

Aus der 2. Medizinischen Klinik  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Ebert)

Analyse zytokinabhängiger Proliferationsinhibition auf  
Pankreaskarzinomzellen und pankreatische Sternzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Jonas Czech

aus  
Erlangen  
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Goerdts  
Referent: Prof. Dr. med. Ebert

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
1.1 Pankreatisches Adenokarzinom .....	2
1.2 Epidemiologie, Risikofaktoren .....	2
1.2.1 Histopathologie .....	2
1.2.2 Tumor microenvironment .....	3
1.3 Pankreatische Sternzellen (PSC) .....	4
1.3.1 Rolle von PSC im Rahmen von pankreatischen Adenokarzinomen ....	4
1.4 Zytokine .....	5
1.4.1 Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) .....	5
1.4.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	6
1.4.3 Platelet Derived Growth Factor (PDGF) .....	7
1.5 Wachstumsfaktor-Inhibitoren .....	8
1.5.1 NVP-BGJ-398 (Infigratinib) .....	8
1.5.2 TKI-258 (Dovitinib) .....	9
1.6 Zielsetzung .....	9
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1 Allgemeine Materialien .....	10
2.2 Spezielle Materialien und Methoden .....	11
2.2.1 Zellkultur und Zelllinien .....	11
2.2.2 Therapeutika .....	12
2.2.3 Zellviabilitäts-Assays .....	13
2.2.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie .....	17
2.2.5 Proteinchemische Methoden .....	21
2.2.6 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR .....	30
2.3 Statistische Auswertung .....	33

<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>34</b>
3.1	Wachstumsfaktor-Rezeptor-Expression	34
3.2	WST-I-Proliferations-Assay	35
3.2.1	Proliferation pankreatischer Karzinomzellen (BxPC-3-Zelllinie) (WST-I-Proliferationsassay)	35
3.2.2	Proliferation pankreatischer Sternzellen (Klon 2.2) (WST-I-Proliferationsassay)	39
3.3	Langzeitproliferationsexperimente mittels Trypanblau-Proliferation-Assay (Wirkstoffexposition bis 240 Stunden)	41
3.3.1	Proliferation in BxPC-3-Zellen (Trypanblau-Assay)	42
3.3.2	Proliferation in Klon2.2-Zellen (PSC) (Trypanblau-Assay)	50
3.4	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie	58
3.4.1	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität von BxPC-3-Zellen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie	58
3.4.2	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität von Klon2.2-Zellen mittels Fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie	62
3.5	Zellzyklusanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie	65
3.5.1	Zellzyklusanalyse bei BxPC-3-Zellen (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)	66
3.5.2	Zellzyklusanalyse bei Klon2.2-Zellen (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)	70
3.6	Proteinchemische Bestimmungen	73
3.6.1	Western Blot – BxPC-3-Zellen (Pankreatische Karzinomzellen)	73
3.6.2	Western Blot – Klon-2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)	74
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>98</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro (1/10 <sup>6</sup> )
5-FU	5-Fluoruracil
5-dFU	5-desoxy-Fluoruracil
DAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK	extracellular signal-regulated kinases (auch MAPK genannt)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration („inhibitory concentration 50“)
IL	Interleukin
m	Milli (1/10 <sup>3</sup> )
M	Molar (mol/l)
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase (auch ERK genannt)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MW	Mittelwert
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor
PSC	pankreatische Sternzellen
ras	„rat sarcoma“ Proto-Onkogen
raf	„rapidly accelerated fibrosarcoma“ Proteinkinasen
SD	Standardabweichung (“standard deviation”)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

## **Einleitung**

### **1.1 Pankreatisches Adenokarzinom**

Das duktales Adenokarzinom und seine Varianten sind die häufigste Form der malignen Entartung des exokrinen Pankreas und machen in etwa 85-90% aller Neoplasien des Pankreas aus (Klöppel et al., 2000). Es ist eine hochmaligne Neoplasie mit infauster Prognose. Gekennzeichnet ist es durch wenige frühe Symptome, eine hohe primäre Therapieresistenz gegen Zytostatika sowie eine frühe lymphogene Metastasierung in die regionären Lymphknoten und hämatogene Metastasierung vor allem in Leber, Lunge und Knochen.

### **1.2 Epidemiologie, Risikofaktoren**

Neoplasien des Pankreas waren im Jahr 2016 mit in etwa 18 400 Neuerkrankungen die sechshäufigste Tumorlokalisation bei Frauen und die zehnthäufigste Tumorlokalisation bei Männern in Deutschland. Die infauste Prognose dieser hochmalignen Erkrankung wird darin deutlich, dass sie im gleichen Jahr bei Frauen und Männern an vierter Stelle in der Statistik der Krebssterbefälle in Deutschland erschien und eine 5-Jahre-Überlebensrate, die weiterhin unter 10% liegt, aufwies (Koch-Institut and e.V., 2019). Das Pankreaskarzinom ist eine Erkrankung des höheren Alters. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 71 Jahre bei Männern und 75 Jahre bei Frauen (Klöppel et al., 2000). Demzufolge zeigt sich im Rahmen der steigenden Lebenserwartung in der Bevölkerung eine steigende Inzidenz.

#### **1.2.1 Histopathologie**

Histopathologisch zeigt sich das duktales Karzinom des Pankreas am häufigsten moderat differenziert mit gangartigen Drüsenstrukturen in zellarmem Stroma. Wichtige Varianten sind das adenosquamöse Karzinom, das durch atypische Drüsenformationen und Plattenepithelformationen gekennzeichnet ist und das undifferenzierte anaplastische Karzinom mit polymorphen, ungeordnet liegenden Tumorzellen (Klöppel et al., 2000) (Löhr et al., 2008). Eine Entwicklung des pankreatischen Adenokarzinoms aus Vorläuferläsionen, wie pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), intraduktal papillär muzinösen Neoplasien und muzinös zystischen Neoplasien, wird beschrieben. Die Entwicklung ausgehend von

dysplastischen duktalem Epithelzellen über Vorläuferläsionen zum invasiven Karzinom ist begleitet durch die zunehmende Ansammlung verschiedener Mutationen, die zentrale Kennzeichen der malignen Entartung, wie Apoptose, DNA-Reparaturmechanismen, Zellzykluskontrolle und Zelladhäsion, betreffen (Hidalgo, 2010; Kleeff et al., 2016).

### **1.2.2 Tumor microenvironment**

Die Mikroumgebung des pankreatischen Adenokarzinoms besteht aus einer komplexen Kombination dichter extrazellulärer Matrix, einer Vielzahl unterschiedlicher Zellarten sowie Blut- und Lymphgefäßen. Neben den Adenokarzinomzellen machen pankreatische Sternzellen, Entzündungszellen, wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen oder Mastzellen, Endothelzellen und Neuronale Zellen, den zellulären Anteil der Pankreaskarzinome aus. Die lokalen Tumorzellen sind dabei im Vergleich zu den anderen Zellarten und insbesondere im Vergleich zu den pankreatischen Sternzellen deutlich unterrepräsentiert (Kleeff et al., 2016; Waghray et al., 2013).

Das dichte kollagenöse Stroma der extrazellulären Matrix wird im Wesentlichen von den Pankreatischen Sternzellen gebildet und reguliert. Es besteht vor allem aus Kollagen Typ 1, Fibronectin, Laminin und anderen Glykoproteinen (Apte et al., 2004; Phillips et al., 2003). Die desmoplastische Reaktion und die Interaktion der unterschiedlichen Bestandteile der Mikroumgebung des pankreatischen Adenokarzinoms beeinflussen das Fortschreiten der Erkrankung und die Prognose deutlich (Wang et al., 2016). Eine gesteigerte Aktivität des Tumorstromas ist mit einem kürzeren Überleben der Pankreaskarzinompatienten assoziiert (Erkan et al., 2008).

Explorative Studien zeigen, dass die komplexe Mikroumgebung des pankreatischen Adenokarzinoms die Proliferation sowie das Überleben von Pankreaskarzinomzellen fördert (Hwang et al., 2008; Lee et al., 2007) und durch Immunmodulation die Graft-vs-tumor Immunreaktion inhibiert (Delitto et al., 2015; Ene-Obong et al., 2013; Hausmann et al., 2014; Ino et al., 2013). Sie übernimmt daher auch eine wichtige Rolle bei der Invasion und Migration von Tumorzellen bzw. bei der Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen (Apte et al., 2004). Deregulierte Neovaskularisation und Zellproliferation schaffen ein dichtes Stromagewebe mit großen hypoxischen Arealen, welches zum Phänomen der verminderten Zytostikasaturation im Tumorgewebe von Pankreaskarzinomen beiträgt und die Resistenzentwicklung gegen systemische

Chemotherapie fördert (Olive et al., 2009). Wachstumsfaktoren und Zytokine sind hierbei wichtige Mediatoren der beschriebenen Effekte der Tumormikroumgebung: FGF- und FGFR-Expression ist vermutlich wichtig für die Interaktion von Karzinomzellen und pankreatischen Sternzellen (Tian et al., 2012), ebenso wie PDGF/PDGFR (Bachem et al., 2005). VEGF- und VEGFR wiederum ist zentral für den oben genannten Prozess der Neovaskularisation und Entstehung hypoxischer Areale (Neesse et al., 2011).

### **1.3 Pankreatische Sternzellen (PSC)**

Die pankreatischen Sternzellen (PSC) als wesentliche Zellbestandteile für die Struktur und die Funktion des Pankreas wurden erst 1982 erstmalig beschrieben (Watari et al., 1982). Sie konnten 1998 von zwei Forscherteams erstmals isoliert werden (Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). In den letzten Jahren war und ist die Erforschung ihrer physiologischen Rolle in der Funktion des Pankreas sowie ihre pathophysiologische Rolle bei der Entstehung und dem Fortbestehen von u.a. chronischer Pankreatitis und der malignen Entartung des Pankreas Gegenstand verschiedener Studien. PSC können in ruhendem Phänotyp und in aktiviertem Phänotyp vorliegen. Im Rahmen der Gewebsschädigung, wie zum Beispiel im Rahmen der akuten Pankreatitis, kommt es zu einer Aktivierung von PSC. Die Aktivierung der PSC führt zu einer Änderung der Morphologie und zur Steigerung der Proliferation, Migration und der Produktion von extrazellulärer Matrix und Zytokinen. Als aktivierende Faktoren wirken neben Alkohol und seinen Metaboliten, verschiedene Wachstumsfaktoren, wie PDGF und TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und eine Vielzahl weiterer Chemokine, die während des oxidativen Stresses im Rahmen einer chronischen Pankreatitis auftreten (Apte et al., 2012). Im Pankreas sollen pankreatische Sternzellen am Erhalt des normalen Umsatzes der extrazellulären Matrix durch Synthese und Abbau von Proteinen, an der exokrinen Sekretion des Pankreas, an der Erkennung pathogen-assoziiertes Moleküle und an der Phagozytose nekrotischer Zellen beteiligt sein sowie Potential als Progenitorzellen besitzen. (Apte et al., 2015).

#### **1.3.1 Rolle von PSC im Rahmen von pankreatischen Adenokarzinomen**

Die Rolle der PSC in der Entwicklung und dem Fortschreiten des pankreatischen Adenokarzinoms steht gegenwärtig im Fokus onkologischer Forschung.



Eine Reihe experimenteller Daten legen eine ausgeprägte Interaktion pankreatischer Adenokarzinomzellen mit pankreatischen Sternzellen nahe (Apte et al., 2004; Apte and Wilson, 2012; Vonlaufen et al., 2008). So zeigt sich im Mausmodell, dass Tiere, denen sowohl Pankreaskarzinomzellen als auch PSC injiziert wurden, signifikant größere Tumervolumina mit höheren Karzinomzellzahlen und gesteigerter Metastasierungsrate aufweisen, als Mäuse, denen nur Karzinomzellen injiziert wurden (Vonlaufen et al., 2008). In der Vermittlung dieses wechselseitigen Effekts zwischen Pankreaskarzinomzellen und PSC wird insbesondere auch Zytokine eine wesentliche Rolle zugesprochen: PDGF, welches von PSC ausgeschieden wird, scheint einen proliferationssteigernden Effekt auf Karzinomzellen zu vermitteln (Vonlaufen et al., 2008). In-vitro-Experimente zeigen, dass eine erhöhte Proliferation, eine verminderte Apoptoserate und eine gesteigerte Migration pankreatischer Karzinomzellen nachzuweisen ist, wenn diese mit Zellüberständen von PSC inkubiert wurden. Die Zytokine FGF-2, TGF- $\beta$  und PDGF, welche von pankreatischen Karzinomzellen sezerniert werden, steigern die Synthese extrazellulärer Matrix durch Aktivierung und Proliferation von PSC.

Die pathophysiologische Bedeutsamkeit der pankreatischen Sternzellen für die Metastasierung pankreatischer Adenokarzinomen wird durch die Beobachtung gestützt, dass im Mausmodell pankreatische Sternzellen des Primärtumors in Metastasen nachgewiesen werden konnten (Xu et al., 2010).

## **1.4 Zytokine**

### **1.4.1 Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)**

Die Familie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren oder auch fibroblast growth factors (FGF) besteht aus 18 Wachstumsfaktoren (FGF1-10 sowie FGF 16-23), welche in 6 Unterfamilien eingeteilt werden (Beenken and Mohammadi, 2009).

Die Wirkung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wird über die Bindung an vier spezifischen FGF-Rezeptoren (FGFR 1 – 4) und deren Isoformen (FGFR 1b – FGFR 3b und FGFR 1c - FGFR 3c) vermittelt (Beenken and Mohammadi, 2009).

Die Bindung der FGF erfolgt hierbei an Immunglobulin-Domänen (D2 & D3) des FGFR und vermittelt die Dimerisierung der Rezeptoren, wodurch es zu einer Aktivierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne kommt. Dadurch werden multiple intrazelluläre Signalwege aktiviert. Es kommt unter anderem zu einer Aktivierung des ras-raf-MAPK-

Signalwegs, zur Aktivierung des PI3-K-Signalwegs und zur Aktivierung eines AKT-abhängigen anti-apoptotischen Signalwegs (Turner and Grose, 2010). Der MAPK-Signalweg scheint dabei eine zentrale Rolle für die Vermittlung proliferationsfördernder Signale zu haben und der PI3-K-Signalweg scheint verstärkt anti-apoptotische Signale zu vermitteln (Wesche et al., 2011). Eine wesentliche Rolle der FGF und FGFR auf die Entstehung und das Fortschreiten des Pankreaskarzinoms wird vielfach beschrieben. So beschrieben Yamanaka et al eine erhöhte Expression von FGF in pankreatischen Karzinomzellen und eine Korrelation dieser erhöhten Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien und verkürztem Überleben (Yamanaka et al., 1993). Weitere Studien beschreiben unter anderem eine FGF-vermittelte Inhibition des Zelltods während der Pankreaskarzinom-Tumorentstehung (Vickers et al., 2001), eine erhöhte Proliferation pankreatischer Karzinomzellen durch FGF (Kornmann et al., 1997; Yamazaki et al., 1997) und eine erhöhte Invasivität und Metastasierung durch FGF-Überexpression (Hasegawa et al., 1994; Nomura et al., 2008). Auch eine Überexpression der FGF-Rezeptoren und die erhöhte Expression bestimmter FGFR-Splicevarianten wird mit Schlüsselmerkmalen des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht: Neben gesteigerter Aktivierung anti-apoptotischer und proliferationsfördernder Signalwege (Kornmann et al., 2002), gesteigerter Tumorzellmobilität und Metastasierung (Liu et al., 2007; Nomura et al., 2008) und einer wesentlichen Rolle in der Angiogenese (Compagni et al., 2000), wird die gesteigerte Expression der FGFR-1 $\beta$ -Splicevariante mit erhöhter Resistenz gegen Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (Vickers et al., 2002).

#### **1.4.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Die Familie der Vascular Endothelial Growth Factors besteht aus sieben Wachstumsfaktoren, wovon fünf von unterschiedlichen menschlichen Geweben exprimiert werden: VEGF-A bis D und Placental Growth Factor (PlGF) (Roy et al., 2006). Weitere Isoformen entstehen durch alternatives Splicing der VEGF-Gene (Otrock et al., 2007). Die Wirkungen der VEGFs werden über die drei VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 sowie über die Neuropiline NP-1 und NP-2 vermittelt. Die VEGF-Rezeptoren bestehen, ähnlich den FGF-Rezeptoren, aus extrazellulären Immunglobulin-Domänen und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Die VEGF-Rezeptoren unterscheiden sich unter anderem in ihrer Bindungsaffinität für die VEGFs (Otrock et al., 2007). Intrazellulär wird die VEGFR-

Wirkung unter anderem über den ras-raf-MAPK-Signalweg, die Protein Tyrosin Kinase 2 (PTK2), die Tyrosinkinase src und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) vermittelt (Roskoski Jr, 2007). Die VEGFs und ihre Rezeptoren sind essentiell in der Angiogenese, der Lymphangiogenese und der Vaskulogenese (Otrock et al., 2007). Insbesondere VEGF-A hat eine hoch potente angiogene Wirkung, vermittelt anti-apoptotische und proliferationsfördernde Effekte auf Endothelzellen und fördert deren Aussprossung. Ebenso fördert es die Motilität von Endothelzellen und beeinflusst eine Vielzahl von Prozessen, in denen Angiogenese eine Rolle spielt (Roskoski Jr, 2007). Pankreaskarzinome mit hoher Expression von VEGF zeigen ein wesentlich dichteres Wachstum von Tumorgefäßen, eine erhöhte Anzahl von Lebermetastasen und kürzere Überlebenszeiten (Seo et al., 2000). Ein Faktor für die Metastasierung könnte hierbei sein, dass eine Aktivierung des VEGFR-1 die epithelial-mesenchymale Transition als Zwischenschritt im Prozess der Metastasierung vermittelt (Yang et al., 2006). Böhler et al konnten eine erhöhte Expression von VEGF und VEGF-Rezeptoren in pankreatischen Karzinomzellen nachweisen und zeigten eine Korrelation der VEGFR-2-Expression mit schlechterer Tumordifferenzierung und verkürztem Überleben. Durch eine Blockade des VEGFR-2 konnte eine Reduktion des Wachstums von Pankreaskarzinomen erreicht werden (Buchler et al., 2002).

### **1.4.3 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)**

Die Familie der Platelet Derived Growth Factors (PDGF) besteht aus vier strukturell verwandten Wachstumsfaktoren (PDGF A, B, C und D). Diese bilden durch Disulfidbrücken verbundene aktive Dimere, wodurch 5 aktive Isoformen des PDGF entstehen: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC und PDGF-DD (Chen et al., 2013). Auch die Wirkungen der PDGFs werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Die beiden Rezeptoren PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$  werden als Dimere aktiv, somit entstehen 3 aktive PDGF-Rezeptor-Dimere: PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGFR- $\beta\beta$ -Dimere und PDGFR- $\alpha\beta$ -Dimer, an welche die PDGF-Dimere spezifisch binden (Chen et al., 2013). PDGFR werden vor allem von mesenchymalen Zellen exprimiert (Andrae et al., 2008). Auch die Stimulation des PDGF-Rezeptors erfolgt mittels Aktivierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Die weitere intrazelluläre Signalweiterleitung wird zum einen über enzymatische Proteine wie Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-K), die src-Tyrosin-Kinase-Familie, die Tyrosin-Phosphatase SHP-2 und das GTPase aktivierende Proteine (GAP), zum anderen über

nicht enzymatische Proteine wie z.B. Grb2, Grb7, Nck, Shb, Shc und Crk vermittelt (Heldin and Westermarck, 1999). Beim pankreatischen Adenokarzinom konnten multiple PDGF-vermittelte neoplastische Effekte gezeigt werden: in Pankreaskarzinomen mit Mutation des Tumorsuppressorgens p53 ist eine erhöhte autonome PDGFR- $\beta$ -Aktivität nachweisbar. Diese geht mit einer höheren Tumordinvasion und Metastasierung sowie einer kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit einher (Weissmueller et al., 2014). Auch eine gesteigerte PDGF-AA-Sekretion in der Tumormikroumgebung von Pankreaskarzinomen geht mit einer kürzeren Überlebenszeit einher (Delitto et al., 2015). PDGF-BB induzierte zudem in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien Zellmigration. In der Pankreaskarzinom-Zelllinie AsPC-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Suppression von PDGF-BB mittels Arsenit Apoptose und Zellzyklusarrest in Pankreaskarzinom-Zellen induziert und Zellmigration, insbesondere vermittelt durch den Akt-Signalweg, inhibiert werden konnte (Horibe et al., 2016). Allerdings zeigte sich in einer Studie auch ein vermindertes Tumorwachstum in pankreatischen Karzinomen, die übermäßig PDGF-BB exprimierten. Dies ging einher mit einer Zunahme der Perizyten in der Tumormikroumgebung (McCarty et al., 2007). Zusammenfassend ist der Effekt von PDGF auf den Progress von Pankreaskarzinomen vielgestaltig und abhängig von unterschiedlichen PDGF, den exprimierten PDGFR und der Interaktion mit anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Es zeigen sich dabei sowohl fördernde, als auch hemmende Wirkungen auf das Tumorwachstum und den Progress. Die Progress-fördernden Effekte von PDGF scheinen jedoch zu überwiegen (Giroux et al., 2009).

## **1.5 Wachstumsfaktor-Inhibitoren**

Um den Effekt von Wachstumsfaktorinhibition auf pankreatische Adenokarzinomzellen und pankreatische Sternzellen zu untersuchen, wurden für die hier vorliegende Arbeit der selektive FGF-Rezeptorinhibitor NVP-BGJ-398 (Infigratinib) und der Multikinase-Inhibitor TKI-258 (Dovitinib) untersucht.

### **1.5.1 NVP-BGJ-398 (Infigratinib)**

NVP-BGJ398 (3-(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-pyrimidin-4-yl]-1-methyl-urea) ist ein 2011 erstmals beschriebener FGF-Rezeptorinhibitor, der nahezu selektiv FGFR-1, -2, -3 und -4 inhibiert. Weiterhin ist eine wesentlich geringere und zu vernachlässigende Inhibition von VEGFR-2

beschrieben. Die Rezeptoraktivierung wird dabei unter anderem durch eine Interaktion von NVP-BGJ-398 mit der ATP-Bindetasche vermittelt (Guagnano et al., 2011).

Die Wirkung von NVP-BGJ-398 auf diverse solide Tumoren wurde mehrfach untersucht. Eine Arbeit von Huynh et al beschreibt eine proliferationshemmende und Apoptose-fördernde Wirkung, wie auch eine hemmende Wirkung auf Metastasierung durch NVP-BGJ-398 bei hepatozellulären Karzinomzellen, insbesondere wenn eine gesteigerte FGFR-Expression vorlag (Huynh et al., 2019). In einer klinischen Phase 1b Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen Urothelkarzinomen wurde bei vier von fünf Patienten mit FGFR-3-Mutationen eine Tumorregression nach Therapie mit Infigratinib beschrieben (Casadei et al., 2019).

### **1.5.2 TKI-258 (Dovitinib)**

TKI-258 ist ein Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor, der unter anderem VEGFR-1, -2 und -3 FEGFR-1 und -2 sowie PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$  inhibiert (Lee et al., 2005). Eine klinische Phase-Ib-Studie an Patienten mit fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen aus dem Jahr 2019 ergab Hinweise auf eine mögliche Effektivität der Kombinationstherapie von Dovitinib mit Gemcitabin und Capecitabin (Prodrug von 5-Fluoruracil) bei diesen Patienten (Ma et al., 2019).

## **1.6 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Dissertation werden humane Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) und pankreatische Sternzellen (Klon 2.2) in vitro mit dem Multikinasehemmer Dovitinib (TKI-258) und dem selektiven FGFR-Inhibitor Infigratinib (NVP-BGJ-398) allein und in Kombination mit 5-Fluoruracil behandelt. Es werden dabei folgende Ziele verfolgt:

- Charakterisierung zytokinabhängiger Proliferationsinhibition humaner BxPC-3- und PSC-Zellen (Klon 2.2) nach Exposition von Dovitinib oder Infigratinib, allein oder in Kombination mit 5-Fluoruracil.
- Semiquantitative Bestimmung der Erk1/2 -Inhibition mittels Westernblotmethodik.
- Durchflusszytometrische Analysen zur Caspase-3 abhängigen Apoptoseinduktion und zum Zellzyklusarrest von BxPC-3- und PSC-Zellen (Klon 2.2) nach Dovitinib oder Infigratinib +/- 5-Fluoruracil.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Allgemeine Materialien

Pipettierhilfe groß	Pipetting aid, Gilson, USA
Pipettierhilfe klein	Eppendorf Reference 10 (1-10µl); Eppendorf Research 100 (10-100µl); Eppendorf Research 1000 (100µl – 1000µl); Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Einmal-Pipettenspitzen	Cellstar serological Pipette, steril (5ml; 10ml; 25ml; 50ml); Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Einmal-Pipettenspitzen	TipOne graduated Tip (10µl; 100µl; 1000µl); Starlab, Hamburg, Deutschland
Eppendorftubes	Safelock tubes (1,5ml; 2,0ml); Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylene Conical Tubes	Cellstar tubes (15ml; 50ml); Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge klein	Biofuge A; Heraceus, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge groß	Biofuge primo R; Heraceus, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	MDF-DU500VH-PE VIP ECO Ultratiefkühlgerät; Biomedical Sales Europe, Den Haag, Niederlande
Gefrierschrank -20°C/ Kühlschrank 4°C	NordCap; NordCap GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Abzug	Abzug nach DIN 12924; Prutscher Laboratory Systems GmbH, Neudörfel, Österreich

## 2.2 Spezielle Materialien und Methoden

### 2.2.1 Zellkultur und Zelllinien

Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37,0°C und 5,0% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden in einem ihren Bedürfnissen entsprechendem Nährmedium (genaue Zusammensetzung siehe unten) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage bzw. am Tag vor einem Versuchsansatz. Es wurde darauf geachtet, dass die Experimente immer in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen durchgeführt wurden. Hierfür wurden die Vitalität und das Wachstum der Zellen regelmäßig mittels Trypanblau-Färbung überprüft.

#### 2.2.1.1 Pankreatische Adenokarzinomzellen

Als pankreatische Adenokarzinomzellen wurde die Zelllinie BxPC-3 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) verwendet. Die BxPC-3-Zelllinie besteht aus humanen pankreatischen Adenokarzinomzellen, die aus Tumorzellen einer 61-jährigen weißen Frau etabliert wurden. BxPC-3 exprimiert CEA, PCAA und PaA als typische Antigene des duktales Pankreaskarzinoms (Tan et al., 1986).

#### 2.2.1.2 Pankreatische Sternzellen

Die verwendeten pankreatischen Sternzellen („Klon 2.2“) wurden von einer Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Mannheim isoliert und kultiviert (Jesnowski et al., 2005).

#### 2.2.1.3 Kulturmedium

##### Gesamtansatz 500 ml:

449,5 ml	Dulbecco's modified Eagle's Medium 1X (DMEM) (GIBCO), Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
50 ml	FBS (Fetales Bovines Serum) (GIBCO), Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
500 µl	Gentamicin Reagent Solution (50 mg/ml) flüssig (GIBCO), ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland

### **Spezielle Materialien und Geräte:**

Kulturflaschen	Cell Star Tissue Culture Flacs, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Tiefe 0,1mm; 0,0025mm <sup>2</sup> ; BLAUBRAND, Wertheim, Deutschland
Brutschrank	Hera Cell, Heraceus, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Mikroskop	Leica DMIL; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Trypan Blue Solution (0,4%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe, Heraceus, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Kryoröhrchen	Cryo.S; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

## **2.2.2 Therapeutika**

### **2.2.2.1 5-Fluoruracil (5-FU) und 5-desoxy-Fluoruracil (5-dFU)**

5-FU wurde zunächst in DMSO als 100mM-Stocklösung gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Für die Experimente wurde die Stocklösung entsprechend weiter verdünnt. Analog zu 5-FU wurden die Experimente auch mit dem klinisch aktiven Fluoropyrimidinmetabolit 5-dFU durchgeführt. Da sich die Ergebnisse hierbei nicht wesentlich von den Ergebnissen der Experimente mit 5-FU unterschieden, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine Darstellung verzichtet.

### **Spezielle Materialien und Geräte:**

5-FU	5-Fluorouracil, ≥99% Pulver; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-dFU	Capecitabin ≥98% Pulver; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Dimethyl Sulfoxid ≥99%; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland



### 2.2.2.2 TKI-258 (Dovitinib)

TKI-258 wurde zunächst in DMSO als 55mM-Stocklösung gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Für die Experimente wurde die Stocklösung entsprechend weiter verdünnt.

#### **Spezielle Materialien und Geräte:**

TKI-258	Dovitinib (TKI-258, CHIR-258); Selleck Chemicals, Houston, USA
DMSO	Methyl Sulfoxid $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.2.2.3 NVP-BGJ-398 (Infigratinib)

NVP-BGJ-398 wurde zunächst in DMSO als 30mM-Stocklösung gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Für die Experimente wurde die Stocklösung entsprechend weiter verdünnt.

#### **Spezielle Materialien und Geräte:**

NVP-BGJ-398	Infigratinib; Selleck Chemicals, Houston, USA
DMSO	Dimethyl Sulfoxid $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2.2.3 Zellviabilitäts-Assays

### 2.2.3.1 WST-1-Zellviabilitäts-Assay

Der WST-1-Assay ermöglicht die Quantifizierung von Zellproliferation und somit auch von Proliferationsinhibition. Die Grundlage des WST-1-Assays ist der Nachweis einer intakten Atmungskette. Hierzu wird ein wasserlösliches Tetrazolium-Salz (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene-disulfonat) verwendet, welches durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan reduziert werden kann, wodurch eine dunkelrote Färbung entsteht (Peskin and Winterbourn, 2000).

