

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Wirkung des targeted Chemotherapeutikums AESZ-108 (AN-152)
auf GnRH- positive Pankreaskarzinomzelllinien**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jennifer Ernst

aus

Duderstadt

Göttingen 2015

Dekan

Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. F. Alves

Tag der mündlichen Prüfung: 27.Oktober 2016

1 Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	1
1.1.2 Ätiologie und Pathologie des Pankreaskarzinoms	2
1.1.3 Aktuelle Therapie des Pankreaskarzinoms	3
1.1.4 Grenzen der Therapie	3
1.2. GnRH-I-Rezeptor-vermittelte Tumorthherapie	7
1.2.1 GnRH-I-Rezeptor	8
1.2.2 GnRH-I-Rezeptor-Expression von Pankreaskarzinomzelllinien	9
1.2.3 AESZ-108 (AN-152)	9
1.2.4 Doxorubicin	12
1.2.5 Einsatz und Erfolg von AESZ-10 in anderen Tumorentitäten	13
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmittel	17
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Puffer und Lösungen	18
2.1.5 Proteine, Proteinaseinhibitoren	18
2.1.6 Oligonukleotide	19
2.1.7 Antikörper	19
2.1.7.1 Primärantikörper	19
2.1.7.2 Sekundärantikörper	19
2.1.8 Pharmakologische Versuchssubstanzen	19
2.1.9 Verwendete Assays, Kits und kommerzielle Reaktionssysteme	19
2.1.9 Medien Zellkultur, Medien Versuche	20
2.1.10 Verwendete Zelllinien	20
2.1.11 Histologisches Material	21
2.1.12 Versuchstiere	21
2.1.13 Matrigel	21
2.1.14 Elektronische Datenverarbeitung	21
2.1.15 Statistische Analyse	21

2.2 Zellbiologische Methoden	22
2.2.1 Zellzahlbestimmung	22
2.2.2 Zellkultur	22
2.2.3 Passagieren adhärenter Zellen	22
2.2.4 Kryokonservierung von Zellen	23
2.2.5 Revitalisierung von Zellen	23
2.2.6 Inhibition der Serum-Carboxylesterase	23
2.2.7 alamarBlue® Proliferations-Assay	23
2.2.8 Messung der Apoptose	24
2.2.8.1 Quantitativer Nachweis der Apoptose- JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection	24
2.2.8.2 Qualitativer Apoptosenachweis- Visualisierung der DNA-Fragmentation durch Anwendung des TUNEL-Assays	25
2.3 Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1 Nukleinsäurenachweis	26
2.3.1.1 Isolierung von RNA aus adhärenen Zellen	26
2.3.1.2 Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.3.1.3 Reverse Transkription	26
2.3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion	27
2.3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.4 Histologische Methoden	29
2.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen	29
2.4.1.1 Entparaffinisierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte	30
2.4.1.2 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte	30
2.4.1.3 Färbung mit Hämotoxylin-Eosin	31
2.5 In-Vivo-Versuche	31
2.5.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	31
2.5.2 Injektion von Tumorzellen	31
2.5.3 Messung des Tumorwachstums	32
2.5.4 Versuchsaufbau und Injektionsschemata	32

3 Ergebnisse	33
3.1 GnRH-I-Rezeptor-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien	33
3.1.1 Nachweis der GnRH-I-Rezeptor-Expression durch RT-PCR	33
3.1.2 Immunhistochemischer Nachweis der GnRH-I-Rezeptor-Expression.....	33
3.2 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf die Zellproliferation der Pankreas- karzinomzelllinien <i>in vitro</i>	36
3.3 Untersuchung der Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf den Apoptoseprozess <i>in vitro</i> ..	37
3.3.1 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das mitochondriale Membranpotential der Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	37
3.3.2 Die Wirkung von AESZ (AN-152) auf die DNA-Fragmentation der humanen Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	37
3.4 Die Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 <i>in vivo</i>	38
3.4.1 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIAPaCa-2	39
3.4.2 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1	39
4 Diskussion	41
4.1 GnRH-I-Rezeptor-Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	41
4.2 Inhibition des Tumorwachstums der Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	44
4.3 AESZ-108 (AN-152)-induzierte Apoptose in GnRH-I-Rezeptor- positiven Pankreaskarzinomzelllinien	45
4.4 Inhibition des Tumorwachstums durch AESZ-108 (AN-152) <i>in vivo</i>	47
4.5 Ausblick	51

5 Zusammenfassung.....	53
6 Publikation.....	54
7 Anhang.....	55
8 Literaturverzeichnis.....	56

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATCC	American Type Culture Collection
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
CE	Carboxylesterase
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DOX	Doxorubicin
DSMO	Dimethylsulfoxid
dUTP	<i>2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate</i> (Desoxyuridintriphosphat)
EGF	epidermal growth factor
EHS	Engelberth-Holm-Swarm
EtBr	Ethidumbromid
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fetales Rinderserum)
GnRH-I	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormone I</i> (Gonadotropin freisetzendes Hormon I)
GnRH-II	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormone II</i> (Gonadotropin freisetzendes Hormon II)
GPRC	<i>G-Protein coupled receptor</i> (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
h	<i>hour</i> (Stunde)
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
min	Minuten
MMP	Metalloproteinasen
NCT	<i>National Clinical Trial</i> (nationale klinische Studie)
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i> (duktales Adenokarzinom des Pankreas)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
sog.	sogenannt
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween-20</i>
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat, Polysorbat 20
TNM	<i>TNM Classification of Malignant Tumours</i> : T= <i>Tumour</i> =Tumor, N= <i>nodes</i> =Lymphknoten, M= <i>Metastases</i> =Metastasen
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Endothelwachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreas besteht aus Zellen, die exokrine oder endokrine Funktionen erfüllen. Tumore, benigner wie maligner Genese, können sowohl von Zellen des exokrinen als auch des endokrinen Teils der Drüse ausgehen.

Immunhistologisch differenziert man das Pankreaskarzinom in zwei große Gruppen epithelialen Ursprungs: das duktales und das azinäres Adenokarzinom des Pankreas. Zelllinienmarker ermöglichen die Differenzierung der Neoplasien und geben Rückschlüsse auf die Transformation der Ursprungszelle (KIM ET AL. 1990). Die immunhistologische Differenzierung des Biopsats ist vor allem im nicht oder unvollständig resektablen Szenario wichtig für die Wahl der optimierten adjuvanten Behandlungsstrategie (COLLISSON ET AL. 2011).

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung des zytotoxischen Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH)-I-Analogons AESZ-108 (AN-152) auf die häufigste Form des Pankreaskarzinoms, das duktales Adenokarzinom (engl. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC). Immunhistologisch bilden sich diese Neoplasien aus den Zellen des Gangepithels. In der Literatur werden Häufigkeiten des duktales Adenokarzinoms am Gesamtanteil der Neoplasien des Pankreas von 80% (ALEXAKIS ET AL. 2004) - 95% (WARSHAW & FERNANDEZ-DEL CASTILLO 1992) berichtet. Die Kriterien der verwendeten TNM-Klassifikation dieser Arbeit sind im Anhang zu finden (VGL. KAP. 6, TAB.16).

1.1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Die gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., „KREBS IN DEUTSCHLAND 2012“ basiert auf den Krebsregisterdaten der Bundesländer und berichtet rund 15.000 Neuerkrankungen an Pankreaskarzinom jährlich.

Das Pankreaskarzinom gehört somit zu den zehn häufigsten Tumorarten Deutschlands. Weiterhin heißt es in diesem statistischen Report zur gesundheitlichen Aufklärung, dass diese Erkrankung eine „ungünstige Prognose“ hat und „mit 6,3% aller Krebstodesfälle bei Männern sowie 7,5 % bei Frauen die vierthäufigste Krebstodesursache“ (KREBS IN DEUTSCHLAND, S. 8) in Deutschland sei.

Die Reichweite der Formulierung „ungünstige Prognose“ wird bei Betrachtung der relativen 5-Jahres-Überlebensrate deutlich. Diese beträgt nach der Auswertung der o.g. Krebsregisterdaten für Männer 8 % und für Frauen 7 %.

Das Pankreaskarzinom hat die niedrigste Überlebensrate aller Krebsentitäten. 2010 und 2011 veröffentlichte internationale Krebsstatistiken globalisieren die ernüchternde Prognose des duktales Pankreaskarzinoms. In diesen Statistiken findet man Angaben zur 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5% und eine mediane Überlebensdauer von 6 Monaten nach Diagnosestellung (JEMAL ET AL. 2011 sowie KREJS 2010). Krejs formuliert es eindrücklich als jene Krebsentität, deren Inzidenz immer noch nahezu identisch zur Mortalität sei (KREJS 2010, S. 355).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 70, für Frauen bei 76 Jahren (KREBS IN DEUTSCHLAND 2012). Die Inzidenz dieser Erkrankung ist in den letzten 50 Jahren stetig leicht gestiegen. Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind nach den Registerdaten, sehr selten. Zahlen von 2 Fällen pro 1 Million pro Jahr wurden in dieser Altersgruppe registriert (KREJS 2010).

1.1.2 Ätiologie und Pathologie des Pankreaskarzinoms

Endogene und exogene Faktoren sowie deren Interaktion führen zur Entwicklung und Progression dieser Neoplasie (POIRIER 2004). Als Risikofaktoren wurden in der Vergangenheit vielfache Faktoren identifiziert und deren Korrelationen im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms untersucht. Die aktuelle S3- Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) hat in Studien untersuchten endogenen und exogenen Risikofaktoren Evidenzstärken zugeteilt:

Neben Ernährungsgewohnheiten erhöhen berufsbedingte Riskofaktoren, das familiäre Pankreaskarzinom, das Peutz-Jeghers-Syndrom, Syndrome verbunden mit einer BRCA-1/2-Mutation, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), hereditäre Pankreatitis, chronische Pankreatitis und Diabetes mellitus als eigenständige Risikofaktoren das Risiko an Pankreaskarzinom zu erkranken, um ein Vielfaches.

Interessant ist, dass vor allem beeinflussbare Lebensgewohnheiten wie Rauchen und Übergewicht, das Risiko an Pankreaskarzinom zu erkranken, nachweislich deutlich erhöhen (LARSSON ET AL. 2005, BERRINGTON DE GONZALEZ ET AL. 2003, QIU ET AL. 2005). Zahlreiche weitere Risikofaktoren werden untersucht. In einer Übersichtsarbeit von VINCENT ET AL. 2009, fasst dieser zusammen, dass trotz komplexer multifaktorieller Genese des Pankreaskarzinoms Rauchen und eine positive Familienanamnese die

dominanten Risikofaktoren seien. 20% der Karzinome seien auf Zigarettenrauch zurückzuführen und Pankreaskarzinome von Rauchern zeigten ein Vielfaches mehr an genetischen Mutationen im Vergleich zu Pankreaskarzinomen von Nichtrauchern (BLACKFORD ET AL. 2009).

1.1.3 Aktuelle Therapie des Pankreaskarzinoms

Gegenwärtig können nur 20% der duktaalen Adenokarzinome in kurativer Intention chirurgisch therapiert werden. Aber selbst die 5-Jahres-Überlebensrate der R₀-resezierten Patienten ist ernüchternd. 10,5% der 93 R₀-resezierten Karzinome eines untersuchten Patientenkollektivs überlebten dieses Zeitintervall. Patienten mit Lymphknoten negativen Status überlebten signifikant länger (26.5%) als Patienten mit Lymphknoten positivem intraoperativem Befund (5%) (GEBHARDT ET AL. 2000).

Nach erfolgtem Tumorstaging differenziert das American Joint Committee on Cancer (AJCC) zum Diagnosezeitpunkt zwischen dem (1) *early stage disease*, (2) *locally advanced disease without evidence of metastasis* und dem (3) *metastatic disease*. Die aktuellen Behandlungskonzepte berücksichtigen neben dem Stadium und den Begleiterkrankungen auch den persönlichen Allgemeinzustand des Patienten.

Frühdiagnostizierte resektable Karzinome erhalten aktuell eine sechsmonatige adjuvante Gemcitabin-basierte Chemotherapie. Liegen Metastasen vor, dann bleibt als Therapieoption nur eine systemische palliative Chemotherapie.

Dem lokal fortgeschrittenem Stadium fehlt bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine definierte Behandlungsstrategie. Aktuell stellen Chemo- und Radiochemotherapie eine Therapieoption dar (MICHL & GRESS, 2013).

1.1.4 Grenzen der Therapie

Die schnelle Metastasierung, fehlende Frühymptome (BAUMGART ET AL. 2005) und fehlende Tumormarker (TANASE ET AL. 2010) erschweren eine frühe Diagnose des Karzinoms.

Das begrenzte Ansprechen dieser Krebsentität auf konventionelle Chemotherapie, *targeted therapy*, Bestrahlung und chirurgische Therapie aufgrund von Mechanismen der primären und sekundären Chemoresistenz erklären die nüchterne Prognose dieses Malignoms (KORNMANN ET AL. 2003, ZALATNAI & MOLNAR 2007).

Titel wissenschaftlicher Artikel wie „*Locally advanced pancreatic adenocarcinoma: where are we and where are we going?*“ (CHANG & SAIF 2011) zeigen deutlich die ernsthaften Schwierigkeiten in der Behandlung des lokal fortgeschrittenen duktales Adenokarzinoms. Auch wenn es in diesem Stadium keinen Anhalt für Metastasen gibt (CALLERY ET AL. 2009), ist Ziel der Therapie die lokoregionale Kontrolle (JOHUNG ET AL. 2012). Radiotherapie allein zeigte keine Effektivität, so dass als Optionen weiterhin systemische Chemotherapie und Radiochemotherapie bleiben (MOERTEL ET AL. 1981, SULTANA ET AL. 2007).

Ergebnisse einer optimalen Applikationsreihenfolge, des effektivsten und zugleich nebenwirkungsärmsten Radiosensitizers (LI CP ET AL. 2003) sowie der wirkungsreichsten Bestrahlungstechnik (GOODMANN & HAJJ 2013) sind noch ausstehend und müssen im Zusammenhang mit dem Allgemeinzustand des Patienten evaluiert werden. Die Ergebnisse der großen GERCOR LAP-07 – MULTICENTERSTUDIE (NCT00634725) zur Evaluierung der optimierten Sequenz der Radiochemotherapie werden erwartet. Erste Ergebnisse wurden auf dem ASCO Annual Meeting 2011 in den USA präsentiert (LI J ET AL. 2011).

Gegenwärtige angewendete neoadjuvante Therapiekonzepte führen zu ähnlichen medianen Überlebenszeiten wie primär resektable Adenokarzinome. Die mediane Überlebenszeit beträgt 22 Monate. (HABERMEHL ET AL. 2012).

Nachdem BURRIS ET AL. 1997 die Überlegenheit des Nukelosidanalogs Gemcitabin gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU) zeigten, nämlich das mediane Überleben 5,65 vs. 4,41 Monate, wurde in zahlreichen Studien nach weiteren Therapiemöglichkeiten des metastasierten Pankreaskarzinoms gesucht. Kombinationstherapien mit 5-FU, Capecitabin, Oxaliplatin, Cisplatin, Irinotecan, Exatecan oder Pemetrexed zeigten keine signifikante Überlegenheit (STATHIS & MOORE 2010).

Ein gemcitabinfreies Therapieregime schien in einem Patientenkollektiv mit gutem Allgemeinzustand überlegen zu sein. Dies zeigte die MultiCenter Studie PRODIGE (CONROY ET AL. 2011). In der Behandlung mit der Vierfach-Kombinationstherapie „FOLFIRINOX“ (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin, n=167) stieg das mediane Überleben von 6,8 auf 11,1 Monate im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin (n=169).

Nach Versagen der systemischen Chemotherapie mit Gemcitabin zeigte lediglich ein secondline-Kombinationsregime mit Oxaliplatin und 5-FU vs. *best-supportive-care* des Patienten einen Zugewinn der medianen Überlebensdauer von 2,5 Monaten (STATHIS & MOORE 2010).

In den letzten 10 Jahren wurde sogenannte *targeted agents* zur gezielten Krebstherapie als Monotherapie oder in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zur Behandlung des metastasierten duktales Adenokarzinoms evaluiert. Antiangiogenetisch wirkende monoklonale Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wie Bevacizumab und Multikinase-Inhibitoren wie Axitinib, Sunitinib oder Sorafenib (KINDLER ET AL. 2010, 2012 SOWIE O'REILLY ET AL. 2010) konnten sich wegen mangelnder Wirkung ebenso wenig durchsetzen wie Marimastat, ein direkter Hemmstoff der Matrix-Protease (BRAMHALL ET AL. 2002) oder Inhibitoren intrazellulärer Enzyme wie der Farnesyl Transferase (VAN CUTSEM ET AL. 2004).

Erfolgsversprechend verweisen MICHL & GRESS (2013) in einem aktuell erschienen Review auf eine kanadische Studie (MOORE ET AL. 2007), die in der Anwendung von Gemcitabin plus Erlotinib eine verlängerte Überlebensdauer in einer Subgruppe ihrer Studie im Vergleich zu Gemcitabin und Placebo beobachtet haben. Dieser Effekt war in der Subgruppe jedoch verbunden mit Hautausschlag. Es bleibt zu evaluieren, ob dies als Nebenwirkung oder als Marker für besonders gutes Ansprechen des Erlotinibs auf die Tumorbilogie in dieser Subgruppe zu interpretieren ist (HEINEMANN ET AL. 2012). Bei Patienten, die keinen Hautausschlag zeigten, war der Zugewinn an absoluter Überlebensdauer deutlich geringer. Erlotinib ist ein sogenanntes *small molecule*, welches den über den *epidermal growth factor* (EGF) vermittelten Signalweg hemmt.

Neu entstehende Therapiekonzepte versuchen die Resistenzmechanismen des Pankreaskarzinoms anzugreifen. MICHL & GRESS 2013, fassen die verschiedenen Angriffspunkte neuer Therapiekonzepte anschaulich in dem oben erwähnten Review zusammen. Tab.1 der vorliegenden Arbeit lehnt sich an diese Klassifikation an und stellt (1) verbesserte Wirkstoffverabreichung und (2) *targeted approaches*, d.h. zielgerichtete Therapieansätze auf Basis charakteristischer Eigenschaften des Malignoms im Gegensatz zu gesundem Gewebe, tabellarisch dar.

Systemisch verabreichte zytotoxische Substanzen erreichen aufgrund der Hypovaskularität und des für das Pankreaskarzinom typischen hyperproliferativen Stromas die karzinomatösen Zelle gar nicht oder nur in geringen Dosen. Deswegen versucht man unter anderem durch Bindung zytotoxischer Substanzen an lipophile Substanzen die Wirkstoffverabreichung (1) zu verbessern.

Im Rahmen der *targeted therapy* des duktales Pankreaskarzinoms (2) versuchen neue Therapieansätze dahingegen Einfluss auf nachgeschaltete Signalkaskaden der Tumorzellen (2a), die charakteristische Stromareaktion selbst (2b), die Tumovaskularisation (2c) oder die Immunantwort (2d) im Rahmen der entstandenen Neoplasie zu nehmen.

Weitere Angriffspunkte sind reaktivierte onkofetale Signalwege (JONES ET AL. 2008) und epigenetische Veränderungen (OMURA & GOGGINS 2009).

Substanz	(X) Angriffspunkt, Mechanismus	Aktuelle klinische Studien	Referenz
(1) Wirkstoffverabreichung			
Nanoparticle albumin-bound (nab)-paclitaxel	Albumin-gebundenes Zytostatikum (OLSON & HANAHAN 2009)	NCT01161186 NCT01470417 NCT01010945	INFANTE ET AL. 2007 VON HOFF ET AL. 2008 FRESE ET AL. 2012 <i>(synergistischer Effekt mit Gemcitabin)</i>
EndoTAG-1	kationische, liposomale Formel, die Paclitaxel bindet (Tumorgefäße und endotheliale Zellmitose)		FASOL ET AL. 2012
(2) targeted therapy			
<i>(2a) Substanz, die mit nachgeschalteten Signalkaskaden interferieren</i>			
Erlotinib	EGFR		MOORE ET AL. 2007
AMG-479	IGF1R	NCT0123147	
GSK1120212 MSC1936369B AZD6244 MEK162	MEK	NCT01231581 NCT01016483 NCT01222689 NCT01363232	
BKM120 BEZ235	PI3K/Akt-Signalweg	NCT01571024 NCT0133776	
RAD001	mTOR	NCT00560963 NCT01077986	

<i>(2b) Einfluss auf Stromareaktion</i>	
Fibronectin ED-B (L19-IL2)	NCT01198522 NCT01198522
TGFβRI (LY2157299)	NCT01373164
Hyaluronan (PEGPH20)	NCT01453153
<i>(2c) Modulation der Tumervaskularisierung</i>	
<i>(2d) Modulation der Immunantwort</i>	
CTLA-4 (Ipilimumab Tremelimumab)	NCT01473940 NCT00556023
CD-40 (CP870,893)	NCT01456585

Tabelle 1: (2a) Erlotinib: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor, niedermolekularer Inhibitor; IGF-1-R (Insulin like Growth Factor-I-Receptor): IGF-1R überexprimiert im Pankreaskarzinomgewebe, Mediator für K-Ras-abhängige und unabhängige Signalkette (MOMOSE ET AL. 2009); MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Effektorenzym des K-Ras-Signalweg; diverse niedermolekulare Inhibitoren, untersuchte Wirksamkeit auch bei K-Ras-mutierten Karzinomen (REMMERS ET AL. 2010); PI3K/Akt-Signalweg: Zellproliferation, Überleben, Metabolismus; mTOR (mammalian target of rapamycin): reguliert Gentranskription, Zellzyklusregulation; TGFβRI (transforming growth factor-β-type-I-receptor); CTLA-4 (cytotoxic-T-lymphocyte-associated-antigen 4): spezifisches Antigen von T-Lymphozyten in Tumoren als Vermittler der Immunresistenz (PARDOLL 2012); CD40(cluster of differentiation) gehört zur Superfamilie des Tumornekrosefaktor-Rezeptors als Schlüssel, in der T-Zell-abhängigen Antitumor-Immunität, sie führen zur Aktivierung der Makrophagen und Tumorregression (BEATTY ET AL. 2011) ; (Tab. mod. nach MICHL & GRESS 2013 Figure 3, Table 1, Seite 321).

