Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie
Ärztliche Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns

Rolle der Zyklin-abhängigen Kinase 9 in Pankreaskarzinomzellen

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

vorgelegt von
Monika Martina Schaum
geboren in Worms

2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Lemke

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Frank Leithäuser

Tag der Promotion: 16. Juli 2021

Teile dieser Arbeit wurden im Februar 2017 unter dem Titel

"CDK9 Is a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer"

in "Tumor Biology"

von Anna-Laura Kretz, Monika Schaum, Julia Richter, Ella F Kitzig, Christine C Engler, Frank Leithäuser, Doris Henne-Bruns, Uwe Knippschild und Johannes Lemke publiziert.

Alle Rechte liegen bei den Autoren. Lizenziert unter CC BY -NC 3.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)

Kretz A-L, Schaum M, Richter J, Kitzig EF., Engler CC., Leithäuser F, Henne-Bruns D, Knippschild U, Lemke J: CDK9 is a prognostic marker and therapeutic target in pancreatic cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 39: 1010428317694304 (2017)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNISVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG 1

1.1 PANKREASADENOKARZINOM 1

1.1.1 Epidemiologie und Entstehung 1

1.1.2 Molekularbiologische Veränderungen im PDAC 3

1.1.3 Konventionelle PDAC-Therapie 4

1.1.4 Ziele neuer Therapieansätze 5

1.2 PROTEINKINASEN ALS SIGNALTRANSDUKTOREN 6

1.2.1 Das humane Kinom 6

1.3 ZYKLIN-ABHÄNGIGE KINASEN (CDK) 6

1.3.1 CDK 6

1.3.2 Zykline als Bindungspartner für CDKs 7

1.3.3 Zyklin-abhängige Kinase 9 7

1.3.4 Die Einflüsse von CDKs auf die Entstehung maligner Tumore 9

1.3.5 Inhibition von CDK 10

1.4 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT 12

2 MATERIAL UND METHODEN 14

2.1 MATERIAL 14

2.1.1 Patientenkollektiv 14

2.1.2 Geräte 14

2.1.3 Chemikalien 15

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Kits 17

2.1.5 Zellkulturmedium 19

2.1.6 Zelllinien 19

2.1.7 Gewebe 20

2.1.8 Antikörper und Inhibitoren 20

2.1.9 Software 22

2.1.10 Lösungen und Puffer 22

2.2 METHODEN 25

2.2.1 Statistische Auswertung 25

2.2.2 Immersionsfixation und Gewebeeinbettung 25

2.2.3 Herstellung von Gewebeschnitten 26

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 26

2.2.5 Immunhiostochemische Färbung mit CDK9 27

2.2.6 Zellbilologische Methoden 29

2.2.7 Auftauen von Zellen 29
2.2.8 Einfrieren von Zellen 30
2.2.9 Splitten von Zellen 30
2.2.10 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer 30
2.2.11 Herstellung von Zelllysaten 31
2.2.12 Proteinbestimmung in Zelllysaten mit Mikrotiterplatten-Photometer 31
2.2.13 Western Blot Analysen 32
2.2.14 MTT-Assay 34
2.2.15 Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse 36
2.2.16 Kristallviolett (Langzeitüberleben von Zellen nach Inhibitorbehandlung) 37

3 ERGEBNISSE 39

3.1 Statistische Aufarbeitung des Patientenkollektivs 39
3.2 Auswertung der immunhistochemischen CDK9 Färbung und Erstellen eines Scores 41
3.3 Beurteilung der immunhistochemischen Präparate 42
3.4 Überexpression von CDK9 in PDAC-Gewebe 43
3.5 Einfluss von CDK9-Expression auf das Langzeitüberleben von PDAC-Patienten 45
3.6 Expression von CDK9 in etablierten Pankreaskarzinomzelllinine 49
3.7 Inhibition von CDK9 durch SNS-032 und Viabilitätsbestimmung mittels MTT 50
3.8 Bestimmung des Langzeitüberlebens nach SNS-032 Behandlung von Panc89-Zellen 51
3.9 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate und des Zellzyklus 53
3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse 55

4 DISKUSSION 56

4.1 CDK9 ist in PDAC Zellen im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas überexprimiert 56
4.2 Eine hohe Expression von CDK9 korreliert mit einem niedrigen Patientenüberleben 57
4.3 CDK9 wird in PDAC Zellen exprimiert und kann von SNS-032 gehemmt werden 57

5 ZUSAMMENFASSUNG 61

6 LITERATURVERZEICHNIS 62

7 ANHANG 78

7.1 Abbildungsverzeichnis 78
7.2 Tabellenverzeichnis 80

Abkürzungs- und Symbolverzeichnisverzeichnis

%	Prozent
<	Kleiner
>	Größer
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw	Beziehungsweise
ca.	Circa
CDK	Zyklin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
CDKI	Zyklin abhängige Kinase Inhibitor
CLL	chronisch-lymphatischen Leukämiezellen
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTD	C-terminale Domäne
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Farb- oder Chemolumineszenzreaktion (enhanced chemiluminescence)
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFG	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)

EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell scanning)
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Fetal cow Serum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
G	Malignitätsgrad (Grading)
g	Gramm
GAB1	Growth-factor-receptor-bound-protein-2-associated-binding-protein 1
GPC1	Heperan-sulfate-proteoglycan-glypican-1
Gskeβ	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her2	Thyrosin-Protein-Kinase erbB2 Rezeptoren
Her3	Thyrosin-Protein-Kinase erbB3 Rezeptoren
HGFR	Hepatozyten Wachstumsfaktorezeptor (Hepatocyte growth factor receptor)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
M	Mol
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (mitogen activated protein kinase)
Max.	Maximal

min	Minute
Min.	Minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
MyoD	myogenic-regulatory-factor D
N	Anzahl
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear-factor κB
Nm	Nanometer
nM	Nanomol
Ø	Durchmesser
p	Signifikanzwert (p value)
PanIn	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDAC	Pankreas-Adenokarzinom
PI	Propodiumiodid
pSer2	Phosphoryliertes Serin Nummer 2
pSer5	Posphoryliertes Serin Nummer 5
PTEFb	Positiver Transkriptions Elongagtions Faktor b (positive-transcription-elongation-factor b)
RB1	Retinoblastoma-Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNA Pol II	RNA Polymerase II
Rpm	Umdrehungen pro Minute (round per minute)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Sec.	Sekunden
Ser/Thr	Serin/Threonin
Ser2	Serin-Rest 2
Ser5	Serin-Rests 5
siRNA	Small interfering RNA
St.	Sankt
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	Transforming-growth Faktors β
TGFβR2	Transforming-growth Faktors β Rezeptor II
TNB	Tris-NaCl-BSA
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TNT	Tris-NaCl-Tween
UICC	Union for International Cancer Control
USA	Vereinten Staaten von Amerika
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachtsumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel
β	Beta

1 Einleitung

1.1 Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Entstehung

Das Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist der häufigste maligne Tumor des Pankreas. Weltweit gibt es jährlich circa (ca.) 365.000 Neuerkrankungen und ca. 359.000 PDAC-assoziierte Sterbefälle. Obwohl das PDAC nur ca 3% der weltweiten Krebsfälle ausmacht, ist es die vierthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache [132]. Dass über 50% der Neuerkrankungen in Industrieländern auftreten, beruht auf verschiedenen Ursachen. Zum einen wird die Erkrankung in Entwicklungs- und Schwellenländern aufgrund der schlechteren Infrastruktur des Gesundheitssystems seltener diagnostiziert, zum anderen sorgt der Anstieg des Durchschnittsalters in Industrienationen für eine wachsende Risikogruppe. Risikofaktoren für eine Erkrankung sind vielfältig. Vor allem das Alter spielt hier eine entschiedene Rolle. Meistens wird die Diagnose bei Patienten gestellt, die älter als 50 Jahre sind; eine epidemiologische Häufung findet sich zwischen dem 70.und 80. Lebensjahr [38]. Im Hinblick auf vermeidbare Risikofaktoren spielt Tabakkonsum eine entscheidende Rolle. Ca. 15 – 30% der Fälle weltweit können mit Tabakkonsum assoziiert werden. Auch der rauchfreie Tabakkonsum kann mit PDAC in Verbindung gebracht werden [13, 15, 109, 147]. Im Hinblick auf vermeidbare Risikofaktoren finden sich auch Übergewicht und hoher Alkoholkonsum. Bei moderatem Alkoholkonsum konnte kein Zusammenhang mit PDAC gezeigt werden [87, 140]. Gesteigerte körperliche Aktivität hingegen erwies sich als protektiver Faktor [16]. Insgesamt allerdings können die bekannten Risikofaktoren nur 25 – 30% der Krankheitsfälle erklären [121]. Die häufig späte Diagnosestellung im fortgeschrittenen Stadium basiert auf der Tatsache, dass PDAC erst spät zu Symptomen führt, die auf die Erkrankung hindeuten. Zwar können schon in frühen Stadien unspezifische Symptome wie beispielsweise ungewollter Gewichtsverlust, Leistungsminderung und Nachtschweiß auftreten, Symptome die auf ein malignes, intraabdominelles Geschehen hinweisen treten hingegen erst spät auf. Hierzu zählen u.a. Magenausgangstenose durch einen Tumor und schmerzloser Ikterus bei Kompression des Galleabflusses [51]. Das PDAC entsteht in den kleinen und mittleren Ausführungsgängen des exokrinen Pankreasgewebes und ist ein hochmaligner Tumor. Es wird klinisch mittels TNM-Klassifikation eingeteilt [6, 17]. Meistens entwickeln sich die Tumorzellen aus

Vorläuferläsionen, sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) [37, 65]. Es werden PanIN-1A und –B, sowie PanIN-2 und PanIN-3 unterschieden, wobei PanIN3 einem Carcinoma in Situ entspricht [64]. Die histologischen Veränderungen der PanINs beziehen sich zunächst auf die Zellmorphologie. Die normalen Gangepithelzellen stellen sich einschichtig kubisch dar. Bei PanINs -1 kommt es zu einer Veränderung des Epithels hin zur zylindrischen Zellform; zudem können Faltenbildungen beobachtet werden, allerdings noch keine Apikalisierung der Zellkerne. Dies ist ab PanIN-2 beschrieben. PanIN-3 ist als „carcinoma in situ“ klassifiziert. Hier zeigen sich ausgeprägte Kernpolymorphologien, mit einer deutlichen Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, allerdings noch keine Überschreitung der Basalmembran.

Innerhalb der Läsionen wurde neben dem Schema der morphologischen auch ein Schema der genetischen Veränderungen erkannt. So kommt es mit zunehmenden Mutationen verschiedener Gene zu einer zunehmenden Entartung vom Ursprungsgewebe.

So lassen sich K-RAS Mutationen, Telomerverkürzungen sowie Inaktivierung von p16 und p53 nachweisen. Es scheint eine zeitliche Struktur zu geben, nach der die genetischen Veränderungen auftreten.

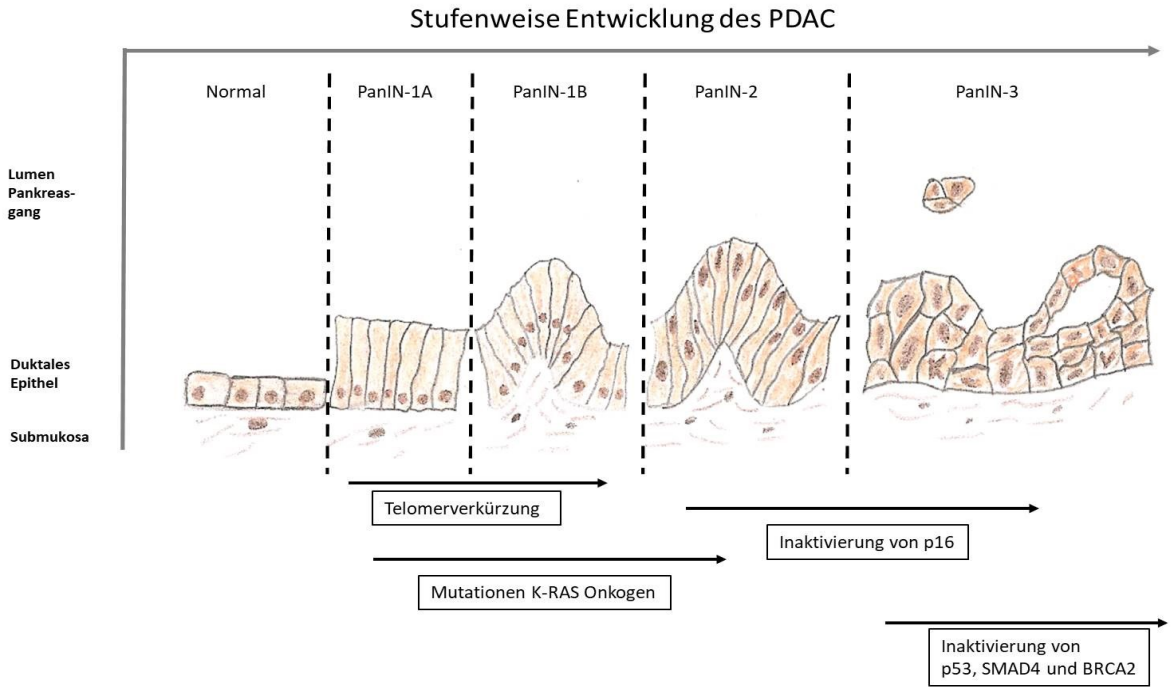

Abbildung 1: **Modell für die stufenweise Entwicklung von PDAC** (nach [65, 4]).
Abkürzungen: PanIN= Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie; PDAC = Pankreasadenokarzinom; p53= Tumorsuppressorprotein p53; BRCA2= Breast Cancer 2 susceptibility protein

1.1.2 Molekularbiologische Veränderungen im PDAC

In PDAC sind eine Vielzahl von molekularbiologischen Veränderungen beschrieben, die zu verschiedenen pathologischen Zelleigenschaften, wie zum Beispiel (z.B.) Proliferation, Migration, Invasion oder Metastasierung führen. Die Vielzahl der genetischen Mutationen führt zu Veränderungen in den Signaltransduktionswegen, die Zellwachstum und Zelldifferenzierung regulieren [46]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine, sowie deren Rezeptoren in PDAC überexprimiert sind. Unter anderem sind Epidermal-growth-Factor (EGF), Tumor Nekrose Faktor α (TNFα), Vascular-endothelial-growth-Factor (VEGF) und Fibroblast-growth-Factor (FGF) und das Zytokin Tumor Nekrose Faktor α (TNFα) überexprimiert [71, 88, 128, 145, 149]. Beispielsweise zu nennen ist hier der Epidermal-growth-factor-Rezeptor (EGFR). Dieser kann, nach Stimulierung durch einen Liganden ein Homodimer bilden, oder in Kombination mit Thyrosin-Protein-Kinase erbB2 Rezeptoren (Her2) und Thyrosin-Protein-Kinase erbB3 Rezeptoren (Her3) ein Heterodimer. Eine Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors setzt intrazelluläre Signalwege in Gang, die über Ras, Raf und Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK) die Mitogenese, sowie invasives Wachstum und Metastasierung begünstigen. Zusätzlich verstärkt wird dieser Effekt über eine Mutation des K-Ras, welche bereits in den PDAC Vorläuferläsionen zu finden ist und in insgesamt über 85% aller PDAC nachgewiesen werden kann [65].

Gesteigert wird dieser Effekt auch über die Tatsache, dass die Rezeptorliganden im PDAC Gewebe oft pathologisch vermehrt vorhanden sind [18]. Auch Hepatocyte-growth-factor-receptor (HGFR) Signalwege sind im PDAC überstimuliert. Dies beruht auf einer Überexpression von z.B. CD44 und Neutropilin 1, welche mit dem Rezeptor interagieren. Eine Stimulierung des Rezeptors durch HGF und die Interaktion mit den o.g. Proteinen aktiviert über Ras, Raf und MAPK Zellsignalwege, die Migration und invasives Zellwachstum begünstigen [95, 136]. Zudem werden sowohl HGRF als auch EGFR effektiver durch ihre Liganden aktiviert, wenn Growth-factor-receptor-bound-protein-2-associated-binding-protein 1 (GAB1) in der Zelle vorhanden ist. Auch das Vorhandensein von Heperan-sulfate-proteoglycan-glypican-1 (GPC1) verstärkt die Rezptorinteraktion und den absteigenden Signalweg. GPC1 ist im PDAC überexprimiert [48, 62, 69, 119]. Die oben genannten Signalwege aktivieren den Ras Signalweg. Eine Punktmutation von K-Ras kann bereits in Frühstadien von PDAC nachgewiesen werden und betrifft über 85% der Fälle. Dies führt

über eine erhöhte Aktivität zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JUN und FOS [3, 9, 33, 42, 66, 74, 90, 97, 151]. Auch chromosomale Instabilitäten und Telomerverkürzungen konnten bereits in den Vorgängerläsionen nachgewiesen werden. Mutationen in den Tumor-Suppressorgenen p53 und SAMD4 treten hingegen erst später in der Onkogenese auf [53, 89].

Im Gegensatz zu den bisher genannten abberanten Signalwegen steht der Signalweg des Transforming-growth Faktors β (TGFβ). Dieser wird durch einen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor aktiviert. Durch Bindung des Liganden TGFβ an einen Typ II Rezeptor (TGFβR2) kommt es zur Homodimerisierung und über die Kinase-Eigenschafte den Rezeptors zur Aktivierung eines Tpy 1 TGFβ Rezeptor, welcher ebenfalls ein Homodimer mit Kinaseeigenschaften in der aktiven Form darstellt. Dies führt über Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 und der Verbindung mit Smad4 zu einem Heterotrimer welches in den Nukleus migriert und die Transkription moduliert. Auch hier ist der eigentlich wachstumshemmede Zellsignalweg von TGF/TGFR im PDAC abberant. Durch den Verlust von CDKN2A (codiert p16) geht die hemmende Wirkung des TGFβ-Signals verloren und es kommt zur Mitogenese. Auch kann der Verlust von Retinoblastom-assoziierten Proteinen TGFβ in ein PDAC Mitogen umwandeln. Durch abberante Signalwege über MAPK und die TFGβ vermittelte Aktivierung von WNT7B über Smad4 kommt es zur Steigerung der Mitogenese, was zur gesteigerten Zellproliferation führt [34, 48].

1.1.3 Konventionelle PDAC-Therapie

Das PDAC bringt die moderne Medizin immer noch an ihre Grenzen. Trotz intensiver Forschung in den vergangenen Jahrzehnten entspricht die Mortalität der Erkrankung annähernd ihrer Inzidenz [39]. Um ein Therapieregime festlegen zu können, muss eine Einteilung der Patienten vorgenommen werden. Die Einteilung richtet sich nach Lokalbefund (chirurgisch resektabel oder nicht chirurgisch resektabel) und dem Vorhandensein von Metastasen. Allerdings weisen bei Diagnosestellung nur ca. 20% der Patienten einen resektablen Tumor ohne Metastasen auf und können einem kurativen Therapieregime bestehend aus radikaler Operation und anschließender Chemotherapie basierend auf 5-Fluorouracil oder Gemcitabin, zugeführt werden [31, 103, 104, 106, 115, 141]. Bei Patienten mit einem resektablen Tumor kann eine radikale Operation das 5-Jahresüberleben auf ca 20% erhöhen [11, 96, 103, 104, 106, 142]. 80% der Patienten

weisen bei Diagnosestellung einen lokal fortgeschrittenen, oder metastasierten Tumor auf und können somit nicht dem kurativen Therapieregime zugeführt werden. Die Chemotherapie bei Patienten mit nicht resektablem Tumor ist abhängig vom Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten. Bis vor wenigen Jahren stellte die Monotherapie mit Gemcitabin das gängige Therapieregime dar [20]. Dieses konnte die Überlebenszeit der Patienten allerdings nur geringfügig verlängern. 2011 wurde aus Chemotherapeutika die Kombinationstherapie FOLFIRINOX, bestehend Leucovorin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin als der Monotherapie überlegen etabliert [30]. Diese Therapie beinhaltet allerdings ein großes Nebenwirkungsspektrum, unter dem die Patienten leiden. Durch Medikamente kann dies nur teilweise beherrscht werden kann, was dazu führt, dass die FOLFIRINOX-Therapie Patienten mit hervorragendem Allgemeinzustand vorbehalten bleibt [30]. Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand und nicht chirurgisch adressierbarem Tumor bleibt die Gemcitabin-Monotherapie oder die palliative best-supportive Care [20, 29, 32, 61, 99, 113, 118, 135]. Die Bestrahlung kann aber zur Therapie von lokalen Schmerzen und zur Prävention von Komplikationen, wie z.B. Metastasen-assoziierten Frakturen, genutzt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die radikale chirurgische Resektion nach wie vor den einzig kurativen Behandlungsansatz bietet [36, 78]. Zwar konnte die konservative Therapie in den letzten Jahren Fortschritte erzielen, eine Heilung bei nicht resektablem Lokalbefund ist allerdings nach wie vor nicht möglich.

1.1.4 Ziele neuer Therapieansätze

Bei nach wie vor hohen Mortalitätsraten aufgrund des PDAC weltweit, können die bisherigen Therapiemöglichkeiten nicht als zufriedenstellend akzeptiert werden. Auch ist es bezüglich des PDAC von großer Bedeutung frühe Marker für ein Krankheitsgeschehen zu finden, da das PDAC erst spät zu Symptomen führt und daher bei Diagnosestellung häufig ein nicht mehr kurativ therapierbares Erkrankungsstadium vorliegt.

Mögliche neue Therapieansätze verbergen sich auf molekularer Ebene. Hier besteht die Möglichkeit an der Tumorentstehung beteiligte Zielmoleküle zu detektieren und direkt zu adressieren. Die Forschung muss hier an den molekularen Grundlagen ansetzen und die intra- und interzellulären Kommunikationswege verstehen. Nur so können Vorgänge wie Signaltransduktion von Wachstumssignalen, Apoptosesignale und insbesondere deren

pathologische Veränderung, welche zur Entstehung maligner Tumoren beiträgt, verstanden und durch neue Therapieansätze gezielt adressiert werden. Sowohl die Suche nach neuen Markern für die Detektion eines frühen Krankheitsgeschehens, als auch neue Behandlungsmöglichkeiten sind daher momentan wichtige Ziele der Forschung.