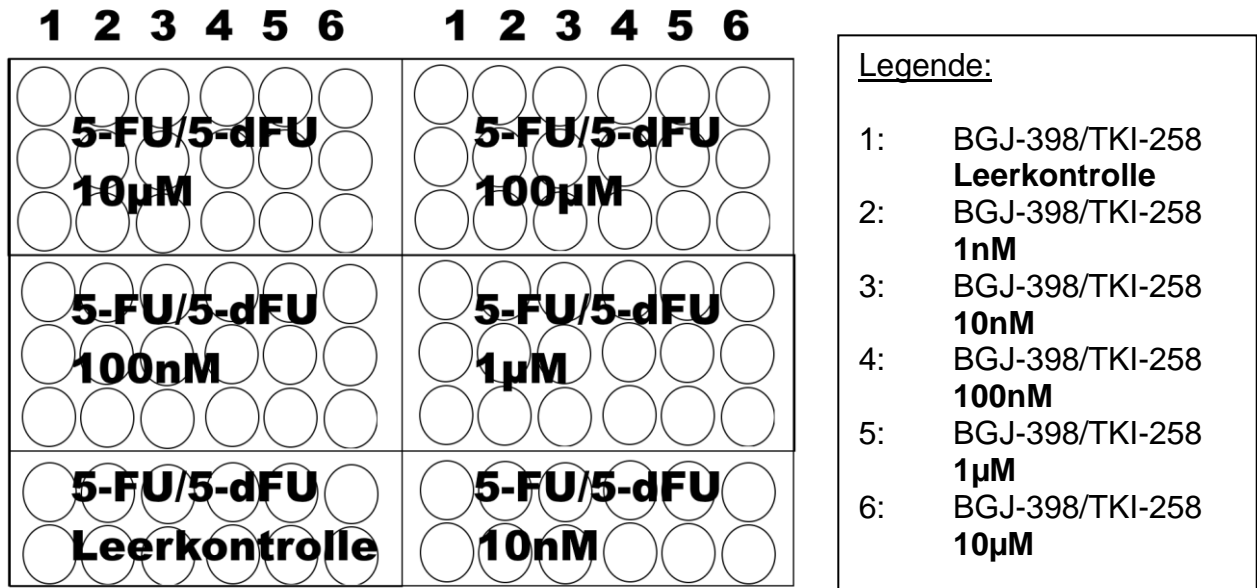
Formazan hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420-480nm. Die photometrisch gemessene Absorption ist somit proportional zur Aktivität der Atmungskette und zur Anzahl der vitalen Zellen. Die Zellen wurden hierzu auf Mikrotiterplatten mit 96 wells ausgesät. Es wurden jeweils 5000 Zellen pro well ausgesät.

Nach 24h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen nach dem Beimpfungsschema behandelt, welches in Tab. 1 & Abb. 1 dargestellt ist. Nach 48 h wurden in jeden well 10µl der WST1-Lösung hinzu pipettiert. Nach 1h und 2h wurde die photometrische Messung mittels Mikroplate-Readers durchgeführt. Aus den photometrischen Messwerten der unbehandelten Kontrollen wurde ein Vergleichswert gebildet, der im Vergleich mit den Messwerten der anderen Therapieschemata die Ermittlung der relativen Proliferation ermöglichte:

$$\text{Relative Proliferation Well x [\%]} = \frac{\text{photometrischer Messwert Well x}}{\text{Durchschnittlicher photometrischer Messwert Leerkontrollen}}$$

<b>WIRKSTOFFKONZENTRATION (IM WELL)</b>	<b>VERWENDETE STOCKLÖSUNGEN</b>
<b><u>5-FU/ 5-DFU</u></b>	
<b>10 nM</b>	10 µl 120nM 5-dFU/5-FU (verdünnt in Zellmedium)
<b>100 nM</b>	10 µl 1,2 µM 5-dFU/5-FU (verdünnt in Zellmedium)
<b>1µM</b>	10 µl 12 µM 5-dFU/5-FU (verdünnt in Zellmedium)
<b>10µM</b>	10 µl 120 µM 5-dFU/5-FU (verdünnt in Zellmedium)
<b>100µM</b>	10 µl 1200 µM 5-dFU/5-FU (verdünnt in Zellmedium)
<b>LEERKONTROLLE</b>	10 µl DMSO (1,2%-ig verdünnt in Zellmedium)
<b><u>TKI-258/BGJ-398</u></b>	
<b>1 nM</b>	10 µl 12nM TKI-258/BGJ-398 (verdünnt in Zellmedium)
<b>10 nM</b>	10 µl 120nM TKI-258/BGJ-398 (verdünnt in Zellmedium)
<b>100 nM</b>	10 µl 1,2µM TKI-258/BGJ-398 (verdünnt in Zellmedium)
<b>1 µM</b>	10 µl 12µM TKI-258/BGJ-398 (verdünnt in Zellmedium)
<b>10 µM</b>	10 µl 120µM TKI-258/BGJ-398 (verdünnt in Zellmedium)
<b>LEERKONTROLLE</b>	10 µl DMSO (4%-ig verdünnt in Zellmedium)

**Tab. 1: Verdünnungsreihen für WST-1-Proliferationsassays**



**Abb. 1.: Beimpfungsschema für WST-1-Proliferationsassays**

Verdünnungen entsprechend Tab.1

### Spezielle Materialien und Geräte:

WST-1-Reagenz

Cell Proliferation Reagent WST-1;  
Roche Diagnostics GmbH,  
Mannheim, Deutschland

96-wells-plate

Cellstar 96 well cell culture plate, sterile, F-  
bottom; Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen, Deutschland

Mikroplate-Reader/Photometer

Spark<sup>®</sup> 10M; Tecan Trading AG, Männedorf,  
Schweiz

#### **2.2.2.2 Trypanblau-Zellviabilitäts-Assay**

Zur Quantifizierung der Zellviabilität wurde eine Trypanblaufärbung verwendet. Als Grundlage dieser Färbung dient der anionischer Diazo-Farbstoff Trypanblau, welcher an Proteine bindet und welcher die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann, von avitalen und perforierten Zellen jedoch aufgenommen wird und diese dunkelblau anfärbt. Dies ermöglicht die lichtmikroskopische Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen. Die Zellen wurden hierzu in 5ml Zellmedium auf Petrischalen mit 5cm Durchmesser ausgesät. Hierbei wurden für jedes Therapieschema fünf Petrischalen mit 180.000 Zellen angesetzt. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit 5-FU, BGJ-398, TKI-258 oder Kombinationen daraus behandelt. Die verwendeten Therapieschemata sind in Tab. 2 beschrieben. Die Konzentrationen, die in der ersten

Spalte der Tabelle angegeben sind, entsprechen dabei den endgültigen Wirkstoffkonzentrationen in der Petrischale. Es wurden basierend auf den Ergebnissen des WST-I-Proliferationsassays die klinisch relevanten Konzentrationen von jeweils 1µM für NVP-BGJ-398 und TKI-258, 10µM für 5-FU und 15µM für 5-dFU gewählt. Anschließend wurden die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 48 h, 96 h, 144h, 192h und 240h wurde von jedem Therapieschema die Zellen einer Petrischale mit Trypsin abgelöst und in eine Zelllösung überführt. Die Zelllösung wurde mit Trypanblau angefärbt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus der Zellzahl, dem Verdünnungs- und dem Kammerfaktor kann die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden. Für die Berechnung der Wachstumsinhibition im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurden die Mittelwerte der Zellzahlen der unbehandelten Kulturen an den jeweiligen Messtagen gebildet und diese in Relation zu dem Mittelwert der jeweiligen Wirkstoffkonzentration(en) zu einem bestimmten Zeitpunkt gesetzt. Für die Bestimmung der Proliferationsinhibition der behandelten Zellkulturen im Vergleich zum Ausgangswert wurden die ermittelten Messwerte jeweils in Relation zur Anzahl der initial ausgesäten Zellen gesetzt.

<b>THERAPIESCHEMATA TRYPANBLAU-ZELLPROLIFERATIONS-ASSAY</b>		
<b>LEERKONTROLLE</b>	200 µl Zellmedium	
<b>5- FLUORURACIL (10µM 5-FU)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl Zellmedium
<b>5-DESOXY- FLUORURACIL (15µM 5-DFU)</b>	100 µl 5-dFU (780 µM)	100 µl Zellmedium
<b>BGJ-398 (1µM BGJ-398)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>TKI-258 (1µM TKI-258)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl TKI-258 (52 µM)
<b>5-FU + BGJ-398 (10µM 5-FU + 1µM BGJ-398)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>5-FU + TKI-258 (10µM 5-FU + 1µM TKI-258)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl TKI-258 (52 µM)
<b>5-DFU + BGJ-398 (15µM 5-FU + 1µM BGJ-398)</b>	100 µl 5-dFU (780 µM)	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>5-DFU + TKI-258 (15µM 5-FU + 1µM TKI-258)</b>	100 µl 5-dFU (780 µM)	100 µl TKI-258 (52 µM)

**Tab. 2: Therapieschemata Trypanblau-Zellproliferations-Assay**

### **Spezielle Materialien und Geräte:**

Trypanblau-Lösung	Trypan Blue Solution (0,4%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Petrischalen	Cellstar CellCulture Dishes; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

## **2.2.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie**

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie basiert auf der Emission von Fluoreszenzfarben durch Zellen, die an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Die Zellen werden hierzu mit Farbstoffen oder Antikörpern gefärbt und in einem Mikrokanal an dem Laser vorbeigeführt. Mit Hilfe von Detektoren werden die angefärbten Zellen, die das spezifische Fluoreszenzsignal absondern, gemessen. Durch den konstanten Fluss der Zellen können in kurzer Zeit viele Zellen bezüglich eines Merkmals quantifiziert werden.

### **2.2.3.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie**

Als Nachweis Caspase-abhängiger Apoptoseinduktion durch die verwendeten Therapeutika wurde eine Caspase-3-Färbung verwendet. Die 13 unterschiedlichen, beim Menschen bekannten, Caspasen gelten als wichtigste Effektoren für den intrazellulären Ablauf der Apoptose (Lamkanfi et al., 2007).

Sie werden in Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. Die Effektorcaspasen liegen zunächst als Procaspasen vor und werden durch die Initiatorcaspasen mittels proteolytischer Spaltung aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade und über verschiedene Mediatoren (poly-ADP ribose polymerase, P 21-activated kinase 2, etc.) zur Einleitung des programmierten Zelltods. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Caspase 3-Aktivität wurde in den Versuchen, die in dieser Arbeit beschrieben sind, ein handelsübliches Kit (siehe unten) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (BxPC-3 bzw. Klon2.2), die entsprechend der in Tab. 3 beschriebenen Therapieschema für 48 h inkubiert wurden, zweimal mit 2000 $\mu$ l kaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 $\mu$ l Cytifix/Cytopermlösung resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (1000 U/min, 3Min.) wurden die Zellen zweimal mit Permwash-Puffer

(1x) gewaschen und in 600µl der gleichen Lösung erneut resuspendiert. Nach Zugabe von 20µl Anti-Caspase-3-FITC-Antikörper wurden die Proben für 30 Minuten vor Licht geschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kalibrierungsprobe wurde eine Negativkontrolle aus unbehandelten Zellen ohne FITC-Antikörperfärbung, verwendet. Als Positivkontrolle dienten BxPC-3 bzw. Klon2.2-Zellen, die für 48 Stunden mit 5-FU [300µM] inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1000µl PermWash-Puffer (1x) wurden die Zellen in weiteren 500µl dieses Puffers aufgenommen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Die Intensität der gemessenen FITC-Fluoreszenz wurde im Kanal FL1-H quantifiziert. Signalintensitäten größer  $10^2$  wurden nach Kalibrierung mit der Negativkontrolle als positiv definiert und im prozentualen Verhältnis zur Gesamtdetektion ausgewertet.

<b>THERAPIESCHEMATA FACS-ANALYSE</b>		
<b>LEERKONTROLLE</b>	200 µl Zellmedium	
<b>POSITIVKONTROLLE (300µM 5-FU)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl 5-FU (15,6 mM)
<b>5-FLOUROURACIL (10µM 5-FU)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl 5-FU (520 µM)
<b>BGJ-398 (1µM BGJ-398)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>TKI-258 (1µM TKI-258)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl TKI-258 (52 µM)
<b>5-FU + BGJ-398 (10µM 5-FU + 1µM BGJ-398)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>5-FU + TKI-258 (10µM 5-FU + 1µM TKI-258)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl TKI-258 (52 µM)

**Tab. 3: Therapieschema durchflusszytometrische Analyse der Caspase-Aktivität und des Zellzyklus**

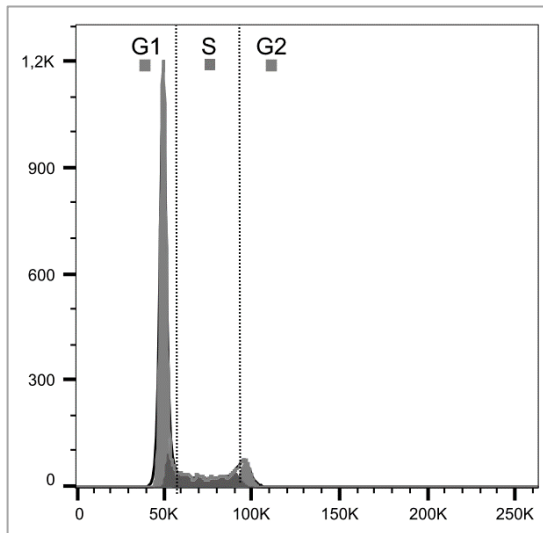
**Spezielle Materialien und Geräte:**

Caspase-3-Antikörper-Kit	FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACS-Tubes	Rundbodenröhrchen, Polystyrol 5ml; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACS-Gerät	BD FACS Canto II; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACS-Software	BD FACSDiva; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

**2.2.3.2 Zellzyklusanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie**

Als Nachweis von Auswirkungen der verwendeten Therapeutika auf den Zellzyklus der behandelten Zellen wurde eine Propidiumiodid-Färbung verwendet. Propidiumiodid dringt nach Fixierung der Zellen in Ethanol und sterilem Natriumchlorid (0,9%) durch die Zellmembran ein und interkaliert mit intrazellulärer Doppelstrang-DNA. Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, dessen Emission bei einer Wellenlänge von 630nm gemessen werden kann, wenn er an Doppelstrang-DNA gebunden ist (Crissman and Steinkamp, 1973; Krishan, 1975). In der G1-Phase des Zellzyklus verfügen Zellen über den einfachen DNA-Satz. Zellen in der G2-Zellzyklusphase enthalten den doppelten Satz genomischer DNA. In der DNA-Synthesephase (S-Phase) erfolgt die Verdopplung des DNA-Satzes, sodass der DNA-Gehalt der Zellen zwischen dem einfachen und dem doppelten DNA-Satz liegt. Dieses Analyseverfahren diente in der vorliegenden Arbeit der semiquantitativen Bestimmung der Zellproliferationsrate. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  Zellen, die entsprechend der in Tab. 3 beschriebenen Therapieschema für 48 h inkubiert wurden, zweimal mit 2000  $\mu$ l sterilem PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 U/min, 3 min) und anschließend mit 500  $\mu$ l Ethanol [95%] und 500  $\mu$ l sterilem Natriumchlorid [0,9%] fixiert. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in PBS (1000  $\mu$ l) resuspendiert und mit 5  $\mu$ l RNase versetzt. Zur Beseitigung interferierender RNA wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis (4°C Probertemperatur) gelagert und 100  $\mu$ l Propidium Iodid hinzugegeben. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte bei einer Wellenlänge von 630 nm. Dabei wurden Zellen mit einer Signalintensität von

$5 \cdot 10^3$  der G1-Zellzyklusphase zugeordnet, Zellen mit einer Signalintensität von  $1 \cdot 10^4$  der G2-Zellzyklusphase, Zellen mit einer Signalintensität zwischen  $5 \cdot 10^3$  und  $1 \cdot 10^4$  wurden der S-Zellzyklusphase zugeordnet. Die Messung der Proben erfolgte mit Hilfe des Programms BD FACSDiva und die Auswertung der Zellzyklusphasen erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo.



**Abb. 2.: Aufteilung FACS-Daten nach Zellzyklusstadien mittels FlowJo**

Basierend auf den Ergebnissen des WST-I-Proliferationsassays wurde für NVP-BGJ-398 und TKI-258 die klinisch relevanten Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  und für 5-FU die Dosis  $10 \mu\text{M}$  gewählt. Es wurden jeweils drei unabhängige Ansätze für BxPC-3-Zellen und Klon2.2-Zellen untersucht.

**Spezielle Materialien und Geräte:**

Propidiumiodid	Propidium Iodid Lösung in Wasser 1,0mg/ml; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
PBS	Life Technologies (GIBCO) PBS pH 7,4; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
RNase	RNase A (DNase und Protease-frei) 10mg/ml; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland



FACS-Tubes	Rundbodenröhrchen, Polystyrol 5ml; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACS-Gerät	BD FACS Canto II; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FlowJo	FlowJo LLC; Ashland, Oregon, USA
BD FACSDiva	BD Biosciences; San Jose, CA, USA

## 2.2.5 Proteinchemische Methoden

Zur Analyse exprimierter Proteine wurden die untersuchten Zellen zunächst lysiert, die Lysate mittels SDS-Page-Gelelektrophorese aufgetrennt, die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und die zu untersuchenden Proteine abschließend mit Antikörpern markiert und mittels Immundetektion dargestellt.

### 2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten zur Proteinanalyse

Entsprechend der Vorbereitung der Zellen für die Caspase-Aktivitätsbestimmung wurden Zellen ausgesät und behandelt. Nach der Beimpfung anhand des in Tab.4 beschriebenen Therapieschemas wurden die Zellen für 48 h inkubiert und dann trypsinisiert und gewaschen.

<b>THERAPIESCHEMATA WESTERN BLOT</b>		
<b>LEERKONTROLLE</b>	200 µl Zellmedium	
<b>FBS 10%</b>	180 µl Zellmedium	20 µl FBS
<b>5-FLOUROURACIL (10µM 5-FU)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl 5-FU (520 µM)
<b>BGJ-398 (1µM BGJ-398)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>TKI-258 (1µM TKI-258)</b>	100 µl Zellmedium	100 µl TKI-258 (52 µM)
<b>5-FU + BGJ-398 (10µM 5-FU + 1µM BGJ-398)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl BGJ-398 (52 µM)
<b>5-FU + TKI-258 (10µM 5-FU + 1µM TKI-258)</b>	100 µl 5-FU (520 µM)	100 µl TKI-258 (52 µM)

**Tab.4 Therapieschema Western Blot**

Anschließend wurde aus den so isolierten Zellen Lysate hergestellt. Die Arbeitsschritte erfolgten dabei auf Eis, um zelluläre Enzyme wie Proteasen und Phosphatasen zu deaktivieren und so einen Abbau der zellulären Proteine zu vermeiden. Die Zellen wurden für 5 Minuten auf Eis mit RIPA-Buffer, dem Proteinase-Inhibitor hinzugefügt war, inkubiert. Das entstandene Lysat wurde mit Hilfe eines Ultraschall-Sonifiers homogenisiert und abschließend bis zur Weiterverarbeitung bei - 80° C gelagert.

<b>REZEPTUR LYSE-PUFFER</b>	
<b>RIPA-BUFFER</b>	1-fach konzentrierte Lösung: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mM Trics-HCl (pH 8,0)</li> <li>- 1 mM EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure)</li> <li>- 0,5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure)</li> <li>- 1 % Triton X-100</li> <li>- 0,1 % Natrium-deoxycholat</li> <li>- 0,1 % SDS (Natriumlaurylsulfat)</li> <li>- 140 mM NaCl</li> </ul>
<b>PROTEINASEINHIBITOR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)</li> </ul> -> direkt vor Gebrauch hinzufügen

**Tab. 5: Lyse-Puffer**

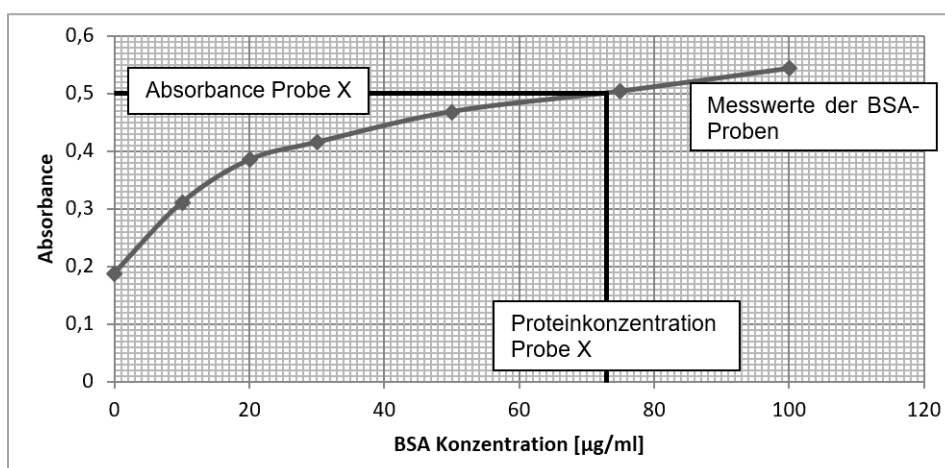
**Spezielle Materialien und Geräte:**

FBS	Life technologies (GIBCO) Standard FBS (Fetales Bovines Serum); ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Tris	Tris Base (≥99,9%); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCl	HCl 37%; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Na-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um in der anschließenden SDS-Page-Gelelektrophorese gleiche Mengen Protein auftragen zu können, wurde die Proteinkonzentration der Zellysate photometrisch mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Grundlage dieser Methode ist eine spezifische Farbreaktion. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau hat ungebunden ein Absorptionsmaximum bei 465nm Wellenlänge. Mit Proteinen bildet er Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595nm Wellenlänge aufweisen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde jeweils 1 µl der Zellysate mit 800 µl aqua dest und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und über 10 Minuten inkubiert. Im Spektralphotometer erfolgte die Messung der Extinktion der Proben bei 595nm. Als Leerwert kam ein substratfreier Ansatz mit 800 µl aqua dest und 200 µl Bradford-Reagenz zum Einsatz. Zur Kalibrierung des Photometers wurde eine Konzentrationsreihe mit Hilfe einer Standard BSA-Protein-Lösung erstellt. Anhand der Absorptionswerte der BSA-Standardlösungen wurde die Proteinkonzentrationen der Zellysate graphisch entsprechend Abb. 3 ermittelt.



**Abb. 3.: Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Graphische Bestimmung der Proteinkonzentration

### **Spezielle Materialien und Geräte:**

Bradford Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Photometer	Spark <sup>®</sup> 10M; Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

### **2.2.5.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der zellulären Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:3 mit SDS-Probenpuffer gemischt und die Mischung für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und sie an SDS zu binden. Dabei wird die intrinsische Ladung der Proteine verdeckt, sodass die Proteine/Polypeptide, die durch das SDS gleichmäßig negativ geladen sind, bei der anschließenden Elektrophorese entsprechend der elektrischen Spannung Richtung Anode wandern und aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt werden. Kleinere Polypeptide und Proteine bewegen sich dabei weiter im Gel als größere. Es wurden jeweils identische Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben und ein Referenzmarker in die Taschen des Elektrophoresegels aufgebracht, das Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht und eine Spannung von 125 V und eine Stromstärke von 200 mA angelegt. Die Auftrennung der Proteine in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer wurde solange durchgeführt bis der 37kD Molekulargewichtsstandard den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Als Laufpuffer wurde Tris-Glycine SDS Buffer verwendet. Die Rezeptur ist in Tab. 6 aufgeführt.

<b>REZEPTUREN DER VERWENDETEN PUFFER</b>	
<b>LAUFPUFFER (TRYS-GLYCINE SDS RUNNING BUFFER)</b>	10-fach konzentrierte Lösung: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 250 mM Tris (Tris-Aminomethan)</li> <li>- 1,92 M Glycin</li> <li>- 1 % SDS (Natriumlaurylsulfat)</li> <li>- Aqua dest</li> </ul>
<b>PROBENPUFFER (SDS PROTEIN SAMPLE BUFFER)</b>	4-fach konzentrierte Lösung: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 40 % Glycerol</li> <li>- 240mM Tris/HCl (pH 6,8)</li> <li>- 8% SDS</li> <li>- 0,04 % Bromophenol Blau</li> <li>- 5% beta- <math>\beta</math>-Mercaptoethanol</li> <li>- Aqua dest</li> </ul>

**Tab. 6: Rezeptur Lauf- und Probenpuffer SDS-Page-Gelelektrophorese**

**Spezielle Materialien und Geräte:**

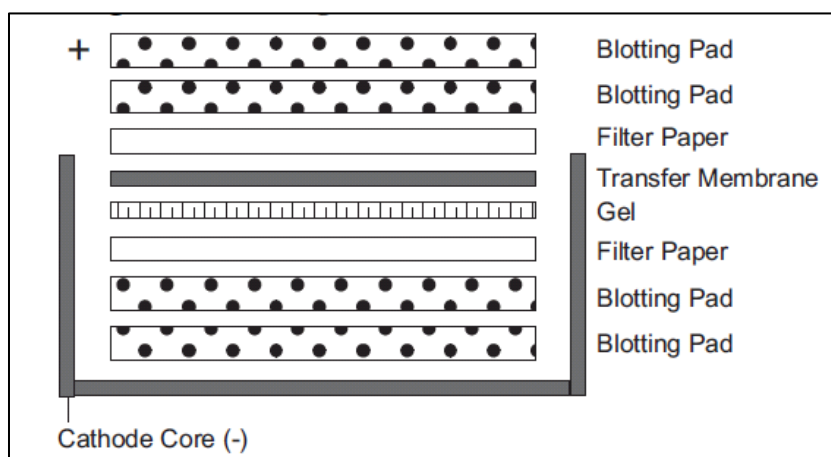
Elektrophorese-Gele	Invitrogen Novex 4-20% Tris-Glycine 12 well Gele; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Referenzmarker	Life technologies SeeBlue Pre-Stained Protein Standard; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Tris	Tris Base ( $\geq 99,9\%$ ); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromophenol Blau	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

$\beta$ -Mercaptoethanol

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe,  
Deutschland

### 2.2.5.4 Western-Blot-Proteintransfer

Zur weiteren Analyse der gelelektrophoretisch aufgespaltene Proteine wurden diese mit Hilfe eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Felds auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen. Hierzu wurde eine Spannung von 25 V für 60 Minuten angelegt. Der Aufbau während des Transfers in der Kammer ist in Abb. 4 dargestellt, die Rezeptur für den Transfer-Puffer findet sich in Tab. 7.



**Abb. 4.: Aufbau während Proteintransfer**

aus "Invitrogen (2009): XCell II™ Blot Module Catalog no. EI9051 – User Manual."

Online:[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fblotmod\\_pro.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fblotmod_pro.pdf) Stand: 22.01.2022.

REZEPTUREN DER VERWENDETEN PUFFER	
<b>TRANSFERPUFFER (NOVEX© TRIS- GLYCINE TRANSFER BUFFER)</b>	25-fach konzentrierte Lösung: - 300mM Tris - 2,40 M Glycin - Aqua dest

**Tab. 7: Rezeptur Western-Blot Transferpuffer**

**Spezielle Materialien und Geräte:**

Elektrophorese-Kammer	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Blot-Modul	XCell II Blot Module; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
PVDF Membran	PVDF Transfer Membrane, 0.45 µm; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Tris	Tris Base (≥99,9%); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

**2.2.5.5 Immundetektion**

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran zunächst mit einer Blocking Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper in 2% Blocking Lösung inkubiert. Die entsprechende Verdünnung des Antikörpers ist in Tab. 9 aufgeführt. Nach einem Waschschrift mit TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper analog zur Behandlung mit dem primären Antikörper für 60 Minuten inkubiert. Nach erneuten Waschschriften mit TBST und TBS wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Substrat behandelt und die Banden per Chemilumineszenz dargestellt. Die Rezeptur der verwendeten Blocking Lösung ist in Tab. 8, die verwendeten Antikörper in Tab.9 aufgeführt.

<b>REZEPTUREN DER VERWENDETEN BLOCKING LÖSUNG</b>	
<b>TBS</b>	10-fach konzentrierte Lösung <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500mM Tris/HCl (pH 7,4)</li> <li>- 1500mM NaCl</li> <li>- Aqua dest</li> </ul>
<b>TBST</b>	1-fach konzentrierte Lösung <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml TBS (10-fach konzentriert)</li> <li>- 900 ml Aqua dest</li> <li>- 1 ml Tween20</li> </ul>
<b>BLOCKING LÖSUNG</b>	5-fach konzentrierte Lösung <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 ml TBST (1-fach konzentriert)</li> <li>- 2,5 g bovines Serumalbum (BSA)</li> </ul>

Tab. 8: Rezeptur Blocking Lösung Immundetektion

<b>PRIMÄR-ANTIKÖRPER</b>	
<b>ERK</b>	Santa Cruz Biotechnology © ERK 1 (C-16): sc-93 (Kaninchen) Molekulargewicht: ERK-1: 44kDa; ERK-2: 42kDa; Verdünnung: 1:200
<b>P-ERK</b>	Santa Cruz Biotechnology © p-ERK (E-4): sc-7383 (Maus) Molekulargewicht: p-ERK-1: 44kDa; p-ERK-2: 42kDa; Verdünnung: 1:200
<b>P21</b>	Santa Cruz Biotechnology © p21 (187): sc-817 (Maus) Molekulargewicht: p21: 21kDa; Verdünnung: 1:50
<b>PCNA</b>	Santa Cruz Biotechnology © PCNA (PC10): sc-56 (Maus) Molekulargewicht: PCNA: 36kDa; Verdünnung: 1:50
<b>CYCLIN-E</b>	Santa Cruz Biotechnology © Cyclin-E (HE12): sc-247 (Maus) Molekulargewicht: Cyclin-E: 53kDa; Verdünnung: 1:50
<b>SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER</b>	
<b>FÜR P-ERK, P21, PCNA UND CYCLIN-E</b>	DAKO Rabbit Anti-Mouse Code No. P 0260 Lot 097 Verdünnung: 1:1000
<b>FÜR ERK</b>	DAKO Swine Anti-Rabbit Code No. P0217 Lot 089 Verdünnung 1:1000

Tab. 9: Antikörper Immundetektion



**Spezielle Materialien und Geräte:**

Electrophorese System	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Geldokumentation	Fusion Solo S; Vilber Lourmat; Eberhardzell, Deutschland
Tris	Tris Base (≥99,9%); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCl	HCl 37%; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

**2.2.5.6 Membran Stripping**

Zur Entfernung der primären und sekundären Antikörper von der PVDF-Membran wurde die Membran zweimalig mit Stripping Puffer für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS und TBST gewaschen und wieder mit Blocking Lösung behandelt. Die Rezeptur der verwendeten Stripping Lösung ist in Tab. 10 aufgeführt.

