

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der inhibitorische Effekt von Niclosamid auf humane  
Pankreaskarzinom-Zelllinien und Analyse der Auswirkungen  
auf den Wnt- und Hedgehog-Signalweg

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Robin Timo Stelling**

aus  
Starnberg

Göttingen 2015

Dekan: **Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

I. Berichterstatterin: **Prof. Dr. med. S. König**

II. Berichterstatter: **Prof. Dr. D. Kube**

III. Berichterstatter: **PD Dr. Dr. A. Neeße**

Tag der mündlichen Prüfung: **10.02.2016**

.

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Der Wnt-Signaltransduktionsweg.....	6
1.3 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg.....	10
1.4 Niclosamid.....	13
1.5 Zielsetzung und Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Gerätschaften.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3 Chemikalien.....	20
2.1.4 Reagenzien-Sets („Kits“ ).....	22
2.1.5 Primer.....	22
2.1.6 Zelllinien.....	23
2.1.6.1 MIA PaCa-2.....	23
2.1.6.2 PANC-1.....	23
2.1.6.3 L3.6pl.....	24
2.1.6.4 HEK 293.....	24
2.2 Software.....	25
2.3 Methoden:.....	25
2.3.1 Zellkultur.....	25
2.3.1.1 Kultivierung der Zellen.....	25
2.3.1.2 Passagieren der Zellen.....	26
2.3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	26
2.3.1.4 Kryokonservierung der Zellen.....	26
2.3.1.5 Revitalisierung der Zellen.....	27
2.3.1.6 Ausplattieren der Zellen.....	27
2.3.1.7 Auszählen der Zellen.....	28
2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	30
2.3.2.1 Annexin-V/Propidiumiodid-Doppelfärbung zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate.....	30
2.3.2.2 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung.....	31
2.3.2.3 Durchflusszytometrie (FACS).....	31
2.3.3 Transwell-Migrationsassay.....	32
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33

2.3.4.1	RNA-Isolierung .....	33
2.3.4.2	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung .....	34
2.3.4.3	cDNA-Synthese .....	34
2.3.4.4	Quantitative real-time PCR .....	34
2.4	Statistik .....	36
3	Ergebnisse .....	37
3.1	Hemmung der Zellproliferation durch Niclosamid und Cyclopamin .....	37
3.2	Detektion der Apoptosen und Nekrosen .....	41
3.3	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid .....	46
3.4	Beeinflussung der Transmigrationskapazität durch Niclosamid .....	48
3.5	Nachweis spezifischer Genexpression mittels qRT-PCR .....	52
3.5.1	Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges .....	52
3.5.2	Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges .....	56
3.5.3	Komponenten des Hedgehog-Signalweges .....	59
4	Diskussion .....	61
4.1	Versuchsbedingungen .....	62
4.1.1	Auswahl der Zelllinien .....	62
4.1.2	Auswahl der Inkubationszeiten und Konzentrationen .....	63
4.2	Einfluss von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zelllinien .....	63
4.2.1	Proliferationshemmung .....	63
4.2.2	Steigerung der Apoptose- und Nekroseraten .....	66
4.2.3	Zellzyklusarrest .....	67
4.2.4	Einfluss auf das Migrationsverhalten .....	69
4.3	Einfluss von Niclosamid auf den Wnt-Signalweg .....	70
4.4	Einfluss von Niclosamid auf den Hedgehog-Signalweg .....	74
4.5	Fazit und Ausblick .....	75
5	Zusammenfassung .....	78
6	Summary .....	80
7	Literaturverzeichnis .....	82

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
AG	Arbeitsgemeinschaft
AML	akute myelotische Leukämie
AP-1	Transkriptionsfaktor-Aktivator-Protein
APC	<i>adenomatous-polyposis-coli</i>
ARP	<i>arginine-rich protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL9	<i>B-cell-lymphoma-9</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CamKII	<i>calcium/calmodulin-dependent kinase II</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-jun	jun-Onkogen
CK1	Casein-Kinase 1
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSC	Tumorstammzellen/ <i>cancer stem cells</i>
dd	doppelt destilliert
DHH	<i>desert hedgehog</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dvl	<i>dishevelled</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS/FCS	<i>fetal bovine serum/fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
<i>g</i>	vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase	postmitotische Präsynthesephase

G2-Phase	prämitotische Postsynthesephase
Gli	Gli-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor
GSK-3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HB	Hepatoblastom
HBC	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HPC	(2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i>
IHH	<i>indian hedgehog</i>
IL8	Interleukin 8
Int-1	<i>integration site</i>
JNK	c-jun N-terminale Kinase
K-Ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LEF/TCF	<i>lymphoid enhancer factor/T-cell factor</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LRP	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
M	Molarität
MLH1	MutL homolog 1
MM	multiples Myelom
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
M-Phase	Mitosephase
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
p16	Protein 16
p53	Protein 53

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
Ptch1	<i>patched</i>
qRT-PCR	quantitative-Real-Time-PCR
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SMAD4/MADH4	<i>Mother against decapentaplegic 4</i>
SMO	<i>smoothened</i>
S-Phase	Synthesephase
STK11	Serine/Threonin Kinase 11
TGF-alpha	<i>Transforming growth factor alpha</i>
VEGF	<i>vascular-endothelial-growth-factor</i>
Wnt	<i>wingless</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Relevante Signalwege für die Entstehung des Pankreaskarzinoms.....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs .....	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs.....	11
Abbildung 4:	Strukturformel des Niclosamids.....	13
Abbildung 5:	Lichtmikroskopische Bilder der verwendeten Zellkulturen .....	29
Abbildung 6:	Hemmung der Zellproliferation nach Inkubation in aufsteigenden Niclosamidkonzentrationen .....	37
Abbildung 7:	Hemmung der Zellproliferation nach Inkubation in aufsteigenden Cyclopaminkonzentrationen .....	39
Abbildung 8:	FACS-Analysen zum Nachweis der Induktion von Apoptose und Nekrose .....	42
Abbildung 9:	Darstellung der dosisabhängigen, prozentualen Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Populationen nach Inkubation mit Niclosamid .....	44
Abbildung 10:	Prozentuale Verteilung der Zellen geordnet nach den jeweiligen Zellzyklus-Phasen	47
Abbildung 11:	Lichtmikroskopische Abbildungen der migrierten Zellen nach Inkubation mit Niclosamid .....	49
Abbildung 12:	Quantitative Auswertung der Inhibition der Migration von MIA PaCa-2 und.....	50
Abbildung 13:	RNA-Expression der Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges.....	53
Abbildung 14:	RNA-Expression der Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges. ....	56
Abbildung 15:	RNA-Expression der Zielgene des Hedgehog-Signalweges.....	59

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Gerätschaften .....	18
Tabelle 2:	verwendete Materialien .....	19
Tabelle 3:	verwendete Chemikalien .....	20
Tabelle 4:	verwendete Reagenzien-Sets .....	22
Tabelle 5:	verwendete Primer.....	22
Tabelle 6:	verwendete Zelllinien.....	23
Tabelle 7:	verwendete Software .....	25
Tabelle 8:	Niclosamid-Versuchsansätze .....	28
Tabelle 9:	Cyclopamin-Versuchsansätze .....	28
Tabelle 10:	Lösungen für die Apoptose- und Nekrosemessungen .....	31
Tabelle 11:	Nicoletti-Lösung .....	31
Tabelle 12:	Reaktionsansatz für die qRT-PCR .....	35
Tabelle 13:	Wnt-Primersequenzen (Eurofins MWG Operon).....	35
Tabelle 14:	Hedgehog-Primersequenzen (Qiagen).....	36
Tabelle 15:	Housekeeping-Primersequenzen (Eurofins MWG Operon) .....	36
Tabelle 16:	Axin 2, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle.....	54
Tabelle 17:	MMP7, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle.....	54
Tabelle 18:	Cyclin D1, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle.....	54
Tabelle 19:	BCL9, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle .....	55
Tabelle 20:	c-jun, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle .....	57
Tabelle 21:	Wnt-5a, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle .....	57

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine der bösartigsten Krebsarten mit einer äußerst schlechten Prognose. Dabei handelt es sich in ca. 95 % aller Fälle um duktale Adenokarzinome des exokrinen Pankreas. Im Jahre 2008 gab es knapp 15.000 Neuerkrankungen, womit das Pankreaskarzinom zu den zehn häufigsten Krebsarten in Deutschland gezählt werden kann. Männer und Frauen sind dabei ungefähr gleichhäufig betroffen. Das altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterbealter liegt seit einigen Jahren gleichbleibend für Männer bei 70 und für Frauen bei 76 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 8 % und für Frauen bei 7 %. Damit zählt der Bauchspeicheldrüsenkrebs zur vierthäufigsten Krebstodesursache in Deutschland und weist die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Robert Koch-Institut 2012). Es wird geschätzt, dass in den USA im Jahr 2012 über 43.000 Patienten neu erkrankten und knapp 38.000 an einem Pankreaskarzinom verstarben. Somit steht das Pankreaskarzinom auch hier an 4. Stelle der Krebserkrankungen (American Cancer Society 2012).

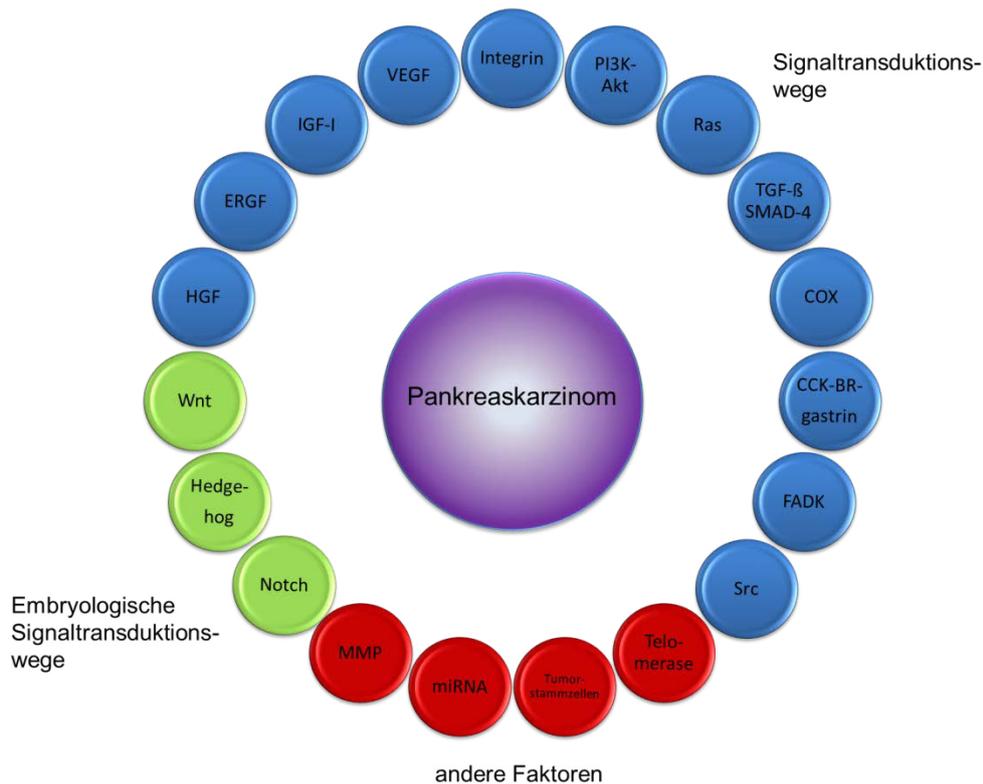
Unabhängig vom Stadium beträgt die mittlere Überlebenszeit nur ca. 4-6 Monate (Niederhuber et al. 1995). Damit entspricht die Inzidenz des Pankreaskarzinoms nahezu der jährlichen Mortalitätsrate, und ein Langzeitüberleben ist die Ausnahme (Robert Koch-Institut 2012). Die schlechte Prognose dieser Tumorerkrankung lässt sich durch das aggressive Wachstum und das Fehlen von spezifischen Frühsymptomen erklären. Dies führt dazu, dass bei bis zu 90 % der Diagnosen ein lokal fortgeschrittener oder bereits metastasierter Befall vorliegt. Außerdem gibt es zurzeit noch keine effektive Screening-Untersuchung, um die Krankheit in einem asymptomatischen Stadium zu diagnostizieren (Lockhart et al. 2005). Dadurch befinden sich nur etwa 20-30 % aller Tumore bei Diagnose in einem resektablen Stadium (Reissfelder et al. 2007).

Als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms werden Ernährungsfaktoren, Lebensgewohnheiten und berufsbedingte Expositionen diskutiert. Da die meisten dieser möglichen Risikofaktoren stark vergesellschaftet sind und es eine große Anzahl von klinischen Studien mit teilweise kontroversen

Ergebnissen gibt, ist es bis dato unklar, in welchem Umfang die verschiedenen Faktoren eine Rolle spielen.

Als weitgehend gesicherte Faktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten Tabakkonsum, Adipositas, eine an tierischen Fetten reiche Ernährung, übermäßiger Alkoholkonsum, eine langjährige chronische Pankreatitis sowie eine positive Familienanamnese (Lowenfels et al. 1993, Lowenfels und Maisonneuve 2006, Hassan et al. 2007). Ein gleichzeitig bestehender Diabetes mellitus wird als Risikofaktor kontrovers diskutiert (Gullo et al. 1994, Everhart und Wright 1995). Bisher konnte nicht ausreichend geklärt werden, welche Umweltfaktoren und beruflich bedingte Schadstoffbelastungen eine Rolle spielen (Robert Koch-Institut 2012). Der regelmäßige Verzehr von Gemüse und Zitrusfrüchten scheint eine protektive Wirkung zu besitzen (Norell et al. 1986).

In neueren Studien zeigt sich auch, dass Angehörige von Risikofamilien oder -gruppen mit einer bekannten genetischen Prädisposition ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms haben (Greer et al. 2009). Zu den genetischen Defekten, die mit der Entstehung eines familiär vererbten Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht werden, zählen unter anderem Keimbahnmutationen in CDKN2A (familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Pankreaskarzinom-Syndrom), BRCA2 (hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom), STK11/LKB1 (Peutz-Jeghers-Syndrom) und MLH1 (hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom) (Jaffee et al. 2002).



**Abbildung 1: Relevante Signalwege für die Entstehung des Pankreaskarzinoms**

Modifiziert nach Wong H und Lemoine 2009, Seite 414

Molekularpathologisch liegen der Tumorentstehung meist eine Vielzahl verschiedener Mutationen zu Grunde, die sich hauptsächlich auf eine Gruppe von zwölf verschiedenen Signalwegen auswirken (Jones et al. 2008) (vgl. Abbildung 1). Das K-Ras-Onkogen aus der Familie der GTP-bindenden Ras-Proteine spielt dabei eine wichtige Rolle. Eine Punktmutation im Codon 12 des K-Ras-Onkogens lässt sich in normalem Pankreasgewebe nur sporadisch nachweisen. Diese Mutation kommt jedoch in nahezu allen duktalem Adenokarzinomen vor (Almoguera et al. 1988, Hruban et al. 1993, Rozenblum et al. 1997). Außerdem kann es zu einer mutationsbedingten Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene wie unter anderem p53, p16 und SMAD4/MADH4 kommen. Im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe liegt beim Pankreaskarzinom eine Überexpression vieler Gene von Wachstumshormonen und deren Rezeptoren vor. So lassen sich erhöhte Spiegel des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), des *transforming growth factor alpha* (TGF-alpha), des *fibroblast growth factor* (FGF), des *insulin-like growth factor I*

(IGF-I), des *nerve growth factor* (NGF), des *hepatocyte growth factor* (HGF) und des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nachweisen (Sirivatanauksorn et al. 1998, Hansel et al. 2003).

Auch eine Reihe anderer Signalwege, die in der Embryogenese des normalen Organismus eine Rolle spielen, kommen neben denen mit Beteiligung des K-Ras-Genes als Auslöser des Pankreaskarzinoms in Frage. So wird dem Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und dem malignen Wachstum des Bauchspeicheldrüsenkrebses zugeschrieben (Berman et al. 2003, Thayer et al. 2003). Ferner konnten in mehr als 65 % der Fälle erhöhte Konzentrationen von  $\beta$ -Catenin, einem Bestandteil des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, in Paraffin-Schnitten aus Tumorgewebe von Patienten mit einem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (Zeng et al. 2006). Diese Befunde wurden auch durch Genanalyse und am Mausmodell bestätigt (Pasca di Magliano et al. 2007). Auch der Notch-Signalweg, welcher eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung, Gewebeproliferation, Differenzierung und Apoptose spielt, konnte in 69 % der Gewebeproben nachgewiesen werden und zeigte eine positive Korrelation mit dem Tumorgrad (Dang et al. 2007). Weiterhin sind auch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Bramhall et al. 1997), Tumorstammzellen (CSC) (Hermann et al. 2007) und eine erhöhte Telomeraseaktivität (Hiyama et al. 1997), neben einer Reihe anderer Faktoren als Gründe für die Tumorentstehung Gegenstand der aktuellen Forschung.

Zu den wichtigsten histologisch unterscheidbaren malignen exokrinen Pankreastumoren gehören das duktale Adenokarzinom, das seröse Zystadenokarzinom, das muzinöse Zystadenokarzinom, das intraduktales papillär-muzinöses Karzinom und das Azinuszellkarzinom (Hamilton und Aaltonen 2000). Das mit 92 % am häufigsten vorkommende duktales Adenokarzinom, ein hochmaligner epithelialer Tumor, imitiert mit seinen atypischen Drüsenformationen in Form und Funktion die mittelgroßen und kleinen Pankreasgänge (Klöppel et al. 2004). Pankreaskarzinome sind zu 65 % im Pankreaskopf, zu 15 % im Pankreaskorpus und zu 10 % im Pankreasschwanz lokalisiert. Weitere 10 % treten multifokal verteilt auf (Ghaneh et al. 2008).

Obwohl in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte in der Erforschung der Tumorbio­logie gemacht werden konnten, haben sich diese neuen Erkenntnisse bisher noch nicht wesentlich auf die Effizienz der Behandlung und die Heilungs- und Überlebensraten ausgewirkt (Jemal et al. 2008). Die einzige potenziell kurative Behandlung des

Pankreaskarzinoms stellt die operative Resektion dar (Javle und Hsueh 2009). Durch eine alleinige Chemo- und/oder Strahlentherapie lässt sich bei einem als resektabel eingeschätzten Pankreaskarzinom keine Heilung erzielen (Doi et al. 2008). Als Standardeingriff für die operative Therapie des Pankreaskopfkarzinoms gilt die Kausch-Whipple-Operation (Weitz et al. 2004). Unabhängig von der Lokalisation des Tumors ist das Ziel immer die Resektion im Gesunden (R0), da hierbei die höchsten Überlebensraten erzielt werden können (Wagner et al. 2004). Als Kontraindikationen für eine Operation gelten Gegebenheiten, die eine R0-Resektion nicht möglich machen. Dazu zählen nachgewiesene Fernmetastasen, Infiltrationen der Mesenterialgefäße und des Truncus coeliacus sowie eine großflächige, tiefreichende, retroperitoneale Infiltration (Varadhachary 2011). Zum einen beträgt aber auch bei mit kurativem Ansatz operierten Patienten die 5-Jahres-Überlebensrate nur 20-30 % (Yang et al. 2005). Zum anderen haben bei Diagnosestellung nur etwa 15-20 % der Patienten einen resektablen, also noch nicht in die umliegenden Strukturen metastasierten Tumorbefall (Yeo et al. 1995).

Eine adjuvante Chemotherapie sollte nach einer R0-Resektion durchgeführt werden. In mehreren Studien konnte ein längeres krankheitsfreies Überleben und eine Steigerung der Gesamtüberlebenszeit durch die adjuvante Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapie erreicht werden (Oettle et al. 2007). Eine adjuvante Radiochemotherapie wird aufgrund der hohen Nebenwirkungen und des mäßigen Benefits nur in Ausnahmefällen durchgeführt. Auch eine alleinige Radio- oder Chemotherapie ohne Operation, eine Radiochemotherapie nach R1-Resektion sowie eine neoadjuvante Strahlen-, Chemo- oder Strahlenchemotherapie ist außerhalb von Studien nicht indiziert (Adler et al. 2007). Die adjuvante Chemotherapie sollte innerhalb von 6 Wochen nach der Operation begonnen und über 6 Monate durchgeführt werden. Dabei ist die Wirkung der beiden zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluorouracil/Folinsäure vergleichbar (Oettle et al. 2007). Auch in der Palliativsituation ist die Chemotherapie der rein supportiven Therapie hinsichtlich Lebensqualität und Überlebensrate überlegen (Yip et al. 2006).

Als Medikament für die Standarderstlinientherapie bei palliativer, systemischer Behandlung des Pankreaskarzinoms eignet sich Gemcitabin (Difluordesoxycytidin) (Burris et al. 1997). Trotz der verbesserten klinischen Situation durch Reduktion von Schmerzen und Gewichtsverlust bleibt die Prognose mit einer 5-Jahres-

Überlebensrate von 3-4 % und einer medianen Überlebenszeit von 4-6 Monaten auch unter einer Therapie mit Gemcitabin äußerst schlecht (Moore M 1996). Auch eine Kombinationstherapie von Gemcitabin mit anderen Medikamenten konnte in Studien bisher keine ausreichenden Vorteile aufzeigen (Adler et al. 2007). So ergab die Kombinationstherapie von Gemcitabin mit Oxaliplatin bzw. mit Cisplatin in Studien den konsistenten Trend zu einem längeren Überleben. In beiden Fällen konnte jedoch, bei erhöhten Raten an Nebenwirkungen, kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Burriss et al. 1997, Louvet et al. 2005). Auch eine Kombination von Gemcitabin mit Fluorouracil (5-FU) ergab keine verbesserte Therapieoption (Berlin et al. 2002). Der einzige statistisch signifikant unterschiedliche Effekt im Überleben zu Gunsten einer Kombinationstherapie konnte in den letzten Jahren bei der Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib aufgezeigt werden, wobei auch hier verstärkt Nebenwirkungen auftraten (Moore MJ et al. 2007, Welch und Moore 2007). Nach einer Studie aus dem Jahr 2011, kann bei günstigem Risikoprofil auch eine Kombination aus 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem FOLFIRINOX-Protokoll für metastasierte Pankreaskarzinome angewendet werden. Dem verlängerten progressionsfreien- und Gesamtüberleben im Vergleich zu Gemcitabin, steht auch hier wieder eine höhere Toxizität entgegen (Conroy et al. 2011).

Aufgrund der nach wie vor sehr schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms wird es in Zukunft sehr wichtig sein, die Screening- und Therapiemethoden zu verbessern. Hoffnung gibt dabei der schnelle Fortschritt im Verständnis über die molekularen Prozesse während der Entwicklung des Pankreaskarzinoms. Dadurch sollten sich Substanzen, die spezifisch in die Signalwege eingreifen, welche das aggressive Wachstum dieses Tumors fördern, besser identifizieren lassen (Li D et al. 2004).

## **1.2 Der Wnt-Signaltransduktionsweg**

Der Wnt-Signalweg gehört zu den wichtigen Signalkaskaden, die bei der physiologischen Embryonalentwicklung in Form von Zellwachstum und Differenzierung eine Rolle spielen (Arce et al. 2006). Der Name des Signalweges leitet sich aus den Bezeichnungen der Gene *wingless* (Drosophila) und *Int-1* (Maus) ab. Das *wingless*-Gen wurde als Segment-Polaritätsgen für die Entwicklung der Flügel in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in den 1970er Jahren entdeckt (Nüsslein-Volhard und

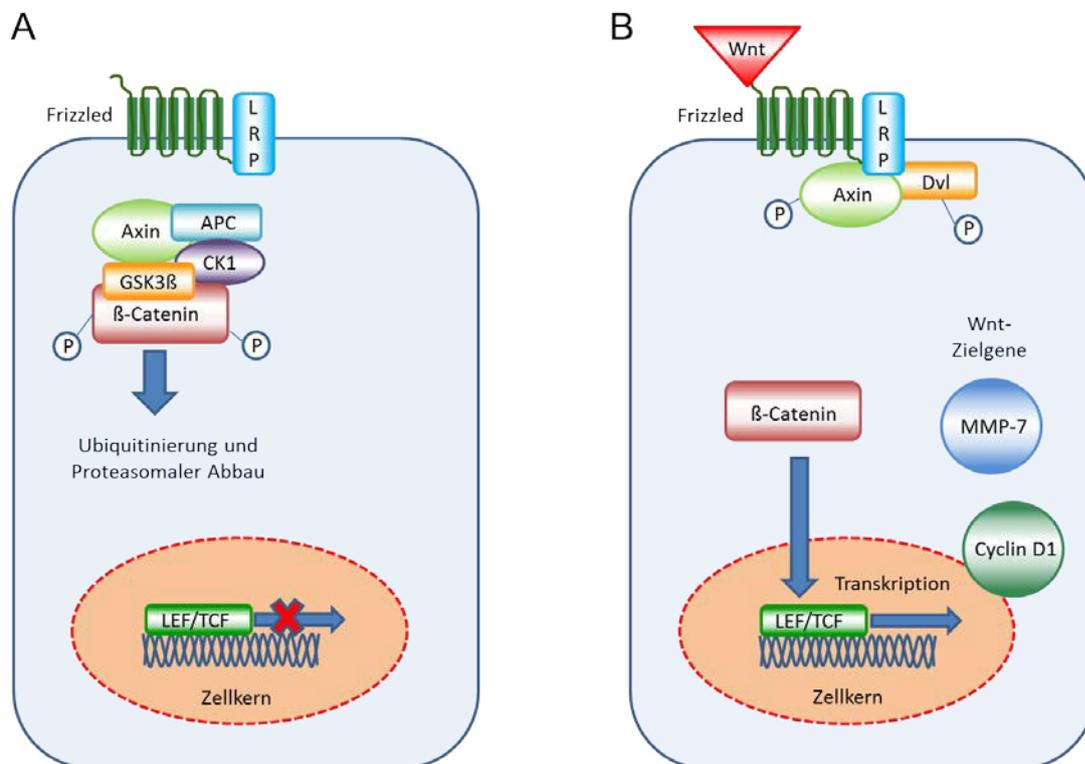
Wieschaus 1980). Eine Mutation in diesem Gen führt zu flügellosen (*wingless*) Organismen (Sharma und Chopra 1975). Als murines Homolog des *wingless*-Gens wurde Int-1 (*integration site*) bei Mensch und Maus in den 1980er Jahren identifiziert. Dieses Protoonkogen fördert bei Mäusen als Integrationsstelle für das *mouse mammary tumor virus* (MMTV) die Entwicklung von Brustkrebs (Nusse und Varmus 1982, Rijsewijk et al. 1987, Uzvölgyi et al. 1988).

Die Wnt-Gene kodieren für Cystein-reiche Signalpeptide mit einer Proteinelänge von ca. 350-400 Aminosäuren. In Vertebraten sind inzwischen 19 verschiedene Wnt-Signalproteine identifiziert worden (Nusse 2005, Clevers 2006). Neben zahlreichen Funktionen in der Organentwicklung spielt der Wnt-Signalweg auch in der Homöostase adulter Gewebe sowie der Krebsentstehung eine Rolle (Logan und Nusse 2004). Eine aktualisierte Auflistung aller Wnt-Komponenten kann auf der Homepage <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> eingesehen werden. Die von den Wnt-Faktoren aktivierten Signalwege können im Allgemeinen in den kanonischen bzw. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, den nicht-kanonischen Signalweg und den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg unterteilt werden. Auf diese Signalkaskaden soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Das Augenmerk liegt dabei auf dem kanonischen Wnt-Signalweg, da dieser in der vorliegenden Promotionsarbeit von hauptsächlichem Interesse ist.

Eine zentrale Bedeutung im kanonischen Wnt-Signalweg hat das Protein  $\beta$ -Catenin. Fehlt die Aktivierung durch den Wnt-Signalweg, wird dieses von einem Degenerationskomplex phosphoryliert und damit zum Abbau markiert. Dieser Multienzymkomplex besteht aus dem Protein Axin oder Conductin/Axin2, dem Tumorsuppressor *adenomatous-polyposis-coli* (APC) sowie den Serin/Threonin-Kinasen Casein-Kinase 1 (CK1) (Amit et al. 2002) und Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Yost et al. 1996). APC fungiert dabei als hemmender Regulator für  $\beta$ -Catenin. Die beiden Kinasen phosphorylieren die Serin/Threonin-Reste an den N-Terminalen von  $\beta$ -Catenin, wodurch dieses der Ubiquitinierung zugeführt und im Proteasom abgebaut wird. Axin spielt eine entscheidende Rolle als Bindungsstelle für die übrigen Bestandteile des Komplexes und verstärkt die Wirkung von GSK-3 $\beta$  (Hart et al. 1998, Logan und Nusse 2004).

In Anwesenheit des Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin vor der Phosphorylierung geschützt, verbleibt aktiv im Zytoplasma und kann nach Translokation in den Zellkern die Trans-

kription kanonischer Wnt-Zielgene initiieren. Dies geschieht, indem ein Wnt-Ligand extrazellulär an den Cystein-reichen N-terminus eines Frizzled-Rezeptors, ein Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor und den Korezeptor *lipoprotein related protein 5/6* (LRP 5/6) bindet (Wehrli et al. 2000). Dies führt zur Hyperphosphorylierung des intrazellulären Proteins *dishevelled* (Dvl) (Wallingford und Habas 2005). Daraufhin bildet Axin ein Heterodimer mit Dvl und bindet an den LRP-Korezeptor. Durch diese Bindung wird Axin abgebaut und es kommt zu einer Dissoziation des Degenerationskomplexes (Mao et al. 2001). Das aktivierte  $\beta$ -Catenin bindet im Zellkern an DNA-Bindungsproteine der *lymphoid enhancer factor/T-cell factor*-(LEF/TCF) Familie (Behrens et al. 1996). Diese wirken in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsrepressoren. Durch die Assoziation mit phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin hingegen bildet sich ein trinärer Komplex, der nach Verdrängung von Korepressoren die Transkription der Wnt-Zielgene initiiert (Daniels und Weis 2005) (vgl. Abbildung 2). Dieser Vorgang wird noch durch Co-Aktivatoren wie *B-cell-lymphoma-9* (BCL9) verstärkt (Brembeck et al. 2004).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs**

(A) In Abwesenheit des Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin abgebaut und die Zielgenexpression somit gehemmt. (B) Die Anwesenheit des Wnt-Signals führt zur Aktivierung des Signalwegs.  $\beta$ -Catenin wird stabilisiert, akkumuliert und aktiviert die Zielgenexpression im Zellkern.

Neben seiner wichtigen Rolle in der embryonalen Entwicklung führt der Wnt-Signalweg auch gehäuft zur Entstehung von Tumoren (Bienz und Clevers 2000). So finden sich bei über 90 % der kolorektalen Karzinome aktivierende Mutationen der Wnt-Signalkaskade, die zu einer Stabilisation von  $\beta$ -Catenin führen (Giles et al. 2003). Auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC), beim Hepatoblastom (HB) (Taniguchi et al. 2005), bei Adenomen und Adenokarzinomen des Magens (Groves et al. 2002) und vielen weiteren soliden Tumoren lassen sich vermehrte Aktivitäten des Wnt-Signalweges beobachten.