1.2 Proteinkinasen als Signaltransduktoren

Um die Zellinteraktion innerhalb eines Organismus zu gewährleisten existieren komplexe Kommunikationssysteme, die die Zellaktivität regulieren. Hierfür werden auf den Zelloberflächen verschiedene Rezeptoren exprimiert. Die Aktivierung eines Rezeptors führt in der Zelle zu verschiedenen Proteininteraktionen wie z.B. Komplexbildung oder Phosphorylierung durch Kinasen. Die hierdurch ausgelöste Signalkaskade führt, durch Aktivierung eins Transkriptionsfaktors mittels spezifischer Phosphorylierung, zu einer Veränderung der Genexpression. Physiologische Prozesse wie Zellzyklus, Metabolismus, Zellmotilität, Zelldifferenzierung, Transkription und Zelltod werden durch reversible Phosphorylierung reguliert. Fehler in dieser Signalkette können, über Hemmung oder Aktivierung der Transkription, zu Dysregulierung der Genexpression zund somit zu Tumorerkrankungen führen [1, 28, 57, 93].

1.2.1 Das humane Kinom

Das humane Kinom besteht aus 518 Proteinkinasen, die bisher entdeckt wurden. Ca. 1,7 % des humanen Genoms kodiert Proteinkinasen. 478 Kinasen werden als eukaryontische Proteinkinasen zusammengefasst, welche, in mehrere Familien unterteilt eine eukaryontische katalytische Domäne aufweisen. Die anderen 40 Proteinkinasen, auch zusammengefasst als atypische Proteinkinasen, weisen keine eukaryontisch katalytische Domäne auf, können aber andere Proteine phosphorylieren [93].

1.3 Zyklin-abhängige Kinasen (CDK)

1.3.1 CDK

Die CDKs gehören zur CMGC-Gruppe, welche eine der 7 Hauptfamilien des humanen Kinoms darstellt. Weitere Mitglieder dieser Kinomfamilie stellen Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPKs), Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta (Gskeβ), dualspezifischen Tyrosin-regulierten Kinasen (DYRK) und die CDK-like Kinasen dar [93]. Der Terminus Zyklin abhängige Kinase wurde auf dem Cold Spring Harbor Symposium 1991 etabliert. Es wurde

alle, bis dahin identifizierten Kinasen mit aktivierenden Zyklin-Bindungspartnern in die Klassifikation aufgenommen. Als CDK-like Kinasen wurden jene Proteine zusammengefasst, welche noch keinen identifizierten Zyklin-Bindungspartern aufwiesen. In den folgenden Jahren wurden weitere Kinasen der Klassifikation hinzugefügt, z.B. CDK8 und CDK9 [49, 137]. In diesem Zuge kam es auch zur Umbenennung diverser Proteine um eine einheitliche Nomenklatur zu gewährleisten. Bis heute sind im humanen Kinom 20 verschiedene CDKs bekannt, die in zwei große Untergruppen unterteilt sind. Die erste Gruppe ist an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt, die zweite Gruppe an der Regulierung der Transkription [23, 84]. Alle CDKs benötigen einen Zyklin-Bindungspartner für die enzymatische Aktivität. CDKs bilden die katalytische Einheit einer heterodimeren Serin/Threonin-Kinase. Eine aktive Kinase liegt erst vor, wenn die Bindung an die regulierende Einheit, das Zyklin, erfolgt ist.

1.3.2 Zykline als Bindungspartner für CDKs

Die humane Zyklin-Familie umfasst 29 Mitglieder, die in 16 Subfamilien und drei Hauptgruppen unterteilt werden. Zyklin weisen eine Größe zwischen 35 und 90 kDa aufweisen und sind durch eine Zyklin-Box definiert. Diese Zyklin-Box besteht aus 100 Aminosäurenresten die 5 α-Helices formen. Die Struktur der Zykline ist aber, im Gegensatz zur Sturktur der CDKs weniger stark konserviert. Die Gruppe III beinhaltet die Zykline C, H, K, L und T, welche die Hauptbindungspartner der transkriptionsregulierenden CDK darstellen [23, 91]. CDK9 bildet die katalytische Untereinheit des CDK-Zyklin-Komplexes. Die Zykline T1, T2a, T2b und Zyklin K dienen im PTEFb als regulatorische Untereinheit. Hierbei stellen die Zykline T2a und T2b Spicevarianten dar [41, 111, 131].

1.3.3 Zyklin-abhängige Kinase 9

CDK9 ist eine Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr Kinase), welche mit ihrem Bindungspartner Zyklin T eine aktive Einheit formt [63, 86]. CDK 9 wurde zunächst unter dem Namen PITLARE beschrieben [49]. Die Umbenennung erfolgte im Zuge der Vereinheitlichung der CDK Nomenklatur. Im humanen Gewebe liegen zwei Varianten von CDK9 vor. $CDK9_{42}$ und $CDK9_{55}$, benannt nach dem jeweiligen Molekulargewicht von 42 bzw. 55 kDa [49, 131]. Dabei beinhaltet die $CDK9_{55}$ Variante einen Prolin- und Glycin-reichen N Terminus. In unterschiedlichen Endgeweben sind die Isoformen unterschiedlich stark exprimiert. So lässt sich in Hoden- und Milzgewebe vermehrt die Isoform $CDK9_{42}$ nachweisen, im Hirn-

und Lebergewebe hingegen vermehrt $CDK9_{55}$ [130]. Beide Formen haben Zyklin T1, T2a, T2b und Zyklin K als Bindungspartner. Bei den Zyklinen T2a und T2b handelt es sich um Splicevarianten desselben Genlokus [81, 120, 134]. Welche CDK9 Variante mit welchen Zyklin interagiert, hängt vor allem vom Zelltyp und der Zelldifferenzierung ab. Unterschiedliche Zellen exprimieren unterschiedliche Formen der Proteine [41, 83, 111, 130, 131]. CDK9 kommt ubiquitär in Gewebearten vor, es zeigt sich aber eine höhere Expression in terminal differenziertem Gewebe als in undifferenzierten Geweben [5, 49]. CDK9 bildet mit seinem Zyklin-Bindgunspartner den positive-transcription-elongation-factor b (PTEFb) welcher die Transkription durch Aktivierung der RNAPol II einleitet [94, 110]. Hierbei wird eine große Untereinheit an der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Pol II zunächst vom Transkriptionsfaktor (TF) II, bestehend aus CDK7 und Zyklin H, phosphoryliert. Die CDT verfügt über zahlreiche, repetitiv vorkommende Sequenzen, bestehend aus 8 Aminosäuren. Diese Sequenz besteht aus: Tyrosin-Serin-Prolin-Threonin-Serin-Prolin-Serin. Die Phosphorylierung des Serin-Rests 5 (Ser5) durch TFII führt zur Initiierung der Transkription. Im Anschluss wird ein weiterer Serin-Rest (Ser2) vom positiven Transkriptions-Elongations-Faktor b (PTEFb), bestehend aus CDK9 und Zyklin-Bindsungspartner phosphoryliert und somit eine Aktivierung der RNA Elongation ermöglicht [44, 76, 112, 144]. Dieser Vorgang ist in der untenstehenden Abbildung vereinfacht dargestellt.

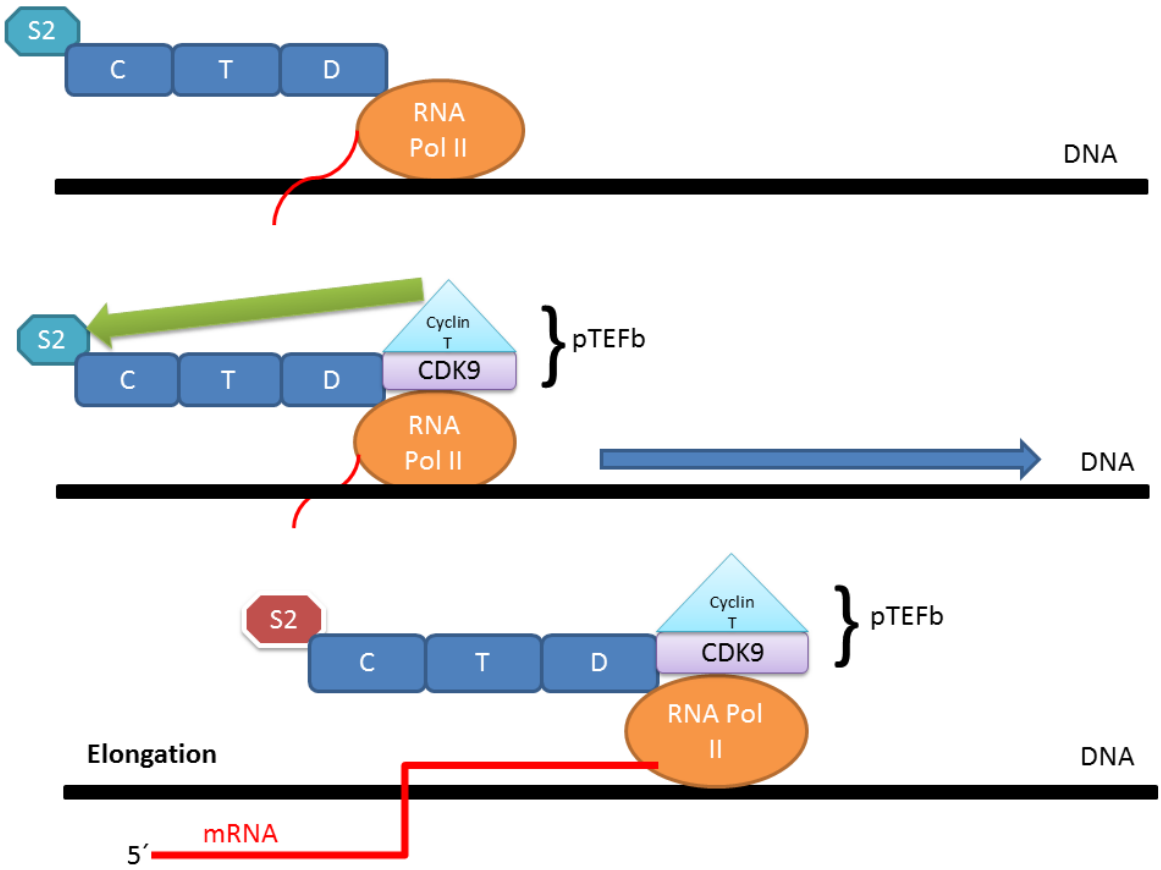

ABBILDUNG 2: **Schematische Darstellung der RNA-Elongation durch die RNA Pol II während der Proteinbiosynthese.**
Cyclin T bildet mit seinem Bindungspartner CDK9 den pTEFb. Dieser phosphoryliert (grüner Pfeil) S2 am C-terminalen Ende der RNA Pol II, hier dargestellt durch einen Farbumschlag von hellblau (nicht phosphoryliert) zu dunkelrot (phosphoryliert). Dies führt zu einer Aktivierung der RNA Pol II und damit zu einer Elongation der mRNA.
Abkürzungen: CDK9= Cyclin-dependent Kinase 9; pTEFb= positive-transcription-elongation-factor; RNA = Ribonukleinsäure; RNA Pol II= RNA-Polymerase II; CTD= C-terminals Ende; S2 = Serin 2; DNA = Desoxyribonukleinsäure; mRNA = messenger RNA

Da PTEFb essentiell für die Transkription ist, ist die aktive Form dieser Kinase stark reguliert. So liegen in den Zellen sowohl eine freie, als auch eine an die Proteinen HEXIM1 oder HEXIM2 sowie 7SKsmall nuclear RNA gebundene Form vor. Ob diese gebundene Form als Reservoir für die freie, aktive Form dient, ist bisher nicht abschließend geklärt [52, 80]. PTEFb wird auch aktiv rekrutiert oder gehemmt. So kann PTEFb mittels positiven Transkriptionsfaktoren wie z.B. myogenic-regulatory-factor D (MyoD) oder nuclear-factor κB (NF-κB) zu Promotoren oder Downstreaming Regionen migrieren. Über Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung ist PTEFb hemmend reguliert [40].

1.3.4 Die Einflüsse von CDKs auf die Entstehung maligner Tumore

Der Progress des Zellzyklus wid an Kontrollpunkten überprüft [108]. Einige CDKs sind essentiell für die Regulierung der Übergänge zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus

[35, 117]. Dies beruht auf der Serin/Threonin Kinasen-Aktivität der aktiven CDK-Zyklin-Komplexe. Die Phosphorylierung der Zielproteine beeinflusst deren Aktivität entscheidend [92]. Wenn diese Regulierungen pathologisch verändert sind kann es zur unkontrollierten Zellteilung kommen. Wobei die unregulierte Zellteilung eines der typischen Merkmale von Krebszellen darstellt [56]. So regulieren beispielsweise die CDK2, CDK4 und CDK6 die Progression der G1 Phase [127]. Diese Regulierung liegt eine Interaktion mit Retinoblastoma-Protein 1 (RB1). RB1 ist ein physiologischer Tumorsuppressor und verhindert in seiner aktiven Form den Zellzyklusprogress durch Hemmung von CDK4 und CDK6 [59, 58, 146]. Durch Punktmutationen oder Gendepletion kann es zum unphysiologischen Zellwachstum und zur unkontrollierten Zellteilung kommen. Zum gleichen Effekt kommt es durch eine Steigerung der Zyklin D Expression, da Zyklin D mit CDK4 und 6 eine aktive Einheit bildet. Durch vermehrtes Vorkommen der regulatorischen Untereinheit, beispielsweise durch Gentranslokation, kommt es zu einer Verstärkung der Zellzyklusprgogression [150]. So ist eine unphysiologische Aktivität von Zyklin D im Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs über das Ras Onkogen beschrieben. Auch für das Multiple Myelom und das Mantelzell-Lymphom sind dysregulierte CDK-Zyklin-Signalwege beschrieben [8, 100, 114]. Auch die Trankskriptionsregulierenden Formen der CDK können an der Enstehung von Krankheiten beteiligt sein. Hier ist insbesondere CDK9 zu nennen. Durch die Aktivierung der Transkription kommt es zur Steigerung der RNA Synthese. Insbesondere Tumorzellen nutzen diesen Vorgang zur Produktion von anti-apoptotischen Proteinen. Hier sind beispielsweise MCL1 und XIAP zu nennen. Diese sind kurzlebige Proteine, die die Apoptose der Zelle verhindern [25, 102]. Eine Resistenz gegen Apoptose gilt allgemein als eines der wichtigsten Merkmale von Krebszellen [55]. Die antiapoptotischen und pro-survival Proteine und müssen über die Aktivierung der RNAPol II kontinuierlich synthetisiert werden, da sie nur kurze Zeit in der Zelle vorliegen, bevor sie über weitere intrazelluläre Mechanismen abgebaut werden [72, 125]. Die hier genannten Prozesse sind an der Entstehung von diversen malignen Erkrankungen beteiligt. Insbesondere CDK9 Dysregulierung ist im Zusammenhang mit Lymphomen [7, 41] Rhabdomyosarkom [77, 133] und Prostata Krebs [77] beschrieben.

1.3.5 Inhibition von CDK

Es konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass insbesondere Überaktivität diverser CDK Familienmitglieder an der Entstehung malginer Erkrankungen beteiligt ist. Eine pharmakologische Hemmung der CDK war daher in den vergangenen Jahren immer wieder ein Bestandteil diverser Forschungsarbeiten, mit dem Ziel dysregulierte Zellsignalwege zu beeinflussen [75, 85]. Hierbei kam es immer wieder zu diversen Hindernissen in der Entwicklung von CDK Inhibitoren (CDKI). Die Entwicklung von CDKI basierte zunächst auf der Molekülstrukur, da die CDKI als Adenosintriphosphat (ATP) Inhibitoren agieren sollen. Eine Interaktion mit der kalytischen Untereinheit der CDK, durch kompetetive ATP-Liganden soll zu deren Hemmung führen. Allerdings ist die Selektivität solcher Inhibitoren stark eingeschränkt, da ATP Bindungsstellen ubiqitär vorkommen. Daher müssen auch Zeilmolekülstrukturen die außerhalb der ATP Bindungsstelle vorkommen adressiert werden [27, 54]. Es konnte gezeigt werden, dass der Zellzyklusprgogress sich durch Hemmung von bis dahin als unverzichtbar für diesen Vorgang betrachteten CKS nicht suffizient vermindert werden konnte. Hier ist als Beispiel CDK2 zu nennen, was dessen Bedeutung als Zeilmolekül für die pharmakologische Inhibierung verblassen ließ [138]. Es sind bisher zwei Generationen von CDKI beschrieben. Mitglieder der ersten Generation zeigten eine wenig selektive Hemmung verschiedener CDKs, insbesondere das bereits erwähnte CDK2 bildete hier ein Zielmolekül [107]. Der erste CDKI der zur klinischen Studie zugelassen wurde war Flavopiridol, ein synthetisches Derivat der indischen Rohitukine Pflanze. Es handelt sich bei Flavopiridol um einen unselektiven CDKI. In Zelllinien mit humanen chronisch-lymphatischen Leukämiezellen (CLL) konnte eine effektive Induktion der Apoptose gezeigt werden sowie die Abnahme der Proteine XIAP und Mcl-1, welche in CLL Apoptoseresistenzen vermitteln [12, 21, 68]. Anders als in den präklinischen Untersuchungen zeigten sich die Ergebnisse in der klinischen Anwendung als Einzelpräparat enttäuschend [2, 19, 82, 122, 126]. Zwar konnten in Kombination mit anderen zytotoxischen Medikamenten, wie z.B. Irinotecan oder Platin bessere Ergebnisse erzielt werden, der Therapieerfolg blieb aber limitiert [10, 45, 124]. Daher kam es im Verlauf zur Entwicklung einer zweiten Generation von CDKI. Diese weisen nicht nur eine höhere Selektivität in der inhibierenden Wirkung unterschiedlicher CDK Subtypen auf, die Hemmung zeigt sich auch potenter [35]. Hier soll insbesondere auf den Inhibitor SNS-032 (ehemals BMS-387032) eingegangen werden, da dieser Inhibitor in den der Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen genutzt wurde. SNS-032 stellt einen selektiven Inhibitor der

CDK-Subtypen 2,7 und 9 dar. Präklinische Studien ergaben Zellzyklus- und Transkriptionshemmende Eigenschaften. Dies lässt sich durch die CDK2 und CDK7 Einflüsse auf den Zellzyklus, und die CDK7 und CDK9 Einflüsse auf die Transkription erklären. Insbesondere der abberante Signalweg von CDK2 konnte bereits in diversen malignen Tumorerkrankungen, wie z.B. nicht-kleinzelligem Lungenkrebs oder Brustkrebs gezeigt werden [67, 101]. Für SNS-032 konnte allerdings eine deutlich höhere Sensitivität für CDK9, im Vergleich mit CDK2 und CDK7 nachgewiesen werden. So liegt die IC_{50} für CDK2 bei 0,05µM und damit fast identisch mit der IC_{50} für CDK7 mit 0,06µM. Hingegen ist die IC_{50} für CDK9 mit 0,005µM angegeben, und damit um das Zehnfache niedriger [105]. Im Vergleich mit Flavopiridol zeigt sich SNS-032 selektiver für CDK9 und deutlich weniger toxisch. In vitro konnte einen vermehrte Inhibition der RNA Synthese und vermehrte Induktion von Zelltod durch SNS-032 als durch Flavopiridol festgestellt werden [26]. Auch in klinischen Phase I Studien konnte die Wirksamkeit von SNS-032 bei geringer Nebenwirkungsrate bereits gezeigt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit und Übelkeit. Eine Bioverfügbarkeit von 20% konnte gezeigt werden [60].

1.4 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

Nicht nur Tumorsuppresorgene und Onkogene sind an der Entstehung von malignen Neoplasien beteiligt, sonder auch Proteinkinasen. Durch Phosphorylierung von Zielproteinen kann deren regulatorische Wirkung beeinflusst werden. Insbesondere von Interesse ist hier die Familie der CDK9. Durch Aktivierung der RNA-Polymerase II hat CDK9 einen direkten Einfluss auf die mRNA Elgongation. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob CDK9 in PDAC überexprimiert wird. Hierfür sollen Gewebeproben von PDAC analysiert werden. Auch Pankreasnormalgeweben sollen analysiert, und mit den Ergebnissen der PDAC Gewebeproben verglichen werden. Hierfür sollen die Proben immunhistochemisch gefärbt und die Ergebnisse mikroskopisch ausgewertet werden. Dabei wird auf die Gewebebank der Klinik für Allgemein- und Visvceralchirurgie der Universität Ulm zurückgegriffen. Zudem soll geklärt werden, ob verschiedene etablierte PDAC-Zelllinien CDK9 exprimieren; und welchen Einfluss eine Hemmung von CDK9 in diesen Zelllinien hat.

Die beiden zentralen Fragestellungen der Arbeit lauten also: Ist CDK9 in PDAC überexprimiert, sowie die Frage, ob eine pharmakologische Hemmung der CDK9-Aktivität in PDAC-Zelllinien zu einer Beeinflussung der Zellen führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Um den Textfluss nicht zu stören wird in dieser Arbeit auf die männliche Grundform des Wortes Patient zurückgegriffen. Dies schließt Frauen selbstverständlich mit ein. Das Patientenkollektiv dieser Arbeit umfasst 54 Patienten die an einem PDAC erkrankten. Die Erstdiagnosen (ED) wurden zwischen dem 01.09.2000 und dem 23.04.2012 gestellt. Es wurden ausschließlich Patienten mit Ersterkrankung eines Pankreas-Adenokarzinoms in die Arbeit aufgenommen. Der Erkrankungsverlauf wurde durch die Tumornachsorge des Universitätsklinikums Ulm überwacht und die Daten dokumentiert.