<b>REZEPTUREN DER VERWENDETEN STRIPPING LÖSUNG</b>	
<b>STRIPPING PUFFER</b>	für 1 l Lösung: - 15 g Glycin - 1 g SDS - 10 ml Tween20 - Aqua dest - pH auf 2,2 puffern mit HCl

**Tab. 10: Rezeptur Stripping Puffer für die Entfernung der Immundetektion-Antikörper von der PVDF-Membran**

**Spezielle Materialien und Geräte:**

Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Tween-20

Merck, Darmstadt, Deutschland

HCl

HCl 37%; Sigma-Aldrich, Steinheim,  
Deutschland

## **2.2.6 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR**

### **2.2.6.1 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland durchgeführt. Die Isolierung erfolgte entsprechend den vom Hersteller vorgegebenen Schritten. Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Menge mittels Spektrophotometer.

### **2.2.6.2 cDNA-Synthese**

Um exprimierte RNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion nachweisen zu können, ist es nötig, die RNA in einsträngige cDNA umzuschreiben. Dies erfolgt mit dem Enzym Reverse Transkriptase. Hierzu wurde das cDNA-Synthese-Kits (Fermentas cDNA Synthesis Kit; ThermoFisher) entsprechend den vom Hersteller vorgegebenen Schritten verwendet.

### **2.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die für die Wachstumsfaktor-Rezeptoren relevanten DNA-Abschnitte aus der cDNA wurden mit Hilfe eines PCR-Cyclers und spezifischen PCR-Primern vervielfacht. Als Referenz-Housekeeping-Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, das als Enzym der Glykolyse in allen kernhaltigen Zellen enthalten ist. Die verwendeten PCR-Primer sind in Tab. 11 aufgeführt.

<b>PCR PRIMER</b>	
<b>FGFR-1</b>	<u>Linker Primer:</u> ggcaaagaattcaaacctgacc <u>Rechter Primer:</u> tccatctctttgtcgggtgt <u>Produktgröße:</u> 392 bp (Basenpaare)
<b>FGFR-2</b>	<u>Linker Primer:</u> ctccggcctctatgcttgta <u>Rechter Primer:</u> gggcagcgaacttgacag <u>Produktgröße:</u> 237 bp
<b>FGFR-3</b>	<u>Linker Primer:</u> atctcctggctgaagaacgg <u>Rechter Primer:</u> gtgcgtcactgtacaccttg <u>Produktgröße:</u> 289 bp
<b>VEGFR-1</b>	<u>Linker Primer:</u> gacctgtgaagcaacagtca <u>Rechter Primer:</u> ctttggcaattcgtgcct <u>Produktgröße:</u> 240 bp
<b>VEGFR-2</b>	<u>Linker Primer:</u> gctggcatggcttctgtg <u>Rechter Primer:</u> aggtctcggttacaagtttct <u>Produktgröße:</u> 248 bp
<b>PDGFR-A</b>	<u>Linker Primer:</u> agaagttccagaccatccca <u>Rechter Primer:</u> ggaccgtcaaagtgtacacc <u>Produktgröße:</u> 246 bp
<b>PDGFR-B</b>	<u>Linker Primer:</u> ggaggtggattctgatgcct <u>Rechter Primer:</u> aagaggaagtcagtcaccgg <u>Produktgröße:</u> 207 bp
<b>GAPDH</b>	<u>Linker Primer:</u> ggagcgagatccctccaaat <u>Rechter Primer:</u> gcgtgtgtcatacttctcatgg <u>Produktgröße:</u> 197 bp

**Tab. 11: Verwendete PCR-Primer mit Eigenschaften**

g = Guanin, a= Adenin, c= Cytosin, t= Thymin, bp = Basenpaare

### 2.2.6.5 Herstellung von Agarose-Gelen

Für die verwendeten Agarose-Gele wurde 1g Agarose in 100 ml TAE-Buffer aufgelöst, dazu wurde die Mischung aufgeköcht. Anschließend wurde 10µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Mischung wurde in eine Gelvorrichtung gegossen und kühlte dort für 20-30 Minuten ab. Für den TAE-Buffer wurde zunächst eine 10-fach konzentrierte Lösung aus 2 mol Tris, 0,13 mol EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und 0,95 mol Essigsäure hergestellt, die auf einen pH von 8,5 gepuffert wurde. Dieses Konzentrat wurde vor der Verwendung mit H<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt.

### 2.2.6.6 Auftrennung der DNA-Abschnitte mittels Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden abschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, hierzu wurden Agarose-Gele verwendet. Es wurde eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 250 mA für 40 Minuten angelegt. Anschließend erfolgte die Auswertung der Gele mittels eines Gel-Dokumentation-Systems.

#### Spezielle Materialien und Geräte:

RNA-Isolierungs-Kit	RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland
cDNA-Synthese-Kit	Fermentas cDNA Synthesis Kit; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Gel-Dokumentation-System	Intas Gel iX Imager; Science Imaging, Göttingen Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Tris Base (≥99,9%); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCl	HCl 37%; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Deutschland

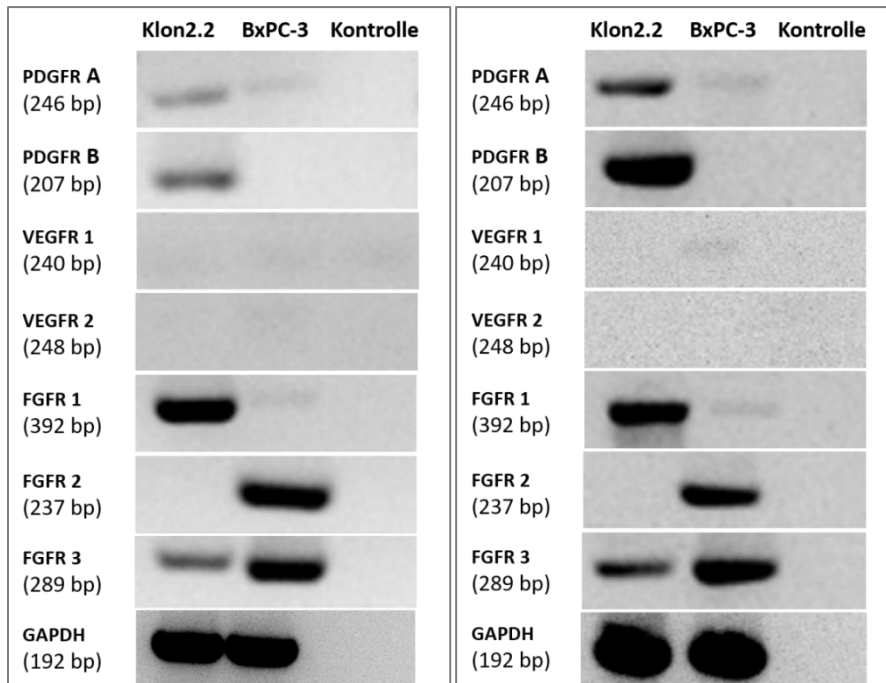
Essigsäure (Ethansäure)                      Essigsäure (>99,5%);                      Sigma-Aldrich,  
Steinheim, Deutschland

### **2.3 Statistische Auswertung**

Die statistischen und graphischen Auswertungen der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe der Programme PSPP (FSF, GNU-Project, USA) und Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, USA). Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus der erhobenen Daten wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Es wurde jeweils von einer gleichen Varianz innerhalb der erhobenen Stichproben ausgegangen. Ab einem p-Wert von <0,05 wurden die Unterschiede zwischen den erhobenen Testwerten als signifikant, ab einem p-Wert von <0,001 als hochsignifikant betrachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Wachstumsfaktor-Rezeptor-Expression



**Abb. 5. a & b: rt-PCR: mRNA-Expression in unbehandelten Klon2.2 (PSC) und BxPC-3-Zellen (Pankreaskarzinom)**

Qualitativer Nachweis der RNA-Expression von PDGF-, VEGF- und FGF-Rezeptoren und GAPDH in unbehandelten Klon2.2 und BxPC-3-Zellen. Darstellung von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten, jeweils mit Leerkontrolle („Kontrolle“).

In Klon2.2-Zellen Nachweis der Expression von PDGFR-A und -B, FGFR-1 und -3 sowie GAPDH. In BxPC-3 Expressionsnachweis von FGFR-2 und -3 sowie GAPDH, weiterhin geringe Expression von PDGFR-A und FGFR-1.

Zum qualitativen Nachweis der Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren in den untersuchten BxPC-3-Zellen (pankreatische Adenokarzinom-Zelllinie) und Klon2.2-Zellen (pankreatische Sternzellen) wurde die mRNA-Expression von FGFR-1, -2 und -3, PDGFR-A und -B, VEGFR-1 und -2 sowie GAPDH als Referenzgen mittels rt-PCR untersucht. Es wurden hierfür unbehandelte Zellen verwendet. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, die in den Abbildungen 5a und 5b dargestellt sind. Die untersuchten BxPC-3-Zellen exprimierten FGFR-2 und FGFR-3 sowie in geringerem Maße FGFR-1. In den Klon2.2-Zellen wurde FGFR-1 und FGFR-3, jedoch kein FGFR-2 detektiert. Tendenziell war die Expression von FGFR-3 in den untersuchten BxPC-3-Zellen stärker als in den Klon2.2-Zellen. Die Klon2.2-

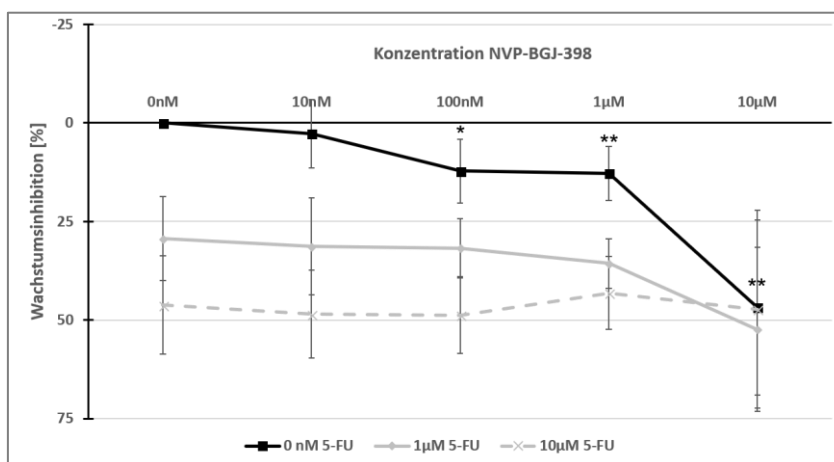
Zellen exprimierten PDGFR-A und -B, während in den BxPC-3-Zellen eine geringe Expression von PDGFR-A detektiert werden konnte.

### 3.2 WST-I-Proliferations-Assay

Mittels WST-I-basiertem Proliferationsassay wurden die antiproliferativen Wirkungen von NVP-BGJ-398 und TKI-258 als Monotherapie sowie als Kombinationstherapie mit 5-FU auf Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) und pankreatische Sternzellen (Klon2.2) bestimmt. Beide Zellreihen wurden jeweils mit eskalierenden Dosen NVP-BGJ-398 bzw. TKI-258 [0nM; 1nM;10nM;100nM;1µM;10µM] und aufsteigenden Dosen 5-FU [0nM; 10nM;100nM; 1µM; 10µM; 100µM] für 48 Stunden inkubiert.

Analoge Versuche wurden ebenfalls mit 5-dFU (5-desoxy-Fluoruracil) durchgeführt. Da sich keine relevanten Unterschiede zur 5-FU-Therapie zeigten, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

#### 3.2.1 Proliferation pankreatischer Karzinomzellen (BxPC-3-Zelllinie) (WST-I-Proliferationsassay)



**Abb. 6.: WST-I-Proliferationsassay: Pankreatische Karzinomzellen (BxPC-3)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **NVP-BGJ-398** allein und in Kombination mit **5-FU**. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 7 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 12.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab 100 nM ( $p < 0,001$ ).

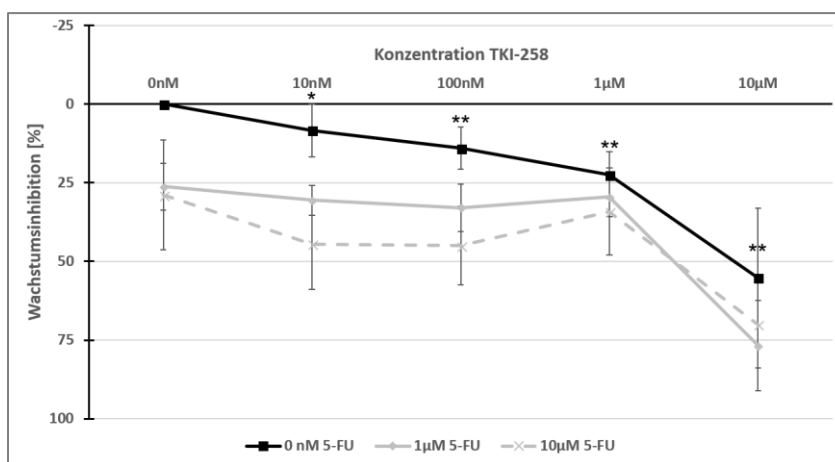
5-FU-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab 1µM ( $p < 0,001$ ).

	BGJ-398 [0nM]	BGJ-398 [10nM]	BGJ-398 [100nM]	BGJ-398 [1µM]	BGJ-398 [10µM]
<b>5-FU [0nM]</b>	0 % [SD <0,01%]	2,7 % [SD = 8,6%]	12,2 % * [SD = 8,1%]	12,8 % ** [SD = 6,8%]	46,8 % ** [SD = 22,2%]
<b>5-FU [10nM]</b>	8,0 % [SD = 7,7%]	10,1 % [SD = 8,3%]	16,3 % [SD = 12,1%]	19,9 % [SD = 9,5%]	41,6 % [SD = 20,0%]
<b>5-FU [100nM]</b>	2,4 % [SD = 9,5%]	9,3 % [SD = 8,9%]	11,3 % [SD = 6,9%]	16,2 % [SD = 6,8%]	49,2 % [SD = 27,9%]
<b>5-FU [1µM]</b>	29,3 % [SD = 10,6%]	31,3 % [SD = 12,3%]	31,8 % [SD = 7,6%]	35,7 % [SD = 6,3%]	52,4 % [SD = 20,8%]
<b>5-FU [10µM]</b>	46,2 % [SD = 12,5%]	48,5 % [SD = 11,1%]	48,7 % [SD = 9,7%]	43,2 % [SD = 9,3%]	47,2 % [SD = 25,1%]
<b>5-FU [100µM]</b>	68,6 % [SD = 6,7%]	69,4 % [SD = 6,3%]	69,5 % [SD = 5,8%]	69,3 % [SD = 5,9%]	71,1 % [SD = 16,0%]

**Tab. 12: WST-I-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **NVP-BGJ-398** allein und in Kombination mit **5-FU**. Abgebildet sind die Daten aus 7 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie



**Abb. 7.: WST-I-Proliferationsassay: Pankreatische Karzinomzellen (BxPC-3)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **TKI-258** allein und in Kombination mit **5-FU**. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 7 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 13.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

TKI-258-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab 10nM ( $p=0,02$ ).

5-FU-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab 1µM ( $p < 0,001$ ).



	TKI-258 [0nM]	TKI-258 [10nM]	TKI-258 [100nM]	TKI-258 [1µM]	TKI-258 [10µM]
<b>5-FU [0nM]</b>	0 % [SD <0,01%]	8,4 % * [SD = 8,4%]	14,0 % ** [SD = 6,8%]	22,5 % ** [SD = 7,5%]	55,3 % ** [SD = 22,3%]
<b>5-FU [10nM]</b>	8,1 % [SD = 9,3%]	10,6 % [SD = 5,9%]	10,4 % [SD = 8,4%]	28,6 % [SD = 4,8%]	77,8 % [SD = 12,6%]
<b>5-FU [100nM]</b>	3,4 % [SD = 11,2%]	7,9 % [SD = 12,9%]	12,3 % [SD = 9,0%]	24,7 % [SD = 7,6%]	56,5 % [SD = 21,7%]
<b>5-FU [1µM]</b>	26,3 % [SD = 7,4%]	30,5 % [SD = 4,8%]	32,9 % [SD = 7,6%]	29,6 % [SD = 6,3%]	76,8 % [SD = 14,3%]
<b>5-FU [10µM]</b>	28,9 % [SD = 17,4%]	44,5 % [SD = 14,4%]	45,0 % [SD = 12,5%]	34,2 % [SD= 13,8%]	70,1 % [SD = 13,8%]
<b>5-FU [100µM]</b>	57,1 % [SD = 10,9%]	58,2 % [SD = 8,8%]	59,7 % [SD = 9,1%]	55,0 % [SD= 10,4%]	76,3 % [SD = 11,1%]

**Tab. 13: WST-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **TKI-258** allein und in Kombination mit **5-FU**.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

### 3.2.1.1 NVP-BGJ-398 als Monotherapie und in Kombination mit 5-FU (BxPC-3-Zelllinie) nach 48 Stunden (WST-I-Proliferationsassay)

#### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

In den BxPC-3-Zellen, die über 48 Stunden mit NVP-BGJ-398 behandelt wurden, zeigte sich ab einer Konzentration von 100nM eine signifikante Inhibition des Zellwachstums ( $p=0,002$ ). Der Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen und den Zellen, die mit NVP-BGJ-398 [100nM] über 48 Stunden behandelt wurden, betrug 12,2% [SD=8,1%;  $p=0,002$ ]. Der Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der mit NVP-BGJ-398 [1µM] (klinisch relevanter Dosisbereich) behandelten BxPC-3-Zellen betrug 12,8% [SD=6,8%;  $p < 0,001$ ].

#### ***5-FU-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

5-FU als Monotherapie zeigte nach 48 Stunden Inkubation ab einer Konzentration von 1µM eine Proliferationshemmung von 29,3% [SD=10,6%,  $p < 0,001$ ].

### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen***

In den BxPC-3-Zellen, die mit einer Kombination aus NVP-BGJ-398 und 5-FU [1µM] behandelt wurden, konnte eine zusätzliche Proliferationshemmung gegenüber der 5-FU-Monotherapie erst ab einer klinisch nicht relevanten NVP-BGJ-398-Konzentration von  $\geq 10\mu\text{M}$  festgestellt werden.

### **3.2.1.2 TKI-258 als Monotherapie (BxPC-3-Zelllinie) und in Kombination mit 5-FU über 48 Stunden (WST-I-Proliferationsassay)**

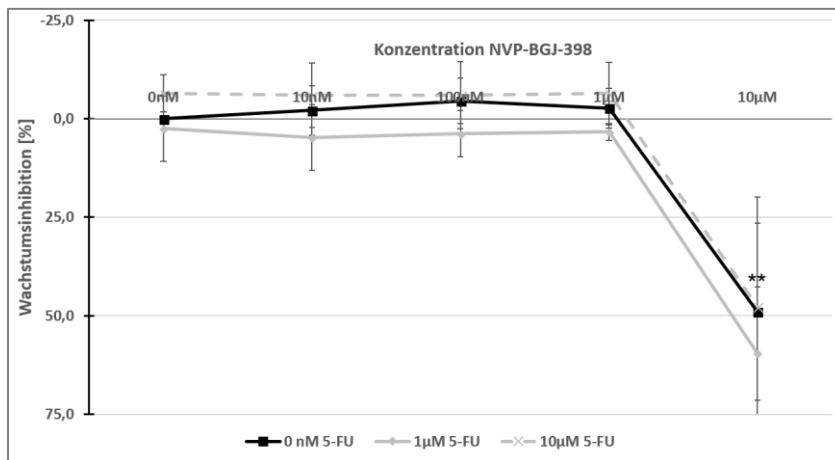
#### ***TKI-258-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

TKI-258 als Monotherapie zeigte ab einer Konzentration von 10nM eine signifikante Proliferationsinhibition von 8,4% [SD=8,4%,  $p=0,02$ ]. Weiterhin zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Wachstumshemmung. So betrug die Proliferationsinhibition bei einer Konzentration von 100nM 14,0% (SD=6,8%;  $p<0,001$ ), bei der höchsten getesteten klinisch relevanten Konzentration von 1µM 22,5% (SD=7,5%,  $p<0,001$ ) und bei der klinisch nicht relevanten Konzentration von 10µM 55,3% (SD=22,3%,  $p<0,001$ ).

#### ***5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen***

Für die BxPC-3-Zellen, die mit TKI-258 und 5-FU (Konzentration  $\geq 1\mu\text{M}$ ) über 48 Stunden inkubiert wurden, wurde eine signifikante zusätzliche Wachstumshemmung gegenüber der 5-FU-Monotherapie erst ab einer Konzentration von 10µM beobachtet (klinisch nicht relevant).

### 3.2.2 Proliferation pankreatischer Sternzellen (Klon 2.2) (WST-I-Proliferationsassay)



**Abb. 8.: WST-I-Proliferationsassay: Pankreatische Sternzellen (Klon2.2)**

Inkubation der pankreatischen Sternzellen (Klon2.2-Zellen) über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **NVP-BGJ-398** allein und in Kombination mit **5-FU**.

Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 5 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 14.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab  $10\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ).

5-FU-Monotherapie: Proliferationsinhibition ab  $100\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Zusätzliche Proliferationsinhibition

NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie: zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber 5-FU-Monotherapie ab  $10\mu\text{M}$  NVP-BGJ-398 für alle 5-FU Dosen

	BGJ-398 [0nM]	BGJ-398 [10nM]	BGJ-398 [100nM]	BGJ-398 [1µM]	BGJ-398 [10µM]
<b>5-FU [0nM]</b>	0 % [SD <0,01%]	- 2,1 % [SD = 6,2%]	-4,5 % [SD = 5,7%]	-2,7 % [SD = 5,0%]	49,0 % ** [SD = 22,4%]
<b>5-FU [10nM]</b>	0,5 % [SD = 11,4%]	2,6 % [SD = 10,7%]	-4,4 % [SD = 10,6%]	-2,4 % [SD = 15,3%]	60,2 % ** [SD = 10,8%]
<b>5-FU [100nM]</b>	1,8 % [SD = 4,2%]	2,6 % [SD = 7,5%]	2,4 % [SD = 8,6%]	3,2 % [SD = 12,4%]	47,0 % ** [SD = 25,3%]
<b>5-FU [1µM]</b>	2,5 % [SD = 8,2%]	4,8 % [SD = 8,3%]	3,8 % [SD = 5,9%]	3,3% [SD = 2,1%]	59,6% ** [SD = 16,8%]
<b>5-FU [10µM]</b>	-6,4 % [SD = 4,7%]	-5,9 % [SD = 8,2%]	-6,0 % [SD = 8,5%]	-6,4 % [SD= 7,9%]	47,7 % * [SD = 27,7%]
<b>5-FU [100µM]</b>	42,5 % [SD = 12,3%]	42,2 % [SD = 13,8%]	42,3 % [SD = 10,0%]	46,3 % [SD= 13,8%]	72,7 % * [SD = 8,9%]

**Tab. 14: WST-Proliferations-Assay – pankreatische Sternzellen (Klon2.2) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 48 Stunden mit eskalierenden Dosen **NVP-BGJ-398** allein und in Kombination mit **5-FU**. Abgebildet sind die Daten aus 5 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

### 3.2.2.1 NVP-BGJ-398 als Monotherapie und in Kombination mit 5-FU (Klon2.2-Zelllinie, pankreatische Sternzellen) nach 48 Stunden

#### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in Klon 2.2-Zellen (PSC)***

In den Klon 2.2-Zellen, die über 48 Stunden mit NVP-BGJ-398 behandelt wurden, zeigte sich in klinisch relevanten Dosen  $\leq 1\mu\text{M}$  keine Proliferationsinhibition.

In der klinisch nicht relevanten Dosis von  $10\mu\text{M}$  NVP-BGJ-398 wurde eine Proliferationshemmung von 49,0 % [SD=22,4%;  $p < 0,001$ ] beobachtet.

#### ***5-FU-Monotherapie in Klon 2.2-Zellen (PSC)***

5-FU zeigte nach 48 Stunden erst ab einer klinisch nicht relevanten Konzentration von  $100\mu\text{M}$  eine Proliferationsinhibition bei den untersuchten Klon2.2-Zellpopulationen. Diese betrug 42,5% [SD=12,3%,  $p < 0,001$ ].

### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in Klon 2.2-Zellen (PSC)***

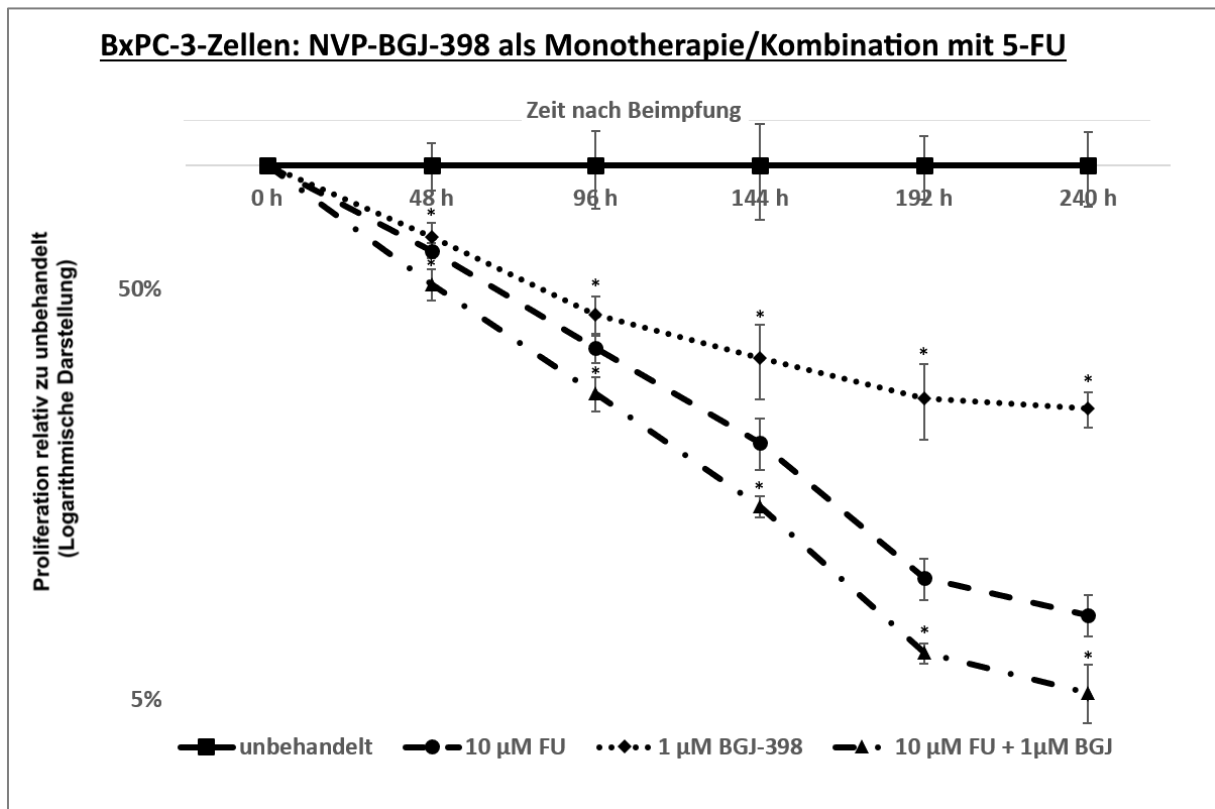
Eine zusätzliche Proliferationsinhibition durch NVP-BGJ-398 in Kombination mit 5-FU gegenüber der 5-FU-Monotherapie konnte nur in klinisch nicht-relevanten BGJ-398-Konzentrationen ( $\geq 10\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden.

### **3.3 Langzeitproliferationsexperimente mittels Trypanblau-Proliferation-Assay (Wirkstoffexposition bis 240 Stunden)**

Mittels Trypanblau-Proliferationsassay wurde die langfristige Proliferationsinhibition von NVP-BGJ-398 und TKI-258 allein und in Kombination mit 5-FU auf BxPC-3-Zellen (Pankreaskarzinomzellen) und Klon 2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen) über einen Zeitraum von insgesamt 240 Stunden untersucht. Die Ergebnisse der Experimente mit BxPC-3-Zellen (Karzinomzellen) sind in Tab. 15 und Tab. 16 sowie in Abb. 9 und Abb.10 dargestellt. Die Ergebnisse der Experimente mit den Klon2.2-Zellen (pankreatische Sternzellen) sind in den Tab. 19 und Tab. 20 sowie den Abb. 11 und Abb. 12 aufgeführt.