1.2. GnRH-I- Rezeptor-vermittelte Tumortherapie

Targeted Chemotherapy bezeichnet eine moderne Strategie der Onkologie um zielgerichtet Krebszellen anzugreifen. Zytotoxische Pharmaka werden an Substanzen gekoppelt, die an krebsspezifische *targets* (Zielscheiben) binden.

Anders als systemisch wirkende konventionelle Chemotherapeutika greifen diese somit zielgerichtet Krebszellen an und vermindern die systemische Toxizität bei gleichzeitiger Wirkungssteigerung. Aufgrund der Zellspezifität kann die Dosis im Vergleich zu alleiniger Gabe der zytotoxischen Substanz eskaliert werden.

Vater dieser Grundidee, so skizzieren SCHALLY ET AL. in einem 2011 veröffentlichten Review, sei PAUL EHRLICH 100 Jahre zuvor, in der Annahme, dass Tumoren spezifische Antigene besitzen und daher selektiv über an

Moleküle gebundene aktive toxische Substanzen eradiziert werden können umgesetzt werden konnte diese Idee erst mit der Entdeckung von Rezeptoren und monoklonalen Antikörpern. Dieser gegen spezifische Zellstrukturen gerichtete Denkansatz war grundlegend für die Entwicklung an Antikörper gebundener Toxine (FITZGERALD & PASTAN 1989, PASTAN ET AL. 2006).

Durch die selektive Expression des GnRH-I-Rezeptors in diversen Karzinomen, bieten Verknüpfungen von zytotoxischen Substanzen mit Peptidhormonen eine effektive Therapieoption auch von hormonunabhängigen Karzinomen (AINA ET AL. 2002).

In Tumoren des Reproduktionstraktes spielt der GnRH-I-Rezeptor eine entscheidende Rolle auf hypophysärer Ebene aufgrund der hypophysären Kontrolle der Reproduktionsorgane. Der Rezeptor ist Zielscheibe von steroid- und hormonabhängigen Tumoren. Agonisten beeinflussen diese Tumore über eine Desensibilisierung des Rezeptors, Antagonisten über eine Rezeptorblockade. Agonisten dieses Rezeptors zeigten in *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Untersuchungen vor allem in steroid- und hormonabhängigen Karzinomen antiproliferative, antimetastatische und antiangiogenetische Wirkung. Antagonisten zeigten eine direkte Antitumor-Wirkung.

Diverse Therapiemöglichkeiten, die sich aus der Expression von GnRH-I-Rezeptoren in mit dem Reproduktionstrakt in Beziehung stehenden Karzinomen (Mamma, Ovar, Prostata) oder davon unabhängigen Karzinomen (malignes Melanom, Glioblastom, Larynxkarzinom) ergeben, beschreibt ein Review von LIMONTA ET AL. (2012).

1.2.1 GnRH-I-Rezeptor

Der Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor-I (*GnRH-I-Receptor* oder auch *LHRH-Receptor*) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (*G-Protein coupled receptor*, GPCR), der zur Rhodopsin-Familie gehört. Der humane GnRH-I-Rezeptor ist auf Chromosom 4 (4q13.1–q21.1) lokalisiert und besteht aus 3 Exons und 2 Introns, die ein aus 328 Aminosäuren bestehendes Protein kodieren (KAKAR ET AL. 1992, KAISER ET AL. 1994). 7-Trans-Membran-Rezeptoren (7-TMR) durchspannen helikal die Membran und sind über Peptidschleifen miteinander verbunden. Das glykolysierte N-terminale Ende liegt extrazellulär. Die Bindung eines Liganden am N-terminalen Ende führt zur Dimerisierung und Internalisierung des Rezeptors (SEALFON ET AL. 1997).

Der GnRH-I-Rezeptor von Säugetieren ist strukturell einzigartig unter den GPCRs. Er besitzt kein intrazelluläres COOH-Ende (KAKAR ET AL. 1992).

Dadurch fehlt dem Rezeptor ein Mediator für Desensibilisierung, Internalisierung und ausgeprägte Plasmamembranexpression (JANOVICK ET AL 2003). Dagegen konnte ein primatenspezifisches Lysin-Residuum an Position 191 (K191) gezeigt werden. Der dadurch fehlgefaltete Rezeptor führt zu einer erhöhten Internalisierungskinetik des GnRH-I-Rezeptors bei gleichzeitiger reduzierter Plasmamembran-Expression. Diese Strategie ermöglicht es der Zelle sehr effektiv die Anzahl der Oberflächen-Rezeptoren zu regulieren und Zellsignale zu vermitteln (JANOVICK ET AL. 2003, 2006).

1.2.2 GnRH-I-Rezeptor-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien

Zwei Arbeitsgruppen zeigten vor über 20 Jahren, dass GnRH-I-Rezeptoren sowohl im Gewebe von Pankreaskarzinomen Syrischer Goldhamster (FEKETE ET AL. 1989) als auch in humanem Pankreaskarzinomgewebe (FRIESS ET AL. 1991) exprimiert werden. Dabei exprimierten beide Gewebe sog. *low-affinity*-GnRH-I-Rezeptoren. SZENDE ET AL. (1991) zeigten später, dass Pankreaskarzinomzellen in Goldhamstern ebenso high-affinity Rezeptoren exprimieren.

Deren Bindungsregionen wurden elektronenmikroskopisch vor allem in der nukleären Membran der pankreatischen Karzinomzellen nachgewiesen. In humanem als auch gesundem Pankreasgewebe von Hamstern konnten keine GnRH-I- Rezeptoren nachgewiesen werden (FEKETE ET AL. 1989).

Mit der Expression des GnRH-I-Rezeptors verbundenen direkte und indirekten Effekte wurden in weiteren Studien *in vitro* und *in vivo* untersucht (PAZ-BOUZA ET AL. 1981, REDDING & SCHALLY 1984, SZENDE ET AL. 1990a,b 1991).

In klinischen Studien konnte ein moderater antiproliferativen Effekt von Triptorelin, einem GnRH-Agonisten, gezeigt werden (GONZALEZ-BARCENA ET. AL. 1986, 1989). Ähnliche antiproliferative Effekte konnten jedoch nicht für die Agonisten Buserelin und Goserelin gezeigt werden (ANDRENSANDBERG 1990, FRIESS ET AL. 1992, SPERTI ET AL. 1992).

1.2.3 AESZ-108 (AN-152)

Zur Entwicklung eines effizient wirksamen Hybridwirkstoffes in der Krebstherapie müssen verschiedene Qualitäten erfüllt werden. Dazu gehören: (1) Selektivität: durch die Bindung des zytotoxischen Agens darf die Affinität des Peptidhormons zu seinem spezifischen Rezeptor nicht herabgesetzt sein, (2) Stabilität der Bindung und (3) Spezifität, d. h. die Bindung darf erst nach Rezeptorbindung in der Krebszelle dekonjugiert werden und das Chemotherapeutikums sollte erst dort wirken. Dieser Mechanismus verbessert die Wirkstoffverabreichung, ermöglicht eine

Eskalation der verabreichten Dosis und reduziert gleichzeitig systemische Nebenwirkungen (SCHALLY ET AL. 1996).

AESZ-108 (AN-152) ist ein Hybridwirkstoff. *Hybrid* beschreibt hierbei die Bindung des Anthrazyklins Doxorubicin an die D-Lys⁶-Seitenkette des Peptidhormons GnRH.

1977 erhielten ANDREW V. SCHALLY und ROGER GUILLEMIN für die Entdeckung des Neurohormons GnRH den Nobelpreis für Medizin. Später entwickelten SCHALLY und ATTILA NAGY an der Tulane University New Orleans, Louisiana, USA, die Vorläufer des heutigen AESZ-108 (AN-152).

Eine besonders hohe Bindungsaffinität an den GNRH-Rezeptor zeigen Analoga des Peptidhormons mit Substitution des Aminosäurerestes Glycin an Position 6 (KARTEN & RIVIER 1986).

Zur kovalenten Bindung von zytotoxischen Substanzen eigneten sich vor allem jene Agonisten und Antagonisten, die an Position 6 Lysin [D-Lys⁶], als Aminosäureseitenkette anbieten (JANÁKY ET AL 1992, NAGY ET AL. 1993). SCHALLY selbst erörtert in einem Review 1999, dass verschiedene chemische Verbindungen existieren, um Doxorubicin an die D-Lys⁶-Aminosäure des Peptidhormons GnRH zu binden, ohne den Verlust seiner antitumorösen Aktivität.

Im Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152) ist Doxorubicin kovalent über eine stabile Esterbindung (14-O-hemiglutarat, *glutaric acid spacer*) an das Peptidhormon gebunden (Abb.1).

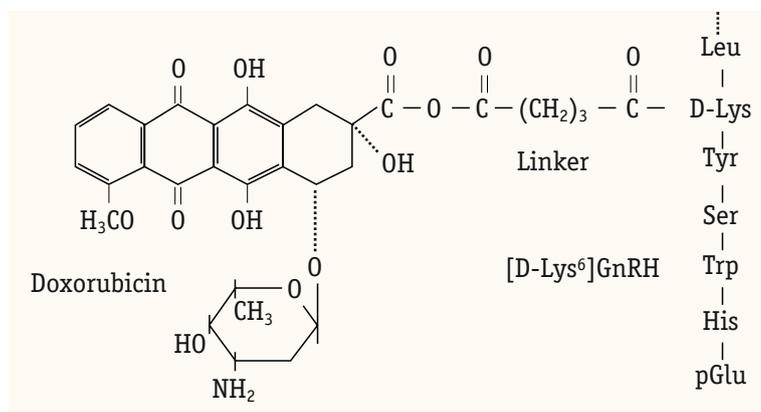


Abbildung 1: Struktur des zytotoxischen GnRH-Analogons AESZ-108 (AN-152). In dem Hybridwirkstoff ist das Anthrazyklin Doxorubicin kovalent über die Seitenkette D-Lys⁶ an das Peptidhormon gebunden (mod. nach GRÜNDKER ET AL. 2006, S. 591).

Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte in *In-Vitro*-Untersuchungsreihen an Endometrium und- Ovarialzellkarzinomen (WESTPHALEN ET AL. 2000), dass

der GnRH-I-Rezeptor - AESZ-108-Komplex nach Bindung innerhalb von Minuten über Membranvesikel (*coated vesicles*) internalisiert wird und sich intranukleär anreichert. Der GnRH-Agonist [D-Lys⁶] wird lysosomal abgespalten, und das frei gewordene Doxorubicin gelangt aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in den Zellkern. Dort induziert Doxorubicin Apoptose durch Interkalierung der nukleären DNA (Abb.2). Der Rezeptor wird recycelt und an die Oberfläche zurücktransportiert.

Ebenso wurde im Rahmen dieser Untersuchungen die Selektivität dieses Hybridwirkstoffes gezeigt, denn der inhibitorische Effekt von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorstadium kann durch einen Überschuss von GnRH-Analoga kompetitiv gehemmt werden. AESZ-108 (AN-152) hat keine Wirkung auf das Wachstum GnRH-negativer Zellen.

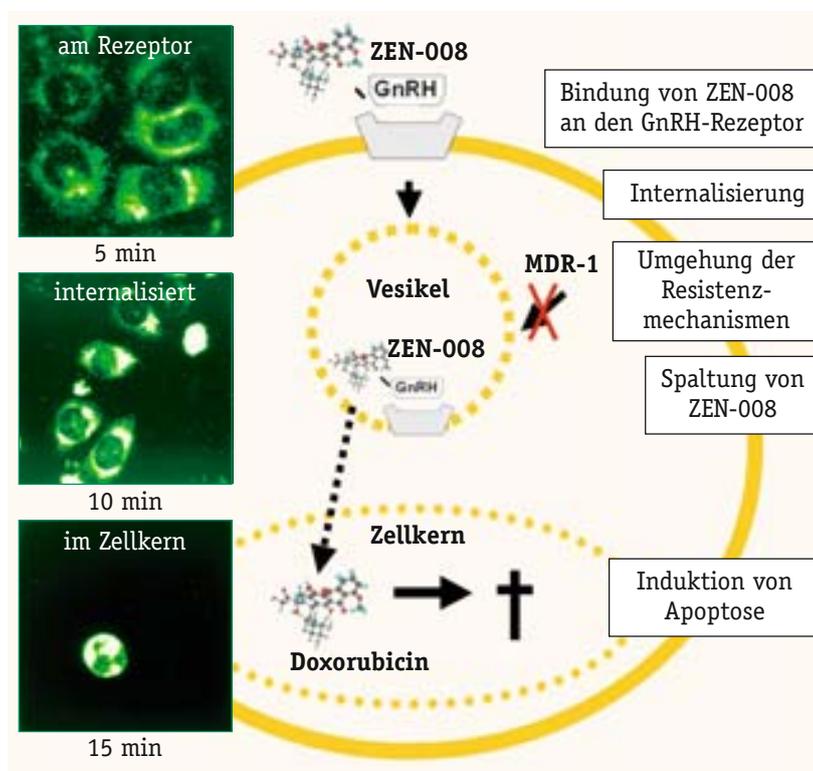


Abbildung 2: ZEN008 = AESZ-108 (AN-152), Aeterna Zentaris, Frankfurt. Rechts im Bild: Zelluläre Aufnahme mit Umgehung der Multi-Wirkstoff-Resistenz (MDR) und Wirkmechanismus des Hybridwirkstoffes ZEN-008 (AN-152): Apoptose der Zelle nach intranukleärer Anreicherung und lysosomaler Abspaltung von Doxorubicin-14-O-Hemiglutarat. Links im Bild: konfokale Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahmen: Lokalisierung von AESZ-108 (AN-152) durch charakteristische Fluoreszenz von Doxorubicin-14-O-Hemiglutarat bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm. Nach fünf Minuten kann AESZ-108 (AN-152) an den GnRH-Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert werden; nach zehn Minuten erfolgt die Internalisierung, der Prozess ist nach fünfzehn Minuten abgeschlossen. Doxorubicin befindet sich intranukleär und induziert die Apoptose der Zelle (aus: GRÜNDKER ET AL. 2006, S. 591).

In-Vivo-Versuchsreihen an Nacktmausmodellen (GRÜNDKER ET AL. 2002) zeigten, dass das Wachstum von GnRH-I-Rezeptor positiven Endometrium- und Ovarialzellkarzinomen durch AESZ-108 (AN-152) im Vergleich zu einer äquivalenten Dosis von freiem Doxorubicin das Tumorwachstum bei gleichzeitig geringerem Nebenwirkungsspektrum deutlich effektiver hemmen kann. GRÜNDKER ET AL. (2002) zeigten außerdem, dass es durch die Therapie mit dem zytotoxischen GnRH-Analogon zu keiner Abnahme der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche (Downregulation) kommt. Somit eignet sich AESZ-108 (AN-152) für wiederholte Anwendungen, die den Therapieeffekt steigern.

Ein weiterer Vorteil des *targeted* Chemotherapeutikums AESZ-108 (AN-152) ist, dass sich keine wie für viele lipophile Chemotherapeutika typische Multi-Wirkstoff-Resistenz (MDR) entwickelt, da die Aufnahme über Membranvesikel erfolgt. GÜNTHER ET AL. (2004 a,b) zeigten in Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen, dass die Expression einer MDR-1 charakteristischen Efflux-Pumpe (170.000Da-Glykoprotein) und phosphorylierter Glukoproteine (Pgp) in der Behandlung mit AN-152 deutlich geringer ist als im Vergleich zur Versuchsgruppe, die mit dem freien Anthrazyklin Doxorubicin behandelt wurde. Somit entwickelt sich in der Therapie mit AESZ-108 (AN-152) keine primäre oder sekundäre Chemoresistenz. Bei schon bestehender Chemoresistenz der Karzinomzellen gegenüber Doxorubicin ist die erfolgreiche Therapie mit AESZ-108 (AN-152) aufgrund des Internalisierungsprozesses dennoch effektiv (GÜNTHER ET AL. 2004 a,b).

1.2.4 Doxorubicin

In den Siebzigern wurde Doxorubicin (DOX) erstmals aus *Streptomyces peucetius var. caesius* isoliert. DOX gehört zu der Antibiotikagruppe der Anthrazykline und wird unter anderem in der Krebstherapie des Mamma-, Bronchial, Magen, Ovarialzell- und Schilddrüsenkarzinoms sowie den Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphom, dem multiplen Myelom, von Sarkomen und in der Behandlung von pädiatrischen Krebsentitäten angewendet (REVIEWS: ARCAMONE ET AL. 1969, CORTÈS-FUNES & CORONADO 2007, WEISS 1992).

Es werden 2 Mechanismen angenommen, durch die DOX mit den Krebszellen interagiert: (1) Interkalierung der DNA, (2) Spaltung der intranukleären Topoisomerase-II.

DOX generiert freie Radikale, die Zellmembran, DNA und Proteine schädigen. In Oxidierungsprozessen von DOX zu einem Semichinon, werden reaktive Sauerstoffmetabolite frei, die Lipide peroxidieren, Membranen und DNA schädigen, zu oxidativem Stress führen und Apoptose-induzierende

Kaskaden triggern (DOROSHOW 1986). Seine lipophilen Eigenschaften lassen DOX die nukleäre Zellmembran passieren (TEWEY ET AL. 1984).

Die dosisabhängige Kardiotoxizität ist der limitierende Faktor in der Anwendung von DOX. DOX wird zu dem Metaboliten Doxorubicinol reduziert. Doxorubicinol interferiert mit Enzymen des Eisenstoffwechsels (Aconitase, ACO-1), der Kalziumregulierung (ATP2A2, Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums; RYR2, Na⁺/K⁺-Pumpe des Sarkolems) und einer Protonenpumpe in der Mitochondrienmembran (F0F1) (THORN ET AL. 2011).

Klinisch unterscheidet man eine frühe Form der Kardiotoxizität wie Arrhythmien oder eine Perikarditis von späten Komplikationen wie Linksherzversagen als Folge einer dilatativen Kardiomyopathie (PAI & NAHATA 2000, FRISHMANN ET AL. 1997). Weiterhin ist DOX allergen, myelosuppressiv, dosisabhängig emetogen, verursacht Flashes und führt zu Alopezie und Hyperurikämie. DOX ist karzinogen, mutagen und möglicherweise gonadal suppressiv (FACHINFORMATION „DOXORUBICIN - HYDROCHLORID“).

1.2.5 Einsatz und Erfolg von AESZ-10 in anderen Tumorentitäten

Die Annahme der selektiven Expressivität von GnRH-I-Rezeptoren alleinig auf Zellen des Reproduktionstraktes konnte widerlegt (GRÜNDKER & EMONS 2005) werden. Die gesteigerte Expression des GnRH-I-Rezeptors in Krebszellen verschiedener Tumorentitäten unter Aussparung hämatopoetischer Stammzellen (GRÜNDKER & EMONS 2005), macht den GnRH-Rezeptor zu einer attraktiven Zielscheibe (target) der targeted vermittelten Chemotherapie (SCHALLY ET AL. 2011).

Im Folgenden eine Übersicht der *In-Vitro* und *In-Vivo* Studien in der Anwendung von AESZ-108 (AN-152):

Tumorentität	Expression GnRH-Rezeptor [%]	Referenz
Prostatakarzinom ^{1,2}	86	HALMOS ET AL. 2000 LETSCH ET AL. 2003 ⁴
Mammakarzinom ^{a,2b,c}	50 ^a	SZEPESHAZI ET AL. 1999 ⁴ BAJO ET AL. 2003 ³ WANG ET AL. 1999 ³
Epitheliales Ovarialzellkarzinom ^{2c}	80	WESTPHALEN ET AL. 2000 ³ GRÜNDKER ET AL. 2002 ⁴

Endometriumkarzinom ^{2c}	80	WESTPHALEN ET AL. 2000 ³ GUNTHER ET AL. 2004 ³ GRÜNDKER ET AL. 2002 ⁴
Harnblasenkarzinom ²	75	SZEPESHAZI ET AL. 2012 ^{3,4}
Kolorektales Karzinom	Krebszelllinien: HT-29, HCT-116, HCT-15, LoVo, Colo-320DM	SZEPESHAZI ET AL. 2007 ^{3,4}
Larynxkarzinom, Mundhöhlenkrebs	Krebszelllinien: KB, Hep-2	KREBS ET AL. 2002 ³
Pankreaskarzinom	in humanem und Pankreasgewebe von syrischen Goldhamstern	FEKETE ET AL. 1989 ³ FRIESS ET AL. 1991 ³

Tabelle 2: Übersicht der *in-vitro* und *in vivo* Studien in der Anwendung von AESZ-108 (AN-152). Nachweis der Expression des GnRH-I-Rezeptors durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), Immunhistochemie, Assays zur Detektion kompetitiver Hemmung der Liganden. ¹= ausstehende Klinische Studien, ²= Klinische Studie Phase-II; ³= In-Vitro-Untersuchungen, ⁴= In-Vivo Untersuchungen; ^a= Östrogen-Rezeptor-negatives Mammakarzinom; ^b= triple negatives Mammakarzinom, ^c= Klinische Studie Phase -II abgeschlossen.

