Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki

„Die in-vitro-Zytostase von Adenokarzinomzellen des Ösophagus durch KAAD-Cyclopamine und sant-1.“

PROMOTION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Tobias Romen
aus Würzburg

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 14.11.2008
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. E. F. Yekebas
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. H.-E. Laack
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. U. Schumacher

MEINEN ELTERN
GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1. Ziel der Arbeit 1
1.2. Refluxkrankheit und Barrett-Schleimhaut 2
1.3. Ösophaguskarzinom 5
1.3.1. Histologische Typen 5
1.3.2. Epidemiologie 6
1.3.3. Formelle Pathogenese des Adenokarzinoms 7
1.3.4. Kausale Pathogenese (Ätiologie) 7
1.3.5. Molekularbiologische Aspekte 8
1.3.6. Patientencharakteristik 10
1.3.7. Chirurgische Intervention 12
1.3.8. Endoskopische Resektion 13
1.3.9. Perkutane Strahlentherapie und Radiotherapie 13
1.3.10. Brachytherapie 14
1.3.11. Neoadjuvante Chemotherapie 14
1.3.12. Neoadjuvante Strahlentherapie 14
1.3.13. Palliative Therapieverfahren 15
1.4. Zytostatika 15
1.4.14. Schädigung der DNS 16
1.4.15. Schädigung der Mitosespindel 16
1.4.16. Zytostatische Antibiotika 16
1.4.17. Hemmung der Bausteinsynthese 17
1.4.18. Einschleusung falscher Bausteine 17
1.4.19. Gezielte antineoplastische Wirkprinzipien 17
1.5. Cyclopamine 18
1.5.20. Wirkungsweise KAAD-Cyclopamine und sant-1 20
1.6. Hedgehog-Signalwege 20
1.6.21. Signalweg-Rezeptoren 22
1.6.22. Signalweg-Komponenten 22
1.6.23. Zielstrukturen der Signalwege 23
1.6.24. Vorkommen und Funktionen des Signalweges 24

2. MATERIAL UND METHODEN 26

2.1. Tumorzellen 26
2.1.25. Zelllinien 26
2.1.26. Zellkultur 26
2.1.27. Medium 27
2.1.28. Zellanzucht 28
2.1.29. Splitten 28
2.1.30. Einfrieren 29
2.1.31. Auftauen 29
2.2. Zellversuchsansatz 30
2.2.32. Durchführung 30
2.2.33. Messung 34
2.2.34. Messprinzip 34
2.2.35. Messdurchführung 35
2.3. Durchflusszytometrie 36

2.3.36. Durchführung 37
2.3.37. Messung am FACS-Gerät 38
2.4. MACS 40
2.4.38. Durchführung 41

ARBEITSMITTEL 44

2.5. Chemikalien 44
2.6. Geräte 45
2.7. Hard- und Software 45
2.8. Verbrauchsmaterialien 46

3. ERGEBNISSE 47

3.1. Primärtumor Barrett-Karzinom PT1590 47
3.2. Lymphknotenmetastase LN1590 55
3.3. Tumorstammzelllinie Barrett-Karzinom PT1590 61
3.4. Nichtstammzellen Barrett-Karzinom PT1590 64
3.5. Tumorstammzelllinie Lymphknotenmetastase LN1590 65
3.6. Nichtstammzellen Lymphknotenmetastase LN1590 68
3.7. FACS-Ergebnisse 70
3.7.39. Barrett-Karzinom PT1590 cd133 positive Zellen 71
3.7.40. Lymphknotenmetastase LN1590 cd133 positiven Zellen 72
3.7.41. Barrett-Karzinom PT und Lymphknotenmetastase LN1590 cd133 positive Zellen 72

4. DISKUSSION 73

4.1. Barrett-Karzinom-Zellen (Primärtumor und Metastase) 73
4.1.42. KAAD-Cyclopamine- und sant-1-Zytostase 73
4.1.43. Cyclopamine-Wirkung bei anderen Tumoren 74
4.1.44. Zytostase chemisch verwandter Substanzen zu sant-1 bei anderen Tumoren 75
4.1.45. Angriffspunkt KAAD-Cyclopamine und sant-1 am Signalweg 76
4.1.46. Negativkontrollsubstanz Tomatidine 77
4.1.47. Wirkung des Proliferationsaktivators Shh-peptid 78
4.2. Tumorstammzellen 79

5. AUSBLICK 86

5.1. Helicobacter pylori 86

6. ZUSAMMENFASSUNG 93

7. DANKSAGUNG 94

8. LEBENSLAUF 95

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 96

10. LITERATURVERZEICHNIS 98

1. EINLEITUNG

1.1. Ziel der Arbeit

Bei der medikamentösen Behandlung bösartiger Tumoren kann man heute auf ein breites Spektrum von Zytostatika zurückgreifen. Sie setzen – wie noch später ausführlich erläutert werden wird, an verschiedenen Stellen des Stoffwechsels der Tumorzellen oder an ihrem Teilungsprozess an. Dadurch ist man heute in der Lage, viele, vor allem Geschwulste des Kindesalters völlig zu heilen oder zumindest in ihrem Wachstum erfolgreich zu bremsen. Gleichzeitig hat man die medikamentösen Nebenwirkungen immer besser in den Griff bekommen.

Trotz dieser für den Krebspatienten erfreulichen Entwicklung gibt es weiterhin einige Tumoren, die auf die heute zugelassenen Zytostatika schlecht oder gar nicht ansprechen. Dazu gehören unter anderem die kolorektalen Tumoren und das Ösophaguskarzinom. So ist es verständlich, dass man nach neuen Stoffklassen und Medikamenten sucht, um die Chemotherapie auch bei den bis jetzt resistenten Tumoren erfolgreich zu gestalten.

Mehr durch Zufall stießen Binns und Mitarbeiter auf eine Substanz, das Cyclopamine, das Missbildungen erzeugt und zugleich so in den Stoffwechsel von Säugern eingreift, dass ihr Wachstum zum Erliegen kommt.
Wir haben uns die Frage gestellt, ob diese Substanz nicht auch bei der Chemotherapie eingesetzt werden kann. Im ersten Schritt dahin wurden in-vitro-Versuche mit humanen Zellen eines Speiseröhrenkarzinoms durchgeführt. Die Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt werden. Zuvor wird zum besseren Verständnis auf die Ätiologie und Pathogenese des Ösophaguskarzinoms eingegangen und die Substanz Cyclopamine sowie ihr Wirkmechanismus im Zellstoffwechsel erläutert.

1.2. Refluxkrankheit und Barrett-Schleimhaut (Seitz 1999)

Bei der Suche nach einer Erklärung, wie Karzinome der Speiseröhre entstehen können, hat man an die Zusammensetzung der verschiedenen Speisen gedacht und auch zu heißes oder scharf gewürztes Essen angeschuldigt. In den letzten Jahren sind das Sodbrennen und speziell die Refluxkrankheit immer mehr in die ätiologischen Überlegungen miteinbezogen worden.

Sodbrennen ist so alt wie die Menschheit. Erst im letzten Jahrhundert wurde dieses Symptom als Teil der Refluxkrankheit und zwar als ihr Leitsymptom begriffen.

Schon Paracelsus stellte 1531 fest, dass das Sodbrennen („sodbrenen“) Ursache allerlei „Torturen“ ist. Glaubte er noch an ein Aufsteigen „des Dampfes der Speisen im Magen“ mit Bildung eines „Tartarus“ (Konkrement) als Ursache, wissen wir heute, dass der Säurereflux, insbesondere der Magensäure, eine bedeutende Ursache des Sodbrennens ist.

Man könnte sie sogar schon als „Volkskrankheit“ bezeichnen, denn etwa 20 Prozent der Bevölkerung klagt mindestens einmal pro Woche über auftretende Refluxbeschwerden. Obwohl das Sodbrennen so weit verbreitet ist, wird sie von Ärzten wie Patienten oftmals als „harmlose Befindlichkeitsstörung“ gesehen und deshalb häufig nicht suffizient diagnostiziert und therapiert.

Um ein physiologisches Geschehen handelt es sich bei einem temporären geringen Reflux von Mageninhalt in den Ösophagus. Ein pathologischer Reflux wird diagnostiziert, wenn in aufrechter Position ein verlängerter Kontakt von Refluxflüssigkeit in der unteren Speiseröhre mit einem pH-Wert unter vier gemessen wird. Der Zeitraum muss länger als sechs Prozent der 24stündigen Langzeit pH-Metrie betragen (Jamieson et al. 1992).

Dabei steht der Grad der Beschwerden nicht in Korrelation mit dem Schweregrad der Schleimhaut-Nekrosen und damit nicht mit dem Ausmaß der Reflux-Ösophagitis. Diese Entzündung der Ösophagusschleimhaut entsteht durch Einwirkung von Magen- oder Duodenalsaft und wird nach endoskopischen Kriterien (z.B. Savary-Miller Klassifikation, MUSE Klassifikation) eingeteilt.

Durch den Säurereflux kommt es zu einer Schädigung des empfindlichen mehrschichtigen Plattenepithels, die man bei entsprechender Ausdehnung (z.B. Erosion oder Ulzeration) endoskopisch feststellen kann.

Der überwiegende Teil an Sodbrennen leidenden Patienten (80-85 Prozent) hat allerdings einen Reflux ohne das Bild einer Reflux-Ösophagitis mit entsprechenden Schleimhautläsionen.

Schon in den 70er Jahren haben Ismail-Beigi und Mitarbeiter histologische Kriterien zur Diagnose einer Reflux-Ösophagitis und insbesondere ihren frühen, histologischen erfassbaren Stadien erarbeitet (so genannte hyperregeneratorische Ösophagopathie) (Ismail-Beigi et al. 1970; Ismail-Beigi u. Pope 1974).

Eine sehr wichtige und häufige Komplikation der Refluxkrankheit ist der Barrett-Ösophagus, der inzwischen als präkanzeröse Kondition definiert wurde.

Abb. 1: Barrettösophagus (endoskopische Aufnahme)

Keine Veränderung hat seit ihrer Erstbeschreibung von Norman Rupert Barrett vor einem halben Jahrhundert (Barrett 1950) einen derart häufigen Definitionswechsel erfahren.

Sah Barrett bei seiner Erstbeschreibung die Ursache in einer kongenitalen Verkürzung der Ösophagusschleimhaut, so ließ er sich wenige Jahre später davon überzeugen, dass es sich um eine erworbene Läsion mit „zylinderepithelialer Auskleidung des unteren Ösophagus“ (CELLO = columnar cell lined lower oesophagus) handelte (Barrett 1957).

1976 konnten Paull und Mitarbeiter durch systematische Untersuchungen zeigen, dass es drei unterschiedliche histologische Formen der Barrett-Schleimhaut gibt: neben einem Cardia- und einem Fundustyp sahen sie eine dritte Form mit „spezialisiertem Zylinderepithel“. Des Weiteren konnten sie eine zonale Schichtung der drei Barrett-Schleimhauttypen nachweisen, wobei der Fundustyp vorzugsweise aboral, der Cardiatyp medial und der Typ mit

„spezialisiertem Zylinderepithel“ am weitesten oral gelegen war (Paull et al. 1976).

Ebenfalls in den 70er Jahren zeigten Arbeitsgruppen, dass beim Barrett-Ösophagus ein erhöhtes Risiko für ein ösophageales Karzinom besteht (Hawe et al. 1973; Haggitt et al. 1978).

Reid und Westenstein bewiesen, dass die maligne Transformation nur bei Fällen mit „spezialisiertem Zylinderepithel“ auftritt (Reid u. Weinstein 1987). Diese Form wird heute aufgrund des erhöhten Karzinomrisikos als Barrett-Schleimhaut im engeren Sinne definiert, was mittlerweile allgemein anerkannt ist.

Als Ausgangspunkt des Zylinderepithels wurde lange an ein simples „Hochwachsen“ der Magenschleimhaut gedacht. Auch die ösophagealen Schleimdrüsen sah man als einen solchen Anfangspunkt an.

Heute wird die Theorie einer Metaplasie des Plattenepithels favorisiert. Beruhend auf der Stammzelltheorie konnte sie anhand verschiedener Antikörper gegen einzelne Zytokeratin-Subtypen wahrscheinlich gemacht werden (Salo et al. 1996; Boch et al. 1997) und durch DNA-Analysen erhärtet werden (Seitz 1999).

1.3. Ösophaguskarzinom

Refluxkrankheit und Barrett-Schleimhaut sind heute als prädisponierende Faktoren des Speiseröhrenkrebses anerkannt. Zum besseren Verständnis der vorlegenden Versuche erscheint es angebracht, auf diesen Krebs etwas näher einzugehen, da er in zwei Varianten auftritt. Nur eine davon diente als Ausgangspunkt für unsere Versuche.

1.3.1. Histologische Typen (Watanabe et al. 1998)

Der Ösophagus ist bekanntlich von einem nicht verhornenden, mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Nach neoplastischer Transformation entstehen - von Raritäten einmal abgesehen - deshalb in der Regel Plattenepithelkarzinome.

Im distalen Ösophagus treten auch Adenokarzinome auf. Lange hielt man sie für Ausläufer eines Kardiakarzinoms. Seit 1950 (Barrett 1950) weiß man, dass die Barrett-Schleimhaut der Vorläufer für Adenokarzinome ist, die im folgenden Barrett-Karzinome genannt werden. Sie haben zyto- und histologisch große Ähnlichkeit mit einem glandulären Kardiakarzinom.

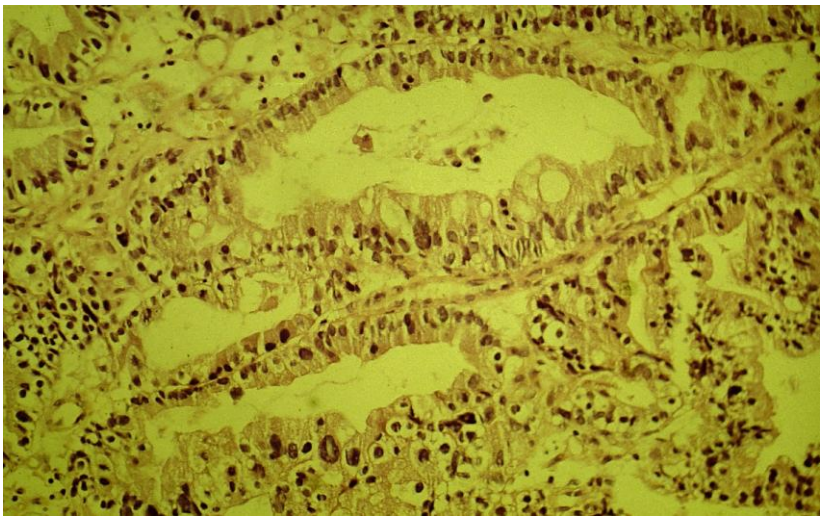


Abb. 2: Adenokarzinom vom Barrett-Typ im distalen Ösophagus (HE, 1:200)

1.3.2. Epidemiologie

(Bollschweiler u. Hölscher 2004)

Das Ösophaguskarzinom zählt mit einer Inzidenz von 300.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den zehn häufigsten Tumoren. Besonders häufig tritt es in Entwicklungsländer auf (Parkin et al. 1997). Während die Zahl der Neuerkrankungen der Plattenepithelkarzinomvariante überall sinkt oder stagniert, ist sie beim Barrett-Karzinom vor allem in den westlichen Industrienationen seit 1990 steil angestiegen. Das liegt sicherlich nicht nur an den verbesserten Diagnoseverfahren und dem gewandeltem Verständnis für Adenokarzinome im distalen Ösophagus.

Das Karzinom betrifft vorwiegend Männer. Die Morbidität liegt in den USA mit 4,5 Neuerkrankungen pro 100.000 männliche Einwohner deutlich über der der Frauen (1,25 Neuerkrankungen pro 100.000 weibliche Einwohner). Nach dem SEER-Report (Surviellance, Epidemiology and End Result) stieg in den USA die Inzidenz des Adenokarzinoms bei der männlichen Bevölkerung von 1975 bis 1997 jährlich um etwa 20 Prozent an. Auch das Saarländische Krebsregister weist für Deutschland einen signifikanten Anstieg beider Karzinomformen der Speiseröhre aus. In dieser Region stieg das Barrett-Karzinom seit 1985 um zehn Prozent pro Jahr steil an (Bollschweiler et al. 2000)

Die auf die Weltbevölkerung bezogene altersstandardisierte Inzidenzrate des Ösophaguskarzinoms beträgt für Männer 6,8 und für Frauen 0,84 pro 100.000 Einwohner (Bollschweiler et al. 2001).

Die Epidemiologie des Adenokarzinoms des Ösophagus lässt sich leicht mit der so genannten „Zehner-Regel“ erfassen: zehn bis fünfzehn Prozent aller Refluxkranken leiden an einer endoskopisch diagnostizierbaren Reflux-Ösophagitis und von diesen entwickeln wiederum zehn Prozent der Patienten einen Barrett-Ösophagus. In der Folgezeit erkranken bis zu zehn Prozent der Patienten mit Barrett-Ösophagus an einem Adenokarzinom des unteren Ösophagus.

1.3.3. Formelle Pathogenese des Adenokarzinoms (Bollschweiler u. Hölscher 2004)

In etwa zehn Prozent der Fälle kann man in der Umgebung des Adenokarzinoms keine Barrett-Schleimhaut entdecken. Hier könnte ein anderes Ausgangsgewebe vorliegen. Nicht immer wird man ausschließen können, dass es sich dabei um ein eingewandertes Kardiakarzinom handelt.