Analoge Versuche wurden mit 5-dFU (5-desoxy-Fluoruracil) durchgeführt: Da sich keine relevanten Unterschiede zur 5-FU-Therapie zeigten, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine Darstellung verzichtet.

### 3.3.1 Proliferation in BxPC-3-Zellen (Trypanblau-Assay)



**Abb. 9.: Trypanblau-Proliferationsassay: Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1 µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10 µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 15.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Proliferationsinhibition von 33,0% [SD=5,6%;  $p=0,03$ ] durch NVP-BGJ-398 ab 48 Stunden, die im weiteren Verlauf auf 74,5 % nach 240 Stunden ansteigt.

5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie: Zusätzliche Wachstumshemmung gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie [10 µM] nach 48 Stunden ( $p=0,04$ ) und über den gesamten Beobachtungszeitraum.

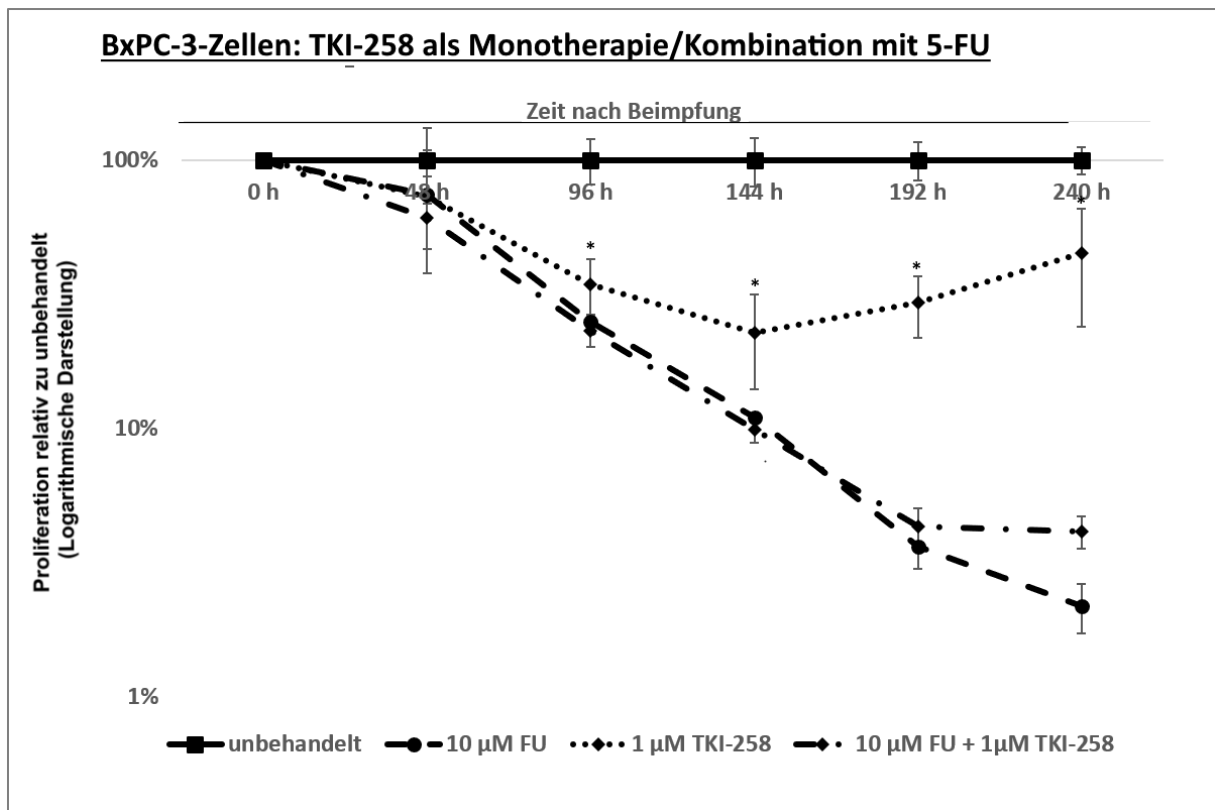
48 h	V1	V2	V3	MW	SD
BGJ-398 [1µM]	40,9%	28,5%	29,6%	<b>33,0% *</b>	5,6%
5-FU [10µM]	35,8%	41,5%	36,6%	<b>38,0%</b>	2,5%
BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]	45,7%	54,9%	45,1%	<b>48,6% *</b>	4,5%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
BGJ-398 [1µM]	62,9%	56,2%	51,3%	<b>56,8% *</b>	4,7%
5-FU [10µM]	60,4%	67,7%	64,2%	<b>64,1%</b>	3,0%
BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]	68,5%	73,6%	74,5%	<b>72,2% *</b>	2,6%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
BGJ-398 [1µM]	75,7%	62,9%	59,7%	<b>66,1% *</b>	6,9%
5-FU [10µM]	75,2%	78,9%	82,5%	<b>78,9%</b>	3,0%
BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]	84,1%	86,2%	85,4%	<b>85,2% *</b>	0,9%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
BGJ-398 [1µM]	78,4%	75,3%	65,1%	<b>72,9% *</b>	5,7%
5-FU [10µM]	88,8%	90,0%	91,6%	<b>90,1%</b>	1,1%
BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]	93,2%	94,0%	93,3%	<b>93,5% *</b>	0,4%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
BGJ-398 [1µM]	77,9%	73,6%	71,9%	<b>74,5% *</b>	2,5%
5-FU [10µM]	90,7%	92,5%	92,8%	<b>92,0%</b>	0,9%
BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]	94,2%	96,1%	94,1%	<b>94,8% *</b>	0,9%

**Tab. 15: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle bei Monotherapie mit NVP-BGJ-398 & 5-FU & Kombinationstherapie mit 5-FU & NVP-BGJ-398**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie.



**Abb. 10.: Trypanblau-Proliferationsassay: Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 16.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

TKI-258-Monotherapie: Proliferationsinhibition von 65,5% [SD=8,1%;  $p=0,03$ ] nach 96 Stunden und während des kompletten Beobachtungszeitraums. Ab 192 Stunden wird der Wachstumsunterschied zwischen den unbehandelten BxPC-3-Zellen und den mit TKI-258 behandelten Zellen kleiner.

TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie: keine zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber der 5-FU-Monotherapie



48 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	47,7%	-22,8%	56,0%	<b>27,0%</b>	35,3%
5-FU [10µM]	41,1%	10,3%	26,8%	<b>26,1%</b>	12,6%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	53,8%	19,6%	43,9%	<b>39,1%</b>	14,3%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	73,9%	54,5%	68,1%	<b>65,5% *</b>	8,1%
5-FU [10µM]	75,5%	72,9%	76,8%	<b>75,1%</b>	1,6%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	80,4%	72,9%	77,2%	<b>76,8%</b>	3,1%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	81,8%	65,0%	84,9%	<b>77,2% *</b>	8,7%
5-FU [10µM]	89,6%	88,9%	88,6%	<b>89,0%</b>	0,4%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	90,6%	91,1%	88,6%	<b>90,1%</b>	1,1%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	80,8%	62,6%	68,7%	<b>70,7% *</b>	7,6%
5-FU [10µM]	96,7%	96,9%	95,5%	<b>96,4%</b>	0,6%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	95,5%	96,7%	94,9%	<b>95,7%</b>	0,7%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	79,1%	27,9%	58,5%	<b>55,1% *</b>	21,1%
5-FU [10µM]	97,3%	98,4%	97,7%	<b>97,8%</b>	0,5%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	96,3%	95,1%	96,2%	<b>95,9%</b>	0,6%

**Tab. 16: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle bei Monotherapie mit TKI-258 & 5-FU & Kombinationstherapie mit 5-FU & TKI-258**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie.

### 3.3.1.1 NVP-BGJ-398 als Monotherapie (BxPC-3-Zelllinie) und in Kombination mit 5-FU über 240 Stunden (Trypanblau-Assay)

In den unbehandelten BxPC-3-Zellen zeigte sich über die beobachteten 240 Stunden ein annähernd exponentielles Wachstum auf durchschnittlich 1513,9% [SD = 312,4%] im Vergleich zum Ausgangswert.

### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] über 240 Stunden zeigte sich eine Proliferationsinhibition um 74,5% [SD=2,5%; p=0,007] im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine signifikante Proliferationsinhibition zeigte sich ab einer Inkubation der Zellen über 48 Stunden.

### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen***

Für die Exposition von BxPC-3-Zellen mit 5-FU [10µM] und zusätzlich NVP-BGJ-398 zeigte sich eine höhere relative Inhibition der Proliferation von 94,8% [SD=0,9%; p=0,035] nach 240 Stunden gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie [10µM] mit einer relativen Inhibition der Proliferation von 92,0 % [SD=0,9%]. Diese höhere Inhibition lässt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum beobachten. Nach 240 Stunden war die Anzahl der vitalen Zellen in den Ansätzen, die mit 5-FU [10µM] und NVP-BGJ-398 [1µM] behandelt wurden, durchschnittlich 21% [SD=13%] geringer als die Anzahl der zu Beginn des Experiments ausgesäten Zellen.

### **Avitale Zellen**

#### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie***

Während der Beobachtungszeit konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der avitalen Zellen zwischen den unbehandelten BxPC-3-Zellen und den Zellen, die mit NVP-BGJ-398 [1µM] behandelt wurden, festgestellt werden.

#### ***5-FU-/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie***

Ebenso zeigte sich kein signifikant höherer Anteil avitaler Zellen in den Zellpopulationen, die mit einer Kombination aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM] behandelt wurden, weder gegenüber den unbehandelten Zellpopulationen, noch gegenüber den Populationen, die ausschließlich mit 5-FU [10µM] behandelt wurden.

Die Ergebnisse sind auch in Tab. 17 dargestellt.

48 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	9,4%	11,0%	9,9%	<b>10,1%</b>	0,7%
<b>BGJ-398 1µM</b>	24,6%	12,1%	9,5%	<b>15,4%</b>	6,6%
<b>5-FU 10µM</b>	19,7%	14,0%	10,0%	<b>10,1%</b>	0,7%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	38,5%	15,2%	17,0%	<b>23,6%</b>	10,6%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	23,0%	7,3%	6,3%	<b>12,2%</b>	7,7%
<b>BGJ-398 1µM</b>	38,8%	13,2%	9,8%	<b>20,6%</b>	12,9%
<b>5-FU 10µM</b>	42,7%	16,3%	15,0%	<b>24,7%</b>	12,8%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	52,5%	20,1%	23,1%	<b>31,9%</b>	14,6%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	16,4%	5,8%	9,1%	<b>10,4%</b>	4,4%
<b>BGJ-398 1µM</b>	40,6%	12,1%	10,2%	<b>21,0%</b>	13,9%
<b>5-FU 10µM</b>	39,9%	17,6%	29,7%	<b>29,1%</b>	9,1%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	52,7%	28,0%	26,5%	<b>35,7%</b>	12,0%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	25,3%	11,6%	8,0%	<b>15,0%</b>	7,5%
<b>BGJ-398 1µM</b>	38,0%	14,3%	8,7%	<b>20,3%</b>	12,7%
<b>5-FU 10µM</b>	56,0%	34,0%	37,2%	<b>42,4%</b>	9,7%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	67,7%	46,5%	33,7%	<b>49,3%</b>	14,0%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	22,2%	13,6%	6,1%	<b>14,0%</b>	6,5%
<b>BGJ-398 1µM</b>	35,2%	19,8%	5,8%	<b>20,3%</b>	12,0%
<b>5-FU 10µM</b>	62,6%	44,0%	20,2%	<b>42,3%</b>	17,4%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	72,1%	61,1%	25,6%	<b>52,9%</b>	19,8%

**Tab. 17: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Anteil der avitalen Zellen an der Gesamtpopulation – Monotherapie mit NVP-BGJ-398 & 5-FU sowie Kombinationstherapie mit 5-FU & NVP-BGJ-398**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Avitale Zellen in % der Gesamtzellzahl der Probe. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose erfolgte in diesem Versuch nicht. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils avitaler Zellen zwischen den behandelten und unbehandelten BxPC-3-Zellen.

### **3.3.1.2 TKI-258 als Monotherapie (BxPC-3-Zelllinie) und in Kombination mit 5-FU über 240 Stunden (Trypanblau-Assay)**

#### ***TKI-398-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

In den mit TKI-258 [1µM] behandelten BxPC-3-Zellen wurde eine signifikante ( $p=0,01$ ) Inhibition der Proliferation nach 96 Stunden beobachtet. Nach 240 Stunden Inkubation mit TKI-258 [1µM] zeigte sich eine Proliferationsinhibition um 55,1% [SD=21,1%;  $p=0,03$ ] gegenüber den unbehandelten Zellen.

#### ***5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 240h keine signifikante zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM].

#### **Avitale Zellen**

##### ***TKI-258-Monotherapie***

Während der Beobachtungszeit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der avitalen Zellen zwischen den unbehandelten BxPC-3-Zellen und den BxPC-3-Zellen, die mit TKI-258 [1µM] behandelt wurden, festgestellt werden.

##### ***5-FU-/ TKI-258-Kombinationstherapie***

Ebenso zeigte sich kein signifikant höherer Anteil avitaler Zellen in den Zellpopulationen, die mit einer Kombination aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] behandelt wurden, weder gegenüber den unbehandelten Zellkulturen, noch gegenüber den Zellen, die ausschließlich mit 5-FU [10µM] behandelt wurden.

Die Ergebnisse sind auch in Tab. 18 dargestellt.

48 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	4,0%	2,7%	7,6%	<b>4,8%</b>	2,1%
TKI-258 1µM	5,9%	3,0%	8,0%	<b>5,7%</b>	2,1%
5-FU 10µM	2,7%	6,9%	6,3%	<b>5,3%</b>	1,8%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	4,5%	5,2%	2,9%	<b>4,2%</b>	1,0%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	2,4%	2,1%	2,9%	<b>2,5%</b>	0,3%
TKI-258 1µM	6,7%	5,0%	2,6%	<b>4,8%</b>	1,7%
5-FU 10µM	8,9%	6,5%	4,9%	<b>6,7%</b>	1,6%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	8,7%	5,9%	2,9%	<b>5,8%</b>	2,4%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	5,6%	5,4%	3,7%	<b>4,9%</b>	0,9%
TKI-258 1µM	8,5%	3,3%	6,3%	<b>6,0%</b>	2,1%
5-FU 10µM	20,0%	29,8%	4,9%	<b>18,2%</b>	10,2%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	9,7%	9,4%	6,9%	<b>8,7%</b>	1,3%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	4,9%	4,0%	5,3%	<b>4,7%</b>	0,5%
TKI-258 1µM	3,8%	2,5%	2,8%	<b>3,0%</b>	0,5%
5-FU 10µM	17,6%	18,8%	32,0%	<b>22,8%</b>	6,5%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	15,0%	17,6%	12,3%	<b>15,0%</b>	2,2%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	16,0%	9,0%	17,4%	<b>14,1%</b>	3,7%
TKI-258 1µM	10,8%	7,8%	4,4%	<b>7,7%</b>	2,6%
5-FU 10µM	40,5%	31,6%	18,6%	<b>30,2%</b>	9,0%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	38,3%	16,4%	21,0%	<b>25,2%</b>	9,4%

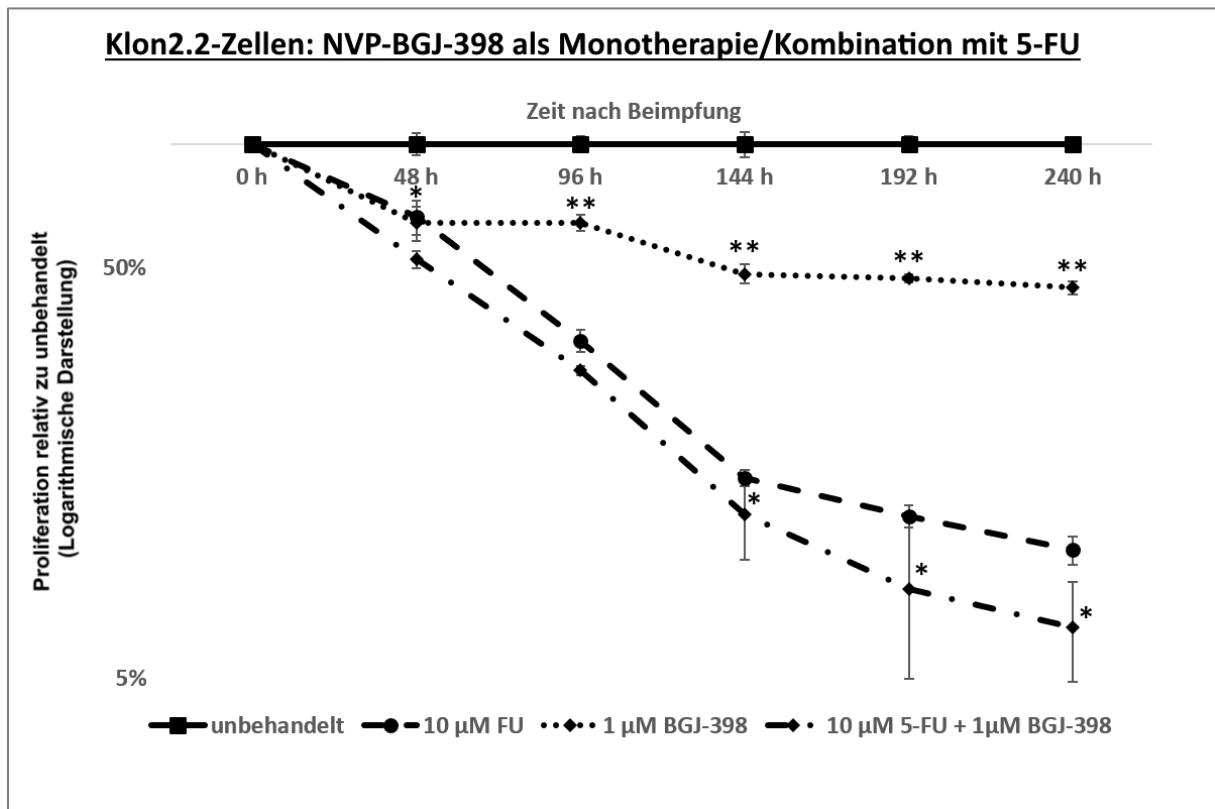
**Tab. 18: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) – Anteil der avitalen Zellen an der Gesamtpopulation – Monotherapie mit TKI-258 & 5-FU sowie Kombinationstherapie mit 5-FU & TKI-258**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Avitale Zellen in % der Gesamtzellzahl der Probe. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose erfolgte in diesem Versuch nicht. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils avitaler Zellen zwischen den behandelten und unbehandelten BxPC-3-Zellen.

### 3.3.2 Proliferation in Klon2.2-Zellen (PSC) (Trypanblau-Assay)



**Abb. 11.: Trypanblau-Proliferationsassay: Pankreatische Sternzellen (Klon2.2)**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1 μM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10 μM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 19.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Proliferationsinhibition von 35,9% [SD=6,3%;  $p=0,005$ ] nach 48 h, die im weiteren Verlauf auf 55,3% [SD=1,7%] nach 240 h ansteigt.

5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie: Zusätzliche Proliferationsinhibition ( $p=0,03$ ) gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie [10 μM] nach 144 h.

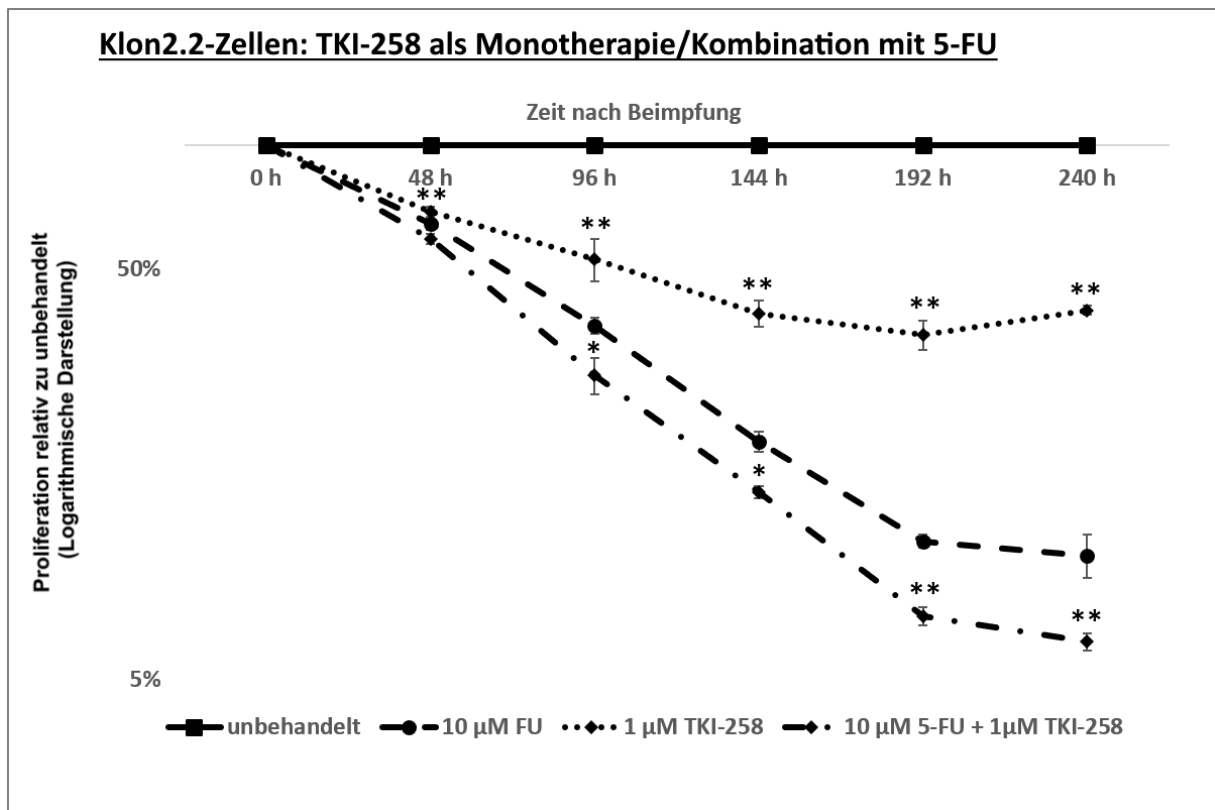
48 h	V1	V2	V3	MW	SD
<b>BGJ-398 [1µM]</b>	27,1%	41,0%	39,7%	<b>35,9% *</b>	6,3%
<b>5-FU [10µM]</b>	42,7%	29,7%	28,8%	<b>33,7%</b>	6,4%
<b>BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]</b>	42,3%	42,7%	57,9%	<b>47,6%</b>	7,3%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
<b>BGJ-398 [1µM]</b>	33,5%	34,0%	39,8%	<b>35,7% **</b>	2,8%
<b>5-FU [10µM]</b>	69,4%	66,7%	64,3%	<b>66,8%</b>	2,1%
<b>BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]</b>	72,3%	67,0%	76,4%	<b>71,9%</b>	3,8%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
<b>BGJ-398 [1µM]</b>	55,4%	50,4%	49,5%	<b>51,8% **</b>	2,6%
<b>5-FU [10µM]</b>	85,4%	84,7%	83,8%	<b>84,7%</b>	0,7%
<b>BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]</b>	87,3%	86,4%	88,8%	<b>87,5% *</b>	1,0%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
<b>BGJ-398 [1µM]</b>	51,8%	54,2%	52,7%	<b>52,9% **</b>	1,0%
<b>5-FU [10µM]</b>	88,5%	86,6%	87,8%	<b>87,6%</b>	0,8%
<b>BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]</b>	91,3%	92,2%	91,8%	<b>91,8% *</b>	0,4%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
<b>BGJ-398 [1µM]</b>	53,0%	56,2%	56,7%	<b>55,3% **</b>	1,7%
<b>5-FU [10µM]</b>	90,9%	88,9%	89,5%	<b>89,8%</b>	0,8%
<b>BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]</b>	93,7%	93,0%	93,3%	<b>93,4% *</b>	0,3%

**Tab. 19: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreatische Sternzellen (Klon2.2) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle bei Monotherapie mit NVP-BGJ-398 & 5-FU & Kombinationstherapie mit 5-FU & NVP-BGJ-398**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie



**Abb. 12.: Trypanblau-Proliferationsassay: Pankreatische Sternzellen (Klon2.2)**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258** [1μM] allein und in Kombination mit **5-FU** [10μM]. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Wachstumskurven aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 20.

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

TKI-258-Monotherapie: Proliferationsinhibition von 31,1% [SD=2,3%;  $p < 0,001$ ] nach 48 h, die im weiteren Verlauf auf 65,4% nach 192 h ansteigt. Nach 240 h wird der Wachstumsunterschied zwischen den unbehandelten BxPC-3 und den mit TKI-258-behandelten Zellen mit 60,3 % [SD=1,0%] wieder kleiner.

5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie: Zusätzliche Proliferationsinhibition ( $p=0,02$ ) gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie [10μM] nach 96 h



48 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	27,9%	32,2%	33,2%	<b>31,1% **</b>	2,3%
5-FU [10µM]	32,8%	38,5%	34,8%	<b>35,4%</b>	2,3%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	38,4%	42,1%	41,6%	<b>40,7%</b>	1,6%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	38,2%	50,9%	51,9%	<b>47,0% **</b>	6,3%
5-FU [10µM]	63,7%	65,4%	61,5%	<b>63,5%</b>	1,6%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	68,6%	75,0%	73,8%	<b>72,4% *</b>	2,8%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	61,7%	64,0%	57,0%	<b>60,9% **</b>	2,9%
5-FU [10µM]	82,5%	80,5%	80,0%	<b>81,0%</b>	1,1%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	85,0%	85,7%	86,2%	<b>85,7% *</b>	0,5%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	65,9%	68,5%	61,7%	<b>65,4% **</b>	2,8%
5-FU [10µM]	89,6%	89,2%	88,6%	<b>89,1%</b>	0,4%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	92,9%	92,4%	93,3%	<b>92,8% **</b>	0,4%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
TKI-258 [1µM]	61,3%	58,9%	60,7%	<b>60,3% **</b>	1,0%
5-FU [10µM]	91,2%	90,4%	88,3%	<b>90,0%</b>	1,2%
TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]	94,2%	93,6%	93,6%	<b>93,8% **</b>	0,3%

**Tab. 20: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreatische Sternzellen (Klon2.2) – Relative Wachstumsinhibition zur unbehandelten Kontrolle bei Monotherapie mit TKI-258 & 5-FU/5-dFU & Kombinationstherapie mit 5-FU/5-dFU & TKI-258**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Relative Wachstumsinhibition in Relation zu den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Inhibition durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

### **3.3.2.1 NVP-BGJ-398 als Monotherapie (Klon2.2-Zelllinie/PSC) und in Kombination mit 5-FU über 240 Stunden (Trypanblau-Assay)**

In unbehandelten Klon2.2-Zellen zeigte sich über die beobachteten 240 Stunden ein annähernd exponentielles Wachstum auf durchschnittlich 3107,4% [SD = 129,0%] nach 240 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert.

#### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1 $\mu$ M] über 240 Stunden zeigte sich eine Proliferationsinhibition um 55,3% [SD = 1,7%;  $p < 0,001$ ] im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1 $\mu$ M] und 5-FU [10 $\mu$ M] über 240 h wurde eine höhere relative Inhibition der Proliferation von 93,4% [SD=0,3%;  $p < 0,001$ ] gegenüber einer relativen Inhibition der Proliferation von 89,8% [SD=0,8%] bei der alleinigen 5-FU-Therapie [10 $\mu$ M] beobachtet.

### **Avitale Zellen**

#### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1 $\mu$ M] über 240 h zeigte sich ein höherer Anteil avitaler Zellen von 15,9% [SD=0,9%] gegenüber den unbehandelten Zellen, die einen Anteil avitaler Zellen von 10,1% [SD=0,7%;  $p = 0,002$ ] aufwiesen.

#### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit der Kombination aus NVP-BGJ-398 [1 $\mu$ M] und 5-FU [10 $\mu$ M] zeigten sich während des gesamten Beobachtungszeitraums tendenziell höhere Anteile avitaler Zellen gegenüber der 5-FU-Monotherapie, jedoch waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

Die Ergebnisse sind auch in Tab. 21 dargestellt.

48 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	5,0%	3,6%	6,3%	<b>5,0%</b>	1,1%
<b>BGJ-398 1µM</b>	8,2%	9,3%	9,7%	<b>9,1% *</b>	0,7%
<b>5-FU 10µM</b>	11,4%	4,7%	6,8%	<b>7,6%</b>	2,8%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	10,7%	10,2%	11,8%	<b>10,9%</b>	0,7%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	4,2%	4,6%	4,1%	<b>4,3%</b>	0,2%
<b>BGJ-398 1µM</b>	7,1%	6,2%	6,0%	<b>6,4% *</b>	0,5%
<b>5-FU 10µM</b>	9,3%	9,2%	10,3%	<b>9,6%</b>	0,5%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	9,4%	5,5%	12,5%	<b>9,2%</b>	2,9%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	5,6%	4,5%	7,4%	<b>5,8%</b>	1,2%
<b>BGJ-398 1µM</b>	11,2%	8,3%	13,3%	<b>10,9% *</b>	2,1%
<b>5-FU 10µM</b>	24,4%	23,5%	13,2%	<b>20,4%</b>	5,1%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	19,4%	26,6%	24,6%	<b>23,5%</b>	3,0%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	8,2%	11,1%	8,6%	<b>9,3%</b>	1,3%
<b>BGJ-398 1µM</b>	13,3%	15,1%	14,1%	<b>14,1% *</b>	0,7%
<b>5-FU 10µM</b>	26,5%	23,7%	22,3%	<b>24,2%</b>	1,8%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	32,4%	33,9%	30,4%	<b>32,2%</b>	1,4%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	11,1%	9,8%	9,5%	<b>10,1%</b>	0,7%
<b>BGJ-398 1µM</b>	14,6%	16,7%	16,6%	<b>15,9% *</b>	0,9%
<b>5-FU 10µM</b>	31,1%	31,9%	31,8%	<b>31,6%</b>	0,4%
<b>BGJ-398 1µM + 5-FU 10µM</b>	43,5%	38,1%	31,8%	<b>37,8%</b>	4,8%

**Tab. 21: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreatische Sternzellen (Klon2.2) – Anteil der avitalen Zellen an der Gesamtpopulation – Monotherapie mit NVP-BGJ-398 & 5-FU sowie Kombinationstherapie mit 5-FU & NVP-BGJ-398**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]**. Avitale Zellen in % der Gesamtzellzahl der Probe. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose erfolgte in diesem Versuch nicht. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* signifikant (p <0,05)/ hoch signifikant (p<0,001) höherer Anteil avitaler Zellen durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Über gesamten Zeitraum höherer Anteil avitaler Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie: Kein signifikant höherer Anteil avitaler Zellen im Vergleich zur 5-FU-Monotherapie.