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit ist das Pankreaskarzinom. Für dessen Entstehung werden in zahlreichen Studien Mutationen des Wnt-Signalweges aufgeführt (Kornmann et al. 1999, Nawroth et al. 2007, Wang L et al. 2009). So findet sich eine hochregulierte Transkription des Wnt-Zielgens Axin2 (Jho et al. 2002, Lustig et al. 2002, Pasca di Magliano et al. 2007), des Zellzyklusproteins Cyclin D1 (Kornmann et al. 1999, Shtutman et al. 1999), und der Matrix-Metalloprotease-7 (MMP7) (Crawford et al. 2002).

In den letzten Jahren zeigte sich, dass es neben dem klassischen bzw. kanonischen Wnt-Signalweg auch einen nicht-kanonischen,  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt-Signalweg gibt. Dieser wird durch die Klasse der Wnt-5a-Proteine aktiviert (Wong G et al. 1994). Das Wnt-Signal wird hierbei nicht durch phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin, sondern durch Faktoren wie JNK (c-jun N-terminale Kinase), CamKII (*calcium/calmodulin-dependent kinase II*) oder PKC (Proteinkinase C) intrazellulär weitergeleitet (Yamanaka et al. 2002). JNK phosphoryliert daraufhin das Protein c-jun, eine Komponente des AP-1-Proteins (Transkriptionsfaktor-Aktivator-Protein-1), was zu einer Initiation der Transkription führt (Weber et al. 2000).

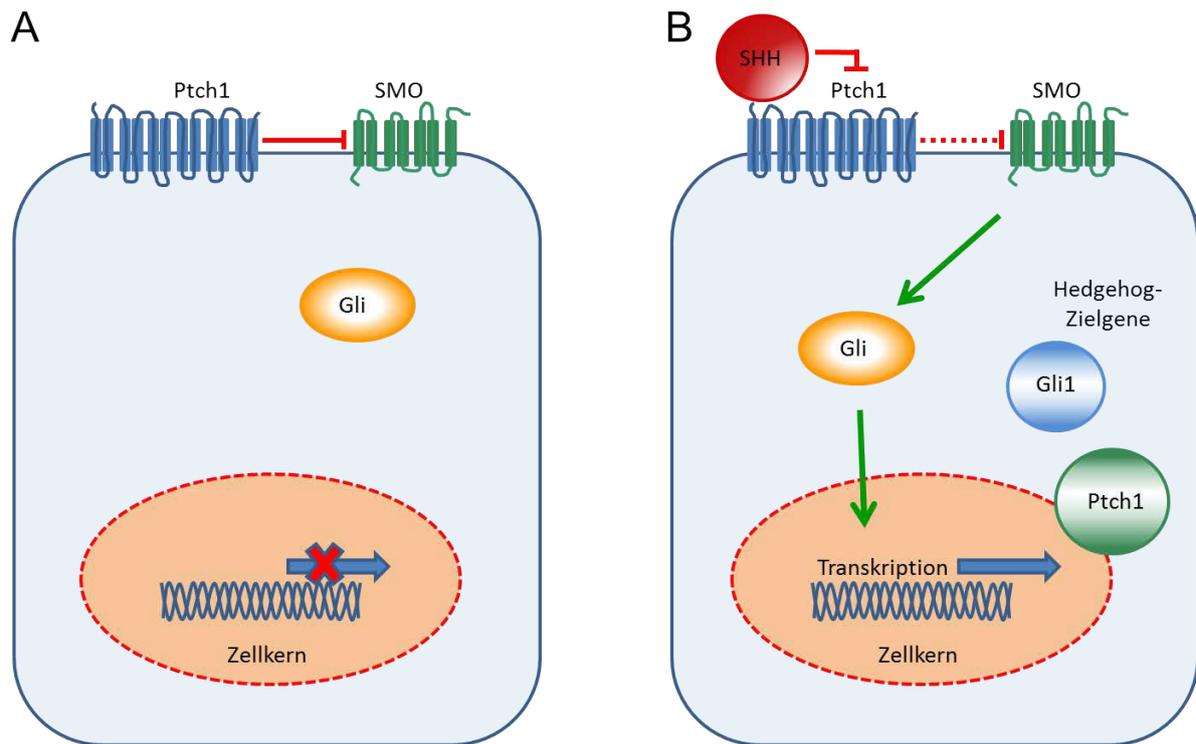
Aktuell scheint die strikte Unterscheidung zwischen einem kanonischen und einem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg veraltet. Vielmehr scheint es Hinweise auf zahlreiche Interaktionen zwischen den Signalwegen (Pukrop und Binder 2008), modulierende Einflüsse verschiedenster Korezeptoren (Teo und Kahn 2010) sowie abweichende Studien bezüglich der Zuordnung einzelner Proteine zu einem der Signalwege zu geben (Mann et al. 1999, Weber et al. 2000).

### 1.3 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg

Hedgehog-Proteine wurden zunächst in *Drosophila melanogaster* im Rahmen eines Mutationsscreenings identifiziert. Dort spielen sie eine wichtige Rolle in der Segmentausbildung während der Embryonalentwicklung und regulieren in eingeschränktem Ausmaß die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen. Wurde das Hedgehog-Gen ausgeschaltet, kam es zu Larvenformen, die im Phänotyp durch eine gedrungene Form und stärkere Behaarung in ihrem Aussehen an einen Igel (englisch: *hedgehog*) erinnerten und so zur Namensgebung führten (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980, Ingham und McMahon 2001, Nieuwenhuis und Hui 2005).

Der Hedgehog-Signalweg ist nach seinem jeweiligen Liganden benannt, wobei in Säugetieren drei dieser Proteine zur Hedgehog-Familie gehören: *sonic hedgehog* (SHH), *indian hedgehog* (IHH) und *desert hedgehog* (DHH) (Sasaki et al. 1999). Das aktive Protein wird von den Hedgehog produzierenden Zellen über einen Dispatched-Rezeptor aus der Zelle sezerniert und bindet an den Zielzellen an *patched* (Ptch1), einem 12-Transmembran-Rezeptorprotein (Burke et al. 1999). In Abwesenheit des Liganden inhibiert Ptch1 die Aktivität von *smoothed* (SMO), einem 7-Transmembranrezeptorprotein mit Ähnlichkeit zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die in Abwesenheit von SHH inhibitorische Wirkung von Ptch1 auf SMO wird durch den Liganden aufgehoben, wodurch die Expression und/oder posttranslationale Prozession der drei Gli-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Gli1 bis Gli3) moduliert wird. Gli1 fungiert dabei als Transkriptionsaktivator und Gli3 als Repressor, wobei Gli2 beide Funktionen innehaben kann. Das Gleichgewicht zwischen den aktivierenden und hemmenden Faktoren bestimmt demnach die Expression der Zielgene (Ruiz i Altaba 1999, Sasaki et al. 1999) (vgl. Abbildung 3).

Dem Hedgehog-Signalweg kommt eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung von Vertebraten und Insekten zu, speziell beim Schließen des Neuralrohres und der Positionierung der Extremitäten bei Anlage des Skeletts (Ingham und McMahon 2001). In den meisten entwickelten Geweben ist er jedoch inaktiviert. In einigen Geweben des adulten Organismus, wie Teilen des Nervensystems und der Lunge jedoch spielt der Hedgehog-Signalweg bei der Erhaltung von Stammzellpopulationen sowie der Gewebereparatur und Geweberegeneration eine Rolle (Watkins et al. 2003, Ahn und Joyner 2005).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs**

(A) In Abwesenheit des Hedgehog-Liganden wird SMO durch Ptch1 gehemmt und die Zielgenexpression vermindert. (B) In Anwesenheit des Hedgehog-Liganden wird die Hemmung von SMO aufgehoben. SMO vermittelt die Stabilisierung von Gli, welches in den Kern transloziert und dort die Transkription der Zielgene katalysiert.

Neben seiner Rolle im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung ist der Hedgehog-Signalweg auch an der Entstehung einer Reihe von Tumoren beteiligt. Ein Zusammenhang zwischen dem Hedgehog-Signalweg und der Krebsentstehung wurde erstmals für das Gorlin-Syndrom (nävoïdes Basalzell-Karzinom) beschrieben. Dieses geht mit einer erhöhten Prädisposition für Medulloblastome, Basalzellkarzinome und Rhabdomyosarkome einher. Zu den genetischen Defekten dieser Krankheit gehört eine Loss-of-function-Mutation von Ptch1, welche durch eine mangelnde Inhibierung von SMO zu einem dauerhaften Proliferationssignal für die Zellen und damit zur Tumorentstehung beiträgt (Hahn et al. 1996, Johnson et al. 1996).

Eine Vielzahl von Tumoren konnte inzwischen mit Veränderungen im Hedgehog-Signalweg in Verbindung gebracht werden (Merchant und Matsui 2010). So wurden Ptch1 und SMO Mutationen in sporadisch aufgetretenen Basalzellkarzinomen (Pietsch et al. 1997, Aszterbaum et al. 1998) und Medulloblastomen (Goodrich et al. 1997) beobachtet. Weiterhin sind Veränderungen im Hedgehog-Signalweg an der

Entstehung des Brustkrebs (Kubo et al. 2004), des Prostatakarzinoms (Karhadkar et al. 2004), des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Watkins et al. 2003), des Ovarialkarzinoms (Bhattacharya et al. 2008), des Melanoms (Stecca et al. 2007) sowie an Tumoren der Leber (Sicklick et al. 2006) beteiligt. Auch bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle (Kayed et al. 2004, Pasca di Magliano et al. 2006, Morton et al. 2007). So konnte in einer Studie in 70 % der humanen Pankreaskarzinom-Gewebeproben eine abweichende SHH Expression im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe beobachtet werden (Thayer et al. 2003).

Ein bekanntes Arzneimittel, welches auf den Hedgehog-Signalweg wirkt, ist Cyclopamin. Dabei handelt es sich um ein steroidales Alkaloid der Lilienpflanze *Veratum californicum*. Es verringert die Aktivität des Signalweges, indem es direkt an SMO bindet und dieses inhibiert (Cooper et al. 1998). Beobachtet wurde dieser Effekt erstmals bei Schafen, die Nachkommen mit nur einem Auge auf die Welt brachten. Durch den Verzehr der Pflanze und Aufnahme des Cyclopamins wurde SMO während der Embryonalentwicklung selektiv inhibiert und es kam somit zu einem Mittel-liniendefekt (Binns et al. 1972). Da die gezielte Blockade von SMO ein wichtiger Ansatz für die Bekämpfung von Tumoren ist, wurde die chemische Struktur von Cyclopamin modifiziert, um so die Spezifität, Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit zu verbessern (Tremblay et al. 2008). Inzwischen ist eine große Anzahl künstlich synthetisierter SMO-Antagonisten bekannt und wurde bereits erfolgreich im Rahmen klinischer Studien, beispielsweise zur Behandlung des Medulloblastoms (GDC-0449) (Rudin et al. 2009) oder Basalzellkarzinom (GDC-0449) (LoRusso et al. 2011) eingesetzt.

## 1.4 Niclosamid

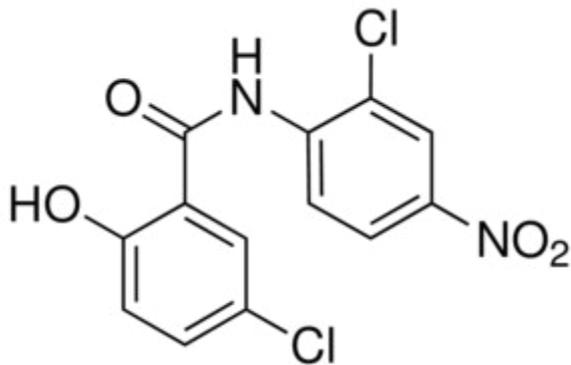


Abbildung 4: Strukturformel des Niclosamids

Bei Niclosamid, dessen systemischer Name 5-Chlor-*N*-(2-chlor-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamid ist, handelt es sich um ein Derivat der Salizylsäure und des Anilins, welche miteinander als Amid verknüpft sind (vgl. Abbildung 4). Das Molekulargewicht beträgt 327,12 g/mol. In Wasser ist Niclosamid quasi unlöslich, die Löslichkeit verbessert sich aber mit steigenden pH-Wert (Devarakonda et al. 2005).

Ursprünglich wurde Niclosamid als Molluskizid in Form eines Salzes mit 2-Aminoethanol verwendet. Dadurch wurde, hauptsächlich in China, die von Wasserschnecken übertragene Bilharziose bekämpft (Dai et al. 2008). Außerdem konnte eine Wirkung gegen die parasitären Überträger der Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei brucei* und *Trypanosoma congolense* beobachtet werden (Merschjohann und Steverding 2008). 1960 wurde Niclosamid unter dem Handelsnamen Yomesan® als Mittel gegen Bandwürmer eingeführt und gilt vor allem gegen *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolopis nana* und *Diphyllobotrium* als wirksam (Barth 2009). Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht aufgeklärt; es bestehen jedoch verschiedene Theorien (Imming et al. 2006). Niclosamid soll zum einen die Glukose-Aufnahme hemmen und in den Kohlenhydratstoffwechsel des Parasiten eingreifen, indem es die Glykolyse fördert und den Zitronensäurezyklus hemmt, wodurch die Laktatkonzentration ansteigt (Lüllmann et al. 2006, Barth 2009). Ferner wird die oxidative Phosphorylierung entkoppelt und die ATP-Bildung gehemmt, wodurch die Bandwürmer empfindlicher gegen proteolytische Enzyme des Magen-Darm Traktes werden (Weinbach und Garbus 1969).

Aufgrund seiner sehr geringen oralen Bioverfügbarkeit hat Niclosamid keine relevante systemische Wirkung auf Säugetiere und eignet sich somit gut zur

topischen Bekämpfung von Parasiten im Magen-Darm-Trakt (Merschjohann und Steverding 2008). Als einzige Nebenwirkungen wurden in seltenen Fällen Übelkeit, Brechreiz und Abdominalschmerzen angegeben (Lüllmann et al. 2006, Barth 2009).

Infolge der SARS (*severe acute respiratory syndrome*) -Epidemie von November 2002 bis Juni 2003, deren Ausbruch in Hong Kong stattfand, wurden neue antivirale Medikamente erforscht. Dabei zeigte sich, dass Niclosamid eine inhibitorische Wirkung auf die Replikation der SARS-assoziierten Coronaviren besitzt (Wu CJ et al. 2004, Chang et al. 2006, De Clercq 2006). Zu den neuesten Erkenntnissen gehört auch der antivirulente Effekt von Niclosamid als Inhibitor des Quorum sensing von *Pseudomonas aeruginosa*, einem Bakterium mit ausgeprägten Resistenzen gegen Antibiotika (Imperi et al. 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Niclosamid die Funktion von dendritischen Zellen beeinflusst. Dies weist hin auf ein gänzlich neues, immunpharmakologisches Wirkungsspektrum und einen möglichen Therapieansatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Wu CS et al. 2014).

In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Veröffentlichungen nachgewiesen werden, dass Niclosamid auf eine große Anzahl von Tumoren wirkt. Dabei wurden verschiedene Wirkungsmechanismen und Effekte auf Signalwege aufgezeigt. So konnten proliferationshemmende Effekte bei Zellen hämatologischer Krebserkrankungen wie der akuten myelotischen Leukämie (AML) (Jin et al. 2010) und dem multiplen Myelom (MM) (Khanim et al. 2011) beobachtet werden. Auch auf solide Tumore wie das kolorektale Karzinom (Ren et al. 2010, Osada et al. 2011, Sack et al. 2011), das Prostatakarzinom (Ren et al. 2010, Lu et al. 2011, Liu et al. 2014), das Mammakarzinom (Balgı et al. 2009, Lu et al. 2011, Wang Y et al. 2013, Londono-Joshi et al. 2014), das Cervixkarzinom (Ren et al. 2010), dem Ovarialkarzinom (Yo et al. 2012, Arend et al. 2014), das Glioblastom (Wieland et al. 2013), das Leiomyom (Ono et al. 2014) und das Adenokarzinom der Lunge (Ren et al. 2010) zeigte Niclosamid eine wachstumshemmende Wirkung. Neben der Monotherapie konnten auch synergistische Effekte mit Chemotherapeutika wie Cytrabin, Etoposid und Daunorubicin bei der AML (Jin et al. 2010) und Oxaliplatin bei kolorektalen Karzinomzellen beobachtet werden (Osada et al. 2011). Weiterhin gibt es Anzeichen, dass Niclosamid als Kombinationstherapie die Resistenzen des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms auf Erlotinib verringert (Li R et al. 2013). Auf normale Körperzellen hingegen scheint Niclosamid keine relevante Wirkung zu haben (Jin et al. 2010, Osada et al. 2011).

Niclosamid inhibiert den zuvor beschriebenen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (vgl. Kapitel 1.2). Verschiedene Komponenten dieses Signalweges dienen dabei als Angriffspunkte. So fördert Niclosamid die Internalisierung des Frizzled1-Rezeptors, vermindert die Expression des Dishevelled-2-Proteins und inhibiert die  $\beta$ -Catenin Stabilisierung (Chen et al. 2009). Außerdem unterdrückt es die Expression von LRP6, einem essentiellen Wnt-Korezeptor (Lu et al. 2011). Der Wirkmechanismus, der zur Blockade des Wnt-Signalweges führt, scheint ein anderer zu sein als derjenige, der für die anthelmintische Aktivität verantwortlich ist (Mook et al. 2013).

Weiterhin inhibiert Niclosamid den Notch-Signalweg durch eine verringerte Expression des Notch1-Rezeptors und seiner Zielgene in K562 Leukämiezellen (Wang A et al. 2009). Darüber hinaus berichtet Ren et al. 2010 von einer Inhibierung des STAT3-Signalweges und einer damit einhergehenden Proliferationshemmung, Apoptose Steigerung und einem Zellzyklusarrest der STAT3-aktiven Zelllinien. Außerdem hemmt es den mTORC1-Signalweg mit einhergehender gesteigerter Autophagozytose (Balgi et al. 2009, Fonseca et al. 2012) sowie den NF- $\kappa$ B Signalweg in AML Zellen (Jin et al. 2010). Das S100A4-Protein spielt eine wichtige Rolle für das Metastasierungsverhalten entarteter Zellen (Boye und Mælandsmo 2010). Niclosamid wirkt auf dieses Protein und führt so in der Boyden-Kammer zu einer verringerten Migrations- und Invasionsrate der behandelten Zellen (Sack et al. 2011). Für die AML konnte eine Wirkung auf Ebene der Tumorstammzellen gezeigt werden (Jin et al. 2010, Osada et al. 2011). Diese stellen einen wichtigen prognostischen Faktor für die metastatische Aktivität des Tumors dar (Hermann et al. 2007). Von mehreren Arbeitsgruppen wurde eine vermehrte Apoptose der entarteten Zellen beobachtet (Jin et al. 2010, Khanim et al. 2011, Osada et al. 2011). Eine Reduktion des Tumorwachstums (Jin et al. 2010, Osada et al. 2011) und Verringerung des Metastasierungsverhaltens durch Niclosamid (Sack et al. 2011), konnte auch *in vivo* nach Xenotransplantation von Leukämiezellen und Kolonkarzinomzellen in Mäuse und nachfolgender Beimpfung mit dem Medikament aufgezeigt werden. Bei Untersuchungen an humanen Mitochondrien konnte festgestellt werden, dass Niclosamid einen Abfall des Membranpotentials bewirkt und die oxidative Phosphorylierung entkoppelt sowie eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies begünstigt. Außerdem konnte die Produktion von freien Leichtketten gehemmt werden, welche ein Hauptgrund für Niereninsuffizienz bei Patienten mit MM sind (Jin et al. 2010, Khanim et al. 2011).

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die bestehenden, in der Klinik etablierten medikamentösen Therapien haben einen nachgewiesenen Effekt auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit einem Pankreaskarzinom. Die Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen ist jedoch sehr limitiert und beschränkt sich auf eine Anwendung im Rahmen einer adjuvanten oder palliativen Therapie. Die insgesamt sehr schlechte Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom kann somit bisher nur unwesentlich beeinflusst werden (vgl. Kapitel 1.1). Die Identifikation weiterer Substanzen für eine gezielte Chemotherapie könnte zukünftig Therapieoptionen möglicherweise verbessern (Jemal et al. 2008). Als Ansatzpunkt gilt dabei das Verständnis über die für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms relevanten Signaltransduktionswege sowie die Möglichkeit diese zu beeinflussen (Mook et al. 2013). Mit Niclosamid haben wir uns für eine Substanz entschieden, die schon seit langem in ganz unterschiedlichen Therapiebereichen Verwendung findet. In den letzten Jahren wurde vermehrt die chemotherapeutische Wirkung von Niclosamid auf verschiedene andere maligne Tumore beschrieben. Auch konnte bereits eine Interaktion von Niclosamid mit den an der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms beteiligten Signaltransduktionswegen Wnt und Hedgehog in anderen Tumor-Zelllinien nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.4).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *In vitro*-Wirkung von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zelllinien. Dabei richtet sich ein besonderer Fokus auf die Interaktion der Substanz mit dem Wnt- und Hedgehog-Signalweg. Die Relevanz dieses Forschungsprojektes ergibt sich aus der geringen Wirksamkeit der bestehenden Therapien mit 5-Jahres-Überlebensraten von nur 7-8 % (Robert Koch-Institut 2012) und der damit verbundenen Notwendigkeit, neue chemotherapeutisch wirksame Substanzen zu identifizieren.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden folgende 6 Fragestellungen untersucht:

1. Inhibiert Niclosamid abhängig von der eingesetzten Dosis das Wachstum bzw. die Proliferation von Pankreaskarzinom-Zellen?
2. Welchen Effekt weist Niclosamid bezüglich Frage 1 im Vergleich zum bekannten Hedgehog-Inhibitor Cyclopamin auf?
3. Hat Niclosamid eine zytotoxische Wirkung als Zelltod-induzierendes Agens (Apoptose vs. Nekrose)?

4. Bewirkt Niclosamid einen Zellzyklusarrest und an welchen Punkten des Zellzyklus greift es ein?
5. Wie wirkt sich Niclosamid auf das Migrationsverhalten und das damit einhergehende metastatische Potential der Tumorzellen aus?
6. Gibt es Veränderungen des Wnt- und Hedgehog-Netzwerkes durch eine Inkubation mit Niclosamid und auf welcher Ebene der Signaltransduktion sind diese nachweisbar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Gerätschaften

Tabelle 1: verwendete Gerätschaften

Gerätschaft	Hersteller	
BD FACS Contro™II Flow Cytometer	BD Bioscience	Heidelberg
Begasungsbrutschrank BB 6060, BB6220	Heraeus	Hanau
C 1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc	München
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories Inc	München
Durchlichtmikroskop Axioskop 2 Plus	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena
Durchlichtmikroskop Leica DFC 350 FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Durchlichtmikroskop Leica DM IRBE	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Einfach-Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Eismaschine	Ziegra	Isernhagen
Farbkamera Leica DC 100	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Feinwaage	Sartorius	Göttingen
Heizblock HLC HTM 130	HCL-Haep-Labor-Consult	Bovenden
Kühl-/Gefrierschränke 4°C	Robert Bosch Hausgeräte GmbH	Gerlingen
-20°C	Liebherr	Biberach
-80°C	SANYO	Wiesloch
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop Technologies	Wilmington, USA
pH Meter, pH S38	WTW Wissenschaftlich Technische Werkstätten	Weilheim
Pipettierhilfe accu-jet	Brand	Wertheim

<b>Gerätschaft</b>	<b>Hersteller</b>	
Sterilbank HERAsafe	Heraeus	Hanau
Stickstofftank GT 100	Schütt-biotec GmbH	Göttingen
T-1 Thermocycler	Biometra	Göttingen
Thermometer	Roth	Karlsruhe
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	WISA	Wuppertal
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph	Schwabach
Wasserbad 1012	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel
Zählkammer nach Neubauer	LO Laboroptik Ltd	Friedrichsdorf
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus	Hanau
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus	Hanau

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: verwendete Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	
24-Well Millicell® Hanging Cell Culture Inserts 8,0 µm	Millipore	Billerica, USA
6-Well-Zellkulturplatten, Cellstar	Greiner bio-one	Frickenhausen
Auslaufpipetten (2 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl)	Starlab	Hamburg
BD Falcon™, 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	BD Bioscience	Heidelberg
BD Microlance™	Beckton Dickinson	Fraga, Spanien
Deckgläser 24x48 mm	Menzel-Gläser	Braunschweig
Falcon-Tubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Filter Tips	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Gewebekulturflaschen T-25-Flask/T-75-Flask	Starlab/Cyto-one	Hamburg

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc	Penfield, USA
Multi®-Safe Seal® Tubes, farblos 1,5/1,7 ml	Carl Roth GmbH und Co KG	Karlsruhe
Multiplate™ 96-Well unskirted PCR Plates	BIORAD	Hercules, CA
Objektträger 76x26 mm	Menzel-Gläser	Braunschweig
Pasteur Pipetten 150 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR	Bamberg
PCR Tube Strip, Flat Cap Strips	BIORAD	Hercules, CA
PCR Tubes 0,2 ml, gemischte Farben	Biozym	Hess. Oldendorf
Rotilabo® Spitzenfilter, CA, steril, Porengröße 0,2 µm	Carl Roth GmbH und Co KG	Karlsruhe
Skalpell (Gr. 10)	Dahlhausen	Köln
Spritzen, Ecoject® 20 ml, 5 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Wattestäbchen, kleiner Kopf	Karl Beese GmbH	Barsbüttel
Zellkulturschalen	Sarstedt	Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 3: verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	
DMEM	Biochroma	Berlin
20x TE Puffer, RNase-frei	Invitrogen	Paisley, UK
Annexin-V-Fluos-Markierungslösung	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
CaCl <sub>2</sub> Calciumchlorid-2-hydrat	Merck	Darmstadt
Chloroform	Merck-Schuchard	Hohenbrunn
Cyclopamine, 5 mg, Purity >99 %	Selleck	München
DMEM/F12	Life Technologies GmbH	Frankfurt

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	
DMSO Dimethylsulfoxid	Merck	Darmstadt
Ethanol 642	Dr. Ing. W. Frohn GmbH	München
Ethanol Rotipuran® ≥99,8 %	Roth	Karlsruhe
Fibronectin	Biochrom AG	Berlin
Foetal Bovine Serum	Fresenius Biotech GmbH	Gräfelfing
Hepes 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	SIGMA-Aldrich	Steinheim
HPC (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin	SIGMA-Aldrich	Steinheim
L-Glutamin	Biochrom AG	Berlin
NaCl Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
NaOH Natronlauge	Merck	Darmstadt
Natriumcitrat-2-hydrat	Sigma-Aldrich	Steinheim
Niclosamid	SIGMA Life Science	Steinheim
PBS pH 7.4	Invitrogen	Paisley, UK
Penicillin Streptomycin	Invitrogen	Paisley, UK
peqGOLD Trifast™	peqlab	Erlangen
Propanol Prophylalkohol	SIGMA-Aldrich	Ayrshire, UK
Propidiumiodid	Appllichem GmbH	Darmstadt
RNAse-freies Wasser	SIGMA-Aldrich	Ayrshire, UK
RPMI-1640-Medium	SIGMA-Aldrich	Ayrshire, UK
Triton X 100	Merck	Darmstadt, Germany
Trypanblau	SIGMA	Steinheim
Trypsin-EDTA (10x)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
VEGF	R&D Systems GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt

## 2.1.4 Reagenzien-Sets („Kits“)

Tabelle 4: verwendete Reagenzien-Sets

Reagenzien-Set	Hersteller	
Quanti Tect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH	Hilden
Diff-Quick Färbeset 130832	Medion Diagnostics	Düdingen, Schweiz
IQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc.	München
iScript™ cDNA-Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories Inc.	München

## 2.1.5 Primer

Tabelle 5: verwendete Primer

Name	Spezies	Signalweg	Herkunft
ARP	human		Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Axin2	human	Wnt	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
BCL9	human	Wnt	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
c-jun	human	Wnt	AG Pukrop (Universitätsmedizin Göttingen)
Cyclin D1	human	Wnt	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Gli1	human	Hedgehog	Qiagen
HPRT	human		Eurofins MWG Operon, Ebersberg
MMP7	human	Wnt	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PDGF	human		Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Ptch1	human	Hedgehog	Qiagen
SHH	human	Hedgehog	Qiagen
SMO	human	Hedgehog	Qiagen

Name	Spezies	Signalweg	Herkunft
Wnt5a	human	Wnt	AG Pukrop (Universitätsmedizin Göttingen)

## 2.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: verwendete Zelllinien

Name	Spezies	Quelle	Herkunft	Referenz
HEK 293	human		AG Hahn (Universitätsmedizin Göttingen)	Graham und van der Eb 1973
Humane Fibroblasten	human	Antragsnummer: 26/9/05	AG Schirmer (Universitätsmedizin Göttingen)	
L3.6pl	human		AG Alves (Universitätsmedizin Göttingen)	Bruns et al. 1999
MIA PaCa-2	human	CRL-1420	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA	Yunis et al. 1977
Panc-1	human	CRL-1469	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA	Lieber et al. 1975

### 2.1.6.1 MIA PaCa-2

Die Zelllinie wurde 1977 von A. Yunis et al. an den Departments of Medicine and Biochemistry, University of Miami School of Medicine und dem Howard Hughes Medical Institute, Miami, Florida, USA etabliert. Die Zellen wurden aus dem Pankreastumorgewebe eines 65-jährigen kaukasischen männlichen Patienten gewonnen und seitdem für *In vitro*-Studien verwendet. Bei der Zelllinie MIA PaCa-2 handelt es sich morphologisch um epithelähnliche Zellen, welche ihren Ursprung in einem undifferenzierten, duktalem Pankreaskarzinom haben. Sie wachsen adhärent als Monolayer am Boden der Gewebekulturflaschen bis zur Konfluenz, wobei ein gewisser Anteil der Zellen frei in der Suspension schwimmt. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 40 Stunden (Yunis et al. 1977).

### 2.1.6.2 PANC-1

Die PANC-1-Zelllinie wurde 1975 von Lieber et al. am Viral Leukemia and Lymphoma Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 20014;

Meloy Laboratories, Inc., 6715 Electronic Drive, Springfield, Va. 22151 etabliert. Die Zellen stammen aus dem undifferenzierten Pankreaskarzinom eines 56-jährigen männlichen kaukasischen Patienten. Es handelt sich morphologisch dabei um epithelähnliche Zellen, die Kolonien bilden. Die Zellen wachsen als Monolayer bis zur Konfluenz und ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 56 Stunden (Lieber et al. 1975).