2.1.2 Geräte

Belichtungssteuerung Kamera MC 80	Carl-Zeiss, Jena Deutschland
Blotkammer (Mini Blot Module)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Dampfkochtopf	Nordic Ware®, Minneapolis, USA
Entwicklermaschine (Cawomat 2000 IR)	Cawo Photochemiche Fabrik GmbH, Schrobenhausen, Deutschland
Flow cytometer (FACScan)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Gelkammer(Mini Gel Tank)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Gewebeausgießstation EC 350	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Gewebeeinbettautomat (Leica ASP 200)	Leica, Bensheim, Deutschland
Mikroskop (Leica DMIL)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop (Olympus CK2)	Olympus, Hamburg, Deutschland

Mikroskop (Olympus IX81)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Kamera MC 80	Carl-Zeiss, Jena, Deutschland
Paraffin-Streckbad	Vogel, GmbH und CoKG, Gießen, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Photometer (Tecan)	Tecan, Meannedorf, Schweiz
Plastikküvette	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Plattenschüttler (Wallac 1296-001)	PerkinElmer®, Winter St. Waltham, USA
Power supply (Model 1000/500)	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Frankreich
Power supply (PowerPac™ Basic)	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Frankreich
Schlittenmikrotom HM 450	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Sicherheitsarbeitsbank (Herasafe™)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex Mixer (Vortex Genie® 2)	Scientific Industries™, New York, USA
Vakuumpumpe (VacuSafe)	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH
Wasserbad (W 80)	Medingen Labortechnik, Arnsdorf, Deutschland
Zellinkubator (Heracell™)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (5415 R/5810 R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

(3-Aminopropyl) triethoxy-silane	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, USA
DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz	General Electric Deutschland, Frankfurt Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
DPBS	Invitrogen (Gibco®), Carlsbad, USA
EDTA	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Entellan	Franz Mensch GmbH, Eresing, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
FBS	Biochrom AG, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37%	Th. Geyer GmbH und CoKG, Renningen, Deutschland
Glycin	AppiChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gycerol	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Hämatoxylin Lösung N 3	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Isopropanol	VWR, Radnor, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
L-Glutamine (200 mM)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Natriumpyruvat	Invitrogen (Gibco®), Carlsbad, USA
Mayers Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich®, Schnelldorf, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Natronlauge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pen Strep (10 000 U/ml Penicillin/Streptomycine)	Invitrogen (Gibco®), Carlsbad, USA
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Pierce Proteaseinhibitor Tabbletten	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Precision plus Protein Standard	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Frankreich
RNase-free water	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure (5x)	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	USB, Staufen, Germany
Triton-X	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA solution	PAN™-Biotech,
Tween-20	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Xylol	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

6-Loch Platten	Sarstedt AG und CoKG, Nümbrcht, Deutschland
96-Loch Platten	Sarstedt AG und CoKG, Nümbrcht, Deutschland

Antigen Retrieval Citrat Plus	BioGenex, Fremont, USA
Bis-Tris plus 4-12%-Gele	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Bolt Transferpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Centrifuge tubes, Falcon 15, 50 ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Contatyp CX-BL 18x24cm	Röntgen Bender, Baden-Baden, Deutschland
DAB (3,3`-Diaminobenzidin (DAB) Substratlösung)	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 20mmx20mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser 24mmx32mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einbettkassetten(Histosetten)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Falcon Röhrchen 15ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon Röhrchen 50ml	BD Biosciences, San Jose, USA
MOPS Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Nitrozellulose/Filterpapier Sandwich	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pierce BCA Protein assay kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pierce ECL Western blotting solution	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Pipetten (0.1 µl – 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipettenspitzen (0.1 µl – 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Safe seal Reagiergefäße 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Serologische Pipetten	Corning Inc., Corning, USA
Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75)	Sarstedt AG und CoKG, Nümbrcht, Deutschland
Zellkulturschalen(10 cm)	Sarstedt AG und CoKG, Nümbrcht, Deutschland

2.1.5 Zellkulturmedium

RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.6 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Trauzold der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt. Vor der Verwendung der Zellen wurden diese, mit Hilfe des Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection Kit, auf Mykoplasmen untersucht.

TABELLE 1: **Verwendete Zelllinien.** In der Tabelle abgebildet sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Namen, dem Ursprungsgewebe sowie der Erstbeschreibung.

Name	Ursprungsgewebe	Erstbeschreibung
BxPC3	Humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie	Tan MH, Nowak NJ, Loor R, et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. Cancer Invest 1986; 4(1): 15–23.

Colo 357	Humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie	21. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, et al. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. Int J Cancer 1980; 25(5): 591–598.
Panc 89	Humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie	22. Okabe T, Nomura H and Oshawa N. Establishment and characterization of a human colony-stimulating factorproducing cell line from a squamous cell carcinoma of the thyroid gland. J Natl Cancer Inst 1982; 69(6): 1235–1243.

2.1.7 Gewebe

Die verwendeten Gewebeproben wurde von der Gewebebank der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie des Universitätsklinikums Ulm zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde mit Zustimmung der unabhängigen Ulmer Ethikkommission durchgeführt. (Genehmigungen 112/2003, 268/2008, und 235/2015)

2.1.8 Antikörper und Inhibitoren

2.1.8.1 Primäre Antikörper

TABELLE 2: **Tabellarische Darstellung aller verwendeten primären Antikörper.**
Abkürzungen: IHC = Immunhistochemie; CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9; IgG = Immunglobulin G; RNA = Ribonukleinsäure; pSer2 = phosphoryliertes Serin2; IgM = Immunglobulin M

Zielantigen	Klon	Isotyp	Verdünnung für Westernblot	Verdünnung für IHC	Hersteller
CDK9	C12F7	Kaninchen	1:1000	1:150	Cell signaling Tech., Danvers, USA

β-Actin	AC-15	Maus IgG	1:10.000		Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
RNA Polymerase II total	8Wg16	Maus IgG	1:2000		Covance, Princeton, USA
RNA Polymerase II pSer2	H5	Maus IgM	1:5000		Covance, Princeton, USA

2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

TABELLE 3: **Tabellarische Darstellung aller verwendeten sekundären Antikörper.**
Abkürzungen: HRP = Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase); AP = alkalische Phosphatase; Ig = Immunglobulin

Antikörper	**Verdünnung für Westernblot**	**Verdünnung für ICH**	**Hersteller**
Anti-Kaninchen-HRP	1:5.000		Cell signaling Tech., Danvers, USA
Anti-Maus IgG-HRP	1:10.000		Cell signaling Tech., Danvers, USA
Anti-Maus IgM-HRP	1:10.000		Southern Biotech, Birmingham, USA

Anti-Kaninchen IgG-AP		unverdünnt	N-Histofine®, Nichirei Corporation, Tokyo, Japan

2.1.8.3 Inhibitoren

TABELLE 4: **Tabellarische Darstellung des vewendeten Inbibitors**. Es ist der in in allen Veruchen verwedete CDK9 Inhibitor mit Hersteller und der in allen Versuchen verwendeten Konzentration angegeben.

Inhibitor	**Hersteller**	**Verwendete Konzentration [nM]**
SNS-032	Selleck Chemicals, Huston, USA	300

2.1.9 Software

CorelDRAW 12	Corel, Ottawa, Canada
GraphPad Prism 6	GraphPad, San Diego, USA
IBM SPSS Statistics 20	IBM, Chicago, USA

2.1.10 Lösungen und Puffer

10xTBS: (Angaben für 2000ml)	48,46g Tris 161,32g NaCl 2000ml dH_2O pH einstellen auf 7,6
Acidid Isopropanol: (Angaben für 200ml)	180ml Isopropanol (100%) 20ml 1M NaCl

Blockierlösung für WB-Membranen:	5g BSA
(Angaben für 100ml)	100ml TBS-Tween
Kristallviolett-Lösung:	250mg Kristallviolett
(Angaben für 250ml)	ad 250ml 50% Ethanol
Lysispuffer (Angaben für 50ml)	1,5ml [1M] Tris-HCl pH 7,4
	1,5ml [5M] NaCl
	200µl [0,5M] EDTA pH 8,0
	200µl [0,5M] KCl
	5ml Glycerol
	0,5ml Triton X-100
	mit Aqua dest. Auf 50ml auffüllen
MTT-Lösung (Angaben für 15ml)	75 mg MTT-Bromide
	15ml PBS
PBS-Puffer-Stock 10x (Angaben für 1 Liter)	80g NaCl
	2g KCl
	14,4g Na_2HPO_4
	2,4g KH_2PO_4
	1000ml dH_2O

Ponceau S-Lösung: (Angaben für 250ml)	250 mg Ponceau S 12,5 ml Essigsäure Ad 250 ml ddH_2O
TBS-Tween: (Angaben für 1000ml)	100ml 10xTBS 900ml dH_2O 1ml Tween20
TNB Blockierlösung (Angaben für 2 Liter)	200ml 1M Tris-HCl pH 7,6 60ml 5M NaCl 10ml Tween 20 4g BSA 1730ml dH_2O
10%-Formaldehyd-Lösung: (Angaben für 1000ml)	270ml 37% Formaldehyd ad 1000ml PBS
Neutrales Formalin (Angaben für 10 Liter)	40g Natriumhydrogenphosphat, 65g Dinatriumhydrogenphosphat, 1000ml Formaldehyd 37%, 9000ml dH2O
TNT-Waschpuffer (Angaben für 2 Liter)	200ml 1M Tris-HCl pH 7,6 60ml 5M NaCl 1ml Tween 20 1739ml dH_2O

2.2 Methoden

2.2.1 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde die Statistik-Software SPSS statistics 20 von IBM genutzt. Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen wurden, bei Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, durch Log-rank Tests ermittelt. Bei Gruppenvergleichen, die mittels Boxplot dargestellt wurden, liegt ein Wilcoxon-Test der statistischen Auswertung zugrunde. Als statistisch signifikant betrachtet wurden P-Werte <0,05.

2.2.2 Immersionsfixation und Gewebeeinbettung

Die intraoperativ entnommenen Gewebeproben wurden zügig in neutrales Formalin eingebracht und über Nacht bei Raumtemperatur bzw. über das Wochenende im Kühlschrank fixiert. Nach Überführung in Histosetten wurde das Gewebe 4 Stunden gewässert, um dann in das Autotechnikon überführt zu werden. Die Einbettung fand nach dem untenstehenden Protokoll (siehe Tabelle 5) automatisch statt. Abschließend erfolgte das Gießen der Gewebeblöcke. Von überschüssigem Wachs gereinigt wurden sie bei Raumtemperatur gelagert.

TABELLE 5: **Einbetungsprotokoll des Autotechnikons.** Reagenzien, sowie Einwirkzeit und Temperatur der automatischen Einbettung sind in der verwendeten Reinfolge dargestellt.
Abkürzungen: % = Prozent; °C = Grad Celsius

Arbeitsschritt	Reagenz	Einwirkzeit	Temperatur
1	70% Ethanol	1:30 Stunde	45°C
2	80% Ethanol	2:00 Stunde	45°C
3	96% Ethanol	2:30 Stunde	45°C
4	100% Ethanol	1:00 Stunde	45°C
5	100% Ethanol	2:00 Stunde	45°C
6	100% Ethanol	4:00 Stunde	45°C
7	Methylbenzoat	4:00 Stunde	45°C
8	Methylbenzoat	3:00 Stunde	45°C
9	Toluol	0:20 Stunde	45°C
10	Paraffin I	1:00 Stunde	60°C
11	Paraffin II	1:00 Stunde	60°C
12	Paraffin III	1:00 Stunde	60°C

2.2.3 Herstellung von Gewebeschnitten

Hierfür wurden die Paraffingewebeblöcke kurz auf einer Gefrierplatte gekühlt, um die weitere Verarbeitung zu erleichtern. Mit dem Schlittenmicrotom wurden ca 2 µm dünne Schnitte mit einem feuchten Papierstreifen in ein Wasserbad überführt und anschließend auf die beschrifteten Objektträger aufgebracht. Über Nacht trockneten die mit Gewebe beschichteten Objektträger bei 40°C im Trockenschrank. Das Herstellen der Gewebeschnitte wurde freundlicherweise von Nadine Süßner und Claudia Drescher übernommen.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die schon seit langem standardisierte HE-Färbung dient der allgemeinen Beurteilung von Gewebeschnitten. Hierbei wird Hämatoxylin, ein Pflanzenstoff des Blauholzes genutzt. Das enthaltene Alaun besitzt positive Komplexverbindungen, die sich an negativ geladene Nukleinsäurephosphatgruppen in Zellkernen anlagern. Der Schwermetallanteil des Alauns erlaubt eine pH-abhängige Blaufärbung des Gewebes, welche durch bläuen bei einem pH-Wert > 3 erreicht wird. Hierfür wird im allgemeinen Leitungswasser verwendet. Eosin wird zur Gegenfärbung genutzt und lagert sich aufgrund seiner negativen Ladung an positive zytoplasmatische Gruppen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten HE-Färbung handelt es sich um eine regressive Färbemethode, bei der nach Überfärbung mit Hämatoxylin die überschüssige Farbe mit Hilfe eines Differentiators (1%HCl-EtOH-Gemisch) entfernt und anschließend die Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt wird.

2.2.4.1 Vorbereitung der Objektträger für HE-Färbungen

Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger zu erreichen wurden diese, wie im Folgenden beschreiben präpariert. Die Objektträger wurden zunächst für 1 Minute in eine Lösung bestehend aus 196ml Aceton gemischt mit 4ml Silane getaucht. Im Anschluss folgte zweimal 1 Minute in reinem Aceton, bevor die Objetktträger ebenfalls zweimal 1 Minute in destilliertes Wasser gelegt wurden. Danach lagerten die Objektträger über Nacht bei 40°C im Trockenschrank. Im Anschluss erfolgte die Bestückung mit Gewebe.

2.2.4.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte als Vorbereitung auf die HE-Färbung

Zum Entparaffiniern wurden die mit Gewebe bestückten Objektträger zunächst zweimal 10 Minuten in Xylol getaucht. Daran anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Hierfür wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten in 100%

Ethanol gestellt, bevor sie je 5 Minuten in Lösungen mit einem Ethanolanteil von 96% bzw 80% lagerten. Es folgten jeweils weiter 5 Minuten in Lösungen mit einem Ethanolgehalt von 70% bzw. 50%. Abschließend wurden die Objektträger zweimal 5 Minuten in destilliertes Wasser gestellt. Es folgte die Färbung nach dem laborintern etablierten, unten beschriebenen HE-Färbeprotokoll.

2.2.4.3 Protokoll der HE-Färbung

Nachdem die sialinierten Objektträger mit Gewebe bestückt und entparaffiniert wurden, wurden sie für 3 Minuten in Hämatoxylinfarbe gestellt, und anschließend zweimal in dH_2O gespült. Nach einem drei sekündigen Bad in 1%HCl-EtOH-Gemisch und erneutem Spülen in dH_2O unter fließendem Wasser für 10 Minuten gebläut. Nach 1 Minute in dH_2O wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Eosin getaucht um anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt zu werden. Hierbei verblieben die Schnitte je zweimal 5 Minuten in 96%er Ethanollösung bevor sie dreimal 5 Minuten in 100%ige Ethanollösung gestellt wurden. Vor dem Eindeckeln mit Entellan erfolgten zwei zehnminütige Bäder in Xylol. Die HE-Färbung wurde v.a. zur ersten Beurteilung der Gewebeschnitte erstellt. Hierbei ließ sich die Gewebequalität sowie der enthaltene Tumoranteil bestimmen. Bei unzureichender Qualität oder geringem Tumoranteil wurde das Verfahren mit anderen Gewebeblöcken desselben Patienten wiederholt. Somit wurden nur Blöcke mit ausreichendem Tumoranteil im weiteren Verlauf immunhistochemisch gefärbt und begutachtet.

2.2.5 Immunhiostochemische Färbung mit CDK9

2.2.5.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte als Vorbereitung auf Immunhistochemie-Färbungen

Für die vorbereitende Entparffinierung der Gewebeschnitte wurden diese zunächst zweimal 10 Minuten in Xylol gestellt. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Hierzu verblieben die Schnitte zuerst dreimal jeweils 5 Minuten in einer 100%igen Ethanollösung. Anschließend folgten 5 Minuten in 70%er Ethanollösung, bevor die Schnitte für zweimal 5 Minuten in destilliertes Wasser überführt wurden. Im Anschluss folgte die weitere Färbung nach dem Protokoll der Immunhistochemie.

2.2.5.2 Etablierung der immunhistochemischen Färbung mit CDK9-Ak

Zur Etablierung der Färbung wurden Paraffinschnitte von Pankreasadenokarzinomgewebe verwendet. Hierbei wurde eine geeignete Antikörper-Verdünnung für eine gute CDK9 Detektion ermittelt. Zu Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen wurde eine Negativkontrolle in die Versuchsreihe eingegliedert. Die Spezifität des Antikörpers wird von der Herstellerfirma Cells Signaling Technology garantiert. Im Verlauf zeigte sich die beste CDK9-Detektion bei einer Verdünnung des Antikörpers mit TNT-Waschlösung von 1:150. Diese Antikörperverdünnung wurde bei allen immunhistochemischen Färbungen beibehalten.

2.2.5.3 Detektionssystem

Zur Antikörperdetektion wurde ein sehr sensitives Zweischritt-System von N-Histofine® genutzt. Hiermit zeigten sich schon in der Vergangenheit gute Ergebnisse bei immunhistochemischen Färbungen. Der unkonjugierte Primärantikörper wird nach Bindung an das zu untersuchende Gewebe als Antigen für den Sekundärantikörper genutzt. Bindungsstelle stellt hier das Fc-Fragment des Primärantikörpers dar. Durch die anschließende Substrat-Chromogenreaktion wird das zu färbende Antigen sichtbar.

2.2.5.4 Protokoll immunhistochemische Färbung mit CDK9

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in eine Plastikküvette überführt und mit Citratpuffer, welcher als Demaskierlösung verwendet wurde bedeckt. Diese Küvetten wurden dampfdurchlässig verschlossen und in einem Dampfkochtopf, welcher mit 600ml dH_2O befüllt war in der Mikrowelle bei 450Watt (W) 15 Minuten gekocht. Anschließend folgten weitere 10 Minuten bei 270W. Diese Hitzedemaskierung wird benötigt, da durch die Paraffinfixierung Antigene maskiert werden können. Als Maskierung bezeichnet man entstehende Molekülquerverbindungen. Dadurch stehen bestimmte Antigene für Antikörperreaktionen nicht mehr zu Verfügung. Die Hitzedemaskierung macht diesen Prozess reversibel und ist hierbei eine gängige Methode, die wesentlich weniger anfällig für Störungen ist als beispielsweise enzymgesteuerte Demaskierungsverfahren [24, 116, 129].

Nach Entnahme aus der Mikrowelle kühlten die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Nach je 5-minütigem Waschen in dH_2O, PBS und TNT wurden die Schnitte mit ca 80µl Blockierungslösung (Peroxidase Blocking Reagent (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) bestückt und in einer Plastikkammer für 20 Minuten inkubiert. Hierbei verhinderte der

Deckel der Plastikkammer ein Austrocknen der Präparate. Danach wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten in TNT-Waschlösung vom Peroxidaseblock befreit und anschließend in der Plasikkammer 30 Minuten mit ca. 80µl TNB pro Schnitt inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen zum Entfernen der Lösung wurden die Schnitte mit „Mäusezähnchen“ abgedeckt. Hierbei handelt es sich um Deckgläschen, die an den Ecken mit Paraffin bestückt wurden. Zwischen Mäusezähnchen und Gewebe wurde die Antikörperverdünnung aufgebracht. Die so präparierten Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in deiner feuchten Kammer gelagert. Am Folgetag wurden die Mäusezähnchen entfernt und die Schnitte dreimal 5 Minuten in TNT gewaschen.

Zur Antikörperdetektion wurde eine Zweischritt-Methode von N-Histofine® verwendet. Hierfür wurde der Sekundärantikörper (HISTOFIN MAX PO RABBIT) unverdünnt aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der Färbung wurde DAB+ als Chromogen verwendet. Hierbei wird 1ml des DAKO-Puffers mit einem Tropfen Chromogensubstrat gemischt, um eine gebrauchsfertige Lösung zu erhalten. Die Schnitte wurden für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein Bad in dH_2O gestoppt. Zur Gegenfärbung der Kerne wurde Mayers Hämalaun verwendet, welches 10 Sekunden einwirkte, bevor die Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden. Die nachfolgende aufsteigende Alkoholreihe diente der Dehydrierung der Präparate. Hierfür wurden diese zunächst 5 Minuten in 70%ige Alkohollösung gestellt und danach in 96%ige Alkohollösung überführt. Es folgten drei weitere Bäder von je 5 Minuten in 100% Ethanol. Nach zweimal 10 Minuten in Xylol erfolgte das Eindeckeln der Präparate mit Entellan®.

2.2.6 Zellbilologische Methoden

Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Firma Sarstedt (75 cm^2) kultiviert und bei 37°C und 5%CO_2 inkubiert. Als Medium wurde RPMI-1640 verwendet. Dieses wurde mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.2.7 Auftauen von Zellen

Zellen wurden in flüssigem Stickstoff oder beim Transport auf Trockeneis gelagert. Vor dem eigentlichen Auftauen wurden Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium bestückt und im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Die Behälter mit den aufzutauenden Zellen wurden direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in ein vorgewärmtes Wasserbad überführt und nach vollständigem Auftauen in die Zellkulturflaschen verbracht. Der erste Mediumwechsel

erfolgte nach 24 Stunden. Je nach Zelldichte erfolgten weitere Medienwechsel, bis die Zelledichte für eine weitere Verwendung ausreichend war.

2.2.8 Einfrieren von Zellen

Als Vorbereitung auf das Einfrieren wurden Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Lösen der Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin. Die gelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon Gefäß überführt und für 10 Minuten bei 800rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 1ml FCS je gewünschtem Cryogefäß gelöst. 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Cryogefäß pipettiert und nach Zugabe von 100µl DMSO für 1 Woche bei -80°C gelagert, bevor die Behälter in den Stickstofftank verbracht wurden.

2.2.9 Splitten von Zellen

Das Splitten der Zellen erfolgte abhängig von den Wachstumseigenschaften alle drei bis vier Tage bei einer ungefähren Zelldichte von 80%. Zunächst wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin und eine Inkubation bei 37°C für 5 Minuten. Um die Trypsineinwirkung zu stoppen wurden die gelösten Zellen in Medium aufgenommen und in neue Flaschen überführt. Je nach Zelldichte und Wachstumseigenschaften wurden die Zellen 1:3 bis 1:10 gesplittet.

2.2.10 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Für einige Versuche, z.B. MTT-Assays war das aussähen einer definierten Anzahl von Zellen wichtig. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Hierbei wurden die adhärenten Zellen zunächst mit Trypsin gelöst und in neuem Medium aufgenommen. Diese Zelllösung wurde dann auf das Fadenkreuz der Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop gezählt. Hierfür wurden die Zellen in den äußeren 4 Großquadraten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl in der Suspension berechnet sich dann mit der untenstehenden Formel.