Heute geht man jedoch, wie schon ausführlich beschrieben, davon aus, dass zumindest der überwiegende Anteil der Adenokarzinome des Ösophagus in einer Barrett-Mukosa – von den Klinikern auch als Endobrachy-Ösophagus bezeichnet - über eine Dysplasie als Präkanzerose entsteht.

Bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung von Barrett wurde von einer Häufung von Adenokarzinomen bei Patienten mit Barrett-Mukosa berichtet (Morson u. Belcher 1952). Adler hat als erster 1963 einen Kausalzusammenhang von Barrett-Schleimhaut und –Karzinom vermutet (Adler 1963).

Das Risiko in Folge eines Endobrachy-Ösophagus an einem Tumor im distalen Ösophagus zu erkranken, wird in retrospektiven Studien mit 36% angegeben, bei prospektiven sogar mit 66%. Die Wahrscheinlichkeit ist somit im Vergleich zur Normalbevölkerung um 30-125mal höher (Cameron 1997).

1.3.4. Kausale Pathogenese (Ätiologie) (Bollschweiler u. Hölscher 2004)

Für das Plattenepithelkarzinom sind Nikotin- und Alkoholabusus die wichtigsten ätiologischen Faktoren.

Starker gastroösophagealer Säurereflux erhöht – wie oben ausgeführt - das Risiko für Adenokarzinomentstehung (Lagergren et al. 1999). Einige Studien belegen auch hier einen negativen Einfluss von Rauchen und Alkoholgenuss. Da der Alkoholkonsum in den westlichen Industrienationen in den letzten 30 Jahren stark angestiegen ist, könnte das die Inzidenzsteigerung erklären.

Auch bei Übergewichtigen kommt es gehäuft zur Refluxkrankheit und Barrett-Karzinomen. Die Adipositas hat bekanntlich in den letzten 50 Jahren sowohl in den USA als auch in einigen europäischen Ländern stark zugenommen. Waren 1960 schon 23 Prozent der weißen, männlichen Amerikaner übergewichtig (BMI > 27,8), erhöhte sich diese Zahl bis 1990 schon auf 32 Prozent. Der

Zusammenhang von erhöhtem Fettkonsum und Reflux dürfte darauf beruhen, dass fettes Essen den Druck des Ösophagussphinkters mindert und damit einen Reflux begünstigt. Geringer Konsum von Gemüse und Früchten und ein Vitaminmangel (β-Karotine, Retinol, Ascorbinsäure, Tocopherol) werden auch als Refluxauslöser genannt. Bei Patienten mit einem Barrett-Karzinom konnte ein erhöhter Konsum von tierischem Eiweiß, Fett und Milch nachgewiesen werden (Wolfgarten et al. 2001).

Einige Autoren weisen darauf hin, dass die Einnahme von H_2-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls die Mortalität eines Ösophaguskarzinoms erhöht (Colin-Jones et al. 1992). Weitere Medikamente – wie Anticholinergika, β-Mimetika, β-Rezeptor-Antagonisten, Bronchodilatatoren, Kalziumkanalblocker, Narkotika und Antihistaminika – reduzieren den Druck im unteren Ösophagusspinkter. Ihre Verschreibung hat wie die der H_2-Rezeptor-Antagonisten in den letzten 30-40 Jahren stark zugenommen. Sie könnten somit ebenfalls ursächlich an der Entstehung eines Barrett-Karzinoms beteiligt sein (Wang et al. 1994).

Vaughan und Mitarbeiter nehmen an, dass auch Asthmapatienten, die jahrelang medikamentös behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko haben (Vaughan et al. 1998).

1.3.5. Molekularbiologische Aspekte (Sarbia u. Müller 2004)

Die Grundprinzipien der molekularen Kanzerogenese, die bei der Entstehung des Kolonkarzinoms erkannt wurden (Fearun, Vogelstein 1990), lassen sich auch auf den Speiseröhrenkrebs übertragen, nämlich: die Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen sowie die Amplifikation von Genabschnitten.

Ein leicht zu bestimmendes Tumorsuppressor-Gen, dem man einen Einfluss auf eine Vielzahl von Neoplasien postuliert, ist das p53-Gen. Es ist auf dem Chromosom 17p lokalisiert. Es wird in normalen Zellen ständig synthetisiert und kontinuierlich sehr schnell wieder abgebaut. Unter dem Einfluss genotoxischer Effekte kommt es zu einer Stabilisierung des p53-Proteins, wodurch es seine Funktion entfalten kann. Diese besteht in einer Arretierung des Zellteilungszyklus von geschädigten Zellen. Dadurch kann die Schädigung

repariert werden. Handelt es sich jedoch um einen irreversiblen Zellschaden, führt das p53-Protein zu einer Apoptose, also zum Zelluntergang. Weitere Aufgaben sind der Einfluss auf die genetische Stabilität durch Genexpression und einer Inhibition der Blutgefäßneubildung, welche für das Wachstum von Tumoren bedeutsam ist (Vogelstein et al. 2000). Beim Adenokarzinom des Ösophagus liegt die Prävalenz von p53-Mutationen bei etwa 60 Prozent (Fitzgerald u. Triadafilopoulos 1998).

Ein weiteres Zellzyklusregulator-Gen spielt eine Rolle bei der Entstehung des Ösophaguskarzinoms: das $p16^{INK4A}$-Gen. Es kodiert für ein Protein mit proliferationshemmender Wirkung (Cordon-Cardo 1995). Beim Adenokarzinom der Speiseröhre stellt die Hypermethylierung des $p16^{INK4A}$-Promoters den Hauptmechanismus zur Inaktivierung von $p16^{INK4A}$ dar (Fitzgerald u. Triadafilopoulos 1998).

Für die Entstehung von Ösophagus-Karzinomen spielt auch der epidermal growth factor receptor (EGFR) eine große Rolle. Er gehört zu einer Familie von Zellmembranproteinen mit extrazellulärer Bindungsdomäne für Wachstumsfaktoren sowie mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität. Die Zellproliferation wird über die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und/oder des homologen Wachstumsfaktors TGF-ß an EGFR stimuliert. Bei 15-30 Prozent der Ösophaguskarzinome entfaltet der EGFR onkogene Wirkung und zwar durch eine Proteinüberexpression, welche durch eine Amplifikation des EGFR-Gens hervorgerufen wird (Montesano et al. 1996).

Eine trunkierte Form des EGFR-Proteins stellt das c-erB-2 (HER2/neu) dar, bei dem die Bindungsdomäne für den epidermalen Wachstumsfaktor fehlt und er somit ohne Bindung aktiv ist. Ähnlich wie EGFR entfaltet auch c-erB-2 beim Ösophaguskarzinom onkogene Wirkung durch eine Proteinüberexpression (Sarbia u. Müller 2004).

Onkogenen Einfluss beim Adenokarzinom des Ösophagus hat auch c-myc, ein nuklearer Transkriptionsfaktor, der bei der Hälfte der Adenokarzinome des Ösophagus durch Amplifikation die Zellproliferation beeinflusst (Sarbia et al. 2001).

Bei 44 Prozent der Adenokarzinome ist ein weiterer Gendefekt festzustellen. Bei dem Tumorsuppressor-Gen, dem „Fragile-histidine-triad- [FHIT]-Gen,

konnten Menin und Mitarbeiter den Verlust eines Allels nachweisen (Menin et al. 2000).

Ein Tumorsuppressor-Gen, das eine zentrale Rolle in einem frühen Stadium der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms spielt, ist das APC-Gen. Allelverluste in diesem Gen sind auch häufig beim Speiseröhrenkrebs identifiziert worden (Montesano et al. 1996).

Neben genetischen Veränderungen in den genannten Tumorsuppressor-Genen kann eine genetische Instabilität vorliegen. Auf chromosomaler Ebene führen Verluste oder Gewinne von Chromosomenbruchstücken und/oder von ganzen Chromosomen zu Aneuploidie, das heißt zu einer Veränderung im DNA-Gehalt von Tumorzellen. Eine DNA-zytometrisch nachweisbare Aneuploidie findet sich bei etwa 70-90 Prozent der ösophagealen Adenokarzinome (Fitzgerald u. Triadafilopoulos 1998).

1.3.6. Patientencharakteristik (Bollschweiler u. Hölscher 2004)

Patienten mit einem Barrett-Karzinom sind im Schnitt acht Jahre älter als solche mit Plattenepithelkarzinom. Sie sind auch häufiger übergewichtig, während Patienten mit Plattenepithelkarzinom oft untergewichtig sind, was an ihrem jahrelangen Alkoholkonsum liegen dürfte. Auch der Nikotinabusus ist eher bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom zu finden. Zweitkarzinome treten bei Adenokarzinomen häufig im Magen und Kolon auf.

Insgesamt weisen 40 Prozent der Patienten mit Ösophaguskarzinom in ihrer Vorgeschichte gastrointestinale Erkrankungen – wie Ulcus duodeni, Ulcus ventriculi, Gastritis oder Reflux-Ösophagitis – auf. Schwere Begleiterkrankungen sind häufig. Bei Patienten im Alter zwischen 60 und 75 Jahren waren es laut einer Studie von (Coebergh et al. 1999):

- Kardiovaskuläre Erkrankungen allgemein (22 Prozent)
- Hypertonie (14 Prozent)
- Chronische Lungenerkrankungen (zwölf Prozent)
- Diabetes mellitus (fünf Prozent)

Der tabellarische Vergleich zeigt den Unterschied im präoperativen Risiko zwischen Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom des Ösophagus:

Präoperatives Risiko	**Plattenepithelkarzinom**	**Adenokarzinom**
Pulmonal	Erhöht	Erhöht
Kardiovaskulär	-----	Erhöht
Renal	-----	Erhöht
Hepatisch	Erhöht	-----

1.3.7. Chirurgische Intervention (Merkle 2002)

Noch vor 20 bis 30 Jahren galt die chirurgische Therapie bei einem Ösophaguskarzinom lediglich als eine Verbesserung der Lebensqualität. Zumal sie nur sehr zurückhaltend – aufgrund der hohen postoperativen Morbidität und Letalität – angewandt wurde.

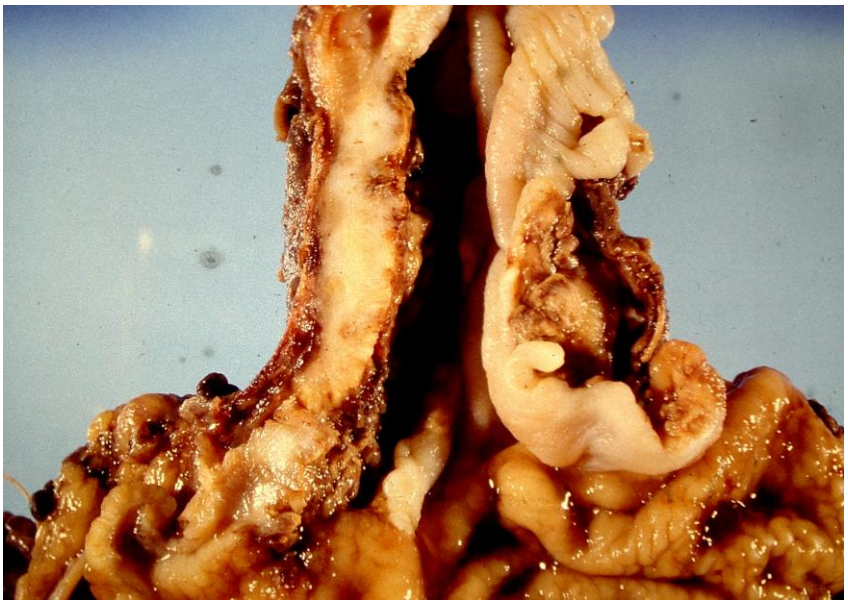


Abb.3: Infiltrierendes Adenokarzinom im distalen Ösophagus (OP-Präparat)

Trotz verbesserter Diagnoseverfahren werden auch heute noch über 90% der Ösophaguskarzinome erst im Stadium T2 oder T3 diagnostiziert und $^{2}/_{3}$ der Patienten weisen schon Lymphknotenmetastasen auf. In diesen Fällen ist ein operativer Eingriff nicht mehr als kurative Maßnahme zu werten. Fortschritte in der chirurgischen Technik, der Anästhesie und der Intensivmedizin haben aber dazu beigetragen, dass die postoperative Morbidität und Letalität deutlich abgesenkt werden konnte.

Insgesamt gesehen stehen die chirurgischen Maßnahmen bei Hoffnung auf potentiell kurative Resektion im Vordergrund aller Therapiemöglichkeiten.

1.3.8. Endoskopische Resektion (Respondek 2002)

Endoskopische Therapieverfahren sind grundsätzlich auf frühe Krankheitsstadien mit noch oberflächlichem Karzinom und nur minimalem bis geringem Lymphknotenmetastasierungsrisiko (niedrigem Malignitätsgrad) beschränkt, da eine Lymphknotenresektion endoskopisch naturgemäß nicht möglich ist.

Hauptzielgruppe der minimal invasiven Chirurgie sind Patienten mit hochgradiger Dysplasie. Hier ist eine Heilung zu erzielen. Viele Patienten mit endoskopischen Dysplasieverdacht zeigen allerdings histologisch bereits ein intramukosales Karzinom (Levine 1997). Kann eine R0-Resektion, also eine Tumorektomie erreicht werden, gelten auch diese Patienten als geheilt.

Die endoskopische Resektion sollte somit nur nach exaktem Tumorstaging mit Ausschluss von Lymphknotenmetastasen mittels Endosonographie sowie den modernen bildgebenden Verfahren angewendet werden.

1.3.9. Perkutane Strahlentherapie und Radiotherapie (Schmidt 2002)

Die Strahlentherapie war über Jahrzehnte für inoperable Patienten die einzige Behandlungsmöglichkeit mit gesicherter Wirkung im Sinne einer objektiven Rückbildung des Tumors und einer subjektiven Besserung der Dysphagie.

Da aber Langzeitstudien unbefriedigende Ergebnisse ergaben und immer wieder Lokalrezidiv- und Metastasierungsraten auftraten, muss nach Rezidiven in regelmäßigen Abständen gefahndet werden.

Die Radiotherapie und die perkutane Strahlentherapie sind Verfahren, die dem palliativen Feld zuzuordnen sind und den Patienten eine passagere Beschwerdebesserung und eine Verzögerung des letalen Verlaufs bieten können. Die Wirkung auf den Tumor kann erhöht werden, wenn die Bestrahlung mit einer Chemotherapie kombiniert wird.

1.3.10. Brachytherapie (Köppen 2002)

Das auch als interstitielle oder Kontakttherapie bezeichnete Verfahren, Brachytherapie, wird auch beim Ösophaguskarzinom angewendet. Hierbei wird die Strahlenquelle in die Ösophaguslichtung eingebracht. Dadurch fällt die Bestrahlung gesunder Gewebe weg, die bei der konventionellen Bestrahlung nicht zu umgehen ist.

Es wird häufig als eine Boost-Bestrahlung mit einer primären Radiotherapie, einer primären Radiochemotherapie oder prä- und perioperativ angewendet. Die alleinige endoluminale Brachytherapie kann bei einem oberflächlich wachsenden Karzinom indiziert sein.

1.3.11. Neoadjuvante Chemotherapie (Mergenthaler 2002)

Ein kombiniertes therapeutisches Verfahren stellt die neoadjuvante Chemotherapie dar. Hierbei kommt neben der Bestrahlung die Chemotherapie zum Einsatz. Diese neuerdings als präoperative Chemotherapie bezeichnete Behandlungsstrategie ist immer dann indiziert, wenn vor einer potentiell kurativen lokalen Therapiemaßnahme wie der Operation beziehungsweise Strahlentherapie eine Tumorreduktion erzielt und eine frühzeitige Metastasierung des Primärtumors verhindert werden kann. Sie stellt augenblicklich noch kein Standardtherapieverfahren dar und wird nur innerhalb kontrollierter Studienprotokolle angewendet.

1.3.12. Neoadjuvante Strahlentherapie

Die neoadjuvante Strahlentherapie ist ein Verfahren, das bisher nur in wenigen Studien untersucht worden ist. Die präoperative Bestrahlung eines Barrettkarzinoms hat keine Auswirkungen auf das Überleben der Patienten gezeigt. Deshalb wird dieses Verfahren nur unter Studienbedingungen durchgeführt (Zacherl et al. 2003).

1.3.13. Palliative Therapieverfahren (Kawan 2002)

Für Patienten mit nicht mehr kurativ behandelbarem Ösophaguskarzinom bieten sich endoskopische Verfahren als palliative Maßnahmen an. So können Bougierung beziehungsweise Ballondilatation, Lasertherapie und der Einsatz von Endoprothesen die oft quälende Dysphagie beseitigen oder doch zumindest soweit verbessern, dass die Patienten wieder breiige Kost auf natürlichem Wege zu sich nehmen können. Tumorbedingte ösophagobronchiale Fisteln können ebenfalls mit Hilfe von Endoprothesen therapiert werden.

Ziel der endoskopischen Verfahren ist es, dem Patienten mit geringer Lebenserwartung, eine verbesserte Lebensqualität mit geringst möglichen methodenbedingten Komplikationen zu bieten.