#### 2.1.6.3 **L3.6pl**

Bei der L3.6pl-Zelllinie handelt es sich um eine metastatische Variante der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie COLO 357. Diese besteht aus Pankreaskarzinom-Zellen eines lokal in die zöliakalen Lymphknoten fortgeschrittenen, nicht metastasierten Pankreaskopfkarzinoms (Morgan et al. 1980). Eine schnellwachsende Variante dieser Zelllinie wurde in die Milz von Nacktmäusen injiziert und im Anschluss die aus Lebermetastasen der Mäuse gewonnenen und isolierten Zellen als L3.3-Zelllinie deklariert (Vezeridis et al. 1992). Diese L3.3-Zelllinie wurde nun erneut in die Milz von Nacktmäusen injiziert und wiederum aus der Leber metastatische Zellen gewonnen. So erhielt man die Zelllinie L3.4pl. Dieser Vorgang der Pankreaszellinjektion wurde noch zwei weitere Male wiederholt und die so gewonnenen Zellen als L3.6pl-Zelllinie in Kultur gebracht. Dabei steht pl für „*pancreas-liver*“. Im Vergleich zu den COLO 357 Ursprungszellen, zeigen die L3.6pl-Zellen ein stärkeres Metastasierungsverhalten, eine stärkere Ausprägung der proangiogenetischen Faktoren VEGF, bFGF und IL8 sowie eine verminderte Expression von E-cadherin (Bruns et al. 1999).

#### 2.1.6.4 **HEK 293**

Bei der HEK 293-Zelllinie handelt es sich um ein Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kidney). Diese wurde mit DNA-Fragmenten des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen. Entwickelt wurde die Zelllinie von van der Eb 1973 an der Universität Leiden (Graham und van der Eb 1973, Graham und Smiley 1977). Parallel zu den Pankreaskarzinom-Zellen wurde diese Zelllinie in den Versuchen verwendet, um eine Positivkontrolle für die Aktivität des Wnt-Signalwegs zu haben (Kim et al. 2008). Die Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Hahn, Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen, zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Software

Tabelle 7: verwendete Software

Verwendete Software	Hersteller	
Microsoft Office 2010	Microsoft	Redmond, USA
CFX Manager™	Bio-Rad Laboratories Inc	München
Leica FW 4000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
ImageJ Launcher 1.4.3.67	Wayne Rasband Research Services Branch, National Institute of Mental Health	Bethesda, Maryland, USA
NanoDrop ND-1000 V3.5.2	Nano Drop Technologies	Wilmington, USA
BD FACS Diva, Version 6.1.3	BD Bioscience	Heidelberg

## 2.3 Methoden:

### 2.3.1 Zellkultur

#### 2.3.1.1 Kultivierung der Zellen

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zur Kultivierung der Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 und PANC-1, der metastatischen Pankreaskarzinom-Zelllinie L3.6pl sowie der transformierten menschlichen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 wurde das Zellkulturmedium RPMI-1640, für die humanen Fibroblasten-Zellen Zellkulturmedium DMEM-F12 benutzt. Dem RPMI-1640-Medium wurden jeweils 10 % fetales Kälberserum, 1 % L-Glutamin und 1 % aus gleichen Teilen bestehendes Penicillin-Streptomycin-Gemisch zugefügt. In T-75-Gewebekulturflaschen wurden jeweils 20 ml dieses Kulturmediums mit den jeweiligen Zellen aufgenommen. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden die Gewebekulturflaschen entsprechend der Empfehlungen in einem Brutschrank bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einer konstanten CO<sub>2</sub>-Zufuhr von 5 % kultiviert.

Die Zelllinien wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Verunreinigungen oder Zelluntergang untersucht. Dabei zeigten die Zellen ein konfluierendes und adhärentes Wachstumsverhalten.

### 2.3.1.2 Passagieren der Zellen

Nach ca. drei bis vier Tagen erreichten die Pankreaskarzinom-Zellen der drei verschiedenen Zelllinien nahezu volle Konfluenz am Flaschenboden und wurden daraufhin geerntet und gesplittet. Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Bei MIA PaCa-2 wurden - wegen der großen Anzahl frei im Kulturmedium schwimmender Zellen - jeweils 5 ml des alten Mediums mit in die neuen Gewebekulturflaschen überführt. Danach wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/EDTA überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert, bis sich durch leichtes Klopfen auf den Flaschenboden ein Großteil der Zellen gelöst hatte. Der Trypsinierungsprozess wurde durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen in ein Falcon-Tube überführt und zentrifugiert (5 min, 102 g, RT). Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet am Boden erneut resuspendiert, mehrfach mit einer Pipette durchmischt und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in 20 ml frischem, vorgewärmtem Kulturmedium wieder in Kultur gebracht.

### 2.3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurde die Anzahl der sich in Suspension befindenden Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gemischt, ein 10 µl großer Tropfen unter das Deckplättchen der Zählkammer gegeben und die Zellen in den vier Großquadranten lichtmikroskopisch gezählt. Die Zellzahl der Probe errechnete sich folgendermaßen:

**Mittelwert aus der Zellzahl der vier Quadranten x 10.000 x Verdünnungsfaktor (ml) = Zellzahl pro Milliliter.**

Durch Eindringen des blauen Farbstoffes konnten tote Zellen ermittelt und damit die Vitalität bestimmt werden.

### 2.3.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Um für die verschiedenen Versuchsreihen stets ausreichend Zellen einer niedrigen Passage aufweisen zu können, wurden zu Beginn der Experimente eine große Anzahl Zellen der gleichen Passage aliquotiert und eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Tube überführt und mit 102 g für 7 min zentrifugiert. Der Kulturmedium-Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 900 µl FCS und 100 µl DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde zum

langsamen Abkühlen für 4 Stunden in einer mit Isopropanolgefüllten Kryobox bei -80°C aufbewahrt und anschließend bei -196°C zur dauerhaften Lagerung im Stickstofftank tiefgefroren.

#### **2.3.1.5 Revitalisierung der Zellen**

Um stets gleiche Versuchsbedingungen zu haben, wurden die Zellen höchstens bis zur 15. Passage verwendet und dann durch neue Zellen aus dem Stickstofftank ersetzt. Zum Revitalisieren der Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen kurz im Wasserbad angetaut und die Zellsuspension zügig in einem 50 ml Falcon-Tube mit Kulturmedium gemischt. Dieses wurde mit 102 g für 7 min zentrifugiert und um das zytotoxische DMSO zu entfernen der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde erneut in Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium noch einmal gewechselt, um nicht angeheftete Zellen und mögliche Reste des DMSO zu entfernen.

#### **2.3.1.6 Ausplattieren der Zellen**

Der antiproliferative Effekt des Niclosamid wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden untersucht. Nach Bestimmung der Zellzahl pro 1 ml wurden jeweils  $2,4 \times 10^4$  Zellen zusammen mit 3 ml des entsprechenden Kulturmediums in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden für 24 Stunden zum Inkubieren im Brutschrank aufbewahrt. Die Zellen zeigten nach der Inkubation wieder ein adhärenthes, konfluierendes Wachstum am Boden der Wells. Das Kulturmedium wurde erneuert, bei MIA PaCa-2 jedoch 1 ml des alten Kulturmediums belassen. Anschließend wurden die Wells nach dem jeweiligen Pipettierschema mit Niclosamid beimpft. Dieses wurde zuvor mit der Feinwaage abgewogen, in der Trägersubstanz DMSO durch Vermengung mit dem Vortexmischer gelöst und Stammlösungen mit der Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  erstellt. Diese wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Je nach Versuch wurden jeweils in 2 Wells der 6-Well-Zellkulturplatten Niclosamid Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  gegeben. Als Negativkontrolle wurden jeweils 2 Wells mit 0,9  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  und 9  $\mu\text{l}$  DMSO beimpft. Zwei weitere Wells blieben jeweils unbehandelt und dienten als Zellkontrolle (vgl. Tabelle 8).

**Tabelle 8: Niclosamid-Versuchsansätze**

Niclosamid-Stammlösungen	Zielkonzentrationen	Ansatz
0,1 mM	0,1 µM	3,0 µl + 2997,0 µl Medium
1,0 mM	0,5 µM	1,5 µl + 2998,5 µl Medium
1,0 mM	1,0 µM	3,0 µl + 2997,0 µl Medium
10,0 mM	3,0 µM	0,9 µl + 2999,1 µl Medium
10,0 mM	10,0 µM	3,0 µl + 2997,0 µl Medium
10,0 mM	30,0 µM	9,0 µl + 2991,0 µl Medium

Nach Zugabe von Niclosamid wurden die Zellkulturplatten wiederum für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für die Versuche zur Hemmung der Proliferation mit Cyclopamin wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen. Um das pulverförmige Cyclopamin in Lösung zu bringen, wurde eine vorher berechnete Menge eines 45 %-igen HBC/PBS-Gemisches als Trägersubstanz zugegeben (4860 µl HBC/PBS auf 5 mg Cyclopamin). Das Gemisch wurde für 60 min bei 65°C bis zur vollständigen Lösung des Pulvers erhitzt. Die 2,5 µmol Cyclopamin-Stammlösung wurde nach folgendem Pipettierschema eingesetzt (vgl. Tabelle 9):

**Tabelle 9: Cyclopamin-Versuchsansätze**

Cyclopamin-Stammlösung	Zielkonzentrationen	Ansatz
2,5 mM	1 µM	1,2 µl + 2998,8 µl Medium
	10 µM	12,0 µl + 2988,0 µl Medium
	25 µM	30,0 µl + 2970,0 µl Medium
	50 µM	60,0 µl + 2940,0 µl Medium

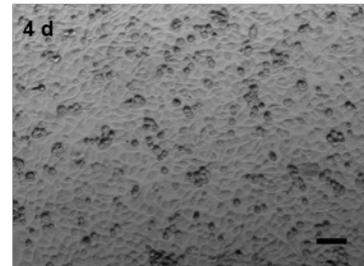
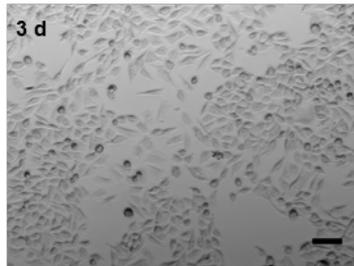
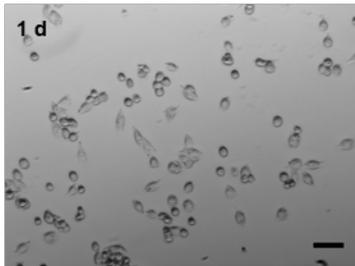
Bei der Versuchsreihe mit Cyclopamin wurden nur  $4 \times 10^3$  Zellen pro Well ausplattiert, diese aber für 48 Stunden mit dem Medikament inkubiert.

### 2.3.1.7 Auszählen der Zellen

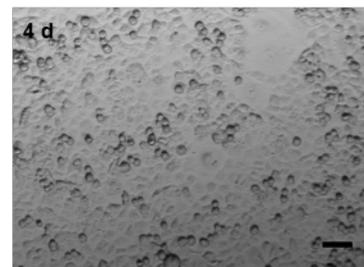
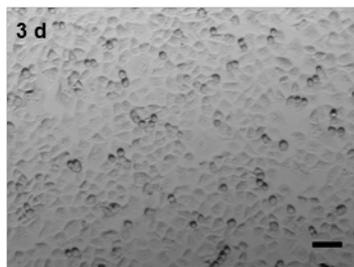
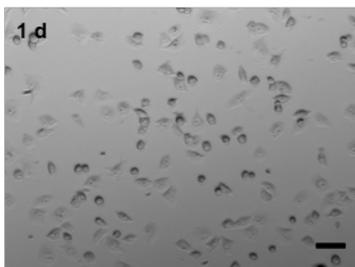
Das Kulturmedium wurde aus den einzelnen Wells abgesaugt und die adhärenen Zellen zwei Mal mit PBS gespült, um die abgestorbenen Zellen auszuwaschen. Danach wurden jeweils 300 µl Trypsin auf die Zellen gegeben und diese für 5 min im Brutschrank inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium gestoppt und die sich nun in Suspension befindlichen Zellen in Falcon-Tubes überführt. Diese wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 250-400 µl Kulturmedium - je nach Pelletgröße - wieder in Suspension

gebracht. Anschließend wurde die Zellzahl pro Well mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Direkt vor der Auszählung wurde jedem Falcon-Tube die entsprechende Menge Trypanblau zugefügt, so dass ein 1:2 Verhältnis von Trypanblau und Kulturmedium entstand. Durch mehrfaches Durchmischen mit der Pipette wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sichergestellt.

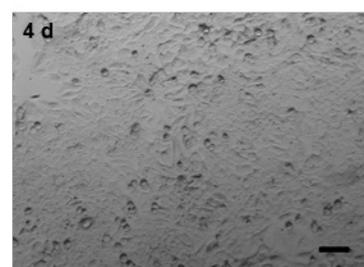
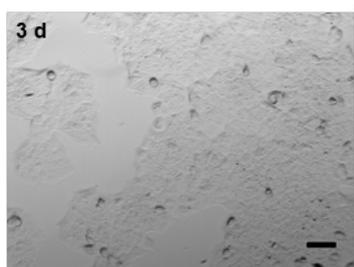
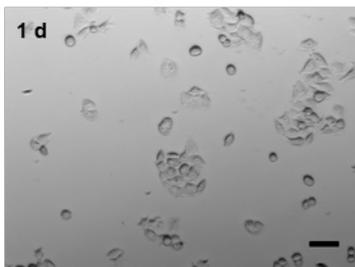
### A: MIA Paca-2



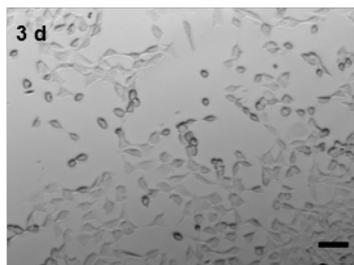
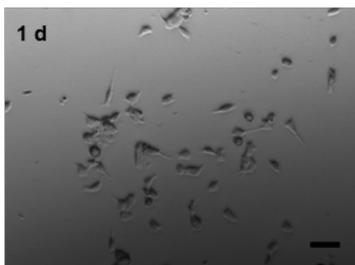
### B: Panc-1



### C: L3.6pl



### D: HEK 293



**Abbildung 5: Lichtmikroskopische Bilder der verwendeten Zellkulturen**

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 (A), Panc-1 (B) und L3.6pl (C) sowie die transformierte menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK 293 (D) wurden in RPMI-1640 Kulturmedium

angezüchtet und kurz vor Erreichen der vollen Konfluenz nach 3-4 Tagen gesplittet. Die Zelllinien wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Verunreinigungen oder Zelluntergang untersucht. Originalvergrößerung 10x, Maßstabsskala= 500  $\mu$ M

Die verschiedenen Zelllinien wurden nach dem Auftauen in 75 ml-Gewebekulturflaschen mit 20 ml RPMI-1640-Medium ausgesät. Dabei wurde eine Menge von ca.  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml Kulturmedium verwendet. Die Zellkulturen wurden bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einer konstanten CO<sub>2</sub>-Zufuhr von 5 % im Brutschrank kultiviert und nach 1, 3 und 4 Tagen unter dem Durchlichtmikroskop fotografiert (vgl. Abbildung 5). Die optimale Zelldichte für die Versuche ergab sich kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz, also ca. 3-4 Tage nach Aussaat.

## **2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

### **2.3.2.1 Annexin-V/Propidiumiodid-Doppelfärbung zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate**

Die Apoptosen und Nekrosen der mit Niclosamid behandelten Zellen wurden durch die Färbung mit Annexin und Propidiumiodid ermittelt. In frühen Stadien der Apoptose kommt es zu Veränderungen an der Außenseite der Plasmamembran eukaryotischer Zellen. Dabei wird das Phospholipid Phosphatidylserin, welches bei vitalen Zellen nur an der zytoplasmatischen Seite der Membran vorkommt auf die äußere Seite transloziert (Vermes et al. 1995). Makrophagen erkennen auf der Außenseite der Zelle exponiertes Phosphatidylserin und phagozytieren diese Zellen. So werden im Organismus durch lysierte Zellen verursachte Entzündungsreaktionen verhindert (Fadok et al. 1998).

Annexin-V-Fluos ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Phospholipid-bindendes-Protein, welches eine starke Affinität zu Phosphatidylserin hat und sich somit als Marker zur Differenzierung zwischen apoptotischen und vitalen Zellen in Zellkulturen eignet (Koopman et al. 1994, Homburg et al. 1995). Da auch nekrotische Zellen Phosphatidylserin in ihren Membranüberresten exprimieren, wurde zur Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen eine Doppelfärbung mit Propidiumiodid vorgenommen. Dabei handelt es sich um einen DNA-bindenden, rot fluoreszierenden Farbstoff. Dieser kann die permeable Membran nekrotischer Zellen überwinden und an die DNA binden, nicht aber die intakte Zellmembran während des frühen Stadiums der Apoptose (Cevik und Dalkara 2003).

Die Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid behandelt, nach 24 Stunden mit Trypsin-EDTA abgelöst und zentrifugiert. Zuvor wurden die am Boden adhären gewachsenen Zellen in Suspension mit den Zellen des Überstandes vereinigt. Das Zellpellet wurde in 200 µl Markierungslösung resuspendiert und in einem FACS-Röhrchen für 15 min inkubiert (vgl. Tabelle 10). Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

**Tabelle 10: Lösungen für die Apoptose- und Nekrosemessungen**

Inkubationspuffer	10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4 140 mM NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/ml PBS
Markierungslösung	1000 µl Inkubationspuffer 20 µl Annexin-V-Fluos 20 µl Propidiumiodid

### 2.3.2.2 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung

Die Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid behandelt, nach 24 Stunden mit Trypsin-EDTA abgelöst und zentrifugiert. Der Kulturmedium-Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl der zuvor angesetzten Nicoletti-Lösung (Nicoletti et al. 1991) resuspendiert, mit dem Vortexer durchmischt und in einem FACS-Röhrchen für 15 min im Brutschrank inkubiert (vgl. Tabelle 11). Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

**Tabelle 11: Nicoletti-Lösung**

Natriumcitrat-2-hydrat	0,1 %
Triton x100	0,1 %
destilliertes Wasser	99,8 %
Propidiumiodid	50 µg/ml

### 2.3.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, neben Größe und Granularität der Zellen auch unterschiedliche Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit Niclosamid anhand der Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos

und Propidiumiodid quantifiziert. Die Annexin-V-Fluos-Signale wurden im grünen Wellenlängenbereich, die Propidiumiodid-Signale im roten Wellenlängenbereich auf einem BD FACS Contro™II Flow Cytometer der Firma BD Bioscience detektiert. Um bei der Auswertung überlappende Emissionsspektren ausschließen zu können, wurden neben mit Annexin-V-Fluos und Propidiumiodid doppelt gefärbten Zellen auch mit jeweils nur einem der Marker gefärbte sowie ungefärbte Zellen gemessen.

Parallel dazu wurde die für die Zellzyklusanalyse mit dem Nicoletti-Puffer behandelten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Durch das in der Pufferlösung enthaltene Triton X-100 wurde erreicht, dass die Zellmembran, nicht aber die Kernmembran lysiert wird. Durch die stöchiometrische Bindung von PI an doppelsträngige DNA konnte entsprechend der detektierten Fluoreszenzsignale der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen gemessen werden. Anhand dieser gemessenen DNA-Mengen konnten die Zellen den verschiedenen Zellzyklus-Phasen (subG1, G1/G0, S) zugeordnet werden. Die Messergebnisse wurden mit dem BD FACS Diva, Version 6.1.3-Programm ausgewertet und die apoptotischen und nekrotischen Zellen zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt.

### **2.3.3 Transwell-Migrationsassay**

Für den Migrationsassay wurden  $8 \times 10^4$  Zellen (MIA PaCa-2) bzw.  $4 \times 10^4$  Zellen (Panc-1) in 500  $\mu$ l RPMI-1640-Medium mit 1 % FCS resuspendiert und im oberen Teil einer modifizierten Boyden-Kammer (24-Well Millicell® Hanging Cell Culture Inserts 8,0  $\mu$ m PET, Millipore) aufgebracht. Die obere Kammer wurde in eine 24-Well-Zellkulturplatte platziert, welche mit 500 ml RPMI-1640-Medium und 10 % FCS gefüllt war. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass die Zellen durch den Serumgradienten aktiviert werden durch die Membran zu migrieren. Nach 3 Stunden wurden die entsprechenden Mengen Niclosamid (0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) bzw. 5  $\mu$ l DMSO als Kontrolle für die maximal verwendete Menge der Trägersubstanz dazugegeben. Eine weitere Probe blieb jeweils unbehandelt, um einen Referenzwert zu bekommen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurden die transmigrierten Zellen ausgezählt. Dazu wurden diese in der Membran fixiert, eingefärbt und jeweils 4 Felder pro Membran unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Jeder Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

## 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.3.4.1 RNA-Isolierung

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2, Panc-1, L3.6pl sowie die transformierte menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK 293 als Wnt-positive Kontrollzellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid für 24 Stunden behandelt. Die Kultivierung der Zellen und Zugabe von Niclosamid erfolgte nach der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Methode. Die Extraktion der DNA aus den zuvor mit Niclosamid behandelten Zellen erfolgte mit peqGOLD TriFast™ nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen direkt in der 6-Well-Zellkulturplatte durch Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast™ pro Schale durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die Zellen wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, sofort auf Eis gelagert und einheitlich für die spätere Verwendung bei -80°C weggefroren.

Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Danach wurden die Proben mit 0,2 ml Chloroform pro ml peqGOLD TriFast™ versetzt, durch kräftiges Schütteln vermischt und erneut für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (15 min, 12.000 g, 4°C) erfolgte die Phasentrennung in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die wässrige Phase, in der sich die DNA ausschließlich anreichert, wurde mit der Pipette in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD TriFast™. Die Proben wurden erneut mit der Pipette durchgemischt, für ca. 15 min auf Eis gelagert und im Anschluss für 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA befand sich nun als gelartige Substanz an der unteren Seite des Röhrchens, so dass der Isopropanol-Überstand vorsichtig abgesaugt werden konnte. Das RNA-Pellet wurde nun durch zweimalige Zugabe von 1 ml 75 %-Ethanol, Vortexen und anschließender Zentrifugation (10 min, 12.000 g, 4°C) gewaschen. Zum Trocknen der RNA wurde das Röhrchen geöffnet und das Pellet für 10 min bei 60°C im Heizblock erwärmt, bis nur noch eine gelartige Substanz übrig blieb. Nach Zugabe von 20 µl RNase-freiem Wasser wurde die Probe erneut für 5 min bei 60°C erwärmt, mit dem Vortexmischer durchgemengt und bei -80°C eingefroren.

#### **2.3.4.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung**

Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Deshalb wurde zur Konzentrationsbestimmung die Extinktion der Lösung bei dieser Wellenlänge im NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer gemessen. Dafür wurde jeweils 1 µl jeder Probe gegenüber einem Leerwert (ddH<sub>2</sub>O) gemessen. Dabei entspricht ein Wert von 1 einer Konzentration von 40 ng/ml einzelsträngiger RNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt, gibt das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm die Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen wieder. Um die Reinheit der Nukleinsäuren zu gewährleisten, sollte dieses idealerweise, bei in Wasser gelöster RNA, zwischen 1,9-2,1 liegen. Um beim Umschreiben der RNA in cDNA eine Amplifikation genetischer DNA mit einem Extinktionsmaximum bei 230 nm ausschließen zu können, wurde darauf geachtet, dass auch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 230 nm in Bereich zwischen 1,9-2,1 lag.

#### **2.3.4.3 cDNA-Synthese**

Für die Synthese komplementärer, einzelsträngiger cDNA wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde zunächst ein Verdau durchgeführt. Dadurch wurde genomische DNA zerstört und konnte somit nicht amplifiziert werden. Dafür wurden 3 µg RNA und 6 µl Puffer mit DNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 40 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 42°C erhitzt. Als Reaktionsansatz wurde zu der 3 µg enthaltenden Menge gereinigter RNA-Lösung 3 µl reverse Transkriptase und 12 µl Puffer gegeben und mit DNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 60 µl aufgefüllt. Dieser Reaktionsmix wurde nun für 15 min bei 42°C und 3 min bei 95°C im T-1-Thermocycler inkubiert. Danach wurden die Proben zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Abweichend dazu wurde für die PCR Versuche mit Hedgehog-Zielgenen das iScript™ cDNA-Synthese-Kit der Firma BioRad verwendet.

#### **2.3.4.4 Quantitative real-time PCR**

Der Einfluss von Niclosamid auf die Expression der kanonischen Wnt-Zielgene MMP7, Axin2 und c-jun, den Wnt-Co-Aktivator BCL9, die nicht-kanonischen Wnt-Zielgene Cyclin D1 und Wnt5a sowie die Hedgehog-Zielgene SHH, SMO, Ptch1 und Gli1 wurde durch eine quantitative-Real-Time-PCR (qRT-PCR) gemessen. Dafür wurden die Zellen in aufsteigender Konzentration für 24 Stunden mit Niclosamid und der höchsten Konzentration an Trägersubstanz (DMSO) inkubiert. Normiert wurden

die Werte auf die unbehandelte Zellkontrolle. Als Referenz-Gene wurden ARP und HPRT verwendet. Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die RNA-Menge in den verschiedenen Zellproben quantitativ bestimmt. Von einer normalen PCR unterscheidet sich die qRT-PCR dadurch, dass die Produktmenge nach jeder einzelnen Amplifikationsrunde bestimmt wird. In dieser Arbeit wurde dafür das „QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit“ (Qiagen) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I nach Herstellerangaben verwendet. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie jeweils eine ähnliche Anlagerungstemperatur aufwiesen, welche um die 60°C lag. Für jede Probe wurde pro Gen eine Dreifachbestimmung durchgeführt mit jeweils einem Ansatz ohne Template (Wasserprobe) als Kontrolle (vgl. Tabelle 12).

**Tabelle 12: Reaktionsansatz für die qRT-PCR**

H <sub>2</sub> O	8,0 µl
QuantiTect™ SYBR® Green	10,0 µl
forward Primer	0,5 µl
reward Primer	0,5 µl

Jeweils 19 µl dieses Reagenzien-Mixes wurden in eine 96-Loch-Platte (BioRad) pipettiert und nach Zugabe von 1 µl der jeweiligen cDNA-Probe verschlossen. Die mit den Proben gefüllten Platten wurden, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, einheitlich über Nacht bei -20°C gelagert. Initial wurde der Reaktionsansatz für 3 min bei 95°C inkubiert. So konnte eine vollständige Denaturierung der DNA-Doppelstränge garantiert werden. Danach wurden 40 Zyklen der folgenden Inkubationsphasen wiederholt:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge 95°C für 15 s 40x
2. Anheftung der Oligonukleotide (annealing) 60°C für 45 s 40x

Zusätzlich fand eine Schmelzkurvenbestimmung von 55°C bis 95°C in 0,5°C/10 s Schritten statt. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit dem CFX Manager™-Programm der Firma BioRad.