Formel Neubauer-Zählkammer: (Mittelwert der Großquadrate) x 10^4 = Zellen/ml

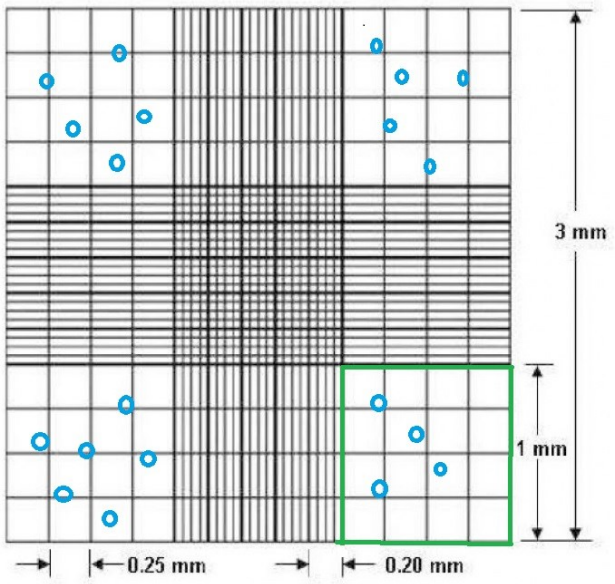

ABBILDUNG 3: **Neubauer-Zählkammer als Methode zur Bestimmung der Zellzahl in Zelllösungen.** Linkes unteres Großquadrat exemplarisch grün umrandet. Zellen sind als blaue Kreise dargestellt. Es werden zunächst alle Zellen der vier Großquadrat unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert aller Großquadrate gebildet. Im hier gewählten Beispiel (20 Zellen dargestellt, entspricht durchschnittlich 5 Zellen pro Großquadrat) würden sich nach der anzuwendenden Formel (Mittelwert der Großquadrate x 10^4 = Zellen/ml) folgende Werte ergeben: 5 x 10^4 Zellen/ml = 50.000 Zellen/ml. Eventuell vorab angefertige Verdünnungen der Zellsuspension sind zu berüksichtigen.
Abkürzungen: mm = Millimeter; ml = Milliliter

Aus der untersuchten Zellsuspension konnte die benötigte Verdünnung berechnet und hergestellt werden.

2.2.11 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die entsprechenden Zellen zunächst in Zellkultur-Platten (ø 10cm) gezüchtet, da sich diese in der Handhabung als geeigneter erwiesen haben. Bei ausreichender Zelldichte oder nach gewünschter Inhibitoreinwirkzeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 300µl Lysepuffer wurden die Platten für wenige Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Lagerung auf Eis für 30 Minuten wurde das Lysat bei 14.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.12 Proteinbestimmung in Zelllysaten mit Mikrotiterplatten-Photometer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den hergestellten Zellllysaten wurden diese mittels Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Science analysiert. Hierfür wurde eine BSA-Verdünnungsreihe als Standard gewählt. Die Zelllysate wurden in einer Verdünnung von 1:8 aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels Photometer. Durch diese Bestimmung war es im Westernblot möglich gleichmäßige Proteinmengen je Probe aufzutragen.

2.2.13 Western Blot Analysen

2.2.13.1 SDS-PAGE

Als Gele wurden 4-12% Bis-Tris Gele (lifetechnologies™ bei Thermo Fischer Scientific) mit 15 Probentaschen verwendet. Die Zelllysate wurden je nach Proteinkonzentration mit dH_2O verdünnt. Diese Verdünnung wurde mittels BCA-Test auf ihren Proteingehalt überprüft um eine gleichmäßige Proteinkonzentration zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben mit 5x SDS versetzt und für 10 Minuten bei 80°C denaturiert. Es wurde 18µl Probenvolumen pro Geltasche aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit 5µl eines Standardmarkers (Precision plus, Bio-rad) befüllt.

Als Laufpuffer diente 1x MOPS-SDS (NuPAGE® MOPS SDS running buffer 20x bei Thermo Fischer Scientific). Für die Gelelektrophorese wurde das Power Supply zunächst 10 Minuten auf 80V eingestellt. Danach erfolgten weitere 50 Minuten bei 150V. Abschließend wurde das Power Supply auf 180V gestellt und gewartet, bis der 25kDa Marker sich am unteren Gelrand befand. Hier wurde die Stromzufuhr gestoppt und

2.2.13.2 Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

Zum Aufbau der Blotting-Module (lifetechnologies™ bei Thermo Fischer Scientific) wurden zunächst die Schwämme, sowie Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran (0,2µm Porengröße) in 1x Transferpuffer (Bolt® Transfer Buffer 20x bei Thermo Fischer Scientific) getränkt. Anschließen wurde die Gelkammer aufgebrochen, die Ladetaschen sowie der untere Gelrand abgetrennt und das Blottin-Sandwich wie unten gezeigt aufgebaut.

TABELLE 6: **Aufbau des Blotting-Sandwiches**. Versuchsaufbau zur Übertragung von Proteinen vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran.
Abkürzungen: (+) = Pluspol; (-) = Minuspol

Anode (+)
Schwamm
Filterpapier
Nitrozellulose-Membran
Gel
Filterpapier
Schwamm
Kathode (-)

Nach einsetzen der Blotting-Kammer in die Kassette wurde diese mit 1x Transferpuffer bestückt und an das Power Supply angeschlossen. Das Power-Supply wurde für 90 Minuten auf 30V eingestellt.

2.2.13.3 Nitrozellulose-Membran Kontrolle mit Ponceau S

Um einen erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran zu gewährleisten wurde die Membran vor dem Blockieren mit einer Ponceau S Lösung gefärbt. Hierfür wurde die Membran für 1 Minute in die Färbelösung getaucht. Überschüssige Farbe wurde mit Waschpuffer entfernt und die Membran eingescannt. Anschließend wurde die Färbelösung vollständig mit TBS-Tween entfernt und die Membran geblockt.

2.2.13.4 Blockieren der Membran

Die Membran wurde für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschüttelt um unspezifische Bindungen durch Erst- und Zweitantikörper zu verhindern.

2.2.13.5 Inkubation mit Primärantikörpern

Alle Antikörperverdünnungen wurden in 5% BSA angesetzt. Die Membran wurde unter ständigem Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert oder 1,5 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS-Tween wurden die Membranteile unter ständigem Schütteln mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal in TBS-Tween gewaschen.

2.2.13.6 Entwickeln der Membran

Als Entwicklungslösung diente ECL Western Blotting substrate (Pierce™ bei Thermo Fischer Scientific) in einem Mischverhältnis 1:1. Hiermit wurde die Membran für 1 Minute getränkt und anschließend in die Filmkassette eingelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach 30 Sekunden bis 10 Minuten erfolgte die Entwicklung der Filme mittels Entwicklermaschiene.

2.2.14 MTT-Assay

Hierbei werden Zellen mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium Bromid) Tetrazolium Lösung behandelt um mögliche Einflüsse von Inhibitoren auf Zellproliferation und Zelltod zu untersuchen. Zellen mit intakter Stoffwechselfunktion können den MTT-Farbstoff aufnehmen und mittels mitochondrialer Reduktion in Formazan umwandeln. Hierdurch kommt es zum Farbumschlag von gelb zu violett. Dieser Farbumschlag kann photometrisch bestimmt werden.

2.2.14.1 Aussähen der Zellen

Das Aussäen der Zellen erfolgte in einer für Zellkultur geeigneten 96-Lochplatte. Die äußeren Reihen der Platte wurden vor Beginn mit je 150µl PBS befüllt um einer übermäßigen Verdunstung des Mediums entgegenzuwirken. Die benötigten Zellen wurden vorab in Zellkulturflaschen gezüchtet und bei ausreichender Zelldichte mittels Trypsin gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde durch Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. In einer 96-Lochplatte wurden je Zelllinie drei Spalten mit je 4 Löchern (Wells) mit je 10.000 Zellen/Well bestückt. Die Platten wurden dann für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Versuchsaufbau ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

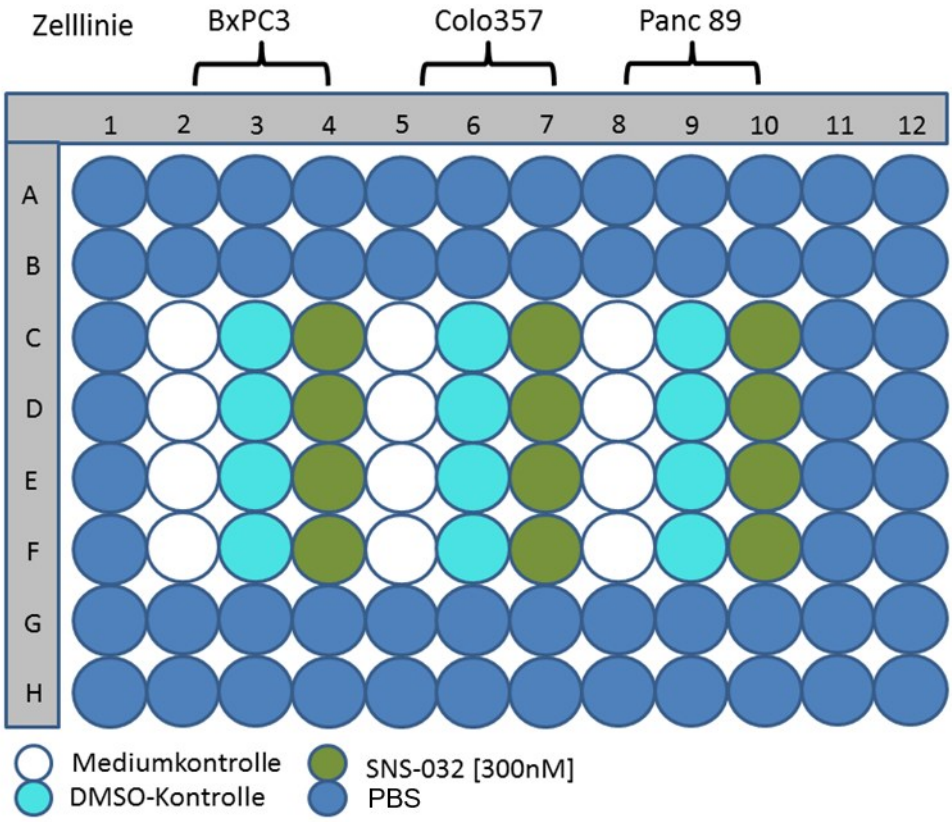

ABBILDUNG 4: **Schematische Darstellung des MTT-Versuchsaufbaus mittls 96-Loch Platte.** Der Versuch dient der Bestimmung der Zellviabilität unter Einwirkung verschiedener Substrate. Hier wird der Einfluss des CDK9 Inhibitors SNS-032 auf drei verschiedene Zelllinien (BxPC3, Colo357 und Panc89) untersucht. Die nicht benötigten Randlöcher werden als Verdunstungsschutz mit PBS befüllt. Pro Zelllinie werden jeweils eine Medium- und DMSO-Kontrolle, sowie eine Spalte mit Inhibitorverdünnung angesetzt. Pro Versuch werden je drei identische Platten verwendet.
Abkürzungen: nM = Nanomol; DMSO = Dimethylsulfoxid; PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung; CDK9 = Zyklin-anhängige Kinase 9;

2.2.14.2 Behandlung der Zellen mit Inhibitor

Anschließend wurde das alte Medium abgenommen und die Platten mit Inhibitor-haltigem Medium bestückt. Hierbei wurde stets eine DMSO- sowie Medium-Kontrolle genutzt. Je nach gewünschter Inhibitionszeit wurden die Platten 24 – 72 Stunden mit SNS-032 bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach abgeschlossener Inhibitionszeit wurde pro Well 10µl MTT-Lösung zugesetzt und die Platten für weiter 4 Stunden im Brutschrank gelagert. Danach wurde das alte Medium mit MTT-Lösung abgesaugt und durch 100µl Acidid Isopropanol ersetzt. Nach 30 Minuten Schütteln im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Absorption mittels Photometer bei 570nm bestimmt.

2.2.15 Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse

Hierbei wird die DNA Menge einer Zelle mittels BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit gefärbt und im FACScan bestimmt. Dadurch lassen sich Rückschlüsse über Zellzyklusphase, Ploidie und Vitalität der Zelle ziehen. Apoptotische Zellen befinden sich in der sub-G_1-Phase und weisen fragmentierte DNA auf. Zellen der G_0-G_1-Phase befinden sich im Zellwachtum und enthalten einen diploiden Chromosomensatz (2C; 46 Chromatiden). Zellen der postsynthetisch/prämitotischen G_2-M-Phase stehen kurz vor der Zellteilung und weisen einen verdoppelten Chromosomensatz auf (4C; 92 Chromatiden). Zellen der S-Phase sythetisieren DNA und einen eine DNA Menge die zwischen jener der G_0-G_1 und der G_2 Phase liegt. Die Analyse der DNA Menge basiert auf der Kernfärbung mittels Propidiumiodid (PI). Die jeweilige DNA-Menge wird dann mittels Laser-Messung bestimmt.

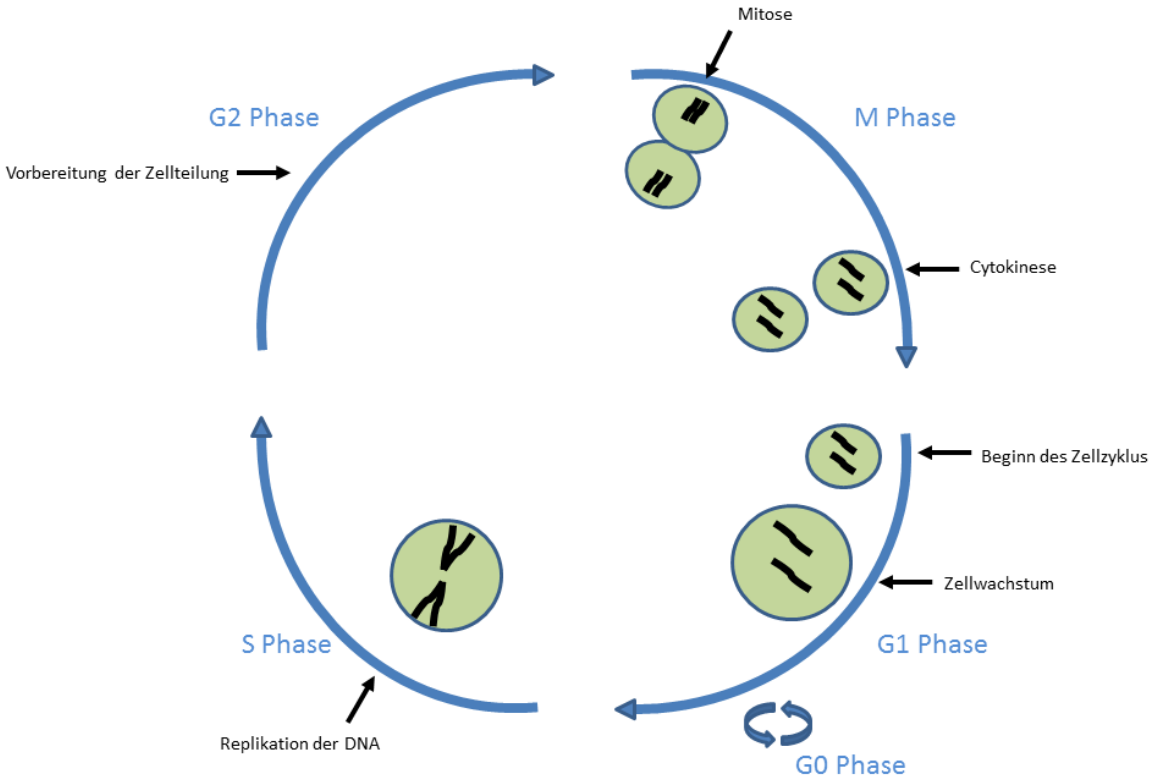

ABBILDUNG 5: **Schematische Darstellung des Zellzyklus in eurkaryontischen Zellen.** Der Zellzyklus dient der Verdopplung der genetischen Information, damit diese bei der Zellteilung an zwei identische Tochterzellen weitergegeben werden kann. Die Replikation der DNA findet während der S Phase satt und führt dazu, dass in der G2 Phase der DNA-Gehalt der Zelle doppelt so hoch ist wie in der G1 Phase.
Abkürzungen: G = gap (=engl. Lücke); S = Synthese; M = Mitose; DNA = Desoxyribonukleinsäure

2.2.15.1 Behandlung von Zellen

Zur Bestimmung der Apoptoserate bei SNS-032 behandelten Zellen wurde eine Durchflusszyrometrie durchgeführt. Hierfür wurden 2ml Panc98 Zellsuspension ($1,5x10^5$) je Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde diese mit SNS-032 [300nM] behandelt. Je nach gewünschter Inhibitoreinwirkzeit wurden die Zellen nach 24-48 Stunden geerntet. Hierfür wurde das Medium in einem Falcon gesammelt um sicherzustellen, dass auch apoptotoische Zellen die sich im Medium befinden in der Messung mit berücksichtigt werden. Der Zellrasen der &-Loch-Platte wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend abtrypsiniert. Die Trypsinwirkung wurde mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zum vorab gesammelten Medium gegeben. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in FACS-Puffer gelöst und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.15.2 Probenvorbereitung

In FACS-Puffer eingefrorene Zellen wurden bei RT aufgetaut und bei 1000rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200µl Solution A (RT) durch leichtes anschnipsen gelöst. Während der 10minütigen Inkubation vereinzelt das in Solution A enthaltene Trypsin die Zellen. Anschließend wurden 180µl Solution B (RT) hinzugefügt. Das Gemisch wurde mehrmals invertiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und 180µl Solution C (4°C) hinzugefügt. Durch mehrmaliges Invertieren wurden die Lösungen vermischt und im Dunkeln 10 Minuten bis maximal 1h inkubiert. Anschließend wurden die Probenansätze durch ein engmaschiges Drahtnetz in leere Plastikröhrchen überführt und bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert.

2.2.15.3 Messung

Zur Messung wurde ein FACScan-Gerät der Firma Becton-Dickinson verwendet. Mittels Fluoreszensfilter wurde das Fluoreszenssignal der PI-gefärbten Zellkerne detektiert und in ein Histogramm umgewandelt. Es wurden 20.000 Zellen pro Probe bestimmt.

2.2.16 Kristallviolett (Langzeitüberleben von Zellen nach Inhibitorbehandlung)

Dieser Versuch dient der Visualisierung von Zellen und deren Wachstumsverhaltens.Die Zellen werden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und nach Beendigung des Versuchs gefärbt. Das genaue Versuchsprotokoll ist im Folgenden beschrieben. Panc89

Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät. Hierbei wurden 10.000 Zellen auf 3ml Gesamtvolumen pro Loch verwendet. Nach dem aussäen wurden die Platten vorsichtig geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Nach 24 Stunden Adhäsionszeit wurden die Zellen mit SNS-032 [300nM] behandelt. Je nach Inhibitoreinwirkzeit wurde das SNS-032-haltige Medium nach 24-72 Stunden abgesaugt und durch frisches Medium ohne Inhibitor-Zusatz ersetzt. Im Anschluss wurde über 7 Tage tägliche Mediumswechsel mit inhibitorfreiem Medium durchgeführt. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen bevor sie mit 10% Formaldehyd-Lösung für 30 Minuten bei RT fixiert wurden. Nach absaugen der Formaldehyd-Lösung wurden die Zellen für 10 min bei RT mit Kristallviolett-Lösung bedeckt. Die Kristallviolett-Lösung wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit dH_2O gewaschen. Nach dem Trocknen konnten die Platten eingescannt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Aufarbeitung des Patientenkollektivs

Von den in die Studie eingeschlossenen 54 Patienten waren 23 Frauen und 31 Männer. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 69.17 Jahre. Das mediane Überleben der Patienten betrug 17,11 Monate (1,35-125,49 Monate). Die 5-Jahres-Überlebendrate betrug circa 14%. Die Datenerhebung wurde im August 2015 beendet. Patienten die nach dem 18.08.2015 noch am Leben waren, werden in dieser Arbeit als lebend klassifiziert. In der Einteilung nach TNM-Klassifikation konnte keinem Patienten ein T1-Stadium zugewiesen werden, nur 2 Patienten befanden sich im T2-Stadium. Der Großteil der Patienten wurde Kategorie T3 zugewiesen; insgesamt 49 Patienten. Nur 2 Patienten wiesen Stadium T4 auf. Die Differenzierung der Tumoren variierte von G1 bis G4. Allerdings waren nur 7 G1-Tumoren und nur 1 G4-Tumor vertreten. Hingegen wiesen 19 Tumoren die Klassifizierung G3 und 27 die Klassifizierung G2 auf. Auch die Einteilung der Tumoren nach UICC-Stadien wies eine unregelmäßige Verteilung auf. So konnte nur 1 Patient dem UICC-Stadium I zugeteilt werden, was sich mit der Tatsache der häufig späten Diagnosestellung deckt. 44 Patienten wurden mittels UICC-Stadium II klassifiziert. 2 Patienten konnten nach UICC-Kriterien in das Stadium III eingeteilt werden. Die restlichen 7 Patienten wurden dem UICC-Stadium IV zugeteilt. Bei 79,6% aller Patienten konnte ein Befall der Lymphknoten nachgewiesen werden. Zudem wiesen 13% der Patienten Fernmetastasen auf. Die prozentualen Anteile einzelner Untergruppen sind in der untenstehenden Tabelle 7 aufgeführt.

TABELLE 7: **Darstellung des Patientenkollektivs dieser Arbeit**. Aufschlüsselung verschiedener Variablen mit Angabe der absoluten Zahlen, sowie der prozentualen Anteile. Uniklinikum Ulm, 2000 – 2015.
Abkürzungen: N = Anzahl; % = Prozent; T = Tumor; UICC = Union for international cancer control; BMI = body-mass-index; > = größer; < = kleiner; min = minimal; max = maximal
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Variable		**N=54**	**%**
Geschlecht	Männlich	31	57.4
	Weiblich	23	42.6
Differenzierung	G1	7	13
	G2	27	50
	G3	19	35.2
	G4	1	1.8
T-Stadium	T1	0	0
	T2	3	5.6
	T3	49	90.7
	T4	2	3.7
Lymphknotenbefall	Nein	11	20.4
	Ja	43	79.6
Fernmetastasen	Nein	47	87
	Ja	7	13
UICC-Stadium	I	1	1.8
	II	44	81.5
	III	2	3.7
	IV	7	13
BMI	niedrig (BMI<18)	1	1.8
	normal (BMI 18-25)	23	42.6
	hoch (BMI>25)	30	55.6
Alter bei Erstdiagnose	Median	69.17	
	Min. – max	34.98-82.99	
Gesamtüberleben (Monate)	Median	17.11	
	Min. – max	1.35-125.49	

3.2 Auswertung der immunhistochemischen CDK9 Färbung und Erstellen eines Scores

Die Detektion von CDK9 im zu untersuchenden Gewebe beruht auf der für das DAB+-Chromgen typischen Farbreaktion (braun) welches sich gut gegen die blaue Hintergrundgärbung des Mayers Hämalaun abgrenzen lässt. Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop in 16-facher Vergrößerung fotografiert und ein Farbstandart festgelegt. Hierbei entsprach +++ der stärksten Färbeintensität, ++ einer mittleren Färbeintensität wohingegen + eine schwache Farbstärke bedeutet. 0 steht für keinerlei erkennbare Färbung. Zur Auswertung der gefärbten Schnitte wurden diese fotografiert und von zwei unabhängigen Personen ausgewertet. Bei Tumorgewebe-Schnitten wurden jeweils 500 Zellen pro Patient gezählt, bei Normalgewebe 100 Zellen. Jeder gezählten Zelle wurde eine Färbeintensität von 0 bis +++ zugeteilt. Die gezählten Zellen wurden mit der Färbeintensität multipliziert, um die CDK9-Expression durch einen Zahlenwert darzustellen. Dieser Wert wird im Folgenden Text vereinfacht als „Score“ bezeichnet. Der Score erreichte im Tumorgewebe (500 Zellen gezählt) theoretisch Werte zwischen 0 (keine Zelle gefärbt) bis 1500 (alle Zellen mit der stärksten Färbeintensität bewertet). Im Normalgewebe (100 Zellen gezählt) Werte zwischen 0 und 300. Um die CDK9-Expression in Tumor- und Normalgewebe direkt miteinander vergleichen zu können wurde der Score der Tumorpatienten, von denen auch Normalgewebe ausgewertet wurde, auf 100 gezählte Zellen gemittelt um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu erreichen.