Eine Phase-I-Studie mit Patientinnen, die an fortgeschrittenen Endometrium-, Mamma- und Ovarialzellkarzinomen erkrankt waren, ermittelte die Verträglichkeit sowie die optimale therapeutische Dosis von AEZS-108 (AN-152) (WIMBERGER ET AL., 2011).

Die so ermittelte Dosis von 267 mg/m², verabreicht in Intervallen von drei Wochen, wurde von den Endometriumkarzinom-Patientinnen (n=44) in einer Phase-II-Studie (AGO-GYN 5) an der Universitätsmedizin Göttingen gut toleriert. Hämatotoxische Nebenwirkungen waren schnell reversibel. Nichthämatologische Nebenwirkungen erforderten lediglich eine retrahierte erneute Verabreichung. Es wurde kein Fall von Kardiotoxizität beobachtet (WIMBERGER ET AL., 2011).

Eine Ansprechrates von 31% ist vergleichbar mit Platin- oder Taxan-basierter Chemotherapie (TEMKIN & FLEMING 2009). 44% zeigten eine Stabilisierung der Erkrankung. Somit beträgt die *Clinical-Benefit-Rate* 74%. Die Gesamtüberlebenszeit ist vergleichbar zur aktuellen Triple-Chemotherapie (13,7 Monate) bei geringerer Toxizität (TEMKIN & FLEMING 2009).

Um die Rolle von AESZ-108 (AN-152) in der Therapie des Endometriumkarzinoms zu definieren, wurde eine Phase-III-klinische Studie (NCT01767155) zur Evaluation einer Sekundärtherapie des Endometriumkarzinoms im Januar 2013 verifiziert.

Aktuell sind die Ergebnisse von klinischen Phase-II-Studien zur Evaluierung der Effektivität und Wirkung der AESZ-108 basierten Therapie des Ovar- und Mammakarzinoms verfügbar. Ergebnisse der Phase-II-Studie der Wirkung von AESZ-108 in der Therapie des Urothelkarzinoms sind noch ausstehend.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die gegenwärtige Therapie des duktales Adenokarzinoms ist frustrierend. Bei Diagnosestellung sind nur ca. 20% in kurativer Intention operabel bei gleichzeitigen ernüchternden 5-Jahres-Überlebensrate trotz primärer Resektabilität. Die Überlebenszeit lokal fortgeschrittener und metastasierter duktales Adenokarzinome des Pankreas beträgt nur wenige Monate.

Die Prognose der inoperablen, chemotherapieresistenten und rasch metastasierender Pankreaskarzinome ist unter der gegenwärtigen systemischen Chemo- und Radiochemotherapie infaust. Innovative Therapiestrategien, die sich zielgerichtet gegen karzinomspezifische Strukturen- sog. targets - richten sind vielversprechende Optionen in der Behandlung dieser aggressiven Tumorentität.

Diese Arbeit untersucht,

- 1) die Expression von GnRH-I-Rezeptoren in humanen Pankreaskarzinomzelllinien und Gewebeschnitten *in vitro*
- 2) die Proliferationsrate humaner Pankreaskarzinomzelllinien unter der Behandlung mit dem zytotoxischen GnRH-Analogen AESZ-108 (AN-152) *in vitro*
- 3) das Apoptoseverhalten humaner Pankreaskarzinomzelllinien unter der Behandlung mit dem zytotoxischen GnRH-Analogen AESZ-108 (AN-152) *in vitro*
- 4) das dosisabhängige Wachstum xenotransplantierte Pankreaskarzinome im Nacktmausmodell unter der Behandlung mit dem zytotoxischen GnRH-Analogen AESZ-108 (AN-152) im Vergleich zur Behandlung mit dem ungebundenen Anthrazyklin Doxorubicin

Aus diesen präklinischen Untersuchungen soll evaluiert werden, ob die Behandlung GnRH-I-Rezeptor positiver Pankreaskarzinome mit dem zytotoxischen GnRH-Analogen AESZ-108 (AN-152) eine spezifische, effektive und zugleich nebenwirkungsarme Therapieoption des duktales Adenokarzinoms des Pankreas darstellt.

Bisher konnte eine zytotoxische Wirkung des GnRH-Analogons AESZ-108 (AN-152) für fortgeschrittene, inoperable, GnRH-I-Rezeptor positive gynäkologische Tumorentitäten bis hin zu klinische Phase-II Studien gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik, Göttingen
Analysewaage BP161P	Sartorius, Göttingen
Autoklav 2540EL	Tuttnauer, Breda (Niederlande)
Brutschrank, Modell 3121 S/N 28439532	Forma Scientific, Nashville (USA)
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Elektrophorese Apparatur, DNA	Aplex, Lisses (Frankreich)/ oder OWL Separation Systems
Gasbrenner	Schütt Labortechnik, Göttingen
Gefrieranlagen:	Air Liquide, Düsseldorf
-150 °C	Forma Scientific, Braunschweig
- 80 °C	Liebherr, Bieberach
- 20°C	
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Heidolph, Bremen
<i>Mikroskope:</i>	
Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Olympus, IX 51	Olympus, Hamburg
Multi- Detection Microplate Reader	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Neubauer-Zählkammer	Brand Gläser, Wertheim
0,1mm (Tiefe), 0, 0025 mm ² (Fläche)	Laboroptik, Friedrichsdorf
Rollenmischer	Dunstable Beds, England
Sterilwerkbank Lamin air LFM 24725	Heraeus, Osterode
Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Forma Scientific, Braunschweig
Überkopfschüttler	Heto , Wettenberg
Vortex REAX top	Heidolph, Bremen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Wipptisch	GFL, Burgwedel
<i>Verwendete Zentrifugen:</i>	
1) Biofuge pico	Heraeus, Osterode
2) Labofuge, Ausschwingmotor	Heraeus, Osterode
3) Tischkühlenzentrifuge 3K30	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien entsprechen dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Combitips plus	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Einfrierboxen	Nalgene Labware, Rochester (USA)
Falconröhrchen 10ml, 20 ml, 50ml (rund, konisch, mit/ohne Stehrand)	Greiner-Bio One, Essen
Gewebekulturflasche	NUNC, Roskilde (Dänemark)
1) 25 cm ²	
2) 75 cm ²	
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nalgene Labware, Rochester (USA)
LabTek Chamber Slide™	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Multiwellplatten:</i>	
1) 6-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
2) 96-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
3) 96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Essen
Objektträger mit Mattrand, 76 x 26mm	Knittel Gläser, Braunschweig
<i>Verwendete Pipetten:</i>	
1) Pasteurpipetten, 150 mm, 230 mm	Wilhelm Ulbrich (WU)GdbR , Mainz
2) Pipetten 5ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Braunschweig
3) Einfach-Pipetten, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
4) Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
<i>Verwendete Pipettenspitzen:</i>	
1) 10µl, 50µl 200µl, 1000µl	Sarstedt, Braunschweig
2) Quarzküvetten	Quarzglas Suprasil, Hellma
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Sarstedt Braunschweig

2.1.3 Chemikalien

1,5% Agarose-Gel	peqLab, Erlangen
alamarBlue®	abD Serotec, Düsseldorf
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue	Bio-rad, München
Diaminobenzidin	Dako, Hamburg
Diisopropylfluorophosphat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen

Ethanol, vergärter	Chemie Vertrieb, Hannover
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Foetal calf serum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Glutamin	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
Natriumchlorid	USB, Staufen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase Buffered Saline (PBS)	PAN- Biotech, Aidenbach
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl-Roth, Karlsruhe
Transferrin	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris)	USB, Staufen
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin- EDTA 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Geyer, Renningen

2.1.4 Puffer und Lösungen

Ethidiumbromidbad	0,007% Ethidiumbromid, 100% Aqua bidest.
PBS	140mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH
TBE (0,5)	10x TBE+10,8 10,8 Trisbase, 55g Borat, 40 ml 0,5 EDTA ad 1l
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 500 mM Tris, pH 7,5
TBST	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20

2.1.5 Proteine, Proteinaseinhibitoren

Proteinaseinhibitorcocktail	Sigma, Deisenhofen
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA, 100 x)	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.6 Oligonukleotide

Zielgen	Sequenz	bp	Hersteller
GnRH-I Rezeptor	5'-GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC-3' 5'-CAG GCT GAT CAC CAC CAT CA-3'	319	MWG, Ebersberg
L7	5'-AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC-3' 5'-ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA-3'	357	MWG, Ebersberg

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide, RT-PCR

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft/Referenz
GnRH-I- Rezeptor	Kaninchen, polyklonal	1:10.000	Emons et al. 2009

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Anti-Rabbit IgG	Affe	1:10.000	GE HealthCare

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.8 Pharmakologische Versuchssubstanzen

Substanz	Stammlösung	Herkunft
AESZ-108 (2133,23 g/mol)	5 x 10 ⁻⁴ M (in PBS)	Aeterna Zentaris, Frankfurt
Doxorubicin (Adriamycin®hydrochlorid)	Pulverform	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 6: Verwendete Versuchssubstanzen

2.1.9 Verwendete Assays, Kits und kommerzielle Reaktionssysteme

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega, Mannheim
D(T)15 Primer	Roche, Mannheim
Histostain® Bulk Kit	Zymed® Laboratories, San Francisco (USA)

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay Biotium, Köln

2.1.9 Medien Zellkultur, Medien Versuche

Als Grundmedium zur Kultur der verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde DMEM-Earl-Kulturmedium w Phenolrot verwendet. Diesem wurden 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS, Transferrin und Glutamin supplementiert.

Zur Kryokonservierung wurde DMEM mit 10% FCS und 10% DMSO verwendet.

Als Hungermedium wurde MEM-EARL w/o Phenolrot verwendet. Diesem Medium wurde 1% Penicillin/Streptomycin, 5% FCS, 1µg/ml Transferrin, 2% Glutamin und 1,1g Natriumhydrogencarbonat supplementiert.

Die Nähr- und Versuchsmedien sowie die zur Supplementierung notwendigen Zusätze wurden von den Firmen Biochrom (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), PAA (Cölbe) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.1.10 Verwendete Zelllinien

Zelllinie (ATCC® Nr.)	Zelltyp	Geschlecht, Alter [Jahre], ethnische Herkunft	Referenz
AsPC-1 (CRL-1682)	Pankreas-Aszites, Adenokarzinom	weiblich, 62, Kaukasierin	Tan et al. 1981
MIA PaCa-2 (CRL-1420)	Pankreas- Tumorgewebe, Adenokarzinom	männlich, 65, Kaukasier	Yunis et al. 1977
PANC-1 (CRL-1469)	Pankreas- Tumorgewebe, duktal Epitheloidkarzinom	männlich, 56, Kaukasier	Lieber et al. 1975

Tabelle 7: Verwendete humane Pankreaskarzinomzelllinien

2.1.11 Histologisches Material

Präparat	Referenz
50 Paraffinschnitte, humanes Pankreaskarzinomgewebe (n=40), benignes Pankreasgewebe (n=10), Charakteristika siehe Tab.14	US-BIOMAX, Rockville, MD, USA

Tabelle 8: Histologisches Material, Paraffinschnitte

2.1.12 Versuchstiere

Stamm	Genotyp	Bezug
CD 1 Nu/Nu	Crl: NU/NU-Foxn1 ^{nu}	Charles River, Sulzfeld

Tabelle 9: Verwendete Versuchstiere

2.1.13 Matrigel

	Herkunft
Matrigel™ Basement Membrane Mix	Engelberth-Holm-Swarm (EHS)- Maussarkom

Tabelle 10: Verwendetes Substrat zur Zellkultur, *in vivo* Versuchsreihe

2.1.14 Elektronische Datenverarbeitung

AxioVision 3.1	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism® 5.03 für Windows	GraphPad Software, San Diego California (USA)
KC4™ Synergy HT	Bio-Tek, Winooski (USA)
Microsoft Word für Mac 2011, Version 14.2.4	Microsoft, Redmond (USA)

2.1.15 Statistische Analyse

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten als Triplikate in drei jeweils voneinander unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Zellpassagen der entsprechenden humanen Pankreaskarzinomzelllinien. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz der gewonnenen Daten wurden eine one-way-ANOVA und ein Newman-Keuls-Test berechnet. Vorliegende gemessene statistische Signifikanzen der Daten $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und n.s. = nicht signifikant wurden entsprechend dem Signifikanzniveau in Text, Tabellen und Abbildungen gesondert dargestellt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung

Trypan-Blau färbt die Membranen der letalen Zellen und ermöglicht somit die Differenzierung letaler von vitalen Zellen. Die Zellzahl kann somit durch Zählen der ungefärbten vitalen Zellen in den vier Großquadranten einer Neubauer-Zählkammer und nach dem Einsetzen in folgende Formel

$$\text{Zellzahl [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Mittelwert der 4 Großquadranten}) \times 10^4 \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Ausgangsvolumen}}$$

Formel 1: Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

berechnet werden. Das Aliquot einer entsprechenden Zelllinie wurde dazu zunächst in PBS-Puffer resuspendiert, und die Zählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop nach Verdünnungen mit der Trypanblau-Lösung im Verhältnis von 1:5 bis 1:20.

2.2.2 Zellkultur

Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden bei 37° Umgebungstemperatur und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 48 Stunden mit zuvor im Wasserbad vorgewärmten Kulturmedium (DMEM-Earl mit Phenolrot, Biochrom (Berlin) mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS, Transferrin, Glutamin) versorgt. Die Arbeit mit den Zelllinien sowie deren Versorgung erfolgte an einer Sterilwerkbank.

2.2.3 Passagieren adhärenter Zellen

Aufgrund der hohen Proliferationsrate der verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden diese im Zeitintervall von maximal 72h passagiert. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 80% auf dem Boden der Gewebekulturflasche wurde das Nährmedium abgesaugt, die Gewebekulturflaschen mit PBS gewaschen und anschließend mit im Wasserbad vorgewärmten Trypsin bei 37°C inkubiert, bis die Peptidasen die adhärenen Zellen vom Boden der Gewebekulturflaschen lösten. Der Lyseprozess wurde lichtmikroskopisch überwacht. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Das am Boden des Zentrifugenröhrchens entstandenen Zellpellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert und ausgedünnt in neuen Zellkulturflaschen

(Fläche 75 cm²) in Kultur gebracht oder auf Versuchsgefäße ausgesät. Überschüssige Zellen wurden konserviert oder verworfen.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Eine zuvor hergestellte Zellsuspension bekannter Konzentration wurde zur Kryokonservierung 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand des am Boden des Zentrifugenröhrchen entstandene Zellpellet wurde abgesaugt und in eiskaltem Einfriermedium (DMEM, Biochrom, Berlin; 10% FCS und 10% DMSO) aufgenommen. Je 1,0 ml dieser Zellsuspension wurden dann in entsprechend beschriftete Kryokonservierröhrchen überführt. Diese wurde zunächst für maximal 24h bei -80°C eingefroren, um dann langfristig in flüssigem Stickstoff (-150°C) konserviert werden zu können.

2.2.5 Revitalisierung von Zellen

Zur Revitalisierung wurden in Stickstoff kryokonservierte Zellen zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension des Kryoröhrchens in ein Falconröhrchen zusammen mit 8 ml Kulturmedium überführt. Diese Suspension wurde dann bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Zweck der Zentrifugation war die Zellen vom DMSO des Einfriermediums zu trennen. Das entstandene Zellpellet wurde in frisches Kulturmedium überführt und die Zellen in einer Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät.

2.2.6 Inhibition der Serum-Carboxylesterase

In allen Versuchen dieser Arbeit, die im Rahmen der Behandlung mit dem zytotoxischen GnRH-Analogen AESZ-108 (AN-152) erfolgten, wurden die Zellen vor Behandlung mit dem Pharmakon für 1 h mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) behandelt.

DFP inhibiert die im fetalen Rinderserum enthaltene Serum-Carboxylesterase (CE) und verhindert die vorzeitige Abspaltung des Doxorubicins von der [D-Lys⁶] Seitenkette des Peptidhormons. In einer Konzentration 0,25 µg/ml konnten keine toxischen Effekte auf die humanen Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet werden (NI & POWERS 1998).

2.2.7 alamarBlue® Proliferations-Assay

alamarBlue® ist ein wasserlöslicher Farbstoff, der basierend auf Redoxreaktionen, in oxidierter blauer Form als *Resazurin* oder in reduzierter rot fluoreszierender Form, als *Resorufin*, vorliegen kann.

Auf dieser Indikatoreigenschaft beruht das Funktionsprinzip des angewandten Proliferationsassays. Die Zählung vitaler Zellen erfolgt über die metabolische Aktivität der Zelle. Es wird der Elektronentransport in der Mitochondrienmembran im Rahmen der Atmungskette der Zelle erfasst.

Vitale Zellen reduzieren die blaue Form des Indikators durch die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette zur rot fluoreszierenden Form Resorufin (AHMED ET AL. 1994). Diese Farbänderung wird quantitativ durch UV-Spektrometrie und Fluoreszenzspektrometrie (Multidetection Microplate Reader, Bio-Tek) gemessen. Dieses Verfahren erfasst die Proliferationsaktivität von Zellen.

Zur Messung der Proliferationsaktivität der humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde eine definierte Zellanzahl in 96-Well-Platten ausgesät. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden 5000 Zellen/Well der Zelllinie MIAPaCa-2 und 500 Zellen/Well der Zelllinie Panc-1 ausgesät. Diese wurden 24 h und 72 h später mit unterschiedlichen Konzentrationen AN-152 ($10^{-5/-7/-9/-11}$) beimpft. Die Zellen wurden insgesamt für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Dann wurde der alamarBlue® Farbstoff hinzugegeben. Schließlich wurde das mitochondriale Membranpotential im Multidetection Microplate Reader durch spektralphotometrische Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm gemessen. Als Kontrolle dienten mit Medium beimpfte Wells. Die Referenzmessung erfolgte bei $\lambda = 630$ nm.

2.2.8 Messung der Apoptose

2.2.8.1 Quantitativer Nachweis der Apoptose- JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection

10x Assay Puffer	1:10 mit destilliertem Wasser
JC-1 Reagenz	1:100 mit 10x Assay Puffer

Tabelle 11: JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay

JC-1 ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff. Die lipophilen Eigenschaften erlauben dem Farbstoff die Passage der Plasma- als auch der Mitochondrienmembran. Durch die Anlagerung des Farbstoffs in beiden

Zellkompartimenten kann ein elektrochemischer Gradient bestimmt werden. Somit ist es möglich, den Zusammenbruch des Membranpotentials- als frühes Zeichen der Apoptose- zu messen.

In vitalen Zellen sammelt sich der kationische Farbstoff JC-1 im negativ geladenen Mitochondrienkompartiment, wo es zur Ausbildung von rot fluoreszierenden Aggregaten kommt. Im frühen Apoptoseprozess der Zellen kommt es zur Bildung von Poren in der Membran der Mitochondrien. Dies führt zum Zusammenbruch des Membranpotentials. Der Farbstoff JC-1 passiert das Mitochondrienkompartiment und liegt dann im Zellplasma als grün fluoreszierendes Monomer vor (SMILEY ET AL. 1991).

Zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials der humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde in Nährmedium eine gleiche, definierte Zellanzahl in 6-Well-Platten ausgesät. Nach erreichter Zellkonfluenz von 80% wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und für 24 h mit Hungermedium versorgt.

Dann wurden die pankreatikokarzinomatösen Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen ($c = 1 \times 10^{-5/-7/-9}$) des zytotoxischen GnRH-Analogons AESZ-108 (AN-152) beimpft und für 72 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die für 72 h in Hungermedium inkubiert wurden. Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranverlustes erfolgte die Anwendung des JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay (BIOTIUM, Köln) nach Herstellerangaben.

Nach Resuspension der Zellen im JC-1-Reagenz und Waschung im Puffer, erfolgte die Messung des Membranverlustes im Multidetektion Microplate Reader (BioTek). Gemessen wurde der rot fluoreszierende Farbstoff bei 550/600 nm und der grün fluoreszierende Farbstoff bei einer Wellenlänge von 485/535 nm.

2.2.8.2 Qualitativer Apoptosenachweis- Visualisierung der DNA-Fragmentation durch Anwendung des TUNEL Assays

Das Funktionsprinzip dieses Assays beruht auf der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung mit Fluoreszin-12-dUTP markierten terminalen Desoxynukleotidyltransferasen (GAVRIELI ET AL. 1992). Diese Transferasen binden an das 3'-OH- Ende der DNA.