### **3.3.2.2 TKI-258 als Monotherapie (Klon2.2-Zelllinie/PSC) und in Kombination mit 5-FU/5-dFU über 240 Stunden (Trypanblau-Assay)**

#### ***TKI-258-Monotherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit TKI-258 [1µM] zeigte sich ab 48 Stunden eine Proliferationsinhibition um 35,9% [SD=6,3%, p=0,004] zur unbehandelten Kontrolle. Diese Proliferationsinhibition zeigte sich während des gesamten Beobachtungszeitraums, nach 240 Stunden wurde eine Proliferationsinhibition um 60,3% [SD= 1,0%; p<0,001] beobachtet. Nach 240 Stunden zeigte sich ein Abflachen der Proliferationsinhibition.

#### ***5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Bei gleichzeitiger Inkubation der Klon2.2-Zellen mit 5-FU [10µM] und TKI-258 [1µM] zeigte sich ab 96 Stunden eine zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber der 5-FU-Monotherapie (p=0,02). Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] über 240 Stunden wurde eine höhere relative Inhibition der Proliferation von 93,8% [SD=0,3%; p=0,01] gegenüber der relativen Inhibition der Proliferation von 90,0% [SD=1,2%] bei alleiniger 5-FU-Therapie [10µM] beobachtet.

#### **Avitale Zellen**

##### ***TKI-258-Monotherapie***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit TKI-258 [1µM] zeigten sich während des gesamten Beobachtungszeitraums tendenziell höhere Anteile avitaler Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen, jedoch waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

##### ***5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie***

Es zeigte sich kein signifikant höherer Anteil avitaler Zellen in den Zellpopulationen, die mit einer Kombination aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] behandelt wurden, gegenüber den Populationen, die ausschließlich mit 5-FU [10µM] behandelt wurden.

Die Ergebnisse sind auch in Tab. 21 dargestellt.

48 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	1,0%	1,6%	2,5%	<b>1,7%</b>	0,6%
TKI-258 1µM	0,7%	4,4%	0,8%	<b>2,0%</b>	1,7%
5-FU 10µM	4,4%	11,3%	3,8%	<b>6,5%</b>	3,4%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	1,7%	3,5%	5,9%	<b>3,7%</b>	1,7%
96 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	2,4%	2,0%	2,1%	<b>2,2%</b>	0,2%
TKI-258 1µM	1,2%	0,5%	6,2%	<b>2,6%</b>	2,6%
5-FU 10µM	3,9%	4,7%	4,3%	<b>4,3%</b>	0,3%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	5,9%	1,9%	8,5%	<b>5,5%</b>	2,7%
144 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	2,6%	3,7%	4,5%	<b>3,6%</b>	0,8%
TKI-258 1µM	3,8%	2,0%	4,4%	<b>3,4%</b>	1,0%
5-FU 10µM	5,4%	10,3%	11,1%	<b>9,0%</b>	2,5%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	14,3%	12,3%	12,7%	<b>13,1%</b>	0,9%
192 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	3,4%	3,5%	4,1%	<b>3,7%</b>	0,3%
TKI-258 1µM	5,2%	6,5%	10,2%	<b>7,3%</b>	2,1%
5-FU 10µM	13,7%	11,9%	25,2%	<b>16,9%</b>	5,9%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	14,6%	18,8%	24,5%	<b>19,3%</b>	4,0%
240 h	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	5,5%	5,0%	6,7%	<b>5,8%</b>	0,7%
TKI-258 1µM	9,0%	5,8%	9,3%	<b>8,0%</b>	1,5%
5-FU 10µM	23,2%	22,2%	24,4%	<b>23,3%</b>	0,9%
TKI-258 1µM + 5-FU 10µM	30,4%	27,9%	21,2%	<b>26,5%</b>	3,9%

**Tab. 21: Trypanblau-Proliferations-Assay – Pankreatische Sternzellen (Klon2.2) – Anteil der avitalen Zellen an der Gesamtpopulation – Monotherapie mit TKI-258 & 5-FU sowie Kombinationstherapie mit 5-FU & TKI-258**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 240 Stunden mit **TKI-258** [1µM] allein und in Kombination mit **5-FU** [10µM]. Avitale Zellen in % der Gesamtzellzahl der Probe. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose erfolgte in diesem Versuch nicht. Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

\*/\*\* signifikant (p <0,05)/ hoch signifikant (p<0,001) höherer Anteil avitaler Zellen durch TKI-258-Monotherapie gegenüber unbehandelt bzw. TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber 5-FU-Monotherapie.

### 3.4 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

#### 3.4.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität von BxPC-3-Zellen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

In den Abb. 13 a-f sind beispielhafte Dotplots dargestellt, weiterhin sind die Ergebnisse in den Abb. 14 und 15 sowie in der Tab. 22 dargestellt.

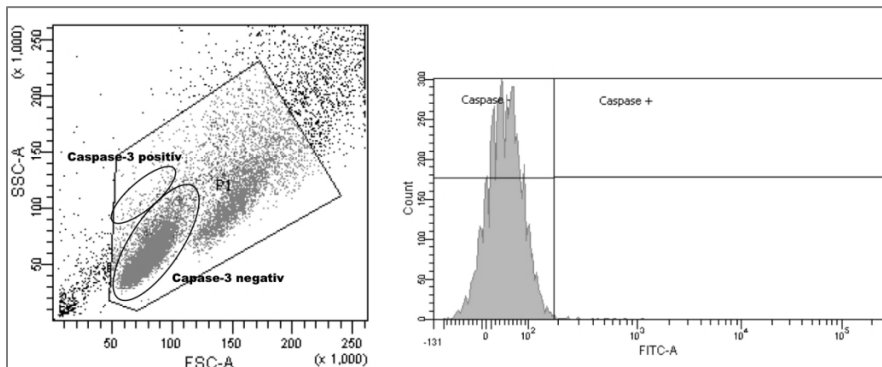


Abb.13a: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – unbehandelt

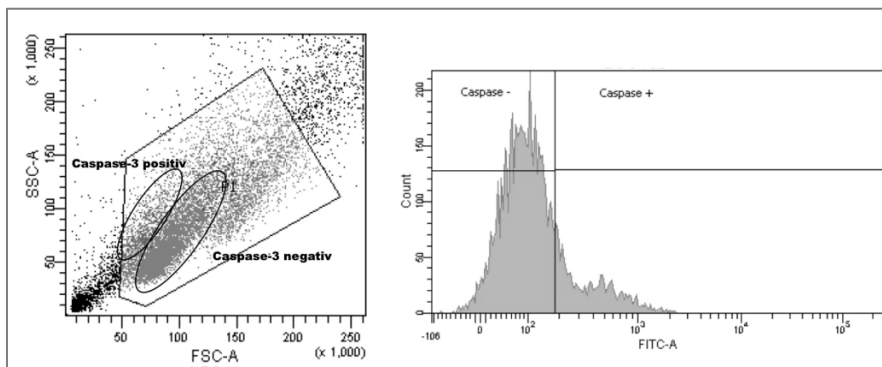


Abb.13b: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – 5-FU [10μM]

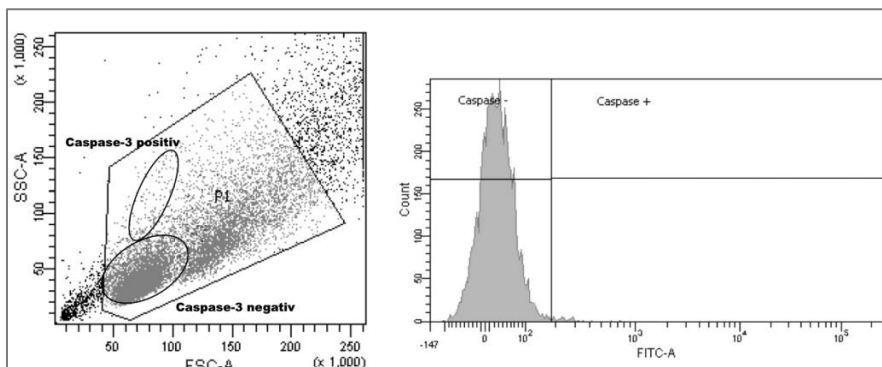


Abb.13c: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – NVP-BGJ-398 [1μM]

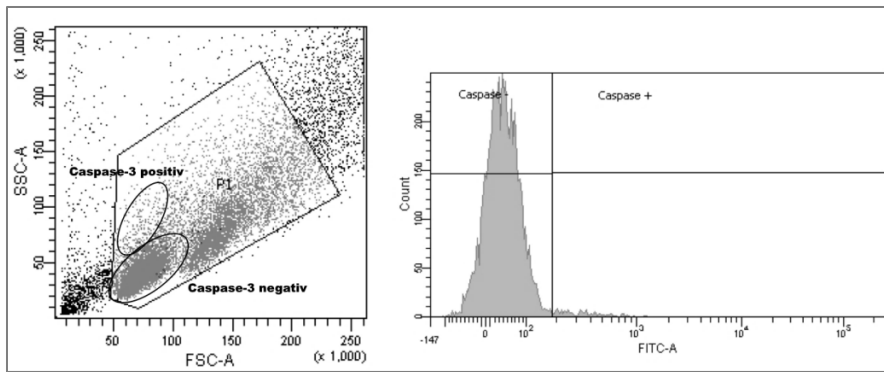


Abb.13d: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – TKI-258 [1µM]

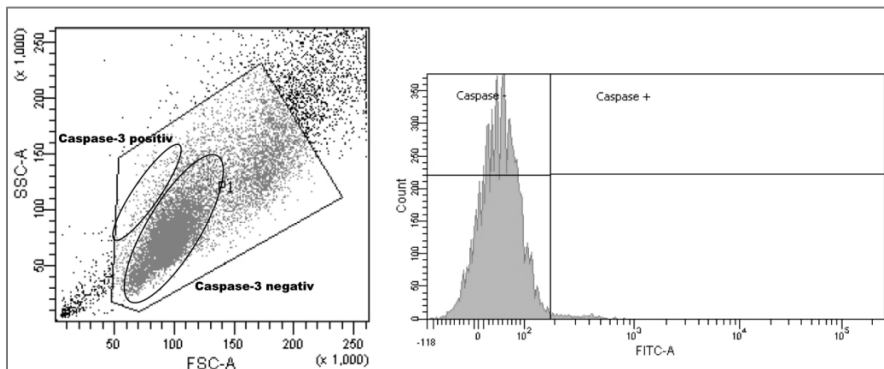


Abb. 13e: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – 5-FU 10µM & NVP-BGJ-398 1µM

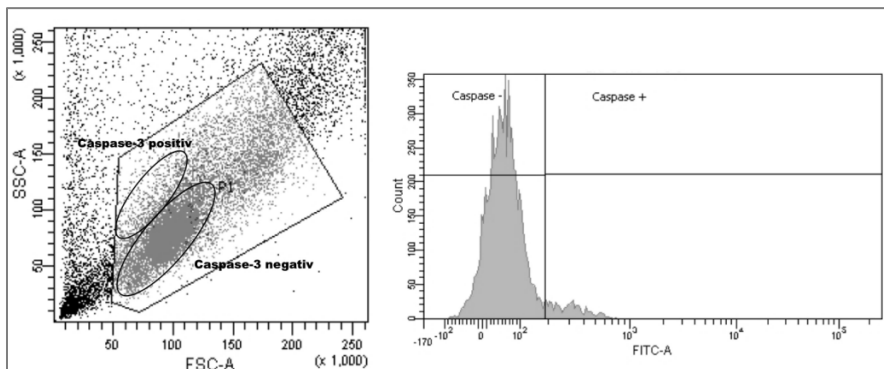


Abb. 13f: Caspase-3-Aktivität – BxPC-3 – 5-FU 10µM & TKI-258 1µM

Abb. 13.a-f: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3 -Aktivität in BxPC-3-Zellen (pankreatische Adenokarzinomzelllinie)

Beispielhafte Abbildungen der Messungen

Anteil Caspase-3 positiver Zellen	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	0,3%	0,4%	0,4%	<b>0,4%</b>	<0,1%
<b>NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	0,6%	0,7%	0,5%	<b>0,6% *</b>	0,1%
<b>TKI-258 [1µM]</b>	1,8%	1,7%	2,4%	<b>2,0% *</b>	0,3%
<b>5-FU [10µM]</b>	20,8%	4,6%	24,7%	<b>16,7%</b>	8,7%
<b>5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	1,5%	2,3%	0,9%	<b>1,6% *</b>	0,6%
<b>5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]</b>	3,7%	7,8%	7,0%	<b>6,2% *</b>	1,8%
<b>5-FU [200µM]</b>	34,7%	23,7%	45,1%	<b>34,5%</b>	8,7%

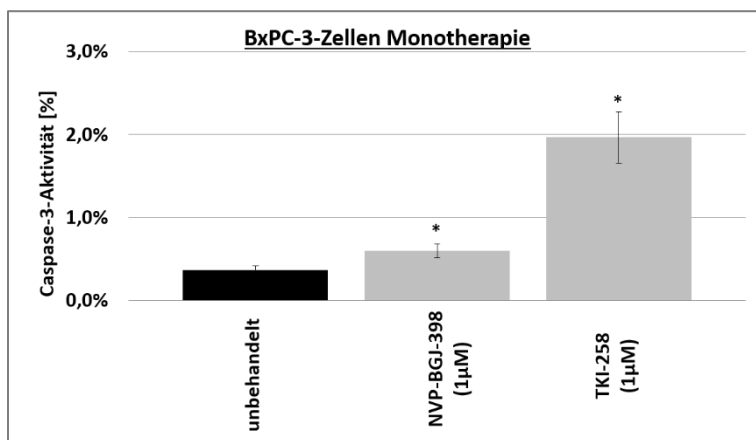
**Tab. 22: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Anteil Caspase-3-positiver BxPC-3-Zellen (Pankreaskarzinomzellen)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** oder **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]** über 48 Stunden. Prozentualer Anteil der Caspase-3-positiven Zellen.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikant (p <0,05)/ hoch signifikant (p<0,001) höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen durch NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber unbehandelt



**Abb. 14.: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3-Aktivität in Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) Monotherapie**

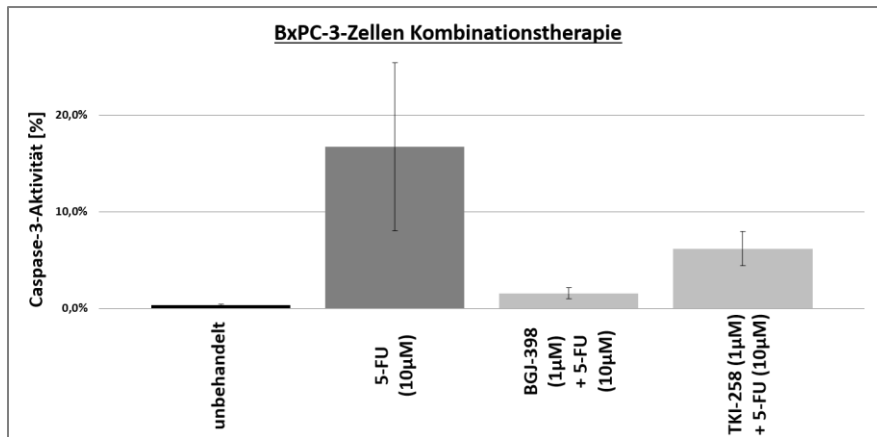
Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** bzw. **TKI-258 [1µM]** Anteil der Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation. Abgebildet sind die Ergebnisse aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\* statistisch signifikant (p-Wert <0,05) höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen

**NVP-BGJ-398-Monotherapie [1µM]:** Höherer Anteil Caspase-3-positiver BxPC-3-Zellen von 0,6% [SD = 0,1%; p=0,02] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,4% [SD=<0,1%]).

**TKI-258-Monotherapie [1µM]:** Höherer Anteil Caspase-3-positiver BxPC-3-Zellen von 2,0 % [SD = 0,3%; p=0,002] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,4% [SD=<0,1%]).





**Abb. 15: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3-Aktivität in Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) Kombinationstherapie**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit **5-FU [10µM] in Kombination mit NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 [1µM]**

Anteil der Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation. Abgebildet sind die Ergebnisse aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Kombinationsschema aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM]: Höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 6,2% [SD = 1,8%; p=0,002] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,4% [SD=<0,1%]).

Kombinationsschemata aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM]: Höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 1,6% [SD = 0,6%; p=0,04] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,4% [SD=<0,1%]).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der Caspase-3-positiven Zellen durch die Kombinationsschemata im Vergleich zur 5-FU-Monotherapie.

### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] für 48 Stunden zeigte sich ein höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 0,6% [SD = 0,1%; p=0,02] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (0,4% [SD = 0,1%] der Zellen).

### ***TKI-258-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit TKI-258 [1µM] für 48 Stunden konnte ein höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 2,0% [SD = 0,3%; p=0,002] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (0,4% [SD = 0,1%] der Zellen) beobachtet werden.

### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit der Kombination aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM] zeigte sich ein tendenziell geringerer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 1,6% [SD=0,6%; p=0,07] gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] mit 16,7% [SD= 8,7%].

### 5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit der Kombination aus TKI-258 [1 $\mu$ M] und 5-FU [10 $\mu$ M] zeigte sich tendenziell ein geringerer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 6,2% [SD=1,8%; p=0,17] gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10 $\mu$ M] mit 16,7% [SD=8,7%].

### 3.4.2 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität von Klon2.2-Zellen mittels Fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

In den Abbildungen 16 a-f sind beispielhafte Dotplots dargestellt, weiterhin sind die Ergebnisse in Abb. 17 & 18 sowie in Tab. 23 dargestellt.

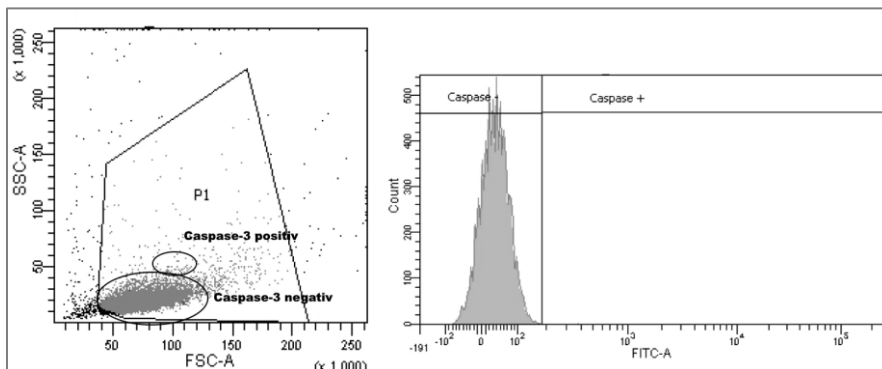


Abb.16a: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 - unbehandelt

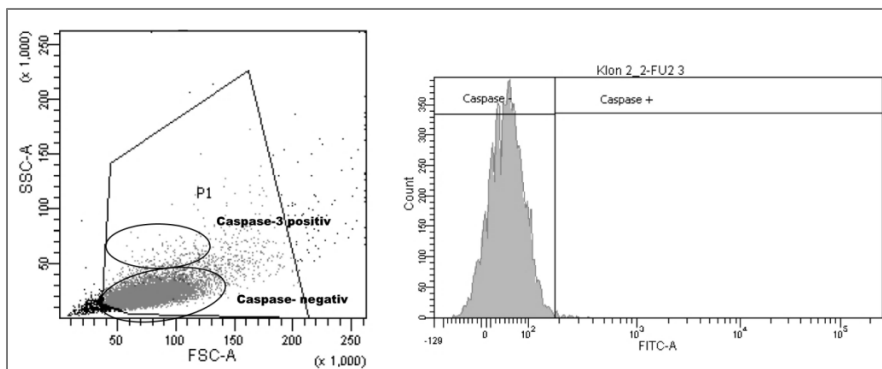


Abb.16b: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 – 5-FU [10 $\mu$ M]

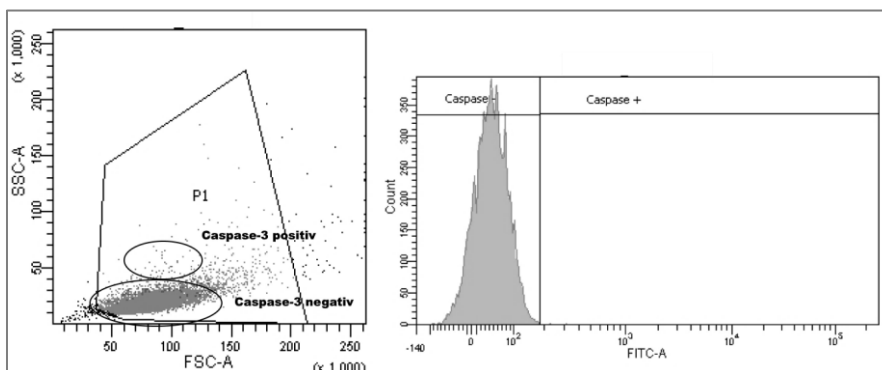


Abb.16c: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 – NVP-BGJ-398 [1 $\mu$ M]

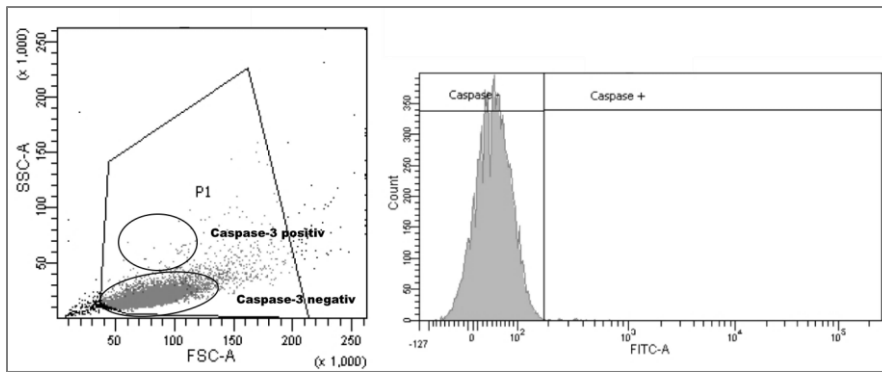


Abb.16d: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 – TKI-258 [1µM]

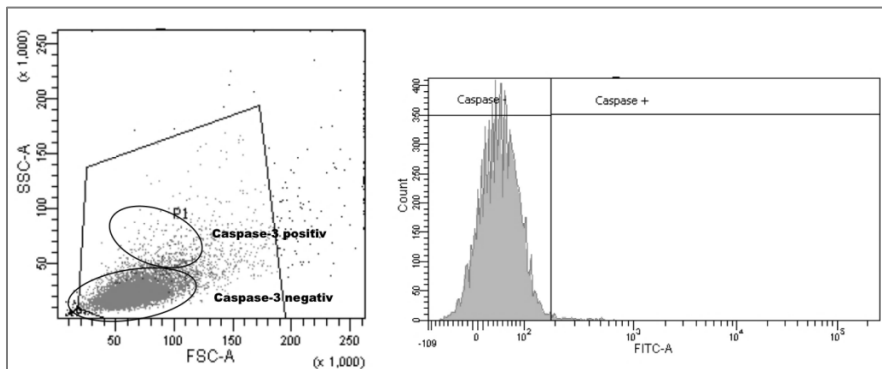


Abb. 16e: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 – 5-FU 10µM & NVP-BGJ-398 1µM

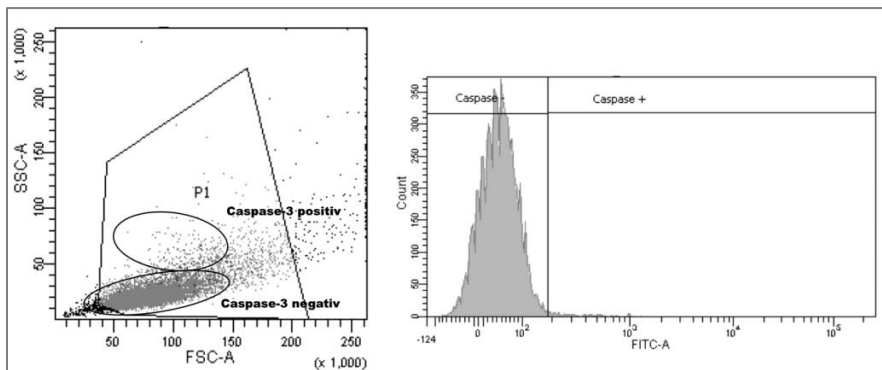


Abb. 16f: Caspase-3-Aktivität – Klon2.2 – 5-FU 10µM & TKI-258 1µM

Abb. 16.a-f: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3 -Aktivität in Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)

Beispielhafte Abbildungen der Messungen

Anteil Caspase-3 positiver Zellen	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	0,2%	0,2%	0,2%	<b>0,2%</b>	<0,1%
NVP-BGJ-398 [1µM]	0,7%	0,6%	0,5%	<b>0,6% *</b>	0,1%
TKI-258 [1µM]	0,7%	0,7%	0,8%	<b>0,7% **</b>	0,1%
5-FU [10µM]	1,0%	1,0%	1,0%	<b>1,0% **</b>	<0,01%
5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]	1,7%	1,8%	1,9%	<b>1,8% *</b>	0,1%
5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]	2,2%	2,0%	2,0%	<b>2,1% **</b>	0,1%
5-FU [200µM]	37,5%	28,5%	12,7%	<b>26,2% *</b>	10,3%

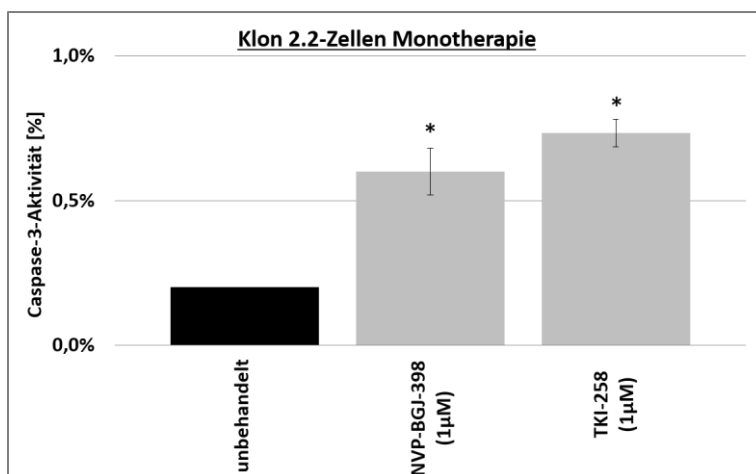
**Tab. 23: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Anteil Caspase-3-positiver Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)**

Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 allein und in Kombination mit 5-FU [10µM] über 48 Stunden. Anteil der Caspase-3-positiver Zellen.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen.



**Abb. 17.: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3-Aktivität in Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)**

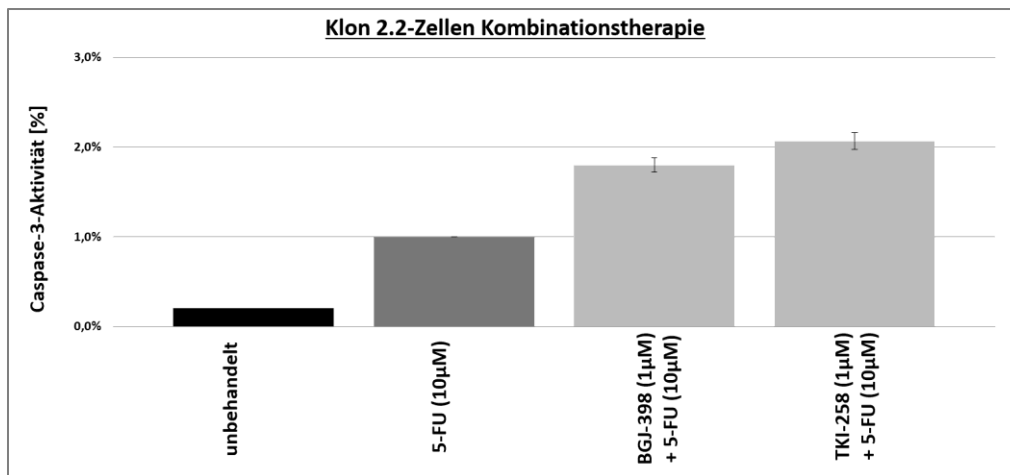
Inkubation der Klon2.2-Zellen über 48 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** bzw. **TKI-258 [1µM]**. Anteil der Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation.

Abgebildet sind die Ergebnisse aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen.

NVP-BGJ-398-Monotherapie [1µM]: Höherer Anteil Caspase-3-positiver Klon 2.2-Zellen von 0,6% [SD = 0,1%;  $p < 0,001$ ] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,2% [SD=<0,1%]).