1.4. Zytostatika

(Lüllmann et al. 2003)

In der medikamentösen Krebstherapie nutzt man seit langem Substanzen, so genannte Zytostatika, die den Stoffwechsel der Krebszellen negativ beeinflussen. Einige Vertreter dieser Stoffklasse greifen in die Zellteilung ein. Dadurch werde Gewebe mit hoher Proliferationsrate – und dazu zählen die meisten Tumorzellen – besonders getroffen. Da natürlich nicht nur die Tumorzellen geschädigt werden, sondern alle schnell wachsenden Gewebe, werden auch gesunde Körperzellen mit hoher Teilungsfrequenz im Wachstum gehemmt. Viele behandelte Patienten leiden deshalb auch unter Haarausfall, Durchfall und Knochenmarkdepression mit erhöhter Infektionsneigung. Ebenfalls häufig finden sich Übelkeit und Erbrechen.

Andere Zytostatika greifen an unterschiedlichen Stellen des Stoffwechsels der Krebszelle an.

Die Zytostatika lassen sich deshalb sinnvoll nach ihrem Wirkmechanismus einteilen.

1.4.14. Schädigung der DNS

Die wichtigste Substanzgruppe, die eine direkte Schädigung der DNS hervorruft, sind die Alkylantien. Die Verbindungen sind chemisch labil und übertragen Alkyl-Reste auf die Nukleinsäuren. Das ist besonders leicht in der DNS-Synthese-Phase möglich. Die DNS wird durch die Alkylantien verändert, so dass sie ihre Funktion im Zellstoffwechsel nicht mehr erfüllen können. Im günstigsten Fall sterben die Zellen ab. Vertreter dieser Gruppe sind Chlorambucil und Cyclophosphamid.

Durch die Alkylierung können auch unerwünschte mutagene Wirkungen auftreten. Das kann dazu führen, dass in gesunden Zellen eine Krebsinduktion ausgelöst wird. Früher spielte dies keine große Rolle, da viele Patienten trotz der Zytostase eine verkürzte Lebenserwartung hatten und so das induzierte Karzinom, also ein Zweitkarzinom, nicht mehr erlebten. Heute ist dieser Effekt aber in Rechnung zu stellen, zumal ja heute auch Kinder erfolgreich zytostatisch behandelt werden.

Eine Schädigung der DNS-Matrize wird durch Cisplatin und Carboplatin hervorgerufen, indem das freiwerdende Platin an die DNA bindet.

1.4.15. Schädigung der Mitosespindel

Die Mitosespindel, die die verdoppelten Chromsomen auseinander ziehen soll, kann leicht durch so genannte Spindelgifte gehemmt werden. Zu diesen gehören Vinblastin und Vincristin.

1.4.16. Zytostatische Antibiotika

Auch unter der Stoffgruppe der eigentlich mikrobiell wirksamen Antibiotika sind Substanzen, die bei Tumorzellen zu Strangbrüchen der DNA führen können und somit auch bei Neoplasien zum Einsatz kommen. Bleomycin vermag das Wachstum von Tumorzellen durch diesen Mechanismus zu inhibieren.

1.4.17. Hemmung der Bausteinsynthese

Für die Bildung von Purin-Basen sowie von Thymidin ist Tetrahydrofolsäure (THF) nötig. Diese entsteht aus Folsäure, unter anderem durch die Einwirkung der Dihydrofolsäure-Reduktase. Das Folsäureanalogon Methotrexat (MTX) hemmt das Enzym.

Der Stoff Hydroxyharnstoff hemmt die Ribonukleotid-Reduktase, welche normalerweise Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide überführt, die dann als DNA-Bausteine dienen.

1.4.18. Einschleusung falscher Bausteine

Falsche Basen, wie 6-Mercaptopurin, das aus Azathioprin freigesetzt wird, und 5-Fluoruracil oder Nucleoside mit „falschen“ Zuckern (Cytarabin) wirken als Antimetabolite. Sie hemmen die DNA-/RNA-Synthese oder führen nach ihrem Einbau zur Bildung „falscher“ Nukleinsäuren.

1.4.19. Gezielte antineoplastische Wirkprinzipien

Wenn neoplastisch entartete Zellen gegenüber normalen Zellen spezielle zytoplasmatische Stoffwechsel- und Oberflächeneigenschaften aufweisen, müsste es möglich sein, hier gezielt einzugreifen. Auf diesem Prinzip kommen Imatinib, Asparaginase und Trastuzumab zum Einsatz.

Vielleicht könnte man mit einem neuartigen Zytostatikum nicht nur präoperativ, sondern sogar kurativ in das Tumorgeschehen eingreifen. Diese Arbeit befasst sich mit der Substanz Cyclopamine, die schon zytostatische Wirkungen an Tumoren in Zellkultur und Mäusen zeigte.

1.5. Cyclopamine

Binns und Mitarbeitern waren aufgefallen, dass Schafe im Westen der USA beim Verzehr der Lilienpflanze *Veratrum californicum* (Abb.5) bei den Nachkommen Missbildungen entwickelten (Binns et al. 1959). Bei der Suche nach der chemischen Substanz, die für diese Veränderungen verantwortlich ist, stieß man auf ein pflanzliches steroidales Alkaloid mit folgender chemischer Struktur:

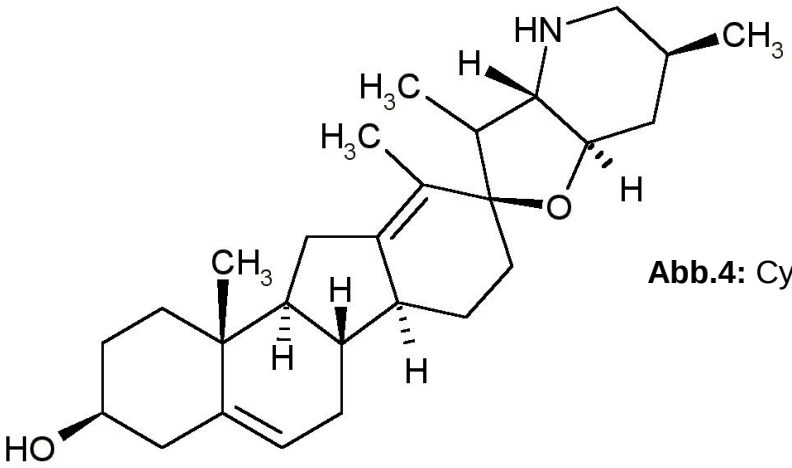


Abb.4: Cyclopamine

Diese chemische Verbindung nannte man, nachdem viele der Schafnachkommen nur ein zentrales Auge entwickelten (cyclopia, Abb.6), Cyclopamine (Binns et al. 1963; Keeler u. Binns 1968).

Zwischenzeitlich hat man bei dieser Stoffgruppe auch einen zytostatischen Effekt entdeckt, der bei einer Reihe von Tumoren in in-vitro- und in-vivo-Versuchen nachgewiesen wurde.

Bei der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von KAAD-Cyclopamine (Abb. 11, S. 33), einem synthetischen Strukturanalogon von Cyclopamine auf in-vitro-gezüchtete Tumorzellen eines Adenokarzinoms des Menschen untersucht und mit sant-1 verglichen. Diesen beiden Substanzen wird derselbe Angriffspunkt im Tumorstoffwechsel zugeschrieben.

Abb. 5: Veratrum californicum

Abb. 6: Cyclopia beim Schaf

1.5.20. Wirkungsweise KAAD-Cyclopamine und sant-1

Wie kann man sich nun den zytostatischen Effekt von KAAD-Cyclopamine erklären?

Hier hilft eine Studie von Cooper et al. weiter. Sie zeigte, dass Cyclopamine und seine Analoga in den Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg eingreifen und diesen blockieren (Cooper et al. 1998).

Zum besseren Verständnis sollen grundlegende Aussagen zu dieser Signalübertragung gemacht werden.

1.6. Hedgehog-Signalwege

Dieser Weg findet sich in vielen Spezies und unterschiedlichen Zellen. Es existieren drei Varianten des Hedgehog-Signaltransduktionsweg: Sonic (Shh), Indian (Ihh) und Desert hedgehog (Dhh). Sie arbeiten ähnlich, aber in unterschiedlichem Kontext (Pathi et al. 2001). Der Sonic hedgehog-Signaltransduktionsweg (Shh) ist am potentesten (Pathi et al. 2001), am besten charakterisiert und in vielen Studien untersucht worden. Er spielt wie noch unten aufgeführt, eine zentrale Rolle bei der Wirkung der von uns untersuchten Substanzen KAAD-Cyclopamine und sant-1.

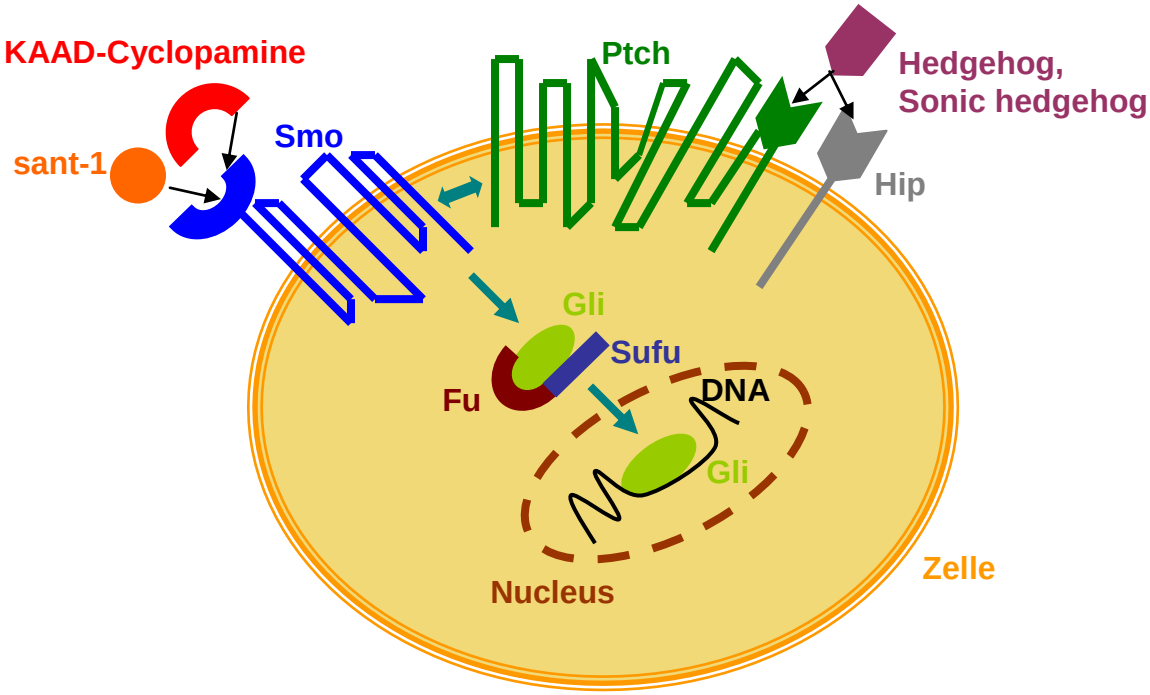


Abb. 7: Hedgehog-Signaltransduktion (schematisch)

Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg ist rezeptorvermittelt. Das auslösende Agens, Hedgehog, ist ein extrazelluläres Glykoprotein. Es wird in vielen Organen gebildet. Nach enzymatischer Aktivierung wird es aus den Zellen ausgeschleust und diffundiert zu den Rezeptoren seiner Zielzellen (Abb.7).

Die Wirkung des Hedgehog-Proteins kann durch das Protein Sightless (Sit) enzymatisch verstärkt werden. Dieses Protein ist auch unter den Namen: Skinny hedgehog, Rasp und Central missing [Ski/Rasp/Cmn] bekannt. Die Proteine Dispatched (Disp) und Tout-velu (Ttv) beeinflussen ebenfalls die Wirkung des Hedgehog-Proteins. Der Effekt des Dispatched geht über einen 12-Transmembranrezeptor, der Sterole binden kann. Dadurch wird die Freisetzung des Hedgehog-Proteins begünstigt.

Das Tout-velu-Protein beeinflusst den Hedgehog-Signaltransduktionsweg auf andere Weise: es setzt Proteoglykane frei, die für den Transport des Hedgehog-Glykoproteins zum Rezeptor von Bedeutung sind (Mullor et al. 2002).

Während also die genannten Substanzen auf unterschiedliche Weise die Wirkung des Hedgehog-Proteins beeinflussen, konkurriert das in Mäusen entdeckte Hedgehog-interacting-protein (Hip) mit dem Hedgehog-Rezeptor um das Hedgehog-Protein und kann so die Bindung des Liganden Hedgehog an den Rezeptor verhindern (Abb. 7, S. 20).

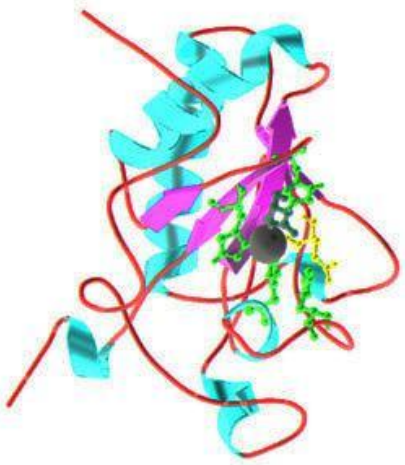


Abb.8: Sonic hedgehog Protein

1.6.21. Signalweg-Rezeptoren

Das Hedgehog-Rezeptor-Protein, auch Patched (Ptch) genannt, wurde zuerst beim Basalzellkarzinom als Tumorsuppressor beschrieben (Hahn et al. 1996; Johnson et al. 1996). Später stellte man fest, dass es das 12-Transmembranrezeptor-Protein ist, das Hedgehog binden kann (Marigo et al. 1996; Stone et al. 1996).

Bei Anwesenheit des Liganden wird ein zweites Protein, das 7-Transmembranprotein Smoothened (Smo), aktiviert. Dadurch kann unter Mithilfe eines G-Proteins die Information zur DNA des Zellkerns weitergeleitet werden (Ingham u. McMahon 2001).

Ist der Rezeptor unbesetzt, reguliert der Patched-Rezeptor durch Konformationsänderungen das benachbarte Smoothened-Protein herunter (Ho u. Scott 2002).

1.6.22. Signalweg-Komponenten

Bei der für uns entscheidenden Variante des Signalweges – dem Sonic-hedgehog-Signalweg – ist das Sonic hedgehog Protein (Shh) (Abb. 8, S. 21) das Pendant zu Hedgehog. Es wird als ein 45kDa Protein synthetisiert und autoproteolytisch in die aktive Form eines 19kDa großen amino-terminalen Fragmentes (Shh-N) gespalten (Marti et al. 1995; Porter et al. 1995; Roelink et al. 1995). Der weitere Verlauf ist wie oben beschrieben, jedoch sind zusätzlich intrazellulär zwei Regulatorproteine eingeschaltet. Dabei handelt es sich um GAS1 und Megalin, auch bekannt als gp330 oder low-density lipoprotein receptor-related protein [LRP]-2 (Nybakken u. Perrimon 2002). Durch die Vielzahl der inhibierenden Faktoren auf den Signalweg kann man davon ausgehen, dass der Signalweg die meiste Zeit deaktiviert ist und nur zu bestimmten Phasen und nur an den Orten, an denen das Hedgehog-Protein vorkommt, Funktionen erfüllt (Ruiz i Altaba et al. 2002).

1.6.23. Zielstrukturen der Signalwege

Die Information des Shh-Weges wird über verschiedene Kinasen, unter anderem Fused (Fu) und Supressor of fused (Sufu), die einen Multiproteinkomplex bilden, zum Zellkern vermittelt (Murone et al. 2000). Des Weiteren wirken im Sonic hedgehog Weg so genannte Zinkfingerstrukturen mit, welche die Transkription bestimmter Gene im Zellkern regulieren. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren dieses Signalweges sind Gli1, 2 und 3 (Ruiz 1999). Sie besitzen Homologien zum Cubitus interruptus-Protein (Ci) der Drosophila (Aza-Blanc et al. 1997; Ruiz i Altaba et al. 2002). Diese Proteine sind mit mehr als 1000 Aminosäuren sehr groß und können viele Funktionen erfüllen (Ruiz 1999; Ruiz et al. 2002). Existiert kein Sonic-hedgehog-Protein, werden die Gli-Proteine vom Proteasom gespalten. Die am Carboxyl-Ende (=c-terminal) gekürzten Formen fungieren als Repressoren der Transkription bestimmter Genabschnitte (Aza-Blanc et al. 1997; Ruiz 1999; Aza-Blanc et al. 2000; Ruiz et al. 2002).

Gli1 dient als Aktivator, vermittelt und amplifiziert das Signal des Hedgehog-Weges und wird durch diesen selbst induziert (Mullor et al. 2002). Die Funktion des Gli2 und des Gli3 auf das Hedgehog-Signal ist je nach Kontext unterschiedlich (Aza-Blanc u. Kornberg 1999; Ruiz 1999; Ingham u. McMahon 2001).