Freiliegende 3'-OH-Enden entstehen im späten Stadium der Apoptose im Rahmen der Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL-System entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die apoptotischen Zellen stellten sich im Fluoreszenzmikroskop grün und die vitalen Zellen rot dar. Dieser Assay diente als ergänzender qualitativer Apoptosenachweis zur Visualisierung der DNA-Fragmentation als Zeichen der späten Apoptose. Das Fluoreszenzmuster wurde in mindestens 3 Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zellpassagen der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaca-2 und Panc-1 nach 9-, 12-, 24- und 36-stündiger Inkubation mit 1×10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) untersucht.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Nukleinsäurenachweis

2.3.1.1 Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen

Zur Isolierung von RNA wurden zunächst Zellen in Kulturflaschen der Größe 25 cm^2 ausgesät und bei einer erreichten Konfluenz von 80% mit Guanidiniumisothiocyanat-haltigem Puffer (RLT-Puffer) lysiert (CHOMCZYNSKI & SACCHI 1987). Die im Gebrauchspuffer enthaltene RNase wurden durch zuvor hinzugefügtes β -Mercaptoethanol ($10 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol pro ml RLT-Puffer) inaktiviert. Die lysierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Vorgang des Schockgefrierens kombiniert mit anschließendem schnellem Auftauen (für 10 min bei 37°C) führten zu einer Homogenisierung der RNA-Proben. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden). Das verwendete Kit basiert auf dem Prinzip, dass die negativ geladenen Nukleinsäuren in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an der Glasfaseroberfläche von Silicagel-Säulen binden (VOGELSTEIN & GILLESPIE 1979).

2.3.1.2 Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der unterschiedlichen charakteristischen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren bei 260 nm und von Proteinen bei 280 nm wurde der Reinheitsgrad der gewonnenen Nukleinsäuren anhand des A_{260} - A_{280} -Absorptionsquotienten photometrisch bestimmt (BioPhotometer 61631, Firma Eppendorf).

Proteine verunreinigen die RNA-Präparation. Als rein gilt ein A_{260} - A_{280} -Absorptionsquotient zwischen 1,8 und 2,0 (GLASEL 1995). In dieser Arbeit wurden $7 \mu\text{l}$ der gewonnenen RNA mit $63 \mu\text{l}$ freiem Wasser in einer

Quarzküvette gemischt und anschließend der Reinheitsgrad photometrisch ermittelt. Als Kontrolle diente eine Messung der Absorption von Ampuwa. Für weitere Berechnungen des RNA-Gehaltes wurde der Mittelwert der drei photometrisch ermittelten Messwerte verwendet.

2.3.1.3 Reverse Transkription

Zur Gewinnung der Matrize für die nachfolgende PCR wurde in der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 1µg RNA eingesetzt. Ziel der RT-PCR ist es, die gewonnene RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umzuschreiben, welcher dann als *Template* für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient (VERSES ET AL. 1987).

Die RT-PCR erfolgte mit 1µg RNA in 14µl-Ansätzen die jeweils 1µl RNasin und 1µl DNase I enthielten. Die Differenz zu 14µl wurde mit RNA freiem Wasser aufgefüllt und für 30 min bei 37°C sowie für weitere 3 min bei 70°C inkubiert.

Während dieser Ansatz auf 4°C herunterkühlte, wurden 26 µl des in u.g. Tabelle aufgeführten Enzymmixes hinzugegeben.

Material	Menge im Mix [µl]	Ausgangskonzentration
d(t) ₁₅ Primer	8	-
dNTPs	4	10 mM
RT-Puffer	8	5x
DTT	4	100 mM
SuperScript II	2	-

Tabelle 12: Enzymmix der reversen Transkription (RT)

Dieser Ansatz wurde dann im Thermocycler für 60 min bei 37°C inkubiert und schließlich bei 95°C für 10 min denaturiert.

Das Funktionsprinzip der RT-PCR basiert auf einer etablierten Methode nach Verses (1987). RNA abhängige DNA-Polymerasen (SuperScript II, Reverse-Transkriptase) synthetisieren aus der gewonnen RNA einen komplementären cDNA-Strang. Der Primer, ein Oligo-d(T)- Primer, markiert den Startpunkt am RNA-Strang, indem er mit diesem hybridisiert. Die im Enzymmix enthaltenen dNTPs liefern die Nukleosidtriphosphate zur Herstellung des cDNA-Strangs.

2.3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die von MULLIS ET AL. 1986 erstbeschriebene Polymerase-Kettenreaktion von Nukleinsäuren zur spezifischen Amplifikation von DNA Sequenzen, wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet.

Das *Template* bezeichnet die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Ein aus zwei Oligonukleotiden bestehender Primer flankiert den Startpunkt für die von der hitzestabilen DNA-Polymerase zu amplifizierende DNA-Sequenz. Der *Primer* bindet nach erfolgter Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C unter einer *Primer* spezifischen *annealing* Temperatur, an den Strang und seinen entsprechenden Gegenstrang.

Die oben beschriebene Polymerase bindet an den *Primer* und verknüpft die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs). Es entsteht ein neuer DNA-Strang. In Folgeschritten erfolgt die Elongation durch die taq-Polymerase (SAIKI ET AL. 1988). Das Temperaturoptimum dieser taq-Polymerase liegt bei 72°C. Eine weitere Denaturierung der entstandenen DNA-Doppelstränge startet den nächsten PCR-Zyklus. Multiple Zyklen führen zur exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

Als semiquantitative Kontrolle dieses Arbeitsschrittes gilt die Amplifikation von L7. Bei L7 handelt es sich um ein ribosomales Protein, welches in allen Geweben exprimiert wird (KO ET AL. 2006).

PCR Material	Menge [μ l]	Ausgangskonzentration
H ₂ O (Ampuwa)	10,725	-
forward -Primer	0,3	20 μ M
reverse-Primer	0,3	20 μ M
dNTPs	1,2	1mM
PCR-Puffer	1,5	10x
DNA-template	0,6	10-100 ng/ μ l
RedTaq Polymerase	0,375	5 U/ μ l
Gesamtvolumen	15	-

Tabelle 13: Reaktionsansatz, Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Gen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
L7	30 sec, 94°C	60 sec, 54°C	60 sec, 72°C	22
GnRH-I R	30 sec, 94°C	60 sec, 60°C	120 sec, 72°C	35

Tabelle 14: Programm Thermocycler, PCR

2.3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (McDONNELL ET AL. 1977) basiert auf dem Funktionsprinzip, dass die negativen Nukleinsäuren unter Gleichspannung zur positiven Anode wandern. Unterschiedliche Laufzeiten im Agarose Gel ergeben sich aufgrund der unterschiedlichen Größe der Moleküle. Bei aufzutrennenden Fragmentgrößen in der Größenordnung von 300-500 bp wurde 1,5% Agarose-Gel verwendet. Die 1,5% agarosehaltigen Gele werden in 1-fach konzentrierten TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) in der Mikrowelle aufgekocht und luftblasenfrei in eine Gelkammer überführt. Ein Gelkamm formte Taschen. Das dann ausgehärtete Gel wurde mit 1x TBE-Puffer überschichtet, der Gelkamm gezogen und jeweils 10µl der DNA-Proben mit 2µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Ein Standard 100 bp ladder Marker (Invitrogen) sowie eine Negativkontrolle liefen zum Vergleich mit.

Bei einer Spannung von 85 V erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben in ca. 50 min. Der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau markierte den zurückgelegten Weg.

Zur Analyse wurden die Gele abschließend unter einem Abzug in Ehtidumbromid (EtBr) gefärbt, in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen und via eines UV-Transluminators (BioDoc Analyze 2.1 (Software), Biometra (Göttingen)) bei Licht der Wellenlänge 312 nm visualisiert und ausgewertet. EtBr interkaliert die DNA und sammelt sich zwischen den Basen der DNA Doppelhelix an. Deswegen eignet sich dieser Farbstoff zur Visualisierung der Nukleinsäurebanden. Eine weitere spezifische Eigenschaft des Farbstoffes ist seine Fluoreszenz bei UV-Licht der Wellenlänge 312 nm.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen

40 humane karzinomatöse Pankreasgewebeschnitte (duktales Adenokarzinom, UICC Stage II-IV, siehe Anhang) und zehn humane gesunde Pankreasgewebeschnitte (Tab. 15) wurden auf die Expression des GnRH-I-Rezeptors untersucht. Bezogen wurde die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte von US-BIOMAX (Rockville, MD, USA). Diese Gewebeschnittreihe beinhalteten die schriftlichen Einwilligungen aller Spender nach deren ausführlichen Aufklärung über Gewinnung, Einbettung

und Anfertigung der Paraffinschnitte entsprechend den gültigen ethischen Leitlinien.

2.4.1.1 Entparaffinisierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte

Zur verbesserten Analyse der Expression des GnRH-I-Rezeptors wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffinisiert. Dazu wurden die Paraffinschnitte für 30 min bei 60°C erwärmt und das flüssige Paraffin durch wiederholtes Waschen mit Xylol entfernt. Dann erfolgte die Rehydrierung der Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Alle 5 min wurden die Schnitte dazu in 100%-, 90%-, 80%- und 70%igen Alkohol inkubiert.

2.4.1.2 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Affinität spezifisch ausgewählter Antikörper zu einem Epitop. Nach erfolgter Antigen-Antikörperreaktion und der Kopplung an ein entsprechendes Detektionssystem wird das Epitop sichtbar gemacht (RAMOS-VARA 2005). Begonnen wurde dieses Prozedere mit einer 20-minütigen Inkubation der Gewebeschnitte in 3%-iger-H₂O₂-Lösung in Methanol für 6 min, um unspezifische Reaktionen durch endogene Peroxidasen auszuschalten. Dann folgte eine Reihe von drei Waschungen mit ddH₂O. Anschließend wurden die Präparate in 0,01 M Citratpuffer bei einem pH-Wert= 6,0 in der Mikrowelle (700 W) für 5 min aufgekocht. Ziel dieses Vorgehens ist die im Zellkern befindlichen Antigene zu demaskieren.

Im weiteren Verlauf wurde zur Immunfärbung das HistostainBulk Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Schnitte wurden zuerst mit der im Kit enthaltenen Blocking Solution für 10 min beschichtet und vorsichtig gewaschen. Dann wurde der polyklonale Primärantikörper (rabbit anti-human GnRH-I Rezeptor Serum) für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:10.000 in 1% bovines Serumalbumin (BSA) in 10 mM Tris, 500 mM NaCl und 0,1% Tween-20 (TBST) bei einem pH-Wert von 8,0 verdünnt. Nach drei Waschgängen mit PBS, wurde der sekundäre konjugierte Meerrettichperoxidase-IgG-Antikörper aufgetragen. Es erfolgten drei weitere Waschgänge mit PBS-Puffer. Um das Farbsignal zu verstärken wurden 100 µl Streptavidin-Peroxidase für 10 min aufgetragen und die Schnitte anschließend ein letztes Mal mit PBS-Puffer gespült. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) in einer 1:5 Verdünnung mit Substratpuffer verwendet. Nach Reaktion der Meerrettichperoxidase mit Wasserstoffperoxid oxidieren die freiwerdenden

Protone, unter der Bildung von Wasser, das farblose Chromogen zu seinem braunen Endprodukt.

Die Kontrollreaktion erfolgte als Substitution des primären Antiserums mit pä-immunen Serum desselben Kaninchens.

2.4.1.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung färbt die nukleären Zellstrukturen dunkelblau bis violett und das Zytoplasma rosa (Wu 1940). Die in den vorangegangenen Schritten entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte, wurden dazu 10 sec. bei RT in HE (Verdünnung 1:10 mit ddH₂O) inkubiert, mit Leitungswasser für 10 min gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 70%, 80%, 90%, 100%) und Xylol für je 5 min dehydriert. Die pH-Wert Änderung von 6,8 auf 7,4 führt zur Blaufärbung der Kerne. Abschließend erfolgte die bläschenfreie Deckung mit DePex Mounting Medium (Gurr) und Deckgläschen. Unter einem Lichtmikroskop wurden die Zellen anschließend betrachtet und analysiert.

2.5 In-Vivo-Versuche

2.5.1 Versuche und Haltungsbedingungen

Alle In-vivo-Versuche wurden an thymusdefizienten, weiblichen Nacktmäusen (CD1 nu/nu, Charles River, Sulzfeld, Germany) gemäß den aktuellen und geltenden deutschen ethischen und tierschutzrechtlichen Richtlinien durchgeführt.

Die 6-8 Wochen alten, weiblichen Nacktmäuse wurden unter veterinärmedizinischer Aufsicht zu maximal 5 Tieren pro Käfig in einem klimatisierten Raum unter Einhaltung eines 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Käfige der Nacktmäuse wurden von Tierpflegern steril gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgte fachmännisch durch die Tierpfleger. Das Trinkwasser der Tiere wurde autoklaviert verabreicht.

2.5.2 Injektion von Tumorzellen

Zellen der Zellreihe MIAPaCa-2 und Panc-1 wurden zunächst in Kulturflaschen kultiviert. Nach erreichter Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abtrypsiniert und in PBS gewaschen. Die humanen Pankreaskarzinomzellen wurden dann mittels einer Neubauer-

Zählkammer gezählt. Ein Volumen von 10^7 Zellen der entsprechenden Zellreihen wurde im Verhältnis 1+1, Zellkulturmedium: Matrigel, resuspendiert. Bis zur Injektion der Tumorzellen wurde die Suspension auf Eis gelagert. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte subkutan in die rechte Flanke aller 30 Nacktmäuse.

2.5.3 Messung des Tumorwachstums

Das Tumolvolumen (TV) wurde mittels eines digitalen Messschiebers bestimmt. Bestimmt wurde bei jeder Messung der Längsdurchmesser (a) im rechten Winkel zum größten Breitendurchmesser (b). Zur Berechnung des Tumolvolumens wurde nachstehende von NOH ET AL. 2003 verwendet.

$$TV = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{1}{2} \times b\right)^2 \times \frac{1}{2} \times a$$

Formel 2: Berechnung des Tumolvolumens (NOH ET AL. 2003)

2.5.4 Versuchsaufbau und Injektionsschemata

Nach 2-3 Wochen erreichte das Tumolvolumen 80 mm^3 . Dieses definierte Tumolvolumen terminierte den Beginn der Therapie und den Injektionstag 0. Somit wurde nach Erreichen eines bestimmten Tumolvolumens von 80 mm^3 mit dem unten folgenden Injektionsschema zu unterschiedlichen Zeiten begonnen. Jeweils fünf Versuchstieren wurden intraperitoneal entsprechend des unten aufgeführten Schemas an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 Doxorubicin, AEZS-108 (AN-152) oder eine Kontrolllösung injiziert (Injektionsvolumen $100 \mu\text{l}$). Das Tumolvolumen wurde an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 und 15 gemessen.

Gruppe1 (n=5)	Kontrolle (physiologische Kochsalzlösung= NaCl 0,9%)
Gruppe 2 (n=5)	60 nmol/20g Doxorubicin
Gruppe 3 (n=5)	60 nmol/20g AESZ-108 (AN-152)

Nach 15 Tagen oder bei Auftreten im Tierversuchsantrag klar definierter Abbruchkriterien wurden die Nacktmäuse durch eine Inhalationsnarkose mit CO_2 betäubt und anschließend durch einen Genickbruch getötet.

3 Ergebnisse

3.1 GnRH-I-Rezeptor-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien

3.1.1 Nachweis der GnRH-I-Rezeptor-Expression durch RT-PCR

In den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Aspc-1, MIAPaCa-2 und Panc-1 (vgl. 2.3.1, S.26ff) konnte der GnRH-I-Rezeptor durch reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen werden (Abb.3). Der Nachweis von L7 diente hierbei als Kontrolle. L7 kodiert ein ribosomales Protein und diente als sog. *Housekeeping-Gen* (HSIAO ET AL. 2001; KO ET AL. 2006).

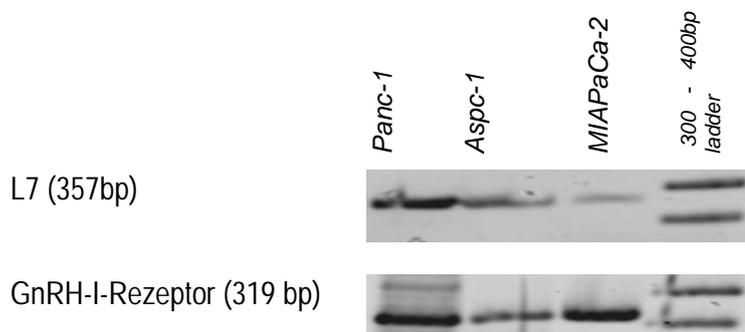


Abbildung 3: GnRH-I Rezeptor Expression in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, Aspc-1 und MIAPaCa-2

3.1.2 Immunhistochemischer Nachweis der GnRH-I-Rezeptor-Expression

Immunhistochemisch wurden 40 humane Pankreaskarzinomgewebeschnitte und 10 gesunde Pankreasgewebeschnitte untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass 32,5% (n= 13) der kanzerösen Gewebe den GnRH-I-Rezeptor exprimierten. Dahingegen wurden keine Antigene des GnRH-I-Rezeptors in gesunden Pankreasgewebe nachgewiesen (vgl. Tab. 15).

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Affinität spezifisch ausgewählter Antikörper zu einem Epitop. Nach erfolgter Antigen-Antikörperreaktion und der Kopplung an ein entsprechendes Detektionssystem wird das Epitop sichtbar gemacht (S.30 der vorliegenden Arbeit).

Die finale Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung färbt die nukleären Zellstrukturen dunkelblau bis violett und das Zytoplasma rosa (S. 31 der vorliegenden Arbeit). Durch das anschließende Aufkochen der Präparate mit Citratpuffer bei saurem pH-Wert wurden im Zellkern befindlichen Antigene demaskiert.

GnRH-Rezeptoren sind in der Membran und im Zytoplasma zu finden, da der Rezeptor nach Aktivierung internalisiert wird (D,2). Man findet auch Kernfärbungen, da der Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zu finden ist (D,3), s. 1.2.3, Abb. 2 auf S.10f der vorliegenden Arbeit, die diese Internalisierungsprozess beschreibt. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen von Normalgewebe des Pankreas (A), GnRH negatives Adenokarzinom des Pankreas (B), GnRH-R positives Adenokarzinom des Pankreas (C) sowie in (D) einen vergrößerten Ausschnitt von (C). (C) 1= GnRH-negative Zelle, 2= GnRH-positive Zelle (Membran und Zytoplasma), 3= GnRH-positive Zelle (auch Zellkern gefärbt).

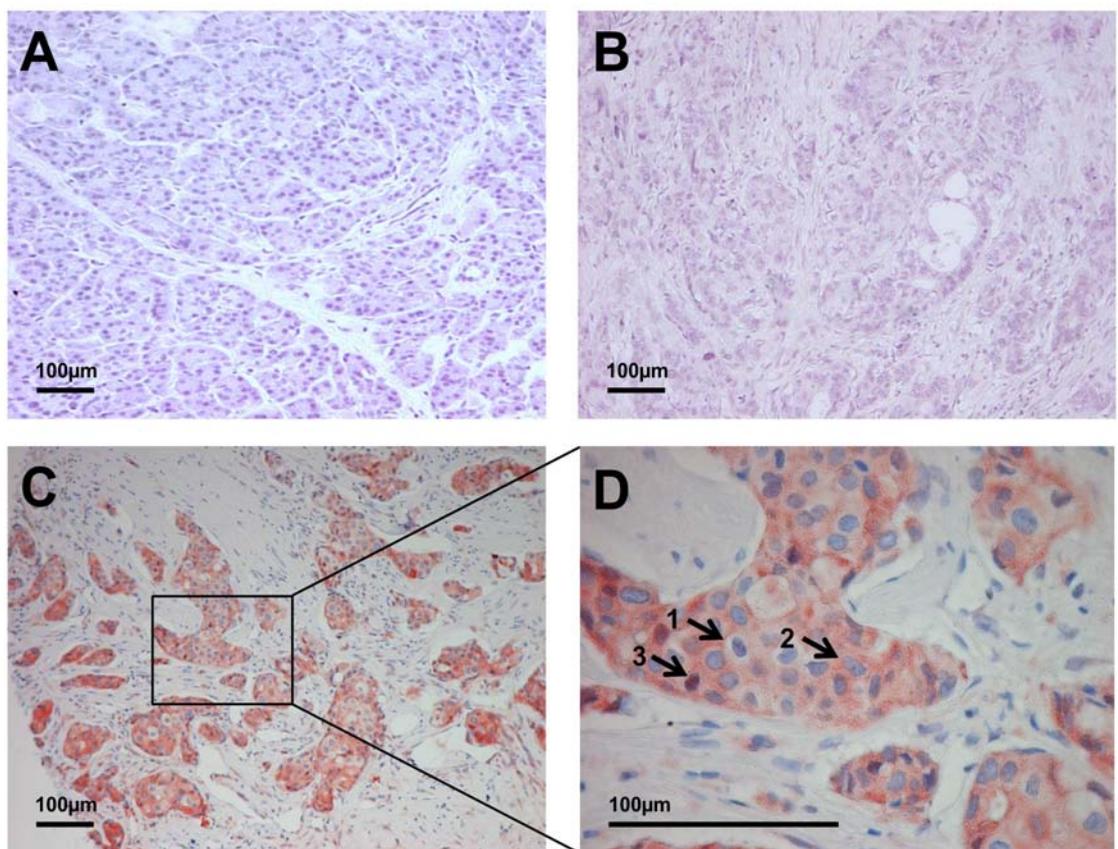


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Olympus IX 51, Olympus Hamburg) (A) Normalgewebe, (B) Adenokarzinom des Pankreas GnRH-R negativ, (C) Adenokarzinom des Pankreas GnRH-R positiv, (D) Ausschnitt von C; 1= negative Zelle, 2= positive Zelle (Membran und Zytoplasma), 3= positive Zelle (auch Zellkern gefärbt); GnRH-Rezeptoren sind in der Membran und im Zytoplasma zu finden, da der Rezeptor nach Aktivierung internalisiert wird. Man findet auch Kernfärbungen, da der Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zu finden ist, s. 1.2.3, Abb. 2 auf S.10f der vorliegenden Arbeit; Eigenschaften der histologischen Präparate, siehe Tabelle 15.