TKI-258-Monotherapie [1µM]: Höherer Anteil Caspase-3-positiver Klon 2.2-Zellen von 0,7% [SD = 0,1%;  $p < 0,001$ ] gegenüber der unbehandelten Kontrolle (0,2% [SD=<0,1%]).



**Abb. 18: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Caspase-3-Aktivität in Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)**

Inkubation der Klon2.2-Zellen über 48 Stunden mit 5-FU [10µM] in Kombination mit NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 [1µM]. Anteil der Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation. Abgebildet sind die Ergebnisse aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. **\*/\*\*** signifikant ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu 5-FU-Monotherapie

Kombinationsschema aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM]: Höherer Anteil Caspase-3-positiver Zellen von 2,1% [SD = 0,09%;  $p < 0,001$ ] gegenüber 5-FU-Monotherapie (1,0%; SD < 0,01%).

Kombinationsschemata aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM]: Keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der Caspase-3-positiven Zellen durch die zur 5-FU-Monotherapie [10µM].

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit den untersuchten Wirkstoffen (in klinisch relevanter Dosis) über 48 Stunden zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich des Anteils Caspase-3-positiver Zellen, jedoch sind diese Unterschiede in ihrer Ausprägung gering. Dies betrifft sowohl die Monotherapien mit NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 [1µM] als auch die Kombinationstherapien mit 5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 [1µM].

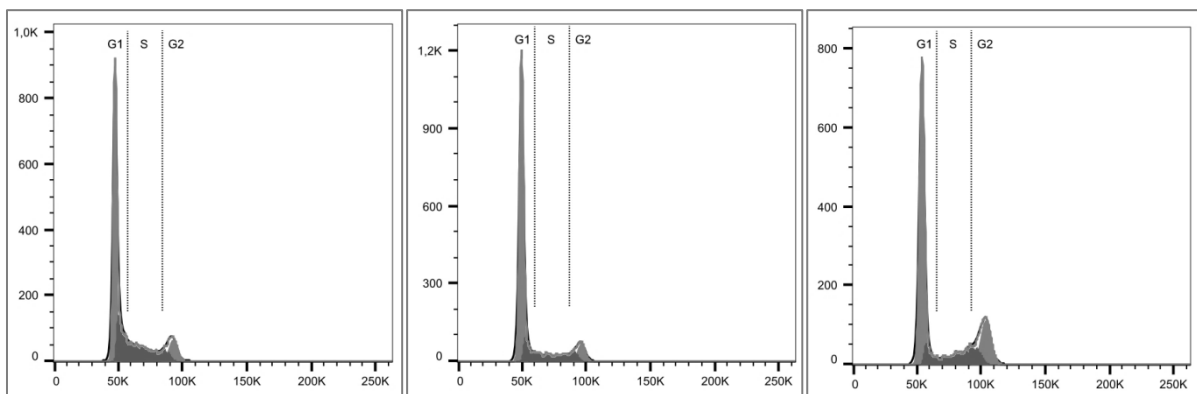
Lediglich in der klinisch nicht relevanten 5-FU Dosis von 200 µM (Positivkontrolle) konnte nach 48 Stunden Inkubation eine relevant erhöhte Caspase-3-Aktivität von 26,2% [SD=10,3%] in den untersuchten Klon2.2-Zellen detektiert werden.

### 3.5 Zellzyklusanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

Mittels Färbung der BxPC-3 und Klon2.2-Zellen mit Propidiumiodid und anschließender fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie wurde der Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen nach einer Inkubation mit

NVP-BGJ-398 bzw. TKI-258 allein und in Kombination mit 5-FU über 48 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse der Experimente mit BxPC-3-Zellen (Karzinomzellen) sind in den Tab. 23 sowie in Abb. 20 dargestellt, die Ergebnisse der Experimente mit den Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen) in Tab. 24. Beispielhafte Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie sind für BxPC-3-Zellen in den Abb.19 a-f und für Klon2.2-Zellen in den Abb. 21 a-f dargestellt.

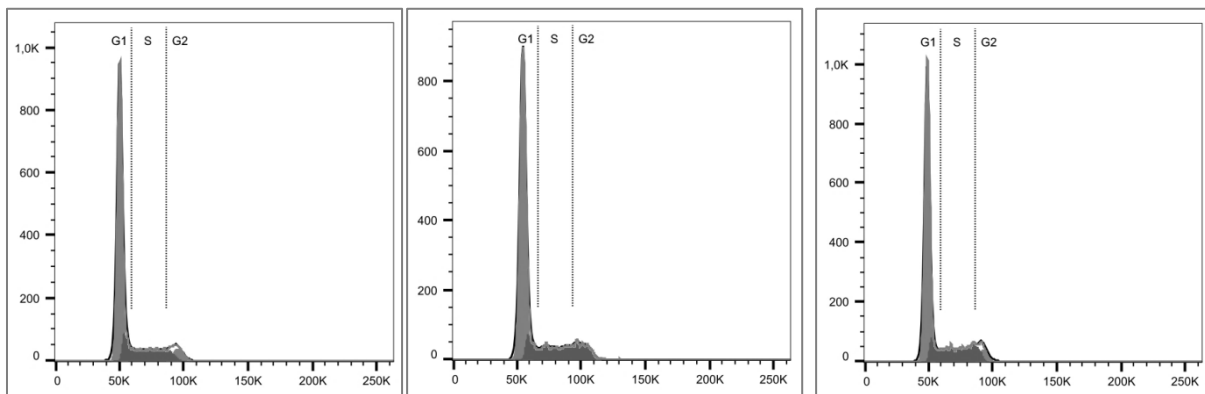
### 3.5.1 Zellzyklusanalyse bei BxPC-3-Zellen (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)



**Abb.19a: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – unbehandelt**

**Abb.19b: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – NVP-BGJ-398 [1µM]**

**Abb.19c: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – TKI-258 [1µM]**



**Abb.19d: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – 5-FU [10µM]**

**Abb.19e: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – NVP-BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]**

**Abb.19f: Zellzyklusanalyse BxPC-3 – TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]**

**Abb. 19a-f: Zellzyklusanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie: BxPC-3-Zellen**  
Beispielhafte Abbildungen der Messungen

<b>G1-Phase</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
unbehandelt	48,5%	54,2%	50,0%	<b>50,9%</b>	2,4%
<b>NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	65,6%	64,3%	63,5%	<b>64,5%*</b>	0,9%
<b>TKI-258 [1µM]</b>	55,5%	51,9%	55,8%	<b>54,4%</b>	1,8%
<b>5-FU [10µM]</b>	63,2%	67,0%	69,4%	<b>66,5%*</b>	2,6%
<b>5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	66,4%	73,7%	71,0%	<b>70,4%*</b>	3,0%
<b>5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]</b>	69,7%	65,6%	65,8%	<b>67,0%*</b>	1,9%
<b>S-Phase</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
unbehandelt	38,4%	34,6%	38,5%	<b>37,2%</b>	1,8%
<b>NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	23,2%	23,6%	24,8%	<b>23,9%**</b>	0,7%
<b>TKI-258 [1µM]</b>	23,6%	25,6%	23,5%	<b>24,2%**</b>	1,0%
<b>5-FU [10µM]</b>	25,6%	24,1%	24,1%	<b>24,6%**</b>	0,7%
<b>5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	31,6%	24,9%	27,0%	<b>27,8%*</b>	2,8%
<b>5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]</b>	24,0%	33,2%	33,0%	<b>30,1%*</b>	4,3%
<b>G2-Phase</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
unbehandelt	8,8%	7,2%	7,0%	<b>7,6%</b>	0,8%
<b>NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	7,0%	8,9%	7,6%	<b>7,8%</b>	0,8%
<b>TKI-258 [1µM]</b>	17,5%	17,9%	18,0%	<b>17,8%**</b>	0,2%
<b>5-FU [10µM]</b>	5,8%	3,3%	1,6%	<b>3,6%*</b>	1,8%
<b>5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]</b>	0,0%	0,0%	0,0%	<b>0,0%**</b>	0,0%
<b>5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]</b>	4,0%	0,0%	0,0%	<b>1,3%*</b>	1,9%

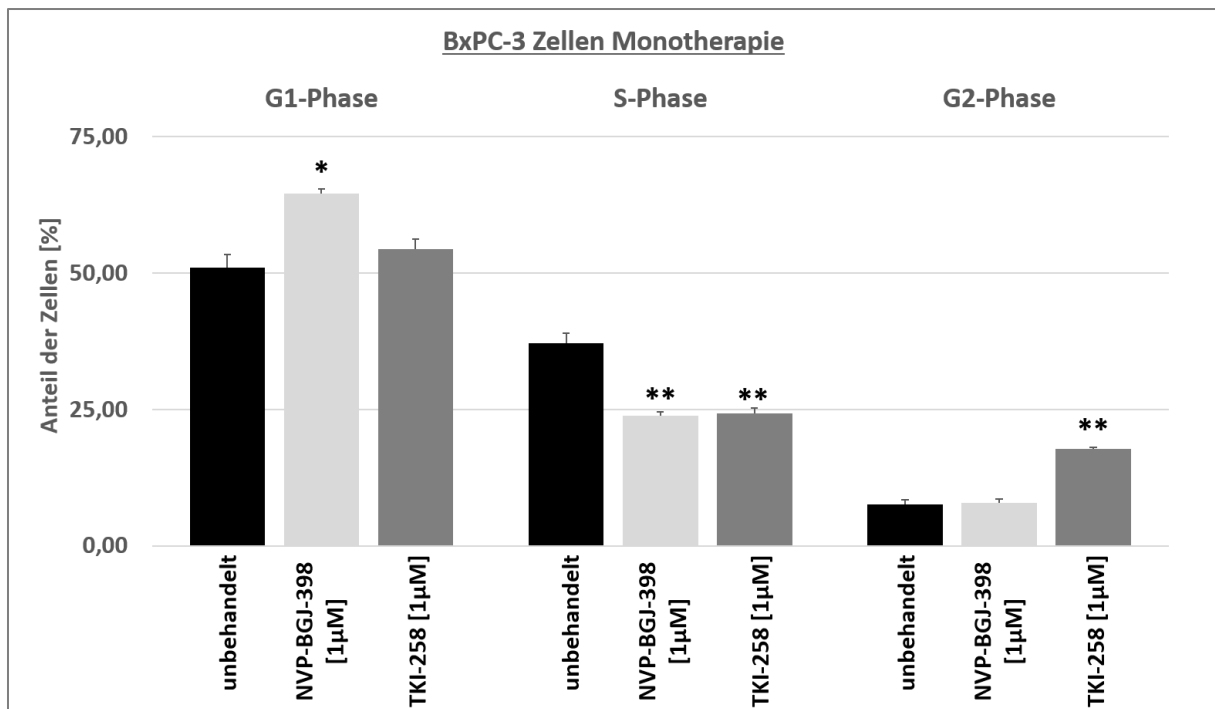
**Tab. 23: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Zellzyklusanalyse - BxPC-3-Zellen (Pankreaskarzinom)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** bzw. **TKI-258 [1µM]** allein und in Kombination mit **5-FU [10µM]** über 48 Stunden. Anteil der Zellen in der G1-, S- und G2-Zellzyklusphase.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikanter ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zu den unbehandelten Zellkulturen



**Abb. 20: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Zellzyklusanalyse in Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3)**

Inkubation der BxPC-3-Zellen über 48 Stunden mit **NVP-BGJ-398 [1µM]** bzw. **TKI-258 [1µM]**. Anteil der Zellen in der G1-, S- & G2-Zellzyklusphase.

Abgebildet sind die Ergebnisse aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikanter ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zu den unbehandelten Zellkulturen

NVP-BGJ-398-Monotherapie: Höherer Anteil der Zellen in G0/G1-Zellzyklusphase (64,5% [SD=0,9%,  $p=0,002$ ]) gegenüber den unbehandelten Kontrollen (50,9% [SD=2,4%] der Zellen).

TKI-258-Monotherapie: Höherer Anteil der Zellen in G2-Zellzyklusphase (17,8% [SD=0,22%;  $p < 0,001$ ]) gegenüber den unbehandelten Kontrollen (7,6% [SD=0,81%]).

### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in BxPC-3-Zellen***

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] für 48 Stunden wurde ein höherer Anteil der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase von 64,5% [SD=0,9%,  $p=0,002$ ] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (50,9% [SD=2,4%] der Zellen) beobachtet sowie ein geringerer Anteil der Zellen in der S-Zellzyklusphase von 23,9% [SD=0,7%,  $p < 0,001$ ] (unbehandelt 37,2% [SD=1,8%]).

Kein Unterschied bezüglich des Anteils der Zellen in der G2-Zellzyklusphase ( $p=0,83$ ).



**5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen**

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit der Kombination aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM] über 48 Stunden wurde ein tendenziell ( $p=0,24$ ) höherer Anteil der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase (70,4% [SD=3,0%]) gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] (66,5% [SD=2,6%] der Zellen) beobachtet. Zudem ist ein signifikant ( $p=0,05$ ) geringerer Anteil von BxPC-3-Zellen in der G2-Zellzyklusphase (0,0% [SD<0,001%]) gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] (3,5% [SD=1,7%]). Bezüglich des Anteils der Zellen in der S-Zellzyklusphase wurde kein signifikanter ( $p=0,19$ ) Unterschied beobachtet.

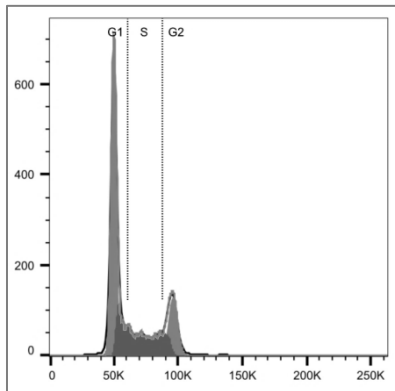
**TKI-258-Monotherapie in BxPC-3-Zellen**

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit TKI-258 [1µM] für 48 Stunden wurde ein signifikant höherer Anteil der Zellen in der G2-Zellzyklusphase von 17,8% [SD=0,22%,  $p<0,001$ ] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (7,6% [SD=0,81%] der Zellen) beobachtet. Daneben wurde ein geringerer Anteil der Zellen in der S-Zellzyklusphase von 24,2% [SD=1,0%,  $p<0,001$ ] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (37,2% [SD=1,8%]) sowie ein tendenziell höherer Anteil ( $p=0,17$ ) der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase von 54,4% [SD=1,8%] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (50,9% [SD=2,41%] der Zellen), beobachtet.

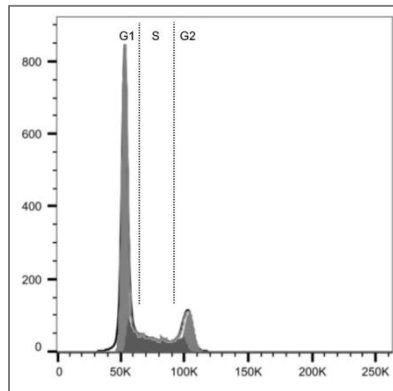
**5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in BxPC-3-Zellen**

Nach Inkubation der BxPC-3-Zellen mit der Kombination aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] über 48 Stunden wurde kein Unterschied ( $p=0,83$ ) bezüglich des Anteils der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] beobachtet. Es wurde ein tendenziell niedrigerer ( $p=0,29$ ) Anteil der Zellen in der G2-Zellzyklusphase von 1,3% [SD=1,9%] gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] (3,5% [SD=1,7%]) und ein tendenziell höherer ( $p=0,15$ ) Anteil der Zellen in der S-Zellzyklusphase von 30,1% [SD=4,3%] gegenüber der 5-FU-Monotherapie [10µM] (24,6% [SD=0,7%]) beobachtet.

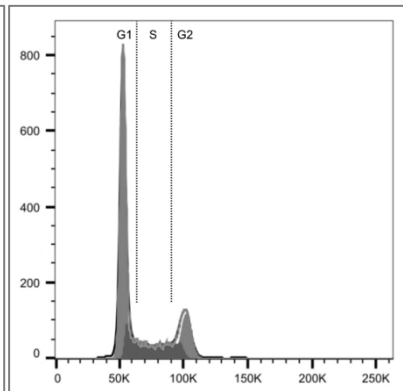
### 3.5.2 Zellzyklusanalyse bei Klon2.2-Zellen (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)



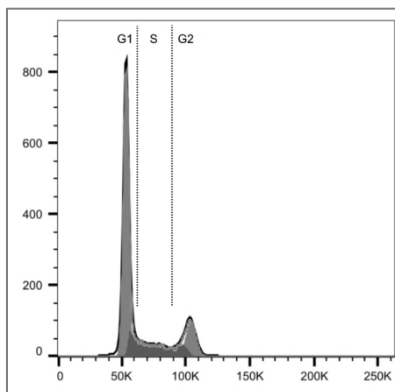
**Abb.21a: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – unbehandelt**



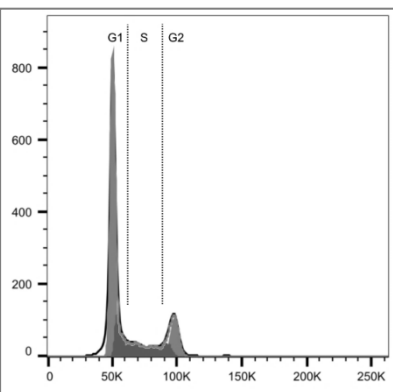
**Abb.21b: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – NVP-BGJ-398 [1µM]**



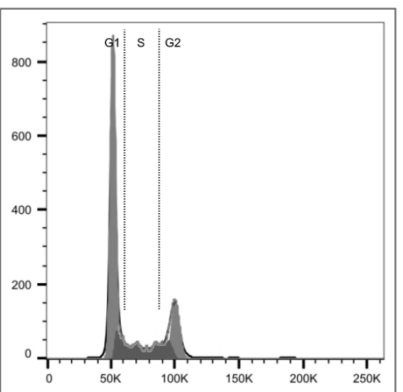
**Abb.21c: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – TKI-258 [1µM]**



**Abb.21d: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – 5-FU [10µM]**



**Abb.21e: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – NVP-BGJ-398 [1µM] + 5-FU [10µM]**



**Abb.21f: Zellzyklusanalyse Klon2.2 – TKI-258 [1µM] + 5-FU [10µM]**

**Abb. 21a-f: Zellzyklusanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie: Klon2.2-Zellen**  
Beispielhafte Abbildungen der Messungen

G1-Phase	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	45,7%	39,6%	47,2%	<b>44,2%</b>	3,3%
NVP-BGJ-398 [1µM]	53,1%	49,3%	54,7%	<b>52,4% *</b>	2,3%
TKI-258 [1µM]	52,3%	51,3%	50,1%	<b>51,2% *</b>	0,9%
5-FU [10µM]	54,6%	35,0%	56,3%	<b>48,6%</b>	9,7%
5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]	50,7%	41,3%	54,1%	<b>48,7%</b>	5,4%
5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]	51,3%	36,8%	50,9%	<b>46,3%</b>	6,7%
S-Phase	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	33,3%	38,0%	33,0%	<b>34,8%</b>	2,3%
NVP-BGJ-398 [1µM]	28,5%	32,6%	28,4%	<b>29,8%</b>	2,0%
TKI-258 [1µM]	27,4%	29,6%	28,0%	<b>28,3% *</b>	0,9%
5-FU [10µM]	25,8%	46,1%	26,4%	<b>32,8%</b>	9,4%
5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]	27,6%	40,5%	27,6%	<b>31,9%</b>	6,1%
5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]	26,1%	37,4%	25,9%	<b>29,8%</b>	5,4%
G2-Phase	V1	V2	V3	MW	SD
unbehandelt	14,7%	19,1%	15,0%	<b>16,3%</b>	2,0%
NVP-BGJ-398 [1µM]	12,0%	13,6%	11,6%	<b>12,8%</b>	1,2%
TKI-258 [1µM]	14,8%	14,8%	15,3%	<b>15,0%</b>	0,2%
5-FU [10µM]	12,5%	14,4%	11,6%	<b>12,8%</b>	1,2%
5-FU [10µM] + NVP-BGJ-398 [1µM]	12,2%	13,6%	12,6%	<b>12,8%</b>	0,6%
5-FU [10µM] + TKI-258 [1µM]	14,9%	21,9%	15,1%	<b>17,3%</b>	3,3%

**Tab. 24: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: Zellzyklusanalyse – Klon2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)**

Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] bzw. TKI-258 allein und in Kombination mit 5-FU [10µM] über 48 Stunden. Anteil der Zellen in der G1-, S- und G2-Zellzyklusphase.

V= Versuchsansatz, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

Abgebildet sind die Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

\*/\*\* signifikanter ( $p < 0,05$ ) / hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zu den unbehandelten Zellkulturen

### ***NVP-BGJ-398-Monotherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit NVP-BGJ-398 [1µM] für 48 Stunden wurde ein höherer Anteil der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase von 52,4% [SD=2,3%,  $p=0,04$ ] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (44,2% [SD=3,3] der Zellen) beobachtet.

Ebenso konnte ein tendenziell geringerer ( $p=0,08$ ) Anteil der Zellen in der S-Zellzyklusphase von 29,8% [SD=2,0%] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (34,8% [SD=2,3%]) und ein tendenziell geringerer ( $p=0,07$ ) Anteil der Zellen in der G2-Zellzyklusphase von 12,4% [SD=0,9%] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (16,3% [SD=2,0%]) beobachtet werden.

### ***5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit der Kombination aus NVP-BGJ-398 [1µM] und 5-FU [10µM] über 48 Stunden wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anteile der Zellzyklusphasen zur 5-FU-Monotherapie [10µM] festgestellt.

### ***TKI-258-Monotherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Es zeigte sich ein höherer Anteil der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase von 51,2% [SD=0,9%; p=0,04] nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit TKI-258 [1µM] für 48 Stunden gegenüber den unbehandelten Kontrollen (44,2% [SD=3,3] der Zellen) und ein geringerer Anteil der Zellen in der S-Zellzyklusphase von 28,3% [SD=0,9%; p=0,04] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (34,8% [SD=2,3%]).

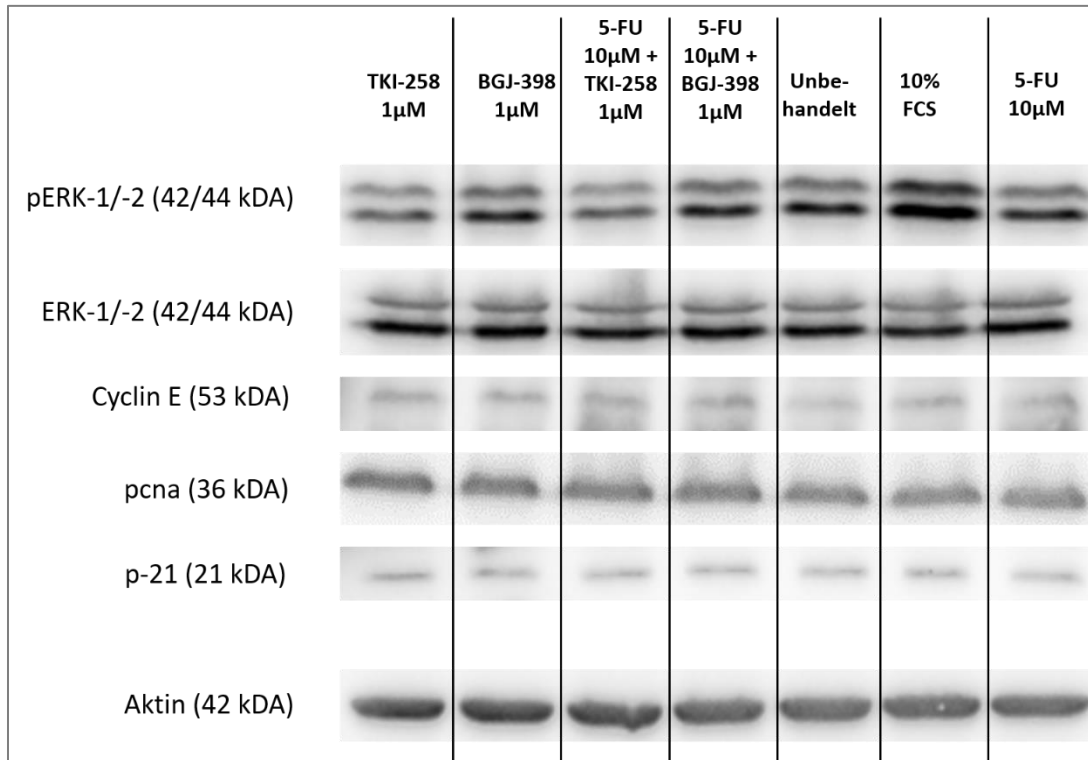
Bezüglich des Anteils der Zellen in der G2-Zellzyklusphase wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen TKI-258 [1µM] und den unbehandelten Kontrollen beobachtet.

### ***5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie in Klon2.2-Zellen (PSC)***

Nach Inkubation der Klon2.2-Zellen mit der Kombination aus TKI-258 [1µM] und 5-FU [10µM] über 48 Stunden wurde ein tendenziell höherer Anteil der Zellen in der G2-Zellzyklusphase von 17,3% [SD=3,3%, p=0,14] gegenüber den unbehandelten Kontrollen (12,8% [SD=1,2%] der Zellen) beobachtet.

### 3.6 Proteinchemische Bestimmungen

#### 3.6.1 Western Blot – BxPC-3-Zellen (Pankreatische Karzinomzellen)



**Abb. 22: Western Blot: Protein-Expression in Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) nach 48 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Therapeutika.** Es wurden 2 unabhängige Experimente durchgeführt. Hier wird exemplarisch ein Experiment dargestellt.

#### ***Aktivierung des ERK-Pathways in pankreatischen Karzinomzellen (BxPC-3)***

In den Versuchen wurden Antikörper gegen ERK und Antikörper gegen pERK verwendet, um die Aktivierung des ras-raf-MAPK-Signalwegs in behandelten und unbehandelten Zellen zu vergleichen.

In der qualitativen Auswertung der Western Blots konnten keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und den behandelten Pankreaskarzinom-Zellpopulationen bezüglich der ERK-Expression festgestellt werden.

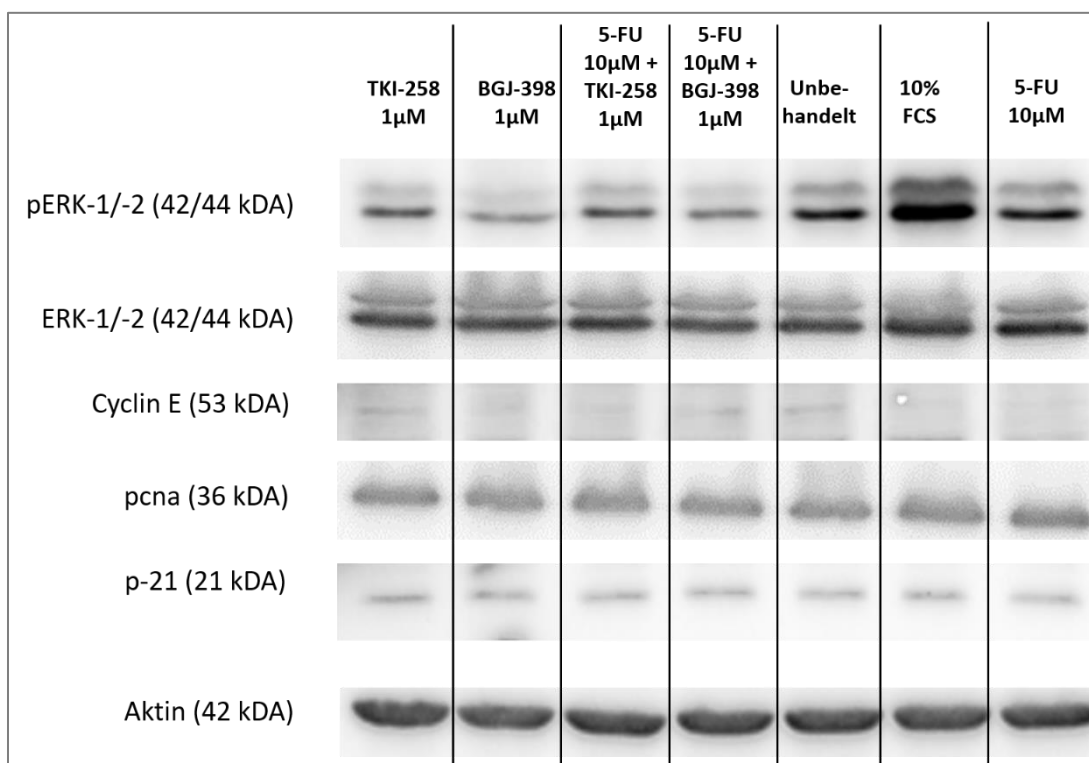
Qualitativ zeigte sich bei allen behandelten Zellpopulationen eine geringere Expression von aktiviertem (phosphoryliertem) ERK (pERK). Die geringste Expression von pERK zeigte sich in den Zellen, die mit TKI-258 (1µM) oder mit einer Kombination

aus 5-FU (10 $\mu$ M) und TKI-258 (1 $\mu$ M) behandelt wurden. Auch in den Zellen, die mit NVP-BGJ-398 behandelt wurden, zeigte sich eine geringere Expression von pERK.

### ***p21-, pcna- und Cyclin-E-Expression in pankreatischen Karzinomzellen (BxPC-3)***

p21 (auch CDK-Inhibitor-1), pcna (proliferating cell nuclear antigen) und Cyclin-E wurden als wesentliche Regulatoren des Zellzyklus ausgewählt, um diesbezügliche Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu untersuchen. Es konnten in den untersuchten Pankreaskarzinomzell-Proben qualitativ keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellproben bezüglich der Expression von p21, pcna oder Cyclin-E festgestellt werden.