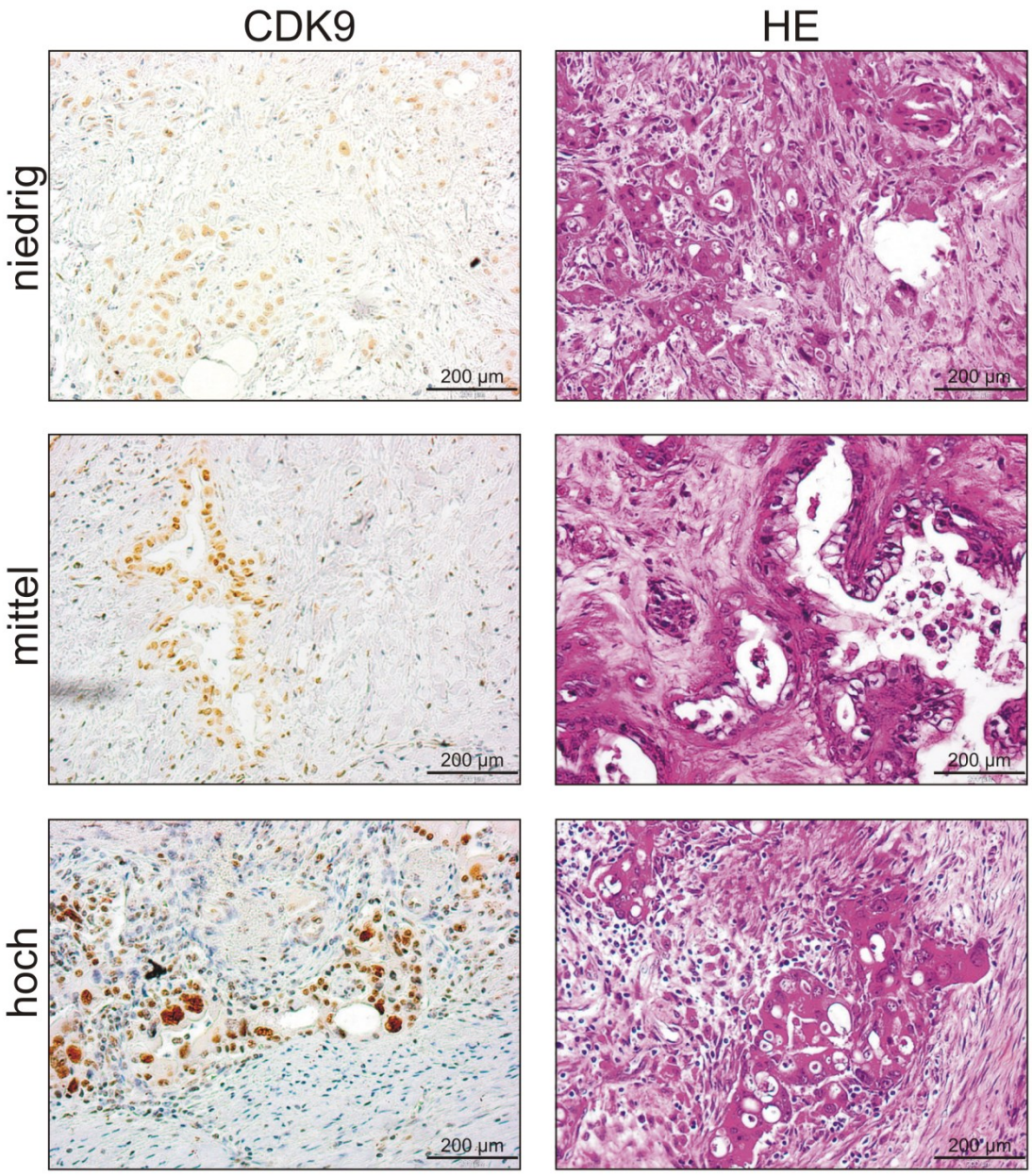

ABBILDUNG 6: **Exemplarische Darstellung verschiedener CDK9-Färbeintensitäten nach immunhistochemischer Anfärbung.**
Die Gewebeschnitte eines Gewebeblocks wurden mittels ICH (Zeilantigen CDK9) und HE gefärbt und in 16-facher Vergrößerung fotografiert. Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen CDK9-Färbeintensitäten in verschiedenen Gewebeproben.
Abkürzungen: CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9; HE = Hämatoxylin-Eosin; µm = Mikrometer; ICH = Immunhistochemie; HE = Hämatoxylin-Eosin

3.3 Beurteilung der immunhistochemischen Präparate

Bei der Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten PDAC-Schnitte unter dem Lichtmikroskop war deutlich festzustellen, dass fast ausschließlich Zellkerne positiv gefärbt waren (Abbildung 7). Das Zytoplasma stellte sich weitestgehend ungefärbt dar. Zudem fiel auf, dass sowohl Pankreasgangepithelien als auch Drüsenzellen und Zellen des neuroendokrinen Systems teilweise eine positive CDK9-Färbung aufwiesen. Auch die in

einigen Präparaten vorhandenen Lymphozyten wiesen teilweises eine positive Färbung auf. Im Gegensatz hierzu zeigten Bindegewebs-/Stromazellen keine immunhistochemische Anfärbbarkeit von CDK9. Alle Auswertungen basieren auf dem oben beschriebenen Score.

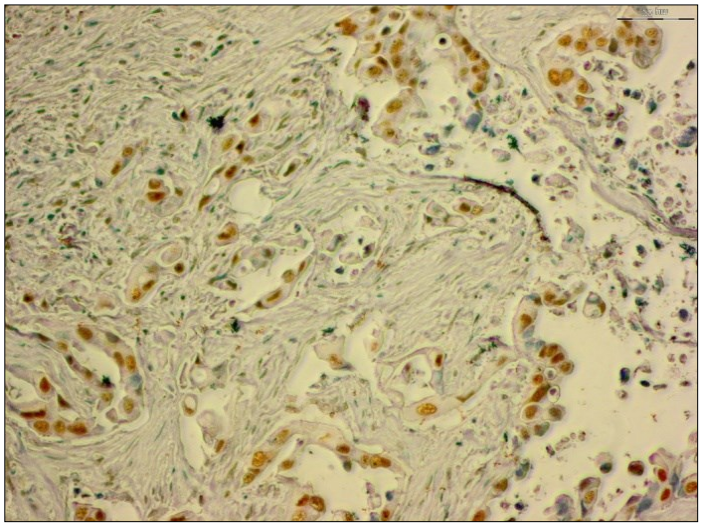

ABBILDUNG 7: **Exemplarische Darstellung eines auszuwertenden Gewebeschnittes nach immunhistochemischer Färbung mit Zielantigen CDK9 und blauer Gegenfärbung.** Von jedem Patienten wurde ein Paraffingewebeschnitt ausgewählt und 4 Bilder in 16-facher Vergrößerung zur Auswertung angefertigt. Deutlich zu erkennen ist die Färbung der duktalen Zellkerne, sowie die fehlende Färbung der Stromazellen.
Abkürzungen: CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9; HE = Hämatoxylin-Eosin; µm = Mikrometer; ICH = Immunhistochemie; HE = Hämatoxylin-Eosin

3.4 Überexpression von CDK9 in PDAC-Gewebe

Zunächst wurde die Expression von CDK9 in Tumor- und Normalgewebe des humanen Pankreas analysiert. Hierfür wurde anhand von 18 Patienten die CDK9-Expression in Tumor- und Normalgewebe direkt miteinander verglichen. Die Präparate zeigten lichtmikroskopisch deutliche Unterschiede der Färbeintensität zwischen Normal- und Tumorgewebe, wie in der untenstehenden Abbildung zu erkennen.

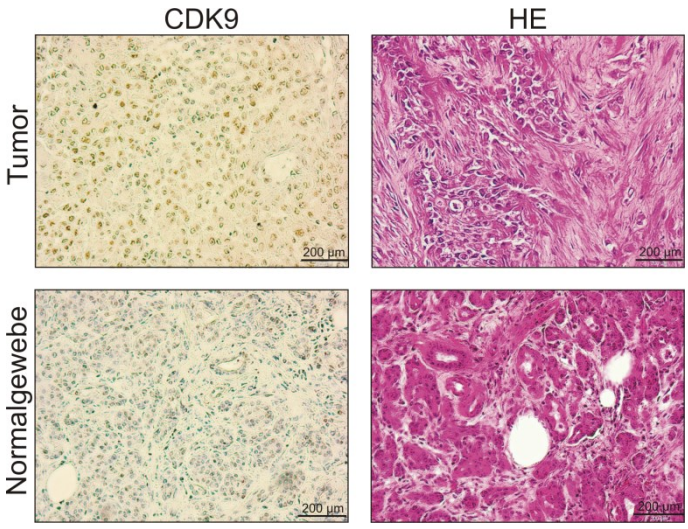

ABBILDUNG 8: **Gegenüberstellung von Pankreaskarzinomgewebe und Normalgewebe desselben Patienten**.
Immunhistochemische Färbung auf Zielantigen CDK9 und HE-Färbung jeweils in 16-facher Vergrößerung.
Abkürzungen: CDK9 = Zyklin abhängige Kinase 9; HE = Hämatoxylin-Eosin; µm = Mikrometer
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Es wurde ein Score für Tumor- und Normalgewebe der jeweils selben Patienten erstellt, und die Werte miteinander verglichen. Basierend auf den Score-Werten wurde ein Boxplot erstellt und die Werte von mittels Wilcoxon-Test korreliert. Es zeigte sich eine statistisch signifikant (p=0,003) erhöhte CDK9-Expression im Tumorgewebe, im Vergleich zum Normalgewebe (Abbildung 9).

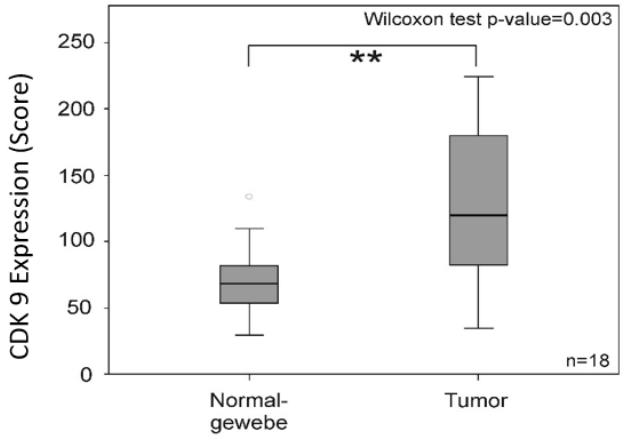

ABBILDUNG 9: **Vergleich der CDK9-Expression in Pankreasnormalgewebe mit -tumorgewebe.** Es wurde exemplarisch das Normal- sowie Tumorgewebe von 18 Patienten untersucht. Es wurden immunhistochemische Färbungen mit Zielantigen CDK9 von Normalgewebe und Tumorgewebe angefertigt, fotografiert und die Färbeintensität, sowie die Anzahl der gefärbten Zellen ausgewertet. Hierbei wurden 100 Zellen pro Gewebeschnitt ausgewertet (Score min:0 – max:300) und die ermittelten Scores miteinander verglichen. Die Auswertung des Gruppenvergleichs erfolgte durch Anwendung des Wilcoxon-Tests; die graphische Darstellung als Boxplot. Als Statistik Software wurde IBM SPSS Statistics 20 verwendet.
Abkürzungen: n = Anzahl; CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Schon in der ersten Betrachtung der immunhistochemisch-gefärbten Tumorschnitte fiel auf, dass es nicht nur große Färbeunterschiede zwischen Tumorgeweben und Normalgewebe gab, sondern dass auch innerhalb der Tumorgewebeproben deutliche Inhomogenität der CDK9-Expression festzustellen war. Aufgrund der großen Inhomogenität des ermittelten Scores wurden die Werte mit verschiedenen Patientenparametern korreliert.

3.5 Einfluss von CDK9-Expression auf das Langzeitüberleben von PDAC-Patienten

Aufgrund der oben beschriebene Überexpression von CDK9 in PDAC-Gewebe wurde im Folgenden untersucht, ob die veränderte CDK9-Expression einen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Patienten hat. Hierfür wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt. Patienten mit einem Score ≤860 wurden in einer Gruppe mit niedriger Expression zusammenfasst und den Patienten mit einem Score >860 gegenübergestellt. 41 Patienten wurden der niedrig-expressions-Gruppe zugeteilt (medianer Score = 396), welche im Folgenden als low-Score Gruppe bezeichnet wird. Die Gruppe mit hoher Expression (medianer Score = 1092) enthielt 13 Patienten. Diese Gruppe wird im Folgenden als high-Score Gruppe bezeichnet. Beim Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich deutliche Unterschiede. So betrug die 2-Jahres-Überlebensrate in der low-Score Gruppe circa 50%, während in der high-Score-Gruppe nach 2 Jahren nur noch 14% der Patienten am Leben waren. Die 5-Jahres-Überlebensrate in der low-Score Gruppe betrug 20% während kein Patient der high-Score Gruppe 5 Jahre nach Diagnosestellung noch lebte. Die Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

TABELLE 8: **Darstellung des Gesamtkollektivs nach Unterteilung in high- und low-Score Gruppe.** Nach Ausweretung der immunhistochenmischen Gewebeschnitte mit Zielantigen CDK9 wurde das Patientenkollektiv in 2 Gruppen geteilt, eine mit niedriger CDK9 Expression die andere mit hoher CDK9 Expression. Die Ausewrtung beruht auf dem oben beschriebenen Score. Die Gruppen werden nach

unterschiedlichen zu untersuchenden Kriterien aufgeschlüsselt und jeweils die absoluten Gruppengrößen angegeben. Zudem werden der mediane Score und die Min-Max-Spanne in Klammern angegeben.
Abkürzungen: N = Anzahl; CDK9 = Zyklin abhängige Kinase 9; > = größer; ≤ = kleiner gleich; min = minimal; max = maximal; M = männlich; W = weiblich; G = Grading; BMI = body-mass-index.
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

	Total N	niedrige CDK9 Expression [Score≤860] N (medianer Score)	hohe CDK9 Expression [Score>860] N (medianer Score)	Mediane CDK9 Expression [Score] (min-max)
Gesamtüberleben				
Gestorben	45	32 (380)	13 (1086)	486 (152-1299)
Lebend	9	9 (470)	0	470 (186-860)
Geschlecht				
M	31	24 (406.5)	7 (1098)	572 (162-1299)
W	23	17 (380)	6 (927)	440 (152-1121)
Differenzierung				
gut (G1, G2)	34	26 (425.5)	8 (1029)	530.5(152-1299)
Schlecht (G3, G4)	20	15 (380)	5 (1121)	407.5(172-1248)
BMI				
niedrig (BMI<18)	1	0	1 (1086)	1086
normal (BMI 18-25)	23	22 (374.5)	1 (900)	378 (162-900)
hoch (BMI>25)	30	19 (454)	11 (1092)	679.5 (152-1299)
Gesamt	54	41 (396)	13 (1086)	478 (152-1299)

Unter verschiedenen Gesichtspunkten wurden die Gruppen miteinander verglichen und die Daten statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

Die untenstehende Abbildung (Abbildung 10) zeigt die Korrelation des Gesamtüberlebens im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit von der CDK9 Expression. Hierbei wird deutlich, dass Patienten mit hohem CDK9-Expressions-Score (grüne Graphik) ein signifikant (p=0,009) schlechteres Gesamtüberleben aufweisen, als Patienten mit niedriger CDK9 Expression (blaue Graphik). Ein Langzeitüberleben mit Datenerhebung mehr als 5 Jahr nach Diagnosestellung war nur in der Gruppe der Patienten mit niedriger CDK9 Expression möglich.

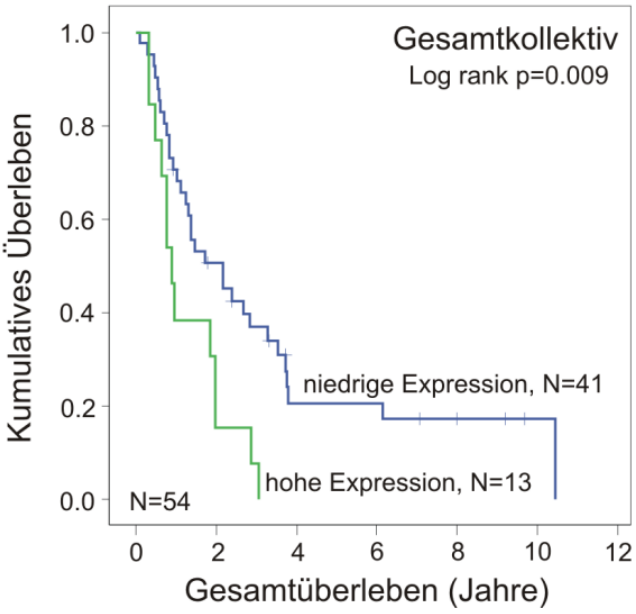

ABBILDUNG 10: **Kaplan-Meier Kurve des Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs über die Zeit.** Das Gesamtüberleben der Patienten ist dargestellt, geteilt in niedrige (grüne Kurve) und hohe (blaue Kurve) CDK9-Expression im Tumorgewebe.
Abkürzungen: N = Anzahl.
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Nachdem dies für das Gesamtkollektiv aller 54 in dieser Arbeit untersuchten Patienten gezeigt werden konnte wurde untersucht, ob die CDK9 Expression unter Berücksichtigung weiterer Faktoren einen Einfluss auf das Patientenüberleben nimmt. Hierfür wurde das Patientenkollektiv nach Geschlechtern aufgetrennt. Es zeigte sich ein signifikant (p=0,04) längeres Gesamtüberleben in der low-Score Gruppe der männlichen Patienten im Vergleich zu den männlichen Patienten der high-Score Gruppe. Im Gegensatz hierzu konnte bei Frauen kein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens zwischen Patientinnen mit hoher CDK9-Expression und niedriger CDK9-Expression festgestellt werden.

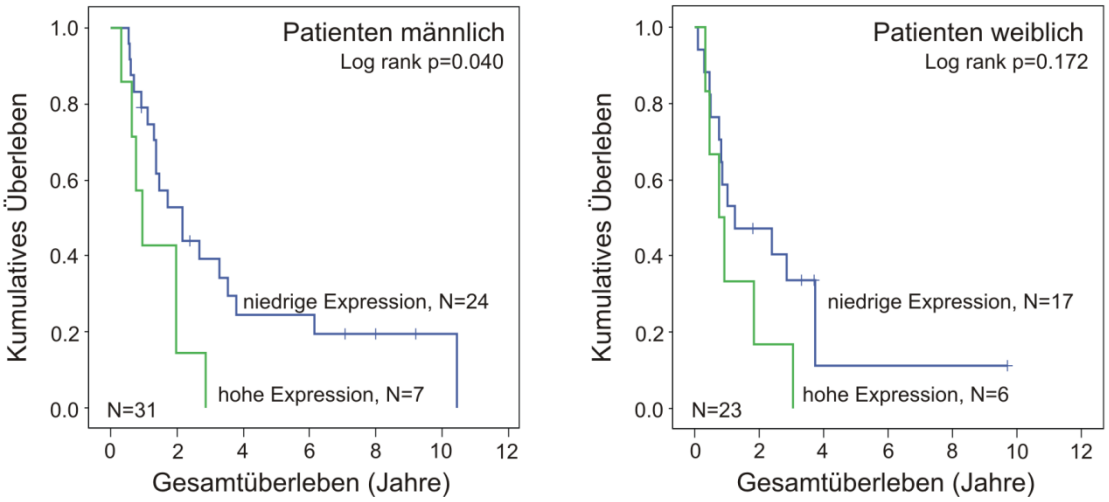

ABBILDUNG 11: **Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Patienten über die Zeit, in Abhängigkeit von der CDK9 Expression im Tumorgewebe.** Die grüne Kurve stellt die low-Score-Gruppe mit niedriger CDK9 Expression dar, die blaue Kurve die high-Score-Gruppe mit hoher CDK9 Expression. Die Daten zeigen ein signifikant besseres Gesamtüberleben von männlichen Patienten mit niedriger CDK9 Expresson im Tumorgewebe (p-Wert=0,04)
Abkürzungen: N = Anzahl; CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9; PDAC = Pankeas-Adenokarzinom

Ebenfalls wurde untersucht, ob das Grading der Tumoren in Abhängigkeit zur CDK9-Expression eine Bedeutung für das Patientenüberleben hat. Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit gut differenzierten Tumoren (G1+G2) und niedriger CDK9-Expression ein signifikant (p<0,001) besseres Langzeitüberleben aufwiesen als Patienten mit gut differenzierten Tumoren und hoher CDK9-Expression. Hingegen konnte kein Unterschied im Langzeitüberleben zwischen high- und low-Score-Gruppe bei schlechtdifferenzierten Tumoren (G3+G4) festgestellt werden.