Nr.	Geschlecht	Alter	Pathologische Diagnose	Differenzierungsgrad	Stadium	TNM	GNRH-I Rezeptor
1	M	65	Adenokarzinom	2	III	T3N1M0	NEIN
2	M	52	Adenokarzinom	1	III	T3N1M0	JA
3	F	45	Adenokarzinom	2	III	T3N1M0	NEIN
4	M	44	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
5	M	47	Adenokarzinom (verstreut)	1	II	T3N0M0	NEIN
6	M	55	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	JA
7	M	57	Adenokarzinom (verstreut) mit Nekrosen	2	II	T3N0M0	NEIN
8	M	34	Adenokarzinom	1	II	T3N0M0	JA
9	F	56	Adenokarzinom	1	III	T3N1M0	NEIN
10	M	42	Adenokarzinom	1	IV	T2N0M1	JA
11	F	39	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	JA
12	M	44	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
13	M	59	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
14	M	65	Adenokarzinom (fettig-fibrös)	-	II	T3N0M0	NEIN
15	F	67	Adenokarzinom (chronische Entzündung des Pankreasgewebes)	-	II	T3N0M0	NEIN
16	M	53	Adenokarzinom	1	II	T3N0M0	JA
17	M	52	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
18	F	72	Adenokarzinom	1	II	T3N0M0	NEIN
19	F	58	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	JA
20	M	41	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
21	M	51	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	JA
22	M	41	Adenokarzinom (verstreut)	-	II	T3N0M0	NEIN
23	F	68	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
24	F	41	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
25	F	72	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	JA
26	F	76	Adenokarzinom mit Nekrosen	2	III	T4N0M0	JA
27	M	52	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
28	F	60	Adenokarzinom	2	III	T4N0M0	NEIN
29	M	76	Adenokarzinom (verstreut)	2	II	T3N0M0	NEIN
30	M	78	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
31	M	41	Adenokarzinom	2	III	T4N1M0	NEIN
32	F	62	Adenokarzinom	3	II	T3N0M0	NEIN
33	M	51	Adenokarzinom (verstreut)	-	II	T3N0M0	NEIN
34	M	50	Adenokarzinom	3	III	T3N1bM0	JA
35	M	60	Adenokarzinom	2	III	T3N1M0	NEIN
36	F	53	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
37	M	59	Adenokarzinom	2	II	T3N0M0	NEIN
38	M	56	Adenokarzinom	3	III	T2N1bM0	JA
39	F	60	Adenokarzinom	3	IV	T2N1M1	JA
40	F	66	Adenokarzinom (Fettgewebe und Blutgefäße)	-	II	T3N0M0	NEIN
41	M	40	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
42	M	47	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
43	M	25	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
44	F	35	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
45	M	30	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
46	M	50	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
47	M	30	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
48	M	40	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
49	M	35	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN
50	F	21	Normales Pankreasgewebe	-	-	-	NEIN

Tabelle 15:GnRH-I-Rezeptor-Expression, humane Pankreas(-Karzinom) Gewebe, Paraffinschnitte, US Biomax, Rockville MD, USA nach UICC-Klassifikation, vgl. Anhang.

3.2 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf die Zellproliferation der Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Zur Analyse der Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Proliferationsverhalten der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 wurden diese 5 Tage lang mit aufsteigenden Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-5} M) des Pharmakons behandelt (vgl. Kapitel 2.2.7). Die untersuchten Konzentrationen von AESZ-108 (AN-152) zeigten eine dosisabhängige signifikante Inhibition des Wachstums der Pankreaskarzinomzelllinien.

Dabei konnte in der Behandlung von MIAPaCa-2 (Abb. 5A) und Panc-1 (Abb. 5B) mit 10^{-11} und 10^{-9} M AESZ-108 (AN-152) keine signifikante Reduktion der Zellzahlen gezeigt werden. 10^{-7} M Konzentrationen AESZ-108 (AN-152) reduzierten die Zellzahl gegenüber der Kontrolle (MIAPaCa: $74,45 \pm 5,65\%$ vs. 100% , $p < 0,001$; Panc-1: $87,00 \pm 2,04\%$ vs. 100% $p < 0,001$). Das Maximum an Wirkungsgrad wurde nach der Behandlung mit 10^{-5} M AESZ-108 (AN-152) sowohl auf das Wachstum der Pankreaszellkarzinomlinie MIAPaCa-2 als auch Panc-1, verglichen zur Zellanzahl der unbehandelten Kontroll-Zellpopulation (MIAPaCa-2: $15,39 \pm 1,89\%$, $p < 0,001$; Panc-1: $19,77 \pm 1,78\%$, $p < 0,001$), gemessen.

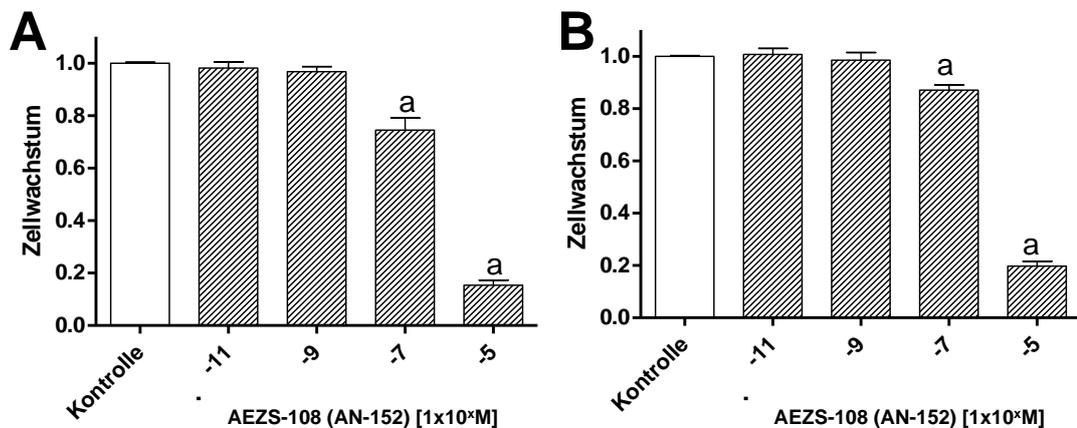


Abbildung 5: Untersuchung der Zellproliferation (alamarBlue® abD Serotec, Düsseldorf) der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 (A) und Panc-1 (B) *in vitro* nach dosisabhängiger Behandlung aufsteigender Konzentrationen des zytotoxischen GnRH-Analogons AESZ-108 (AN-152). Die Anzahl der vitalen Zellen ist als Prozentanteil, verglichen mit der unbehandelten Kontrollpassage, (100%) dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm den Standardfehler dar, a= $p < 0,001$.

3.3 Untersuchung der Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf den Apoptoseprozess *in vitro*

3.3.1 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das mitochondriale Membranpotential der Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Die Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 mit AESZ-108 (AN-152) in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-7} M) für eine Inkubationszeit von 72h reduzierte das Membranpotential $[\Delta\Psi]$ beider untersuchter Pankreaskarzinomzelllinien (Abb. 6A und 6B).

Verglichen mit der unbehandelten Zellpopulation führten die Behandlung mit 10^{-9} M AESZ-108 (AN-152) von MIA-PaCa-2 und von Panc-1 zu einem signifikanten Zusammenbruch des Membranpotentials ($77,92\pm 1,75\%$ und $81,94\pm 2,27\%$ vs. 100%, $p < 0,001$).

Eine weitere signifikante Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials konnte bei der Behandlung dieser Pankreaskarzinomzelllinien mit 10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) gemessen werden. Verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe wurde eine Reduktion des Membranpotentials auf korrespondierende $70,00\pm 1,43\%$ für die humane Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 und $73,48\pm 2,33\%$ für Panc-1 mittels des JC-1 Apoptose-Assays detektiert. Für beide Messungen gilt $p < 0,001$.

Ein maximaler Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials als frühes Zeichen der Apoptoseinduktion wurde in der Behandlung der pankreatikokarzinomatösen Zelllinien mit 10^{-5} M AESZ-108 (AN-152) gemessen. Dies entsprach korrespondierenden Werten des Membranpotentials in Höhe von $49,17\pm 1,18\%$, $p < 0,001$ für MIAPaca-2 und $51,40\pm 1,64\%$, $p < 0,001$ für Panc-1.

3.3.2 Die Wirkung von AESZ (AN-152) auf die DNA-Fragmentation der humanen Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Die Ergebnisse des TUNEL-Assays (vgl. Kapitel 2.2.8.2) bestätigten die apoptoseinduzierende Wirkung von AESZ-108 (AN-152) durch fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der DNA-Fragmentation als spätes Zeichen der Apoptose. Die Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 in einer Konzentration von 2×10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) für 36 h führte zu einer signifikanten Anzahl apoptotischer Zellen. Der Zuwachs an apoptotischen Zellen der Pankreaskarzinomzellen MIAPaCa-2 (Abb.6C) und Panc-1 (Abb.6D) stellt sich als grün fluoreszierend, im Vergleich zu den rot fluoreszierenden vitalen Zellen dar.

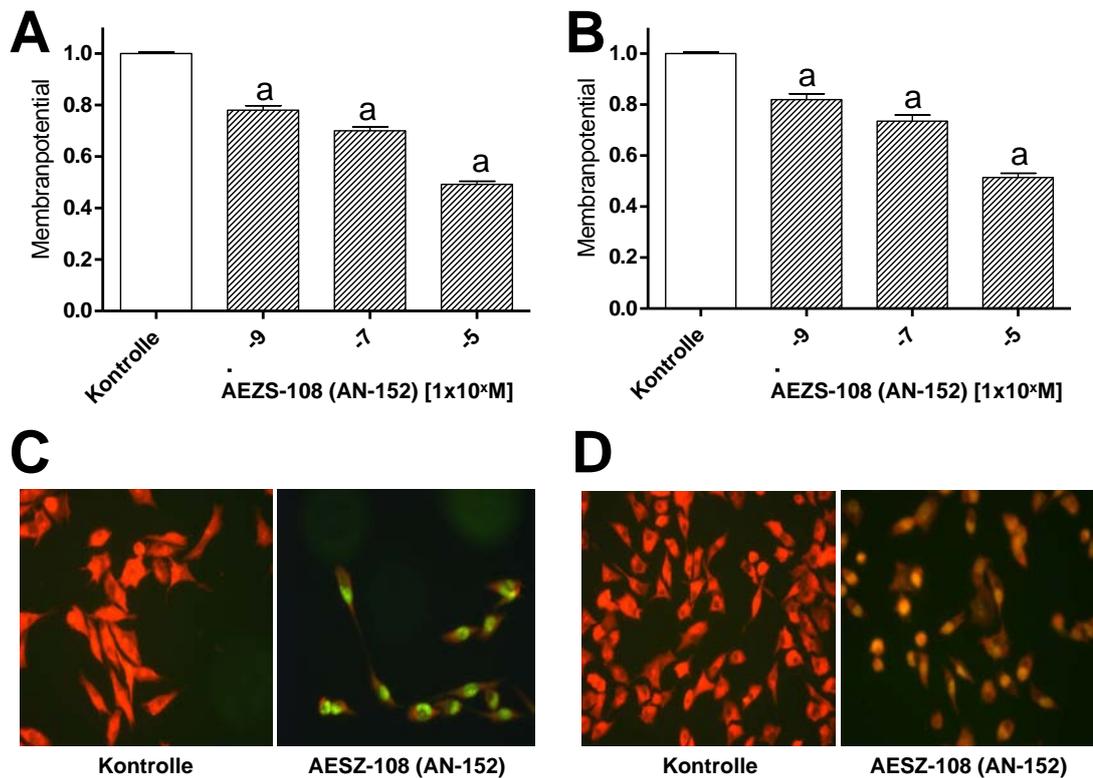


Abbildung 6: Wirkung von AESZ (AN-152) auf den Apoptoseprozess der humanen Pankreaskarzinomzellen MIAPaCa-2 (A,C) und Panc-1 (B, D). Im Säulendiagramm die Wirkung aufsteigender Dosen des zytotoxischen GnRH- Analogons AESZ-108 (AN-152) nach 72h Inkubationsdauer auf das mitochondriale Membranpotential als Zeichen der Induktion des Apoptoseprozesses [$\Delta\Psi$]: MIAPaCa-2(A) und Panc-1(B) im Vgl. zur unbehandelten Kontrolle (=100%). Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines Quartetts der beschriebenen Versuchsreihe mit vier verschiedenen Zellpassagen der entsprechenden Zelllinie, $a=p<0.001$. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die DNA-Fragmentation als grün fluoreszierende 3'OH-Enden und visualisieren die Strangbrüche im Rahmen des späten Apoptoseprozesses. Aufnahmen nach 36 h Behandlung mit AESZ-108 (AN-152; $c=10^{-7}M$) MIAPaCa-2 (C) und Panc-1 (D) im Vgl. zur Kontrolle, unbehandelte vitale rot fluoreszierende Zellen.

3.4 Die Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 *in vivo*

Um den Wirkungsgrad des targeted Chemotherapeutikums AESZ-108 (AN-152) *in vivo* zu untersuchen, wurden weiblichen CD1-Nacktmäusen die heterogenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 und Panc-1 subkutan transplantiert (vgl. Kapitel 2.5). Nachdem ein Tumolvolumen von $80mm^3$ (Tag 0) erreicht worden war, erfolgte die intraperitoneale Injektion physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) (*Kontrollgruppe*, $n=5$), des Anthrazyklins Doxorubicin ($n=5$) oder des targeted Chemotherapeutikums AESZ-108 (AN-152) ($n=5$) in einer Konzentration von 60nmol/20g an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12. Die Messung des Tumolvolumens erfolgte alle drei Tage bis zum Tag 15. An Tag 15 wurden die Versuchstiere tierschutzgerecht

getötet wurden. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden keine mit der Behandlung verbundenen Nebenwirkungen für die Versuchstiere beobachtet.

3.4.1 Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIAPaCa-2

Ab Tag 9 der Versuchsreihe wurde das Tumolvolumen unter der Behandlung mit dem targeted Chemotherapeutikum AESZ-108 (AN-152) gegenüber der Kontrollgruppe messbar geschwächt ($194.1 \pm 6.5\%$ (AN-152) vs. $287.8 \pm 43.4\%$ (Kontrolle), vgl. zum Ausgangsvolumen=100%). Ebenso gilt dies im Vergleich der mit Doxorubicin behandelten Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($255.7 \pm 16.9\%$ (DOX) vs. $287.8 \pm 43.4\%$ (Kontrolle) vgl. zum Ausgangsvolumen=100%).

Statistisch signifikante Hemmung ($p < 0.05$) des Tumorwachstums wurde nach 5 Injektionen AESZ-108 (AN-152) an Tag 12 der Versuchsreihe erreicht. Nach Beendigung der Injektionstherapie an Tag 15 der Versuchsreihe betrug das Tumolvolumen der mit AESZ-108 (AN-152) behandelten Versuchsgruppe nur die Hälfte des Tumolvolumens der unbehandelten Versuchsgruppe verglichen zum jeweiligen initialen Tumolvolumen ($415.2 \pm 57.0\%$ (AN-152) vs. $891.2 \pm 131.2\%$ (Kontrolle), $p < 0.01$).

Eine wesentlich geringere Wachstumshemmung ohne Erreichen statistischer Signifikanz wurde am Ende der Versuchsreihe unter der Behandlung mit Doxorubicin im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen ($748.8 \pm 69.9\%$ (DOX) vs. $891.2 \pm 131.2\%$ (Kontrolle), $p > 0.05$) (Abb.7A).

3.4.2 Wirkung von AESZ-108 (AN-2) auf das Tumorwachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1

Messbare Hemmung des Tumorwachstums wurde bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 ebenso an Tag 9 im Rahmen der 4. Messung des Tumolvolumens detektiert ($201.5 \pm 11.9\%$ (AN-152) vs. $220.3 \pm 30.9\%$ (DOX) vs. $257.5 \pm 4.1\%$ (Kontrolle), $p > 0.05$).

Verglichen wurde auch hier der Zuwachs in [%] gegenüber der jeweiligen initialen Tumorumfängen der Kontrollgruppe und der mit AESZ-108 (AN-152) und Doxorubicin (DOX) behandelten Versuchsgruppen ($n=5$), bei gleichem Versuchsaufbau und Durchführung.

Im weiteren Verlauf der Injektionsbehandlung erreichten die Ergebnisse an Tag 15 eine statistisch signifikante Hemmung des Tumorwachstums in der mit AESZ-108 (AN-152) behandelten Versuchsgruppe. Am Ende der Versuchsreihe (Tag 15) betrug der Zuwachs an Tumolvolumen der mit

AESZ-108 (AN-152) behandelten Versuchsgruppe die Hälfte des Tumolvolumens der unbehandelten Kontrollgruppe ($393.7 \pm 34.2\%$ (AN-152) vs. $790.5 \pm 137.3\%$ (Kontrolle), $p < 0.05$). Eine wachstumshemmende, jedoch statistisch nicht signifikante Wirkung auf Panc-1 wurde mit Doxorubicin erzielt ($627.0 \pm 103.5\%$ (DOX) vs. $790.5 \pm 137.3\%$ (Kontrolle)), (Abb.7B).

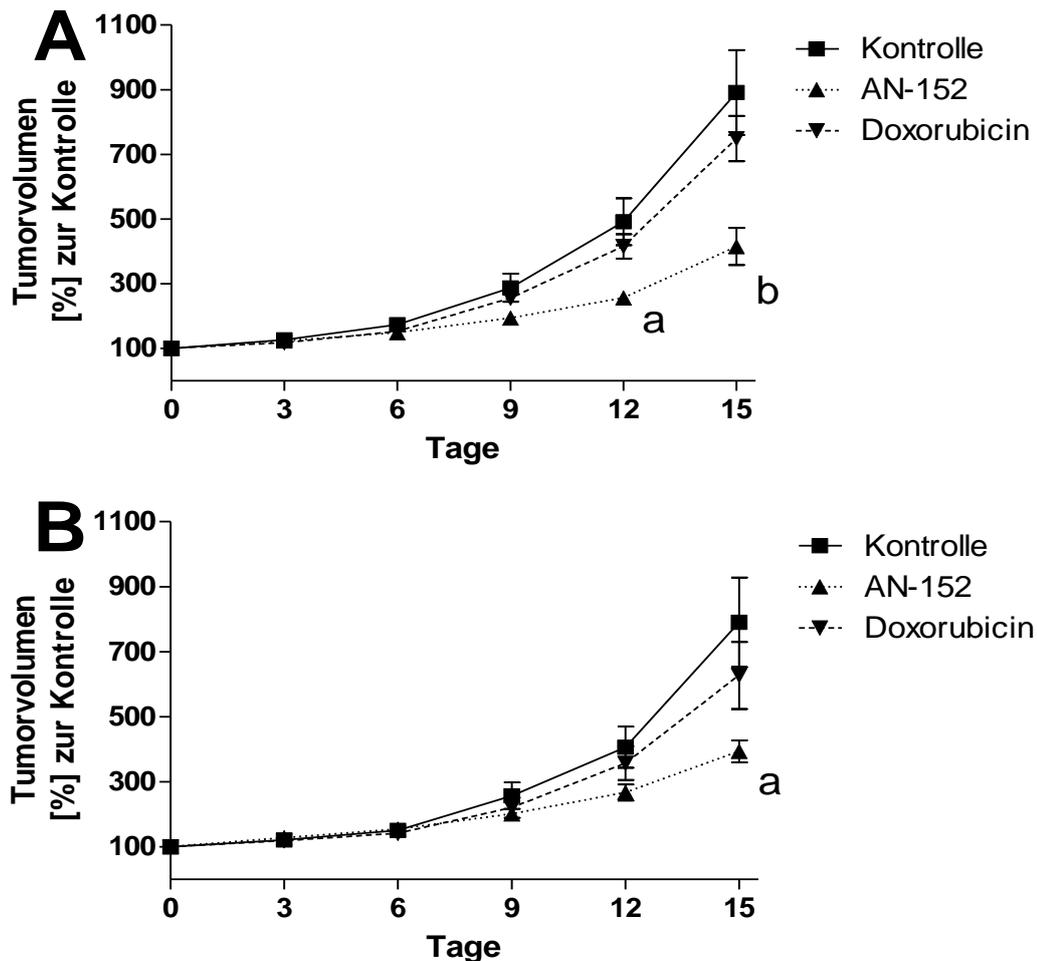


Abbildung 7: Entwicklung des Tumolvolumens nach Xenotransplantation der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIAPaCa-2 (7A) und Panc-1 (7B) in Nacktmäuse; Behandlung der verschiedenen Versuchstiergruppen mit 60nmol/20g AESZ-108 (AN-152) (n=5), Doxorubicin (n=5) oder physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl)(Kontrollgruppe,n=5). Beobachtungszeitraum und Versuchsdauer: 15 Tage; Messung des Tumolvolumens erfolgte an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 und 15; Injektionen an den Tagen 0, 3, 6, 9 und 12. Die vertikalen Balken stellen den Mittelwert und Standardfehler der entsprechenden Versuchsgruppe dar. a= $p < 0.05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe und b= $p < 0.01$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. Verglichen wurde der Zuwachs in [%] der jeweiligen initialen Tumolvolumina der Kontrollgruppe gegenüber der mit AESZ-108 (AN-152), (n=5) und Doxorubicin (DOX), (n=5) behandelten Versuchstiergruppen.