Folgende genspezifische Primersequenzen wurden verwendet:

**Tabelle 13: Wnt-Primersequenzen (Eurofins MWG Operon)**

Name	Sequenz
MMP7	fw 5'ACTTCGATGAGGATGAACG3' rev 5'TTTGGGGATCTCCATTTCC3'

Axin2	fw 5'GCTAGCTGAGGTGTCTGAAGC3' rev 5'ACACCTGCCAGTTTCTTTGG3'
BCL9	fw 5'AGCTCGTTCTCCCAACTTGC3' rev 5'GGGTTTGGACCTGAAATTGC3'
Cyclin D1	fw 5'GCATCTACACCGACAACCTCCA3' rev 5'TGAAATCGTGCGGGGTCATT3'
Wnt5a	fw 5'AGGGCTCCTACGAGAGTGCT3' rev 5'GACACCCCATGGCACTTG3'
c-jun	fw 5'CCTTGAAAGCTCAGAACTC3' rev 5'CTTTCTGTTTAAGCTGTGCC3'

**Tabelle 14: Hedgehog-Primersequenzen (Qiagen)**

Name	Sequenz
SHH	fw 5'AACTCACCCCAATTACAACC3' rw 5'CAAAGCGTTCAACTTGTCC3'
SMO	fw 5'GGGAGGCTACTTCCTCATCC3' rw 5'CATGGTCTCGTTGATCTTGC3'
Patch1	fw 5'ACCTGGAACGAGGACAAAGC3' rw 5'GGAAAGCACCTTTTGAGTGG3'
Gli1	fw 5'ATATGTCCAGCCCAACTCC3' rw 5'CACGCTTCTCCTCTCTCTCG3'

**Tabelle 15: Housekeeping-Primersequenzen (Eurofins MWG Operon)**

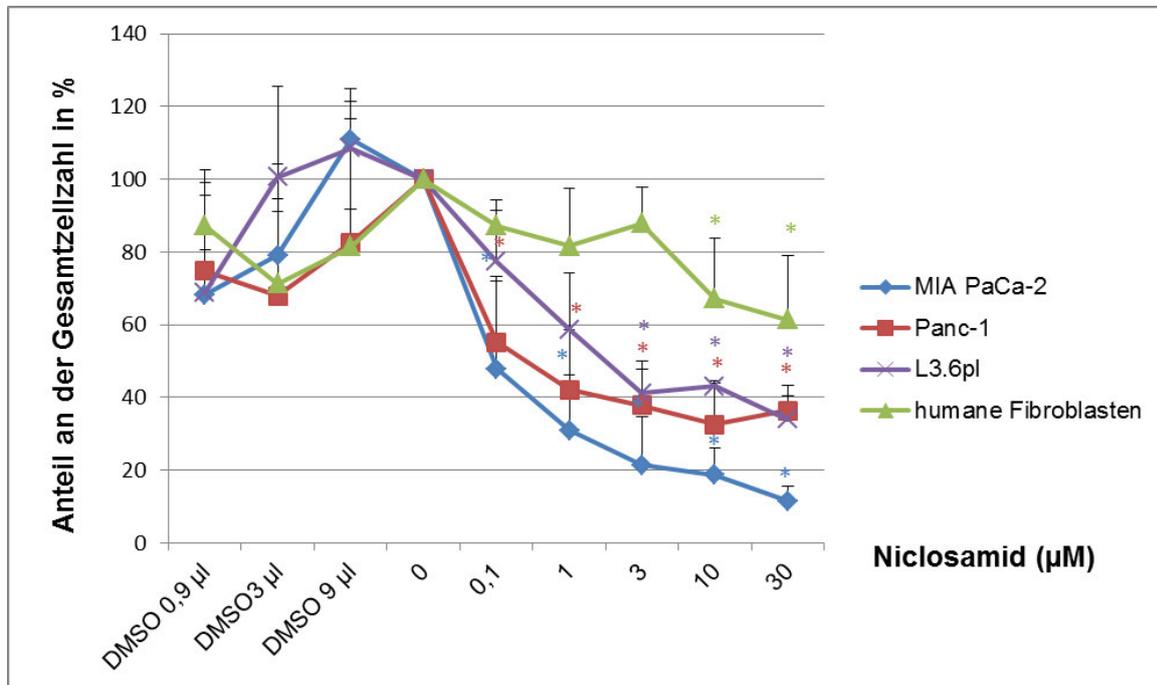
Name	Sequenz
ARP	fw 5'CGACCTGGAAGTCCAACACTAC3' rev 5'ATCTGCTGCATCTGCTTG3'
HPRT	fw 5'ATGCTGAGGATTTGGAAAGG3' rev 5'CAGAGGGCTACAATGTGATGG3'

## 2.4 Statistik

Für die Ermittlung der Messdaten wurden, falls nicht anders angegeben, jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse werden demnach als Mittelwert (Mean) mit positiver einfacher Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur Beurteilung der Signifikanzen wurde der t-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Hemmung der Zellproliferation durch Niclosamid und Cyclopamin



**Abbildung 6: Hemmung der Zellproliferation nach Inkubation in aufsteigenden Niclosamidkonzentrationen**

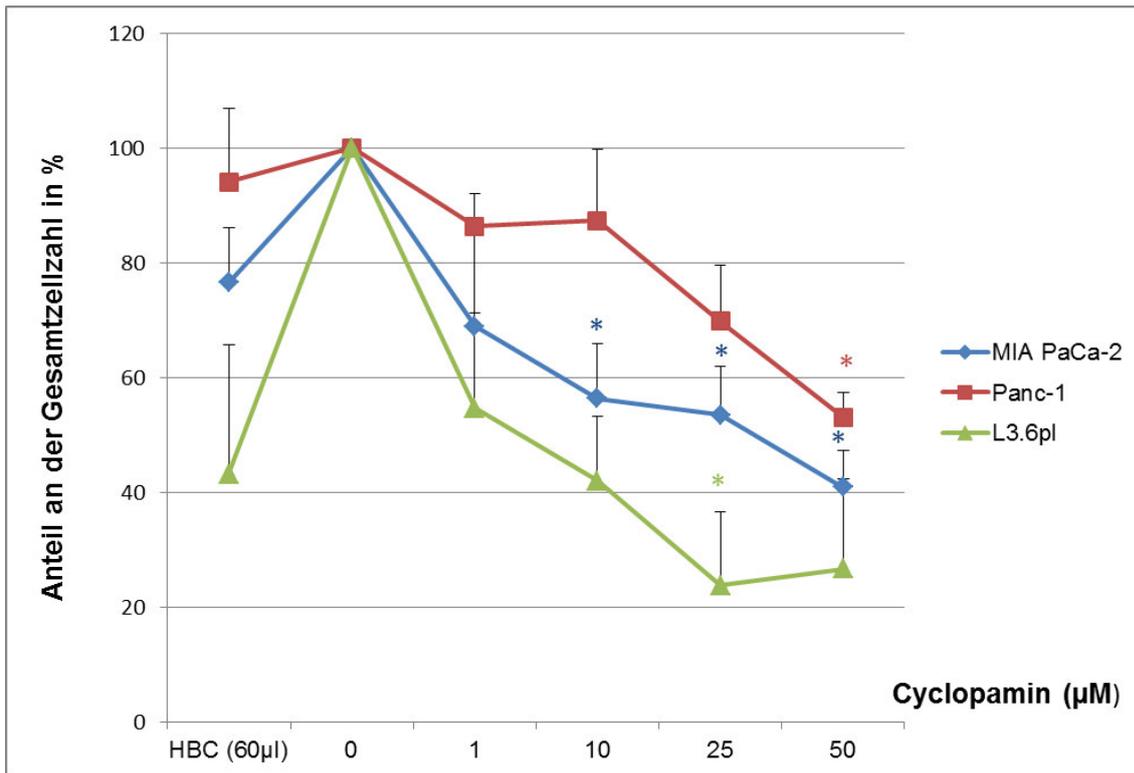
Jeweils  $2,4 \times 10^4$  Zellen pro Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte angezüchtet und für 24 Stunden mit Niclosamid inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer die Anzahl vitaler Zellen ermittelt. Normiert an der unbehandelten Kontrolle (0 µM Niclosamid) wurde der relative Anteil vitaler Zellen konzentrationsabhängig durch die Gabe von Niclosamid reduziert. Bereits ab Konzentrationen von 0,1-3 µM Niclosamid zeigte sich eine signifikant niedrigere Zellzahl der Pankreaskarzinom-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Für humane Fibroblasten trat dieser Effekt erst ab einer Konzentration von 10 µM Niclosamid auf. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (\* $p \leq 0,05$ ).

Für alle eingesetzten Tumor-Zelllinien (MIA PaCa-2, Panc-1 und L3.6pl) trat ein deutlicher konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt durch Niclosamid auf. MIA PaCa-2- und Panc-1-Zellen zeigten bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM Niclosamid einen signifikanten Abfall der Proliferation. So fanden sich bei MIA PaCa-2 nur noch 48 % und bei Panc-1 55 % der Zellen, im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, nach 24-stündiger Inkubation. Dieser Effekt verstärkte sich noch deutlich, je weiter die eingesetzte Niclosamidkonzentration erhöht wurde. Unter Ein-

satz von 30  $\mu\text{M}$  Niclosamid fand sich ein Rückgang der Proliferation auf 12 % bei MIA PaCa-2 und 36 % bei Panc-1.

Betrachtet man die L3.6pl-Zellen, so sprachen diese erst bei höheren Konzentrationen im gleichen Maße auf das Medikament an. Mit einem Rückgang auf 59 % konnte erst ab 1  $\mu\text{M}$  eingesetztem Niclosamid ein ähnliches Ergebnis erzielt werden wie für die anderen Zelllinien schon bei 0,1  $\mu\text{M}$ . Ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  ließ sich ein signifikanter Rückgang der Proliferationsrate auf 41 % des Kontrollwertes dokumentieren. Ab dieser Konzentration ließen sich vergleichbare Ergebnisse wie bei den beiden anderen Zelllinien ermitteln.

Um einen Vergleich der Wirkung von Niclosamid auf gesunde Zellen zu ermitteln, wurden die Versuche ebenfalls mit humanen Fibroblasten durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutlich geringere Auswirkung auf die Proliferationsraten. Erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten beobachtet werden. Bei allen Konzentrationen jedoch lagen die Effekte weit unter denen der behandelten Pankreaskarzinom-Zelllinien. Somit schien es ein therapeutisches Fenster zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  zu geben, in dem Niclosamid eine Wirkung auf Pankreaskarzinom-Zellen ausübt, ohne dabei toxisch für normale Körperzellen zu sein (vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 7: Hemmung der Zellproliferation nach Inkubation in aufsteigenden Cyclopaminkonzentrationen**

Jeweils  $4 \times 10^3$  Zellen pro Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte angezüchtet und für 48 Stunden mit Cyclopamin inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer die Anzahl vitaler Zellen ermittelt. Cyclopamin hemmt konzentrationsabhängig die Proliferation der Pankreaskarzinom-Zellen. Die Ergebnisse wurden jeweils prozentual an der Kontrolle normiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (\* $p \leq 0,05$ ).

Mit dem Hedgehog-Inhibitor Cyclopamin wurden die gleichen Versuche wie zuvor mit Niclosamid durchgeführt, um die Wirkung von Niclosamid auf die Proliferationsrate der Pankreaskarzinom-Zellen vergleichen zu können. Dafür wurde das Cyclopamin in einem 45 %-igen HBC/PBS-Gemisch in Lösung gebracht und auf die Zellen gegeben.

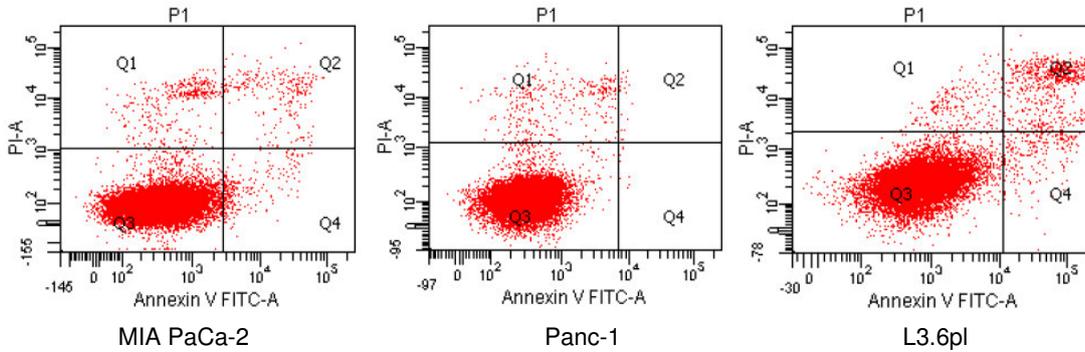
Nach 24 Stunden zeigten sich keine Unterschiede in der Zellzahl zwischen den behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle. Erst nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden und einer Reduktion der Zellzahl auf  $4 \times 10^4$  pro Well konnten eine signifikante Hemmung bzw. Reduktion der Zellzahl beobachtet werden.

Cyclopamin wirkt sich auf die Proliferation aller drei Pankreaskarzinom-Zelllinien aus. Der größte Effekt zeigte sich bei MIA PaCa-2 unter Einsatz von 10 µM Cyclopamin mit einer verringerten Proliferation auf 56 % im Vergleich zur Kontrolle. Die anderen

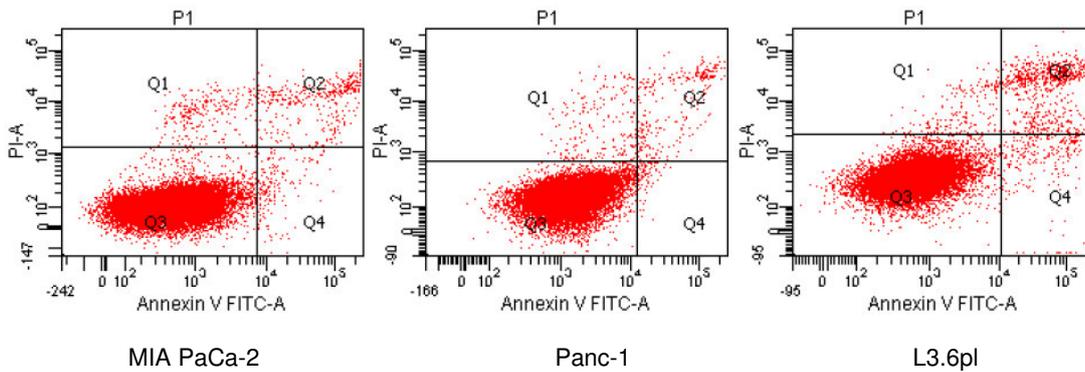
beiden Zelllinien zeigten signifikante Veränderungen erst bei 50  $\mu\text{M}$  mit einer Verringerung auf 53 % (Panc-1) bzw. 25  $\mu\text{M}$  mit einer Verringerung auf 23 % (L3.6pl). Im Vergleich zu Niclosamid konnten mit Cyclopamin erst bei Verdopplung der Inkubationszeit auf 48 Stunden und höheren Konzentrationen von eingesetzter Substanz signifikante Veränderungen bezüglich der Proliferationsraten beobachtet werden (vgl. Abbildung 7).

## 3.2 Detektion der Apoptosen und Nekrosen

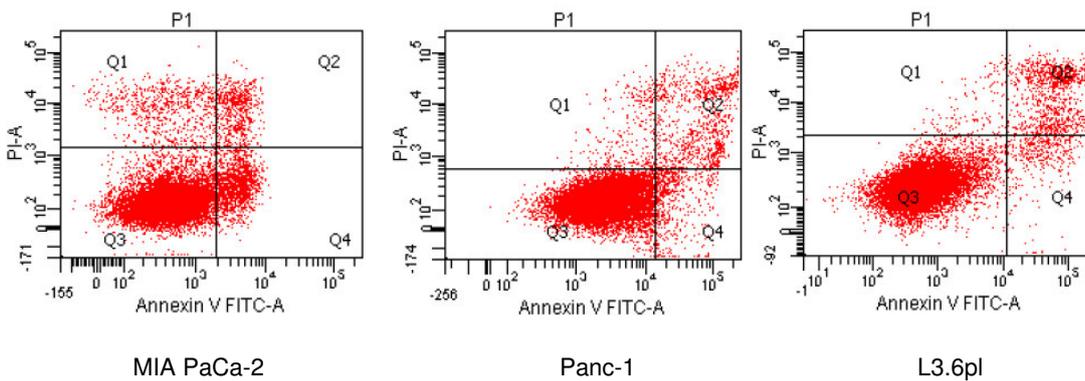
A: Zellkontrolle (unbehandelte Tumorzellen)



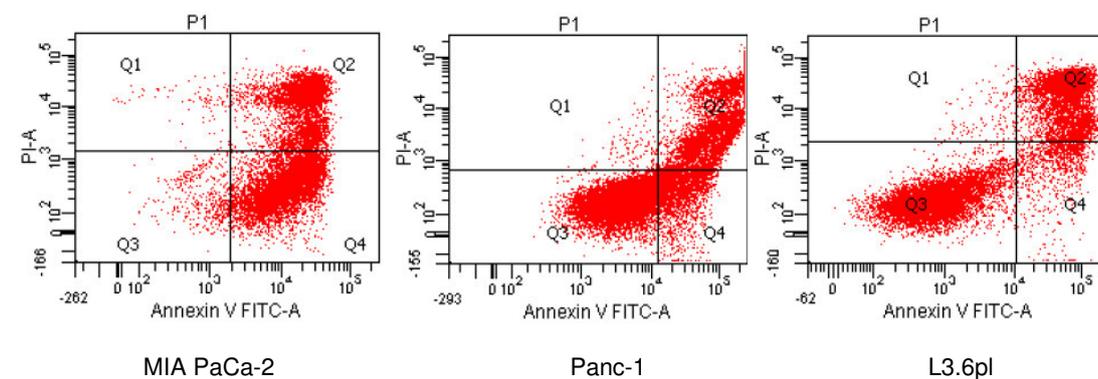
B: 0,1  $\mu$ M Niclosamid



C: 1  $\mu$ M Niclosamid

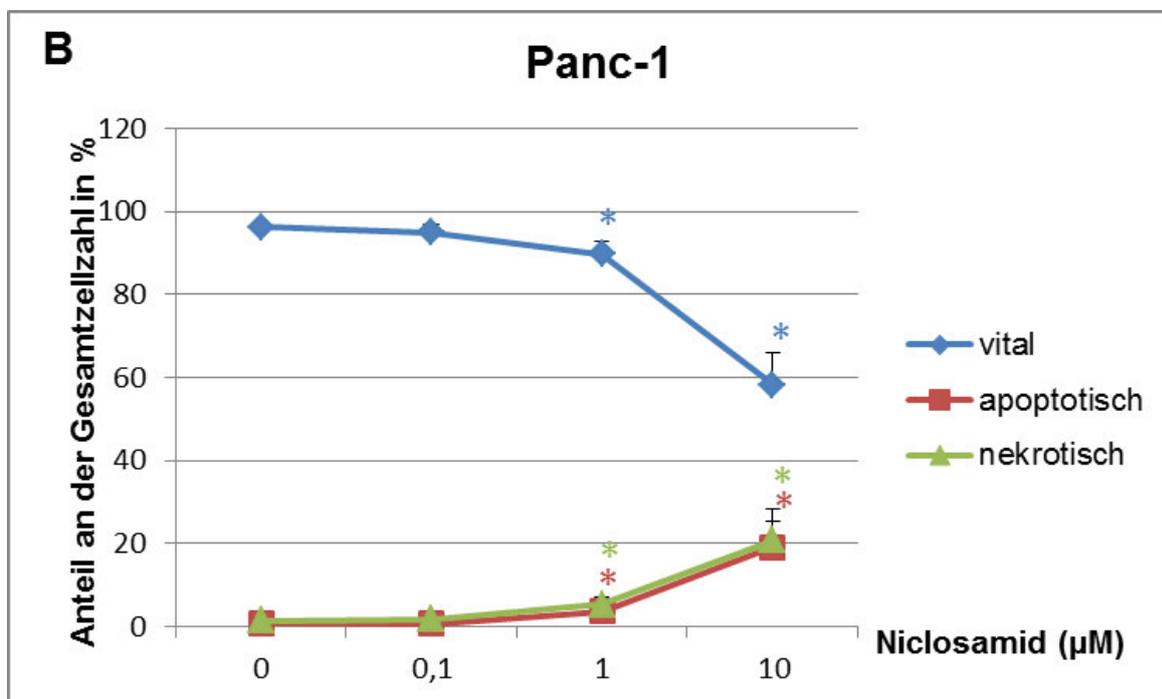
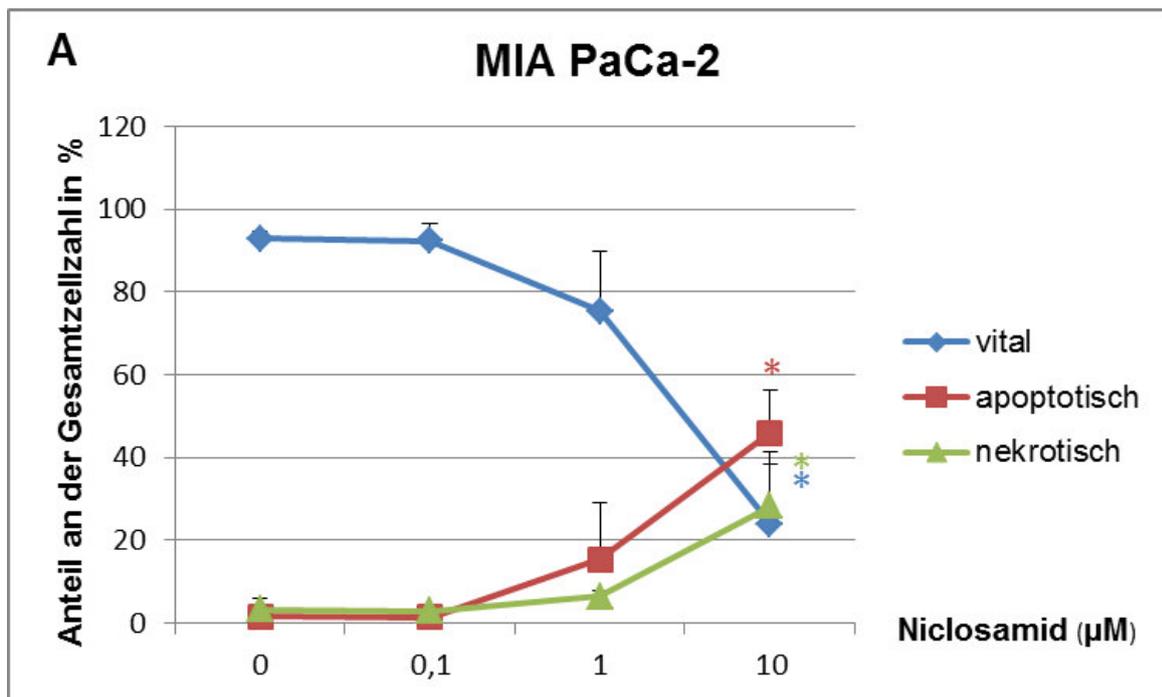


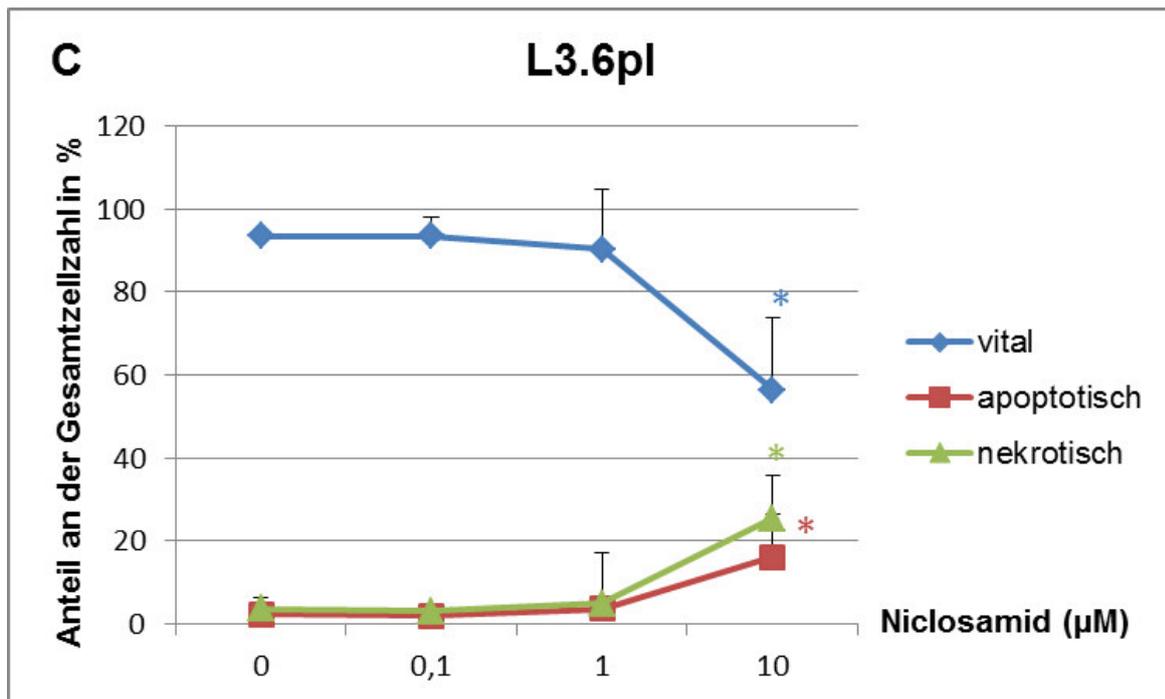
D: 10  $\mu$ M Niclosamid



**Abbildung 8: FACS-Analysen zum Nachweis der Induktion von Apoptose und Nekrose**

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2, Panc-1 und L3.6pl wurden 24 Stunden ohne Behandlung (A) sowie 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 (B), 1 (C) und 10  $\mu$ M (D) Niclosamid inkubiert und nach Annexin-V/Propidiumiodid-Doppelfärbung mittels FACS-Analyse untersucht. Im Gate Q3 kommen die vitalen, in Q4 die apoptotischen und in Q2 die nekrotischen Zellen zur Darstellung. Mit aufsteigenden Konzentrationen von Niclosamid ließ sich eine Verschiebung der Populationen zu mehr apoptotischen und nekrotischen Zellen erkennen. Die Gates zwischen den einzelnen Populationen wurden anhand der Kontrollmessungen gesetzt.





**Abbildung 9: Darstellung der dosisabhängigen, prozentualen Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Populationen nach Inkubation mit Niclosamid**

Die drei Zelllinien MIA PaCa-2 (A), Panc-1 (B) und L3.6pl (C) wurden für 24 Stunden mit aufsteigenden Niclosamidkonzentrationen wie angegeben inkubiert. Die Apoptose- und Nekroseraten wurden an den unbehandelten Kontrollzellen normiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (\* $p \leq 0,05$ ). Mit steigenden Konzentrationen ließ sich eine Verschiebung der Anteile vitaler Zellen zu vermehrt apoptotischen und nekrotischen Zellen beobachten. MIA PaCa-2 reagierte hierbei am sensibelsten auf Niclosamid, gefolgt von L3.6pl und Panc-1.

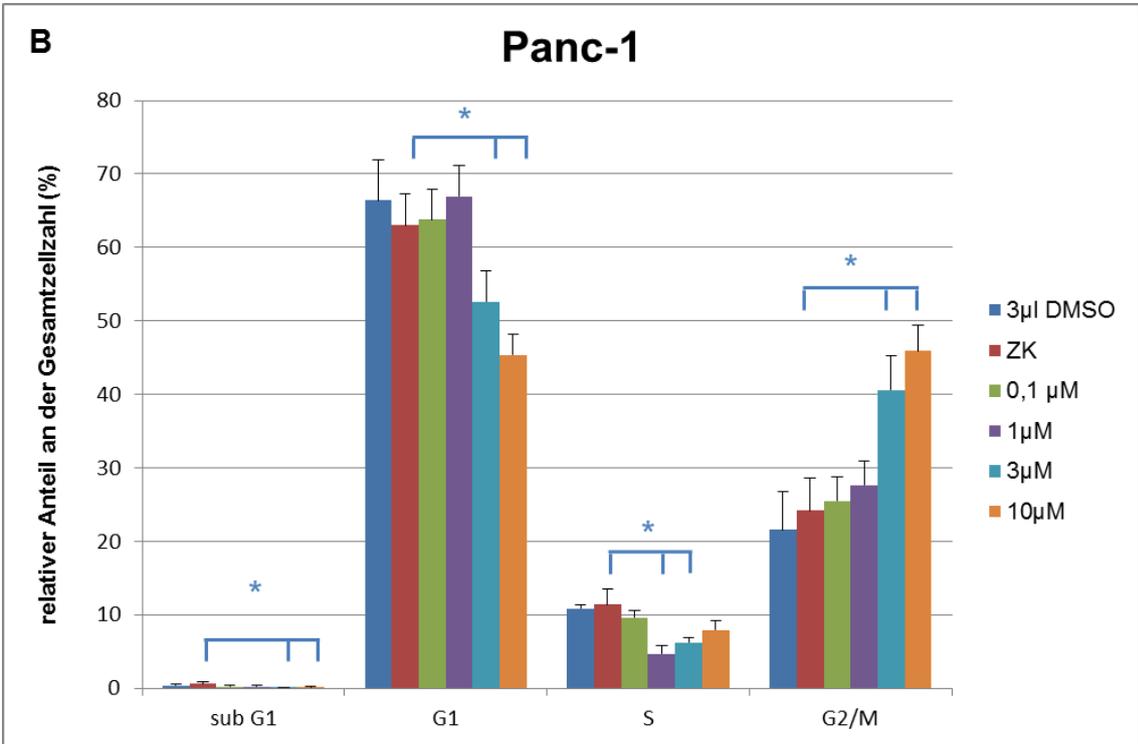
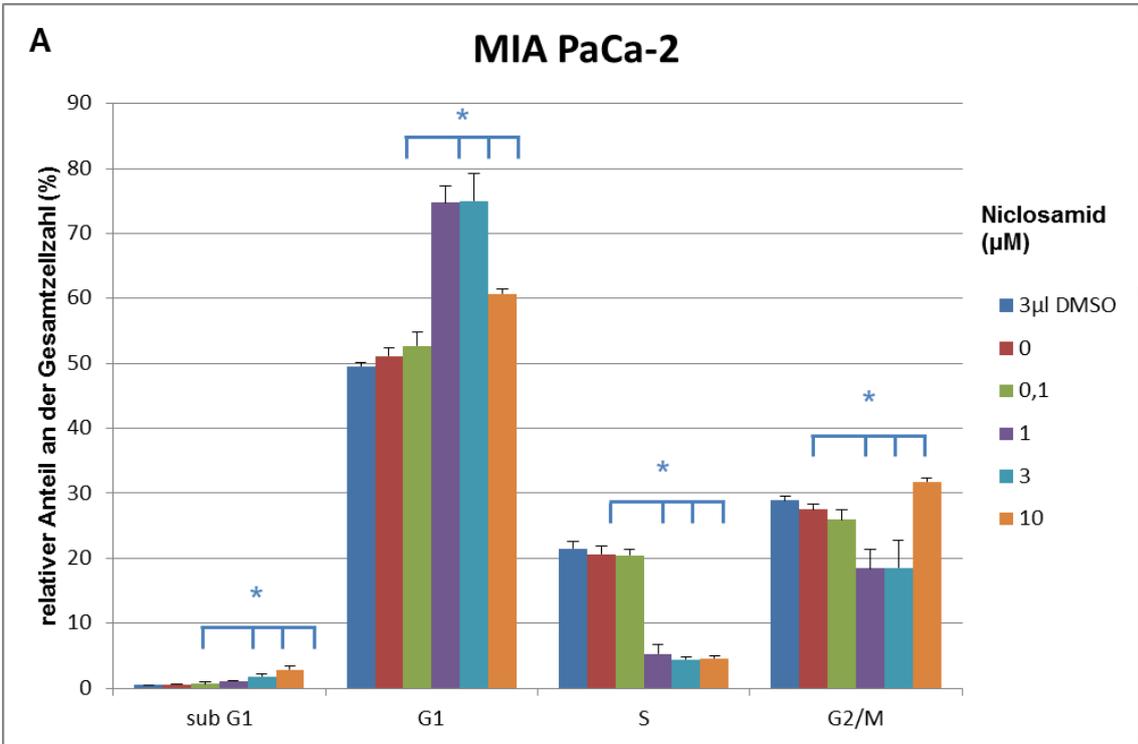
Die nachgewiesene Proliferationshemmung (siehe Proliferationsassay Kapitel 3.1) der Pankreaskarzinom-Zelllinien durch Niclosamid führte zur Frage, welche Art des Zelluntergangs möglicherweise durch die Inkubation mit Niclosamid ausgelöst wird. Zur Klärung wurden die mit Niclosamid behandelten Tumorzellen mit der Annexin-V/Propidiumiodid-Doppelfärbung inkubiert, um apoptotische und nekrotische sowie vitale Zellsubpopulationen zu unterscheiden. Bei allen drei Zelllinien ließ sich unter der Behandlung mit Niclosamid eine Verschiebung der Populationsanteile von vitalen zu apoptotischen und nekrotischen Zellen dokumentieren.