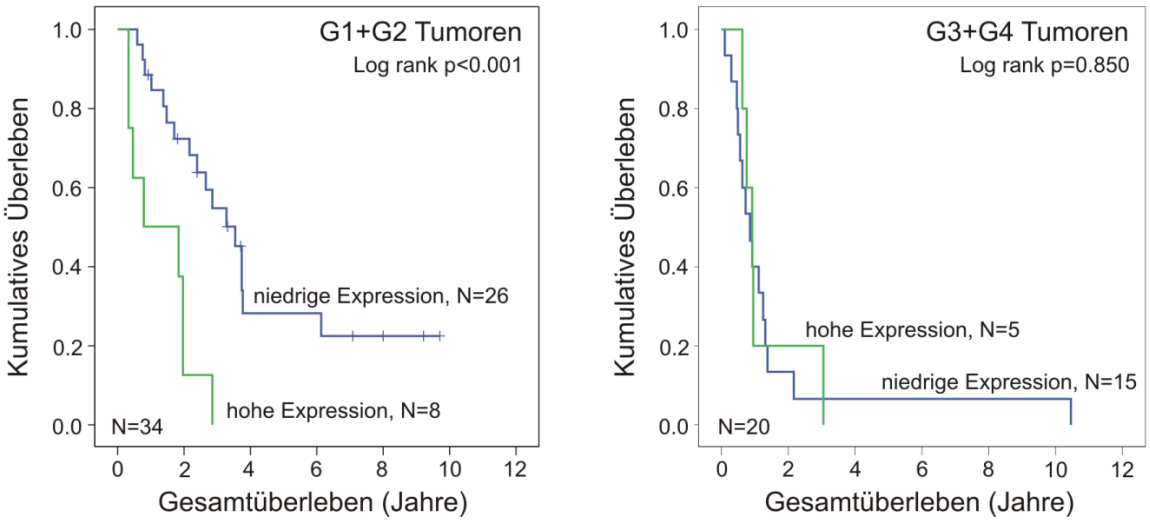

ABBILDUNG 12: **Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von Patienten mit gut (links) oder schlecht (rechts) differenzierten Tumoren über die Zeit, in Abhängigkeit von der CDK9 Expression im Tumorgewebe.** Tumoren mit histopathologische Differenzierung (G) G1 und 2 wurden als gut differenziert, G3 und G4 als schlecht differenziert eingestuft. Die grüne Kurve stellt die low-Score-Gruppe mit niedriger

CDK9 Expression dar, die blaue Kurve die high-Score-Gruppe mit hoher CDK9 Expression. Die Daten zeigen ein signifikant höheres Gesamtüberleben von Patienten mit gut differenzierten Tumoren und niedriger CDK9 Expression (p-Wert < 0,001)
Abkürzungen: N = Anzahl; G = Grading; CDK9 = Zyklin-abhängige Kinase 9; < = kleiner
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CDK9 in PDAC überexprimiert ist und dies einen negativen Einfluss auf das Patientenüberleben mit sich bringt, wurde der Frage nachgegangen, ob eine Hemmung von CDK9 zu einem verbesserten Langzeitüberleben führen könnte. Diese Fragestellung wurde in Zellkulturversuchen untersucht.

3.6 Expression von CDK9 in etablierten Pankreaskarzinomzelllinine

Im Weiteren soll die Rolle von CDK9 in PDAC Zellen untersucht werden. Hierfür sollen etablierte Zelllinien (BxPC3, Colo357 und Panc89) genutzt werden. Zunächst soll untersucht werden, ob diese Zelllinien eine CDK9 Expression aufweisen. Zudem soll untersucht werden, ob sich in den etablierten PDAC Zelllinien eine heterogene CDK9 Expression feststellen lässt. Hierfür wurden Zelllysate angefertigt und diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot-Verfahren analysiert.

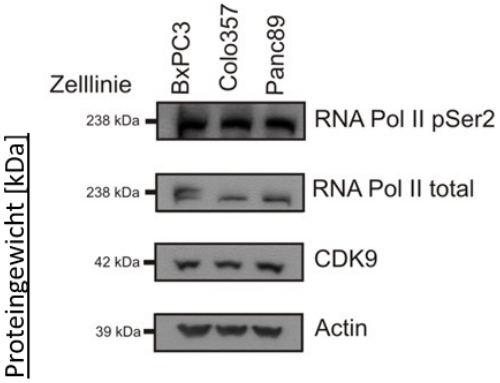

ABBILDUNG 13: **Westernblotanalyse von RNA Pol II total, RNA Pol II pSer2, CDK9 und β-Actin in drei PDAC-Zelllinien (BxPC3, Colo357, Panc89).**
Abkürzungen: kDa = Kilodalton; RNA = Ribonukleinsäure; RNA Pol II = RNA-Polymerase II; pSer2 = phosphoryliertes Serin2; CDK9 = Zyklin abhängige Kinase 9.
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Alle drei Zelllinien zeigen eine deutliche Expression, sowohl von CDK9 als auch von dessen Phosphorylierungsprodukt RNA Pol II pSer2. Es soll untersucht werden, ob eine pharmakologische Hemmung von CDK9 in PDAC-Zelllinien möglich ist, oder ob dies, z.B. durch Mutationen im Tumorgewebe nicht mehr möglich ist.

Um herauszufinden, ob CDK9-Hemmung mittels spezifischer Inhibition zu einer veränderten Zellvitalität führen kann, wurde in der Fachliteratur nach einem geeigneten

Inhibitor gesucht. Es wurden in der Vergangenheit verschiedene CDK9 Inhibitoren entwickelt, allerdings stellt allein SNS-032 einen relativ selektiven CDK9-Inhibitor dar. Zwar hemmt SNS-032 auch CDK2 und CDK7, seine IC50 beschriebenen ist für CDK9 allerdings deutlich sensitiver. Die konstante Konzentration von 300nM SNS-032 in allen in dieser Arbeit Versuchen wurde gewählt, da erreicht wurde, und gleichzeitig ein geringes Nebenwirkungsspektrum diese in klinischen Studien im Patientenserum zeigte [60, 139]. Um den gewählten Inhibitor im Versuchsaufbau zu testen wurden Panc89 Zellen für 0-12 Stunden mit SNS-032 behandelt, um zu prüfen, ob hierdurch eine Hemmung von CDK9 induziert werden kann. Es wurde deutlich, dass die RNA Pol II pSer2, die allgemein den Phosphorylierungspunkt von CDK9 darstellt, schon nach wenigen Stunden der SNS-032-Behandlung deutlich abnimmt. Hierdurch ist der Rückschluss zulässig, dass eine SNS-032-Behandlung zu einer Hemmung der CDK9-Aktivität in vitro führt.

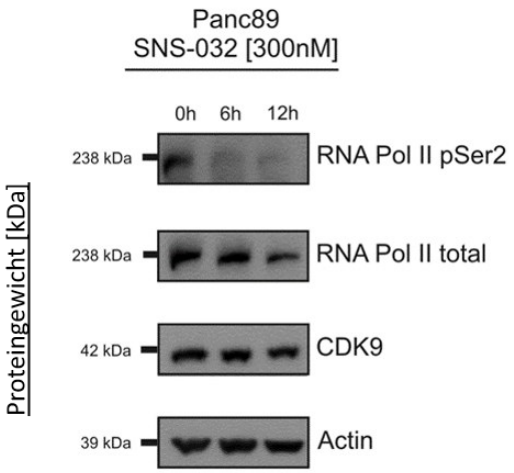

ABBILDUNG 14: **Westernblot Analyse von SNS-032 behandelten Panc89 Zellen.** Unter Behandlung mit SNS-032 als CDK9 Inhibitor zeigt sich eine deutliche Abnahme der RNA Pol II pSer2, welche das Phosphorylierungsprodukt von CDK9 darstellt.
Abkürzungen: kDa = Kilodalton; RNA = Ribonukleinsäure; RNA Pol II = RNA-Polymerase II; pSer2 = phosphoryliertes Serin2; CDK9 = Zyklin abhängige Kinase 9; h = Stunden; nM = Nanomol.
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Nachdem gezeigt wurde, dass SNS-032 zu einer Hemmung der CDK9-Aktivität in der PDAC-Zelllinie Panc89 führt, wurde untersucht, ob sich durch diese Hemmung ein Einfluss auf die Viabilität oder Vitalität der kultivierten Zellen nachweisen lässt.

3.7 Inhibition von CDK9 durch SNS-032 und Viabilitätsbestimmung mittels MTT

Die Zelllinien wurden über 24 – 72 Stunden mit SNS-032 in einer Konzentration von 300nM behandelt. Medium- und DMSO-Kontrollen wurden für jede Zelllinie bestimmt, da SNS-032

im potentiell zelltoxischen DMSO gelöst wurde. Ein Vergleich von Medium- und DMSO-Kontrolle sollte auf einen zellschädigenden Effekt von DMSO auf die Zellkulturen hinweisen. Da sich kein signifikanter Unterschied zwischen Medium und DMSO-Kontrolle zeigte, wurden die Ergebnisse der Inhibition auf den DMSO-Wert normiert und anschließend graphisch dargestellt.

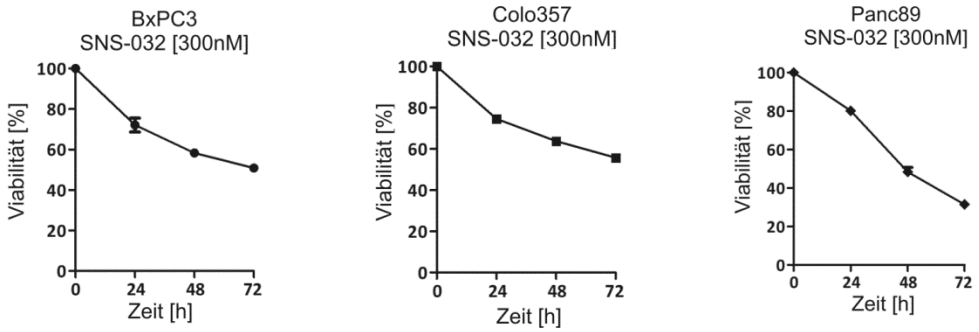

ABBILDUNG 15: **Abnahme der Zellviabilität in Prozent (%) durch unterschiedlich lange Behandlung (in Stunden (h)) der Zellen mit SNS-032 in konstanter Konzentration von 300nM.**
Dargestellt für die verwendeten Zelllinien BxPC3, Colo357 und Panc89. Alle Zelllinien zeigen eine Abnahme der Zellviabilität, allerdings mit zelllinienspezifischen Unterschieden. Die stärkste Abnahme der Zellviabilität ist bei Panc89 zu beobachten.
Abkürzungen: nM = Nanomol; % = Prozent; h = Stunde.
Modifiziert nach [73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Es zeigte sich eine deutliche, zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität. Es wurde auch deutlich, dass nicht alle Zelllinien gleich auf die Inhibitorbehandlung ansprechen. Zwar war der zeitanhängige Verlauf der Kurven, mit stärkerer Abnahme der Zellviabilität bei längerer Inhibitor-Wirkung bei allen Zelllinien zu verzeichnen, die maximal erreichte Hemmung der Viabilität variierte aber stark zwischen den verschiedenen Zelllinien. Während in BxPC3 Zellen nach 72h eine Viabilitätsreduktion von annähernd 50% erzielt werden konnte, zeigten die Colo357 Zellen im selben Zeitfenster einen schwächeren Effekt mit nur ca 40% Viabilitätsreduktion. Hingegen konnte in Panc89 Zellen mit einer Viabilitätsreduktion von fast 70% nach 72h der größte Effekt erzielt werden.

3.8 Bestimmung des Langzeitüberlebens nach SNS-032 Behandlung von Panc89-Zellen durch Kristallviolett-Färbung

Da eine MTT Messung zwar die Viabilität der Zellen ermittelt, aber keine Aussage über das Langzeitüberleben der Zelle nach Beendigung des Stimulus liefert wurden Kristallviolett-Färbungen durchgeführt. Hierbei werden die Zellen nach Beendigung der Inhibitorbehandlung in Inhibitor-freiem Vollmedium für mehrere Tage weiter inkubiert.

Hiermit soll ermittelt werden, ob die Inhibitorbehandlung einen längerfristigen Effekt aufweist. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob die PDAC Zellen nach Beendigung der Inhibitoreinwirkung zu einem normalen Wachstum zurückkehren, oder ob die Effekte nachhaltig sind und die Wirkung auch nach Beendigung der Inhibition weiter nachweisbar ist. Der Versuch wurde mit Panc89 Zellen durchgeführt, da diese in vorangegangenen Versuchen das beste Ansprechen auf eine Inhibitorbehandlung gezeigt hatten.

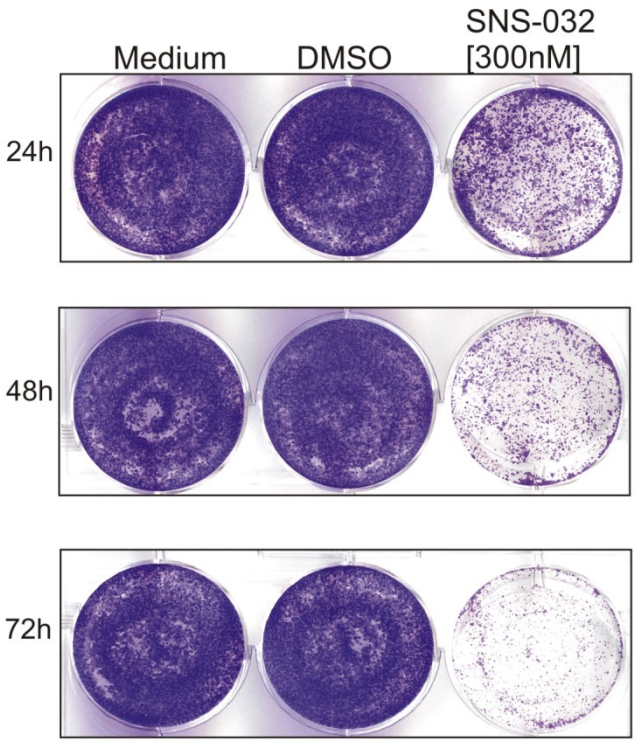

ABBILDUNG 16: **Kristallviolett-Färbung von Panc89 Zellen nach Behandlung mit SNS-032 über 24-72 Stunden.** Medium und DMSO-Kontrollen sind jeweils mit dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche, zeitabhängige Abnahme der Zelldichte durch die Behandlung mit SNS-032.
Abkürzungen: h = Stunden; DMSO = Dimethylsulfoxid; nM = Nanomol.
[73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

Auch hierbei zeigte sich, dass abhängig von der Inkubationszeit, die Zellen ein deutlich verringertes Langzeitüberleben aufweisen. Es zeigte sich visuell kein Unterschied zwischen der Medium- und der DMSO-Kontrolle. Beide Kontrollen wurden, identisch zum Vorgehen mit SNS-032, behandelt. Auch nach 48 und 72h konnten keine Unterschiede zwischen Medium- und DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Nach 24h Inhibitorinkubation zeigten sich allerdings deutlich sichtbare Effekte. Der mittels Kristallviolett angefärbte Zellrasen zeigte eine deutlich geringere Zelldichte als in den beiden Kontrollen. Nach 48h Inhibitoreinwirkzeit konnte dieser Effekt noch einmal verstärkt werden. Nach 72h Inhibitoreinwirkzeit war eine massive Abnahme der Zelldichte zu verzeichnen.

3.9 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate und des Zellzyklus

Um zu zeigen welchen Einfluss eine SNS-032 Behandlung bei Panc89-Zellen auf den Zellzyklus hat, wurden Zellen für 24 – 72h mit SNS-032 [300nM] behandelt. Hierbei wurde festgestellt, dass es in den ersten 24h nach SNS-032-Behandlung in den Zellen zu einem G2-Arrest kommt. Der Anstieg der G2-Phase nach 24h Behandlung betrug im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 16.34%. Die Apoptoserate blieb nach 24 Stunden SNS-032 Behandlung weitestgehend konstant. Nach 48h hingegen war eine steigende Apoptoserate zu verzeichnen. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen in der SubG1-Fraktion stieg um 28.19% (von 9.96% auf 38.15%). Nach 72h Inkubationszeit war nur noch ein leichter Anstieg der Apoptoserate von 38% auf 45% zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SNS-032-Behandlung einen doppelten Wirkmechanismus aufweist. Zunächst eine Blockade des Zellzyklus und anschließend die Herbeiführung eines apoptotischen Zelltods. Erst ab einer Wirkzeit von 48 Stunden kann eine steigende Apoptoserate beobachtet werden.

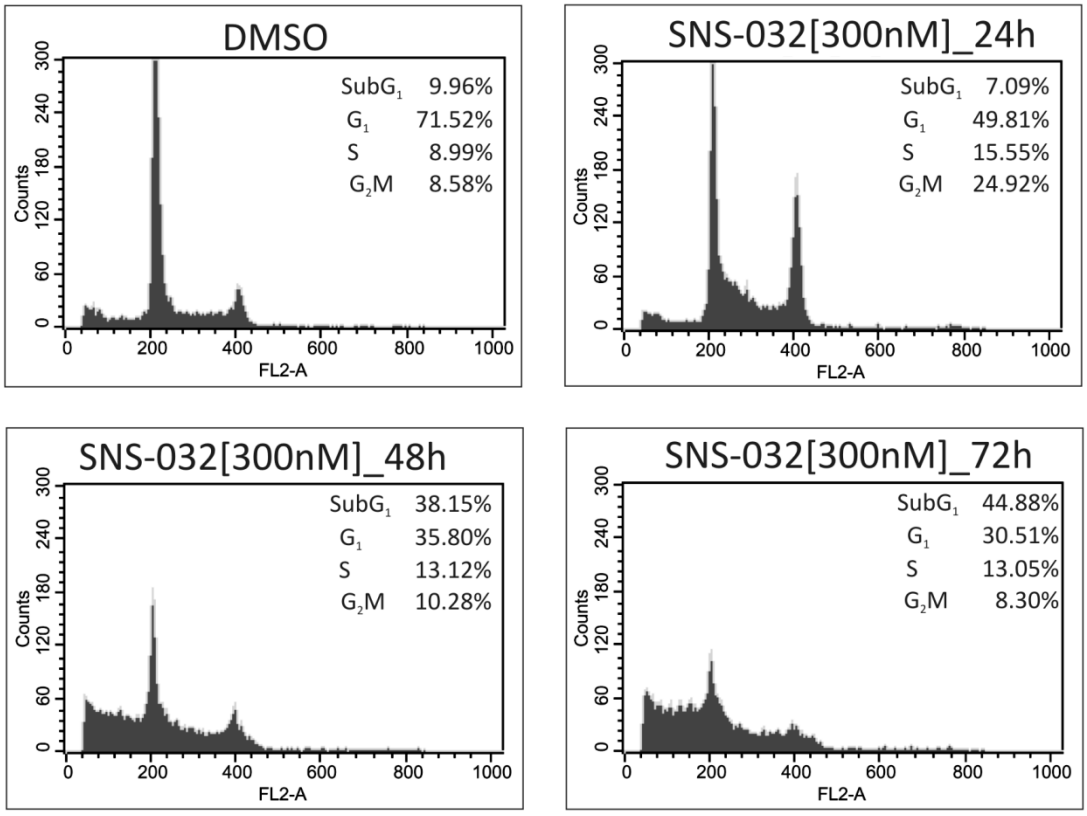

ABBILDUNG 17: **Graphische Darstellung der FACS-Scan-Analysen der Inhibitorbehandlung von Panc89-Zellen mit 300nM SNS-032 über 0-72 Stunden**. Zur Verarbeitung der Zellen wurden die Herstellerangaben des BD Cellcycle KITS befolgt, wie in Methoden beschrieben.
Die prozentualen Anteile der einezelnen Zellzyklus-Fraktionen sind in den jeweiligen Diagrammen integriert. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der G2M Fraktion nach 24h Inhibitor-Behandlung, sowie eine deutliche Zuhnahem der Sub G1 Fraktion nach mindestens 48h Inhibitor-Behandlung.
Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; nM = Nanomol; h = Stunden, % = Prozent; SubG1 = Anteil apoptotische Zellen; G1 = Anteil Zellen in der Gap 1-Phase; S = Anteil Zellen in der Synthese-Phase; G2M = Anteil Zellen in der Gap 2-Phase 2 und Mitose-Phase;
[73] , CC BY -NC 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/

3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der Arbeit wie folgt darstellen. Es handelt sich beim untersuchten Patientenkollektiv um ein heterogenes Kollektiv. Bei diesem Patientenkollektiv konnte eine Überexpression von CDK9 in Karzinomzellen festgestellt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass eine hohe CDK9 Expression im Tumorgewebe einen negativen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellt. In den zellbiologischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten PDAC-Zelllinien CDK9 exprimieren. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung mittels SNS-032 in der Zellline Panc89 zu einer Abnahme des CDK9 Phosphorylierungsproduktes RNAPol II pSer2 führt. Auch wurde gezeigt, dass die SNS-032 Behandlung der Zelllinien zu einer Abnahme der Zellviabilität führt, und dass dies abhängig von der Inhibitorinkubationszeit ist. Auch konnte am Beispiel Panc89 gezeigt werden, dass das Langzeitüberleben der Zellen auch nach Beendigung des CDK9-inhibierenden Stimulus vermindert bleibt. Hierfür wurde die Methode der Kristallviolettfärbung genutzt. Der Einfluss auf den Zellzyklus wurde zuletzt mittels FACS-Analyse untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass es zu einer zeitabhängigen Steigerung der Apoptose kam. Die FACS Analysen wurden an Panc89 Zellen durchgeführt.

4 Diskussion

Mitglieder der CDK Familie beeinflussen durch das Phosphorylieren von Zielproteinen den Zellzyklus und die Proteinbiosynthese von Zellen. Dies macht sie zu Schlüsselkomponenten in der Regulation von Zellteilung, Zellwachstum und apoptotischen Prozessen. Eine Dysregulation von diversen Mitgliedern der CDK Familie kann somit zu pathologischen Krankheitsbildern führen, u.a. zur Tumorentstehung. Mitglieder der CDK Familie stellen somit einen wichtigen Ansatzpunkt für spezifische Inhibitoren dar, insbesondere bei Apoptose-resistenten Krebserkrankungen wie dem PDAC. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CDK9 in PDAC und Normalgewebe des Pankreas zu vergleichen, mögliche Einflüsse von CDK9 Expssion im PDAC zu untersuchen und CDK9 in PDAC-Zelllinien in vitro zu hemmen.

Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit lauten also:

1. CDK9 ist in PDAC-Zellen im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas überexprimiert
2. Eine hohe Expression von CDK9 in PDAC Gewebe korreliert mit einem niedrigen Patientenüberleben
3. CDK9 wird in PDAC Zellen exprimiert und kann von SNS-032 gehemmt werden, was zu einer Abnahme der Zellviabilität und -vitalität führt

Die einzelnen Ergebnisse sollen nun in getrennten Abschnitten diskutiert werden.