4 Diskussion

Die niedrige Überlebensrate trotz tumorrandfreier Resektion im Frühstadium, die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber systemischen Chemotherapien und die therapielimitierenden Nebenwirkungen der aktuell empfohlenen gemcitabinbasierten systemischen Chemotherapie sind der Antrieb in der Entwicklung neuer Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms.

GnRH-I-Rezeptor vermittelte Chemotherapie ist ein hocheffizienter und – spezifischer Mechanismus um selektiv das Tumorgewebe zu schädigen, gesunde Zellen zu schonen und somit gleichzeitig Nebenwirkungen zu vermindern. Grundlegend für den Erfolg und die Selektivität der rezeptorvermittelten Chemotherapie, sind die biologischen Unterschiede gesunder und kanzeröser Zellen. In der GnRH-I-Rezeptor vermittelten Chemotherapie bedeutet dies die tumorspezifische Expression des GnRH-I-Rezeptors (VGL. 1.2.5).

Durch die selektive Expression des GnRH-I-Rezeptors in Karzinomzellen des Pankreas (VGL. 1.2.2) stellt die Behandlung mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152) eine neue, rezeptorvermittelte Therapiemöglichkeit dar.

4.1 GnRH-I-Rezeptor-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Im Rahmen der Recherche der vorliegenden Arbeit erschien vor nunmehr 30 Jahren eine Arbeit von SANDBERG & ROSENTHAL (1979), die erstmals die Expression von Steroidrezeptoren in exokrinen Drüsen des Pankreas und der Prostata beschrieb.

Eine Arbeitsgruppe, in der auch Schally involviert war, wies erstmals GnRH-I-Rezeptoren sowohl in humanem Pankreasgewebe von Patienten (n=3) als auch Pankreasgewebe von Goldhamstern nach (FEKETE ET AL. 1989). 1990 zeigten FRIESS ET AL. die Expression von GnRH-I-Rezeptoren in humanem Pankreaskarzinomgewebe. Sie untersuchten die Expression von GnRH-I-Rezeptoren in Gewebeproben von gesundem Pankreasgewebe (n=11), Patienten mit chronischer Pankreatitis (n=15) und in Proben, die im Rahmen der chirurgischen Resektion des duktales Pankreaskarzinoms von 23 Patienten gewonnen wurden (UICC-Klassifikation: I (n=7), II (n=10), III (n=6); Grade 2 (n=19), Grade 3 (n=4)).

Eine Konzentration der GnRH-I-Rezeptor-Membranproteine nach Bradford >3 fmol/mg wurde in jener Arbeit als GnRH-I-positiv gewertet. Die Untersuchungen ergaben, dass in einer Biopsie des gesunden Pankreasgewebes ($n=1/11(9\%)$, $c(\text{GnRH-I-R}) \approx 10$ fmol/mg), in 10 Biopsien chronischer Pankreatitis ($n=10/15$ (67%), $c(\text{GnRH-I-R}) = 10,6 \pm 2,1$ fmol/mg) und in 13 Biopsien des duktales Pankreaskarzinoms (13/23 (57%), $c(\text{GnRH-I-R}) = 11,7 \pm 1,9$ fmol/mg) der GnRH-I-Rezeptor exprimiert wurde.

Um eine rezeptorvermittelte Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, galt es zunächst, die Expression des GnRH-I-Rezeptors in den humanen *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Versuchsreihen verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien (MiaPaCa-2 und Panc-1) zu überprüfen, additiv erfolgte der immunhistochemische Nachweis in Gewebeschnitten humaner pankreatischer Adenokarzinome ($n=40$) und zur Kontrolle in 10 Gewebeschnitten gesunden Pankreasgewebes ($n=10$, vgl. 2.4; 3.1.2 ;Tab.14,15).

Mittels RT-PCR konnte die Expression des GnRH-I-Rezeptors der in *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Versuchsreihen eingesetzten humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 bestätigt werden (Abb.3). Dies ist ebenso gültig für die humane Pankreaskarzinomzelllinie Aspc-1 (vgl. Kap. 2.1.10, Tab.7 sowie Abb.3).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der in Paraffin gebetteten aufbereiteten Gewebeschnitte zeigten, dass 32,5% der pankreatikokarzinomatösen Gewebeproben den GnRH-I-Rezeptor exprimieren. Keines der immunhistochemisch untersuchten gesunden Pankreasgewebesschnitte der vorliegenden Arbeit exprimierte den GnRH-I-Rezeptor (Tab. 15).

Diese Ergebnisse waren grundlegend, um nach geprüfter selektiver Expression die selektive Wirkung der rezeptorvermittelten Aufnahme des zytotoxischen GnRH-Analogons AESZ-108 (AN-152) zu untersuchen.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wiesen GnRH-I-Rezeptoren in einer Vielzahl unterschiedlicher kanzeröser Zelllinien und Gewebeproben vor allem in Organen des Reproduktionstraktes nach. Die Ergebnisse unterschiedlicher Rezeptornachweismethoden ergaben, dass 50% der Mammakarzinome, 80% der Endometrium-, 80% der Ovarialzell- (EMONS & SCHALLY 1994) und 86% der Prostatakarzinome (HALMOS ET AL. 2000) den GnRH-I-Rezeptor exprimieren.

Neben der Untersuchung der Expression des GnRH-I-Rezeptors hat die Rezeptordichte vermutlich ebenso einen Einfluss auf die Effektivität der

rezeptorvermittelten Therapie. So zeigten die ersten Ergebnisse in der klinischen Anwendung von AESZ-108 (AN-152) (Phase-I-Studie) bei fortgeschrittenen Endometrium-, Mamma- und Ovarialzellkarzinom eine dosisabhängige Remission der Tumore (n=17), vor allem in Tumoren (n=3), deren Großteil an Zellen (90, 80 und 60%) einen GnRH-I-Rezeptor exprimieren. Eine Remission konnte aber auch in 2 Fällen, in denen nur 20-30% der Zellen einen GNRH-I-Rezeptor exprimieren, gezeigt werden (EMONS ET AL. 2010).

SZEPESHAZI ET AL. (2012) zeigten unterschiedliche Rezeptordichten des GnRH-I-Rezeptors in 18 immunhistochemisch untersuchten Harnblasenkarzinomen. 3 Proben exprimierten stark den GnRH-I-Rezeptor in 2 Proben wurde er nur schwach exprimiert und in 13 Proben lag die Expression quantitativ im mittleren Bereich. Die Expressionsdichte innerhalb einer Probe zeigte teilweise ein sehr heterogenes Expressionsmuster. Der Einfluss der GnRH-I Rezeptordichte auf die Effektivität dieser in GnRH-I positiven Pankreaskarzinomzelllinien wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Ein weiterer Vorteil der GnRH-I basierten Chemotherapie ist die Selektivität dieses rezeptorvermittelten Therapieregimes. Der Hybridwirkstoffes hatte keinen Einfluss auf das Tumorwachstum der GnRH-I-Rezeptor negativen Ovarialzellkarzinomzelllinie SK-OV-3 (WESTPHALEN ET AL. 2000) und der GnRH-I Rezeptor negativen Mammakarzinomzelllinie UCI-107 (KREBS ET AL. 2000).

WESTPHALEN ET AL. 2000 gelang es durch konfokales Laserscanning den Internalisierungsprozess von AESZ-108 (AN-152) darzustellen. So wird AESZ-108 (AN-152) durch GnRH-I-Rezeptor-vermittelte Endozytose selektiv internalisiert und intranukleär angereichert. Bestätigt wurde dieser selektive rezeptorvermittelte Internalisationsmechanismus durch Radioligandenbindungsstudien (HALMOS ET AL. 1999) und 2-Photonen-Laser-Scanning Mikroskopie (WANG ET AL. 1999, KREBS ET AL. 2000). Die daraus resultierende selektive Wirkung auf rezeptorpositive Karzinomzellen vermindert die Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Chemotherapie zu beobachten sind.

Der Vorteil des rezeptorvermittelten Internalisierungsmechanismus ist neben Selektivität und Verminderung systemischer Nebenwirkungen auch die Überwindung der Multi-Wirkstoff Resistenz (MDR-1).

Besonders das Pankreaskarzinom zeigt ausgeprägte Chemoresistenz. Der Mechanismus der MDR ist multifaktoriell und wird oft nach initialer Therapie mit Anthrazyklinen beobachtet (BOOSER & HORTOBAGYI 1999). GÜNTHER ET AL. (2004A,B) zeigten, dass die Expression einer MDR-1 charakteristischen Efflux-Pumpe (170.000Da Glykoprotein) und mit ihr assoziierter phosphorylierter Glukoproteine (Pgp) in der Behandlung mit AESZ-108 (AN-

152) (Endometrium- und Ovarialzellkarzinom) im Vergleich zur Versuchsgruppe, die mit Doxorubicin behandelt wurde, deutlich geringer ist. Somit ist im Rahmen der AESZ-108 (AN-152)- Behandlung keine primäre oder sekundäre Chemoresistenz zu erwarten.

Bei schon bestehender Chemoresistenz der Karzinomzellen gegenüber Doxorubicin ist die erfolgreiche Therapie aufgrund der rezeptorvermittelten Endozytose von AESZ-108 (AN-152) dennoch effektiv (GÜNTHER ET AL. 2004A,B). Diese Ergebnisse sind besonders vielversprechend in der Behandlung des chemoresistenten Pankreaskarzinoms.

Die Untersuchungen der Expression des GnRH-I-Rezeptors in dieser Arbeiten zeigen, dass 32,5% der untersuchten Pankreaskarzinomgewebes den GnRH-I-Rezeptor exprimieren (vgl. 3.1.2, Tab.15). Um somit die Ergebnisse der vorherigen Abschnitte zusammenzufassen, eignet sich ein Drittel der Pankreaskarzinome zur selektiven rezeptorvermittelten Chemotherapie mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152).

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit weiterer in anderen Tumorentitäten gewonnenen Ergebnisse auf das duktales Pankreaskarzinom sind weitere Untersuchungen notwendig. So z.B. die Überprüfung des Internalisierungsprozesses des targeted Chemotherapeutikum und die Expression der von GÜNTHER ET AL. (2004A,B) beschriebenen Efflux-Pumpe in Pankreaskarzinomzellen.

4.2 Inhibition des Tumorwachstums der Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Mithilfe des verwendeten Proliferationsassays (vgl. 2.2.7) wurde in dieser Arbeit die dosisabhängige Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) auf die Vitalität der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 untersucht.

Die fluoreszenzspektrometrische Messung zeigte nach 5-tägiger Inkubation der humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 mit 10^{-11} und 10^{-9} M AESZ-108 (AN-152) keine Reduktion der Zellzahl oder Inhibition des Zellwachstums. Behandlungen der Pankreaskarzinomzelllinien ab einer Konzentration 10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Ein maximaler zytoreduktiver Effekt um mehr als 80% wurde nach der Behandlung mit 10^{-5} M AESZ-108 (AN-152) erzielt (vgl. Kap. 3.2, Abb. 5).

In dieser Arbeit konnte mit der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt werden, dass der Hybridwirkstoff AESZ-

108 (AN-152) eine dosisabhängige zellreduktive Wirkung auf die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 hat.

In einem 2011 erschienen Review stellen SCHALLY ET AL. anschaulich die Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) in verschiedenen Tumorentitäten einander gegenüber. Zellreduktive Effekte des Hybridwirkstoffes *in vitro* wurden für das GnRH-I-Rezeptor positive Prostatakarzinom, das Mammakarzinom, das Ovarialzellkarzinom, das Endometriumkarzinom, das Urothelkarzinom der Blase, das kolorektale Karzinom und das Mundhöhlen- und Larynxkarzinom gezeigt.

FÖST ET AL. (2011) und REUTTER ET AL. (2013) untersuchten ebenso mithilfe des alamarBlue® Proliferationsassays die Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) auf das Proliferationsverhalten humaner triple-negativer Mammakarzinomzellen (HCC-1806, HCC-1937) bzw. humaner Endometrium- (AN3CA, HEC-1-A) und Ovarialzellkarzinomzelllinien (EFO-21, NIH:OVAR-3).

Die o.g. Arbeiten zeigten eine Zellzahlreduktion für AN3CA bei Behandlung mit 10^{-9} M AESZ-108 (AN-152). Eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl der anderen o.g. humanen Karzinomzelllinien konnte ab einer Konzentration in Höhe von 10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) fluoreszenzspektrometrisch gemessen werden. Maximale zytoreduktive Effekte wurden nach der Behandlung mit 10^{-5} M AESZ-108 (AN-152) erzielt.

Bei Betrachtung der einzelnen Werte in den vergleichbaren Untersuchungen der beiden o.g. Arbeiten mit den hier ermittelten Ergebnissen, wurde bei äquivalenten Dosen AESZ-108 (AN-152), eine vergleichbare Reduktion der Zellzahl triple-negativer Mamma- und Ovarialkarzinomzellen gemessen.

Zusammenfassend ist die gemessene zytoreduktive Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) auf humane Pankreaskarzinomzelllinien vergleichbar zu Ergebnissen in anderen Tumorentitäten (SCHALLY ET AL. 2011, TAB.2, S.13).

4.3 AESZ-108 (AN-152)-induzierte Apoptose in GnRH-I-Rezeptor positiven Pankreaskarzinomzelllinien

Um die Ätiologie der in dieser Arbeit gemessenen verminderten Zellzahl durch Apoptose gegenüber einem antiproliferativen Effekt abzugrenzen, wurde zur qualitativen Detektion einer Apoptose-Induktion ein DeadEnd Colorimetric TUNEL-Assay durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.8.2). Zur quantitativen Erfassung der Apoptose wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als frühes Zeichen der Apoptose durch den JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay an den humanen

Pankreaskarzinomzellen MiaPaCa-2 und Panc-1 gemessen (vgl. Kap. 2.2.8.1).

Die Behandlung beider humaner Pankreaskarzinomzelllinien mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152) führte zu einem statistisch signifikanten Verlust des Membranpotentials. Diese Beobachtung gilt für alle geprüften Konzentrationen des Hybridwirkstoffes. Dabei führte die Inkubation für 72 h mit 10^{-9} M AESZ-108 (AN-152) zu einer 10%-igen, mit einer 10^{-7} M Konzentration zu einer 25%-igen und die Inkubation mit 10^{-5} M Konzentration des Hybridwirkstoffes zu einer 50%-igen Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (vgl. Kap. 3.3.2, Abb. 6 A,B).

GÜNTHER ET AL. 2004B wiesen auch in GnRH-I-Rezeptor-positiven humanen Endometrium- und Ovarialzellkarzinomzelllinien Apoptoseinduktion nach 72 h Inkubation mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152) nach. Der statistisch signifikante Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollzellpopulation wurde in der Arbeit von GÜNTHER ET AL. 2004b durchflusszytometrisch gemessen.

Die Ergebnisse der Apoptosemessungen mithilfe des JC-1 Apoptoseassays von FÖST ET AL. (2011) und REUTTER ET AL. (2013) an den o.g. Tumorentitäten zeigten für die humanen Karzinomzelllinien einen statistisch signifikanten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials für HCC-1937, HEC-1-A, EFO-21 und NIH:OVCAR-3 nach 72 h Inkubation mit einer 10^{-9} M Konzentration AESZ-108 (AN-152). Für die humanen Karzinomzelllinien HCC-1806 und AN3-CA wurde eine statistisch signifikante Abnahme des Membranpotentials erst nach 72 h Inkubation mit dem Hybridwirkstoff in einer 10^{-7} M Konzentration gemessen.

Somit ist die in dieser Arbeit gemessene apoptoseinduzierende Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) auf die humanen Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* vergleichbar mit dem apoptoseinduzierenden Effekt des Hybridwirkstoffes auf andere Tumorentitäten.

Zur Visualisierung und als qualitativer Nachweis der späten Apoptose, zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der vorliegenden Arbeit nach 36 h Inkubation mit 10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) deutlich grün fluoreszierende freie 3'OH- Enden, die im Rahmen des Apoptoseprozesses durch Strangbrüche freigelegt wurden (vgl. Kap. 3.3.2, Abb. 6 C,D).

Auch Endometriumzelllinien (HEC-1-A) zeigten nach 48h Inkubation 10^{-7} M AESZ-108 (AN-152) vergleichbare, fluoreszenzmikroskopisch visualisierbare apoptotische Zellkernmorphologien (REUTTER ET AL. 2013).

In dieser Arbeit konnte qualitativ die apoptoseinduzierende Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) für die humanen Pankreaskarzinom-

zelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 nachgewiesen werden. Die quantifizierende Analyse der apoptotischen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte ein vergleichbares Wirkungsausmaß des Hybridwirkstoffes auf die Apoptoseinduktion der vorliegenden aggressiven Tumorentitäten zu den in anderer Arbeitsgruppen untersuchten Tumorentitäten.

4.4 Inhibition des Tumorwachstums durch AESZ-108 (AN-152) *in vivo*

Die Behandlung xenotransplanteder Nacktmäuse mit 60nmol/20g AESZ-108 (AN152) bzw. Doxorubicin pro Injektion zeigte eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums beider pankreatikokarzinomatöser xenotransplanteder Tumorzelllinien. Insgesamt betrug die Anzahl der Injektionen fünf. Sowohl MiaPaCa-2 als auch Panc-1 eigneten sich aufgrund des raschen und stetigen Wachstums gut für ein Tumormodell.

In der *In-vivo-Versuchsreihe* der vorliegenden Arbeit zeigte die humane Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 ein etwas aggressiveres Wachstum und erreichte im Vergleich zu Panc-1 schon 2 Wochen nach Injektion der Tumorzellen ein Tumolvolumen von 80 mm³. Auch wurde das Tumorwachstum der humanen xenotransplanteden Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 schon nach der vierten Injektion (Tag 12) statistisch signifikant inhibiert, das Tumorwachstum der humanen xenotransplanteden Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 erst nach fünf Injektionen (Tag 15).

In beiden Tiermodellen betrug das Tumolvolumen der mit AESZ-108 (AN-152) behandelten Nacktmäuse am Ende der Versuchsreihe gleichermaßen 50% des Tumolvolumens der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Behandlung der dritten Versuchsgruppe mit Doxorubicin inhibierte ebenso das Tumorwachstum, ohne jedoch statistisch signifikante Inhibition erzielen zu können (vgl. Kap. 3.4, Abb.7).

Ein direkter Vergleich ist aufgrund des vergleichbaren Versuchsaufbaus zu der Arbeit von FÖST ET AL. (2011) möglich. Diese Arbeit untersuchte die Wirkung des Hybridwirkstoffes AESZ-108 (AN-152) auf GnRH-I-Rezeptorpositive xenotransplantede triple-negative Mammakarzinomzelllinien (HCC-1806 und MDA-MB-231). FÖST ET AL. (2011) zeigten neben der inhibierenden Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das Tumorwachstum der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie eine statistisch signifikante Regression des Tumorwachstums. Eine Regression des Tumolvolumens in der Behandlung von AESZ-108 (AN-152) wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

In der o.g. Arbeit an triple-negativen Mammakarzinomen war eine Remission bereits nach der ersten Injektion des Hybridwirkstoffes zu messen.

Insgesamt reduzierte AESZ-108 (AN-152) das Tumolvolumen der triple-negativen Mammakarzinome am Ende der Versuchsreihe um mehr als 10% (HCC-1806). Unter Injektionstherapie mit Doxorubicin versiebenfachte sich in das Tumolvolumen der triple-negativen Mammakarzinome. Das Tumolvolumen der unbehandelten Kontrollgruppe vervierzehnfachte sich im Vergleich zum Ausgangstumolvolumen.

Das Tumolvolumen der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde am Ende der Versuchsreihe nach fünfmaliger Injektion mit AESZ-108 (AN-152) um mehr als 25% reduziert. Unter der Behandlung mit Doxorubicin verfünffachte sich beinahe das Tumolvolumen im Vergleich zum Ausgangsvolumen. Das Tumolvolumen der unbehandelten Kontrollgruppe verneunfachte sich während des Versuchszeitraums (FÖST ET AL. 2011).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit in der Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) keine Regression des Tumorwachstums erzielt wurde, so war die durch AESZ-108 (AN-152) erzielte Inhibition des Tumorwachstums der alleinigen Therapie mit Doxorubicin deutlich überlegen.

Dies wurde ebenso für das Prostatakarzinom (LETSCH ET AL. 2003), ein Doxorubicin resistentes Mammakarzinom (BAJO ET AL. 2003), Endometrium und Ovarialzellkarzinom (GRÜNDKER ET AL. 2002), das kolorektale Karzinom (SZEPEHAZI ET AL. 2007) und das Urothelkarzinom der Blase (SZEPEHAZI ET AL. 2012) in xenotransplantierten Nacktmausmodellen gezeigt.