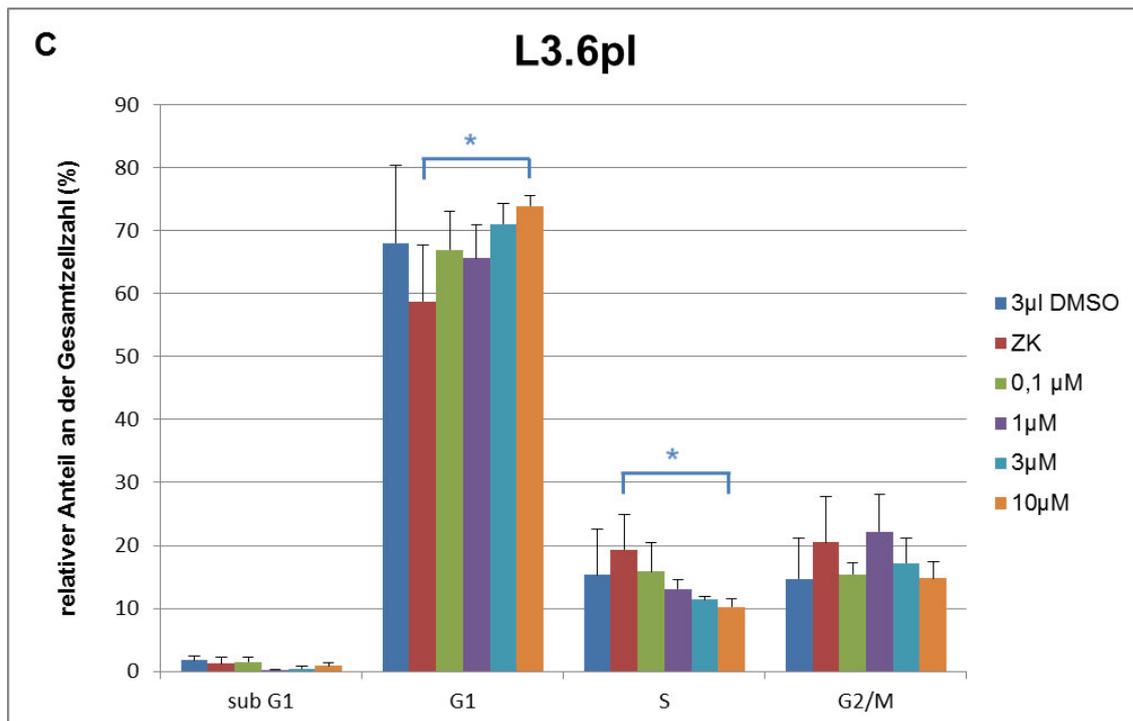
Bei den MIA PaCa-2-Zellen konnten im Vergleich zu den anderen Zelllinien die größten Effekte bei gleicher Konzentration erzielt werden. Es zeigte sich ein deutlicher Abfall des Anteils vitaler Zellen an der Gesamtpopulation von 93 % bei den unbehandelten Kontrollzellen (0 µM Niclosamid) auf 75 % bei 1 µM Niclosamidkonzentration und 24 % bei 10 µM. Die Apoptoserate stieg parallel dazu

von 2 % (0  $\mu$ M) auf 15 % (1  $\mu$ M) und 46 % (10  $\mu$ M) an. Die relative Anzahl der nekrotischen Zellen stieg entsprechend von 3 % (0  $\mu$ M) auf 6 % (1  $\mu$ M) und 28 % (10  $\mu$ M). Stellt man die für MIA PaCa-2 gemessenen Ergebnisse den anderen Zelllinien gegenüber, zeigt sich hier die höchste Empfindlichkeit auf die Inkubation mit Niclosamid (vgl. Abbildung 9 A).

Die Panc-1-Zelllinie zeigte im Gegensatz zu MIA PaCa-2 einen sehr viel geringeren Effekt auf die Behandlung. So verringerte sich der Anteil der vitalen Zellen von 96 % ohne Niclosamid-Einwirkung auf 90 % (1  $\mu$ M) und 58 % (10  $\mu$ M). Die Apoptoserate nahm von 1 % (0  $\mu$ M) auf 4 % (1  $\mu$ M) und 19 % (10  $\mu$ M) und die Nekroserate parallel dazu von 1 % (0  $\mu$ M) auf 5 % (1  $\mu$ M) und 21 % (10  $\mu$ M) zu. Die Effekte nach Zugabe von 1 und 10  $\mu$ M Niclosamid waren jedoch im Vergleich deutlich geringer als bei den MIA PaCa-2-Zellen (vgl. Abbildung 9 B). Bei L3.6pl wiederum sank die Vitalität von 93 % (0  $\mu$ M) auf 90 % (1  $\mu$ M) und 56 % (10  $\mu$ M). Komplementär dazu stieg der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation von 2 % (0  $\mu$ M) auf 4 % (1  $\mu$ M) und 16 % (10  $\mu$ M). Die Nekroserate stieg von 4 % (0  $\mu$ M) auf 5 % (1  $\mu$ M) und 25 % (10  $\mu$ M) (vgl. Abbildung 9 C). Somit konnte durch Inkubation mit Niclosamid bei MIA PaCa-2 der größte Effekt dokumentiert werden, gefolgt von L3.6pl im Mittelfeld und den nur wenig beeinflussten Panc-1-Zellen (vgl. Abbildung 8 und 9).

### 3.3 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid





**Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der Zellen geordnet nach den jeweiligen Zellzyklus-Phasen**

Die Zelllinien MIA PaCa-2 (A), Panc-1 (B) und L3.6pl (C) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid behandelt und die prozentualen Anteile der Zellpopulation in den jeweiligen Zellzyklusphasen ermittelt. Die Zellpopulation in der G1-Phase wuchs bei allen Zellreihen mit aufsteigenden Konzentrationen. Bei Panc-1 jedoch zeigte sich ab 3 µM wieder ein signifikanter Abfall. Der Anteil gemessener Zellen in der S-Phase nahm bei allen Zelllinien mit steigenden Konzentrationen ab. Für die G2/M-Phase ließ sich nur bei Panc-1 eine Steigerung erkennen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (\* $p \leq 0,05$ ).

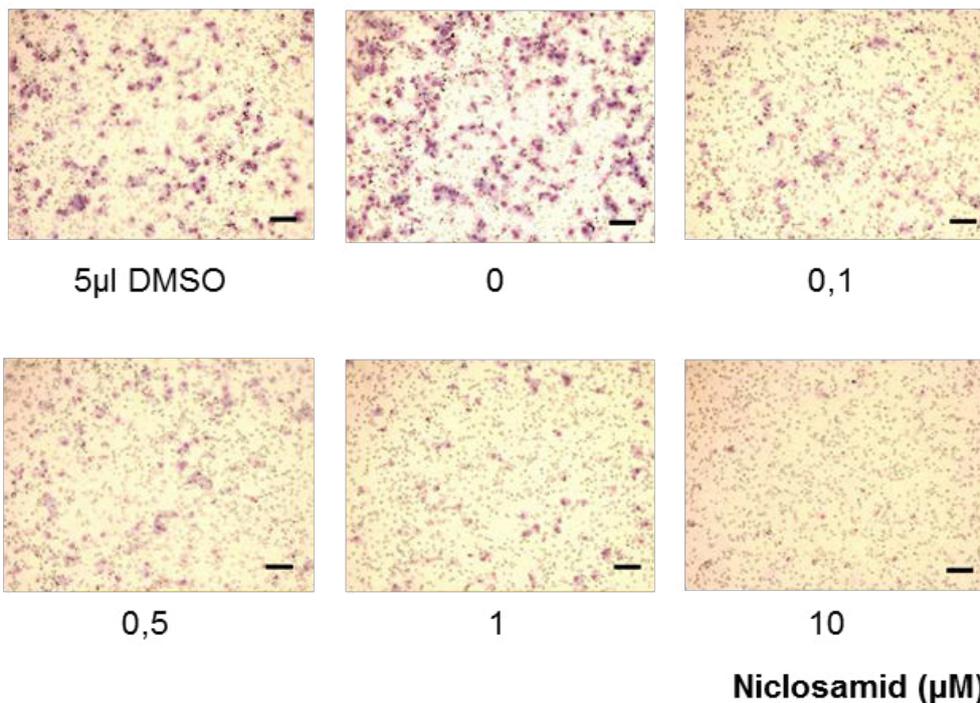
Für alle drei Zelllinien konnten signifikante Effekte erzielt werden. Bei MIA PaCa-2 zeigte sich ab 1 µM eingesetztem Niclosamid eine signifikante Zunahme der Anteils der Zellen in der G1-Phase (75 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen (51 %). Bei einer Konzentration von 10 µM fiel dieser Anteil wieder leicht ab (61 %). Der Anteil an der Zellpopulation, der sich in der S und G2/M-Phase befand, nahm jeweils ab. Von 21 % der Kontrolle auf maximal 5 % bei einer Menge von 10 µM Niclosamid in der S-Phase sowie von 27 % auf maximal 18 % bei Einsatz von 1 µM und 3 µM Niclosamid in der G2/M-Phase. Bei einer Konzentration von 10 µM zeigte sich in der G2/M-Phase wieder ein Anstieg der Populationsanteile auf 32 %. Dieser Wert war jedoch immer noch signifikant niedriger als der jeweilige Wert der unbehandelten Kontrollzellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Anteil der Zellpopulation in der S und G2/M-Phase bei höheren Konzentrationen abnahm und der Anteil an der G1-Phase bei 1 µM zuerst stieg und danach auch einen signifikanten Abfall zeigte (vgl. Abbildung 10 A).

Die Zelllinie Panc-1 reagierte unter Inkubation von 3  $\mu\text{M}$  Niclosamid mit einem signifikanten Abfall in der G1-Phase von 66 % auf 53 % und bei 10  $\mu\text{M}$  auf minimal 48 %. Auch der Anteil der Zellen in der S-Phase wurde geringer und sank von 11 % auf minimal 5 % (1  $\mu\text{M}$ ), um dann wieder leicht anzusteigen (vgl. Abbildung 10 B). Bei L3.6pl zeigte sich die größte Zunahme der G1 Population von 68 % auf 74 % bei 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid sowie eine signifikante Abnahme der S Population von 15 % auf 10 % ebenfalls bei 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid. In der G2/M-Phase ließ sich keine Tendenz hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Anteile beobachten (vgl. Abbildung 10 C).

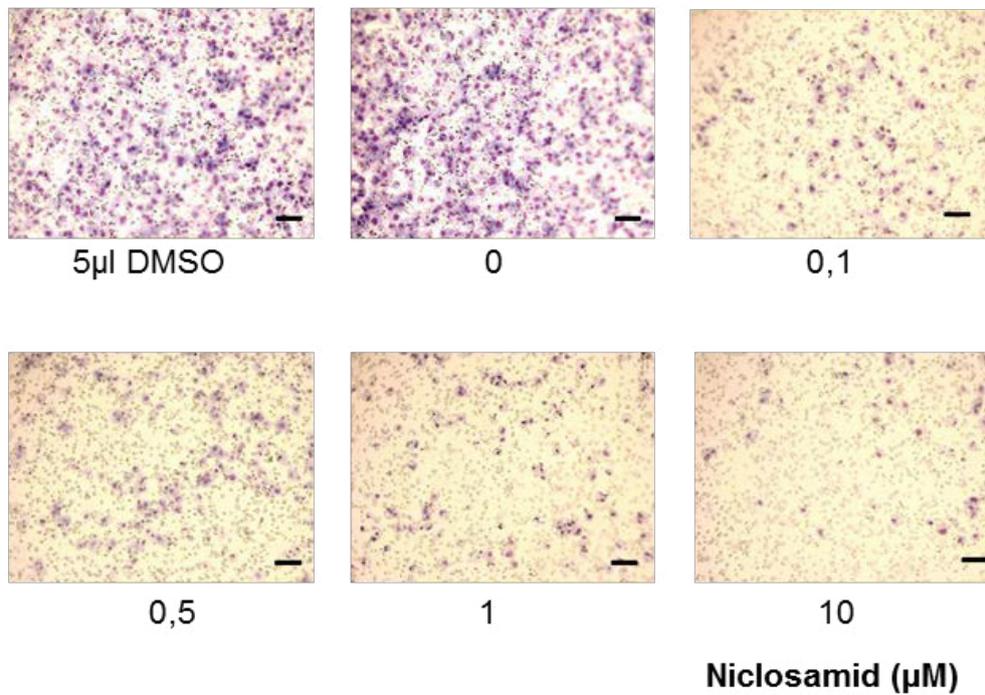
Der Anteil der Zellen, die sich in der subG1-Phase befanden, lag bei allen drei Zelllinien bei ca. 1 %. Bei den MIA PaCa-2-Zellen ließen sich in Übereinstimmung mit den Versuchen zur Proliferationshemmung und Apoptose signifikante Anstiege dieser Zellpopulationsanteile bei aufsteigenden Niclosamidkonzentrationen erkennen.

### 3.4 Beeinflussung der Transmigrationskapazität durch Niclosamid

#### A: MIA PaCa-2

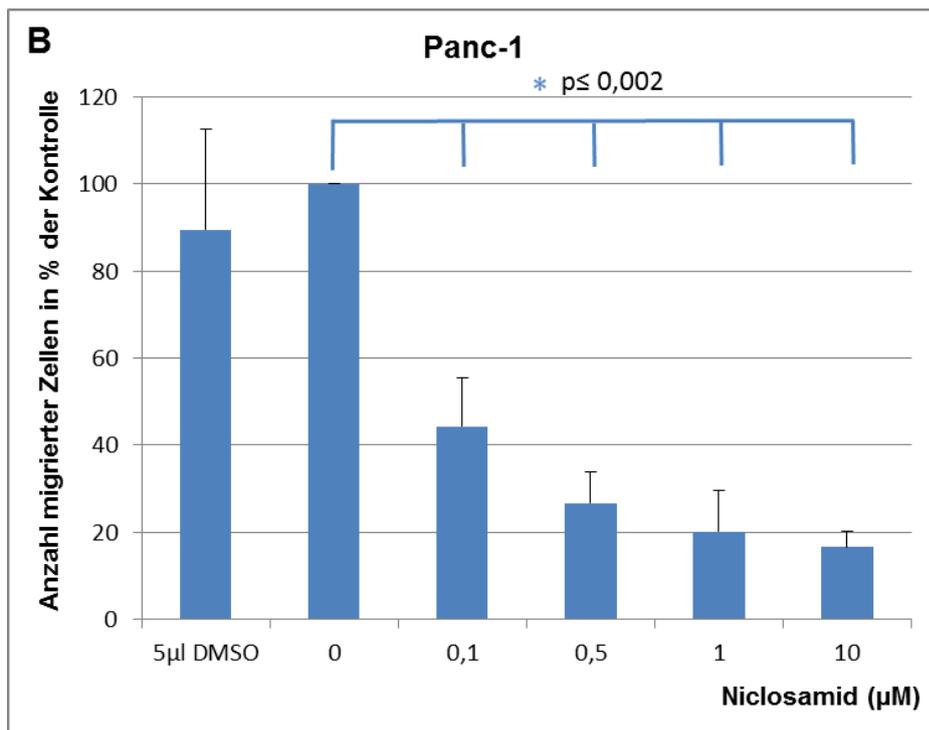
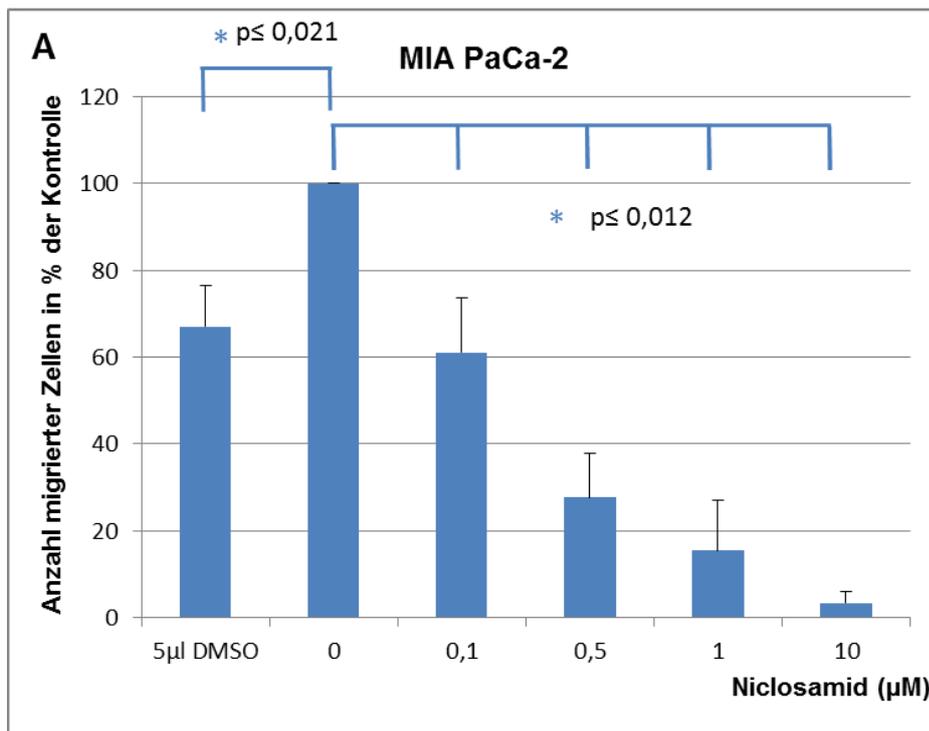


## B: Panc-1



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Abbildungen der migrierten Zellen nach Inkubation mit Niclosamid**

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 (A) und Panc-1 (B) wurden für 24 Stunden mit Niclosamid in der Boyden-Kammer inkubiert. Mit steigenden Konzentrationen zeigte sich in der lichtmikroskopischen Dokumentation bei beiden Zelllinien eine geringere Anzahl der durch die Membran migrierten Zellen. Originalvergrößerung 25x, Maßstabsskala = 100 µM



**Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Inhibition der Migration von MIA PaCa-2 und Panc-1 in Abhängigkeit von der Niclosamidkonzentration**

Jeweils  $1,2 \times 10^4$  (MIA PaCa-2) (A) bzw.  $4 \times 10^3$  (Panc-1) (B) Zellen wurden in den oberen Teil der Boyden-Kammer mit serumfreien Kulturmedium gegeben und mit steigenden Konzentrationen Niclosamid inkubiert. Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Zellen angefärbt, bei 25-facher Vergrößerung fotografiert und ausgezählt. Bereits ab Konzentrationen von  $0,1 \mu\text{M}$  migrierte ein signifikant geringerer Anteil Zellen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die Membran. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (\* $p \leq 0,05$ ).

Tumorzellen wachsen infiltrativ und migrieren dabei in die umliegenden Gewebe. Der Einfluss von Niclosamid auf die Funktion der Migrationsfähigkeit der einzelnen Zelllinien durch eine poröse Membran (8  $\mu\text{m}$ ) wurde mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit aufsteigenden Niclosamidkonzentrationen behandelt. In mehreren Vorversuchen wurde die jeweils ideale Anzahl zu plattierender Zellen ermittelt, um auswertbare Migrationsraten zu erreichen (MIA PaCa-2:  $1,2 \times 10^4$ , Panc-1:  $4 \times 10^3$ ).

Bei beiden Zelllinien konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt von Niclosamid auf das Migrationsverhalten beobachtet werden (vgl. Abbildung 11 und 12). Bei den MIA PaCa-2-Zellen zeigte sich ab  $0,1 \mu\text{M}$  eingesetztem Niclosamid ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Migrationsrate betrug im Vergleich zur Kontrolle nur noch 61 % (vgl. Abbildung 12 A). Ein weitaus stärkerer Effekt konnte bei den Panc-1-Zellen beobachtet werden. Hier bewirkte eine Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  Niclosamid einen signifikanten Abfall der Migrationsrate von 100 % auf 44 % im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 12 B).

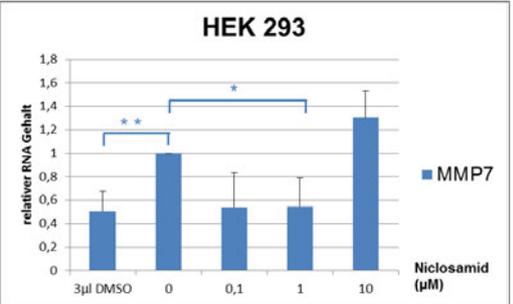
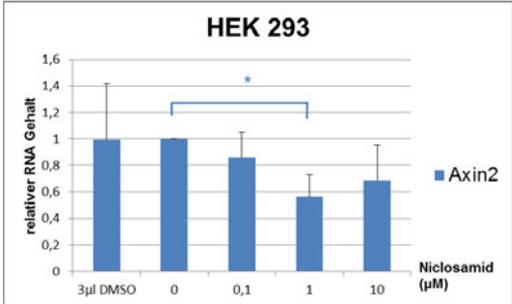
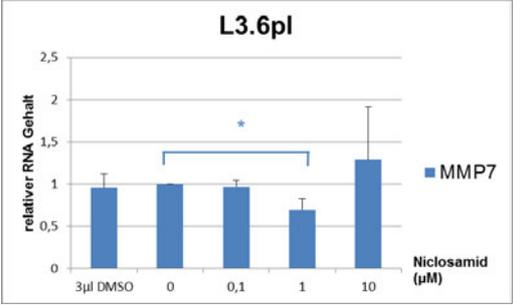
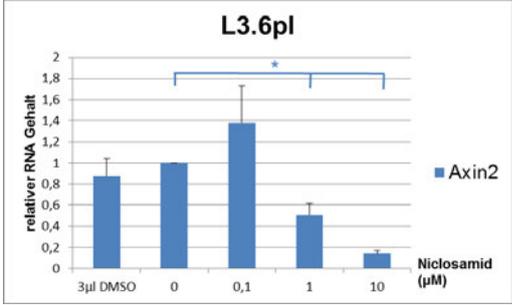
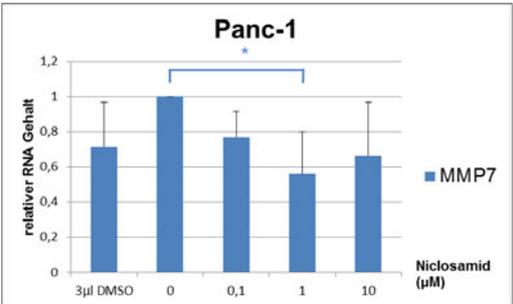
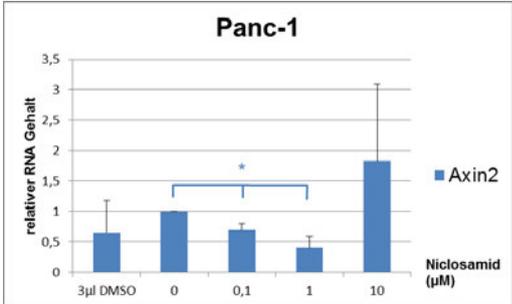
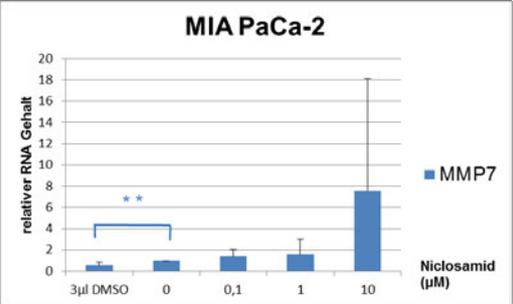
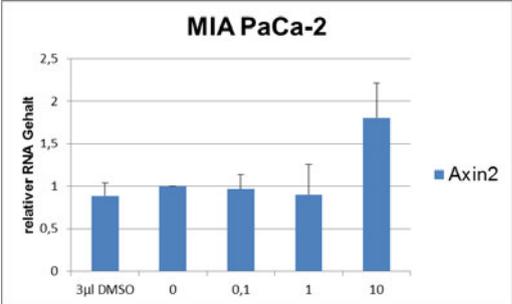
Bei gleichem Versuchsaufbau migrierten bei L3.6pl keine Zellen durch die Membranen. Auch eine schrittweise Steigerung der ausplattierten Zellzahl von  $2 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^5$  und eine Verlängerung der Migrationsdauer von 24 Stunden bis hin zu 6 Tagen brachten keinen Erfolg. Um den Zellen einen weiteren Anreiz zur Migration zu geben wurden Fibronectin (100 ng/ml) und VEGF (50 ng/ml) als Chemokine eingesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen 24 Stunden vor dem Aussähen in ein Kulturmedium mit nur 1 % FCS umgesetzt, um einen verstärkten Effekt des Serumgradienten zu bewirken. Bei keinem dieser Versuche konnten jedoch Zellen beobachtet werden, welche die Poren in der Membran passierten.

# 3.5 Nachweis spezifischer Genexpression mittels qRT-PCR

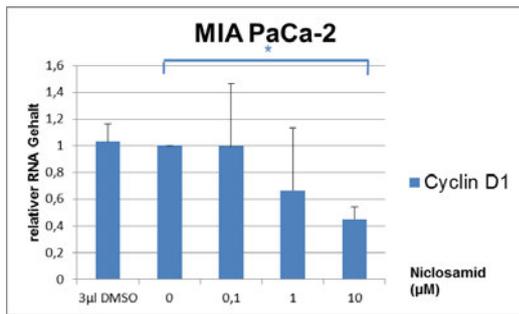
## 3.5.1 Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges

**A: Axin2**

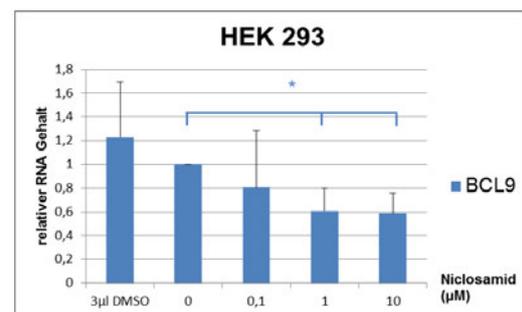
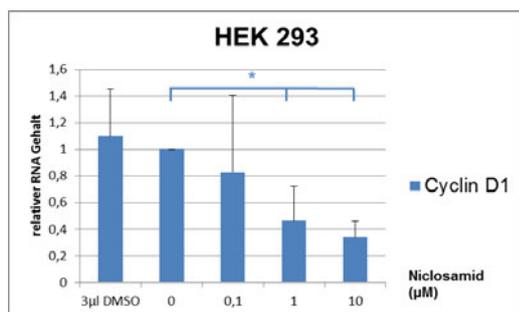
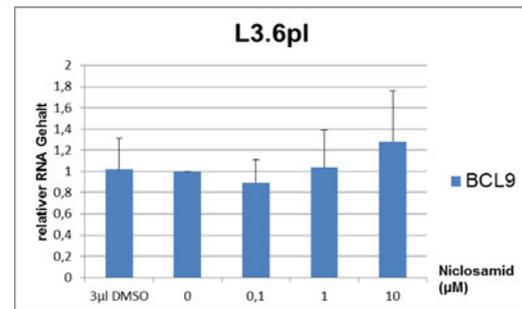
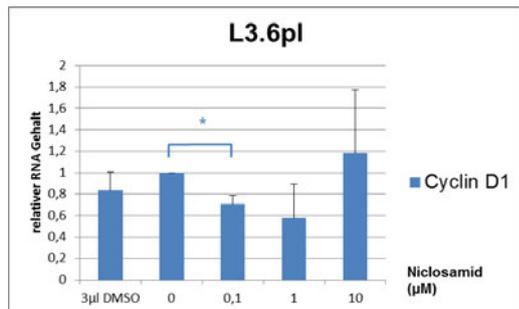
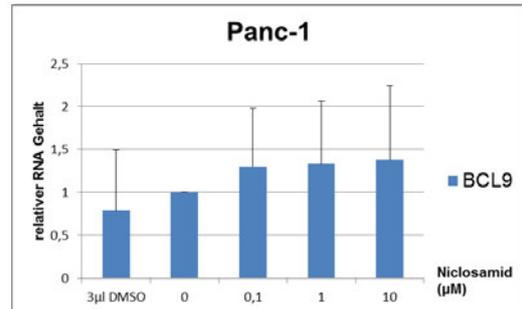
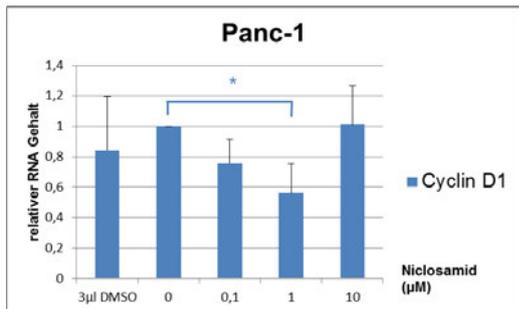
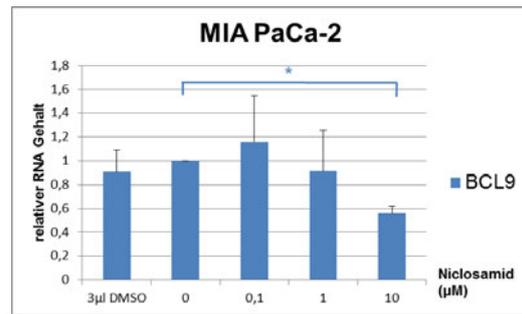
**B: MMP7**



### C: Cyclin D1



### D: BCL9



**Abbildung 13: RNA-Expression der Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges.**

Dargestellt sind Axin2 (A), MMP7 (B), Cyclin D1 (C) und der Co-Aktivat BCL9 (D). Die angegebenen Zelllinien wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid für 24 Stunden inkubiert und jeweils an der unbehandelten Zellokontrolle normiert. Steigende Konzentrationen von Niclosamid führten bei allen Zelllinien zu einer Expressionsabnahme der Wnt-Komponenten. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

In den folgenden Tabellen sind die Signifikanzen der behandelten Pankreas-karzinom-Zelllinien und der Wnt-positiven Kontroll-Zelllinie HEK293 für die untersuchten Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges aufgezeigt. Festgelegt wurden die Signifikanzen zwischen den Expressionsniveaus der behandelten Zellen und der unbehandelten Zellkontrolle (0 µM) (\*) bzw. zwischen der Zellkontrolle und der DMSO-Kontrolle, in der sich nur die Trägersubstanz und kein Medikament befand (\*\*) ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 16: Axin 2, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

	<b>MIA</b>					
	<b>PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>	<b>L3.6pl</b>		<b>HEK 293</b>	
DMSO vs. 0 µM	0,274	0,317	0,268		0,982	
DMSO vs. 0,1 mM	0,595	0,914	0,086	*	0,641	
DMSO vs. 1 mM	0,941	0,473	0,031	*	0,176	
DMSO vs. 10 mM	0,022	*	0,214	0,002	*	0,35
0 µM vs. 0,1 mM	0,744	0,008	*	0,13	0,274	
0 µM vs. 1 mM	0,659	0,006	*	0,001	*	0,011
0 µM vs. 10 mM	0,028	*	0,323	0	*	0,115

**Tabelle 17: MMP7, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

	<b>MIA</b>					
	<b>PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>	<b>L3.6pl</b>		<b>HEK 293</b>	
DMSO vs. 0 µM	0,048	**	0,121	0,685	0,008	**
DMSO vs. 0,1 mM	0,123		0,767	0,424	0,861	
DMSO vs. 1 mM	0,302		0,489	0,947	0,822	
DMSO vs. 10 mM	0,315		0,839	0,099	0,009	*
0 µM vs. 0,1 mM	0,394		0,052	0,481	0,054	
0 µM vs. 1 mM	0,54		0,033	*	0,016	*
0 µM vs. 10 mM	0,344		0,128	0,466	0,084	

**Tabelle 18: Cyclin D1, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

	<b>MIA</b>				
	<b>PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>	<b>L3.6pl</b>		<b>HEK 293</b>
DMSO vs. 0 µM	0,692	0,486	0,161		0,661
DMSO vs. 0,1 mM	0,9	0,723	0,295		0,53
DMSO vs. 1 mM	0,259	0,298	0,284		0,068
DMSO vs. 10 mM	0,003	*	0,543	0,382	0,026
0 µM vs. 0,1 mM	0,983		0,056	0,004	*
0 µM vs. 1 mM	0,281		0,017	*	0,084
0 µM vs. 10 mM	0,001	*	0,948	0,621	0,001

**Tabelle 19: BCL9, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

	<b>MIA PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>	<b>L3.6pl</b>	<b>HEK 293</b>	
DMSO vs. 0 $\mu$ M	0,429	0,632	0,923	0,442	
DMSO vs. 0,1 mM	0,364	0,414	0,599	0,336	
DMSO vs. 1 mM	0,98	0,41	0,952	0,099	*
DMSO vs. 10 mM	0,035	* 0,413	0,456	0,089	*
0 $\mu$ M vs. 0,1 mM	0,513	0,482	0,452	0,524	
0 $\mu$ M vs. 1 mM	0,687	0,481	0,875	0,025	*
0 $\mu$ M vs. 10 mM	0	* 0,492	0,36	0,015	*

Der Einfluss von Niclosamid auf den kanonischen Wnt-Signalweg wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Dazu wurden die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2, Panc-1, L3.6pl sowie die transformierte menschliche embryonale Nieren-Zelllinie HEK 293 als Positivkontrolle für die Aktivität des Wnt-Signalwegs mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid für 24 Stunden behandelt. Als Housekeeping-Gene wurden ARP und HPRT verwendet.