### **3.6.2 Western Blot – Klon-2.2-Zellen (Pankreatische Sternzellen)**



**Abb. 23: Western Blot: Protein-Expression in pankreatischen Sternzellen (Klon2.2) nach 48 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Therapeutika.** Es wurden 2 unabhängige Experimente durchgeführt. Hier wird exemplarisch ein Experiment dargestellt.

### ***Aktivierung des ERK-Signalweges in pankreatischen Sternzellen (Klon2.2)***

Bezüglich der ERK-Expression konnten auch bei den Klon2.2-Zellen keine qualitativen Unterschiede zwischen den unbehandelten und den behandelten Zellpopulationen

festgestellt werden. Qualitativ zeigte sich bei den untersuchten PSC (Klon2.2) insbesondere bei den Zellkulturen, die mit NVP-BGJ-398 [1µM] als Mono- oder Kombinationstherapie mit 5-FU [10µM] behandelt wurden, eine geringere pERK-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dies zeigte sich auch bei den mit TKI-258 [1µM] behandelten Zellen.

***p-21-, pcna- und Cyclin-E-Expression in pankreatischen Sternzellen (Klon2.2)***

In den untersuchten PSC-Proben konnten qualitativ keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellproben bezüglich der Expression von p21, pcna oder Cyclin-E festgestellt werden.

## **4 DISKUSSION**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine hochmaligne Neoplasie mit einer infausten Prognose, bei der die 5-Jahres-Überlebensrate trotz intensiver Chemotherapie und radikaler chirurgischer Therapie weiterhin deutlich unter 10% liegt (Koch-Institut and e.V., 2019). Eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung sowie eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Zytostatika tragen zudem zur schlechten Prognose bei (Kleeff et al., 2016). Dies verdeutlicht, dass neue alternative Therapieansätze für das Pankreaskarzinom benötigt werden sowohl für die adjuvante Therapie nach der chirurgischen Resektion als auch für die primäre medikamentöse Therapie nicht-operabler oder metastasierter Pankreastumore.

Als möglicher und vielversprechender Ansatzpunkt gilt hierbei die sogenannte desmoplastische Reaktion des Pankreaskarzinoms: Ein besonderes Merkmal des Pankreaskarzinoms ist das dichte Stromagewebe, welches die Tumormikroumgebung der Karzinomzellen bestimmt. Die Regulation dessen erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen. So wird unter anderem der Kontakt der Tumorzellen mit Immunzellen gesteuert (Ene-Obong et al., 2013) und die Konzentration von Chemotherapeutika in der Umgebung der Karzinomzellen reduziert (Olive et al., 2009). Das Stromagewebe fördert zudem die Proliferation und die Metastasierung, es steigert die Resistenzentwicklung und beeinflusst wesentlich das Outcome von Pankreaskarzinom-Patienten (Erkan et al., 2008). Pankreatische Sternzellen (PSC), insbesondere in aktivierter Form, sind in diesem Zusammenhang die Hauptquelle der extrazellulären Matrix und regulieren auch deren Abbau und Remodelling (Neesse et al., 2011). PSC sind zentrale Regulatoren des Stromagewebes und nehmen gleichzeitig durch direkte Interaktion mit Pankreaskarzinomzellen Einfluss auf die Prognose und das Fortschreiten der Tumorerkrankung: Vonlaufen et al beschreiben, dass durch PSC erhöhte Proliferationsraten, verminderte Apoptose und gesteigerte Migration von Pankreaskarzinomzellen in Mausmodellen und Zellkulturmodellen induziert werden (Vonlaufen et al., 2008). Die Interaktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und pankreatischen Sternzellen erscheint somit als ein möglicher Ansatzpunkt für gezielte Therapien. Unter den Mediatoren, welche die wechselseitige Interaktion zwischen diesen Zellarten vermitteln, scheinen insbesondere Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen: Verschiedene FGF- und FGFR-Varianten werden von Pankreaskarzinomzelllinien und pankreatischen



Sternzellen exprimiert (Kornmann et al., 1998). Yamanka et al beschreiben, dass eine übermäßige Expression von FGF durch Pankreaskarzinomzellen mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechterer Prognose einhergeht (Yamanaka et al., 1993). Eine Studie von Kornmann et al zeigt, dass viele Pankreaskarzinomzellen eine übermäßige Expression der Isoform IIIc des FGFR-1 aufweisen und dass diese übermäßige Expression mit erhöhter Proliferation und verlängerter Überlebensdauer der Karzinomzellen einhergeht (Kornmann et al., 2002). Dabei war zudem eine gesteigerte Aktivität des mitosefördernden MAPK-Signalwegs im Sinne einer möglicherweise ursächlichen Effektor-Kaskade gezeigt worden. Eine Studie von Coleman et al beschreibt, dass eine Inhibition von FGFR-1 und FGF-2 durch RNAi oder chemische Inhibition bei PSC zu einer deutlich reduzierten Proliferation sowie zu einer deutlich geringeren Invasivität von PSC als auch von Pankreaskarzinomzellen führt (Coleman et al., 2014). Des Weiteren scheint die Aktivierung von PSC teilweise aberrant durch Wachstumsfaktoren, die von Pankreaskarzinomzellen sezerniert werden, induziert zu werden. So zeigt eine Studie von Bachem et al, dass unter anderem FGF-2 und PDGF am Übergang von PSC in ihre aktivierte Form beteiligt sind (Bachem et al., 2005). Diese ist durch eine gesteigerte Proliferation und Migration der PSC sowie eine erhöhte Synthese extrazellulärer Matrix geprägt und somit auch wichtig für den Progress von Pankreaskarzinomen. Auch für den VEGF/VEGFR-Signalweg legen Studien eine Progress-fördernde Wirkung bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Pankreaskarzinom-erkrankungen nahe, insbesondere im Zusammenhang mit Tumor-Neoangiogenese. So beschreiben Büchler et al eine Proliferationsinhibition von Pankreaskarzinomen in Rattenmodellen, in denen der VEGFR-2 mittels Retroviren herabreguliert wurde (Büchler et al., 2002). Zusammenfassend zeigten sich also in einer Vielzahl von experimentellen Studien Hinweise, die für die Wichtigkeit von FGF, PDGF und VEGF und deren Rezeptoren als Vermittler in der Zell-Zell-Interaktion von PSC und Pankreaskarzinomzellen und für das Fortschreiten des Pankreaskarzinoms als Erkrankung sprechen. Entsprechend erscheint eine zielgerichtete Inhibition dieser Wachstumsfaktoren oder ihrer Rezeptoren als vielversprechende Therapieoption.

In den von uns untersuchten Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie BxPC-3 konnten wir mittels RT-PCR eine starke Expression von FGFR-2 und FGFR-3 sowie schwächere Expressionen von FGFR-1, von PDGF-Rezeptoren und VEGF-Rezeptoren nachweisen. Die untersuchten pankreatischen Sternzellen exprimierten insbesondere PDGFR-B und FGFR-1 sowie PDGFR-A und FGFR-3. Eine starke Expression von

PDGF-Rezeptoren ist bei PSC in der Literatur vorbeschrieben. PDGF wird eine bedeutende Rolle als Mitogen für PSC zugewiesen und es wurde gezeigt, dass eine starke PDGFR-Expression von PSC vorkommt, insbesondere in ihrer aktivierten Form (Schneider et al., 2001). Die Ergebnisse entsprechender gezielter Therapien gegen VEGF oder PDGF mittels „small molecules“ oder rekombinanten, monoklonalen Antikörpern waren jedoch ernüchternd. So deuteten die Ergebnisse von zwei Phase II Studien zwar noch auf eine erhöhte Wirksamkeit des rekombinanten, humanisierten, monoklonalen VEGF-Antikörpers Bevacizumab in Kombination mit Gemcitabin im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin hinsichtlich progressionsfreier Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit hin (Kindler et al., 2005; Ko et al., 2008). Diese Ergebnisse konnten jedoch in einer Phase III Studie nicht bestätigt werden (Kindler et al., 2010). Ebenso konnte für die Kombination von Gemcitabin mit dem „small molecule“ Imatinib, welches PDGF-Rezeptoren inhibiert, in einer Phase II Studie kein Vorteil hinsichtlich progressionsfreier Überlebenszeit oder Gesamtüberleben gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie gezeigt werden (Moss et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des Multikinase-Inhibitors TKI-258 („Dovitinib“) und des spezifischen FGFR-Inhibitors NVP-BGJ-398 („Infigratinib“) auf die Pankreaskarzinom-Zelllinie BxPC-3 und die pankreatische Sternzell-Zelllinie Klon2.2 untersucht. TKI-258 bindet an verschiedene Tyrosinkinase, wie VEGFR-1 (IC<sub>50</sub> 10nM), VEGFR-2 (IC<sub>50</sub> 13nM), VEGFR-3 (IC<sub>50</sub> 8nM), FGFR-1 (IC<sub>50</sub> 8nM), FGFR-3 (IC<sub>50</sub> 9nM), PDGFR- $\alpha$  (IC<sub>50</sub> 200nM) und PDGFR- $\beta$  (IC<sub>50</sub> 27nM). Weiterhin zeigt sich auch eine inhibierende Wirkung auf andere Tyrosinkinase wie z.B. c-Kit (Lee et al., 2005). Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit von TKI-258 zeigen sich bei unterschiedlichen malignen Neoplasien, so unter anderem bei Endometrium-Karzinomen (Konecny et al., 2013), bei Glioblastomen (Schafer et al., 2016) oder bei Magenkarzinomen (Deng et al., 2012). Eine Arbeit von Taeger et al beschreibt Effekte von TKI-258 auf das Pankreaskarzinom. Die Arbeitsgruppe beschreibt in vitro Experimente, die eine geringere Proliferation und Motilität der mit TKI-258 behandelten Pankreaskarzinomzellen zeigen und dass in Mausmodellen ein geringeres Tumorwachstum, weniger Lymph- und Lebermetastasen sowie eine längere Gesamtüberlebensdauer bei Mäusen, die mit TKI-258 behandelt wurden, beobachtet werden konnte. Taeger et al beschreiben dabei vor allem auch die Effekte von Dovitinib auf das FGF/FGFR-Signalling und postulieren, dass insbesondere die Inhibition der FGF-Rezeptoren durch Dovitinib entscheidende Wirkungen auf

Pankreaskarzinomzellen haben könnte (Taeger et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von TKI-258 (Dovitinib) auf die Proliferation mittels eines WST-1-Proliferationsassays über 48 Stunden sowie mittels eines Langzeit-Proliferationsassays (Trypanblau-Färbung) über 240 Stunden untersucht. In den BxPC-3-Zellen (pankreatisches Adenokarzinom) zeigte sich im WST-1-Assay für die TKI-258-Monotherapie eine dosisabhängige Proliferationsinhibition ab einer Konzentration von 10 nM ( $8,4\% \pm 8,4\%$ ;  $p < 0,001$ ). Die höchste klinisch relevante Konzentration von  $1\mu\text{M}$  zeigte eine Proliferationsinhibition von  $22,5\% \pm 7,5\%$  ( $p < 0,001$ ), die höchste untersuchte TKI-258-Konzentration von  $10\mu\text{M}$  bewirkte eine Proliferationsinhibition nach 48h von  $55,3\% \pm 22,3\%$  ( $p < 0,001$ ). In der Kombinationstherapie aus 5-FU und TKI-258 konnte für klinisch relevante TKI-258-Konzentrationen ( $\leq 1\mu\text{M}$ ) in den WST-Assays keine zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber der 5-FU-Monotherapie gezeigt werden. Ausgehend von den Ergebnissen der 48-Stunden-WST-Proliferationsassays wurden die Langzeit-Proliferationsassays mittels Trypanblau-Färbung mit einer TKI-258-Konzentration von  $1\mu\text{M}$  durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Proliferationsinhibition von  $65,5\% \pm 8,1\%$  ( $p = 0,01$ ) nach einer Inkubation der Karzinomzellen mit TKI-258 über 96 Stunden und von  $77,2\% \pm 8,7\%$  ( $p = 0,008$ ) nach 144 Stunden. In der TKI-258-Monotherapie zeigte sich nach 192 Stunden wieder ein vermehrtes Wachstum der BxPC-3-Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die BxPC-3-Pankreaskarzinomzellen einen noch unklaren Resistenzmechanismus gegen die Multikinase-Inhibition durch eine TKI-258-Monotherapie aufweisen. In der klinisch relevanten TKI-258-Konzentration von  $1\mu\text{M}$  konnte keine zusätzliche Proliferationsinhibition gegenüber der 5-FU- bzw. 5-dFU-Monotherapie gezeigt werden. Allerdings tritt die rückläufige Wachstumsinhibition, die in den Wachstumskurven der TKI-258-Monotherapie beobachtet wurde, in der 5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie nicht auf. Durch diese Kombinationstherapie kommt es zu einer Wachstumsinhibition von  $95,9\% \pm 0,6\%$  ( $p < 0,001$ ) gegenüber den unbehandelten Pankreaskarzinomzellen nach 240 Stunden. Es konnte kein signifikanter Anstieg des Anteils avitaler Zellen durch die TKI-258-Monotherapie gegenüber den unbehandelten BxPC-3-Zellen und durch die TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber der 5-FU-Monotherapie beobachtet werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Bestimmung der Caspase-3-Aktivität, die lediglich einen geringfügigen Anstieg der Caspase-3-Aktivität in den BxPC-3-Zellen zeigten, die mit einer TKI-258-Monotherapie (2,0%) und mit einer 5-FU/TKI-258-

Kombinationstherapie (6,2%) behandelt wurden, ist anzunehmen, dass für die beobachtete Proliferationsinhibition eine antiproliferative Wirkung im Vordergrund steht und nicht eine zytotoxische Wirkung. Im Zellzyklusessay zeigte sich ein Anstieg des Anteils Karzinomzellen in der G2-Zellzyklus-Phase, nachdem sie mit einer TKI-258-Monotherapie behandelt wurden, damit ist ein G2/M-Arrest als eine Ursache der Proliferationsinhibition wahrscheinlich. Diese Induktion eines G2/M-Zellzyklusarrests bei Pankreaskarzinomzellen erscheint auch deshalb plausibel, da dieser Effekt von Dovitinib auch bei anderen malignen Neoplasien beschrieben wird: eine Arbeit von Huynh et al beschreibt einen entsprechenden G2/M-Zellzyklusarrest bei hepatozellulären Karzinomzellen, die mit TKI-258 behandelt wurden (Huynh et al., 2012). Man et al beschreiben die dosisabhängige Induktion eines G2/M-Zellzyklusarrests durch TKI-258 in verschiedenen Karzinomzelllinien, unter anderem Zervixkarzinomen, Nasopharynxkarzinomen und hepatozellulären Karzinomen, und nennen als mögliche Ursache hierfür von TKI-258 verursachte DNA-Schäden durch eine Inhibition von Polymerasen (Man et al., 2014). In den BxPC-3-Zellkulturen, die mit der 5-FU/TKI-258-Kombinationstherapie behandelt wurden, wurde dieser G2/M-Zellzyklusarrest nicht beobachtet. Hier zeigte sich ein Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase. Es ist denkbar, dass es durch die Kombination mit 5-FU zu einem Arrest des Zellzyklus bereits in dieser Phase der Zellteilung kommt und der G2/M-Arrest als Wirkmechanismus deswegen in den Hintergrund tritt. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von ERK-1/-2 in den Zellen, die mit TKI-258 als Monotherapie oder in Kombination mit 5-FU behandelt wurden. Es erscheint somit wahrscheinlich, dass auch eine Inhibition des MAPK-Signalwegs, der eine proliferationsfördernde und Apoptose-hemmende Wirkung hat, zum inhibierenden Effekt von TKI-258 auf die Pankreaskarzinom-Zellproliferation beiträgt. Die Inhibition von FGFR/PDGFR/VEGFR-Signalwegen durch TKI-258 scheint in in-vitro-Zellkulturen somit eine antiproliferative Wirkung bei Pankreaskarzinomzellen zu bewirken. Diese wird unter anderem durch einen G2/M-Zellzyklusarrest bei einer TKI-258-Monotherapie bzw. einen G0/G1-Zellzyklusarrest bei einer Kombinationstherapie aus 5-FU und TKI-258 und durch eine Inhibition des MAPK-Signalwegs vermittelt. Da die proliferationsinhibierende Wirkung von TKI-258 auch deutlich oberhalb der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) auf die Wachstumsfaktorrezeptoren noch wesentlich zunimmt, erscheint es wahrscheinlich, dass auch Off-Target-Wirkungen von TKI-258 außerhalb der Wirkung auf FGFR/PDGFR/VEGFR zu der

Proliferationsinhibition beitragen. Als mögliche Wirkungsorte sind hier unter anderem die DNA-Polymerasen zu nennen, deren Inhibition und daraus folgende DNA-Schäden in der Arbeit von Man et al. als eine Ursache des durch TKI-258 vermittelten G2/M-Zellzyklusarrests genannt werden (Man et al., 2014). Obwohl in den in-vitro-Proliferationsdaten keine zusätzliche Proliferationsinhibition durch die Kombinationstherapie aus TKI-258 und 5-FU gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie nachgewiesen werden konnte, könnte eine solche Kombinationstherapie aus TKI-258 und Zytostatika dennoch eine sinnvolle Therapieoption darstellen. Hierfür spricht zum einen das wieder zunehmende Wachstum nach 144 Stunden TKI-258-Monotherapie, welches in der Kombinationstherapie nicht beobachtet wurde und das auf einen unklaren Resistenzmechanismus hinweisen könnte, zum anderen die wahrscheinlichen Wirkungen von TKI-258 auf den MAPK-Signalweg und die Zellzyklus-Steuerung (G2/M-Zellzyklusarrest), welche die Wirkung von Zytostatika ergänzen könnten. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um in-vitro-Daten an 2D-Zellkulturen handelt, sind weitere in-vivo-Studien notwendig und erscheinen aufgrund der erhobenen Daten sinnvoll.

In den Klon2.2-Zellkulturen (PSC) zeigte sich durch die TKI-258-Monotherapie [1µM] ebenfalls eine signifikante Proliferationsinhibition von 31,1% [SD=2,3%; p<0,001] nach 48 Stunden und von 60,3% [SD=1,0%; p<0,001] nach 240 Stunden. Auch in den PSC-Zellkulturen, die mit der TKI-258-Monotherapie behandelt wurden, zeigte sich im Verlauf nach 192 Stunden eine Stagnation der antiproliferativen Wirkung. Dies könnte, wie bereits bei den BxPC-3-Karzinomzellen diskutiert, auf einen Resistenzmechanismus hinweisen, der bei einer Monotherapie mit TKI-258 wirksam wird. Als mögliche Resistenzmechanismen gegen Dovitinib von pro-B-Zellen beschreibt eine amerikanische Forschungsgruppe Mutationen der FGFR-2-Kinase-Domäne sowie FGFR-2-Überexpression (Byron et al., 2013). Ob dies auf Pankreaskarzinomzellen und PSC übertragbar ist, bleibt spekulativ. Wie bei den BxPC-3-Karzinomzellen konnte diese abnehmende Inhibition auch bei Behandlung der Klon2.2.-Sternzellen mit der 5-FU-/TKI-258-Kombinationstherapie nicht beobachtet werden. Es wurde eine Proliferationsinhibition von 93,8% ±0,3% nach 240 Stunden beobachtet, dabei zeigte sich eine zusätzliche Proliferationsinhibition (p<0,001) gegenüber der 5-FU-Monotherapie. In den PSC-Zellkulturen, die mit einer TKI-258-Monotherapie behandelt wurden, zeigte sich kein signifikant höherer Anteil der avitalen Zellen und kein relevant höherer Anteil der Caspase-3-positiven Zellen

gegenüber den unbehandelten Zellen. Somit ist wahrscheinlich, dass die TKI-258-Monotherapie *in vitro* einen antiproliferativen, jedoch keinen wesentlichen zytotoxischen Effekt auf Klon2.2-Zellkulturen vermittelt. Die Klon2.2-Zellkulturen, die mit einer Kombination aus 5-FU und TKI-258 behandelt wurden, wiesen nach 240 Stunden einen höheren Anteil avitaler Zellen ( $26,5\% \pm 3,9\%$ ;  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $5,8\% \pm 0,7\%$ ) auf. Da kein Unterschied bezüglich des Anteils avitaler Zellen zur 5-FU-Monotherapie ( $23,3\%$ ;  $SD = 0,09\%$ ;  $p = 0,31$ ) gezeigt werden konnte, ist der beobachtete zytotoxische Effekt der Kombinationstherapie vermutlich eher 5-FU zuzuschreiben, die zusätzliche Proliferationsinhibition am ehesten ein antiproliferativer Effekt. Die beobachteten Effekte von TKI-258 auf den Zellzyklus der Klon2.2-PSC-Zellkulturen sind weniger ausgeprägt als auf den Zellzyklus der BxPC-3-Karzinomzellkulturen. Bei PSC-Zellen, die mit der TKI-258-Monotherapie behandelt wurden kam es zu einem geringen Anstieg der G0/G1-Phase, sodass ein TKI-258-induzierter G0/G1-Arrest zum beobachteten antiproliferativen Effekt beitragen könnte. Bei PSC-Zellen, die mit der TKI-258/5-FU-Kombinationstherapie behandelt wurden, konnten keine signifikanten Effekte auf den Zellzyklus beobachtet werden. Da auch bei den Klon2.2-Zellen eine geringere Phosphorylierung des ERK-Proteins nach Behandlung mit TKI-258 sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit 5-FU gezeigt wurde, könnte der beobachtete antiproliferative Effekt von TKI-258 auf PSC-Zellen analog zu den Effekten bei BxPC-3-Zellen unter anderem durch eine geringere Aktivierung des proliferationsfördernden MAPK-Signalwegs vermittelt werden. In Anbetracht dieser *in-vitro*-Daten könnte eine Therapie mit TKI-258 auch auf die PSC einen relevanten proliferationsinhibierenden Effekt haben, insbesondere auch in Kombination mit Zytostatika wie 5-FU. Da PSC diverse proliferationsfördernde und die Prognose verschlechternde Effekte in der Entstehung und dem Fortschreiten des pankreatischen Adenokarzinoms vermittelt, könnte ein solcher proliferationsinhibierender Effekt auf PSC bei der Therapie mit TKI-258 zu einer Prognoseverbesserung bei Pankreaskarzinompatienten beitragen (Apte and Wilson, 2012). Weitere Studien sind notwendig um zu erörtern, ob sich diese Effekte auch in *in-vivo*-Modellen und im Rahmen von Therapiestudien bestätigen, um die Auswirkungen auf die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der Tumormikroumgebung und insbesondere der Interaktion zwischen PSC und pankreatischen Tumorzellen zu erörtern, zum Beispiel durch Ko-Kulturmodelle, und

um den möglicherweise bestehenden Resistenzmechanismus gegen die TKI-258-Monotherapie besser zu verstehen.

Angesichts der Relevanz des FGF/FGFR-Signalling insbesondere auch auf die Proliferation von pankreatischen Karzinomzellen (Kornmann et al., 1997; Yamazaki et al., 1997) wurden weiterhin die Effekte des selektiven FGFR-Inhibitors NVP-BGJ-398 (Infigratinib) auf Pankreaskarzinomzellen und pankreatische Sternzellen untersucht. Infigratinib ist ein hochpotenter Inhibitor von FGF-Rezeptoren, es wird die Wirkung von FGFR-1 (IC<sub>50</sub> 0,9nM), FGFR-2 (IC<sub>50</sub> 1,4nM) und FGFR-3 (IC<sub>50</sub> 1nM) inhibiert. Weiterhin besteht eine geringe Inhibition von FGFR-4 und VEGFR-2 (Guagnano et al., 2011). Studien geben Hinweise für die Wirksamkeit von NVP-BGJ-398 bei verschiedenen malignen Neoplasien, unter anderem bei malignen Rhabdoidtumoren (Wöhrle et al., 2013), Endometriumkarzinomen (Konecny et al., 2013) und Kolonkarzinomen (Göke et al., 2013). NVP-BGJ-398 zeigte in den Proliferationsassays eine inhibierende Wirkung in klinisch relevanter Dosis auf die Proliferation der untersuchten Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie BxPC-3. In den Kurzzeit-Untersuchungen nach 48h mittels WST-1-Assay wurde eine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum ab einer Dosis von 100nM beobachtet. Für die Langzeituntersuchungen mittels Trypanblau-Proliferationsassay wurde die klinisch-relevante NVP-BGJ-398-Konzentration von 1µM untersucht. Es zeigte sich eine Inhibition des Zellwachstums durch die NVP-BGJ-398-Monotherapie von 74,5% (SD=2,5%, p=0,007) nach 240 Stunden. Eine Stagnation dieser Proliferationsinhibition wie bei der TKI-258-Monotherapie wurde bei Infigratinib nicht beobachtet. Insgesamt wurde tendenziell eine etwas höhere Proliferationsinhibition in den Langzeitproliferationsassays durch die NVP-BGJ-398-Monotherapie als durch die TKI-258-Monotherapie beobachtet, jedoch waren diese Unterschiede zwischen TKI-258 und NVP-BGJ-398 statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse der Kollegen Byron et al zeigen, dass Mutationen der FGFR-2-Kinase-Domäne mit erhöhter intrinsischer Kinase-Aktivität sowie FGFR-2-Überexpression eine mögliche Ursache der TKI-258-Resistenz bei Pro-B-Zellen sind (Byron et al., 2013). In diesem Zusammenhang könnte die spezifischere Bindung von NVP-BGJ-398 (IC<sub>50</sub> 1,4nM) an FGFR-2 gegenüber TKI-258 (IC<sub>50</sub> 9nM) eine Erklärung bieten, warum eine Stagnation der Proliferationsinhibition bei TKI-258 beobachtet wurde, jedoch nicht bei NVP-BGJ-398. Zum anderen sind unspezifische Off-Target-Wirkungen, die zwischen den beiden Therapeutika differieren könnten, als mögliche Ursache zu

nennen. Weitere Folgeuntersuchungen unter anderem bezüglich des Down-Stream-Signallings sind zur weiteren Klärung dieser Fragestellung notwendig.

Die Kombinationstherapie 5-FU/NVP-BGJ-398 zeigte nach 240 Stunden eine zusätzliche Proliferationsinhibition (94,8%; SD=0,9%;  $p=0,035$ ) gegenüber der 5-FU-Monotherapie (92,0%; SD=0,9%). Es konnte kein signifikanter Anstieg des Anteils avitaler Zellen durch die NVP-BGJ-398-Monotherapie gegenüber den unbehandelten BxPC-3-Zellen und durch die NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie gegenüber der 5-FU-Monotherapie beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich auch bei NVP-BGJ-398 lediglich ein geringfügiger Anstieg der Caspase-3-Aktivität in den BxPC-3-Zellen, die mit einer NVP-BGJ-398-Monotherapie (0,6%) und mit einer 5-FU/NVP-BGJ-398-Kombinationstherapie (1,6 %) behandelt wurden. Es ist somit wahrscheinlich, dass bei NVP-BGJ-398 eine antiproliferative Wirkung für die beobachtete Proliferationsinhibition im Vordergrund steht und nicht eine zytotoxische Wirkung.

Angesichts des Anstiegs des Anteils der Zellen in der G1-Zellzyklusphase und des gleichzeitigen Abfalls des S-Zellzyklusphasen-Anteils in den Populationen, die mit einer NVP-BGJ-398-Monotherapie behandelt wurden, ist die Induktion eines G0/G1-Zellzyklusarrest eine wahrscheinliche Ursache des proliferationshemmenden Effekts von NVP-BGJ-398. Diese Schlussfolgerung erscheint auch plausibel, da sowohl in physiologischen Zellen als auch bei malignen Neoplasien der Einfluss des FGF/FGFR-Signallings für die Regulierung des Zellzyklus beschrieben ist. Ebenso ist für eine Inhibition von FGF-Rezeptoren in verschiedenen malignen Neoplasien eine Induktion eines G0/G1-Zellzyklusarrest beschrieben. So beschreiben Miyake et al, dass bei Karzinomzellen der Harnblase die selektive Inhibition von FGF-Rezeptoren zu einer Induktion eines G0/G1-Zellzyklusarrests führt (Miyake et al., 2010). Pattarozzi et al untersuchten die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib auf Mesotheliomzellen. Ihre Schlussfolgerung ist, dass die antiproliferative Wirkung im Wesentlichen auf die Inhibition von FGFR1 zurückzuführen ist. Sie beschreiben dabei ebenfalls die Induktion eines G0/G1-Zellzyklusarrests (Pattarozzi et al., 2017). Der Effekt eines G0/G1-Zellzyklusarrests konnte auch in den BxPC-3-Zellkulturen beobachtet werden, die mit einer NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie behandelt wurden. Der Anteil der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase war dabei tendenziell höher ( $p=0,24$ ) und der Anteil der Zellen in der G2-Zellzyklusphase signifikant niedriger ( $p=0,04$ ) als bei den BxPC-3-Zellen, die ausschließlich mit 5-FU behandelt wurden. Eine Verstärkung des auch durch 5-FU induzierten G0/G1-



Zellzyklusarrests könnte somit ein Wirkungsmechanismus sein, der die beobachtete zusätzliche Wachstumsinhibition der NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie vermittelt. Die Hemmung des proliferationsfördernden MAPK-Signalwegs könnte ein weiterer Effekt der FGFR-Inhibition durch NVP-BGJ-398 sein, welcher Wachstumsinhibition vermittelt. So zeigte sich sowohl in den BxPC-3-Zellen, die mit einer NVP-BGJ-398-Monotherapie, als auch in jenen, die mit einer NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie behandelt wurden, eine geringere Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK, welches eine wichtige Proteinkinase im MAP-Kinase-Signalweg ist. Die zentrale Rolle des MAP-Kinase-Signalwegs als proliferationsfördernder Downstream-Signalweg des FGFR-Rezeptors ist in der Tumorentstehung unter anderem in der Arbeit von Wesche et al beschrieben (Wesche et al., 2011). Perera et al beschreiben eine Proliferationsinhibition mit Herunterregulierung des MAP-Kinase-Signalwegs durch den FGFR-Inhibitor Erdafitinib (Perera et al., 2017), ebenso wie Grünewald et al dies in verschiedenen FGFR-überexprimierenden Tumorzelllinien durch den FGFR-Inhibitor Rogaratinib beschreiben (Grünewald et al., 2019). In der Arbeit von Kornmann et al wird eine Überexpression der FGFR-1 IIIc-Isoform in Pankreaskarzinomzellen und eine dadurch vermittelte mitogene Wirkung beschrieben (Kornmann et al., 2002). Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass der selektive FGFR-Inhibitor NVP-BGJ-398 (Infigratinib) in-vitro in pankreatischen Adenokarzinomzellen der BxPC-3-Zellreihe eine Proliferationsinhibition bewirkt, welche unter anderem durch einen G0/G1-Zellzyklusarrest und Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs vermittelt wird. Dieser Effekt zeigt sich sowohl durch die Monotherapie, als auch durch die Kombinationstherapie mit dem Zytostatikum 5-FU. Weitere Studien sind notwendig, um zu erörtern, ob sich diese Zellkultur-Daten in-vivo reproduzieren lassen und um weitere Effekte auf das Down-Stream-Signalling zu verstehen.