Auch GRÜNDKER ET AL. (2002) konnten für das Endometrium und Ovarialzellkarzinom gleichermaßen wie FÖST ET AL. (2011) für das o.g. triple-negative-Mammakarzinom eine Reduktion des Tumorumfanges um mehr als 20%, für die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B bzw. um mehr als 30% für die Ovarialzellkarzinomzelllinie NIH:OVCAR-3 zeigen. Der Versuchsaufbau unterschied sich sowohl von der vorliegenden Arbeit, als auch von der Arbeit von FÖST ET AL. (2011):

GRÜNDKER ET AL. (2002) injizierten einmalig, aber in einer höheren Dosis (300nmol/20g und 700nmol/20g). Der Beobachtungszeitraum betrug 10 Tage. Messungen erfolgten alle 3 Tage. Eine Regression wurde in dieser Arbeit nach Behandlung der xenotransplantierten Tumore mit AESZ-108 (AN-152) erzielt. Doxorubicin inhibierte lediglich das Tumorwachstum.

Das duktale Pankreaskarzinom wird durch sein aggressives Wachstum charakterisiert. Die Wachstumseigenschaften dieser Tumorentität könnten ein Erklärungsversuch der fehlenden Regression unter der Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) sein.

Es bleibt weiterhin zu untersuchen, ob es gegebenenfalls unbeschriebene Resistenzmechanismen des Pankreaskarzinoms gegenüber dieser untersuchten Behandlung gibt oder ob es zur signifikanten Downregulation

der GnRH-I-Rezeptoren nach wiederholter Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) kommt. Eine signifikante reaktive Downregulation des GNRH-I-Rezeptors konnte nach Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) gegenwärtig für die Behandlung des Endometrium- und Ovarialzellkarzinoms mit AESZ-108 (AN-152) im Tiermodell widerlegt werden (GRÜNDKER ET AL. 2002). Es wird sogar angenommen, dass eine wiederholte Injektion die Effektivität der Therapie steigern könnte.

Der geringe Unterschied in der Hemmung des Tumorumfanges im Vergleich der Hochdosis- und Niedrigdosis-Versuchstiergruppe in der Arbeit von GRÜNDKER ET AL. 2002 kann durch eine mögliche Sättigung des GnRH-I-Rezeptors erklärt werden.

Somit muss in weiteren Versuchen die Dosis von AESZ-108 (AN-152) in der Behandlung des Pankreaskarzinoms eskaliert werden, um neben der Sättigungsdosis weitere pharmakologische Eigenschaften wie etwa die dosislimitierende Wirkung zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit zeigte keine der Nacktmäuse für den Zeitraum der Versuchsreihe weder nach der Injektion von AESZ-108 (AN-152) noch nach Injektion von Doxorubicin Nebenwirkungen. Dies könnte durch die repetitive Injektion der niedrigen Dosis AESZ-108 (AN-152) und Doxorubicin erklärt werden.

In dem oben beschriebenen Versuchsdesign von GRÜNDKER ET AL. 2002, starben die Nacktmäuse in der Hochdosis-Therapie (700nmol/20 g) mit Doxorubicin (Hec-1B: 4/5; NIH:OVCAR-3: 3/5). In der niedrigdosierten Therapie (300nmol/20g) starb keines der Tiere, aber Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust und zyanotisches, ischämisches Hautkolorit wurden beschrieben. In der Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) wurden in keiner Versuchsreihe Nebenwirkungen beobachtet. Zusammenfassend zeigten GRÜNDKER ET AL. 2002, dass äquimolare Dosen von AESZ-108 (AN-152) bei gleichzeitig regressivem Tumorwachstum weniger toxisch sind als Doxorubicin.

Grundlegend muss in der Interpretation der aus dem Tiermodell gewonnenen Ergebnisse beachtet werden, dass im humanen Serum die Aktivität der Serum-CE signifikant geringer ist als in Nacktmäusen (NAGY ET AL. 2000). Somit ist die Wirkung äquimolarer Dosen von AESZ-108 (AN-152) in humanem Gewebe womöglich effektiver als im Mausmodell.

Die höhere Konzentration der CE im Vergleich zum humanem Serum trifft ebenso für das fetale Rinderserum (FCS) zu. Um auf den menschlichen Organismus übertragbare Ergebnisse aus den in-vitro-Versuchen zu erhalten, wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kulturmedium für 1h vor Zugabe von AESZ-108 (AN152) mit Diisopropylfluorophosphat (DFP)

behandelt. DFP inhibiert die im fetalen Rinderserum enthaltende Serum-CE und verhindert die Spaltung von AESZ-108 (AN-152) und die damit verbundene frühzeitige Freisetzung des zytotoxischen Doxorubicins.

Basierend auf den präklinischen Arbeiten, die zeigen, dass sich AESZ-108 (AN-152) als Chemotherapeutikum in GnRH-I-Rezeptor positiven Tumorentitäten eignet, ermittelte eine 2010 publizierte Studie klinische Daten zur tolerierten Maximaldosis, dosislimitierenden Toxizität, vorläufigen Wirksamkeit und hormoneller Effekte in der Behandlung von 17 Patientinnen mit histologisch gesicherten GnRH-I-Rezeptor positiven metastasierten, unresektablen Endometriums-, Mammakarzinom- und Ovarialzellkarzinom (EMONS ET AL. 2010). 10, 20, 40, 80, 160 (n=6) und 267 (n=7) mg/m² AESZ-108 (AN-152) wurde in 1-6 Zyklen verabreicht.

6 Patientinnen, 160 mg/m² (n=3) und 267 mg/m² (n=3), sprachen auf die Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) an. EMONS ET AL. (2010) unterschieden dabei in *stable disease*, *partial* oder *complete response*.

Dosislimitierende Neutropenie und Leukopenien wurden in der 267mg/m² behandelten Gruppe (Grad 3/4) im ersten Behandlungszyklus beobachtet. In der 160 mg/m² behandelten Patientengruppe konnten keine dosislimitierende Nebenwirkungen beobachtet werden. Weitere nicht dosislimitierende Nebenwirkungen glichen dem bekannten Nebenwirkungsspektrum Doxorubicins (vgl. Kap. 1.2.4). Alopezie, und eine Palmaretrhodysästhesie, die gravierend und charakteristisch für Doxorubicin sind wurden in je einem Fall der mit 160 mg/m² AESZ-108 (AN-152) behandelten Patientengruppe und in vier bzw. einem Fall der Verabreichung der maximalen Dosis beobachtet.

Beachtlich ist, dass in der Therapie mit AESZ-108 (AN-152) in dem Versuchszeitraum kein Zeichen anthrazyklintypischer Kardiotoxizität beobachtet wurde. Kontrolliert wurde dies durch regelmäßige Kontrollen der linksventrikulären Ejektionsfraktion und repetitive Elektrokardiogramme.

Untersuchungen des Blut-Hormonspiegels hypophysärer Hormone nach Behandlung mit AESZ-108 (AN-152) zeigten keinen Einfluss der Therapie auf die Hormonspiegel von Kortison, TSH, T3 und T4. Die LH und FSH Konzentrationen sanken nach der Behandlung mit dem Hybridwirkstoff. Sie bewegten sich aber weiterhin im Normalbereich prämenopausaler Blutkonzentrationen.

Die Ergebnisse der ersten klinischen Anwendung von AESZ-108 (AN-152) zeigen im Vergleich zu bekannten Nebenwirkungen in einer Monotherapie mit Doxorubicin ein deutlich vermindertes Nebenwirkungsspektrum. Basierend auf den in o.g. klinischen Studie ermittelten pharmakologischen Eigenschaften empfehlen EMONS ET AL. (2010) zusammenfassend eine Behandlung mit 267 mg/m² AESZ-108 (AN-152, im Intervall von 3 Wochen gemeinsam mit 8mg Dexamethason zur antiemetischen Prophylaxe.

Zu berücksichtigen sind bei den Ergebnissen der oben zitierten Arbeiten die fehlenden Langzeitergebnisse und die Heterogenität des Patientenkollektivs.

Ebenso muss die Übertragbarkeit der pharmakologischen Ergebnisse aus der Therapie anderer Tumorentitäten mit AESZ-108 (AN-152) auf das Pankreaskarzinom in weiteren präklinischen Arbeiten überprüft werden. Längerfristige Wirkungen und Nebenwirkungen im Rahmen einer dauerhaften Therapie mit AESZ-108 (AN-152) müssen weiterhin in Tierversuchen umfassend untersucht werden.

4.5 Ausblick

Zahlreiche neue Therapieansätze versuchen, die ernüchternde Prognose des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms zu verbessern. Die Ergebnisse klinischer Studien werden ungeduldig erwartet, und es ist fraglich, ob eine der unter 1.1.4 genannten Therapieoptionen Einzug in den klinischen Alltag findet. MICHL & GRESS (2013) fassen in ihrem Review die Herausforderung in der Therapie des Pankreaskarzinoms treffend zusammen: die Heterogenität dieser aggressiven Tumorentität erfordert eine personalisierte Therapie. Subgruppen dieser Erkrankungen müssen zur optimalen Therapie bioptisch identifiziert werden. Erste Ansätze sind die Identifikation gesteigerter Signalkaskaden (JONES ET AL. 2008) und die Definition von Subtypen dieser Tumorentität (COLLISSON ET AL. 2011). Aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums zum Diagnosezeitpunkt müssen Komorbiditäten und Allgemeinzustand des Patienten ebenso in der therapeutischen Eignung eines Pharmakons berücksichtigt werden.

32,5% der in dieser Arbeit untersuchten Pankreaskarzinome exprimieren den GnRH-I-Rezeptor und eignen sich zur selektiven Therapie mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152). Die rezeptorvermittelte Aufnahme umgeht Resistenzmechanismen wie die charakteristische MDR des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms. Das Tumorwachstum im Tiermodell konnte nebenwirkungsfreier und effektiver als unter Therapie mit Peptidhormon-ungebundenem, freiem Doxorubicin inhibiert werden. Jedoch konnte keine Regression des Tumorwachstums durch AESZ-108 (AN-152) erzielt werden.

Deshalb bleibt in vorklinischen Untersuchungen zu untersuchen, ob die Potenz der Therapie mit AESZ-108 (AN-152) in Kombination mit anderen antitumorösen Substanzen zu steigern wäre.

Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob gegebenenfalls schon allein eine Dosissteigerung oder gar die Therapie mit dem 500-1000fach potenteren Daunosamine-modifizierten Derivat AN-201 (NAGY ET AL. 1996) effektiver und vergleichbar nebenwirkungsarm ist.

Einer optimierten Therapie fehlen gegenwärtig weiterhin Marker, die den Verlauf der Erkrankung und die Effektivität der Therapie kontrollieren können.

In den Endzügen der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erschien im ONCOTARGET eine Arbeit von SZEPEHAZI ET AL., MAI 2013, die in HE-Färbungen und immunhistochemisch den GnRH-I-Rezeptor in 2 humanen Pankreaskarzinomgewebeproben und den Pankreaskarzinomzelllinien SW-1990, Panc-1 und CFPAC-1 nachwies, diesen quantifizierte (via Western Blot) und Bindungstyp, Bindungskapazität und Dissoziationskonstante (low/high affinity, K_d [nM], B_{max} [fmol/mg Protein]) beschrieb. Ergänzend wurden in dieser Arbeit die antitumorösen Effekte von ungebundenem Doxorubicin und dem targeted Chemotherapeutikum AESZ-108 (AN-152) auf die Genexpression auf mRNA-Ebene quantifiziert. Untersucht wurde die Expression von Genen der Karzinogenese, die verantwortlich sind für Invasion, Metastasierung, Angiogenese, Adhäsion, Signaltransduktionsketten, Produktion von Transkriptionsfaktoren, Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparaturmechanismen (Fig.4, SZEPEHAZI ET AL. 2013). Die Effekte beider Substanzen auf die Genexpression der diversen Proteine in der Tumorgenese und -progression der 3 untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zeigten ein sehr heterogenes, variables Ergebnis (SZEPEHAZI ET AL. 2013, Fig.4). Die Überlegenheit von AESZ-108 (AN-152) gegenüber Doxorubicin korrelierte mit einer herabgesetzten Expression von Genen, die verantwortlich sind für Invasion, Metastasierung, Adhäsion und Angiogenese von Tumoren. Letztendlich führt die verminderte Expression dieser Gene zu einer herabgesetzten Aktivität von Metalloproteinasen (MMP). Der Grad an Expression von MMP 1,2,9 korreliert mit Tumorgrad, Größe und Invasivität des Pankreaskarzinoms. Dies könnte eine Erklärung der antitumorösen Wirkung von AESZ-108 (AN-152) auf das hormonunabhängige Wachstum des Pankreaskarzinoms sein (SZEPEHAZI ET AL. 2013).

Die Variabilität der Ergebnisse dieser aktuellen Untersuchung auf mRNA-Ebene unterstreicht erneut die Heterogenität dieser Tumorentität und die Notwendigkeit der von MICHL & GRESS (2013) geforderten personalisierten Therapie.

5 Zusammenfassung

Die Überlebensrate von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist sowohl in primär resektablen als auch im lokal fortgeschrittenen und metastasierten Stadium kurz. Das duktale Adenokarzinom des Pankreas breitet sich rasch aus und wird aufgrund fehlender Frühsymptome oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Gegenwärtig fehlen spezifische Tumormarker, die eine frühzeitige Diagnose erlauben würden. Aufgrund zahlreicher Mechanismen der primären und sekundären Chemoresistenz ist das Pankreaskarzinom verhältnismäßig resistent gegenüber konventioneller systemisch verabreichter Chemotherapie, antikörperbasierten sowie niedermolekularen Therapiestrategien, Enzyminhibitoren, Bestrahlung und chirurgischer Therapie. Ein vielversprechender Angriffspunkt zur zielgerichteten Therapie des Pankreaskarzinoms eröffnet die tumorspezifische Expression des GnRH-I Rezeptors. In dieser Arbeit konnte der GnRH-I-Rezeptor durch RT-PCR und immunhistochemisch in 32,5% der duktaalen Adenokarzinome des Pankreas nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem Hybridwirkstoff AESZ-108 (AN-152), einem zytotoxischen GnRH-Analogon *in vitro* und *in vivo* Apoptose in den GnRH-I-Rezeptor-positiven Pankreaskarzinomzelllinien induziert. Apoptose wurde durch den intrinsischen Signalweg über den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials vermittelt und führte zu DNA-Fragmentierung des Nukleus wie fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden konnte. Das zytotoxische GnRH-Analogon AESZ-108 (AN-152) führt *in vivo* zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich zur Therapie mit dem Anthrazyklin Doxorubicin, welches zu keiner signifikanten Inhibition des Pankreaskarzinomwachstums führt. Die rezeptorvermittelte Aufnahme ermöglicht eine selektive Therapie. Nach rezeptorvermittelter Endozytose wird das an die D-Lys⁶-Seitenkette gebundene Doxorubicin spezifisch im Nukleus der rezeptorpositiven Karzinomzellen freigesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass AESZ-108 (AN-152) ein geeigneter Ansatz zur selektiven Chemotherapie GnRH-I-Rezeptor positiver humaner duktaaler Adenokarzinome des Pankreas ist.

6 Publikation

Gründker C, Ernst J, Reutter MD, Ghadimi BM, Emons G (2011): Effective targeted chemotherapy using AEZS-108 (AN-152) for LHRH receptor-positive pancreatic cancers. *Oncol Rep* 26(3), 629-35.

Abstract

Pancreatic cancer is the fourth commonest cause of cancer-related mortality across the world. Because of the poor response to conventional chemotherapy, small molecules, radiation therapy and surgery, the development of new targeted therapies is necessary. In the present study, we have analyzed expression of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) receptor in specimens of human pancreatic cancers. Furthermore, we have investigated in vitro and in vivo whether the cytotoxic LHRH agonist AEZS-108 (AN-152) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells that express LHRH receptors. LHRH receptor expression in tumor specimens of human pancreatic cancers was assessed using immunohistochemistry. Cell proliferation was analyzed using the alamar blue proliferation assay. Induction of apoptosis was analyzed using the TUNEL assay and quantified by measurement of loss of mitochondrial membrane potential. In vivo experiments were performed using nude mice bearing xenografted human pancreatic tumors. Thirteen of 40 human pancreatic adenocarcinomas (32.5%) expressed LHRH receptors. We were able to show that treatment of LHRH receptor-positive MiaPaCa-2 and Panc-1 human pancreatic cancer cells with AEZS-108 (AN-152) resulted in apoptotic cell death in vitro. The antitumor effects could be confirmed in nude mice. AEZS-108 (AN-152) inhibited the growth of xenotransplants of human pancreatic cancers in nude mice significantly, without any apparent side effects. The cytotoxic LHRH agonist AEZS-108 (AN-152) seems to be a suitable drug with little toxicity for treatment of LHRH receptor-positive human pancreatic cancers.

7 Anhang

7.1 TNM-Klassifikation des duktales Pankreaskarzinoms nach UICC

T	Primary Tumor
Tx	Primary tumor cannot be assessed
Tis	Carcinoma in situ; intraepithelial or invasion of lamina propria
T0	No evidence of primary tumor
T1	Tumor invades submucosa
T2	Tumor invades muscularis propria
T3	Tumor invades through muscularis propria into subserosa or into non-peritonealized pericolic or perirectal tissues.
T4	Tumor directly invades other organs or structures and/or perforate visceral peritoneum
N	Regional lymph nodes
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in 1 to 3 regional lymph nodes
N2	Metastasis in 4 or more regional lymph nodes
M	Distant metastasis
Mx	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Tab.16: TNM- Tumorklassifikation des duktales Adenokarzinoms des Pankreas nach UICC.

Grade 1 or well-differentiated: Cells appear normal and are not growing rapidly.

Grade 2 or moderately-differentiated: Cells appear slightly different than normal.

Grade 3 or poorly differentiated: Cells appear abnormal and tend to grow and spread more aggressively.

8 Literaturverzeichnis

Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS (2002): Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 66(3), 184-199

Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170(2), 211-224

Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP (2004): Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg* 91, 1410-1427

Andrén-Sandberg A (1990): Treatment with an LHRH analogue in patients with advanced pancreatic cancer. A preliminary report. *Acta Chir Scand* 156(8), 549-551

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969): Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 11(6), 1101-1110

Bajo AM, Schally AV, Halmos G, Nagy A (2003): Targeted doxorubicin-containing luteinizing hormone-releasing hormone analogue AN-152 inhibits the growth of doxorubicin-resistant MX-1 human breast cancers. *Clin Cancer Res* 9(10 Pt 1), 3742-3748

Baumgart M, Heinmöller E, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM (2005): The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. *Cell Oncol* 27(1), 3-13

Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, Huhn RD, Song W, Li D, Sharp LL (2011): CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331(6024), 1612-1706

Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E (2003): A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 89(3), 519-523

Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, Wolfgang C, Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Eshleman JR (2009): Genetic mutations

associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res* 69(8), 3681-3688

Booser DJ, Hortobagyi GN (1994): Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47(2), 223-258

Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA (2002): A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 87(2), 161-167

Burriss HA 3rd, 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(6), 2403-2413

Callery MP, Chang KJ, Fishman EK, Talamonti MS, William Traverso L, Linehan DC (2009): Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* 16(7), 1727-1733

Chang BW, Saif MW (2011): Locally advanced pancreatic adenocarcinoma: where are we and where are we going? Highlights from the "2011 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium". San Francisco, CA, USA. *JOP* 12(2), 101-105

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1), 156-159

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L (2011): Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 17(4), 500-503

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364(19), 1817-1825

Cortés-Funes H, Coronado C (2007): Role of anthracyclines in the era of

targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* 7(2), 56-60

Doroshov JH (1986): Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(12), 4514-4518

Ehrlich P. (1895): The relationship existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action. In: The Collected Papers of Paul Ehrlich. Himmelweite F, Marguardt, M, Elmsford, HD (Hrsg.). Pergamon, London, 1956, 596-618

Emons G, Schally AV (1994): The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9(7), 1364-1379

Emons G, Kaufmann M, Gorchev G, Tsekova V, Gründker C, Günthert AR, Hanker LC, Velikova M, Sindermann H, Engel J, Schally AV (2010): Dose escalation and pharmacokinetic study of AEZS-108 (AN-152), an LHRH agonist linked to doxorubicin, in women with LHRH receptor-positive tumors. *Gynecol Oncol* 119(3), 457-461

Fachinformationen „Doxorubicinhydrochlorid“, Zulassungsnummer (AMG 76): 57733.00.00; PharmNet.Bund. Bundesministerium für Gesundheit.