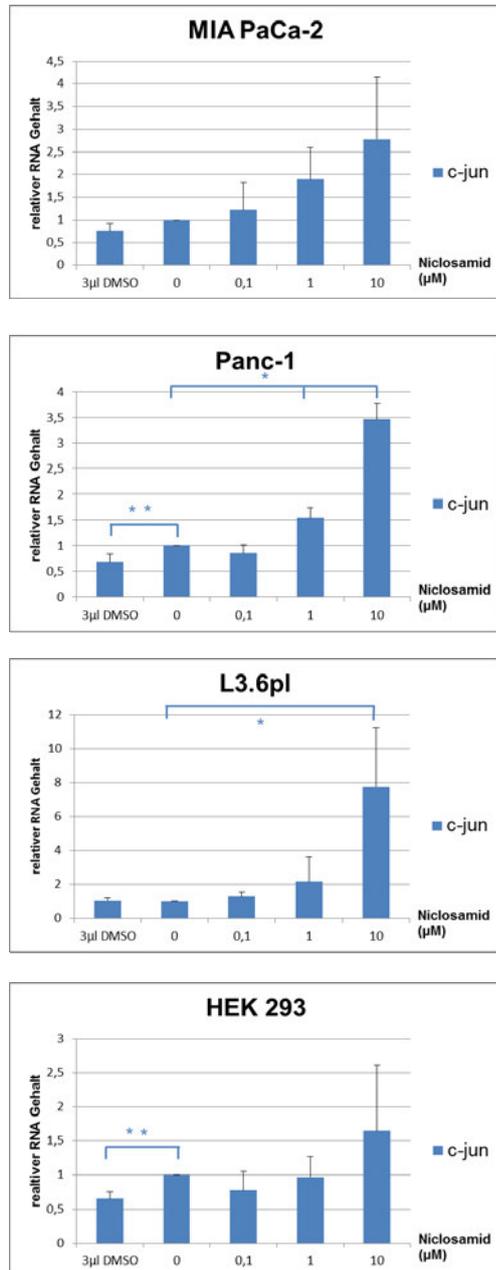
Über alle Zelllinien und ausgewählten Gene hinweg ließ sich ein genereller Trend zur Hemmung des kanonischen Wnt-Signalweges in Abhängigkeit von der Niclosamidkonzentration erkennen. So fanden sich bei L3.6pl und HEK 293 ab 1  $\mu$ M Niclosamid und bei Panc-1 bereits ab 0,1  $\mu$ M Niclosamid signifikante Rückgänge der Expression von Axin2. Auch MMP7 zeigte außer bei MIA PaCa-2 in allen Zelllinien einen signifikanten Rückgang ab 1  $\mu$ M des eingesetzten Medikamentes. Für Cyclin D1 ließ sich sogar bei allen vier Zelllinien ein signifikanter Effekt erkennen. Dieser trat bei L3.6pl schon ab 0,1  $\mu$ M, bei Panc-1 und HEK 293 bei 1  $\mu$ M und bei MIA PaCa-2 bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M des applizierten Medikaments auf. Der Co-Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalweges BCL9 zeigte bei MIA PaCa-2 und HEK 293 eine signifikant herabgesetzte Expression. Bei Panc-1 und L3.6pl ließ sich kein eindeutiger Trend erkennen (vgl. Abbildung 13).

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt insgesamt auf, dass die Expression der einzelnen Zielgene insbesondere bei der höchsten Konzentration von 10  $\mu$ M Niclosamid häufig vom generellen Trend abwich und eine deutliche Zunahme zeigte. Dieser Effekt ließ sich mit MIA PaCa-2 (Axin2, MMP7), Panc-1 (Axin2, Cyclin D1, BCL9), L3.6pl (MMP7, Cyclin D1, BCL9) und HEK 293 (MMP7) bei allen eingesetzten Zelllinien beobachten. Dies könnte durch den hohen Anteil nekrotischer und apoptoti-

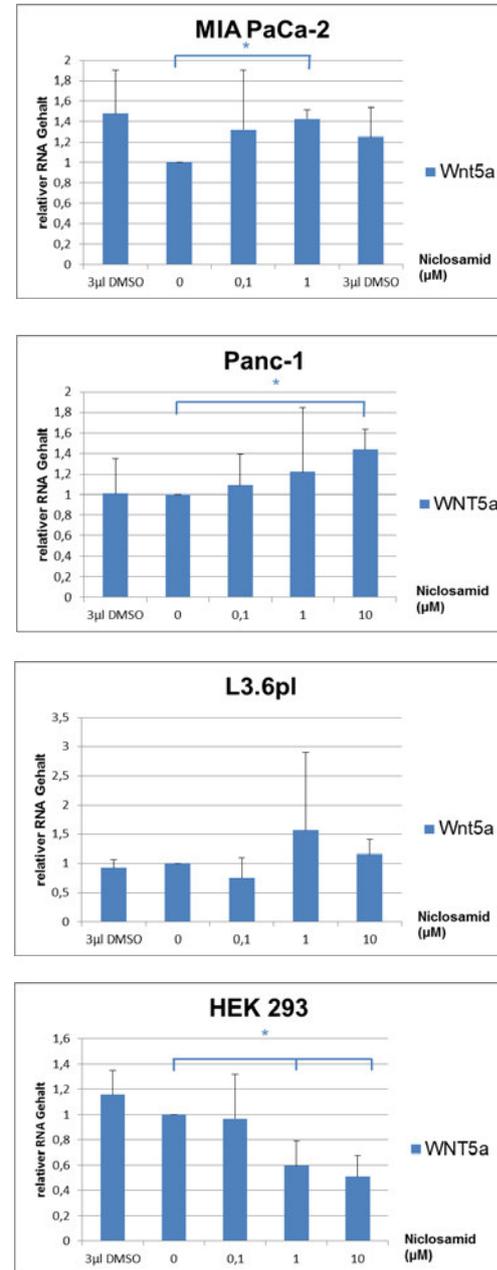
scher Zellen erklärt werden, der möglicherweise durch unspezifische Degradationsprodukte die Ergebnisse als Störvariable beeinflusst (vgl. Kapitel 3.2).

### 3.5.2 Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges

#### A: c-jun



#### B: WNT5a



**Abbildung 14: RNA-Expression der Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges.**

Dargestellt sind c-jun (A) und Wnt5a (B). Die angegebenen Zelllinien wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid für 24 Stunden inkubiert und jeweils an der unbehandelten Zellkontrolle normiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei allen Zelllinien zeigt sich grundsätzlich eine Expressionssteigerung bei höheren Konzentrationen.

Signifikanzen der behandelten Pankreaskarzinom-Zelllinien und der Wnt-positiven Kontroll-Zelllinie HEK 293 für die untersuchten Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges. Festgelegt wurden die Signifikanzen zwischen den Expressionsniveaus der behandelten Zellen und der unbehandelten Zellkontrolle (0  $\mu$ M) (\*) bzw. zwischen der Zellkontrolle und der DMSO-Kontrolle (\*\*) ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 20: c-jun, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

	<b>MIA PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>		<b>L3.6pl</b>		<b>HEK 293</b>
DMSO vs. 0 $\mu$ M	0,069	0,022	**	0,626		0,005 **
DMSO vs. 0,1 mM	0,274	0,276		0,208		0,512
DMSO vs. 1 mM	0,053	0,004	*	0,25		0,152
DMSO vs. 10 mM	0,066	0	*	0,029	*	0,152
0 $\mu$ M vs. 0,1 mM	0,571	0,187		0,105		0,237
0 $\mu$ M vs. 1 mM	0,092	0,01	*	0,232		0,881
0 $\mu$ M vs. 10 mM	0,09	0	*	0,028	*	0,314

**Tabelle 21: Wnt-5a, Signifikanzen der behandelten Zellen zur jeweiligen Kontrolle**

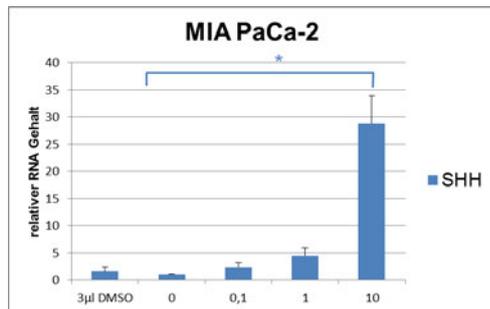
	<b>MIA PaCa-2</b>	<b>Panc-1</b>		<b>L3.6pl</b>		<b>HEK 293</b>
DMSO vs. 0 $\mu$ M	0,12	0,973		0,417		0,234
DMSO vs. 0,1 mM	0,715	0,134		0,466		0,464
DMSO vs. 1 mM	0,842	0,767		0,45		0,023 *
DMSO vs. 10 mM	0,481	0,638		0,24		0,012 *
0 $\mu$ M vs. 0,1 mM	0,401	0,631		0,281		0,883
0 $\mu$ M vs. 1 mM	0,001	* 0,58		0,499		0,022 *
0 $\mu$ M vs. 10 mM	0,206	0,017	*	0,344		0,007 *

Um eine Beeinflussung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Niclosamid aufzuzeigen, wurden die beiden Marker c-jun und Wnt5a als wichtige Komponenten dieses Signalweges untersucht (vgl. Kapitel 1.3). Dabei konnte für c-jun eine generelle Expressionssteigerung unter aufsteigenden Konzentrationen von Niclosamid für alle untersuchten Zelllinien festgestellt werden (vgl. Abbildung 14 A). Für Panc-1 ergaben sich ab einer Niclosamidkonzentration von 1  $\mu$ M und für L3.6pl bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M sogar signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Für Wnt5a, einen nicht-kanonischen Wnt-Liganden, ließ sich generell keine eindeutige Beeinflussung durch die Behandlung mit Niclosamid beobachten (vgl. Abbildung 14 B). MIA PaCa-2 und Panc-1 zeigten eine Steigerung

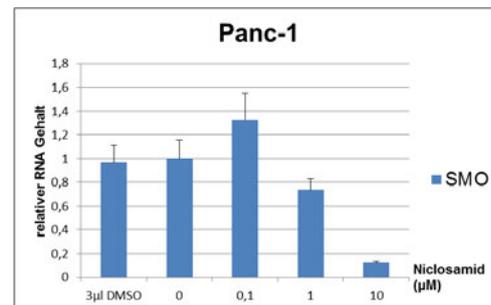
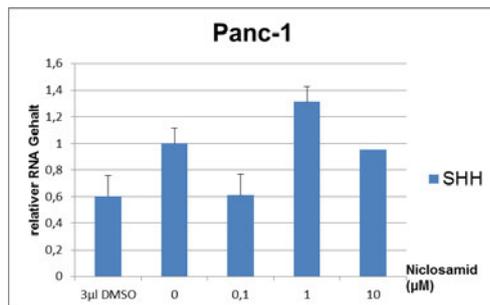
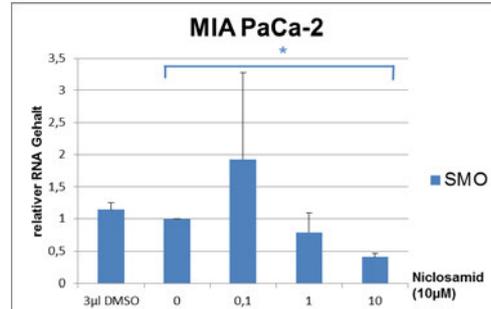
der Expression unter Inkubation mit Niclosamid, wohingegen bei HEK 293 eine deutliche Abnahme des Expressionslevels zu verzeichnen war. Bei L3.6pl ließen sich keine eindeutigen Veränderungen der Expression durch die Behandlung mit Niclosamid erkennen.

### 3.5.3 Komponenten des Hedgehog-Signalweges

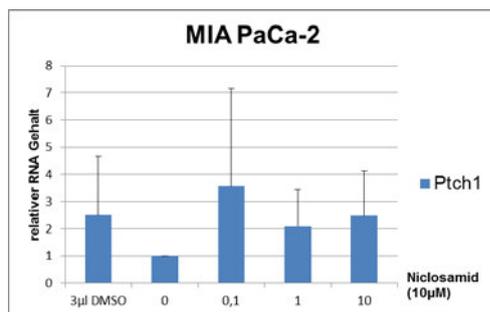
#### A: SHH



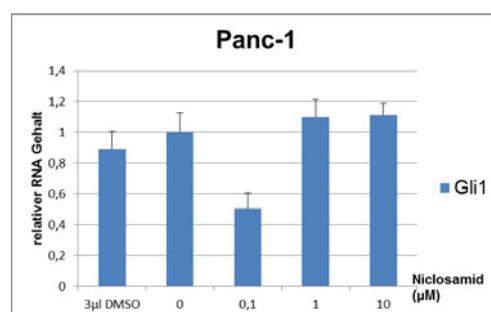
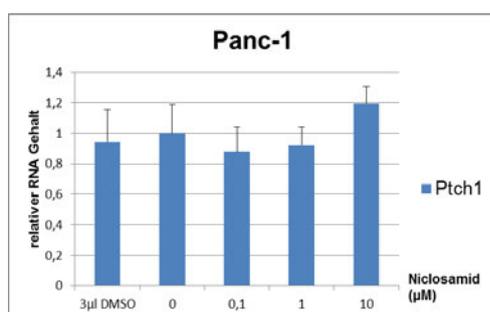
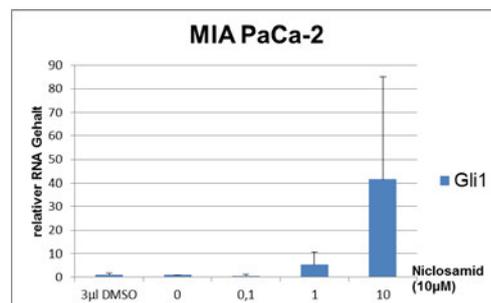
#### B: SMO



#### C: Ptch1



#### D: Gli1



**Abbildung 15: RNA-Expression der Zielgene des Hedgehog-Signalweges.**

Dargestellt sind SHH (A), SMO (B), Ptch1 (C) und Gli1 (D). Die angegebenen Zelllinien wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid für 24 Stunden inkubiert. Die Expressionen der einzelnen Zielgene wurden jeweils an der unbehandelten Zellkontrolle normiert (\*p≤0,05 % vs. Kontrolle).

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Niclosamid auf den Hedgehog-Signalweg aufgezeigt werden. Hierbei handelt es sich um einen weiteren, an der Entstehung des Pankreaskarzinoms beteiligten Signalweg (vgl. Kapitel 1.3). Dafür wurden die

Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 und Panc-1 für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid behandelt. Anschließend wurden in der qRT-PCR die Expressionslevel ausgewählter Gene des Hedgehog-Signalweges (SHH, SMO, Ptch1 und Gli1) gemessen. Als Housekeeping-Gene wurden wiederum ARP und HPRT verwendet. Für MIA PaCa-2 konnte nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid eine Expressionssteigerung des Liganden SHH beobachtet werden. Die Expression des 7-Transmembranrezeptorproteins SMO hingegen stieg bei 0,1  $\mu\text{M}$  eingesetztem Niclosamid, um dann bei 10  $\mu\text{M}$  wieder einen Abfall gegenüber der Kontrolle aufzuzeigen. Das 12-Transmembran-Rezeptorprotein Ptch1 zeigte eine von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid gleichbleibende Expressionssteigerung. Für den Transkriptionsaktivator Gli1 ließ sich diese erst bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  erkennen. Die mit Niclosamid behandelten Panc-1-Zellen zeigten eine verminderte Expression von SMO bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Die anderen Komponenten des Hedgehog-Signalweges ergaben unter Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen keine eindeutige Veränderung im Sinne einer Zu- oder Abnahme der Expression (vgl. Abbildung 15).

Im Gegensatz zu den anderen Versuchsreihen handelt es sich bei den hier dargestellten Ergebnissen nicht um Triplikate. Da bereits in orientierenden Untersuchungen keine Eindeutigkeit erhoben werden konnte, wurden die Versuche mit den Zelllinien MIA PaCa-2 nach zwei Ansätzen und mit Panc-1 nach nur einem Ansatz vorzeitig beendet.

## 4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten Krebsarten und geht mit einer äußerst schlechten Prognose einher. Nach wie vor gilt die chirurgische Therapie als einziges potenziell kuratives Verfahren (Doi et al. 2008). Jedoch können nur etwa 20-30 % aller Tumore aufgrund der fehlenden Frühsymptomatik in einem resektablen Stadium diagnostiziert werden (Reissfelder et al. 2007). Keine der momentan vorhandenen Chemotherapien führt zu einer ausgeprägten Verlängerung des Gesamtüberlebens. Die Heilungs- und Überlebensraten können, bei teilweise sehr starken Nebenwirkungen, nur in einem äußerst geringen Ausmaß gesteigert werden (Jemal et al. 2008). Eine ausschließliche Radio- oder Chemotherapie sollte bei Patienten mit resektabel eingeschätztem Pankreaskarzinom demnach nicht durchgeführt werden. Diese kommt nur im Rahmen einer adjuvanten oder palliativen Behandlung in Betracht (Doi et al. 2008). Aufgrund der unzureichenden therapeutischen Möglichkeiten für das Pankreaskarzinom wird der Entwicklung neuer Wirkstoffe bzw. der Ausweitung der Wirkspektren bekannter Substanzen ein großer Stellenwert in der Krebsforschung zugesprochen. Diese sollten gezielt an den Bestandteilen der an der Tumorentwicklung beteiligten Signalwege angreifen, um eine selektive nebenwirkungsarme Zytotoxizität zu bewirken (Li D et al. 2004).

Die von uns untersuchte anthelmintische Substanz Niclosamid wird schon seit langem für unterschiedlichste therapeutische Zwecke eingesetzt. Unter anderem konnten proliferationshemmende Effekte auf verschieden solide Tumore nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.4). Bezogen auf Pankreaskarzinom-Zellen gab es bereits erste Hinweise, dass Niclosamid auch über den Wnt-Signalweg einen modulierenden Einfluss ausübt (Giles et al. 2003, Zeng et al. 2006, Pasca di Magliano et al. 2007, Lu et al. 2011, Li Y et al. 2014).

Es zeigt sich, dass die Hemmung des Tumorwachstums beim Pankreaskarzinom und die Beeinflussung über verschiedene Signalwege durch Niclosamid ein noch unzureichend erforschtes Gebiet ist. Dieses hat vor dem Hintergrund der momentan sehr unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten beim Pankreaskarzinom eine hohe medizinische Relevanz.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse eine inhibitorische Wirkung des Anthelmintikums Niclosamid auf die humanen Pankreaskarzinom-

Zelllinien MIA PaCa-2, Panc-1 und L3.6pl. Neben dem Einfluss auf die für das Tumorwachstum wichtige Proliferation konnte eine Steigerung der Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen, eine Beeinflussung des Zellzyklus sowie eine Verringerung der Migrationskapazität eruiert werden.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss von Niclosamid auf zwei der für die Entwicklung von Pankreaskarzinomen bedeutsamen Signalwege Wnt und Hedgehog untersucht. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger inhibitorischer Effekt von Niclosamid auf die Expressionsraten von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs. In der exemplarischen Überprüfung von Markern des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges und des Hedgehog-Signalweges konnten keine eindeutigen Aussagen bezüglich einer Modulation durch Niclosamid getroffen werden.

## **4.1 Versuchsbedingungen**

### **4.1.1 Auswahl der Zelllinien**

Die in den Versuchen eingesetzten Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 und Panc-1 entstammen ursprünglich einem Primärtumor. Es handelt sich dabei um seit langem etablierte und in vielen Forschungsprojekten verwendete Zelllinien. Bei den Zellen zeigt sich eine hohe Proliferationskapazität sowie niedrige Aneuploidie und Zelldifferenzierung. Sie weisen zusammengenommen hohe Malignitätskriterien auf. Durch ihre unkomplizierte Kultivierbarkeit und eine sehr kurze Verdopplungszeit von 40 Stunden (MIA PaCa-2) bzw. 52 Stunden (Panc-1), eignen sich diese Zelllinien sehr gut für die in dieser Forschungsarbeit durchgeführten Versuche (Yunis et al. 1977) (vgl. Kapitel 2.1.6.1 und 2.1.6.2). Außerdem wurde für die Versuchsreihen die L3.6pl-Zelllinie, eine metastatische Variante der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie COLO 357, verwendet. Da Pankreaskarzinome bei Diagnosestellung häufig bereits metastasiert sind, schien es sinnvoll, die Wirkung von Niclosamid auch in einer solchen metastatischen Zelllinie zu testen (Bruns et al. 1999) (vgl. Kapitel 2.1.6.3).

Als Kontrolle für die PCR-Versuche wurde neben den eben genannten Tumorzelllinien die HEK 293-Zelllinie als Wnt-aktive Kontrolle eingesetzt (vgl. Kapitel 2.1.6.4).

### **4.1.2 Auswahl der Inkubationszeiten und Konzentrationen**

In mehreren Vorversuchen wurden verschiedene für die Niclosamid-Wirkung geeignete Inkubationszeiten (24, 48 und 72 Stunden) getestet (Osada et al. 2011, Sack et al. 2011). Da die Zellen bereits nach 24 Stunden deutlich auf Niclosamid ansprachen, wurde dieser Zeitraum für alle Versuche ausgewählt. Der Dosisbereich zwischen 0,1-30  $\mu\text{M}$  orientierte sich an dem in der Literatur für die Behandlung anderer Tumorzellen beschriebenen Konzentrationen mit Niclosamid (Ren et al. 2010, Sack et al. 2011, Ono et al. 2014).

## **4.2 Einfluss von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zelllinien**

Als grundlegende erste Frage der Dissertationsarbeit galt es zu überprüfen, ob Niclosamid eine Wirkung auf die Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2, Panc-1 und L3.6pl ausübt. Dafür wurden die Zellen jeweils für 24 Stunden mit Niclosamid behandelt und im Anschluss die Zellzahl sowie die Apoptose- und Nekroseraten bestimmt. Weiterhin wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt und das Migrationsverhalten untersucht.

### **4.2.1 Proliferationshemmung**

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von Niclosamid auf die Proliferation der Zellen untersucht. Dafür wurden die drei verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen Niclosamid inkubiert und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Um eine selektive Inhibition rasch proliferierender Krebszellen nachzuweisen, wurden die gleichen Versuche mit humanen Fibroblasten als Kontrollzellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1). Zudem wurde in parallelen Versuchen das Vergleichsmedikament Cyclopamin als bekannter Proliferationshemmer bei Pankreaskarzinom-Zellen verwendet (Feldmann et al. 2008 a, Feldmann et al. 2008 b) (vgl. Kapitel 1.3).

Bei allen drei Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums durch Niclosamid beobachtet werden. So zeigte sich eine signifikant verringerte Proliferationsrate bereits ab 0,1  $\mu\text{M}$  (MIA PaCa-2 und Panc-1) bzw. 3  $\mu\text{M}$  (L3.6pl) eingesetztem Niclosamid im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Kapitel 3.1). Dies deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, welche die antiproliferative Wirkung von Niclosamid auf solide Tumore untersuchten,

wie zum Beispiel das kolorektale Karzinom (Ren et al. 2010, Osada et al. 2011, Sack et al. 2011), das Mammakarzinom (Balgi et al. 2009, Lu et al. 2011, Wang Y et al. 2013, Londono-Joshi et al. 2014), das Prostatakarzinom (Ren et al. 2010, Lu et al. 2011, Liu et al. 2014), das Ovarialkarzinom (Yo et al. 2012, Arend et al. 2014), das Cervixkarzinom (Ren et al. 2010), das Glioblastom (Wieland et al. 2013), das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Li R et al. 2013), das Leiomyom (Ono et al. 2014) oder das Adenokarzinom der Lunge (Ren et al. 2010). Auch auf hämatologische Tumore wie der AML (Jin et al. 2010) und dem MM (Khanim et al. 2011) scheint Niclosamid eine vergleichbare Wirkung zu besitzen.

Auch die bereits gezeigte Abhängigkeit der Wirkung von der eingesetzten Konzentration lässt sich mit den vorliegenden Versuchen vergleichen. Für Prostatakarzinom-Zellen konnte eine mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) zwischen 0,1-0,7  $\mu$ M Niclosamid ermittelt werden (Ren et al. 2010, Lu et al. 2011). Für Mammakarzinom-Zellen zeigten sich  $IC_{50}$ -Werte zwischen 0,1-1  $\mu$ M (Lu et al. 2011) und für AML-Zellen konnten diese Werte bereits mit Dosierungen unter 0,1  $\mu$ M erreicht werden (Jin et al. 2010). Entsprechend zeigte sich in den vorliegenden Versuchen bei gleichen Inkubationszeiten ein Abfall der Proliferation auf 48 % (MIA PaCa-2) und 55 % (Panc-1) unter Einsatz von 0,1  $\mu$ M Niclosamid. L3.6pl erreichte eine  $IC_{50}$  bei Dosierungen zwischen 1-3  $\mu$ M Niclosamid.

Auch auf humane Fibroblasten wirkte Niclosamid mit einem Rückgang der Proliferationsrate, jedoch in einem weitaus geringeren Ausmaß. Signifikante Werte konnten in der Dissertationsarbeit erst ab Konzentrationen von 10  $\mu$ M Niclosamid beobachtet werden. Die Pankreaskarzinom-Zelllinien hingegen zeigten schon ab 0,1  $\mu$ M Niclosamid eine signifikante Abnahme der Proliferation. Bei den Fibroblasten ergab sich bei Konzentrationen von 0,1-3  $\mu$ M weiterhin ein relativer Anteil vitaler Zellen von über 80 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Auch unter Einsatz von 10  $\mu$ M Niclosamid war der Rückgang der vitalen Zellzahl auf 67 % des Ausgangswertes im Vergleich zu MIA PaCa-2 (19 %), Panc-1 (33 %), und L3.6pl (43 %) noch deutlich geringer (vgl. Kapitel 3.1). Dieses selektive Ansprechen von Niclosamid auf Krebszellen unter weitgehender Aussparung normaler Körperzellen (therapeutisches Fenster im Bereich von 1–10  $\mu$ M) deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So setzt Niclosamid die Lebendzellzahl von AML-Zellen herab, ohne dabei gesunde Knochenmarkszellen zu beeinflussen (Jin et al. 2010). Das gleiche gilt für die Viabilität humaner neuronaler Zellen im Vergleich zu

Glioblastomzellen (Wieland et al. 2013). Darüber hinaus wurde die Anzahl vitaler Monozyten, B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach 7 Tagen Inkubation mit Niclosamid im Gegensatz zu MM-Zellen nur geringfügig beeinflusst (Khanim et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass auch für die antitumorale Wirkung von Niclosamid beim Pankreaskarzinom ein therapeutisches Fenster besteht. In einem Bereich zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  hemmt Niclosamid, ohne größere Beeinflussung normaler Körperzellen die Proliferation von Pankreaskarzinom-Zellen (vgl. Kapitel 3.1).

Parallel wurden die Versuche auch mit dem Hedgehog-Inhibitor Cyclopamin durchgeführt. Ein identischer Versuchsaufbau konnte keine Effekte im Sinne einer Proliferationshemmung bewirken. Erst nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden und einer Erhöhung der Konzentrationen auf 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  ließ sich eine signifikante Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle erkennen (vgl. Kapitel 3.1). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, bei denen ebenfalls längere Inkubationszeiten für die Versuche verwendet wurden. So konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl nach 4 Tagen Inkubation mit 6  $\mu\text{M}$  Cyclopamin bei Zellen eines neuroendokrinen Tumors (Fendrich et al. 2007) und nach 6 Tagen mit nur 1,5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin bei Pankreaskarzinom-Zellen erreicht werden (Feldmann et al. 2008 b). Auch auf die von uns verwendeten Zelllinien MIA PaCa-2 und L3.6pl hatte Cyclopamin in den von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Versuchen (6  $\mu\text{M}$ , 4 Tage) einen signifikanten Effekt, nicht jedoch auf die Panc-1-Zellen (Feldmann et al. 2007). Niclosamid schien demnach bereits nach sehr viel kürzeren Inkubationszeiten eine proliferationshemmende Wirkung auf Pankreaskarzinom-Zelllinien zu haben als Cyclopamin.

Es ist anzumerken, dass sich die Applikation des in Pulverform gelieferten Cyclopamins auf die Zellen als äußerst schwierig erwies. Wie im Kapitel 2.4.1.6 beschrieben, wurde dem Pulver eine vorher berechnete Menge eines 45 %-igen HBC/PBS-Gemisches als Trägersubstanz zugegeben. Diese Mischung wurde erhitzt, um das darin enthaltene Pulver in Lösung zu bringen. Aufgrund der elektrostatischen Anziehung konnte das Pulver möglicherweise nicht adäquat aus dem braunen und damit schwer einsehbaren Glasbehälter entfernt werden, in dem es geliefert worden war. Nach Zugabe der Trägersubstanz konnte die vollständige Lösung des Pulvers in diesem Gefäß nur schwer beurteilt werden. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass die applizierten Mengen Cyclopamin möglicherweise geringer als die in den

Versuchsansätzen kalkulierten Mengen waren. Die nach Inkubation mit Cyclopamin erhobenen Messergebnisse sind demnach kritisch zu betrachten.

#### **4.2.2 Steigerung der Apoptose- und Nekroseraten**

Als zweiten Aspekt galt es zu klären, ob die proliferationshemmende Eigenschaft von Niclosamid bei aufsteigenden Konzentrationen und die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringerten Zellzahlen durch Apoptose und Nekrose bedingt waren. Ein zytotoxischer Effekt mit vermehrten Apoptose- und Nekroseinduktionen nach Behandlung mit Niclosamid konnte bereits für andere Tumor-Zelllinien aufgezeigt werden (Ren et al. 2010, Jin et al. 2010, Lu et al. 2011, Osada et al. 2011, Khanim et al. 2011, Londono-Joshi et al. 2014, Ye et al. 2014).