Wichtige Genabschnitte, die von diesen Transkriptionsfaktoren reguliert werden, sind Protoonkogene und Wachstumsfaktoren (Pasca di Magliano u. Hebrok 2003). Die bedeutendsten Genabschnitte sind cyclin D1/2 und Cyclin E. Sie wurden in menschlichen Haarfollikeln gefunden (Mill et al. 2003). Beide Proteine spielen beim Zellzyklus der Drosophila eine wichtige Rolle (Duman-Scheel et al. 2002). Weitere Zielgene sind sds Onkogen n-Myc im humanen Nervensystem (Kenney et al. 2003) und der epidermal growth factor (EGF). Auch das wurde bei Drosophila gefunden (Amin et al. 1999). Weitere Zielstrukturen sind der platet-derived-growth-factor (PDGF) (Dahmane et al. 2001) und bei der Angiogenese der vascular-epithelial-growth-factor (VEGF) (Pasca di Magliano u. Hebrok 2003).

In den Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg ist ein negativer Feedback-Mechanismus eingebaut (Pasca di Magliano u. Hebrok 2003), denn Proteine des Signalweges selbst sind Ziel der Transkriptionsfaktoren.

Die Gli-Proteine spielen nicht nur im Hedgehog-Signaltransduktionsweg eine Rolle. Sie können auch Funktionen in anderen Signalwegen erfüllen. So können Gli2 und Gli3 durch den Fibroblast-Wachstumsfaktor-Signalweg (FGF) im Mesoderm reguliert werden (Brewster et al. 2000).
Die Gli-Transkriptionsfaktoren 1 und 2 wurden des Weiteren bei der Tumorgenese bei Mäusen und Kaulquappen nachgewiesen (Dahmane et al. 1997; Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000).
Krishnan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es noch weitere mögliche Transkriptionsfaktoren gibt. Unter anderem wirkt sich der Shh-Weg auf den so genannte promoter-transcription factor II (COUP-TFII) aus (Krishnan et al. 1997). Auch in der Drosophila fand man weitere Zielstrukturen (Apidianakis et al. 2001).

1.6.24. Vorkommen und Funktionen des Signalweges

Zunächst wurde der Hedgehog-Signaltransduktionsweg [Lit.übersicht: (Mullor et al. 2002; Pasca di Magliano u. Hebrok 2003)] bei der Embryogenese der Drosophila und des Zebrafisches beschreiben (Nusslein-Volhard u. Wieschaus 1980; Krauss et al. 1993; Ingham u. McMahon 2001). Später konnte er auch in Nagern (Traiffort et al. 1999) und in menschlichen Zellen (Ho u. Scott 2002) nachgewiesen werden.

Der Signalweg ist ein wichtiges Glied der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Bei der Hirnentwicklung des Menschen (Ekker et al. 1995; Ericson et al. 1995) und in Enterozyten des Dünndarms bei Mäusen (Madison et al. 2005) konnte man diese Funktion belegen und zeigen, dass er zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus aktiv ist (Ruiz et al. 2002). Des Weiteren wurde er bei der Entwicklung der Inseln des Pankreas und bei der Erythropoese nachgewiesen (Detmer et al. 2005). Olsen und Mitarbeiter zeigten, dass der Hedgehog-Signalweg bei der Angiogenese von Tumoren beteiligt ist (Olsen et al. 2004). Marigo und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls den Shh-Weg und stellten fest, dass er beim Menschen bei der Ausbildung des Darmes, der Leber, der Lunge und der Nieren eine Rolle spielt, sich aber im Erwachsenenalter in gesunden Zellen nicht mehr nachweisen lässt (Marigo et al. 1995).

Störungen des Signalweges führen weiterhin zu Cyclopia – Fehlen der medianen Gesichtstrukturen und ein ungetrenntes Frontalhirn, hervorgerufen durch ein abnormale Bildung des ventralen Neuralrohres (Siebert et al. 1990) – und anderen Entwicklungsdefekten in Mäusen (Chiang et al. 1996) und in Menschen (Roessler et al. 1996). Auch die Entwicklung der Speiseröhre, deren Malformation bei unseren Versuchen im Blickpunkt stand, steht unter dem Einfluss dieses Signalweges (Ioannides et al. 2003).

Nachdem die Rolle des Signalweges bei der Zellproliferation aufgedeckt worden war, lag es nahe, zu untersuchen, ob der Weg nicht auch bei der Tumorgenese bedeutsam ist. Thayer et al. fanden heraus, dass Störungen im Signalweg zur Entstehung von Adenokarzinomen des Pankreas beitragen (Thayer et al. 2003). Auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde der Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg gefunden (Watkins et al. 2003). Bei Basalzellkarzinomen der Maus (Oro et al. 1997; Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000), der Froschembryos (Dahmane et al. 1997) und des Menschen (Fan et al. 1997) ist der Sonic-hedgehog-Signalweg gestört. Auch bei der von uns betrachteten Speisröhrengeschwulst wurde der Einfluss des Signalweges bescheinigt (Motoyama et al. 1998; Ma et al. 2005a; Ma et al. 2005b).

Die Störungen im Signalweg bei der Kanzerogenese kennt man schon näher: so konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass es bei der Tumorentstehung zu einer Überexpression der beteiligten Liganden kommt (Oro et al. 1997; Berman et al. 2003). Auch treten weiterhin Mutationen bei den Proteinen auf, die am Signalweg beteiligt sind (vgl. S. 23, 24) (Xie et al. 1998; Taipale et al. 2000).

2. MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von Tumorzellen auf steroidale Alkaloide an Zellkulturen in vitro untersucht, um deren zytostatische Wirkung zu testen. Die Methodik lehnte sich an ein Verfahren von (Mosmann 1983) an, das wie unten beschrieben in unserem Labor modifiziert wurde.

2.1. Tumorzellen

2.1.25. Zelllinien

Das Ausgangsmaterial waren Zellen eines Barrett-Karzinoms (PT1590) sowie von Mikrometastasen aus einem befallenen Lymphknoten (LN1590). Der klinisch T3 N1 M0 eingestufte Tumor und die Zellen der Metastase waren einem 65 Jahre alten Mann (Nr:1590) bereits 1996 entnommen worden.
Nachdem sie in Kultur gebracht und charakterisiert wurden (Hosch et al. 2000) führte man erste Versuche mit diesen durch (Scheunemann et al. 1999).

2.1.26. Zellkultur

Alle Arbeitsschritte rund um die Zellkultur wurden in einer reinen Sicherheitswerkbank „bench“ der Firma Heraeus Instruments (Abb. 9) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Jede Person, die dort arbeitete, war mit einem weißen Schutzkittel bekleidet und trug Einmalhandschuhe. Die Arbeitsfläche wurde nach jedem Arbeitsgang mit Papiertüchern und Flächendesinfektionsmittel gereinigt.

Abb. 9: Sicherheitswerkbank

2.1.27. Medium

Das Tumormedium (Lagerung bei vier Grad Celsius) stellte sich zusammen aus:

Artikel	**Verdünnung**	**Menge [ml]**
RPMI1640 + GlutaMAX^{TM} I + 25mM HEPES [23]		422,5
Fetales Kälberserum [14]		50,0
Penicillin/Streptomycin [21]	1000/1000$^{\mu g}/_{ml}$	5,0
Insulin [16]	100µg gelöst in 100ml Aqua dest. →1$^{\mu g}/_{m}$	5,0
Basic Fibroblast Growth Factor – human 25µg [2]	gelöst in 25ml RPMI1640 → 1$^{\mu g}/_{ml}$	5,0
Epithel Growth Factor 100µg [9]	gelöst in 100ml RPMI1640 → 1$^{\mu g}/_{ml}$	5,0
Transferrin 80mg [25]	gelöst in 100ml Aqua dest. → 10µM	2,5
Gentamycin 10mg/ml [15]		5,0
Gesamt		**500,0**

2.1.28. Zellanzucht

Mit 20ml Tumormedium in der 75cm^2 großen Kulturflasche wurden die Zellen angezüchtet. Inkubiert wurden die Zellen in einem Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius und fünfprozentiger CO_2-Atmosphäre. Nach zwei bis drei Tagen endete jeweils eine Passage mit dem Splitten der Zellen.

2.1.29. Splitten

1.) absaugen des alten Tumormediums mit einer sterilen Glas-Pasteurpipette mit Hilfe einer Absaugpumpe
2.) 2ml Trypsin-EDTA [26] mit einer sterilen Plastikpipette auf die Zellen geben
3.) PT1590: 60sek; LN1590: 90sek einwirken lassen
4.) nach mikroskopischer Kontrolle, absaugen der Lösung mit einer sterilen Pasteurpipette
5.) mit 10ml Tumormedium in einer sterilen Plastikpipette die Zellen vom Flaschenboden abtrennen, indem die Suspension mehrfach angesaugt und über die Zellen gegeben wurde
6.) bei 100% konfluenten Flaschen: je 5ml in eine neue Zellkulturflasche geben
7.) die neuen Kulturflaschen mit je 15ml Tumormedium beschicken und damit der Beginn einer neuen Passage

Bei Bedarf wurden die Zellen eingefroren und konnten so über lange Zeit sicher gelagert werden und zu jedem gewünschten Zeitpunkt wieder aufgetaut und wieder rekultiviert werden.

2.1.30. Einfrieren

a) 2ml Trypsin-EDTA auf Zellen geben
b) 60-90sek einwirken lassen
c) mit 10ml Tumormedium Zellen aufnehmen
d) Suspension in ein 15ml Flacon® Röhrchen geben
e) 5 Min. bei 1500U/min (Beschleunigung/Bremse Stufe 9) bei 20°C waschen
f) absaugen des Überstandes mit einer sterilen Pasteurpipette
g) auftauen und aufnehmen des cell culture freezing medium-DMSO mit einer sterilen Plastikpipette
h) Zellen mit dem Medium aufnehmen
i) frozen medium Gefäß in ein Behälter mit ca.-20°C stellen
j) Medium in das Gefäß geben und verschließen
k) 1 Nacht in einen -80°C Tiefkühlschrank stellen
l) in flüssigem Stickstoff lagern

2.1.31. Auftauen

a) mit einer Plastikpipette (2ml) die Zellen mit Tumormedium aus dem frozen medium Gefäß aufnehmen
b) in ein 15ml Falcon®-Röhrchen geben
c) 5min bei 1500U/min zentrifugieren
d) Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette absaugen
e) mit neuem Tumormedium Zellen wie oben beschrieben in eine Zellkulturflasche überführen

2.2. Zellversuchsansatz

2.2.32. Durchführung

Bei der Durchführung der Proliferationsversuche in Abhängigkeit von Inhibitoren wurden sterile 96-well-Platten verwendet. Dabei wurden jeweils vier Platten beschickt und alle 24 Stunden eine Messung mit einer dieser Platten durchgeführt.

Dabei wurden die wells wie folgt beschickt:

1) 80-100%ig adhärente Zellkulturflasche von alter Tumormediumlösung mit einer sterilen Pasteurpipette befreien
2) 2ml Trypsin-EDTA mit einer sterilen Plastikpipette hinzugeben
3) 60-90sek inkubieren
4) Trypsin-EDTA mit einer sterilen Pasteurpipette absaugen
5) 10ml Tumormedium mit einer sterilen Plastikpipette hinzugeben und Zellen von ihrer Wachstumsoberfläche ablösen
6) Zellsuspension in ein 50ml Falcon®-Röhrchen überführen
7) 20µl mit einer Eppendorf Pipette und autoklavierten Pipettenspitzen in ein Eppendorf Gefäß überführen
8) 20µl Tryptan-Blau in das Eppendorf Gefäß hinzugeben und mischen
9) Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (0,0025mm^2) (Abb.10) → 2 Zählkammern = Zellen x 10^4 pro ml
10) Verdünnung ausrechnen um 7000 Zellen pro well zu erhalten:
    benötigte ml Tumormedium x 35000 = y/ausgezählte Zellzahl
11) errechnete Menge Zellsuspension in ein 50ml Röhrchen geben und Tumormedium in der jeweilig benötigten Menge zusetzen
12) 96-well-Platte mit je 200µl Zellsuspension (7000 Zellen) mit einer digitalen Pipette beschicken (Abb. 11)
13) die umgebenden wells mit 10%iger Kupfersulfatlösung (10%ig = 50g Kupfersulfat in 500ml Aqua dest., welche mit einer Einmalspritze und einem Spritzenvorsatzfilter steril filtriert wurde und bei +4°C gelagert wurde) mit einer Multipipette beschicken (Abb. 11)
14) Platten mit beiliegenden Deckeln verschließen, beschriften und in den Brutschrank geben

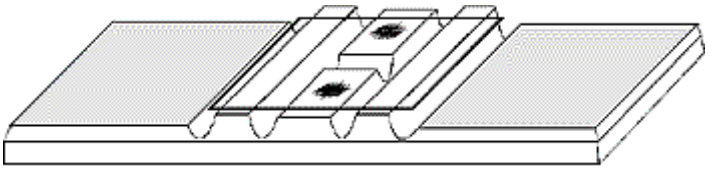


Abb. 10: Neubauer-Zählkammer

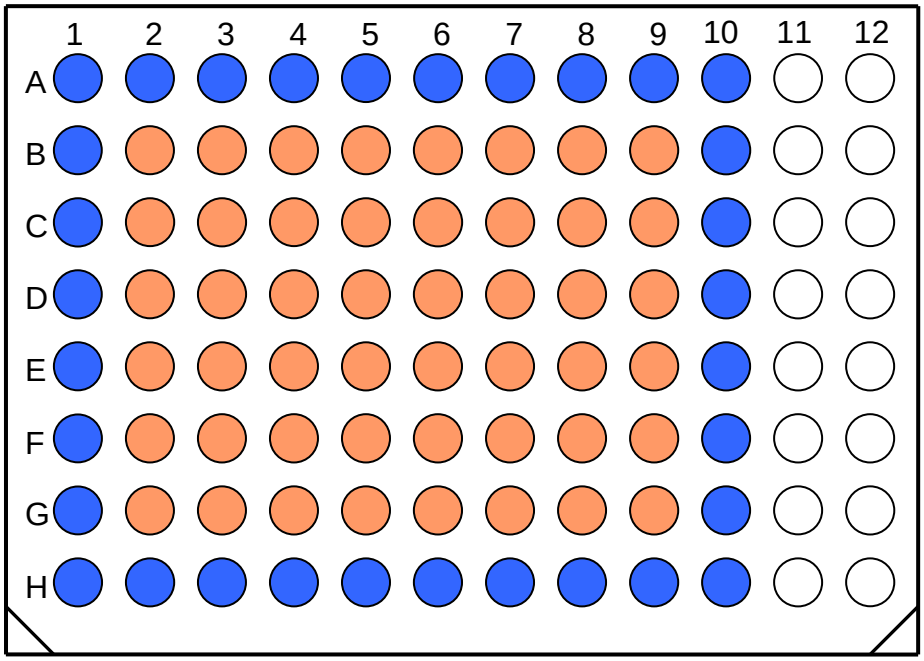


Abb. 11: 96-well-Platte

Mit Kupfersulfatlösung (blau) wurden die außen liegenden wells (im Beispiel 1 A-E; 10 A-E; A1-10; H 1-10) beschickt. In die Innenliegenden (orange) wurden 7000 Zellen, die in 200µl Tumormedium gelöst waren, pipettiert (hier: B, C, D, E, F, G 2-9).

Medikamenten-Gabe

Nach einer ersten Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die wells von drei 96-well-Platten mit den zu untersuchenden Chemikalien beschickt.

Zuvor wurden Stock-Lösungen angefertigt.