Fasol U, Frost A, Büchert M, Arends J, Fiedler U, Scharr D, Scheuenpflug J, Mross K (2012): Vascular and pharmacokinetic effects of EndoTAG-1 in patients with advanced cancer and liver metastasis. *Ann Oncol* 23(4), 1030-1036

Fekete M, Zalatnai A, Comaru-Schally AM, Schally AV (1989): Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 4(5), 521-528

FitzGerald D, Pastan I (1989): Targeted toxin therapy for the treatment of cancer. *J Natl Cancer Inst* 81(19), 1455-1463

Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011): Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep* 25(5), 1481-1487

Frese KK, Neesse A, Cook N, Bapiro TE, Lolkema MP, Jodrell DI, Tuveson DA (2012): nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov* 2(3), 260-269

Friess H, Büchler M, Kiesel L, Krüger M, Beger HG (1991): LH-RH receptors in the human pancreas. Basis for antihormonal treatment in ductal carcinoma of the pancreas. *Int J Pancreatol* 10(2), 151-159

Friess H, Büchler M, Krüger M, Beger HG (1992): Treatment of duct carcinoma of the pancreas with the LH-RH analogue buserelin. *Pancreas* 7(5), 516-521

Frishman WH, Sung HM, Yee HC, Liu LL, Keefe D, Einzig AI, Dutcher J (1997): Cardiovascular toxicity with cancer chemotherapy. *Curr Probl Cancer* 21(6), 301-360

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3), 493-501

Gebhardt C, Meyer W, Reichel M, Wunsch PH (2000): Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 385, 14–20

Glaser JA (1995): Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18(1), 62-3

González-Barcena D, Rangel-Garcia NE, Perez-Sanchez PL, Gutierrez-Damperio C, Garcia-Carrasco F, Comaru-Schally AM, Schally AV (1986): Response to D-Trp-6-LH-RH in advanced adenocarcinoma of pancreas. *Lancet* 2(8499), 154

González-Barcena D, Ibarra-Olmos MA, García-Carrasco F, Gutiérrez-Samperio C, Comaru-Schally AM, Schally AV (1989): Influence of D-Trp-6-LH-RH on the survival time in patients with advanced pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother* 43(4), 313-317

Goodman KA, Hajj C (2013): Role of radiation therapy in the management of pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 107(1), 86-96

Gründker C, Emons G: GnRH in cancers of reproductive organs. In: Lunenfeld B (ed). GnRH analogs in human reproduction. Taylor and Francis, London 2005, 16-28

Gründker C, Völker P, Griesinger F, Ramaswamy A, Nagy A, Schally AV, Emons G (2002): Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-

releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 187(3), 528-537

Gründker C, Günthert AR, Emons G (2006): Zielzellspezifische Chemotherapie über den GnRh-Rezeptor. *Frauenarzt* 47(7), 590-592

Günthert AR, Gründker C, Bongertz T, Nagy A, Schally AV, Emons G (2004a): Induction of apoptosis by AN-152, a cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), in LHRH-R positive human breast cancer cells is independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Breast Cancer Res Treat* 87(3), 255-264

Günthert AR, Gründker C, Bongertz T, Schlott T, Nagy A, Schally AV, Emons G (2004b): Internalization of cytotoxic analog AN-152 of luteinizing hormone-releasing hormone induces apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cell lines independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Am J Obstet Gynecol* 191(4), 1164-1172

Habermehl D, Kessel K, Welzel T, Hof H, Abdollahi A, Bergmann F, Rieken S, Weitz J, Werner J, Schirmacher P (2012): Neoadjuvant chemoradiation with Gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. *Radiat Oncol* 7, 28

Halmos G, Nagy A, Lamharzi N, Schally AV (1999): Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone bind with high affinity to human breast cancers. *Cancer Lett* 136(2), 129-136

Halmos G, Arencibia JM, Schally AV, Davis R, Bostwick DG (2000): High incidence of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH receptor gene expression in human prostate cancers. *J Urol* 163(2), 623-629

Heinemann V, Haas M, Boeck S (2012): Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev* 38(7), 843-853

Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, Dillon W, Lee KF, Clark KE, Haverty P, Weng Z, Mutter GL, Frosch MP, MacDonald ME, Milford EL, Crum CP, Bueno R, Pratt RE, Mahadevappa M, Warrington JA, Stephanopoulos G, Stephanopoulos G, Gullans SR (2001). A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 7(2), 97-104

Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA, Yeo C, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M (2007): Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma.

J Clin Oncol 25(3), 319-25

Janáky T, Juhász A, Bajusz S, Csernus V, Srkalovic G, Bokser L, Milovanovic S, Redding TW, Rékási Z, Nagy A (1992): Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(3), 972-976

Janovick JA, Ulloa-Aguirre A, Conn PM (2003): Evolved regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor cell surface expression. *Endocrine* 22(3), 317-327

Janovick JA, Knollman PE, Brothers SP, Ayala-Yáñez R, Aziz AS, Conn PM (2006): Regulation of G protein-coupled receptor trafficking by inefficient plasma membrane expression: molecular basis of an evolved strategy. *J Biol Chem* 281(13), 8417-8425

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2), 69-90

Johung K, Saif MW, Chang BW (2012): Treatment of locally advanced pancreatic cancer: the role of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol, Biol, Phys* 82(2), 508–518

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321(5897), 1801-1806

Kaiser UB, Dushkin H, Altherr MR, Beier DR, Chin WW (1994): Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13.1-q21.1 and mouse chromosome 5. *Genomics* 20(3), 506-508

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD (1992): Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189(1), 289-295

Karten MJ, Rivier JE (1986): Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* 7(1), 44-66

Kim JH, Ho SB, Montgomery CK, Kim YS (1990): Cell lineage markers in human pancreatic cancer. *Cancer* 66(10), 2134-2143

Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF (2010): Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 28(22), 3617-3622

Kindler HL, Wroblewski K, Wallace JA, Hall MJ, Locker G, Nattam S, Agamah E, Stadler WM, Vokes EE (2012): Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs* 30(1), 382-386

Ko JR, Wu JY, Kirby R, Li IF, Lin A (2006): Mapping the essential structures of human ribosomal protein L7 for nuclear entry, ribosome assembly and function. *FEBS Lett* 580(16), 3804-3810

Kornmann M, Beger HG, Link KH (2003): Chemosensitivity testing and test-directed chemotherapy in human pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res* 161,180-95

Krebs in Deutschland 2007/2008. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 8. Ausgabe. Berlin 2012

Krebs LJ, Wang X, Pudavar HE, Bergey EJ, Schally AV, Nagy A, Prasad PN, Liebow C (2000): Regulation of targeted chemotherapy with cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogue by epidermal growth factor. *Cancer Res* 60(15), 4194-4199

Krebs LJ, Wang X, Nagy A, Schally AV, Prasad PN, Liebow C (2002): A conjugate of doxorubicin and an analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone shows increased efficacy against oral and laryngeal cancers. *Oral Oncol* 38(7), 657-663

Krejs GJ (2010): Pancreatic Cancer: Epidemiology and Risk Factors *Dig Dis* 28, 355–358

Larsson SC, Permert J, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A (2005): Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer* 93(11),1310-5

Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom (2006). Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG). Online: Arbeitsgemeinschaft der

Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (**AWMF**, Leitlinienregister 030/010), www.awmf.org. überarbeitet 2006, z. Zt. in Überprüfung, Stand: 16.07.2013.

Letsch M, Schally AV, Szepeshazi K, Halmos G, Nagy A (2003): Preclinical evaluation of targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogue AN-152 in androgen-sensitive and insensitive prostate cancers. *Clin Cancer Res* 9(12), 4505-4513

Li CP, Chao Y, Chi KH, Chan WK, Teng HC, Lee RC, Chang FY, Lee SD, Yen SH (2003): Concurrent chemoradiotherapy treatment of locally advanced pancreatic cancer: gemcitabine versus 5-fluorouracil, a randomized controlled study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57(1), 98-104

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004): Pancreatic cancer. *Lancet* 363(9414), 1049-1057

Li J, Ng J, Allendorf J, Saif MW (2011): Locally advanced pancreatic adenocarcinoma: are we making progress?. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011. *JOP* 12(4), 347-350

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(5),741-747

Limonta P, Montagnani Marelli M, Mai S, Motta M, Martini L, Moretti RM (2012): GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies. *Endocr Rev* 33(5), 784-811

McDonell MW, Simon MN, Studier FW (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110, 119-146

Michl P, Gress TM (2013): Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 62(2), 317-326

Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, O'Connell MJ, Reitemeier RJ, Rubin J, Schutt AJ, Weiland LH, Childs DS, Holbrook MA (1981): Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 48(8), 1705-10

Momose I, Kunimoto S, Osono M, Ikeda D (2009): Inhibitors of insulin-like

growth factor-1 receptor tyrosine kinase are preferentially cytotoxic to nutrient-deprived pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 380(1), 171-176

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group(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(15), 1960-1966

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt, 263-273

Nagy A, Szoke B, Schally AV (1993): Selective coupling of methotrexate to peptide hormone carriers through a gamma-carboxamide linkage of its glutamic acid moiety: benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate activation in salt coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13), 6373-6376

Nagy A, Armatis P, Schally AV (1996): High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: structure-activity relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6), 2464-2469

Nagy A, Plonowski A, Schally AV (2000): Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin 14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro: implications for the design of preclinical studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(2):829-834

Ni LM, Powers JC (1998): Synthesis and kinetic studies of an amidine-containing phosphonofluoridate: a novel potent inhibitor of trypsin-like enzymes. *Bioorg Med Chem* 6(10), 1767-1773

Noh YH, Matsuda K, Hong YK, Kunstfeld R, Riccardi L, Koch M, Oura H, Dadras SS, Streit M, Detmar M (2003): An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol* 121(6),1536-1543

Ojajärvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen TP, Kogevinas M, Porta M, Vainio HU, Weiderpass E, Wesseling

CH (2000): Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup Environ Med* 57(5), 316-324

Olson P, Hanahan D (2009): Cancer. Breaching the cancer fortress. *Science* 324(5933), 1400-1401

Omura N, Goggins M (2009): Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2(4), 310-326

O'Reilly EM, Niedzwiecki D, Hall M, Hollis D, Bekaii-Saab T, Pluard T, Douglas K, Abou-Alfa GK, Kindler HL, Schilsky RL, Cancer and Leukemia Group B (2010): A Cancer and Leukemia Group B phase II study of sunitinib malate in patients with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (CALGB 80603). *Oncologist* 15(12), 1310-1319

Pai VB, Nahata MC (2000): Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22(4), 263-302

Pardoll DM (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12(4), 252-264

Pastan I, Hassan R, FitzGerald D, Kritman R (2006): Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 6(7), 559-565

Paz-Bouza JI, Redding TW, Schally AV (1987): Treatment of nitrosamine-induced pancreatic tumors in hamsters with analogs of somatostatin and luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(4), 1112-1116

Poirier MC (2004): Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer* 4, 630-637

Qiu D, Kurosawa M, Lin Y, Inaba Y, Matsuba T, Kikuchi S, Yagyu K, Motohashi Y, Tamakoshi A; JACC Study Group (2005): Overview of the epidemiology of pancreatic cancer focusing on the JACC Study. *J Epidemiol* 15 Suppl 2, 157-167

Ramos-Vara JA (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 42(4), 405-426

Redding TW, Schally AV (1984): Inhibition of growth of pancreatic carcinomas in animal models by analogs of hypothalamic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(1), 248-252

Remmers N, Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA (2010): Molecular pathology of early pancreatic cancer. *Cancer Biomark* 9(1-6), 421-440

Reutter M, Emons G, Gründker C (2013): Starving tumors: inhibition of glycolysis reduces viability of human endometrial and ovarian cancer cells and enhances antitumor efficacy of GnRH receptor-targeted therapies. *Int J Gynecol Cancer* 23(1), 34-40

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491

Sandberg AA, Rosenthal HE (1979): Steroid receptors in exocrine glands: the pancreas and prostate. *J Steroid Biochem* 11(1A), 293-299

Schally AV, Nagy A (1999): Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 141(1), 1-14

Schally AV, Nagy A, Szepeshazi K, Pinski J, Halmos G, Armatas P, Miyazaki M, Comaru-Schally AM, Yano T, Emons G (1996): Controversies and Perspectives. In: Filicori M, Flamigni C (eds). *Treatment with GnRH Analogs*. Carnforth, U.K.: Parthenon, 33-44

Schally AV, Engel JB, Emons G, Block NL, Pinski J (2011): Use of analogs of peptide hormones conjugated to cytotoxic radicals for chemotherapy targeted to receptors on tumors. *Curr Drug Deliv.* 8(1), 11-25

Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993): Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14(2), 133-51

Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP (1997): Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18(2), 180-205

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB (1991): Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(9), 3671-3677

Sperti C, Pasquali C, Catalini S, Cappellazzo F, Bonadimani B, Militello C, Pedrazzoli S (1992): Hormonal treatment of unresectable pancreatic cancer with LHRH analogue (goserelin). *Eur J Surg Oncol* 18(3), 267-271

- Stathis A, Moore MJ (2010): Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 7(3), 163-172
- Sultana A, Tudur Smith C, Cunningham D, Starling N, Tait D, Neoptolemos JP, Ghaneh P (2007): Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy. *Br J Cancer* 96(8), 1183-90
- Szende B, Srkalovic G, Groot K, Lapis K, Schally AV (1990a): Regression of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters treated with luteinizing hormone-releasing hormone antagonists or agonists. *Cancer Res* 50(12), 3716-3721
- Szende B, Srkalovic G, Schally AV, Lapis K, Groot K (1990b): Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on pancreatic cancers in hamsters. Events that accompany tumor regression. *Cancer* 65(10), 2279-2290
- Szende B, Srkalovic G, Timar J, Mulchahey JJ, Neill JD, Lapis K, Csikos A, Szepeshazi K, Schally AV (1991): Localization of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in pancreatic and mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(10), 4153-4156
- Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A (1999): Effective treatment of advanced estrogen-independent MXT mouse mammary cancers with targeted cytotoxic LH-RH analogs. *Breast Cancer Res Treat* 56(3), 267-276
- Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G (2007): LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol* 30(6), 1485-1492
- Szepeshazi K, Schally AV, Keller G, Block NL, Benten D, Halmos G, Szalontay L, Vidaurre I, Jaszberenyi M, Rick FG (2012): Receptor-targeted therapy of human experimental urinary bladder cancers with cytotoxic LH-RH analog AN-152 [AEZS- 108]. *Oncotarget* 3(7), 686-99
- Tan MH, Shimano T, Chu TM (1981): Differential localization of human pancreas cancer-associated antigen and carcinoembryonic antigen in homologous pancreatic tumoral xenograft. *J Natl Cancer Inst.* 67(3), 563-569
- Tanase CP, Neagu M, Albulescu R, Hinescu ME (2010): Advances in pancreatic cancer detection. *Adv Clin Chem* 51, 145-180

Temkin SM, Fleming G (2009): Current treatment of metastatic endometrial cancer. *Cancer Control* 16(1), 38-45

Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF (1984): Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226(4673), 466-468

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB (2011): Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 21(7), 440-446

Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H (2004): Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22(8), 1430-1438

Verses G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987): The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237, 415-417

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2009): Pancreatic cancer. *Lancet* 378(9791), 607-620

Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(2), 615-619

Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, Korn RL, Desai N, Trieu V, Iglesias JL, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, Rajeshkumar NV, Maitra A, Hidalgo M (2008). *J Clin Oncol* 29(34), 4548-4554

Wang X, Krebs LJ, Al-Nuri M, Pudavar HE, Ghosal S, Liebow C, Nagy AA, Schally AV, Prasad PN (1999): A chemically labeled cytotoxic agent: two-photon fluorophore for optical tracking of cellular pathway in chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20), 11081-11084

Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C (1992). Pancreatic carcinoma. *N. Engl J Me.* 326, 455- 465

Weiss RB (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19(6), 670-686

Westphalen S, Kotulla G, Kaiser F, Krauss W, Werning G, Elsasser HP, Nagy A, Schulz KD, Grundker C, Schally AV, Emons G (2000): Receptor mediated antiproliferative effects of the cytotoxic LHRH agonist AN-152 in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol* 17(5), 1063-1069

Wimberger P, Gorchev G, Hanker L, Staehle A, Hristamina A, Beckmann MW, Dall P, Gruendker C, Hilpert F, Sehouli J, Harter P, Taskova V, Emons G, AGO Study Group, Germany (2011): AGO-GYN 5 (Phase II) study with AEZS-108, a targeted cytotoxic LHRH analog, in patients with LHRH receptor positive endometrial cancer. Posterpräsentation (Abstract-ID: A-373-0005- 00247), ESGO Milan, Italy; September 11-14, 2011

Wu CF (1940): Double-staining in toto with hematoxylin and eosin. *Science* 92(2396), 515-516

Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ (1977): Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19(1), 128-135

Zalatnai A, Molnár (2007): Review. Molecular background of chemoresistance in pancreatic cancer. *In Vivo* 21(2), 339-347

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker für seine engagierte, geduldige und stetige Betreuung. Darüber hinaus gilt dieser Dank ebenso der Arbeitsgruppe Molekulare Gynäkologie: Sonja Blume, Matthias Läsche, Renate Dietrich, Kathrin, Eckhardt, Dr. Antje Schubert, PD Dr. rer. nat. Rainer Girgert, Dr. med. Madita Reutter und Dr. med. Crispin Föst für deren Unterstützung, Vermittlung von Labormethodik, Hilfestellung, einzigartige Arbeitsatmosphäre und die stetige Motivation.

Prof. Dr. med. Günter Emons möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung der hervorragenden Infrastruktur des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Göttingen und die uneingeschränkten Möglichkeiten und Mittel zur Realisierung dieser Arbeit danken.

Vielen Dank weiterhin Prof. Dr. med. Michael Ghadimi, Direktor der Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen, nicht nur für die Bereitstellung der humanen Pankreaskarzinomzelllinien, sondern vor allem für die prompte und zündende Hilfe in der Bewältigung der unendlich erscheinenden Fülle von neuen Therapiekonzepten des Pankreaskarzinoms. Die Empfehlung eines herausragenden Reviews der aktuell diskutierten Therapieansätze des Pankreaskarzinoms war bei der Vollendung meiner Arbeit eine sehr große Hilfe.

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. med. David Liebetanz, Abt. Klinische Neurophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen, der mir in der Zusammenarbeit in einer klinischen Studie mühevoll und geduldig die Grundsätze wissenschaftlichen Arbeitens und Publizierens vermittelt hat. Vielen Dank meiner aktuellen Abteilung, namentlich Prof. Dr. med. Klaus-Michael Stürmer (Klinikdirektor der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie) und Dr. med. Gunther Felmerer (Bereichsleiter Plastische Chirurgie) für das Einrichten von Freiräumen und das Vertrauen im Ausbau neuer Forschungsansätze.

Lebenslauf

Am 29. Oktober 1985 wurde ich, Jennifer Ernst, in Duderstadt geboren.

Nach Besuch der Grundschule Fuhrbach folgte die Orientierungsstufe der Astrid-Lindgren Schule in Duderstadt. Im Sommer 2005 erlangte ich am Eichsfeld-Gymnasium Duderstadt die allgemeine Hochschulreife.

Nach einem 3-monatigen Praktikum in Madrid (Fa.Otto Bock) zur Markanalyse der prothetischen und orthetischen Versorgungsmöglichkeiten auf der iberischen Halbinsel nahm ich im Oktober 2005 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität in Göttingen auf. Nach der erfolgreichen Absolvierung des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung begann ich im April 2008 studienbegleitend auf der interdisziplinären Intensivstation des Krankenhaus Weende zu arbeiten.

Aufgrund meines außerordentlichen Interesses für die periphere Nerven Chirurgie begann ich 2007 im Rahmen eines Praktikums bei der Fa. Neurodan (DK) an der Mitarbeit an der Safety Studie PB-SA844-100 ActiGait Observational Study und dem Führen eines klinischen Registers. Seit 2008 arbeite ich in einer interdisziplinären Neuroprothetiksprechstunde (Klinische Neurophysiologie Prof. Paulus, Prof. Liebetanz sowie Klinik für Neurochirurgie Prof. Rohde, PD Dr. Mielke). Ich betreue die Patienten mit Fallfuß nach Läsion des 1. Motoneuron hinsichtlich der Eignung der zur Implantation eines implantierbaren selektiven Peroneusstimulators (ActiGait). Mein Aufgabenbereich umfasst seither die Koordination von Patientenfragen, Screening, Prüfen der Implantationsindikation, peri- und postoperative Betreuung der Patienten, Aktivierung und Adjustierung des implantierbaren Systems. Die Sprechstunde ist bis heute in meinem beruflichen Alltag integriert. Der initialen Veröffentlichung der Safety Studie folgten weitere Studien.

Meine Dissertation begann ich im September 2009 im Labor der Molekularen Gynäkologie (Prof. rer. nat. Gründker) der Abteilung Gynäkologie (Prof. Emons).

Den Zeitraum von September 2010 bis April 2011 verbrachte ich dank eines ERASMUS-Stipendiums am Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. Ich absolvierte dort das Wahlfach Plastische Chirurgie und Anästhesie. Zudem verbrachte ich den überwiegenden Teil des klinischen Rotatorios in dem Department für Plastische und Wiederherstellungschirurgie von Prof. Jaume Masia.

Im August 2011 begann mein Praktisches Jahr (Anästhesie, UMG; Abt. Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, UMG; Innere Medizin, Duderstadt). Im November 2012 erfolgte die Approbation zur Ärztin.

Seither bin ich Weiterbildungsassistentin in der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie. Dort gilt meine besondere Aufmerksamkeit der

peripheren Nerven Chirurgie, Plexuschirurgie und dem selektiven Nerven Transfer zur Steuerung von myoelektrischen Prothesen. Im Rahmen der Erprobung von neuen Oberflächenelektroden sowie kortikaler sensibler Repräsentation werden Patienten nach einem selektiven Nerven Transfer intensiviert mit dem Department of Orthobionic, Department of Neurorehabilitation Engineering (Bernstein Center for Computational Neuroscience, Prof. Farina) prä- und postoperativ begleitet.