4.1 CDK9 ist in PDAC Zellen im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas überexprimiert

Durch die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen, die Teilen dieser Arbeit zu Grunde liegen konnte gezeigt werden, dass CDK9 in PDAC Gewebe signifikant vermehrt exprimmiert wird, verglichen mit dem untersuchten Normalgewebe des Pankreas. Erhöhte CDK9 Aktivität konnte bereits sowohl in Prostatkrebszellen [47] als auch in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs [98] nachgewiesen werden. Allerdings konnte bei der Literaturrecherche bisher nur wenige Nachsweise gefunden werden, dass es in vorherigen Studien gelungen ist, eine CDK9 Überexpression im primären, humanen Tumorgewebe nachzuweisen [7]. Dass CDK9 im PDAC überexprimiert ist konnte mit dieser Studie erstmalig gezeigt werden. Diese Entdeckung unterstützt die Theorie, dass CDK9 eine

Schlüsselrolle bezüglich entarteten Zellsignalwegen einnimmt, die zu Malignitätsmerkmalen wie z.B. invasives Wachstum, unkontrollierte Proliferation und Metastasenbildung beitragen. Die Unterschiedliche Färbung der Präperate legt den Schluss nahe, dass auch innerhalb des PDAC Gewebes eine gewisse Heterogenität gegeben ist.

4.2 Eine hohe Expression von CDK9 im primären, humanen PDAC Gewebe korreliert mit einem niedrigen Patientenüberleben

Durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass eine hohe CDK9 Expression im primären, humanen PDAC Gewebe einen negativen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten darstellt. Diese Ergebnisse waren für das Gesamtkollektiv der in die Studie aufgenommenen Patienten signifikant (log rank $p < 0{,}009$). Nach Aufteilung des Patientenkollektivs je nach Tumordifferenzierung in eine Gruppe mit G1 und G2 Tumoren und eine zweite Gruppe mit G3 und G4 Tumoren konnte ein signifikatanter Zusammenhang zwischen CDK9 Expression und Langzeitüberleben der Patienten nur in der Gruppe der gut differenzierten Tumoren (G1 und G2) gezeigt werden (siehe Abbildung 11). Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass in undifferenziertem Tumorgewebe weitere intrazelluläre Prozesse dysreguliert sind, und die regulierende Wirkung von CDK9 mit zunehmneder Entdifferenzierung an Bedeutung verliert. Es könnte allerdings auch sein, dass bis dahin durch CDK9 regulierte intrazelluläre Prozesse von anderen Molekülen übernommen werden. An Lymphomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass CDK9 während des Differenzierungsprozesses hochreguliert ist [7]. Dies zeigt, dass vor allen in gut differenzierten Tumoren eine selektive Adressierung von CDK9 einen vielversprechenden, neuen Therapieansatz bietet. Diese These wird von der Tatsache gestützt, dass eine CDK9 Inhibierung bisher im Tiermodell, sowie in ersten klinischen Studien am Patienten gut vertragen wurden [14, 60, 79, 139].

4.3 CDK9 wird in PDAC Zellen exprimiert und kann von SNS-032 gehemmt werden, was zu einer Abnahme der Zellviabilität und –vitalität führt

Die Dysregulierung verschiedener CDK-gesteuerter Signalwege wurde mit der Entstehung und dem Progress verschiedener Krebsarten im Menschen in Verbindung gebracht [22, 35, 43, 75]. In der Literatur wurde die Rolle der CDK lange auf die Regulation des Zellzyklus reduziert. Auch die Zielsetzung der ersten entwickelten Inhibitoren richtete sich auf eine Hemmung des Zellzyklusprogresses in Tumorzellen aus [123]. Nach bekanntwerden der

transkirptionsregulierenden Eigenschften einiger CDKs, insbesondere CDK7 und CDK9, durch die Bildung des pTEFb mit dem Zyklin-Bindungspartner konnte hier ein neuer vielversprechender Therapieansatz bei der Beahdlung maligner Tumore identifiziert werden. Insbesondere, da die unkontrollierte Transkription ein wichtiges Kennzeichen von Tumorzellen darstellt [55, 56]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des CDKI SNS-032 auf unterschiedliche PDAC-Zelllinien untersucht, nachdem gezeigt werden konnte, dass alle in den Versuchen genutzte Zelllinien CDK9 exprimieren (siehe Abbildung 13). Der Inhibitor wurde bewusst gewählt, da es sich bei SNS-032 um den in der Literatur als CDK9 selektivsten beschriebenen CDKI handelt. Auch konnte bereits gezeigt werdem, dass eine CDK9-Inhibierung sowohl in Tiermodellen, als auch in klinischen Studien gut toleriert wird, was den Inhibitor für die Entwicklung neuer Therapieansätze besonder interessant macht [14, 60, 79, 139]. Auch die in den Versuchen verwendete Inhibitorkonzentration beruht auf der Literaturrecherche. Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass bereits in klinischen Studien weiterführend erforschte CDKI zuletzt Rückschläge erlitten haben. So konnten durch unselektive CDK Hemmung toxische Effekte beschrieben werden [50]. In dieser Arbeit konnte zunächst eine zeitabhängige Reduktion der Zellviabilität durch die Behandlung mit SNS-032 in den untersuchten Zelllinien demonstriert werden. Da mit dem MTT-Verfahren nur die Zellviabilität, also die Stoffwechselaktivität, nicht aber der Zelltod bestimmt werden kann, wird hier zwar deutlich, dass eine SNS-032-Behandlung einen negativen Effekt auf die Stoffwechselleistung der Zellen ausübt, es lassen sich hieraus allerdings noch keine Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus ziehen. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auf einer Induktion von Apoptose beruht, oder nur auf einer kurzfristigen Verminderung der Stoffwechselaktivität, wurden Kristallviolett Färbungen angefertigt. Hier lag der Fokus auf einer zeitabhänigen Inhibitorinkubation, allerdings wurde der Stimlus nach 24-72 Stunden beendet und die Zellen weiter im Inhibitorfreien Medium kultiviert. Zellen die durch den Inhibitor nur in ihrer Stoffwechselleistung eingeschränkt, bei denen aber kein Zelltod induziert wurde, können nach Beendigung der Inhibition wieder zu einem aktiven Stoffwechsel zurückkehren. Apoptotische/nekrotische Zellen hingegen können sich im folgenden Stimulus-freien Intervall nicht mehr teilen. Dies führt im Folgenden zu einem weniger dichten Zellrasen der, nach Beendigung der Kultivierungsphase, mittels Kristallviolett gefärbt wird. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zellen sich auch nach Beendigung des CDK9-inhibierenden

Stimulus durch SNS-032 nicht erholten. Dieser Rückschluss ist aus der Abnahme der Zelldichte zulässig. Dies spricht nicht nur für eine im MTT Assay gezeigte Reduktion der Zellviabilität, sonder auch der Zellvitalität. Um diese Untersuchung weiter zu vertiefen wurden im Anschluss Zellzyklusanalysen mittels FACS Analyse durchgeführt. Hier zeigte sich eine zeitabhänige Zunahme der Apoptoserate. Insbesondere konnte dieser Effekt nach ≥ 48 h Inhibitoreinwirkzeit verzeichnet werden. Es stellt sich die Frage, welchen Überlebensvorteil eine Überexpression von CDK9 für Tumorzellen mit sich bringt. Es ist in der Literatur beschrieben, dass die vermehrte Transkription vor allem zur vermehrten Synthese von kurzlebigen, anti-apoptotischen Proteinen wie beispielsweise Mcl-1 und X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) führt [26]. Eine vermehrte Synthese dieser Proteine führt zu einer erniedrigten Apoptoserate im betroffenen Gewebe. Eine niedrige Apoptoserate ist ein weitverbreitetes Phänomen in Tumorzellen und stellt eines der bekanntesten Kennzeichen von Krebszellen dar [56]. Das Phänomen der vermehrten Apoptose von Tumorzellen durch inhibitorische Einwirkung auf CDK9 wurde schon von anderen Autoren beschrieben. Hierbei wir davon ausgegangen, dass eine CDK9-Inibierung zu einer verringerten Synthese der antiapoptotische Proteine führt, und die Zelle somit ihre Resistenz gegen Apoptosemechanismen verliert [26]. Dieser Effekt beruht vor allem auf der, durch SNS-032 induzierten CDK9 Hemmung, und der damit verbundenen verminderten Transkription von kurzlebigen, antiapoptotoschen Molekülen wie XIAP und Mcl-1 [26, 73, 148]. CDK9 wird zudem eine Schlüsselrolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen zugeschrieben, die Invasion, Proliferation und Metastasenbildung von Krebszellen beeinflussen [26]. Die Überexpression von CDK9 in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe beweist eine neue Mutation, die in der stufenweisen Entartung des Ursprungsgewebes abläuft. Dass dies einen Wachstumsvorteil für den Tumor bietet und somit zu einem Nachteil der Patienten führen kann zeigt sich durch die Tatsache, dass Patienten mit geringerer CDK9-Expression ein signifikant längeres Überleben aufweisen als Patienten mit hoher CDK9-Expression im Tumorgewebe. Da dieser Effekt vor allem in gut differenzierten Tumoren zu beobachten ist lässt darauf schließen, dass es mit fortschreitender Entartung der Tumorzellen zu anderen schwerwiegenden Mutationen kommt, die die regulierende Rolle von CDK9 übernehmen, und somit die vermehrte CDK9-Expression bei fortschreitender Entdifferenzierung des Tumors an Bedeutung verliert. CDKs wurde schon lange Zeit mit der Regulierung des Zellzyklus in

Verbindung gebracht, allerdings wurde CDK9 erst in der jüngeren Vergangenheit eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Transkription zugesprochen [94, 112]. Die bisher üblichen Chemotherapieregime wie Gemcitabin oder FOLFIRINOX (enthält Folinsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin) konnten bisher keinen durchschlagenden Behandlungserfolg aufweisen. In neuen Studien konnten bereits synergistische Effekte von SNS-032 in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika gezeigt werden. Insbesondere konnte im PDAC eine Kombination aus SNS-032 und Gemcitabin ooder Irinotecan vielversprechende Ergebnisse liefern [73]. Auch für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie konnten Chemotherapie-senitivierende Effekte von SNS-032 gezeigt werden [70, 143]. Trotz guter Fortschritte in der allgemeinen Krebstherapie bleibt die Behandlung des PDAC nach wie vor eine Herausforderung für die moderne Medizin. Aufgrund des aggressiven Wachstums, der frühen metastatischen Aussaat und des späten Auftretens von Symptomen ist das PDAC eine Erkrankung mit schlechter Prognose für den Patienten. Zudem bleibt die Wirksamkeit der bisherigen Therapien wie z.B. Gemcitabin oder FOLFIRINOX hinter den hohen Ansprüchen zurück, die Aufgrund starker positiver Entwicklungen in den vergangenen Jahren an Krebsmedikamente gestellt werden. Auch muss bedacht werden, dass etablierte Chemotherapeutika oftmals auch gesunde Zellen angreifen und so dem Organismus häufig schaden. In den vergangenen Jahren gab es nur geringe Fortschritte in der Therapie des PDAC. Hier wird die Notwendigkeit neuer Therapieansätze deutlich. Es zeigt sich also, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für die weitere präklinische und klinische Forschung und Weiterentwicklung der CDK9-inhibierenden Therapie liefert. Die erhobenen Daten beweisen, dass es einen kombinierten Wirkmechanismus, bestehend aus Zellzyklusarrest und Apoptose-Induktion gibt, und dass dieser Wirkmechanismus zeitabhängig ist. Eine genauere molekulare Analyse der Wirkweise von CDK9 in PDAC muss in weiteren Studien erfolgen. Dass CDK9 in gut differenzierten PDAC einen negativen prognostischen Marker des Patientenüberlebens darstellt, konnte bereits in dieser Arbeit demonstriert werden. Ebenso wurde aufgezeigt, dass die pharmakologische Inhibierung von CDK9 einen vielversprechenden, neuen Ansatz in der bisher häufig frustranen Therapie von Pankreaskarzinomen darstellt.

5 Zusammenfassung

Mitglieder der Zyklin-dependent-Kinase (CDK)-Familie sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Da eine Dysregulation verschiedener CDKs zur Entstehung maligner Tumoren beitragen kann stellen sie interessante Zielmoleküle für eine zielgerichtete Inhibierungstherapie dar. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Zyklin-abhängigen Kinase 9 (CDK9) auf das duktale Pankreasadenkoarzinom (PDAC) untersucht; und überprüft, ob eine gezielte Hemmung einen möglichen neuen Therapieansatz darstellt.

Hierfür wurden Gewebeproben von 54 Patienten ausgewertet. Zunächst wurde das Normalgewebe dem Tumorgewebe hinsichtlich der CDK9 Expression gegenübergestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CDK9 im Tumorgewebe höher exprimiert wird als im Normalgewebe des Pankreas. Im Anschluss wurden die Tumorgewebeproben untereinander verglichen. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, um die Gewebeproben zu analysieren und einzuteilen; um diese anschließend miteinander vergleichen zu können. Es zeigte sich, dass die Expression von CDK9 in PDAC verschiedener Patienten sehr variabel ist. Eine hohe CDK9 Expression im Tumorgewebe korreliert mit einem niedrigen Patientenüberleben. Daher kann eine hohe CDK9 Expression als negativer prognostischer Marker für das Patientenüberleben genutzt werden. Außerdem wurde mittels Zellkulturversuchen gezeigt, dass eine spezifische Inhibierung von CDK9 mit Hilfe des Inhibitors SNS-032 in PDAC Zelllinien zu einer Abnahme der Zellviabilität führt. Dass diese Wirkung zeitabhängig ist konnte mittels Kristallviolett-Färbungen gezeigt werden. Eine genauere Analyse des Zellzyklus in Abhängigkeit von der Wirkzeit von SNS-032 ergab, dass es zunächst zum G2-Zellzyklusarrest kommt, bevor nach ca 48 Stunden eine Apoptose einsetzt.

Daher lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass CDK9 einen negativen prognostischen Marker für Patienten mit Pankreasadenokarzinomen darstellt. Zudem stellt die Inhibierung von CDK9 einen vielversprechenden neuen Therapieansatz im Kampf gegen diese noch immer oft tödlich verlaufende Erkrankung dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Abba MC., Sun H, Hawkins KA., Drake JA., Hu Y, Nunez MI., Gaddis S, Shi T, Horvath S, Sahin A, Aldaz CMarcelo: Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. Molecular cancer research, 5: 881–890 (2007)
2. Aklilu M, Kindler HL., Donehower RC., Mani S, Vokes EE.: Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. Annals of oncology, 14: 1270–1273 (2003)
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell, 53: 549–554 (1988)
4. Arnold MA., Goggins M: BRCA2 and predisposition to pancreatic and other cancers. Expert reviews in molecular medicine, 2001: 1–10 (2001)
5. Bagella L, MacLachlan TK., Buono RJ., Pisano MMichele, Giordano A, Luca A: Cloning of murine CDK9/PITALRE and its tissue-specific expression in development. Journal of Cellular Physiology, 177: 206–213 (1998)
6. Beger HG., Rau B, Gansauge F, Leder G, Schwarz M, Poch B: Bauchspeicheldrüsenkrebs–Heilungschancen minimal. Deutsches Arzteblatt, 105: 255–262 (2008)
7. Bellan C, Falco G, Lazzi S, Micheli P, Vicidomini S, Schürfeld K, Amato T, Palumbo A, Bagella L, Sabattini E, Bartolommei S, Hummel M, Pileri S, Tosi P, Leoncini L, Giordano A: CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation. The Journal of Pathology, 203: 946–952 (2004)
8. Bergsagel PLeif, Kuehl WMichael: Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. Journal of Clinical Oncology, 23: 6333–6338 (2005)
9. Biankin AV., Kench JG., Morey AL., Lee C-S, Biankin SA., Head DR., Hugh TB., Henshall SM., Sutherland RL.: Overexpression of p21^{WAF1/CIP1} is an Early Event in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. Cancer Research, 61: 8830 (2001)
10. Bible KC., Lensing JL., Nelson SA., Lee YK., Reid JM., Ames MM., Isham CR., Piens J, Rubin SL., Rubin J, Kaufmann SH., Atherton PJ., Sloan JA., Daiss MK., Adjei AA.,

Erlichman C: Phase 1 trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points. Clinical cancer research, 11: 5935–5941 (2005)

11. Birkmeyer JD., Stukel TA., Siewers AE., Goodney PP., Wennberg DE., Lucas FLee: Surgeon volume and operative mortality in the United States. The New England journal of medicine, 349: 2117–2127 (2003)
12. Blagosklonny MV.: Flavopiridol, an inhibitor of transcription: implications, problems and solutions. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 3: 1537–1542 (2004)
13. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K: Smokeless tobacco and cancer. The Lancet Oncology, 9: 667–675 (2008)
14. Boquoi A, Chen T, Enders GH.: Chemoprevention of mouse intestinal tumorigenesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.), 2: 800–806 (2009)
15. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT., Petersen G, Bracci PM., Ji BT., Negri E, Li D, Risch HA., Olson SH., Gallinger S, Miller AB., Bueno-de-Mesquita HB., Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA., Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR., Holly EA., Bertuccio P, Gao YT., Hassan M, Yu H, Kurtz RC., Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Duell EJ., Boffetta P, La Vecchia C: Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). Annals of oncology, 23: 1880–1888 (2012)
16. Brenner DR., Wozniak MB., Feyt C, Holcatova I, Janout V, Foretova L, Fabianova E, Shonova O, Martinek A, Ryska M, Adamcakova Z, Flaska E, Moskal A, Brennan P, Scelo G: Physical activity and risk of pancreatic cancer in a central European multicenter case-control study. Cancer causes & control, 25: 669–681 (2014)
17. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Hrsg): TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons, Inc, Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ (2017)
18. Bublil EM., Yarden Y: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. Current opinion in cell biology, 19: 124–134 (2007)
19. Burdette-Radoux S, Tozer RG., Lohmann RC., Quirt I, Ernst DScott, Walsh W, Wainman N, Colevas ADimitrios, Eisenhauer EA.: Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma. Investigational new drugs, 22: 315–322 (2004)

20. Burris H3rdA, Moore MJ., Andersen J, Green MR., Rothenberg ML., Modiano MR., Christine Cripps M, Portenoy RK., Storniolo AMaria, Tarassoff P: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. Journal of Clinical Oncology, 15: 2403–2413 (1997)
21. Byrd JC., Shinn C, Waselenko JK., Fuchs EJ., Lehman TA., Nguyen PL., Flinn IW., Diehl LF., Sausville E, Grever MR.: Flavopiridol Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Via Activation of Caspase-3 Without Evidence of bcl-2 Modulation or Dependence on Functional p53. Blood, 92: 3804–3816 (1998)
22. Canavese M, Santo L, Raje N: Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. Cancer biology & therapy, 13: 451–457 (2012)
23. Cao L, Chen F, Yang X, Xu W, Xie J, Yu L: Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. BMC evolutionary biology, 14: 10 (2014)
24. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH., Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E: Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The Journal of Pathology, 171: 83–98 (1993)
25. Chen R, Keating MJ., Gandhi V, Plunkett W: Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. Blood, 106: 2513–2519 (2005)
26. Chen R, Wierda WG., Chubb S, Hawtin RE., Fox JA., Keating MJ., Gandhi V, Plunkett W: Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 113: 4637–4645 (2009)
27. Cirillo D, Pentimalli F, Giordano A: Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors. Current medicinal chemistry, 18: 2854–2866 (2011)
28. Cohen P: The origins of protein phosphorylation. Nature cell biology, 4: E127-30 (2002)
29. Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, Gebbia V, Cartenì G, Massidda B, Dapretto E, Manzione L, Piazza E, Sannicolo M: Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. Journal of Clinical Oncology, 28: 1645–1651 (2010)

30. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, La Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J-B, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M: FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. The New England journal of medicine, 364: 1817–1825 (2011)
31. Conway WC., Bolton JS.: Surgical treatment of pancreatic cancer. The Journal of the Louisiana State Medical Society, 163: 107–113 (2011)
32. Cunningham D, Chau I, Stocken DD., Valle JW., Smith D, Steward W, Harper PG., Dunn J, Tudur-Smith C, West J: Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. Journal of Clinical Oncology, 27: 5513–5518 (2009)
33. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P: Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. Current genomics, 12: 15–24 (2011)
34. Di Pasca Magliano M, Biankin AV., Heiser PW., Cano DA., Gutierrez PJ. A., Deramaudt T, Segara D, Dawson AC., Kench JG., Henshall SM., Sutherland RL., Dlugosz A, Rustgi AK., Hebrok M: Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. PloS one, 2: e1155 (2007)
35. Diaz-Padilla I, Siu LL., Duran I: Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. Investigational new drugs, 27: 586–594 (2009)
36. Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, Funakoshi A, Wakasugi H, Asano T, Hishinuma S, Ogata Y, Sunamura M, Yamaguchi K, Tanaka M, Takao S, Aikou T, Hirata K, Maguchi H, Aiura K, Aoki T, Kakita A, Sasaki M, Ozaki M, Matsusue S, Higashide S, Noda H, Ikeda S, Maetani S, Yoshida S: Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. Surgery today, 38: 1021–1028 (2008)
37. Dunne RF., Hezel AF.: Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Hematology/oncology clinics of North America, 29: 595–608 (2015)
38. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DMaxwell, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, 136: E359-86 (2015)

39. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM., Forman D, Bray F: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base (2012)
40. Fu J, Yoon H-G, Qin J, Wong J: Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. Molecular and cellular biology, 27: 4641–4651 (2007)
41. Fu TJ., Peng J, Lee G, Price DH., Flores O: Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. The Journal of biological chemistry, 274: 34527–34530 (1999)
42. Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM., Wilentz RE., Yeo CJ., Hruban RH., Goggins M: Aberrant Methylation of Preproenkephalin and p16 Genes in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. The American Journal of Pathology, 160: 1573–1581 (2002)
43. Gallorini M, Cataldi A, Di Giacomo V: Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy. BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, 26: 377–391 (2012)
44. Garriga J, Graña X: Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. Gene, 337: 15–23 (2004)
45. George S, Kasimis BS., Cogswell J, Schwarzenberger P, Shapiro GI., Fidias P, Bukowski RM.: Phase I study of flavopiridol in combination with Paclitaxel and Carboplatin in patients with non-small-cell lung cancer. Clinical lung cancer, 9: 160–165 (2008)
46. Goggins M, Hruban RH., Kern SE.: BRCA2 Is Inactivated Late in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. The American Journal of Pathology, 156: 1767–1771 (2000)
47. Gordon V, Bhadel S, Wunderlich W, Zhang J, Ficarro SB., Mollah SA., Shabanowitz J, Hunt DF., Xenarios I, Hahn WC., Conaway M, Carey MF., Gioeli D: CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 24: 2267–2280 (2010)
48. Gore AJesse, Deitz SL., Palam LReddy, Craven KE., Korc M: Pancreatic cancer-associated retinoblastoma 1 dysfunction enables TGF-β to promote proliferation. The Journal of clinical investigation, 124: 338–352 (2014)
49. Graña X, Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP., Rosenblatt J, Morgan DO., Giordano A: PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the

retinoblastoma protein in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 3834–3838 (1994)