In den untersuchten PSC-Zellkulturen der Zellreihe Klon2.2 zeigte sich eine Proliferationsinhibition durch die NVP-BGJ-398-Monotherapie nach 240 Stunden von 55,3% (SD=1,7%;  $p < 0,001$ ) gegenüber den unbehandelten Zellen. Eine Stagnation dieser Proliferationsinhibition wie bei der TKI-258-Monotherapie wurde nicht beobachtet. In der NVP-BGJ-398/5-FU Kombinationstherapie zeigte sich eine signifikante zusätzliche Proliferationsinhibition von 93,4% (SD=0,3%;  $p = 0,004$ ) gegenüber der 5-FU-Monotherapie (89,8%; SD=0,8%). Es zeigte sich ein geringfügiger Anstieg der avitalen Zellen nach Behandlung der Klon2.2-Zellen mit der

NVP-BGJ-398-Monotherapie über 240 Stunden von 15,9% (SD=0,9%) gegenüber den unbehandelten Zellen (10,1%; SD=0,7%; p=0,002). Zudem ergab sich ein tendenziell höherer Anteil avitaler Zellen nach Behandlung mit der NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie über 240 Stunden (37,8%; SD=4,8%) gegenüber der 5-FU-Monotherapie (31,6%; SD 0,4%; p=0,14). Der Anteil Caspase-3-positiver Klon2.2-Zellen war sowohl in denjenigen, die mit der NVP-BGJ-398-Monotherapie, als auch in den Zellen, die mit der NVP-BGJ-398/5-FU-Kombinationstherapie behandelt wurden, nur geringfügig erhöht. Somit könnte NVP-BGJ-398 in-vitro einen geringfügigen zytotoxischen Effekt auf pankreatische Sternzellen der Klon2.2-Zellen ausüben, der beobachtete Wachstumsunterschied wird jedoch vermutlich im Wesentlichen durch einen antiproliferativen Effekt vermittelt. Für die NVP-BGJ-398-Monotherapie zeigte sich ein Anstieg der Klon2.2-Zellen in der G1-Zellzyklusphase von 52,4% (SD=2,3%; p=0,04) gegenüber den unbehandelten Zellen (44,2%; SD=3,3%), somit scheint NVP-BGJ-398 in der Monotherapie in einem gewissen Maße einen G0/G1-Zellzyklusarrest bei Klon2.2-Zellen zu vermitteln. Für die Kombinationstherapie mit 5-FU konnte kein signifikanter Effekt auf den Zellzyklus gezeigt werden. Wie auch in den BxPC-3-Tumorzellen zeigte sich auch in den Klon2.2-PSC-Zellkulturen eine geringere ERK-Phosphorylierung, sodass eine durch NVP-BGJ-398 vermittelte Hemmung des MAP-Kinase-Signalwegs auch in den Klon2.2-Zellen zur Proliferationsinhibition beitragen könnte. Der selektive FGFR-Inhibitor NVP-BGJ-398 (Infigratinib) vermittelte in den hier vorgestellten Zellkulturexperimenten als Monotherapie eine Proliferationsinhibition in den pankreatischen Sternzellen der Klon2.2-Zellreihe und zeigte eine signifikante zusätzliche Proliferationsinhibition zur 5-Fluorouracil-Monotherapie. Den erhobenen Daten folgend beruht diese Proliferationsinhibition wie auch in den Pankreaskarzinomzellen am ehesten auf einem antiproliferativen Effekt, der unter anderem durch einen G0/G1-Zellzyklusarrest und die Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs vermittelt wird. Bachem et al untersuchten die parakrinen, stimulierenden Effekte pankreatischer Adenokarzinomzellen auf pankreatische Sternzellen. Sie folgern dabei, dass unter anderem FGF-2 und PDGF Mediatoren des proliferations-fördernden Effekts der Pankreaskarzinomzellen auf PSC darstellen (Bachem et al., 2005).

Aufgrund des proliferationsinhibierenden Effekts des Multikinase-Inhibitors TKI-258 und insbesondere des selektiven FGFR-Inhibitors NVP-BGJ-398 könnte die vorliegende Arbeit darauf hindeuten, dass insbesondere der FGF/FGFR-Signalweg die Proliferation pankreatischer Sternzellen steigert. Es sind jedoch weitere Studien, wie

zum Beispiel Ko-Kultur-Experimente mit pankreatischen Karzinomzellen und Sternzellen nötig, um diese Hypothese zu erhärten.

In Zusammenschau sprechen die Experimente mit dem Multi-Kinase-Inhibitor TKI-258 (Dovitinib) und des selektiven FGFR-Inhibitors NVP-BGJ-398 (Infigratinib) dafür, dass der FGF/FGFR-Signalweg ein wesentlicher Vermittler proliferations-fördernder Signale für pankreatische Adenokarzinomzellen und für pankreatische Sternzellen ist und dass die Inhibition von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und insbesondere des FGF/FGFR-Signalwegs eine vielversprechende Therapieoption für pankreatische Adenokarzinome sein könnte. Insbesondere die selektivere und spezifischere Inhibition von FGF-Rezeptoren könnte zur Vermeidung von möglichen Resistenzen des pankreatischen Adenokarzinoms gegen Wachstumsfaktor-Inhibition beitragen und vermittelte, zumindest in den in-vitro-Zellkulturen einen etwas stärkeren proliferations-hemmenden Effekt. Ob sich dieser proliferationshemmende Effekt auch in vivo darstellen lässt, sollte durch weitere Studien erörtert werden. Für Dovitinib wurden entsprechende in vivo Experimente an Mausmodellen bereits durch Taeger et al durchgeführt, es zeigten sich signifikante Wachstumsverzögerung und Überlebensvorteile durch die TKI-258-Therapie (Taeger et al., 2011) und Ma et al veröffentlichten 2019 erste Ergebnisse einer TKI-258 Phase-Ib-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinomen. Diese ergab Hinweise für eine mögliche Effektivität der Kombinationstherapie von Dovitinib mit Gemcitabin und Capecitabin (Prodrug von 5-Fluoruracil) (Ma et al., 2019).

Weiterführende Studien zum Ansatz der selektiven FGFR-Inhibition durch Infigratinib sind dem Autor dieser Arbeit zum derzeitigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Weiterhin könnte insbesondere der Effekt einer selektiven FGFR-Inhibition auf die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung und die Interaktion zwischen pankreatischen Adenokarzinomzellen und pankreatischen Sternzellen Thema weiterer Untersuchungen wie zum Beispiel von Ko-Kultur- oder in-vivo-Experimenten sein.

Die selektive Inhibition von FGFR durch Wirkstoffe wie NVP-BGJ-398 wie auch die Therapie mit Multikinase-Inhibitoren wie TKI-258 könnten möglicherweise als zielgerichtete Therapie zusätzlich zur Chirurgie und zur systemischen Chemotherapie zur Verbesserung der infausten Prognose des Adenokarzinom des Pankreas in zukünftigen Therapieansätzen entscheidend beitragen.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Das Adenokarzinom des Pankreas hat trotz intensiver multimodaler Therapie weiterhin eine infauste Prognose. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist die Tumormikroumgebung der Karzinomzellen. Sie vermittelt Resistenzen, steigert die Metastasierungsrate und die Tumormigration. Die Interaktion von pankreatischen Sternzellen (PSC) und Karzinomzellen ist dabei wesentlich und wird durch Zytokine wie FGF, PDGF und VEGF reguliert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden humane Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) und PSC (Klon 2.2) in vitro mit dem Multikinaseinhibitor Dovitinib (VEGFR-1/2/3, FEGFR-1/2, PDGFR- $\alpha/\beta$ ) und dem selektiven FGFR-Inhibitor Infigratinib allein und in Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) behandelt, um Auswirkungen auf Proliferation, Zellzyklus, Apoptose und Downstream-Signalwege zu charakterisieren. In den Zellproliferationsversuchen zeigte sich eine dosisabhängige Wachstumsinhibition durch Dovitinib in BxPC-3 ( $77,2\% \pm 8,7\%$  nach 144h,  $p=0,008$ ) und PSC ( $60,3\% \pm 1,0\%$  nach 144h,  $p<0,001$ ). FACS-Analysen ergaben in BxPC-3-Zellen einen G2/M-Zellzyklusarrest (G2/M-Phase  $17,8\% \pm 0,22\%$ ,  $p<0,001$ ; unbehandelt  $7,6\% \pm 0,81$ ) und einen antiproliferativen Effekt durch Dovitinib ohne Caspase-3 abhängige Apoptoseinduktion. PSC-Zellen zeigen einen G0/G1-Arrest (G1/G0  $51,2\% \pm 0,9\%$ ,  $p=0,04$ ; unbehandelt  $44,2\% \pm 3,3\%$ ) durch Dovitinib. Infigratinib allein führt zu einer Wachstumsinhibition von BxPC-3-Zellen ( $74,5\% \pm 7,5\%$  nach 240h,  $p=0,007$ ) und von PSC ( $55,3\% \pm 1,7\%$  nach 240h,  $p<0,001$ ). Die Kombination mit 5-FU ( $10\mu\text{M}$ ) führt zu einer geringen Steigerung des antiproliferativen Effekts gegenüber 5-FU-Monotherapie (Infigratinib/5-FU vs. 5-FU:  $94,8\%$  vs.  $92,0\%$ ,  $p=0,035$ ). Dies wurde in den Experimenten mit Dovitinib/5-FU (vs. 5-FU) nicht beobachtet. Infigratinib vermittelt in BxPC-3 (G1/0  $64,5\% \pm 0,9\%$ ,  $p=0,002$ ; unbehandelt  $50,9\% \pm 2,4\%$ ) und PSC (G1/0  $52,4\% \pm 2,3\%$ ,  $p=0,04$ ; unbehandelt  $44,2\% \pm 3,3\%$ ) einen G0/G1-Arrest. Eine relevante Caspase-3 abhängige Apoptoseinduktion wurde nicht detektiert, so dass auch für Infigratinib von einer antiproliferativen Wirkung ausgegangen werden muss. Eine Inhibition des MAPK-Signalwegs wurde in diesem Zusammenhang als mögliche Ursache der Wachstumsinhibition sowohl für Dovitinib als auch Infigratinib in BxPC-3-Zellen und PSC beobachtet. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Experimente, dass die Inhibition proliferationsfördernder Signale (insbesondere des FGF-Rezeptors) von Effektorzellen (Karzinomzellen und PSC) der desmoplastischen Reaktion des Adenokarzinoms des Pankreas ein vielversprechender Therapieansatz sein könnte, um die Prognose von Pankreaskarzinompatienten langfristig zu verbessern.

## **Literaturverzeichnis**

Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* 22, 1276-1312.

Apte, M., Pirola, R., and Wilson, J. (2012). Pancreatic Stellate Cells : A Starring Role in Normal and Diseased Pancreas. *Frontiers in Physiology* 3.

Apte, M., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (2015). Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Current opinion in gastroenterology* 31, 416-423.

Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43, 128-133.

Apte, M.V., Park, S., Phillips, P.A., Santucci, N., Goldstein, D., Kumar, R.K., Ramm, G.A., Buchler, M., Friess, H., McCarroll, J.A., *et al.* (2004). Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29, 179-187.

Apte, M.V., and Wilson, J.S. (2012). Dangerous liaisons: Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27, 69-74.

Bachem, M.G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R.M., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Grunert, A., and Adler, G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115, 421-432.

Bachem, M.G., Schünemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., and Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128, 907-921.

Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 235-253.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Buchler, P., Reber, H.A., Buchler, M.W., Friess, H., and Hines, O.J. (2002). VEGF-RII influences the prognosis of pancreatic cancer. *Annals of surgery* 236, 738-749; discussion 749.

Büchler, P., Reber, H.A., Ullrich, A., Shiroiki, M., Roth, M., Büchler, M.W., Lavey, R.S., Friess, H., and Hines, O.J. (2002). Pancreatic cancer growth is inhibited by blockade of VEGF-RII. *Surgery* 134, 772-782.

Byron, S.A., Chen, H., Wortmann, A., Loch, D., Gartside, M.G., Dehkoda, F., Blais, S.P., Neubert, T.A., Mohammadi, M., and Pollock, P.M. (2013). The N550K/H mutations in FGFR2 confer differential resistance to PD173074, dovitinib, and ponatinib ATP-competitive inhibitors. *Neoplasia* 15, 975-988.

Casadei, C., Dizman, N., Schepisi, G., Cursano, M.C., Basso, U., Santini, D., Pal, S.K., and De Giorgi, U. (2019). Targeted therapies for advanced bladder cancer: new strategies with FGFR inhibitors. *Ther Adv Med Oncol* 11, 1758835919890285-1758835919890285.

Chen, P.H., Chen, X., and He, X. (2013). Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochimica et biophysica acta* 1834, 2176-2186.

Coleman, S.J., Chioni, A.M., Ghallab, M., Anderson, R.K., Lemoine, N.R., Kocher, H.M., and Grose, R.P. (2014). Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO molecular medicine* 6, 467-481.

Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M.A., Cotten, M., and Christofori, G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* 60, 7163-7169.

Crissman, H.A., and Steinkamp, J.A. (1973). Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *The Journal of cell biology* 59, 766-771.

Delitto, D., Black, B.S., Sorenson, H.L., Knowlton, A.E., Thomas, R.M., Sarosi, G.A., Moldawer, L.L., Behrns, K.E., Liu, C., George, T.J., *et al.* (2015). The inflammatory milieu within the pancreatic cancer microenvironment correlates with clinicopathologic parameters, chemoresistance and survival. *BMC Cancer* 15, 783.

Deng, N., Goh, L.K., Wang, H., Das, K., Tao, J., Tan, I.B., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Lim, K.H., *et al.* (2012). A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* 61, 673-684.

Ene-Obong, A., Clear, A.J., Watt, J., Wang, J., Fatah, R., Riches, J.C., Marshall, J.F., Chin-Aleong, J., Chelala, C., Gribben, J.G., *et al.* (2013). Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 145, 1121-1132.

Erkan, M., Michalski, C.W., Rieder, S., Reiser-Erkan, C., Abiatari, I., Kolb, A., Giese, N.A., Esposito, I., Friess, H., and Kleeff, J. (2008). The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6, 1155-1161.

Giroux, V., Dagorn, J.C., and Iovanna, J.L. (2009). A Review of Kinases Implicated in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* 9, 738-754.

Göke, F., Göke, A., von Mässenhausen, A., Franzen, A., Sharma, R., Kirsten, R., Böhm, D., Kristiansen, G., Stenzinger, A., Wynes, M., *et al.* (2013). Fibroblast Growth Factor Receptor 1 as a Putative Therapy Target in Colorectal Cancer. *Digestion* 88, 172-181.

Grünewald, S., Politz, O., Bender, S., Héroult, M., Lustig, K., Thuss, U., Kneip, C., Kopitz, C., Zopf, D., Collin, M.P., *et al.* (2019). Rogaratinib: A potent and selective pan-FGFR inhibitor with broad antitumor activity in FGFR-overexpressing preclinical cancer models. *Int J Cancer* 145, 1346-1357.

Guagnano, V., Furet, P., Spanka, C., Bordas, V., Le Douget, M., Stamm, C., Brueggen, J., Jensen, M.R., Schnell, C., Schmid, H., *et al.* (2011). Discovery of 3-(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), A Potent and Selective Inhibitor of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* 54, 7066-7083.

Hasegawa, Y., Takada, M., Yamamoto, M., and Saitoh, Y. (1994). The gradient of basic fibroblast growth factor concentration in human pancreatic cancer cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 1435-1439.

Hausmann, S., Kong, B., Michalski, C., Erkan, M., and Friess, H. (2014). The role of inflammation in pancreatic cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 816, 129-151.

Heldin, C.H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews* 79, 1283-1316.

Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 362, 1605-1617.

Horibe, Y., Adachi, S., Yasuda, I., Yamauchi, T., Kawaguchi, J., Kozawa, O., Shimizu, M., and Moriwaki, H. (2016). Anticancer effect of arsenite on cell migration, cell cycle and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Oncology Letters* 12, 177-182.

Huynh, H., Chow, P.K.H., Tai, W.M., Choo, S.P., Chung, A.Y.F., Ong, H.S., Soo, K.C., Ong, R., Linnartz, R., and Shi, M.M. (2012). Dovitinib demonstrates antitumor and antimetastatic activities in xenograft models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 56, 595-601.

Huynh, H., Lee, L.Y., Goh, K.Y., Ong, R., Hao, H.X., Huang, A., Wang, Y., Graus Porta, D., Chow, P., and Chung, A. (2019). Infigratinib Mediates Vascular Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* 69, 943-958.

Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B., and Logsdon, C.D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research* 68, 918-926.

Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., and Hiraoka, N. (2013). Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108, 914-923.

Jesnowski, R., Fürst, D., Ringel, J., Chen, Y., Schrödel, A., Kleeff, J., Kolb, A., Schareck, W.D., and Löhr, M. (2005). Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-

acetylcysteine. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 85, 1276-1291.

Kindler, H.L., Friberg, G., Singh, D.A., Locker, G., Nattam, S., Kozloff, M., Taber, D.A., Karrison, T., Dachman, A., Stadler, W.M., *et al.* (2005). Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 8033-8040.

Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., *et al.* (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). *Journal of Clinical Oncology* 28, 3617-3622.

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., *et al.* (2016). Pancreatic cancer. *Nature reviews Disease primers* 2, 16022.

Klöppel, G., Hruban, R.H., Longnecker, D.S., Adler, G., Kern, S.E., and Partanen, T.J. (2000). Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In *World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System*, S.R. Hamilton, and L.A. Aaltonen, eds. (Lyon: IARC Press), pp. 221-230.

Ko, A.H., Dito, E., Schillinger, B., Venook, A.P., Xu, Z., Bergsland, E.K., Wong, D., Scott, J., Hwang, J., and Tempero, M.A. (2008). A phase II study evaluating bevacizumab in combination with fixed-dose rate gemcitabine and low-dose cisplatin for metastatic pancreatic cancer: is an anti-VEGF strategy still applicable? *Investigational new drugs* 26, 463-471.

Koch-Institut, R., and e.V., G.d.e.K.i.D. (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016* (Robert Koch-Institut).

Konecny, G.E., Kolarova, T., O'Brien, N.A., Winterhoff, B., Yang, G., Qi, J., Qi, Z., Venkatesan, N., Ayala, R., Luo, T., *et al.* (2013). Activity of the Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors Dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in Human Endometrial Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 632-642.

Kornmann, M., Beger, H.G., and Korc, M. (1998). Role of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 17, 169-175.

Kornmann, M., Ishiwata, T., Beger, H.G., and Korc, M. (1997). Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* 15, 1417-1424.

Kornmann, M., Ishiwata, T., Matsuda, K., Lopez, M.E., Fukahi, K., Asano, G., Beger, H.G., and Korc, M. (2002). IIIc isoform of fibroblast growth factor receptor 1 is overexpressed in human pancreatic cancer and enhances tumorigenicity of hamster ductal cells. *Gastroenterology* 123, 301-313.

Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology* 66, 188-193.



Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation* 14, 44-55.

Lee, J.K., Edderkaoui, M., Truong, P., Ohno, I., Jang, K.T., Berti, A., Pandol, S.J., and Gukovskaya, A.S. (2007). NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology* 133, 1637-1648.

Lee, S.H., Lopes de Menezes, D., Vora, J., Harris, A., Ye, H., Nordahl, L., Garrett, E., Samara, E., Aukerman, S.L., Gelb, A.B., *et al.* (2005). In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 3633-3641.

Liu, Z., Ishiwata, T., Zhou, S., Maier, S., Henne-Bruns, D., Korc, M., Bachem, M., and Kornmann, M. (2007). Human fibroblast growth factor receptor 1-IIIb is a functional fibroblast growth factor receptor expressed in the pancreas and involved in proliferation and movement of pancreatic ductal cells. *Pancreas* 35, 147-157.

Löhr, J.-M., Klöppel, G., Keller, J., Layer, P., and Beglinger, C. (2008). Pancreas. In *Gastroenterologie*, J.F.F. Riemann, Wolfgang; Galle, Peter R.; Mössner, Joachim, ed. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG), pp. 1176-1893.

Ma, W.W., Xie, H., Fetterly, G., Pitzonka, L., Whitworth, A., LeVea, C., Wilton, J., Mantione, K., Schihl, S., Dy, G.K., *et al.* (2019). A Phase Ib Study of the FGFR/VEGFR Inhibitor Dovitinib With Gemcitabine and Capecitabine in Advanced Solid Tumor and Pancreatic Cancer Patients. *American journal of clinical oncology* 42, 184-189.

Man, W.Y., Mak, J.P.Y., and Poon, R.Y.C. (2014). Dovitinib induces mitotic defects and activates the G2DNA damage checkpoint. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18, 143-155.

McCarty, M.F., Somcio, R.J., Stoeltzing, O., Wey, J., Fan, F., Liu, W., Bucana, C., and Ellis, L.M. (2007). Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *The Journal of clinical investigation* 117, 2114-2122.

Miyake, M., Ishii, M., Koyama, N., Kawashima, K., Kodama, T., Anai, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., and Sugano, K. (2010). 1-tert-butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido[2,3 -d]pyrimidin-7-yl]-urea (PD173074), a selective tyrosine kinase inhibitor of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3), inhibits cell proliferation of bladder cancer carrying the FGFR3 gene mutation along with up-regulation of p27/Kip1 and G1/G0 arrest. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 332, 795-802.

Moss, R.A., Moore, D., Mulcahy, M.F., Nahum, K., Saraiya, B., Eddy, S., Kleber, M., and Poplin, E.A. (2012). A Multi-institutional Phase 2 Study of Imatinib Mesylate and Gemcitabine for First-Line Treatment of Advanced Pancreatic Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR* 5, 77-83.

Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., *et al.* (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60, 861-868.

Nomura, S., Yoshitomi, H., Takano, S., Shida, T., Kobayashi, S., Ohtsuka, M., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Kato, A., *et al.* (2008). FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 99, 305-313.

Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, NY)* 324, 1457-1461.

Otrock, Z.K., Makarem, J.A., and Shamseddine, A.I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood cells, molecules & diseases* 38, 258-268.

Pattarozzi, A., Carra, E., Favoni, R.E., Wurth, R., Marubbi, D., Filiberti, R.A., Mutti, L., Florio, T., Barbieri, F., and Daga, A. (2017). The inhibition of FGF receptor 1 activity mediates sorafenib antiproliferative effects in human malignant pleural mesothelioma tumor-initiating cells. *Stem Cell Res Ther* 8, 119.

Perera, T.P.S., Jovcheva, E., Mevellec, L., Vialard, J., De Lange, D., Verhulst, T., Paulussen, C., Van De Ven, K., King, P., Freyne, E., *et al.* (2017). Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol Cancer Ther* 16, 1010-1020.

Peskin, A.V., and Winterbourn, C.C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta* 293, 157-166.

Phillips, P.A., McCarroll, J.A., Park, S., Wu, M.J., Pirola, R., Korsten, M., Wilson, J.S., and Apte, M.V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52, 275-282.

Roskoski Jr, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 62, 179-213.

Roy, H., Bhardwaj, S., and Yla-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 580, 2879-2887.

Schafer, N., Gielen, G.H., Kebir, S., Wieland, A., Till, A., Mack, F., Schaub, C., Tzaridis, T., Reinartz, R., Niessen, M., *et al.* (2016). Phase I trial of dovitinib (TKI258) in recurrent glioblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 142, 1581-1589.

Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R.M., Menke, A., Adler, G., Waltenberger, J., Grunert, A., and Bachem, M.G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *American journal of physiology Cell physiology* 281, C532-543.

Seo, Y., Baba, H., Fukuda, T., Takashima, M., and Sugimachi, K. (2000). High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88, 2239-2245.

Taeger, J., Moser, C., Hellerbrand, C., Mycielska, M.E., Glockzin, G., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Stoeltzing, O., and Lang, S.A. (2011). Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR Impairs Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis by Effects on Tumor Cells, Endothelial Cells, and Pericytes in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 2157-2167.

Tan, M.H., Nowak, N.J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A.A., Lopez, C., Pickren, J.W., Berjian, R., Douglass, H.O., and Chu, T.M. (1986). Characterization of a New Primary Human Pancreatic Tumor Line. *Cancer Investigation* 4, 15-23.

Tian, X., Chen, G., Zhou, S., Henne-Bruns, D., Bachem, M., and Kornmann, M. (2012). Interactions of pancreatic cancer and stellate cells are mediated by FGFR1-III isoform expression. *Hepato-gastroenterology* 59, 1604-1608.

Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 116-129.

Vickers, S.M., Huang, Z.Q., MacMillan-Crow, L., Greendorfer, J.S., and Thompson, J.A. (2002). Ligand activation of alternatively spliced fibroblast growth factor receptor-1 modulates pancreatic adenocarcinoma cell malignancy. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 6, 546-553.

Vickers, S.M., MacMillan-Crow, L., Huang, Z., and Thompson, J.A. (2001). Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) signaling inhibits peroxynitrite-induced cell death during pancreatic tumorigenesis. *Free radical biology & medicine* 30, 957-966.

Vonlaufen, A., Joshi, S., Qu, C., Phillips, P.A., Xu, Z., Parker, N.R., Toi, C.S., Pirola, R.C., Wilson, J.S., Goldstein, D., *et al.* (2008). Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68, 2085-2093.

Waghray, M., Yalamanchili, M., di Magliano, M.P., and Simeone, D.M. (2013). Deciphering the role of stroma in pancreatic cancer. *Current opinion in gastroenterology* 29, 537-543.

Wang, L.M., Silva, M.A., D'Costa, Z., Bockelmann, R., Soonawalla, Z., Liu, S., O'Neill, E., Mukherjee, S., McKenna, W.G., Muschel, R., *et al.* (2016). The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 7, 4183-4194.

Watari, N., Hotta, Y., and Mabuchi, Y. (1982). Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas folia anatomica Japonica* 58, 837-858.

Weissmueller, S., Machado, E., Saborowski, M., Morris, J.P.t., Wagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.H., Pfister, N.T., Tschaharganeh, D.F., Kitzing, T., *et al.* (2014). Mutant

p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell* 157, 382-394.

Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E.M. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *The Biochemical journal* 437, 199-213.

Wöhrlle, S., Weiss, A., Ito, M., Kauffmann, A., Murakami, M., Jagani, Z., Thuery, A., Bauer-Probst, B., Reimann, F., Stamm, C., *et al.* (2013). Fibroblast Growth Factor Receptors as Novel Therapeutic Targets in SNF5-Deleted Malignant Rhabdoid Tumors. *PLoS ONE* 8, e77652.

Xu, Z., Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Fiala-Beer, E., Zhang, X., Yang, L., Biankin, A.V., Goldstein, D., Pirola, R.C., Wilson, J.S., *et al.* (2010). Role of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer Metastasis. *The American journal of pathology* 177, 2585-2596.

Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., Beger, H.G., Uchida, E., Onda, M., Kobrin, M.S., and Korc, M. (1993). Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 53, 5289-5296.

Yamazaki, K., Nagao, T., Yamaguchi, T., Saisho, H., and Kondo, Y. (1997). Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2)-associated with tumour proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 431, 95-101.

Yang, A.D., Camp, E.R., Fan, F., Shen, L., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T.W., Wu, Y., Hicklin, D.J., *et al.* (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Research* 66, 46-51.

## 6 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Jonas Czech  
Geburtsdatum: 21.06.1989  
Geburtsort: Erlangen  
Familienstand: Ledig  
Vater: Dr. Bernd Alfred Czech  
Mutter: Monika Czech

### SCHULISCHER WERDEGANG

1996 – 2000 Friedensschule Schwäbisch Gmünd - Rehnenhof  
2000 – 2009 Parler Gymnasium Schwäbisch Gmünd  
18.06.2009 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2010/11 Beginn des Studiums der Humanmedizin  
An der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Medizinische Fakultät Mannheim  
07.09.2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)  
14.04.2016 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)  
13.06.2017 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

## **7 DANKSAGUNG**

Meinen Eltern möchte ich für die unermüdliche Unterstützung danken, mit der sie mich durch mein Studium und meine Promotion begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. M. Ebert danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Ebenso danke ich Herrn Dr. N. Härtel und Herrn Dr. R. Jesenofsky für die geduldige und engagierte Begleitung während dieser Studie, die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, mit denen sie mich bei der Vollendung derselben unterstützt haben.

Weiterhin danke ich Frau Stefanie Uhlig, FlowCore Mannheim und Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, für die große Unterstützung.