Stocks:

1) 25mg Tomatidine + 55,3ml DMSO = 1000µM Tomatidine (Abb. 13, S. 33)
2) 100µg KAAD-Cyclopamine + 143,3µl DMSO = 1000µM KAAD-Cyclopamine (Abb.12, S. 33)
3) 5mg sant-1 + 13,387ml DMSO = 1000µM sant-1 (Abb.14, S. 33)
4) 25µg Shh-peptid + 500µl PBS (10%ig Fetales Kälberserum) = 50µg/ml Shh-peptid (Abb. 15, S. 33)

	z.B. siehe **Abb. 11**
a) ohne Zusätze	2 B-G
b) 5µM Tomatidine (= 1µl 1000µM Tomatidine pro 200µl)	3 B-G
c) 10µM Tomatidine (=2µl 1000µM Tomatidine pro 200µl)	4 B-G
d) 5µM KAAD-Cyclopamine (= 1µl 1000µM KAAD-C. pro 200µl)	5 B-G
e) 10µM KAAD-Cyclopamine (= 2µl 1000µM KAAD-C. pro 200µl)	6 B-G
f) 5µM sant-1 (= 1µl 1000µM sant-1 pro 200µl)	7 B-G
g) 10µM sant-1 (= 2µl 1000µM sant-1 pro 200µl)	8 B-G
h) 1000µM Shh-peptid (= 4µl Shh-peptid pro 200µl)	9 B-G

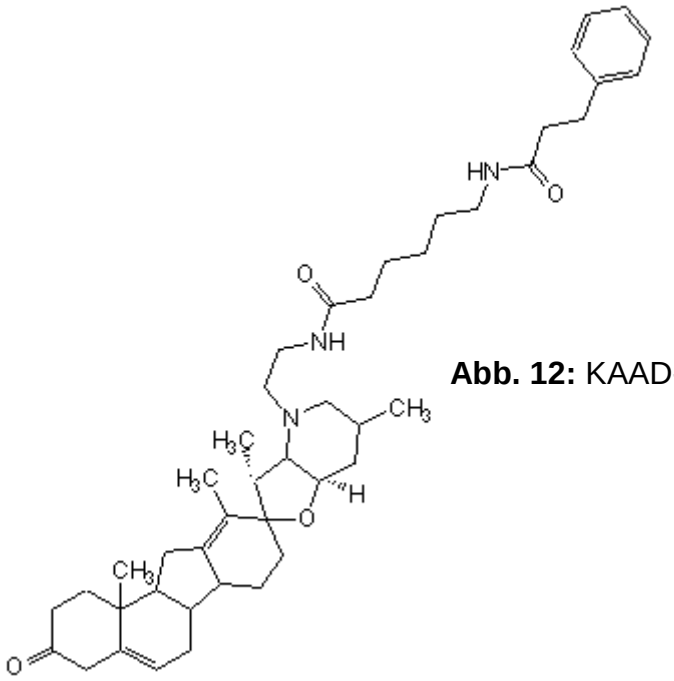


Abb. 12: KAAD-Cyclopamine

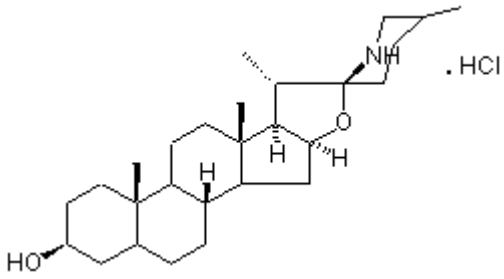


Abb. 13: Tomatidine

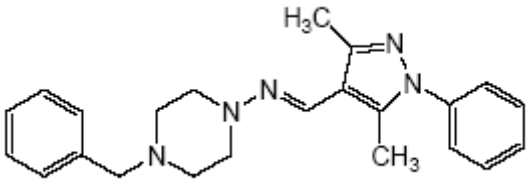


Abb. 14: sant-1

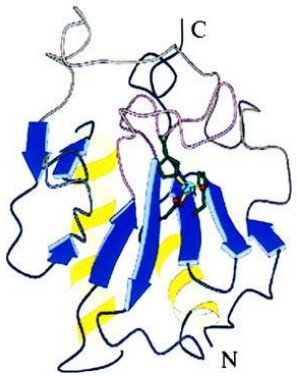


Abb. 15: Shh-peptid

2.2.33. Messung

Die erste Messung erfolgte nach 24 Stunden und markierte in den Ergebnissen den Null-Stunden-Wert. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die drei noch verbliebenen 96-well-Platten mit den zu untersuchenden Chemikalien beschickt.

2.2.34. Messprinzip

Das Prinzip der Messung beruht auf der Proportionalität eines enzymatischen Umsetzvorganges zur Vitalität von Zellen.

Dabei wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu violetten Formazan-Kristallen umgesetzt. Die Konzentration dieses farbigen Produktes kann spektrophotometrisch mit einem ELISA-Reader ermittelt werden. Dabei wurde bei 540nm gemessen, sowie der Referenzwert bei 690nm eingestellt. Die gemessenen Extinktionswerte sind proportional zur aktuellen Zellvitalität, da diese Reaktion nur in lebenden Zellen ablaufen kann. Bei Wiederholung der Messung nach bestimmten Zeitintervallen bei Zellen des gleichen Ansatzes geben die Ergebnisse Auskunft über die Proliferationsleistung dieser Zellen. Die Abb. 16 veranschaulicht den chemischen Umsatzvorgang der Moleküle.

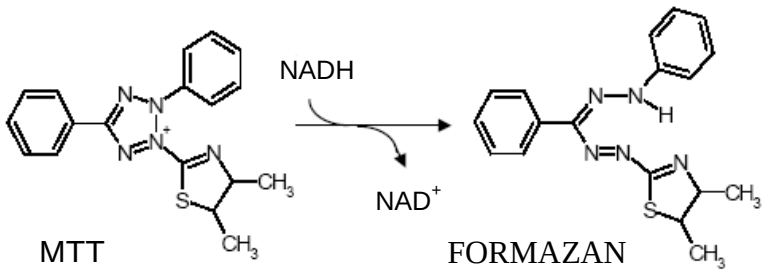


Abb. 16: Chemische Reaktion des MTT

2.2.35. Messdurchführung

Unter sterilen Bedingungen wurde den wells jeweils 20µl MTT-Lösung (=100mg MTT + 10ml D-PBS, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C) mit einer Pipette zugegeben und wieder verschlossen in den Inkubator gelegt. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 200µl MTT-Stopp-Lösung (=450ml Ethanol 100%ig + 25ml Essigsäure 100%ig + 25ml Aqua dest.) aufgefüllt. Dabei wurde eine Multipipette verwendet und, um das umgesetzte violette Formazan vom Boden der wells abzutrennen, die Stopp-Lösung mehrfach aufgezogen und wieder aus der Pipettenspitze abgelassen. Danach wurde die Platte in den ELISA-Reader (Abb. 17) überführt und die Messung an der geöffneten Platte durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf dem angeschlossenen PC gespeichert sowie ausgedruckt.

Abb. 17: ELISA-Reader

2.3. Durchflusszytometrie

FACS (Fluorescence-Activating-Cell-Sorting)

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen anhand ihrer gegebenen Lichtstreuungseigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert. Die Fluoreszenz der Zellen stammt von einer Bindung von Antikörpern, an die vorher ein fluoreszierendes Molekül gebunden wurde, an extra- aber auch intrazellulär exprimierte Antigene. Durch eine Kombination von an verschiedene Fluorochrome gekoppelten Antikörpern können mehrere Parameter analysiert werden. Diese Fluorochrome werden so gewählt, dass sie nach Anregung durch einen Laserstrahl in verschiedenen Wellenlängen Licht emittieren können. Dadurch kann detektiert werden, ob an die analysierte Zelle ein oder mehrere Antikörper gebunden haben. Als Fluorochrome wurden Floureszeinisothiocyanat (FITC, FL1) und Phycoerythrin (PE, FL2) verwendet.

Die gefärbten Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert einzeln nacheinander einen oder in neueren Geräten auch mehrere Laserstrahlen (Abb. 19). Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als „Vorwärtsstreulicht“ FSC bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als „Seitwärtsstreulicht“ (SSC) bezeichnet und hängt ab von der „Granularität“ und der „Membranfaltung“ der Zelle.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Abb. 18) mit einem luftgekühlten Argonlaser und einem zweiten, roten Dioden-Laser verwendet. FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Von jeder Probe wurden die Daten von mindestens 100000 Zellen festgehalten. Die Analyse erfolgte mit CellQuest Research Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Daten wurden entweder als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale "Punkt-Bilder" (dot-plots) dargestellt und analysiert. Durch Einsatz von Analysefenstern ließen sich aufgrund ihrer spezifischen Expression von Oberflächenmarkern verschiedene Zellpopulationen selektieren.

Mit dieser Methode bestimmten wir den prozentualen Anteil der Zellen, die das CD133-Antigen (Cluster of Differentiation) exprimierten. Dieses Antigen findet sich bei humanen Stammzellen (Miraglia et al. 1997) und wurde erstmals bei hämatopoetischen Vorläuferzellen gefunden (Yin et al. 1997).
Im gleichen Arbeitsschritt wurde auch der Anteil der CD34pos-Zellen ermittelt. Sie sind ebenfalls als Vorläuferzellen anzusehen (Yin et al. 1997).

2.3.36. Durchführung

1) Zellkulturflasche mit 2ml Trypsin-EDTA beschicken
2) 60-90 sek. inkubieren
3) Überstand absaugen
4) Zellen mit Tumormedium abtrennen und in ein 15ml Falcon®-Röhrchen überführen
5) 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
6) Überstand abdekantieren
7) Zellkonzentrat mit 5ml D-PBS auflösen
8) je 2,5ml der Zellsuspension in zwei zuvor beschriftete (Kontrolle/Messung) FACS-Röhrchen überführen
9) 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
10) Überstand dekantieren
11) 10µl Blocking-Reagenz in beide Röhrchen geben und Zellkonzentrat damit aufwirbeln
12) Kontrolle-Röhrchen: Messungs-Röhrchen:
    10µl Simultest Control γ1/γ1 10µl CD133-PE
    10µl CD34-FITZ
    hinzufügen und vermischen
13) 30 Min. bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubieren
14) mit je 3ml FACS-Wasch-Lösung auffüllen
15) 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
16) die Röhrchen mit je 350µl FACS-Wasch-Lösung auffüllen
17) vortexen
18) Kontroll-Röhrchen über die Ansaugspitze stülpen und Stütze unter das Röhrchen fahren

2.3.37. Messung am FACS-Gerät

FACS-Gerät

a) am Hauptschalter einschalten
b) Frontschublade öffnen
c) Druckhebel umlegen auf ON
d) RUN-Taste betätigen
e) HI-Taste betätigen.

Apple PC

a) Messungs-Maske öffnen
b) unter dem Menü-Punkt „Aqcuire“ den Task „Parameter Description“ öffnen
c) in dem erscheinenden Fenster eine neue Datei entwerfen und angeben welche Art der Messung durchgeführt werden soll (Kontroll-Röhrchen = erstes Röhrchen = Simultest Control y1/y1, Messungs-Röhrchen = zweites Röhrchen = CD133/CD34)
d) unter dem Menüpunkt „Aquire“ den Task „Counters“ anwählen
e) unter dem Menüpunkt Aqcuire“ den Task „Connect to Cytometer“ anwählen
f) „Apple-Taste“ gedrückt halten und die Zifferntasten „1“, „2“, „3“, „4“ nacheinander betätigen, so dass Messungsfenster erscheinen
g) im Fenster „Connect to Cytometer“ “Aqcuire” betätigen
h) Einstellungen am “Apple-Fenster” vornehmen, um die durchlaufenden Zellen im rechten, oberen Feld erscheinen zu lassen
i) im Fenster „Connect to Cytometer“ “Pause” und “Abort” drücken
j) Häkchen im Fenster „Connect to Cytometer“ bei “Setup” entfernen
k) erneut im Fenster „Connect to Cytometer“ „Aqcuire” drücken
l) Messung wird durchgeführt und nach 100.000 Zellen abgespeichert
m) Kontroll-Röhrchen entfernen und Messungs-Röhrchen in das Gerät wie oben beschrieben einsetzen
n) im Fenster „Connect to Cytometer“ “Aqcuire” drücken
o) Messung des zweiten Röhrchens wird bis 100.000 Zellen durchgeführt und automatisch abgespeichert
p) Röhrchen entfernen
q) ein mit Aqua destillata gefülltes FACS-Röhrchen einsetzen
r) Gerät in umgekehrter Reihenfolge wie oben beschrieben wieder ausschalten oder „Standby“ drücken

Abb. 18: FACS-Gerät

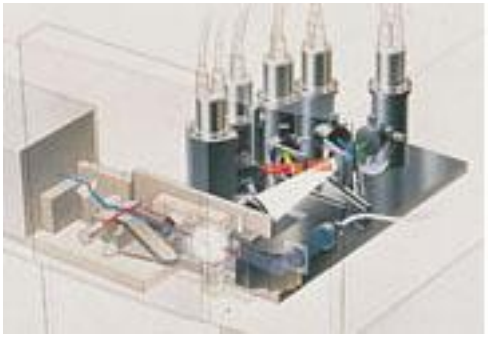


Abb. 19: Durchflusslasereinheit

2.4. MACS

(Magnetic-Activating-Cell-Sorting)

Zur Isolierung der cd133pos Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, Abb. 20) verwendet. Die Zellen werden dabei mit superparamagnetischen Mikropartikeln beladen, an die monoklonale Antikörpern gebunden waren. Die Aufreinigung erfolgte in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Permanentmagneten (Abb. 22) erzeugt wurde. Die Probe wurde auf die Säule (Abb. 20/21) gegeben und durchlief das Magnetfeld. Dann wurde mit PBS mehrere Male nachgespült. Antikörperbindende und somit magnetische Zellen wurden im Magnetfeld festgehalten und konnten, nachdem die Säule wieder aus dem Magnetfeld genommen wurde, mit Puffer lebend herausgespült werden.

Das MACS-System kann zur Anreicherung (Sortierung) oder zum Ausschluss (Depletion) einer Zellpopulation aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Separation haben wir die Originalfraktion, sowie die negative und positive Fraktion durchflusszytometrisch analysiert.

Nachdem erste Ergebnisse bestätigten, dass cd133pos-Zellen bei beiden Zelllinien vorhanden waren, konnte dieses Verfahren zum Auftrennen der Zellen nach ihrer cd133-Positivität erfolgen.

2.4.38. Durchführung

1) möglichst 5 Zellkulturflaschen (insgesamt für diesen Versuch 15-30) jeweils mit 2ml Trypsin-EDTA beschicken
2) 60-90sek inkubieren
3) Überstand absaugen
4) Zellen mit Tumormedium aufnehmen
5) alle gewonnen Zellen in ein 50ml Falcon®-Röhrchen überführen
6) 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
7) Überstand abdekantieren
8) Zellen mit 500µl Tumormedium vermengen
9) 200µl Blocking-Reagenz hinzugeben und vermischen
10) 200µl CD133-beads hinzugeben und gut vermischen
11) 30 Min. im Brutschrank inkubieren und alle 10 Min. schwenken
12) 40ml steriles D-PBS hinzugeben
13) 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
14) Überstand abdekantieren
15) MACS-Auftrenn-Säule in VarioMACS einsetzen
16) MACS-Röhrchen unter der Säule anbringen (Abb. 21)
17) 5ml steriles D-PBS auf die Säule geben und durchlaufen lassen
18) Zellsieb auf ein neues 50ml Falcon®-Röhrchen setzen
19) 2ml steriles D-PBS auf das Zellkonzentrat geben und gut aufmischen
20) Zellsuspension durch das Zellsieb in das zweite Falcon®-Röhrchen überführen
21) erneut 2ml D-PBS in das zentrifugierte Röhrchen geben und die restlichen Zellen aufnehmen
22) Zellsuspension ebenfalls durch das Sieb in das zweite Röhrchen überführen
23) Zellfilter verwerfen
24) gesiebte Zellsuspension in 0,5ml Schritten nach und nach in die MACS-Säule geben
25) nachdem die Zellsuspension komplett durch die Säule gelaufen ist, wird dreimal mit 5ml D-PBS die Säule durchgespült
26) bei Bedarf ein neues MACS-Röhrchen einsetzen

27) bevor die dritte Portion der 5ml D-PBS-Lösung komplett durchgelaufen ist und noch ca. 2,5ml über der Säule stehen, diese nach vorne aus dem Magnetfeld entfernen
28) gleichzeitig ein 15ml Falcon®-Röhrchen unter die Säule halten
29) Säule in das Falcon®-Röhrchen einsetzen
30) Stempel (Abb. 20) auf Säule ansetzen und erste Portion durchdrücken
31) Stempel entfernen und auf den Kopf abstellen, um eine Kontamination der steilen Stempelspitze zu verhindern
32) 5ml D-PBS auf die Säule geben
33) mit Stempel durchdrücken
34) 5ml D-PBS auf die Säule geben
35) mit Stempel durchdrücken
36) CD133neg-Zellen aus den MACS-Röhrchen in ein 50ml Falcon®-Röhrchen überführen
37) beide Falcon®-Röhrchen 5 Min. bei 1500 U/Min. bei 20°C waschen
38) Überstand dekantieren
39) Zellkonzentrate mit Tumormedium aufmischen

Abb. 20: Säule und Stempel

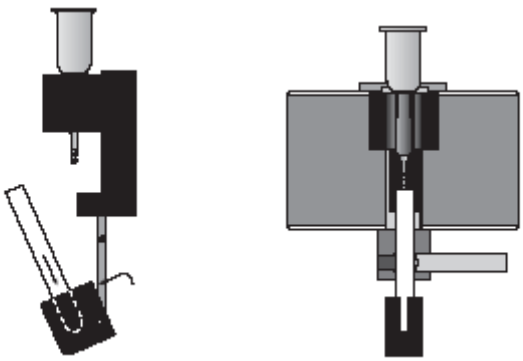


Abb. 21: Säule und Röhrchen eingesetzt

Die aufgetrennten Zellen wurden wie oben beschrieben in den MTT-Versuchsansatz eingebracht. Des Weiteren wurden sie in Kulturflaschen angezüchtet und zu mehreren Zeitpunkten gefacst (siehe oben), um die Veränderungen des Stammzellanteils (cd133pos-Zellen) zu untersuchen. Da der Anteil der cd133postiven-Zellen in der unbehandelten Zellkultur nur wenige Prozentpunkte betrug, mussten die aufgetrennten Stammzellen in kleineren Kulturflaschen gezüchtet werden.