50. Guha M: Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. Nature reviews. Drug discovery, 11: 892–894 (2012)
51. Gullo L, Tomassetti P, Migliori M, Casadei R, Marrano D: Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis? Pancreas, 22: 210–213 (2001)
52. Haaland RE., Herrmann CH., Rice AP.: siRNA depletion of 7SK snRNA induces apoptosis but does not affect expression of the HIV-1 LTR or P-TEFb-dependent cellular genes. Journal of Cellular Physiology, 205: 463–470 (2005)
53. Hahn SA., Schutte M, Hoque AT., Moskaluk CA., da Costa LT., Rozenblum E, Weinstein CL., Fischer A, Yeo CJ., Hruban RH., Kern SE.: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science (New York, N.Y.), 271: 350–353 (1996)
54. Hall M, Peters G: Genetic Alterations of Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases, and Cdk Inhibitors in Human Cancer. In: . Advances in Cancer Research. Elsevier 1996, 67–108.
55. Hanahan D, Weinberg RA.: The Hallmarks of Cancer. Cell, 100: 57–70 (2000)
56. Hanahan D, Weinberg RA.: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646–674 (2011)
57. Hanks SK.: Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome biology, 4: 111 (2003)
58. Harbour J, Luo RX., Dei Santi A, Postigo AA., Dean DC.: Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1. Cell, 98: 859–869 (1999)
59. Harbour JW., Dean DC.: The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. Genes & development, 14: 2393–2409 (2000)
60. Heath EI., Bible K, Martell RE., Adelman DC., Lorusso PM.: A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. Investigational new drugs, 26: 59–65 (2008)
61. Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schuller J, Saletti P, Bauer J, Figer A, Pestalozzi B: Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the

Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. Journal of Clinical Oncology, 25: 2212–2217 (2007)

62. Hezel AF., Kimmelman AC., Stanger BZ., Bardeesy N, Depinho RA.: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes & development, 20: 1218–1249 (2006)
63. Hirose Y, Ohkuma Y: Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. Journal of biochemistry, 141: 601–608 (2007)
64. Hruban RH., Adsay NVolkan, Albores–Saavedra J, Compton C, Garrett ES., Goodman SN., Kern SE., Klimstra DS., Klöppel G, Longnecker DS., Lüttges J, Offerhaus GJohan A.: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. The American Journal of Surgical Pathology, 25 (2001)
65. Hruban RH., Goggins M, Parsons J, Kern SE.: Progression Model for Pancreatic Cancer. Clinical Cancer Research, 6: 2969 (2000)
66. Hruban RH., Maitra A, Schulick R, Laheru D, Herman J, Kern SE., Goggins M: Emerging Molecular Biology of Pancreatic Cancer. Gastrointestinal Cancer Research, 2: S10-5 (2008)
67. Hunt KK., Keyomarsi K: Cyclin E as a prognostic and predictive marker in breast cancer. Seminars in cancer biology, 15: 319–326 (2005)
68. Kitada S, Zapata JM., Andreeff M, Reed JC.: Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood, 96: 393–397 (2000)
69. Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Büchler MW., Lander AD., Korc M: The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. The Journal of clinical investigation, 102: 1662–1673 (1998)
70. Kodym E, Kodym R, Reis AE., Habib AA., Story MD., Saha D: The small-molecule CDK inhibitor, SNS-032, enhances cellular radiosensitivity in quiescent and hypoxic non-small cell lung cancer cells. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 66: 37–47 (2009)
71. Korc M: Role of Growth Factors in Pancreatic Cancer. Surgical Oncology Clinics of North America, 7: 25–41 (1998)

72. Koumenis C, Giaccia A: Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. Molecular and cellular biology, 17: 7306–7316 (1997)
73. Kretz A-L, Schaum M, Richter J, Kitzig EF., Engler CC., Leithäuser F, Henne-Bruns D, Knippschild U, Lemke J: CDK9 is a prognostic marker and therapeutic target in pancreatic cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 39: 1010428317694304 (2017)
74. Laghi L, Orbetegli O, Bianchi P, Zerbi A, Di Carlo V, Boland CRichard, Malesci A: Common occurrence of multiple K-RAS mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. Oncogene, 21: 4301–4306 (2002)
75. Lapenna S, Giordano A: Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. Nature reviews. Drug discovery, 8: 547–566 (2009)
76. Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ., Shokat KM., Bentley DL., Fisher RP.: Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. Nature structural & molecular biology, 19: 1108–1115 (2012)
77. Lee DK., Duan HO., Chang C: Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. The Journal of biological chemistry, 276: 9978–9984 (2001)
78. Lemke J, Barth TF. E., Juchems M, Kapapa T, Henne-Bruns D, Kornmann M: Long-term survival following resection of brain metastases from pancreatic cancer. Anticancer research, 31: 4599–4603 (2011)
79. Lemke J, Karstedt S, Abd El Hay M, Conti A, Arce F, Montinaro A, Papenfuss K, El-Bahrawy MA., Walczak H: Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. Cell death and differentiation, 21: 491–502 (2014)
80. Li Q, Price JP., Byers SA., Cheng D, Peng J, Price DH.: Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. The Journal of biological chemistry, 280: 28819–28826 (2005)

81. Lin X, Taube R, Fujinaga K, Peterlin BMatija: P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA. The Journal of biological chemistry, 277: 16873–16878 (2002)
82. Liu G, Gandara DR., Lara PN., Raghavan D, Doroshow JH., Twardowski P, Kantoff P, Oh W, Kim K, Wilding G: A Phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. Clinical cancer research, 10: 924–928 (2004)
83. Liu H, Herrmann CH.: Differential localization and expression of the Cdk9 42k and 55k isoforms. Journal of cellular physiology, 203: 251–260 (2005)
84. Liu J, Kipreos ET.: Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. Molecular biology and evolution, 17: 1061–1074 (2000)
85. Liu X, Shi S, Lam F, Pepper C, Fischer PM., Wang S: CDKI-71, a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cells compared to flavopiridol. International journal of cancer, 130: 1216–1226 (2012)
86. Liu Y, Kung C, Fishburn J, Ansari AZ., Shokat KM., Hahn S: Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. Molecular and cellular biology, 24: 1721–1735 (2004)
87. Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM., Bracci PM., Ji BT., Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB., Bueno-de-Mesquita HB., Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA., Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR., Holly EA., Gao YT., Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P, Duell EJ.: Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). Annals of oncology, 23: 374–382 (2012)
88. Luo J, Guo P, Matsuda K, Truong N, Lee A, Chun C, Cheng SY., Korc M: Pancreatic cancer cell-derived vascular endothelial growth factor is biologically active in vitro and enhances tumorigenicity in vivo. International journal of cancer, 92: 361–369 (2001)
89. Lüttges J, Galehdari H, Bröcker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Klöppel G, Schmiegel W, Hahn SA.: Allelic Loss Is Often the First Hit in the Biallelic Inactivation of the p53 and DPC4 Genes During Pancreatic Carcinogenesis. The American Journal of Pathology, 158: 1677–1683 (2001)

90. Lüttges J, Klöppel G: Update on the pathology and genetics of exocrine pancreatic tumors with ductal phenotype: precursor lesions and new tumor entities. Digestive diseases (Basel, Switzerland), 19: 15–23 (2001)
91. Ma Z, Wu Y, Jin J, Yan J, Kuang S, Zhou M, Zhang Y, Guo A-Y: Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. Molecular phylogenetics and evolution, 66: 1002–1010 (2013)
92. Malumbres M, Barbacid M: To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nature reviews. Cancer, 1: 222–231 (2001)
93. Manning G, Whyte DB., Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: The protein kinase complement of the human genome. Science (New York, N.Y.), 298: 1912–1934 (2002)
94. Marshall NF., Peng J, Xie Z, Price DH.: Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. The Journal of biological chemistry, 271: 27176–27183 (1996)
95. Matsushita A, Götze T, Korc M: Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. Cancer Research, 67: 10309–10316 (2007)
96. Mayo SC., Gilson MM., Herman JM., Cameron JL., Nathan H, Edil BH., Choti MA., Schulick RD., Wolfgang CL., Pawlik TM.: Management of patients with pancreatic adenocarcinoma: national trends in patient selection, operative management, and use of adjuvant therapy. Journal of the American College of Surgeons, 214: 33–45 (2012)
97. McCarthy DM., Brat DJ., Wilentz RE., Yeo CJ., Cameron JL., Kern SE., Hruban RH.: Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling. Human pathology, 32: 638–642 (2001)
98. Moiola C, Luca P, Gardner K, Vazquez E, Siervi A: Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 9: 3119–3126 (2010)
99. Moore MJ., Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR., Gallinger S, Au HJ., Murawa P, Walde D, Wolff RA.: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer

Institute of Canada Clinical Trials Group. Journal of Clinical Oncology, 25: 1960–1966 (2007)

100. Motokura T, Bloom T, Kim HG., Jüppner H, Ruderman JV., Kronenberg HM., Arnold A: A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. Nature, 350: 512–515 (1991)

101. Müller-Tidow C, Metzger R, Kügler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, Dockhorn-Dworniczak B, Schneider PM., Koeffler HPhillip, Berdel WE.: Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. Cancer Research, 61: 647–653 (2001)

102. Napolitano G, Majello B, Licciardo P, Giordano A, Lania L: Transcriptional activity of positive transcription elongation factor b kinase in vivo requires the C-terminal domain of RNA polymerase II. Gene, 254: 139–145 (2000)

103. Neoptolemos JP., Stocken DD., Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ., Gallinger S, Mariette C, Wente MN., Izbicki JR., Friess H, Lerch MM., Dervenis C, Oláh A, Butturini G, Doi R, Lind PA., Smith D, Valle JW., Palmer DH., Buckels JA., Thompson J, McKay CJ., Rawcliffe CL., Büchler MW.: Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. Journal of the American Medical Association, 304: 1073–1081 (2010)

104. Neoptolemos JP., Stocken DD., Friess H, Bassi C, Dunn JA., Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ., Büchler MW.: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. The New England journal of medicine, 350: 1200–1210 (2004)

105. Nuwayhid S, Stockett D, Hyde J, Aleshin A, Walker DH, Arkin MR (Hrsg): SNS-032 is a potent and selective inhibitor of Cdk2, 7 and 9 and induces cell death by inhibiting cell cycle progression and the expression of antiapoptotic proteins, 47 (2006)

106. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein W-O, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing

curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. Journal of the American Medical Association, 297: 267–277 (2007)

107. Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JLuis, Malumbres M, Barbacid M: Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. Nature genetics, 35: 25–31 (2003)

108. Pardee AB.: G1 events and regulation of cell proliferation. Science (New York, N.Y.), 246: 603–608 (1989)

109. Parkin DM.: 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. British journal of cancer, 105 Suppl 2: S6-S13 (2011)

110. Peng J, Marshall NF., Price DH.: Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. The Journal of biological chemistry, 273: 13855–13860 (1998)

111. Peng J, Zhu Y, Milton JT., Price DH.: Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. Genes & development, 12: 755–762 (1998)

112. Peterlin BMatija, Price DH.: Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. Molecular cell, 23: 297–305 (2006)

113. Philip PA., Benedetti J, Corless CL., Wong R, O'Reilly EM., Flynn PJ., Rowland KM., Atkins JN., Mirtsching BC., Rivkin SE., Khorana AA., Goldman B, Fenoglio-Preiser CM., Abbruzzese JL., Blanke CD.: Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. Journal of Clinical Oncology, 28: 3605–3610 (2010)

114. Phillips AC., Vousden KH.: E2F-1 induced apoptosis. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 6: 173–182 (2001)

115. Pierantoni C, Pagliacci A, Scartozzi M, Berardi R, Bianconi M, Cascinu S: Pancreatic cancer: progress in cancer therapy. Critical reviews in oncology/hematology, 67: 27–38 (2008)

116. Pileri SA., Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PPaolo, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B: Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. The Journal of Pathology, 183: 116–123 (1997)

117. Pines J: The cell cycle kinases. Seminars in cancer biology, 5: 305–313 (1994)

118. Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML., Hochster H, Mitchell E, Alberts S, O'Dwyer P, Haller D, Catalano P, Cella D, Benson ABowen: Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. Journal of Clinical Oncology, 27: 3778–3785 (2009)

119. Preis M, Korc M: Signaling pathways in pancreatic cancer. Critical reviews in eukaryotic gene expression, 21: 115–129 (2011)

120. Romano G, Kasten M, Falco G, Micheli P, Khalili K, Giordano A: Regulatory functions of Cdk9 and of cyclin T1 in HIV Tat transactivation pathway gene expression. Journal of Cellular Biochemistry, 75: 357–368 (1999)

121. Rosato V, Polesel J, Bosetti C, Serraino D, Negri E, La Vecchia C: Population attributable risk for pancreatic cancer in Northern Italy. Pancreas, 44: 216–220 (2015)

122. Schwartz GK., Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, Werner J, Perkins P, Stoltz M, Kelsen D: Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. Journal of Clinical Oncology, 19: 1985–1992 (2001)

123. Schwartz GK., Shah MA.: Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. Journal of Clinical Oncology, 23: 9408–9421 (2005)

124. Shah MA., Kortmansky J, Motwani M, Drobnjak M, Gonen M, Yi S, Weyerbacher A, Cordon-Cardo C, Lefkowitz R, Brenner B, O'Reilly E, Saltz L, Tong W, Kelsen DP., Schwartz GK.: A phase I clinical trial of the sequential combination of irinotecan followed by flavopiridol. Clinical cancer research, 11: 3836–3845 (2005)

125. Shapiro GI.: Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. Journal of Clinical Oncology, 24: 1770–1783 (2006)

126. Shapiro GI., Supko JG., Patterson A, Lynch C, Lucca J, Zacarola PF., Muzikansky A, Wright JJ., Lynch TJ., Rollins BJ.: A phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. Clinical Cancer Research, 7: 1590–1599 (2001)

127. Sherr CJ., Roberts JM.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes & development, 13: 1501–1512 (1999)

128. Shi Q, Le X, Abbruzzese JL., Peng Z, Qian C-N, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li X-C, Xie K: Constitutive Sp1 Activity Is Essential for Differential Constitutive Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Pancreatic Adenocarcinoma. Cancer Research, 61: 4143 (2001)

129. Shi SR., Key ME., Kalra KL.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. The journal of histochemistry and cytochemistry, 39: 741–748 (1991)

130. Shore SM., Byers SA., Dent P, Price DH.: Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms. Gene, 350: 51–58 (2005)

131. Shore SM., Byers SA., Maury W, Price DH.: Identification of a novel isoform of Cdk9. Gene, 307: 175–182 (2003)

132. Siegel RL., Miller KD., Jemal A: Cancer Statistics, 2017. CA: a cancer journal for clinicians, 67: 7–30 (2017)

133. Simone C, Giordano A: Abrogation of signal-dependent activation of the cdk9/cyclin T2a complex in human RD rhabdomyosarcoma cells. Cell death and differentiation, 14: 192–195 (2007)

134. Simone C, Stiegler P, Bagella L, Pucci B, Bellan C, Falco G, Luca A, Guanti G, Puri PLorenzo, Giordano A: Activation of MyoD-dependent transcription by cdk9/cyclin T2. Oncogene, 21: 4137–4148 (2002)

135. Sultana A, Smith CTudur, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP., Ghaneh P: Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. Journal of Clinical Oncology, 25: 2607–2615 (2007)

136. Tanizaki J, Okamoto I, Sakai K, Nakagawa K: Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. British journal of cancer, 105: 807–813 (2011)

137. Tassan JP., Jaquenoud M, Léopold P, Schultz SJ., Nigg EA.: Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 8871–8875 (1995)

138. Tetsu O, McCormick F: Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. Cancer Cell, 3: 233–245 (2003)

139. Tong W-G, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey RDonald, Badros AZ., Popplewell L, Coutre S, Fox JA., Mahadocon K, Chen T, Kegley P, Hoch U, Wierda WG.: Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. Journal of Clinical Oncology, 28: 3015–3022 (2010)

140. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C: Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. International journal of cancer, 126: 1474–1486 (2010)

141. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, Doi R, Monden M, Hatori T, Tanaka M, Shimada M, Kanemitsu K: A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. British journal of cancer, 101: 908–915 (2009)

142. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA., Friess H, Büchler MW.: Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. The British journal of surgery, 91: 586–594 (2004)

143. Walsby E, Lazenby M, Pepper C, Burnett AK.: The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine. Leukemia, 25: 411–419 (2011)

144. Wang S, Fischer PM.: Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. Trends in pharmacological sciences, 29: 302–313 (2008)

145. Watanabe N, Tsuji N, Kobayashi D, Yamauchi N, Akiyama S, Sasaki H, Sato T, Okamoto T, Niitsu Y: Endogenous tumor necrosis factor functions as a resistant factor against hyperthermic cytotoxicity in pancreatic carcinoma cells via enhancement of the heart shock element-binding activity of heart shock factor 1. Chemotherapy, 43: 406–414 (1997)

146. Weinberg RA.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 81: 323–330 (1995)

147. Whiteman DC., Webb PM., Green AC., Neale RE., Fritschi L, Bain CJ., Parkin DMax, Wilson LF., Olsen CM., Nagle CM., Pandeya N, Jordan SJ., Antonsson A, Kendall BJ., Hughes MCelia B., Ibiebele TI., Miura K, Peters S, Carey RN.: Cancers in Australia in

2010 attributable to modifiable factors: introduction and overview. Australian and New Zealand journal of public health, 39: 403–407 (2015)

148. Xie G, Tang H, Wu S, Chen J, Liu J, Liao C: The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 induces apoptosis in breast cancer cells via depletion of Mcl-1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein and displays antitumor activity in vivo. International journal of oncology, 45: 804–812 (2014)

149. Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG., Uchida E, Onda M, Kobrin MS., Korc M: Overexpression of Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors in Human Pancreatic Cancer Correlates with Advanced Tumor Stage. Cancer Research, 53: 5289 (1993)

150. Yu Q, Geng Y, Sicinski P: Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. Nature, 411: 1017–1021 (2001)

151. Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M: Molecular biology of pancreatic cancer. World journal of gastroenterology, 17: 2897–2908 (2011)

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: **Modell für die stufenweise Entwicklung von PDAC** 2

Abbildung 2: **Schematische Darstellung der RNA Elongation durch die RNA Pol II während der Proteinbiosynthese.** 9

Abbildung 3: **Neubauer-Zählkammer als Methode zur Bestimmung der Zellzahl in Zelllösungen** 31

Abbildung 4: **Schematische Darstellung des MTT-Versuchsaufbaus mittls 96-Loch Platte.** 35

Abbildung 5: **Schematische Darstellung des Zellzyklus in eurkaryontischen Zellen.** 36

Abbildung 6: **Exemplarische Darstellung verschiedener CDK9-Färbeintensitäten nach immunhistochemischer Anfärbung.** 42

Abbildung 7: **Exemplarische Darstellung eines auszuwertenden Gewebeschnittes nach immunhistochemischer Färbung mit Zielantigen CDK9 und blauer Gegenfärbung.....** 43

Abbildung 8: **Gegenüberstellung von Pankreaskarzinomgewebe und Normalgewebe desselben Patienten** 44

Abbildung 9: **Vergleich der CDK9-Expression in Pankreasnormalgewebe mit -tumorgewebe** 44

Abbildung 10: **Kaplan-Meier Kurve des Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs über die Zeit** 47

Abbildung 11: **Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Patienten über die Zeit, in Abhängigkeit von der CDK9 Expression im Tumorgewebe** 48

Abbildung 12: **Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von Patienten mit gut (links) oder schlecht (rechts) differenzierten Tumoren über die Zeit, in Abhängigkeit von der CDK9 Expression im Tumorgewebe** 48

Abbildung 13: **Westernblotanalyse von RNA Pol II total, RNA Pol II pSer2, CDK9 und β-Actin in drei PDAC-Zelllinien (BxPC3, Colo357, Panc89).** 49

Abbildung 14: **Westernblot Analyse von SNS-032 behandelten Panc89 Zellen** 50

Abbildung 15: **Abnahme der Zellviabilität in Prozent (%) durch unterschiedlich lange Behandlung (in Stunden (h)) der Zellen mit SNS-032 in konstanter Konzentration von 300nM.** 51
Abbildung 16: **Kristallviolett-Färbung von Panc89 Zellen nach Behandlung mit SNS-032 über 24-72 Stunden** 52
Abbildung 17: **Graphische Darstellung der FACS-Scan-Analysen der Inhibitorbehandlung von Panc89-Zellen mit 300nM SNS-032 über 0-72 Stunden** 54

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: **Verwendete Zelllinien** 19

Tabelle 2: **Tabellarische Darstellung aller verwendeten primären Antikörper.** 20

Tabelle 3: **Tabellarische Darstellung aller verwendeten sekundären Antikörper.** 21

Tabelle 4: **Tabellarische Darstellung des vewendeten Inbibitors** 22

Tabelle 5: **Einbetungsprotokoll des Autotechnikons** 25

Tabelle 6: **Aufbau des Blotting-Sandwiches** 32

Tabelle 7: **Darstellung des Patientenkollektivs dieser Arbeit** 40

Tabelle 8: **Darstellung des Gesamtkollektivs nach Unterteilung in high- und low-Score Gruppe** 45

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns dafür, dass ich in ihrer Abteilung diese Arbeit anfertigen durfte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johannes Lemke, der mir diese Dissertation durch die Themenbereitstellung ermöglicht hat. Vielen Dank für die gute Betreuung, die Motivation und die Unterstützung!

Herrn PD Dr. med. Frank Leithäuser gilt mein Dank für die Hilfe bei der Bewertung der Präparate.

Vielen herzlichen Dank auch an Anna-Laura Kretz, Julia Richter, Ella Kitzig und Sandra Schneider sowie Christine Engler für die Gemeinschaft, den Zusammenhalt, die Hilfe bei allen fachlichen Fragen und den moralischen Beistand.

Bei Nadine Süßner möchte ich mich für die kleinen und großen Hilfen bei allen alltäglichen und außergewöhnlichen Arbeiten im Labor bedanken, auch für die Anfertigung der Gewebeschnittte!

Insbesondere möchte ich mich hier auch bei meiner Familie und meinen Feunden bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen, meinen Brüdern für die Motivation diese Arbeit zu beenden und meinem Mann, der immer für mich da ist, wenn ich ihn wirklich brauche.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Monika Martina Schaum
Geburtsjahr:	1990
Geburtsort:	Worms

Schulbildung

09/1997 – 06/2001	Grundschule
08/2001 – 03/2010	Gymnasium Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

10/2010	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm
09/2012	1. Ärztliche Prüfung
seit 2014	Anfertigung einer experimentellen, medizinischen Promotion in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Uniklinik Ulm
10/2015	2. Ärztliche Prüfung
05/16 – 05/17	Praktisches Jahr
05/2017	Approbation zur Ärztin
Seit 07/2017	Assistenzärztin