Die in der FACS-Analyse mithilfe einer Annexin-/Propidiumiodid-Doppelfärbung ermittelten Versuchsergebnisse zeigten einen dosisabhängigen Anstieg des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen für alle drei untersuchten Zelllinien (vgl. Kapitel 3.2). Bei Konzentrationen unterhalb des von uns ermittelten, zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  liegenden therapeutischen Fensters schien Niclosamid eine rein zytostatische Wirkung zu haben. So befanden sich bei 0,1  $\mu\text{M}$  eingesetztem Medikament bei allen Zelllinien noch über 90 % der Zellen in einem vitalen Stadium. Ab 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid nahm der Anteil der vitalen Zellen jedoch ab. So waren bei MIA PaCa-2 hier bereits 15 % der Zellen in Apoptose und 6 % nekrotisch. Bei Panc-1 (4 % Apoptose, 5 % Nekrose) und L3.6pl (4 % Apoptose und 5 % Nekrose) war dieser Effekt jedoch deutlich schwächer. Am oberen Ende des therapeutischen Fensters bei 10  $\mu\text{M}$  befanden sich bei den drei Zelllinien 16-46 % der Zellen in Apoptose sowie 21-28 % in Nekrose.

Andere Studien stützen diese Ergebnisse. So konnte auch an Prostatakarzinom-Zellen eine dosisabhängige Induktion der Apoptose und Nekrose durch Niclosamid mit ähnlichen Werten ermittelt werden. Nach 24 Stunden Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid zeigten sich 5 % apoptotische und 9 % nekrotische Zellen, mit 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid 15 % Apoptose und 39 % Nekrose (Ren et al. 2010). Für Mammakarzinom-Zellen konnten nach 24 Stunden Inkubation 15 % (1,25  $\mu\text{M}$  Niclosamid) bzw. 30 % (10  $\mu\text{M}$  Niclosamid) apoptotische Zellen gemessen werden (Ye et al. 2014). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Studie bei der nach 24 Stunden Inkubation mit 1,2  $\mu\text{M}$  Niclosamid signifikant und 2,4  $\mu\text{M}$  Niclosamid hochsignifikant gesteigerte Apoptoseraten bei Prostata- und Mammakarzinom-Zellen erreicht wurden

(Lu et al. 2011). Auch AML-Zellen zeigten nach 48 Stunden Inkubation mit Niclosamid bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  eine Zunahme der Apoptoseraten auf 20 % und nach 72 Stunden Inkubation mit 1,5  $\mu\text{M}$  Niclosamid eine Zunahme auf 80 % (Jin et al. 2010). Für Zellen des MM konnte nach 48 Stunden Inkubation mit 3,5  $\mu\text{M}$  Niclosamid eine Steigerung der Apoptoserate auf 40-80 % gemessen werden (Khanim et al. 2011). Für Zellen des kolorektalen Karzinoms im Vergleich zu Fibroblasten aus dem menschlichen Tumorgewebe, Brustepithelgewebe und mononukleären Zellen des peripheren Blutes konnte bereits gezeigt werden, dass auch bei der Apoptoseinduktion Niclosamid selektiv auf Tumorzellen wirkt und dabei normale Körperzellen ausspart. Auch nach 72 Stunden Inkubation zeigten die gesunden Körperzellen erst ab höheren Konzentrationen von 5-20  $\mu\text{M}$  eine vermehrte Apoptose von 1-30 %, wohingegen die kolorektalen Karzinomzellen bei diesen Konzentrationen und Zeiten bereits zwischen 60-80 % in Apoptose waren (Osada et al. 2011). Als Ursache für die Apoptoseinduktion wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Jin et al. 2010, Khanim et al. 2011) sowie ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung diskutiert (Khanim et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Niclosamid sowohl zeit- als auch dosisabhängig zytotoxisch wirkt, indem es durch Apoptose und Nekrose den Zelltod bewirkt. Die zytotoxische Wirkung tritt in der vorliegenden Dissertationsarbeit erst am oberen Ende des therapeutischen Fensters (1-10  $\mu\text{M}$ ) auf. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten würde jedoch wahrscheinlich auch bei geringeren Konzentrationen zu einem solchen Effekt führen.

### **4.2.3 Zellzyklusarrest**

Die antiproliferative und apoptoseinduzierende Wirkung von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zellen legte eine Zellzyklusanalyse unter Exposition von Niclosamid nahe (vgl. Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Der Zellzyklus besteht aus der M-Phase (Phase der mitotischen Teilung) und der Interphase, die sich wiederum in die G0/G1-, S-, und G2-Phase gliedert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann anhand des unterschiedlichen DNA-Gehalts der Zellpopulationen eine Zuordnung zu den verschiedenen Zyklusphasen vorgenommen werden. In der G0/G1-Phase beginnen die Zellen zu wachsen und es liegt ein einfacher Chromosomensatz vor. In der S-Phase wird durch die Replikation der Chromosomensatz verdoppelt. Danach

folgt die G2-Phase als Vorbereitung auf die Mitose, an deren Ende wieder ein einfacher Chromosomensatz vorliegt. Zusätzlich zu diesen Phasen gibt es noch Teile der Zellpopulation, die sich in der subG1-Phase befinden. Diese Fraktion beinhaltet Zellen, die sich in einem mittleren bis späten Stadium der Apoptose befinden und einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen als die diploiden Zellen der G0/G1-Phase (Lenz et al. 2007).

Der Anteil der Zellpopulation der subG1-Phase nahm bei MIA PaCa-2 mit steigenden Konzentrationen signifikant zu. Bei Panc-1 ließ sich eine Abnahme und bei L3.6pl kein eindeutiger Trend erkennen. Im Vergleich zur Gesamtzellzahl nahm der Anteil der subG1-Fraktion bei allen drei Zelllinien auch bei höheren Niclosamidkonzentrationen nur einen sehr geringen Anteil im niedrigen einstelligen Prozent Bereich ein. Die Fraktionen der übrigen Zellzyklusphasen verschoben sich jedoch bei höheren Niclosamidkonzentrationen deutlich. So ließ sich bei allen drei Zelllinien ein signifikanter Abfall des Anteils der sich replizierenden Zellen in der S-Phase beobachten. Der Anteil der Zellen in der G1-Phase stieg bei allen Zelllinien zunächst an, was eine dosisabhängige Induktion des Zellzyklusarrestes bei geringen Mengen von Niclosamid (0,1  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$ ) vermuten lässt. Diese These wird von anderen Studien gestützt. So konnten der Anteil von Prostatakarzinom-Zellen in der G1-Phase nach 24 Stunden Inkubation von 47 % (DMSO-Kontrolle) auf 75 % (1  $\mu\text{M}$  Niclosamid) gesteigert werden (Ren et al. 2010) und bei Glioblastomzellen von 48 % (DMSO-Kontrolle) auf 77 % (1  $\mu\text{M}$  Niclosamid) (Wieland et al. 2013). Bei Zellen der AML konnte kein Effekt von Niclosamid auf den Zellzyklus gemessen werden (Jin et al. 2010). Bei höheren Dosen von 3  $\mu\text{M}$  (MIA Paca-2) sowie 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  (Panc-1) Niclosamid kam es jedoch wieder zu einem signifikanten Abfall der Populationsanteile an der G1-Phase im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu stiegen diese bei L3.6pl weiter an. Die Anzahl der Zellen mit einfachem Chromatin Gehalt in der G2/M-Phase zeigte bei MIA PaCa-2 für Konzentrationen bis 3  $\mu\text{M}$  eine Ab-, bei Panc-1 eine Zunahme und bei L3.6pl keinen eindeutigen Trend (vgl. Kapitel 3.3).

Die durchflusszytometrische Analyse deutet darauf hin, dass Niclosamid dosisabhängig einen G0/G1-Zellzyklusarrest in Pankreaskarzinom-Zellen induziert. Die Spitze dieses Arrestes lag bei Konzentrationen zwischen 0,1-3  $\mu\text{M}$ . Diese Ergebnisse decken sich mit einer verminderten Expression von Cyclin D1 bei gleichen Konzentrationen (vgl. Kapitel 3.5.1). Cyclin D1 reguliert im Zellzyklus den Übergang von der

G1- in die S-Phase (Wieland et al. 2013). Die Induktion von Apoptose war in der Zellzyklusanalyse durch die sich in der subG1-Phase befindlichen Zellfraktionen nachweisbar. Dieser Effekt war aber sehr viel geringer ausgeprägt, als die vorstehenden Versuche der FACS-Analysen hätten vermuten lassen.

#### **4.2.4 Einfluss auf das Migrationsverhalten**

Initial entwickelt sich und wächst das Pankreaskarzinom als umschriebener Tumor. Dieser beginnt dann jedoch relativ rasch, sich metastatisch in die umliegenden Gewebe und systemisch auszubreiten. Dieser Prozess ist in 90 % der Fälle für den Tod des Patienten verantwortlich (DiMugno et al. 1999). Dabei korreliert die Beweglichkeit und das Migrationsverhalten der Zellen mit der Befähigung Metastasen auszubilden (Partin et al. 1989).

Mit Hilfe eines Transwell-Migrationsassays mit modifizierter Boyden-Kammer wurde die Wirkung von Niclosamid auf die Migrationskapazität der Pankreaskarzinom-Zelllinien und damit den Einfluss auf deren metastatisches Potential untersucht. Die migrierenden Zellen benötigen in diesem *In vitro*-Ansatz einen chemotaktischen Gradienten, um die Poren der Membran zu überwinden. Dafür wurden die Zellen in Kulturmedium ohne FCS gehalten und in den unteren Teil der Boyden-Kammer Kulturmedium mit 10 % FCS gegeben. Die Ergebnisse der Zellmigration durch die Poren der Boyden-Kammer zeigten einen inhibitorischen Effekt von Niclosamid auf die Metastasierung. Bereits eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Niclosamid führte bei MIA PaCa-2 zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl migrierter Zellen auf 61 % und bei Panc-1 auf 44 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen, deren Migrationsrate als Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Bei Steigerung der applizierten Menge Niclosamid zeigte sich eine weitere kontinuierliche Abnahme der Zellmigration. Bei Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid migrierten so gut wie keine Zellen mehr durch die Membran (MIA PaCa-2 3 %, Panc-1 17 %) (vgl. Kapitel 3.4). Zusammengenommen ließen diese Ergebnisse vermuten, dass Niclosamid bereits in sehr niedrigen Konzentrationen die Migration von Pankreaskarzinom-Zellen inhibiert. Im Bereich des therapeutischen Fensters zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  (vgl. Kapitel 3.1) war die Migrationsfähigkeit bereits nahezu vollständig aufgehoben. Einen vergleichbaren Effekt hatte Niclosamid auch auf Mammakarzinom-Zellen mit einer Abnahme der Migrationsrate auf 65 % (1,25  $\mu\text{M}$ ) bzw. 20 % (5  $\mu\text{M}$ ) nach 24 Stunden Inkubation (Ye et al. 2014). Weiterhin konnten Zellen des kolorektalen Karzinoms um mehr als 50 % in ihrer

Migrationsrate nach 24 Stunden Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid herabgesetzt werden (Sack et al. 2011).

Die L3.6pl-Zelllinie konnte, obwohl in der Literatur als hoch metastatisch beschrieben (Bruns et al. 1999), auch unter Einsatz verschiedenster Chemokine und Veränderung aller Parameter (vgl. Kapitel 3.4) nicht zur Migration gebracht werden. So wurde die Anzahl der ausplattierten Zellen von  $2 \times 10^4$  schrittweise bis  $2,5 \times 10^5$  gesteigert. Auch eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 24 Stunden bis hin zu 6 Tagen brachte keinen Erfolg. Sogar unter Einsatz der chemotaktisch wirkenden Substanzen Fibronectin (100 ng/ml) und VEGF (50 ng/ml) konnten keine Migrationsbewegungen beobachtet werden. Weiterhin wurden die Zellen 24 Stunden vor dem Aussähen in ein Kulturmedium mit nur 1 % FCS umgesetzt, um einen verstärkten Effekt des Serumgradienten zu bewirken. Um weitere Fehlerquellen ausschließen zu können, wurden verschiedene Nährmedien (RPMI-1640, DMEM-F12) und verschiedene Passagen der Zelllinie verwendet. Da die Migrationsrate der Zellen nicht nur verringert war, sondern überhaupt keine Zellen die Membran passierten, muss auch ein Missverhältnis zwischen der Größe der Zellen zu dem der Poren in Betracht gezogen werden. Hierbei ist anzumerken, dass die verwendete Porengröße von 8  $\mu\text{M}$  ausreichend für die Migration der Zellen sein sollte. Dies wurde von anderen Arbeitsgruppen mit ähnlichem Versuchsaufbau bereits gezeigt (Bruns et al. 1999).

Insgesamt konnte ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Niclosamidkonzentration und Migration der Pankreaskarzinom-Zelllinien MIA PaCa-2 und Panc-1 beobachtet werden. Eine Minderung der Migrationsfähigkeit zeigte sich bereits in relativ geringen Konzentrationen und schien somit ein sensibler Marker für die Wirkung des Medikaments auf das metastatische Wachstum des Tumors zu sein.

### **4.3 Einfluss von Niclosamid auf den Wnt-Signalweg**

Ein zentraler Fokus der vorliegenden Arbeit richtete sich auf die Frage, ob es durch die Inkubation mit Niclosamid zu Veränderungen des Wnt-Netzwerkes in Pankreaskarzinom-Zellen kommt. Hierfür wurden veränderte Expressionen einiger ausgewählter Wnt-Komponenten unter Niclosamid-Einwirkung in der qRT-PCR nachgewiesen. Die Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden entsprechend den vorherigen Versuche mit Niclosamid behandelt und die konzentrationsabhängige transkriptionelle Expression der Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges Axin2, MMP7 und Cyclin D1 sowie des Wnt-Co-Aktivators BCL9 in der qRT-PCR aufge-

zeigt. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt (Giles et al. 2003, Li Y-J et al. 2005, Zeng et al. 2006, Pasca di Magliano et al. 2007, Lu et al. 2011). Auch gibt es Hinweise, dass eine gezielte Blockade des Wnt-Signalweges eine Verringerung der Proliferation sowie Induktion der Apoptose bei Pankreaskarzinom-Zellen zur Folge hat (Pasca di Magliano et al. 2007). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass Niclosamid eine zytotoxische Wirkung auf Pankreaskarzinom-Zellen hat (vgl. Kapitel 3.2). Möglicherweise hat Niclosamid auch einen inhibitorischen Effekt auf die Komponenten des Wnt-Signalweges im Pankreaskarzinom. Diese These wird durch die bereits aufgezeigte Beeinflussung des Wnt-Signalweges durch Niclosamid in anderen soliden Tumoren gestützt (Chen et al. 2009, Lu et al. 2011, Osada et al. 2011, Sack et al. 2011, Londono-Joshi et al. 2013, Wang Y et al. 2013, Wieland et al. 2013, Arend et al. 2014, Londono-Joshi et al. 2014 Ono et al. 2014).

Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine dosisabhängige Expressionsabnahme der kanonischen Wnt-Komponenten unter Einsatz von 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid. Besonders die Inhibierung des Wnt-Zielgens Cyclin D1 scheint interessant, da hierdurch neben der Unterdrückung des Zellwachstums auch ein verbessertes Ansprechen vieler Chemotherapeutika auf das Pankreaskarzinom vermutet wird (Kornmann et al. 1999). Außerdem korreliert eine verminderte Expression von Cyclin D1 mit den in der Zellzyklusanalyse gemachten Beobachtungen (vgl. Kapitel 3.3). Als Zellzyklusprotein vermittelt Cyclin D1 den Übergang von der G0/G1-Phase in die S-Phase. Eine Blockade von Cyclin D1 könnte also einen konzentrationsabhängigen Eintritt der Zellen in den Zellzyklusarrest erklären (Sherr 1996, Wieland et al. 2013). Nach 24 Stunden Inkubation mit Niclosamid konnte für MIA PaCa-2 eine signifikante Expressionsminderung ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Bei Panc-1 war diese bei einer Dosis von 1  $\mu\text{M}$  und bei L3.6.pl bereits bei einer Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$  nachweisbar. Bei beiden Zelllinien stieg die Expression von Cyclin D1 bei 10  $\mu\text{M}$  Niclosamid jedoch wieder an. Ähnliche Effekte von Niclosamid konnten auch bei Mammakarzinom-Zellen beobachtet werden (Wang Y et al. 2013). Auch auf Proteinebene konnte dieser Effekt bereits bestätigt werden (Lu et al. 2011, Wieland et al. 2013). Diese Ergebnisse könnten hinweisend auf einen antiproliferativen Effekt von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zellen durch die Blockade von Cyclin D1 sein.

Eine vermehrte Expression von Axin2 gilt als Indiz für einen aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Zellen. Obwohl Axin2 als Teil des Degenerationskomplexes inhibitorisch auf  $\beta$ -Catenin wirkt, korreliert die Expression positiv mit der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges (Yan et al. 2001). Auf Proteinebene konnte eine hemmende Wirkung auf die Axin2-Expression unter Niclosamidinkubation mit Konzentrationen von 0,3-2,4  $\mu$ M für 24 Stunden beobachtet werden (Lu et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Konzentrationen in diesem Bereich ein ähnlicher Effekt erzielt werden. Für Panc-1 ließ sich dabei eine signifikante Reduktion der Expression bei 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Niclosamid und für L3.6pl bei 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M sehen. MIA PaCa-2 allerdings zeigte keine augenfälligen Veränderungen (vgl. Kapitel 3.5.1). Niclosamid hat demnach eine überwiegend hemmende Wirkung auf diese Komponente des kanonischen Wnt-Signalweges in Pankreaskarzinom-Zellen.

Ein Expressionsrückgang von MMP7 ließe sich mit den in den Versuchen beobachteten, durch Niclosamid gesteigerten Apoptoseraten korrelieren. MMP7 beeinflusst die Tumorformation, indem es selektiv die Expansion eines gegen apoptotische Stimuli resistenten gangartigen Epithels im Pankreaskarzinom fördert (Crawford et al. 2002). Ein signifikanter Expressionsrückgang konnte auch hier nur bei Panc-1 und L3.6pl bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht werden (vgl. Kapitel 3.5.1). Die verminderte Expression von MMP-7 trat demnach parallel zum Anstieg der Apoptoseraten bei Konzentrationen von bis zu 1  $\mu$ M Niclosamid auf.

Weiterhin wurde die transkriptionelle Expression des Wnt-Co-Aktivators BCL9 untersucht. Dieser ist in manchen Fällen der akuten lymphatischen Leukämie überexprimiert. Seine Funktion in soliden Tumoren bleibt jedoch weiterhin unklar (Brembeck et al. 2004). Er scheint jedoch eine Rolle für die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin zu spielen (Kramps et al. 2002). In den Versuchsreihen konnte lediglich für MIA PaCa-2 eine signifikante Expressionsminderung unter Einsatz von 10  $\mu$ M Niclosamid eruiert werden. Die anderen beiden Zelllinien zeigten keinen eindeutigen Trend. Rückschlüsse auf die Wirkung von Niclosamid auf BCL9 lassen sich demnach nur für MIA PaCa-2 ziehen.

Generell konnte ein Expressionsrückgang der Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges beobachtet werden. Dieser Effekt trat auf bei Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M appliziertem Niclosamid. Die Blockade dieses Signalweges käme

demnach als möglicher Ansatzpunkt für die selektive inhibitorische Wirkung von Niclosamid auf Pankreaskarzinom-Zellen in Betracht. Bei allen drei eingesetzten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigte sich mit steigenden Applikationsmengen von Niclosamid eine Expressionsminderung. Bei einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  stieg die gemessene RNA-Expression jedoch wieder deutlich an. Wie zuvor gezeigt, befand sich bei dieser Applikationsmenge von Niclosamid ein großer Teil der Zellen bereits in Apoptose und Nekrose (vgl. Kapitel 3.2). Dadurch vermehrt vorhandene unspezifische Degradationsprodukte könnten möglicherweise die Ergebnisse als Störvariable beeinflusst haben.

Ein Einfluss von Niclosamid auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg wurde anhand der beiden Marker c-jun und Wnt5a analysiert. Bei Wnt5a handelt es sich um einen klassischen nicht-kanonischen Wnt-Liganden, dessen Expression im Pankreaskarzinom üblicherweise gestört ist (Schwartz et al. 2009). Unklarheit herrscht darüber, ob es zu einer vermehrten oder verminderten Expression im Vergleich zu normalem Pankreas-Gewebe kommt (Crnogorac-Jurcevic et al. 2001, Ripka et al. 2007). Seine exakte Rolle im Wnt-Signalweg, wie auch seine exklusive Zuordnung zum nicht-kanonischen Wnt-Signalweg werden momentan noch kontrovers diskutiert. Wahrscheinlich spielt Wnt5a weniger bei der Tumorentstehung, sondern eher bei der Tumorentwicklung eine Rolle (Pukrop und Binder 2008).

Für die Mia PaCa-2-Zellen zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung von Wnt5a bei 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid und für Panc-1 bei 10  $\mu\text{M}$ . Für beide Zelllinien ließ sich jedoch kein konzentrationsabhängiger Effekt über alle Messwerte hinweg erkennen. Bei L3.6pl konnten keine augenscheinlichen Expressionsveränderungen von Wnt5a ermittelt werden (vgl. Kapitel 3.5.2). C-jun, ein weiterer Marker für den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, zeigte bei allen drei Zelllinien einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Expression. Signifikante Werte wurden hier jedoch hauptsächlich bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht. Diese Ergebnisse müssen aufgrund der hohen Apoptoseraten bei dieser Niclosamid-Konzentration wie zuvor erläutert, kritisch gesehen werden (vgl. Kapitel 3.5.2).

Neben den drei Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden die Versuche auch mit HEK 293 durchgeführt. Diese Zellen wurden bereits als Wnt-aktive Positivkontrolle für Wnt-Gen-Nachweise in der PCR verwendet (vgl. Kapitel 2.1.6.4). In den durchgeführten Versuchen deckten sich die Ergebnisse der HEK 293-Zelllinie größtenteils mit denen

der Pankreaskarzinom-Zelllinien. Dies bestätigt die These, dass Niclosamid mutmaßlich eine inhibitorische Wirkung über die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs ausübt.

#### **4.4 Einfluss von Niclosamid auf den Hedgehog-Signalweg**

Es ist bekannt, dass bei der Entstehung von Tumoren beteiligte Signalwege nicht für sich alleine stehen, sondern immer mit anderen Signalwegen verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen (vgl. Kapitel 1.1). Somit wirken auch Inhibitoren wie Niclosamid nicht exklusiv auf einen Signalweg. Ein Einfluss von Niclosamid auf den Notch-Signalweg (Wang A et al. 2009) und den Wnt-Signalweg (Osada et al. 2011), welche beide eine Rolle in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms in soliden Tumoren spielen, gilt als sehr wahrscheinlich (vgl. Kapitel 1.4). Letzteres konnte auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.5.1).

Aus der Literatur ist bekannt, dass neben diesen beiden Signalwegen auch der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt (Berman et al. 2003, Thayer et al. 2003, Kaye et al. 2004, Pasca di Magliano et al. 2006, Morton et al. 2007). Die Expression der Hedgehog-Komponenten SHH, SMO und Ptch1 ist im normalen Pankreasgewebe nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu kommt es während der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms zu einem relativen Anstieg der Expression dieser Proteine (Pasca di Magliano et al. 2006). Durch Einsatz von Cyclopamin, einem etablierten Inhibitor des Hedgehog-Signalwegs, konnte bereits eine signifikante Expressionsabnahme der Hedgehog-Zielgene Gli1, Gli2 und Ptch1 in Pankreaskarzinom-Zellen beobachtet werden (Feldmann et al. 2007, Feldmann et al. 2008 b). Eine Reduktion der Expression von Ptch1 durch Niclosamid konnte für Mammakarzinom-Zellen gezeigt werden (Wang Y et al. 2013). Die für die verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien beschriebene Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch den Hedgehog-Inhibitor Cyclopamin konnten in den zuvor beschriebenen Versuchen bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.1). Ziel dieser Arbeit war es demnach aufzuzeigen, ob durch eine Inkubation der Pankreaskarzinom-Zellen mit Niclosamid auch der Hedgehog-Signalweg beeinflusst wird.

Für die qRT-PCR-Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit die Transkripte des Liganden SHH, der Membranproteine Ptch1 und SMO sowie des Gli-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Gli1 nachgewiesen. Der Ligand SHH schien bei MIA PaCa-2

von Niclosamid unbeeinflusst, bis es unter Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  zu einem starken Anstieg der Expression kam. Bei dieser höchsten eingesetzten Konzentration befand sich jedoch ein großer Anteil der Zellen bereits in Apoptose (vgl. Kapitel 3.2). Die Expressionsaktivität von SMO ging mit Steigerung der Konzentrationen zurück. Bei den Transkripten von Ptch1 und Gli1 hingegen konnte ein Anstieg der Aktivität beobachtet werden. Die mit Niclosamid behandelten Panc-1-Zellen zeigten eine verminderte Expression von SMO bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Es ließ sich jedoch kein eindeutiger Effekt im Hinblick auf die mRNA-Expression für SHH, Ptch1 oder Gli1 erkennen (vgl. Kapitel 3.5.3).

Die unabhängig voneinander durchgeführten Experimente zeigten teilweise sehr hohe Standardabweichungen, und es ließen sich keine eindeutigen Trends hinsichtlich eines modulierenden Effektes von Niclosamid auf die Zielgene des Hedgehog-Signalweges erkennen (vgl. Kapitel 3.5.3). Eine große Variabilität im Ansprechen verschiedener Pankreaskarzinom-Zellen auf eine Therapie mit Cyclopamin wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Thayer et al. 2003, Feldmann et al. 2007). Auch das Vorhandensein von Subklonen mit abweichend starker Hedgehog-Aktivität und damit unterschiedlicher Beeinflussung durch Cyclopamin wird vermutet (Feldmann et al. 2007). Möglicherweise treten ähnliche Effekte auch bei der Behandlung mit Niclosamid auf und erklären damit die beobachteten Ergebnisse.

## **4.5 Fazit und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte dargelegt werden, dass Niclosamid eine konzentrations- und zeitabhängige inhibitorische Wirkung auf Pankreaskarzinom-Zelllinien hat. Dabei stellte sich heraus, dass ein therapeutisches Fenster in einem Bereich von 1-10  $\mu\text{M}$  besteht. In diesem werden Tumorzellen, aber kaum normale Körperzellen beeinflusst. Die verminderte Proliferation konnte zum einen auf den induzierten Zellzyklusarrest und zum anderen auf eine Steigerung von Apoptose und Nekrose in den behandelten Zellen bei Dosierungen von 10  $\mu\text{M}$  zurückgeführt werden. Darüber hinaus wurde bereits in geringen Konzentrationen die Migration der Zellen signifikant gehemmt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Niclosamid ein potentieller Inhibitor des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in Pankreaskarzinom-Zellen ist. Dies konnte in der PCR anhand der konzentrationsabhängigen Expressionsminderung der Gene für die Signalkaskade wichtiger Proteine aufgezeigt werden. Diese Blockade

könnte unter anderem ursächlich für die oben beschriebenen wachstumshemmenden Effekte von Niclosamid sein. Hierbei ist anzumerken, dass Niclosamid auch auf andere Signalwege Einfluss nimmt. Somit kann die Wnt-Blockade nur als Bestandteil, nicht aber als exklusiver Auslöser der inhibitorischen Wirkung angesehen werden. Eine hemmende Wirkung auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg konnte indes nicht nachgewiesen werden, da es im Bereich des therapeutischen Fensters (1-10  $\mu\text{M}$ ) zu keiner eindeutigen Zu- oder Abnahme der Expression kam. Auch ein Effekt von Niclosamid auf den Hedgehog-Signalweg konnte nicht eindeutig bestätigt werden.

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte demnach die These bestätigt werden, dass Niclosamid das Wnt-Netzwerk in Pankreaskarzinom-Zellen beeinflusst. Die Blockade dieser Signalkaskade geht einher mit einer Proliferationshemmung, Zellzyklusblockade, vermehrter Apoptose und Nekrose sowie einer verminderten Migrationsrate. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Niclosamid ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung von Pankreaskarzinomen mit übermäßiger Aktivierung des Wnt-Signalweges sein könnte. Hierbei reihen sich die erhobenen Daten in die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen ein. So konnten für eine Vielzahl anderer Tumore bereits ähnliche inhibitorische Effekte unter Inkubation mit Niclosamid erreicht werden (vgl. Kapitel 1.4). Auch konnten neben dem Wnt-Signalweg andere Signalkaskaden wie der Notch- (Wang A et al. 2009), der STAT3- (Ren et al. 2010), der mTOR1- (Balgi et al. 2009, Fonseca et al. 2012) sowie der NF- $\kappa$ B-Signalweg (Jin et al. 2010) als mögliche Angriffspunkte von Niclosamid aufgezeigt werden. Eine Untersuchung der Niclosamid-Wirkung auf weitere, für die Entstehung des Pankreaskarzinoms wichtige Signalwege, dürfte ein interessanter Ansatz zukünftiger Forschungsaktivitäten sein.

Um die *In vitro*-Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zu bestätigen, bedarf es zudem im nächsten Schritt einer Untersuchung der hemmenden Wirkung von Niclosamid auf das Tumorstadium im Tiermodell. Ein Effekt von Niclosamid in Tiermodellen mit xenotransplantierten Mäusen konnte bereits für die AML (Jin et al. 2010), das kolorektale Karzinom (Osada et al. 2011), das Bronchialkarzinom (Li R et al. 2013), das Glioblastom (Wieland et al. 2013), das Ovarialkarzinom (Yo et al. 2012) sowie das Mammakarzinom (Londono-Joshi et al. 2014) gezeigt werden.

Um als Anthelmintikum bei Caestodenbefall zu wirken, wird eine einmalige orale Dosis von 2 g verabreicht. Dies führt zu einem Serumplasmaspiegel von 0,76-18,35 µM. Dieser befindet sich im Bereich der für die *In vitro*-Versuche verwendeten Konzentrationen. Die große Spanne des Serumplasmaspiegels ist der individuell sehr unterschiedlichen Absorptionsrate von Niclosamid geschuldet (Andrews et al. 1982). Dies könnte zu uneinheitlichen Effekten auf Tumore in klinischen Studien führen (Li Y et al. 2014). Die niedrige orale Bioverfügbarkeit führt zwar zu einer guten Verträglichkeit (Andrews et al. 1982), gleichzeitig müssten aber Versuche mit einer gut absorbierbaren Form von Niclosamid vorangestellt werden, um verlässliche Schlüsse in Bezug auf eine Krebstherapie ziehen zu können (Li Y et al. 2014).

Niclosamid scheint demnach ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen zu sein. Ein Effekt auf Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Es bedarf jedoch weiterer Analysen, um die genauen molekularen Wirkungsmechanismen besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Krebsarten mit einer extrem schlechten Prognose für die Patienten (Robert Koch-Institut 2012). Der Entwicklung neuer Substanzen für die Therapie wird eine große Bedeutung zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse zugesprochen (Li D et al. 2004).

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, die Wirkung des für die Behandlung von Bandwurminfektionen eingesetzten Anthelmintikums Niclosamid auf verschiedene Pankreaskarzinom-Zelllinien zu untersuchen.