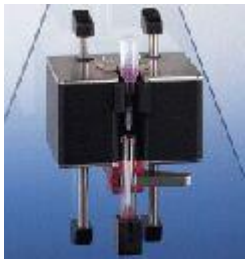


Abb. 22: Magnet

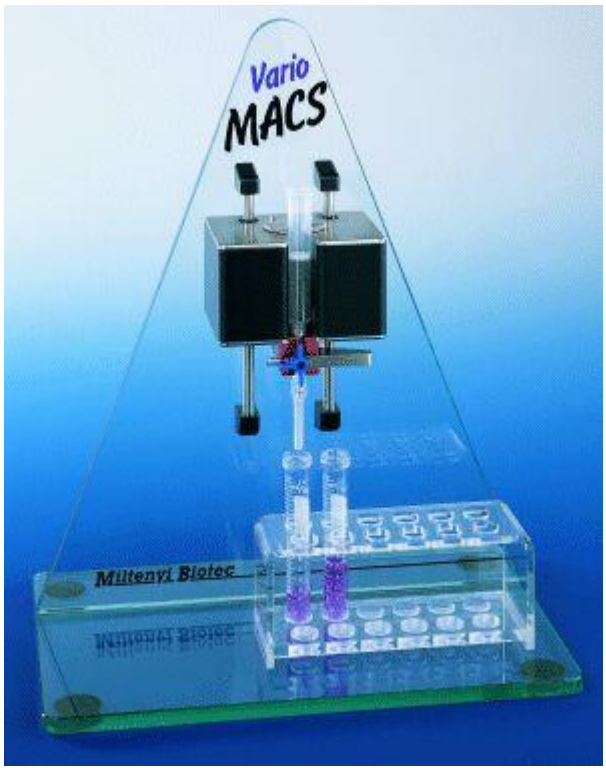


Abb. 23: MACS-Vorrichtung

2.5. Chemikalien

[1] aqua ad iniectabilia, DeltaSelect, Dreieich, D

[2] Basic Fibroblast Growth Factor – human Boehringer Mannheim

[3] BD FACSFlow™ 20l, BD Biosiences, San Jose, CA, USA

[4] Blocking-Reagenz

[5] cd133-beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

[6] cd133-PE (clone AC141), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

[7] cd34-FITC, BD Biosiences, San Jose, Kalifornien, USA

[8] cell culture freezing medium-DMSO GIBCO™

[9] Dimethyl sulfoxide minimum 99,5% GC, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA

[10] D-PBS CaCl2, MgCl2, GIBCO™, UK

[11] Epithel Growth Factor Boehringer Mannheim

[12] Essigsäure 100% 1l, Merck, Darmstadt, D

[13] Ethanol 100%

[14] Fermacidal®, IC Products SA, Minusio, CH

[15] Fetales Kälberserum GIBCO™, UK

[16] Gentamycin 10mg/ml Biochrom AG, Berlin, D

[17] Insulin SIGMA®, Deisenhofen,D

[18] KAAD-(3-*K*eto-N-*a*minoethyl-*a*minocaproyl-*d*ihydrocinnamoyl) Cyclopamine,

[19] Kupfersulfat 1kg, Biesterfeld, Itzehoe-Edendorf, D
Merck Biosiences, Bad Soden, D

[20] MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, approx. 98% TLC, SIGMA®, Deisenhofen, D

[21] Penicillin/Streptomycin 1000/1000 $^{\mu g}/_{ml}$ seromed Biochrome

[22] Recombinant Human Sonic Hedgehog, amino terminal peptide, R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA

[23] RPMI1640 + GlutaMAX™ I + 25mM HEPES GIBCO™, UK

[24] sant-1, 5mg, Merck Biosiences, Bad Soden, D

[25] sant-1, Merck Biosciences, Bad Soden, D

[26] Tomatidine, 25mg, Merck Biosiences, Bad Soden, D

[27] Transferrin SIGMA®, Deisenhofen, D

[28] Trypsin-EDTA GIBCO™, UK

2.6. Geräte

[29] Absauggerät Miniport, Servox Medizintechnik GmbH, Troisdorf, D

[30] Autoklav, 120°C, 2,8bar, 20Min., Pro-face, Quickpanel

[31] Behälter mit flüssigem Stickstoff

[32] Certomat® MV, B. Braun, Melsungen, D

[33] ELISA-Reader Dynatech R5000, Chantilly, VA, USA

[34] eppendorf easypen, Hamburg, D

[35] FACS-Gerät, BD FACS-Calibur, BD Biosiences, San Jose, CA, USA

[36] Finnpipette Multichannel 30-300µl, Thermo Electron Corporation, Helsinki, Finnland

[37] Kühlschrank, Linde AG, Wiesbaden, D

[38] Mikroskop, BH-2, Olympus, Tokio, Japan

[39] Mikroskop, Wilovert Standard PH 40, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D

[40] Multipipette® plus, eppendorf, Hamburg, D

[41] Neubauer-Zählkammer, 0,0025mm^2

[42] Pipette Research® (variabel) 100-1000µl, eppendorf, Hamburg, D

[43] Pipette Research® (variabel) 10-100µl, eppendorf, Hamburg, D

[44] Rotina 35R Hettich, Tuttlingen, D

[45] Sicherheitswerkbank HERASafe®HS, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory

[46] Tiefkühlschrank, Liebherr, Ochsenhausen, D

[47] Trockenschrank, Sanyo Sterilzer, München, D

[48] VarioMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

[49] Wärmeschrank (Heraeus Instruments)

2.7. Hard- und Software

[50] 17“-Bildschirm, Fujitsu-Siemens Computers GmbH, München, D

[51] 17”-Bildschirm MultiSync FE1250, NEC, USA

[52] Drucker, Hewlett Packard DeskJet 840C

[53] Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D

[54] MikroWin 2000 Version 4.23, Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D

[55] PC, Wing Computer GmbH, Elmshorn, D

[56] Prism 4.03 GraphPad, San Diego, Kalifornien, USA

2.8. Verbrauchsmaterialien

[57] 96-well-Platte, NUNC™, Wiesbaden, D

[58] Combitips® 1ml, 5ml, eppendorf, Hamburg, D

[59] Einmalhandschuhe, Kimberly-Clark, Roswell, Georgia, USA

[60] Einmalspritze 20ml, B. Braun, Melsungen, D

[61] Kulturflasche 25cm^2, SARSTEDT,

[62] Kulturflaschen 75cm^2, SARSTEDT,

[63] MACS-Auftrenn-Säule mit Stempel, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

[64] MACS-Röhrchen, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

[65] Pasteurpipetten Länge: 230mm, Roth, Karlsruhe, D

[66] Pipettenspitzen, TreffLab, Degersheim, CH

[67] Plastikpipette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml Falcon®, Beckton Dickinson, USA

[68] Röhrchen 15ml, 50ml Flacon®, Beckton Dickinson, USA

[69] Rundbodenröhrchen 5ml, BD Biosiences, San Jose, CA, USA

[70] Spritzenvorsatzfilter, Qualilab, Olivet, F

[71] Zellsieb, 40µm Nylon, Falcon, Beckton Dickinson, USA

3. ERGEBNISSE

Die Substanzen KAAD-Cyclopamine und sant-1 beeinflussen das Wachstum menschlicher Tumorzellen. Die auf den Seiten 47-60 dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf unselektierte Zelllinien. Anschließend Ergebnisse gewonnen an Zellen, die durch das MACS-System aufgetrennt wurden.

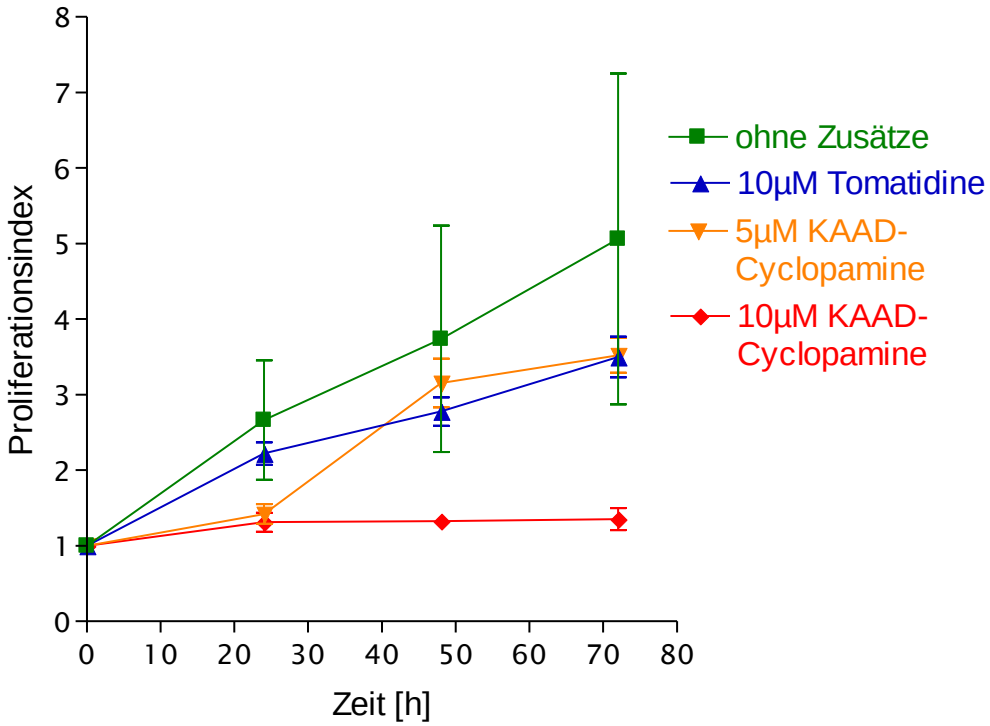
3.1. Primärtumor Barrett-Karzinom PT1590

Die von dem Barrett-Karzinom gewonnenen Zellen PT1590 wachsen bei dem benutzten Medium gut an.

Bei Zugabe von *KAAD-Cyclopamine* (10µM) ist das Wachstum bereits nach 24 Stunden signifikant inhibiert. Die Proliferation ist um 100 Prozent im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 24). Bei der halben Dosis ist die Inhibition nicht so ausgeprägt, aber nach 72 Stunden liegt auch hier eine signifikante Wachstumshemmung vor.

Auch *Tomatidine* hemmt die Proliferation. Bei Gabe von 10µM Tomatidine entspricht die Wachstumshemmung nahezu vollständig der, die durch Gabe von 5µM KAAD-Cyclopamine zu erreichen ist. Das Wachstum nach 72 Stunden wird um etwa 30 Prozent im Vergleich zur Kontrolle inhibiert (Abb. 24).

Verdoppelt man die Dosis auf 20µM, ist die zytostatische Wirkung noch ausgeprägter. In Abb. 25 ist die Proliferationshemmung bei hoher Dosis beider Substanzen graphisch dargestellt. Zu allen Messzeitpunkten ist die Wachstumshemmung von 20µM Tomatidine zu 20µM KAAD-Cyclopamine nicht statistisch signifikant zu unterscheiden.



.

Abb. 24: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (24h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	N.S.		
5µM KAAD-Cyclopamine	N.S.	N.S.	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,05	N.S.	N.S.

p-Werte (48h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	N.S.		
5µM KAAD-Cyclopamine	N.S.	N.S.	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,05	< 0,001

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	< 0,01		
5µM KAAD-Cyclopamine	< 0,01	N.S.	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001	< 0,001

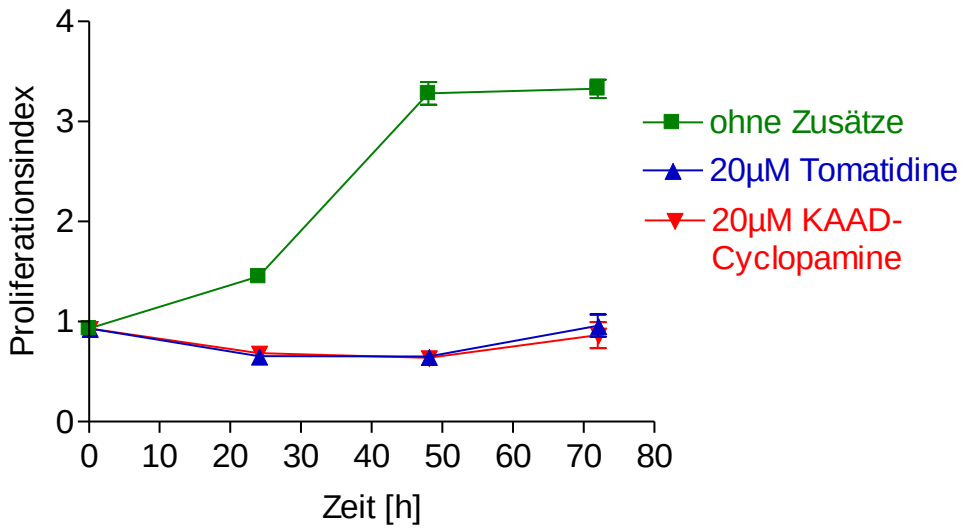


Abb. 25: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von KAAD-Cyclopamine und Tomatidine in höheren Konzentrationen (20µM)

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	20µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
20µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

Vom *Sonic hedgehog Peptid (Shh-peptid*) ist bekannt, dass es die Proliferation günstig beeinflusst. Wie Abb. 26 zeigt, verursacht es in der Konzentration 100µg/ml keine signifikante Steigerung des Karzinomzellwachstums.

Bei der zehnfachen Konzentration ist eine Proliferationssteigerung zu erreichen (Abb. 27). Sie beträgt nach 72 Stunden statistisch signifikante 17 Prozent.

Bei kombinierter Gabe des Proliferationsaktivators Shh-peptid und des Inhibitors KAAD-Cyclopamine ist festzustellen, dass der inhibitorische Effekt kombinationsabhängig abgeschwächt, aber nicht aufgehoben wird.

Die gegenseitige Beeinflussung läuft allerdings nicht zeitlich kongruent. Aus Abb. 26, vor allem aber Abb. 27 geht hervor, dass zunächst der hemmende Einfluss durch KAAD-Cyclopamine überwiegt und erst im Zeitraum nach etwa 48 Stunden die Wirkung des Shh-peptids auf die Proliferation deutlich sichtbar wird. Der Proliferationsindex des letzten Messzeitpunktes ist aber immer noch $^1/_3$ unter dem der Kontrolle.

Nach 48 Stunden ist die Proliferation bei Doppelgabe etwas geringer als nach alleiniger Zufuhr von KAAD-Cyclopamine. Der Unterschied beträgt etwa 20 Prozent (vgl. Abb. 24).

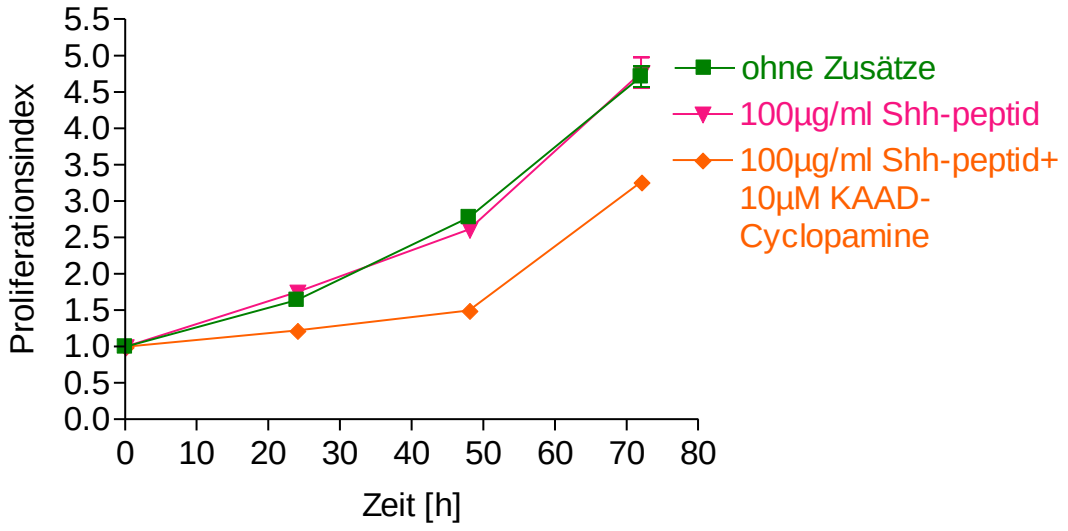


Abb. 26: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von 100µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	100µg/ml Shh-peptid
100µg/ml Shh-peptid	N.S.	
100µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001

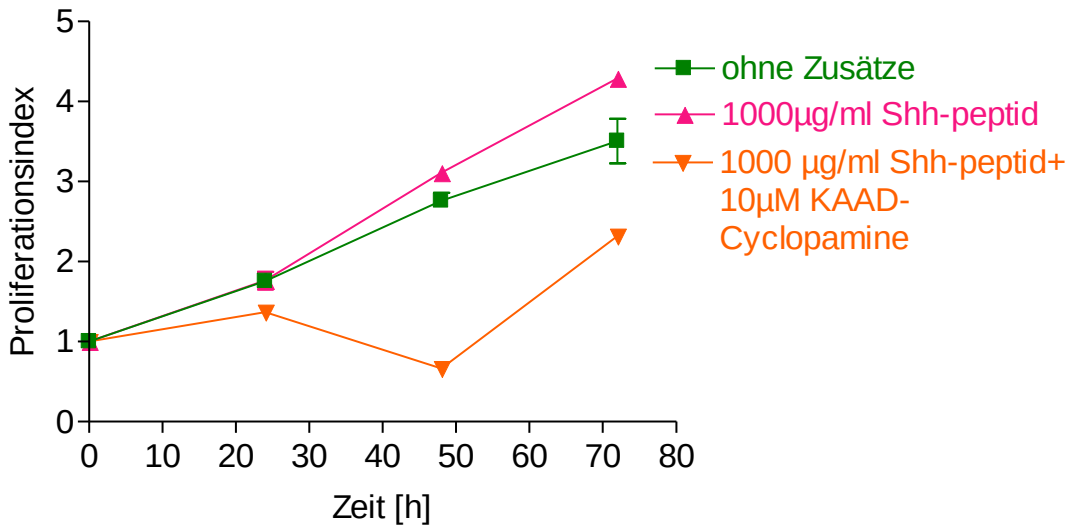


Abb. 27: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001

Die vergleichbare Beeinflussung des Wachstums bei Doppelgabe ist bei der Kombination von Shh-peptid und Tomatidine zu sehen (Abb. 28). Der 72-Stundenmesswert ist 40 Prozent unter dem des Kontrollmesswertes.

Auch hier findet sich nach 48 Stunden eine diskrete Absenkung der Proliferationsrate.

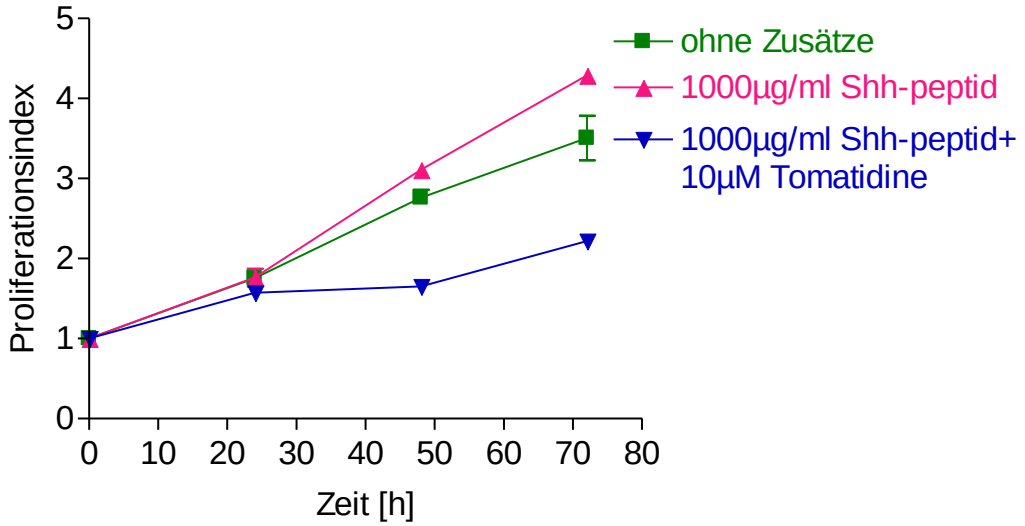


Abb. 28: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM Tomatidine	< 0,001	< 0,001

In der Abb. 29 ist die Wirkung des fraglichen Zytostatikums *sant-1* zu sehen.

In der Tat ist auch hier, wie bei KAAD-Cyclopamine, eine wachstumshemmende Wirkung festzustellen, die bei 5µM und vor allem bei 10µM nach 72 Stunden signifikant ist. Die Absenkung bei 10µM im Vergleich zur Kontrolle beträgt nach 72 Stunden 45 Prozent.

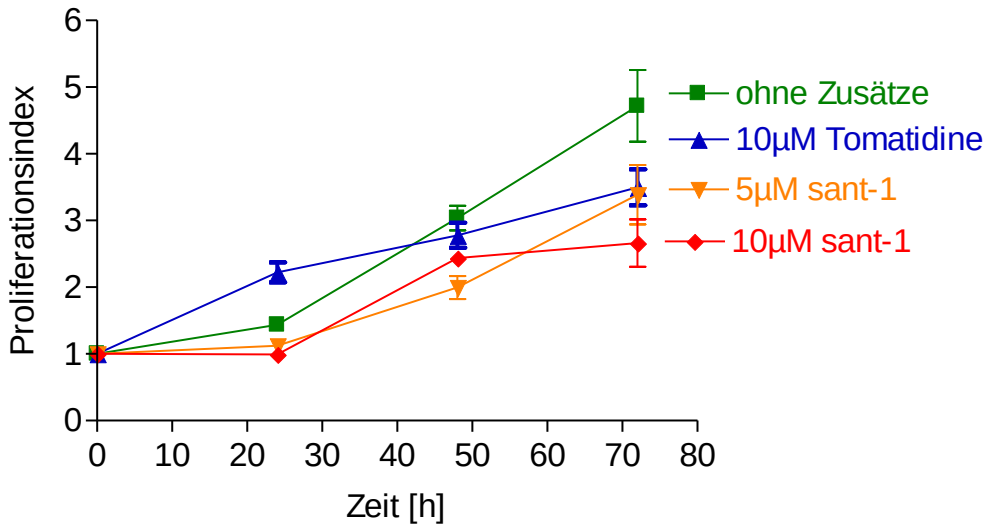


Abb. 29: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von sant-1 im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM sant-1
10µM Tomatidine	< 0,01		
5µM sant-1	< 0,001	N.S.	
10µM sant-1	< 0,001	N.S.	N.S.

Bei gleichzeitiger Gabe von Shh-peptid und sant-1 ist die Proliferationshemmung nicht wie erwartet schwächer ausgebildet, sondern sogar ausgeprägter (Abb. 30). Gegenüber der Kontrolle (nur sant-1) beträgt der Rückgang nach 72 Stunden 22 Prozent (vgl. Abb. 29).

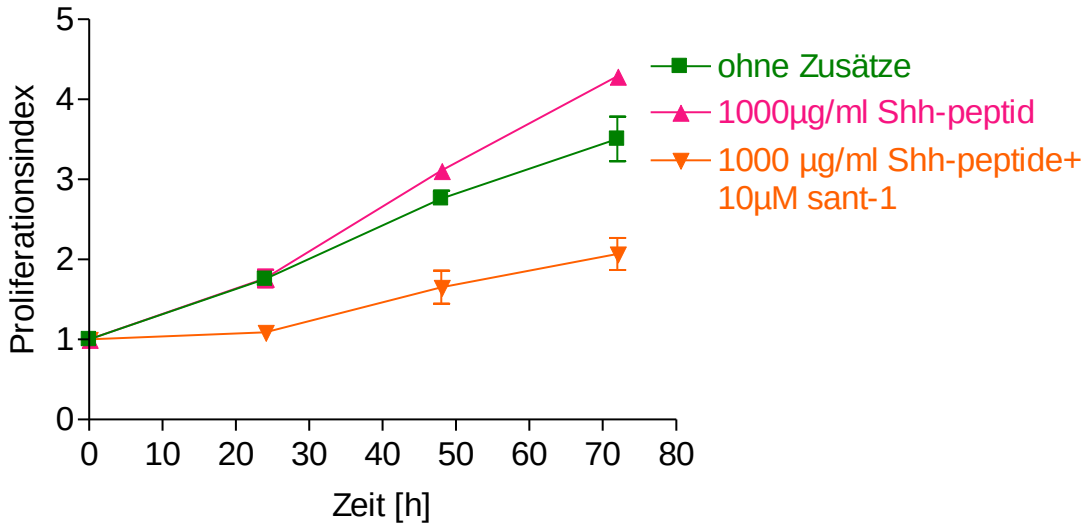


Abb. 30: Barrett-Karzinom (PT1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit sant-1

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	100µg/ml Shh-peptid
100µg/ml Shh-peptid	< 0,05	
100µg Shh-peptid+10µM sant-1	< 0,001	< 0,001

3.2. Lymphknotenmetastase LN1590

Die Beeinflussung der getesteten Substanzen auf Zellen der Lymphknotenmetastase (LN1590) fällt anders aus wie die des Primärtumors. Es ergeben sich deutliche quantitative Unterschiede.

Die Metastase-Zellen zeigen eine schwächere Proliferation als die Zellen des Primärtumors.

Bei 5µM und 10µM KAAD-Cyclopamine ist eine schwache Wachstumshemmung festzustellen (Abb. 31). Die Wirkung fällt aber viel schwächer aus als beim Primärtumor. Nach 72 Stunden liegt der Proliferationsindex nur $^1/_3$ unter dem der Kontrollgruppe.

Dieser Unterschied zum Primärtumor gilt in gleicher Weise für die Substanz Tomatidine.

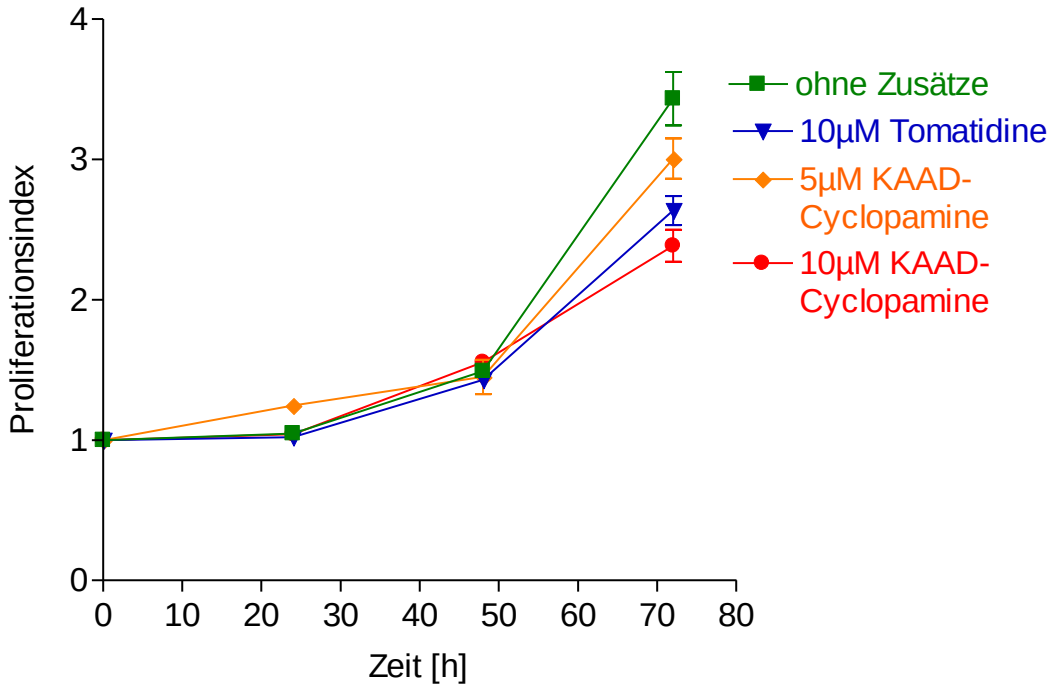


Abb. 31: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (48h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	N.S.		
5µM KAAD-Cyclopamine	N.S.	N.S.	
10µM KAAD-Cyclopamine	N.S.	N.S.	N.S.

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	< 0,001		
5µM KAAD-Cyclopamine	< 0,01	N.S.	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.	< 0,001

Die zusätzliche Gabe von Shh-peptid hat keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstumsverhalten (Abb. 32).

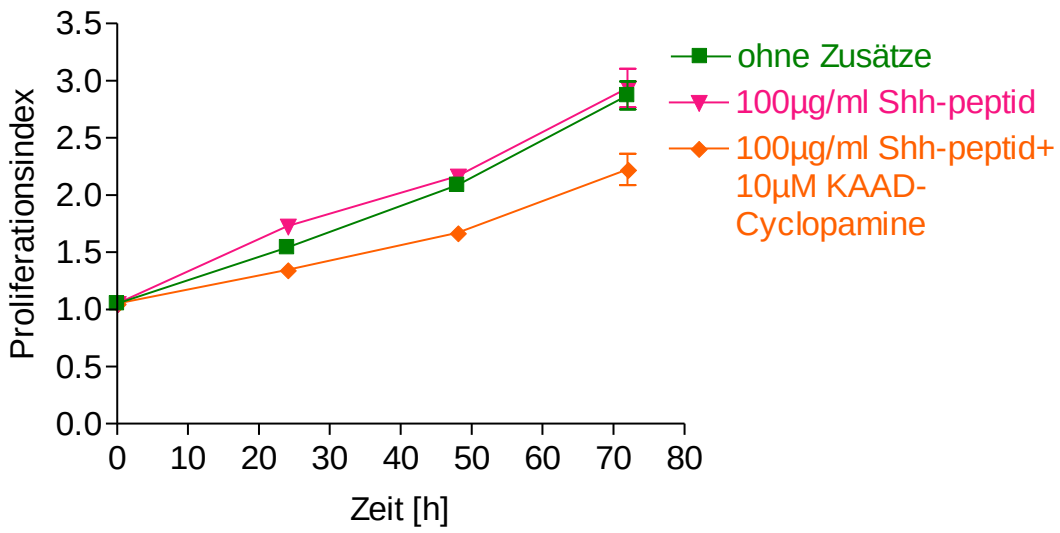


Abb. 32: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von 100µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	100µg/ml Shh-peptid
100µg/ml Shh-peptid	N.S.	
100µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001

Bei einer Konzentration von 1000µg/ml des Shh-peptids nimmt das Wachstum nicht zu, sondern sogar ab (Abb. 33). Die alleinige Gabe von Shh-peptid wirkt sich ebenfalls, wenn auch schwächer – wachstumshemmend aus (Abb. 33). Allerdings wirkt es bis 48 Stunden nach Versuchsbeginn wachstumsförderlich. Der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant.

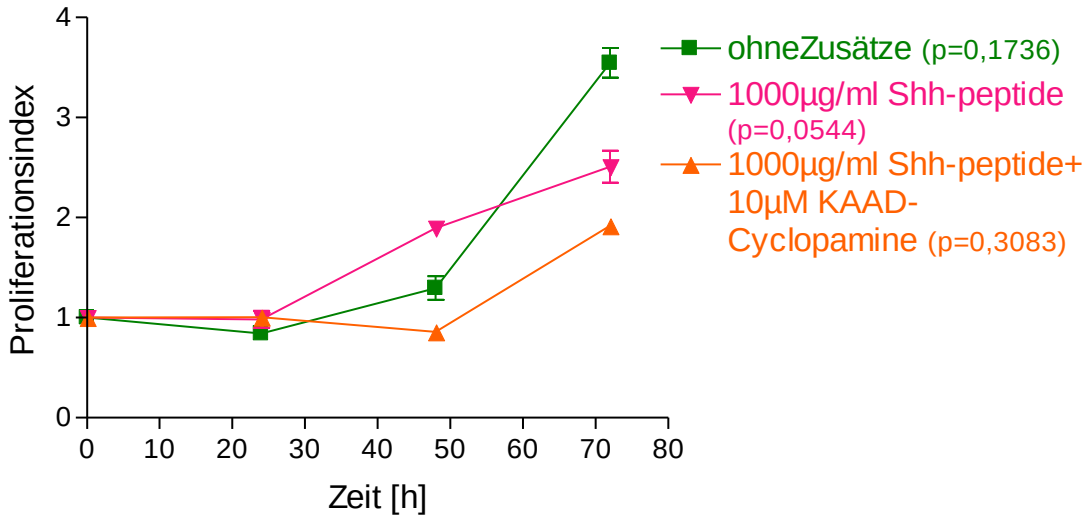


Abb. 33: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (48h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	N.S.	
1000µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	N.S.	< 0,05

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001

Vergleichbare Ergebnisse sind mit Tomatidine und mit der Kombination aus Shh-peptid und Tomatidine zu erzielen (Abb. 34).

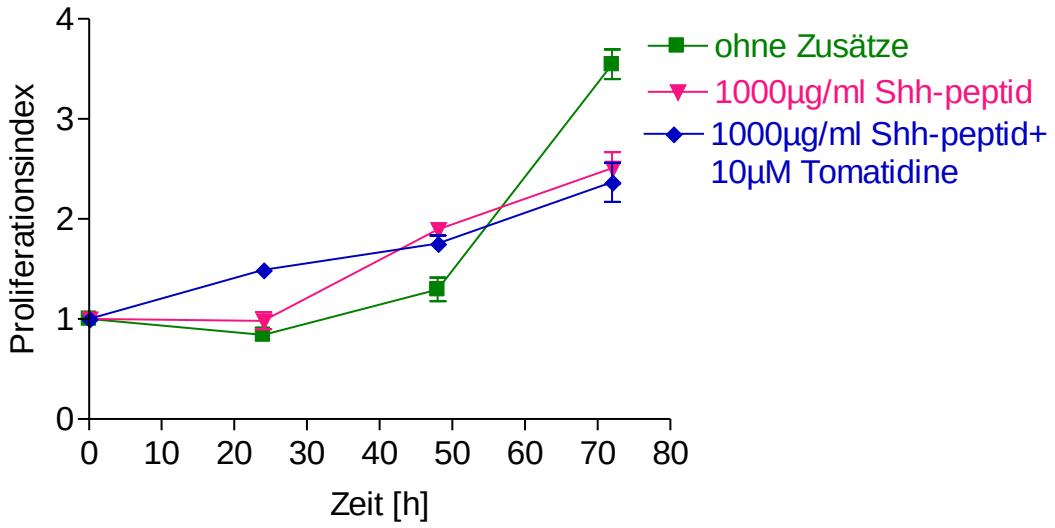


Abb. 34: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM Tomatidine	< 0,001	N.S.

Die Wirkung von sant-1 (Abb. 35) gleicht weitgehend der von KAAD-Cyclopamine (vgl. Abb. 31).