Die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien (MIA PaCa-2, Panc-1 und L3.6pl) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen des Medikaments Niclosamid für 24 Stunden behandelt (0,1; 1; 3; 10; 30  $\mu\text{M}$ , Inkubation in RPMI-1640-Medium). Nachfolgend wurden die vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer wurde die Migration der Zellen durch eine poröse Membran (Porengröße 8  $\mu\text{m}$ ) untersucht. FACS-Analysen nach Färbung mit Annexin und Propidiumiodid dienten zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate sowie zum Nachweis der Veränderungen im Zellzyklus. Um Effekte von Niclosamid auf die Signaltransduktion aufzuzeigen, wurden qRT-PCR-Analysen ausgewählter Wnt- und Hedgehog-Zielgene durchgeführt.

Bereits eine Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Niclosamid führte zu einer signifikanten Reduktion der vitalen Zellen in allen drei Zelllinien. Bei MIA PaCa-2 und Panc-1 konnte sogar ab 0,1  $\mu\text{M}$  Niclosamid eine signifikante Abnahme der Zellzahl beobachtet werden (MIA PaCa-2 auf 48 % und Panc-1 auf 55 %);  $p \leq 0,05$ . Außerdem konnte bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  eine Inhibition der Zellmigration in MIA PaCa-2 auf 28 % und Panc-1 auf 27 % des Ausgangswertes gezeigt werden.

In der FACS-Analyse zeigte sich bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  (Panc-1) und 10  $\mu\text{M}$  (MIA PaCa-2 und L3.6pl) Niclosamid eine signifikante Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Populationsanteile. Weiterhin konnte eine dosisabhängige Induktion des Zellzyklusarrestes bei Konzentrationen zwischen 0,1-1  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Signifikante Effekte auf die Expression der Wnt-Zielgene fanden sich bei allen drei Zelllinien. So kam es bei mit Niclosamid behandelten Zellen zu einem Rückgang der Expression der kanonischen Wnt-Komponenten Axin2 und MMP7 (Panc-1, L3.6pl), Cyclin D1 (MIA PaCa-2, Panc-1, L3.6pl) und BCL9 (MIA PaCa-2). Eine ein-

deutige Beeinflussung der Komponenten des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges (c-jun, Wnt5a) und des Hedgehog-Signalweges (SHH, SMO, Ptch1, Gli1) konnte nicht ermittelt werden.

Niclosamid hatte demnach mindestens drei verschiedene Wirkmechanismen: Es hemmte die Zellproliferation und Migration, förderte die Apoptose und Nekrose und bewirkte einen Zellzyklusarrest der Pankreaskarzinom-Zellen. Außerdem konnte mit der PCR der hemmende Einfluss von Niclosamid auf den kanonischen Wnt-Signalweg, einen der wichtigsten Signalwege in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms, aufgezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Niclosamid ein neuer Inhibitor des Wnt-Signalweges in Pankreaskarzinom-Zelllinien identifiziert werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation berechtigen möglicherweise zur Annahme, dass Niclosamid zukünftig eine aussichtsreiche chemotherapeutische Substanz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen könnte.

## 6 Summary

Pancreatic cancer is one of the most aggressive malignancies, carrying an extremely poor prognosis for patients (Robert Koch-Institut 2012). The development of new therapeutic agents is considered highly significant in improving clinical outcomes (Li D et al. 2004).

Here we evaluate the inhibitory effects of niclosamide, an anthelmintic drug used for the treatment of tapeworm infections, on various pancreatic cancer cell lines.

Human pancreatic cancer cell lines (MIA PaCa-2, Panc-1 and L3.6pl) were treated for 24 hours with various concentrations of niclosamide (0.1, 1, 3, 10, 30  $\mu$ M, incubation in RPMI-1640-Medium) and vital cells were counted afterwards. A modified Boyden chamber was used to assess migration of the different cells across the porous membranes (pore size 8  $\mu$ m). Following annexin and propidium iodide staining, FACS analysis was used to determine apoptotic and necrotic cell death and effects on the cell cycle. We then used qRT-PCR analyses of specific Wnt and Hedgehog target genes to elucidate possible effects of niclosamide on the signal transduction.

Incubation in niclosamide concentrations as low as 3  $\mu$ M resulted in significant reduction in the number of vital cells in all three pancreatic cancer cell lines. In human MIA PaCa-2 and Panc-1 even the lowest concentration (0.1  $\mu$ M) had a significant inhibitory effect on the relative cell number (MIA PaCa-2 to 48 % and Panc-1 to 55 %);  $p \leq 0.05$ . We were also able to demonstrate that niclosamide inhibited cell migration in MIA PaCa-2 to 28 % and Panc-1 to 27 % at a concentration of 0.5  $\mu$ M when compared to the untreated control.

FACS analysis showed that 1  $\mu$ M (Panc-1) and 10  $\mu$ M (MIA PaCa-2 and L3.6pl) of niclosamide significantly increased necrotic and apoptotic cell populations. Flow cytometric analysis also revealed a dose dependent G0/G1 phase arrest at concentrations between 0.1-1  $\mu$ M. Significant effects on the gene expression of Wnt-signaling targets were found in all three cell lines. Treated cells showed decreased expression for components of the canonical Wnt-pathway Axin2 and MMP7 (Panc-1, L3.6pl), Cyclin D1 (MIA PaCa-2, Panc-1, L3.6pl) and BCL9 (MIA PaCa-2). A distinct impact on the non-canonical Wnt- (c-jun, Wnt5a) and Hedgehog- (SHH, SMO, Ptch1, Gli1) members could not be identified.

Niclosamide worked in at least three ways: it inhibited pancreatic cancer cell proliferation and migration, it promoted cell necrosis and apoptosis, and it caused a G0/G1 cell cycle arrest. Using real time PCR, we also showed the ability of niclosamide to modulate the canonical Wnt-pathway, which is known to be one major signaling pathway involved in pancreatic tumorigenesis. In summary, niclosamide could be identified as an inhibitor of the Wnt-pathway in human pancreatic cancer cells.

The results of this dissertation may possibly justify the assumption that niclosamide may have the potential as a promising chemotherapeutic agent for the treatment of human pancreatic cancer in near future.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Adler G, Seufferlein T, Bischoff S, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr J et al. (2007): S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2007. *Z Gastroenterol* 45, 487–523
2. Ahn S, Joyner AL (2005): In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894–897
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M (1988): Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant c-K-ras Genes. *Cell* 53, 549–554
4. American Cancer Society (2012): Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta: Am Cancer Society 500812, 1-64
5. Amit S, Hatzubai A, Birman Y (2002): Axin-mediated CKI phosphorylation of beta -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 16, 1066–1076
6. Andrews P, Thyssen J, Lorke D (1982): The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacol Ther* 19, 245–295
7. Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006): Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492–7504
8. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Samant RS, Li Y, Conner M, Hidalgo B, Alvarez RD, Landen CN, Straughn JM, Buchsbaum DJ (2014): Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by niclosamide: A therapeutic target for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 134, 112–120
9. Aszterbaum M, Rothman A, Johnson RL, Fisher M, Xie J, Bonifas JM, Zhang X, Scott MP, Epstein EH (1998): Identification of Mutations in the Human PATCHED Gene in Sporadic Basal Cell Carcinomas and in Patients with the Basal Cell Nevus Syndrome. *J Invest Dermatol* 110, 885–888
10. Balgi AD, Fonseca BD, Donohue E, Tsang TCF, Lajoie P, Proud CG, Nabi IR, Roberge M, Cao Y (2009): Screen for Chemical Modulators of Autophagy Reveals Novel Therapeutic Inhibitors of mTORC1 Signaling. *PLoS ONE* 4, e7124
11. Barth H: Anthelminthika. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. 10. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2009, 916–919
12. Behrens J, Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. von (1996): Functional Interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642
13. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB (2002): Phase III Study of Gemcitabine in Combination With Fluorouracil Versus Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 20, 3270–3275
14. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Oca RM, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN (2003): Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 946-851
15. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, Mukherjee P (2008): Role of Hedgehog Signaling in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 14, 7659–7666
16. Bienz M, Clevers H (2000): Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell* 103, 311–320
17. Binns W, Keeler RF, Balls LD (1972): Congenital Deformities in Lambs, Calves, and Goats Resulting from Maternal Ingestion of Veratrum ca/ifornicum- Hare Lip, Cleft Palate, Ataxia, and Hypoplasia of Metacarpal and Metatarsal Bones. *Clin Toxicol* 5, 245–261
18. Boye K, Mælandsmo GM (2010): S100A4 and Metastasis. *Am J Pathol* 176, 528–535
19. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GWH, Lemoine NR (1997): Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182, 347–355

20. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkens J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between  $\beta$ -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225–2230
21. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999): In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *NEO* 1, 50–62
22. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K (1999): Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803–815
23. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P (1997): Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *J Clin Oncol* 15, 2403–2413
24. Cevik IU, Dalkara T (2003): Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell Death Differ* 10, 928–929
25. Chang YW, Yeh TK, Lin KT, Chen WC, Yao HT, Lan SJ, Wu YS, Hsieh HP, Chen CM, Chen CT (2006): Pharmacokinetics of Anti-SARS-CoV Agent Niclosamide and Its Analogs in Rats. *J Food Drug Anal* 14, 329–353
26. Chen M, Wang J, Lu J, Bond MC, Ren X-R, Lysterly HK, Barak LS, Chen W (2009): The Anti-Helminthic Niclosamide Inhibits Wnt/Frizzled1 Signaling. *Biochemistry* 48, 1267–10274
27. Clevers H (2006): Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480
28. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouchhé O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J (2011): FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Eng J Med* 364, 1817–1825
29. Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA (1998): Teratogen-Mediated Inhibition of Target Tissue Response to Shh Signaling. *Science* 280, 1603–1607
30. Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD (2002): Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* 109, 1437–1444
31. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, Jones M, Tyson K, Bassi C, Scarpa A et al. (2001): Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 20, 7437–7446
32. Dai J, Wang W, Liang Y, Li H, Guan X, Zhu Y (2008): A novel molluscicidal formulation of niclosamide. *Parasitol Res* 103, 405–412
33. Dang TVK, Washington K, Berlin J (2007): The role of Notch3 signaling pathway in pancreatic cancer (Abstract). *J Clin Oncol* 25, 21049
34. Daniels DL, Weis WI (2005):  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 364–371
35. De Clercq E (2006): Potential antivirals and antiviral strategies against SARS coronavirus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4, 291–302
36. Devarakonda B, Hill RA, Liebenberg W (2005): Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *Int J Pharm* 304, 193–209
37. DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA (1999): American Gastroenterological Association medical position statement: epidemiology, diagnosis and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterol* 117, 1463–1484
38. Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, Funakoshi A, Wakasugi H, Asano T, Hishinuma S et al. (2008): Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: Final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today* 38, 1021–1028
39. Everhart J, Wright D (1995): Diabetes as a Risk Factor for Pancreatic Cancer. *JAMA* 273, 1605–1609

40. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998): Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF $\beta$  PGE $_2$ , and PAF. *J Clin Invest* 101, 890–898
41. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A et al. (2007): Blockade of Hedgehog Signaling Inhibits Pancreatic Cancer Invasion and Metastases: A New Paradigm for Combination Therapy in Solid Cancers. *Cancer Res* 67, 2187–2196
42. Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, Bedja D, Bisht S, Alvarez H, Koorstra JM, Habbe N, Karikari C, Mullendore M et al. (2008): An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 7, 2725–2735 (=Feldmann et al. 2008 a)
43. Feldmann G, Habbe N, Dhara S, Bisht S, Alvarez H, Fendrich V, Beaty R, Mullendore M (2008): Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 57, 1420–1430 (=Feldmann et al. 2008 b)
44. Fendrich V, Waldmann J, Esni F, Ramaswamy A, Mullendore M, Buchholz M, Maitra A, Feldmann G (2007): Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocrine Rel Cancer* 14, 865–874
45. Fonseca BD, Diering GH, Bidinosti MA, Dalal K, Alain T, Balgi AD, Forestieri R, Nodwell M, Rajadurai CV, Gunaratnam C et al. (2012): Structure-Activity Analysis of Niclosamide Reveals Potential Role for Cytoplasmic pH in Control of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling. *JBC* 287, 17530–17545
46. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP (2008): Biology and management of pancreatic cancer. *Postgrad Med J* 84, 478–497
47. Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003): Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Rev Cancer* 1653, 1–24
48. Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP (1997): Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants. *Science* 227, 1109–1113
49. Graham FL, van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467
50. Graham FL, Smiley J (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36, 59–72
51. Greer JB, Lynch HT, Brand RE (2009): Hereditary pancreatic cancer: a clinical perspective. *Best Pract Clin Gastroenterol* 23, 159–170
52. Groves C, Lamlum H, Crabtree M, Williamson J, Taylor C, Bass S, Cuthbert-Heavens D, Hodgson S, Phillips R, Tomlinson I (2002): Mutation Cluster Region, Association Between Germline and Somatic Mutations and Genotype-Phenotype Correlation in Upper Gastrointestinal Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Pathol* 160, 2055–2061
53. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate A (1994): Diabetes and the Risk of Pancreatic Cancer. *N Eng J Med* 331, 81–84
54. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E (1996): Mutations of the Human Homolog of Drosophila patched in the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell* 85, 841–851
55. Hamilton SR, Aaltonen LA: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. In: World Health Organization Classification of Tumours. Hrsg. v. Kleihues P, Sobin LH. 2. Auflage; IARC Press, Lyon 2000, 219-250
56. Hansel DE, Kern SE, Hruban RH (2003): Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Annu Rev Gen Human Genet* 4, 237–256
57. Hart MJ, los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (1998): Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ . *Current Biol* 8, 573–581

58. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R et al. (2007): Risk Factors for Pancreatic Cancer: Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 102, 2696–2707
59. Hermann PC, Huber S, Tischer A, Hesler C von, Luckner M, Bruns CJ, Heeschen C: Identifikation und Charakterisierung von hochmetastatischen und therapieresistenten Tumorstammzellen beim Pankreaskarzinom. In: *Chirurgisches Forum 2007 für Experimentelle und Klinische Forschung*. Hrsg. v. Steinau HU. 36. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2007, 59–61
60. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T (1997): Telomerase Activity Is Detected in Pancreatic Cancer but not in Benign Tumors. *Cancer Res* 57, 326–331
61. Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D (1995): Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood Cancer J* 85, 532–540
62. Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, Weering DHJ, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993): K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Pancreas. *Am J Pathol* 143, 545–554
63. Imming P, Sinning C, Meyer A (2006): Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Rev Drug Discovery* 5, 821–834
64. Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, Longo F, Zennaro E, Rampioni G, Visca P, Leoni L (2012): New Life for an Old Drug: the Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing. *Antimicrob Agents and Chemother* 57, 996–1005
65. Ingham PW, McMahon AP (2001): Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059–3087
66. Jaffee EM, Hruban RH, Canto M, Kern SE (2002): Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* 2, 25–28
67. Javle M, Hsueh C (2009): Updates in Gastrointestinal Oncology – insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology. *J Hematol Oncol* 2, 9
68. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008): Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58, 71–96
69. Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C, Freund J, Costantini F (2002): Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172–1183
70. Jin Y, Lu Z, Ding K, Li J, Du X, Chen C, Sun X, Wu Y, Zhou J, Pan J (2010): Antineoplastic Mechanisms of Niclosamide in Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells: Inactivation of the NF- B Pathway and Generation of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res* 70, 2516–2527
71. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH et al. (1996): Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome. *Science* 272, 1668–1671
72. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A et al. (2008): Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321, 1801–1806
73. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004): Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707–712
74. Kaye H, Kleeff J, Keleg S, Guo J, Ketterer K, Berberat PO, Giese N, Esposito I, Giese T, Böchler MW et al. (2004): Indian hedgehog signaling pathway: Expression and regulation in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 110, 668–676
75. Khanim FL, Merrick BAME, Giles HV, Jankute M, Jackson JB, Giles LJ, Birtwistle J, Bunce CM, Drayson MT (2011): Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production. *Blood Cancer J* 1, 1-12

76. Kim K-A, Wagle M, Karolyn T, Zhan X, Dixon MA, Liu S, Gros D, Korver W, Yonkovivh S, Tomasevic N et al. (2008): R-Spondin Family Members Regulate the Wnt Pathway by a Common Mechanism. *Mol Biol Cell* 19, 2588–2596
77. Klöppel G, Lüttges J, Heitz PU: Pankreas. In: Pathologie, 3. Auflage. Hrsg. v. Böcker W, Denk H, Heitz PU. 3. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2004, 807-820
78. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine. *Blood Cancer J* 84, 1415–1420
79. Kornmann M, Danenberg KD, Arber N (1999): Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Pancreatic Cancer Cells Is Associated with Increased Chemosensitivity and Decreased Expression of Multiple Chemoresistance Genes. *Cancer Res* 59, 3505–3511
80. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Züllig S, Basler K (2002): Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear  $\beta$ -Catenin-TCF Complex. *Cell* 109, 47–60
81. Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M (2004): Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for Patients with Breast Cancer. *Cancer Res* 64, 6071–6074
82. Lenz D, Mittag A, Bocsi J: Probenvorbereitung für die Bildzytometrie. In: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Hrsg. v. Sack U, Tárnok A, Rothe G. Karger Verlag, Basel 2007, 604–646
83. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004): Pancreatic cancer. *The Lancet* 363, 1049–1057
84. Li R, Hu Z, Sun S, Chen ZG, Owonikoko TK, Sica GL, Ramalingam SS, Curran WJ, Khuri FR, Deng X (2013): Niclosamide Overcomes Acquired Resistance to Erlotinib through Suppression of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther* 12, 2200–2212
85. Li Y, Li P, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ (2014): Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Letters* 349, 8–14
86. Li YJ, Wei Z-M, Meng Y-X, Ji X-R (2005):  $\beta$ -catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: Relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11, 2117–2123
87. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15, 741–747
88. Liu C, Lou W, Zhu Y, Nadiminty N, Schwartz CT, Evans CP, Gao AC (2014): Niclosamide Inhibits Androgen Receptor Variants Expression and Overcomes Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 20, 3198–3210
89. Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD (2005): Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapy and Continued Progress. *Gastroenterol* 128, 1642–1654
90. Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781–810
91. Londono-Joshi AI, Arend RC, Aristizabal L, Li Y, Lu W, Samant RS, Metge BJ, Forero A (2013): Inhibition of Wnt co-receptor LRP6 sensitizes basal-like breast cancer stem cells to TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody. *Cancer Res* 73, Supplement 1
92. Londono-Joshi AI, Arend RC, Aristizabal L, Lu W, Samant RS, Metge BJ, Hidalgo B, Grizzle WE, Conner M, Forero-Torres A et al. (2014): Effect of Niclosamide on Basal-like Breast Cancers. *Mol Cancer Ther* 13, 800–811
93. LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Chang I, Darbonne WC et al. (2011): Phase I Trial of Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) in Patients with Refractory, Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 17, 2502–2511
94. Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taieb J et al. (2005): Gemcitabine in Combination With Oxaliplatin Compared With

Gemcitabine Alone in Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer: Results of a GERCOR and GISCAD Phase III Trial. *J Clin Oncol* 23, 3509–3516

95. Lowenfels AB, Maisonneuve P (2006): Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 20, 197–209
96. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg Á, Domellöf L (1993): Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Eng J Med* 328, 1433–1437
97. Lu W, Lin C, Roberts MJ, Waud WR, Piazza GA, Li Y, Mei L (2011): Niclosamide Suppresses Cancer Cell Growth By Inducing Wnt Co-Receptor LRP6 Degradation and Inhibiting the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *PLoS ONE* 6, e29290
98. Lüllmann H, Mohr K, Hein L: Wurmerkrankungen. In: *Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Hrsg. v. Lüllmann H. 17. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010, 518-520
99. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W et al. (2002): Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184–1193
100. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ et al. (1999): Target genes of  $\beta$ -catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1603–1608
101. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH III, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L et al. (2001): Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Mol Cell* 7, 801–809
102. Merchant AA, Matsui W (2010): Targeting Hedgehog -- a Cancer Stem Cell Pathway. *Clin Cancer Res* 16, 3130–3140
103. Merschjohann K, Steverding D (2008): In vitro trypanocidal activity of the anti-helminthic drug niclosamide. *Exp Parasitol* 118, 637–640
104. Mook RA, Chen M, Lu J, Barak LS, Lyerly HK, Chen W (2013): Small molecule modulators of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 2187–2191
105. Moore M (1996): Activity of Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Carcinoma. *Cancer Suppl* 78, 633–638
106. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA et al. (2007): Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960–1966
107. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, Quinn LA, McGavran L, Gordon SG (1980): Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 25, 591–598
108. Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, Wright CVE, Hebrok M, Lewis BC (2007): Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *PNAS* 104, 5103–5108
109. Nawroth R, van Zante A, Cervantes S, McManus M, Hebrok M, Rosen SD, Blagosklonny M (2007): Extracellular Sulfatases, Elements of the Wnt Signaling Pathway, Positively Regulate Growth and Tumorigenicity of Human Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE* 2, e392
110. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 139, 271–279
111. Niederhuber JE, Brennan MF, Menck HR (1995): The National Cancer Data Base Report on Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 76, 1671–1677
112. Nieuwenhuis E, Hui C-c (2005): Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Gen* 67, 193–208
113. Norell SE, Ahlbom A, Erwald R, Jacobson G, Lindberg-Navier I, Olin R, Törnberg B, Wiechel KL (1986): Diet and Pancreatic Cancer: A Case-Control study. *Am J Epidemiol* 124, 894–902

114. Nusse R (2005): Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28–32
115. Nusse R, Varmus HE (1982): Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome. *Cell* 31, 99–109
116. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801
117. Oettle H, Prost S, Neuhaus P, Gellert P, Langrehr J, Ridwesi K, Schramm H, Fahlke J (2007): Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 297, 267–277
118. Ono M, Yin P, Navarro A, Moravek MB, Coon JS V., Druschitz SA, Gottardi CJ, Bulun SE (2014): Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth. *Fertility and Sterility* 101, 1441–1449
119. Osada T, Chen M, Yang XY, Spasojevic I, Vandeusen JB, Hsu D, Clary BM, Clay TM, Chen W, Morse MA et al. (2011): Antihelminth Compound Niclosamide Downregulates Wnt Signaling and Elicits Antitumor Responses in Tumors with Activating APC Mutations. *Cancer Res* 71, 4172–4182
120. Partin AW, Schoeniger JS, Mohler JL, Coffey DS (1989): Fourier analysis of cell mortality: Correlation of mortality with metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1254–1258
121. Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M (2006): Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev* 20, 3161–3173
122. Pasca di Magliano M, Biankin AV, Heiser PW, Cano DA, Gutierrez PJA, Deramaudt T, Segara D, Dawson AC, Kench JG, Henshall SM et al. (2007): Common Activation of Canonical Wnt Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2, e1155
123. Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N (1997): Medulloblastomas of the Desmoplastic Variant Carry Mutations of the Human Homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 57, 2085–2088
124. Pukrop T, Binder C (2008): The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 86, 259–266
125. Reissfelder C, Koch M, Büchler M, Weitz J (2007): Pankreaskarzinom. *Chirurg* 78, 1059–1072
126. Ren X, Duan L, He Q, Zhang Z, Zhou Y, Wu D, Pan J, Pei D, Ding K (2010): Identification of Niclosamide as a New Small-Molecule Inhibitor of the STAT3 Signaling Pathway. *ASC Med Chem Lett* 1, 454–459
127. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987): The *Drosophila* Homolog of the Mouse Mammary Oncogene int-1 Is Identical to the Segment Polarity Gene wingless. *Cell* 50, 649–657
128. Ripka S, König A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P (2007): WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178–1187
129. Robert Koch-Institut: Bauchspeicheldrüse. In: Krebs in Deutschland 2007/2008, Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Hrsg. v. Robert Koch Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. 8. Auflage; Robert Koch Institut, Berlin 2012, 48–51
130. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ et al. (1997): Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57, 1731–1734
131. Rudin CM, Hann CL, Lattera J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B (2009): Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N Eng J Med* 361, 1173–1178
132. Ruiz i Altaba A (1999): The works of GLI and the power of Hedgehog. *Nature Cell Biol* 1, 147–148

133. Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Kobelt D, Lemm M, Fichtner I, Schlag PM, Shoemaker RH, Stein U (2011): Novel Effect of Antihelminthic Niclosamide on S100A4-Mediated Metastatic Progression in Colon Cancer. *J Nat Cancer Inst* 103, 1018–1036
134. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-c, Nakafuku M, Kondoh H (1999): Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Dev* 126, 3915–3924
135. Schwartz AL, Malgor R, Dickerson E, Weeraratna AT, Slominski A, Wortsman J, Harii N, Kohn AD, Moon RT, Schwartz FL et al. (2009): Phenylmethimazole Decreases Toll-Like Receptor 3 and Noncanonical Wnt5a Expression in Pancreatic Cancer and Melanoma Together with Tumor Cell Growth and Migration. *Clin Cancer Res* 15, 4114–4122
136. Sharma RP, Chopra VL (1976): Effect of the Wingless (wg1) Mutation on Wing and Haltere Development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48, 461–465
137. Sherr CJ (1996): Cancer Cell Cycles. *Science* 274, 1672–1677
138. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999): The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5522–5527
139. Sicklick JK, Li Y, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, Ludlow JW, Owzar K, Chen W, Torbenson MS et al. (2006): Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogen* 27, 748–757
140. Sirivatanauksorn V, Sirivatanauksorn Y, Lemoine NR (1998): Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. *Langenbeck's Arch Surg* 383, 105–115
141. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz i. Altaba A (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *PNAS* 104, 5895–5900
142. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Noshio K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y (2005): Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 24, 7946–7952
143. Teo JL, Kahn M (2010): The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1149–1155
144. Thayer SP, Pasca di Magliano M, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, del Castillo CF, Yajnik V (2003): Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851–856
145. Tremblay MR, Nevalainen M, Nair SJ, Porter JR, Castro AC, Behnke ML, Yu L-c, Hagel M, White K, Faia K (2008): Semisynthetic cycloamine analogues as potent and orally bioavailable hedgehog pathway antagonists. *J Med Chem* 51, 6646–6649
146. Uzvölgyi E, Kiss I, Pitt A, Arsenian S, Ingvarsson S, Udvardy A, Hamada M, Klein G, Sümegi J (1988): *Drosophila* homolog of the murine *Int-i* protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3034–3038
147. Varadhachary GR (2011): Preoperative therapies for resectable and borderline resectable pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* 2, 136–142
148. 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
149. Vezeridis MP, Tzanakakis GN, Meitner PA, Doremus CM, Tibbetts LM, Calabresi P (1992): In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. *Cancer* 69, 2060–2063
150. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW (2004): Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 91, 586–594
151. Wallingford JB, Habas R (2005): The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Dev* 132, 4421–4436

152. Wang A, Ku H, Liang Y, Chen Y, Hwu Y, Yeh T (2009): The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells. *J Cell Biochem* 106, 682–692
153. Wang L, Heidt DG, Lee CJ, Yang H, Longsdon CD, Zhang L, Fearon ER, Ljungman M, Simeone DM (2009): Oncogenic Function of ATDC in Pancreatic Cancer Through Wnt Pathway Activation and  $\beta$ -catenin Stabilization. *Cancer Cell* 15, 207–219
154. Wang Y, Chao T, Chang C, Yo Y, Yu M, Lai H, Deoraj A (2013): Drug Screening Identifies Niclosamide as an Inhibitor of Breast Cancer Stem-Like Cells. *PLoS ONE* 8, e74538
155. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB (2003): Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313–317
156. Weber U, Paricio N, Miodzik M (2000): Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Dev* 127, 3619–3629
157. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S (2000): arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527–530
158. Weinbach EC, Garbus J (1969): Mechanism of Action of Reagents that uncouple Oxidative Phosphorylation. *Nature* 221, 1016–1018
159. Weitz J, Koch M, Kleeff J, Müller MW, Schmidt J, Friess H, Büchler MW (2004): Kausch-Whipple pancreaticoduodenectomy. Technique and results. *Chirurg* 75, 1113–1119
160. Welch SA, Moore MJ (2007): Erlotinib: success of a molecularly targeted agent for the treatment of advanced pancreatic cancer. *Fut Oncol* 3, 247–254
161. Wieland A, Trageser D, Gogolok S, Reinartz R, Hofer H, Keller M, Leinhaas A, Schelle R, Normann S, Klaas L et al. (2013): Anticancer Effects of Niclosamide in Human Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 4124–4136
162. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential Transformation of Mammary Epithelial Cells by Wnt Genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278–6286
163. Wong HH, Lemoine NR (2009): Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6, 412–422
164. Wu CJ, Jan J, Chen C, Hsieh H, Hwang D, Liu H, Liu C, Huang H, Chen S, Hong C et al. (2004): Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication by Niclosamide. *Antimicrob Agents and Chemother* 48, 2693–2696
165. Wu CS, Li Y, Chen JJ, Chen Y, Chu C, Pan I, Wu Y, Lin C (2014): Antihelminthic niclosamide modulates dendritic cells activation and function. *Cell Imm* 288, 15–23
166. Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E (2002): JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO reports* 3, 69–75
167. Yan D, Wiesemann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH (2001): Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is activated in human colon tumors. *PNAS* 98, 14937–14978
168. Yang GY, Wagner TD, Fuss M, Thomas CR (2005): Multimodality Approaches for Pancreatic Cancer. *CA Cancer J Clin* 55, 352–367
169. Ye T, Xiong Y, Yan Y, Xia Y, Song X, Liu L, Li D, Wang N, Zhang L, Zhu Y et al. (2014): The Anthelmintic Drug Niclosamide Induces Apoptosis, Impairs Metastasis and Reduces Immunosuppressive Cells in Breast Cancer Model. *PLoS ONE* 9, e85887
170. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA (1995): Pancreaticoduodenectomy for Cancer of the Head of the Pancreas. *Ann Surg* 221, 721–733
171. Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D (2006): Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer (Review). *Cochrane Database of Systematic Rev* 2006 3, 1-83

172. Yo Y, Lin Y, Wang Y, Balch C, Huang R, Chan MWY, Sytwu H, Chen C, Chang C, Nephew KP et al. (2012): Growth Inhibition of Ovarian Tumor-Initiating Cells by Niclosamide. *Mol Cancer Ther* 11, 1703–1712
173. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996): The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10, 1443–1454
174. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ (1977): Human Pancreatic Carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture Sensitivity to Asparaginase. *Int J Cancer* 19, 128–135
175. Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, Monga NK, Bell A, Sood A, Malhotra V, Sood N, Midda V, Monga DK et al. (2006): Aberrant Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *NEO* 8, 279–289

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie zu verfassen, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Sarah König und Frau PD Dr. rer. nat. Petra Krause für die Überlassung eines hoch interessanten Themas und die exzellente Betreuung dieser Arbeit. In unzähligen Gesprächen gaben sie mir immer wieder neue Denkanstöße und Hilfestellungen bei der Abfassung meiner Dissertationsarbeit.

Für die ausführliche Einarbeitung in die Labormethoden und die anhaltende Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente danke ich Caroline Breysach, Derya Bocuk, Sabine Buth, Dr. rer. nat. Sabine Niebert, Roswitha Streich und Sabine Wolfgramm.

Meinem Kommilitonen Malte Monin danke ich für die große gegenseitige Unterstützung bei den Arbeiten im Labor und den intensiven Austausch beim Verfassen unserer Dissertationen.