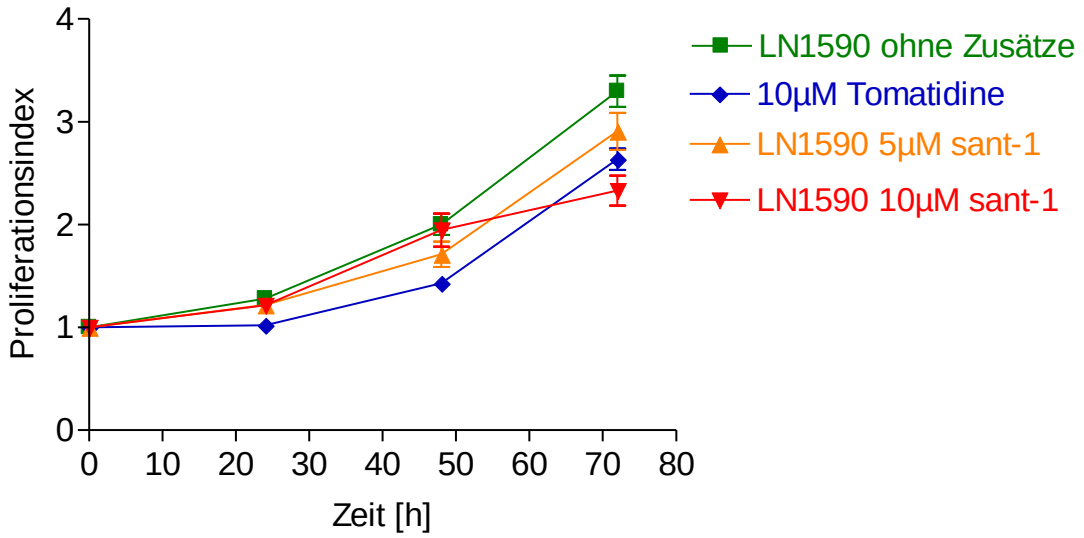


Abb. 35: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von sant-1 im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	5µM sant-1
10µM Tomatidine	< 0,001		
5µM sant-1	N.S.	N.S.	
10µM sant-1	< 0,001	N.S.	< 0,01

Die zusätzliche Gabe von Shh-peptid verstärkt die Wachstumshemmung der Zellen der Lymphknotenmetastase durch sant-1 (Abb. 36).

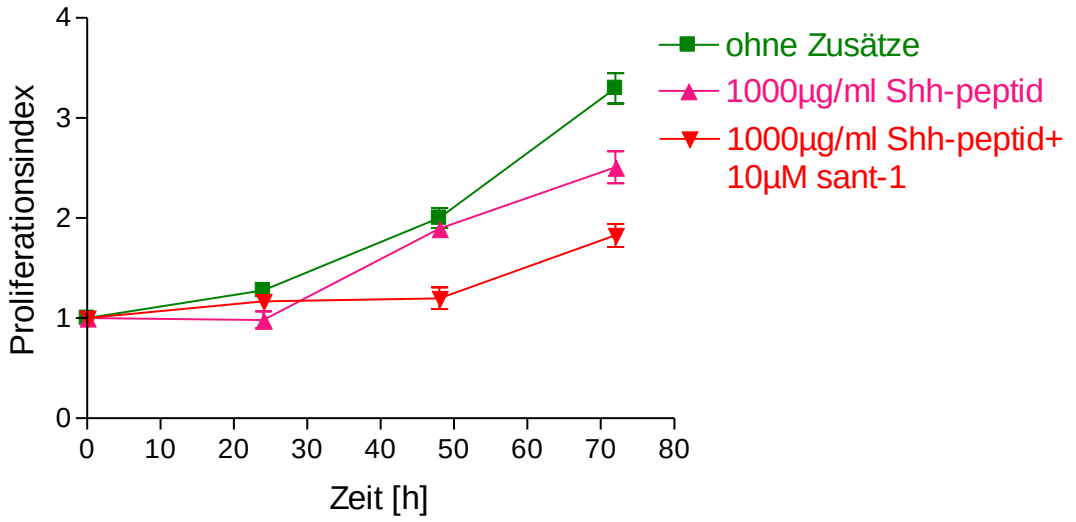


Abb. 36: Lymphknotenmetastase (LN1590): Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit sant-1

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM sant-1	< 0,001	< 0,01

3.3. Tumorstammzelllinie Barrett-Karzinom PT1590

Die cd133-positiven-Tumorzellen in dem Primärtumor zeigen eine etwas schwächere Proliferationsrate als die nicht selektierten Zellen (vgl. Abb. 24).

Die Wirkung des KAAD-Cyclopamine auf das Wachstumsverhalten ist bei beiden Zelllinien, den Selektionierten und Nichtselektionierten, vergleichbar. Dagegen hemmt Tomatidine das Wachstum dieser Stammzellen viel stärker (Abb. 37).

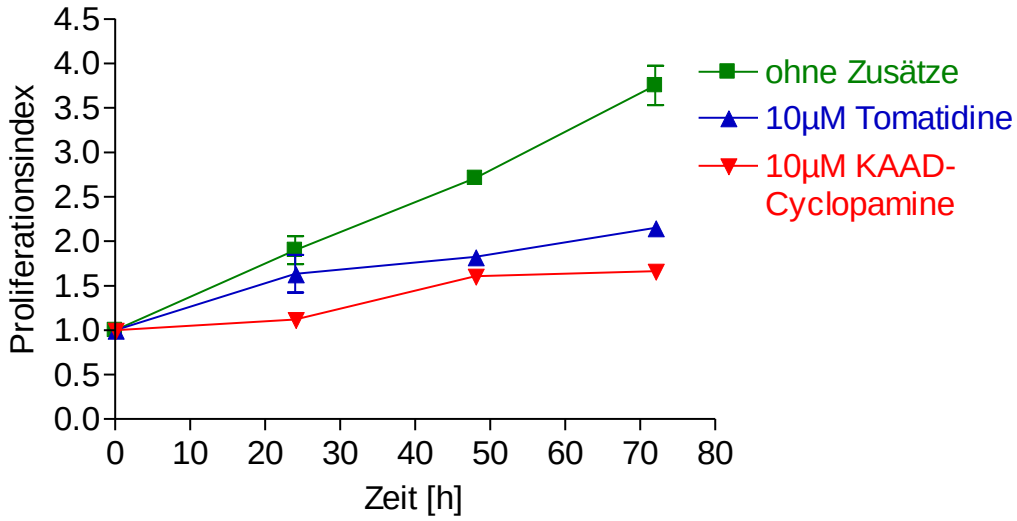


Abb. 37: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 positive Zellen: Gabe von KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

Bei einer Verlängerung des Beobachtungszeitraumes bis 96 Stunden verändert sich nichts am Wachstumsverhalten der Zellen der drei Kollektive. Es kommt allerdings zu einem starken Wachstumsschub der Zellen ohne Zusätze im letzten Messungszeitraum (Abb. 38).

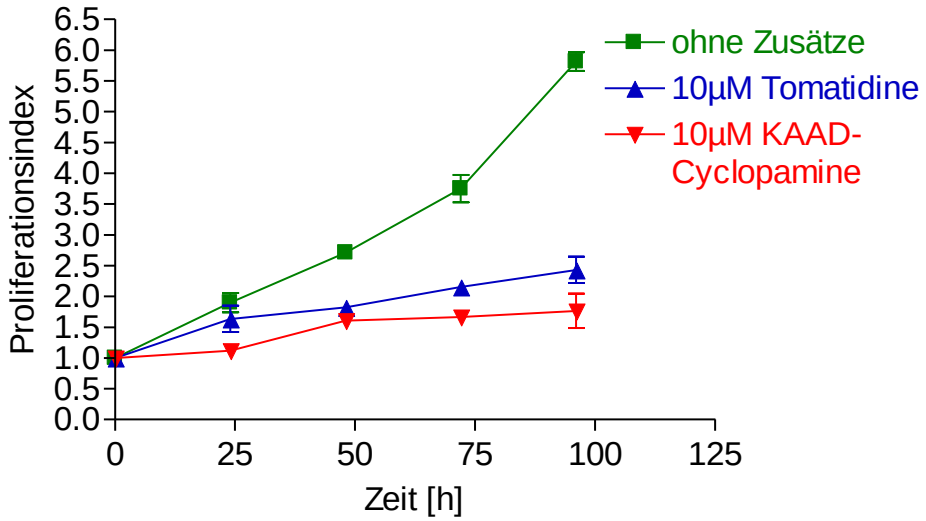


Abb. 38: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 positive Zellen: Gabe von KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine bei verlängertem Messzeitraum

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

p-Werte (96h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

Die gleiche Wirkung wie Tomatidine kann man mit sant-1 erzielen (Abb. 39).

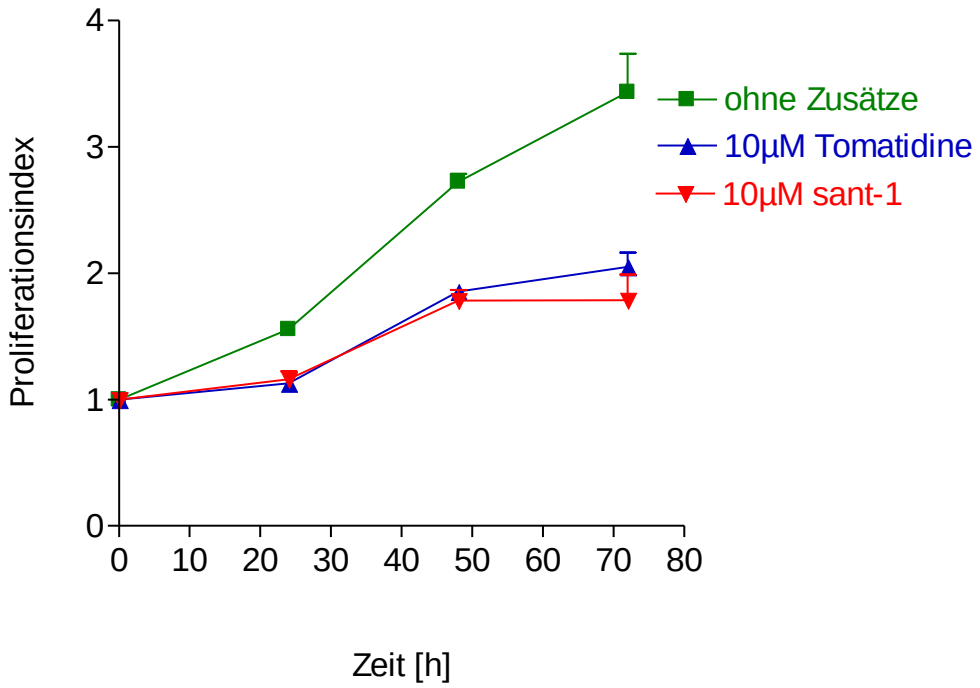


Abb. 39: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 positive Zellen: Gabe von sant-1 im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (48h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM sant-1	< 0,001	N.S.

3.4. Nichtstammzellen Barrett-Karzinom PT1590

Das Wachstumsverhalten der Nichtstammzellen (cd133 negativ), die etwa 95 Prozent der Gesamtpopulation ausmachen, entspricht weitgehend dem Proliferationsverhalten das auf den Seiten 47 bis 54 dargestellt ist. Lediglich der Einfluss des Tomatidine ist auf die Nichtstammzellpopulation ausgeprägter (Abb. 40).

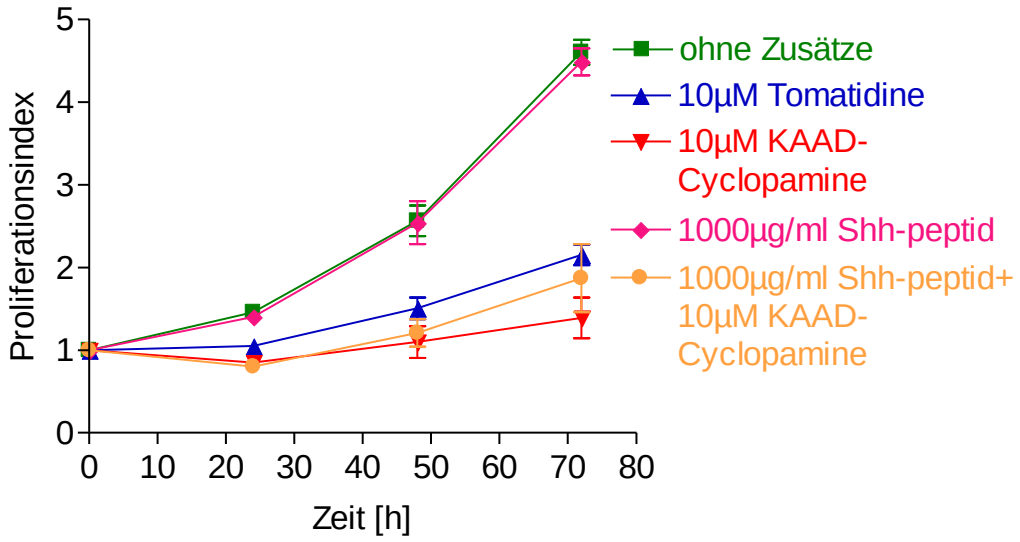


Abb. 40: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 negative Zellen: Gabe von KAAD-Cyclopamine, 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	10µM KAAD-Cyclopamine	10µl/ml Shh-peptid
10µM Tomatidine	< 0,001			
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,05		
10µl/ml Shh-peptid	N.S.	< 0,001	< 0,001	
10µl/ml Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.	N.S.	< 0,001

3.5. Tumorstammzelllinie Lymphknotenmetastase LN1590

Wie beim Primärtumor zeichnen sich die cd133-positiven-Tumorzellen der Metastase durch eine etwas geringere Proliferation gegenüber den nichtselektionierten Metastasezellen aus (vgl. Abb. 31).

Bei den cd133-positiven-Zellen der Lymphknotenmetastase fällt auf, dass diese durch KAAD-Cyclopamine und sant-1 stärker in ihrem Wachstum gehemmt werden als die Zellen der unselektionierten Zelllinie (vgl. Abb. 31 und Abb. 35) und die Zellen der Restpopulation (vgl. Abb. 44, S. 68).

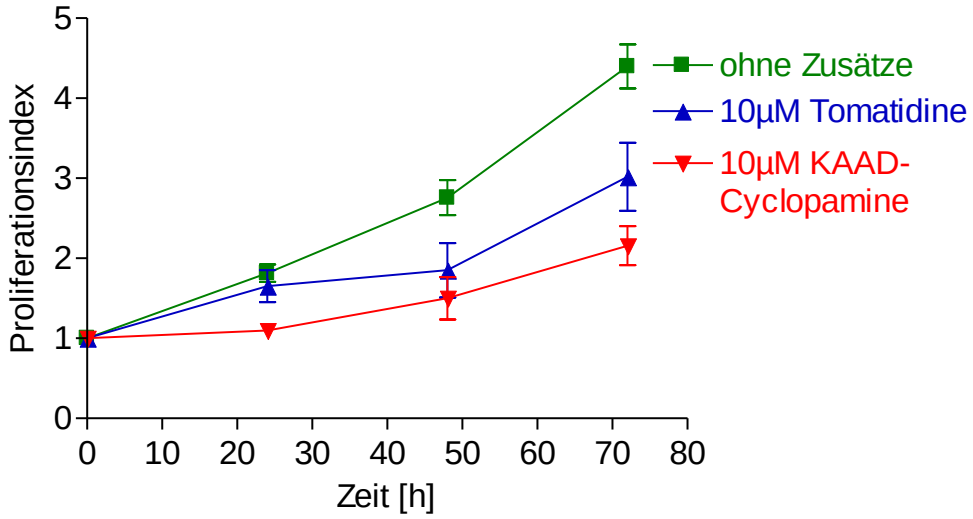


Abb. 41: Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 positive Zellen: Gabe von KAAD-Cyclopamine im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

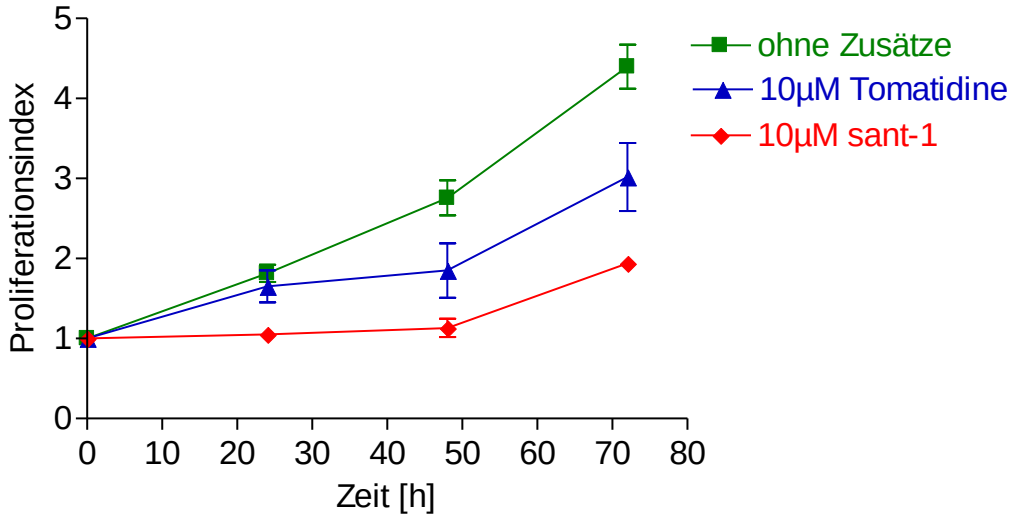


Abb. 41: Lymphknotenmetastase (LN 1590) cd133 positive Zellen: Gabe von sant-1 im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine
10µM Tomatidine	< 0,001	
10µM sant-1	< 0,001	N.S.

Die Shh-peptid-Wirkung ist bei den cd133-positiven-Tumorzellen und der Restpopulation gleich (vgl. Abb. 43 und Abb. 44).

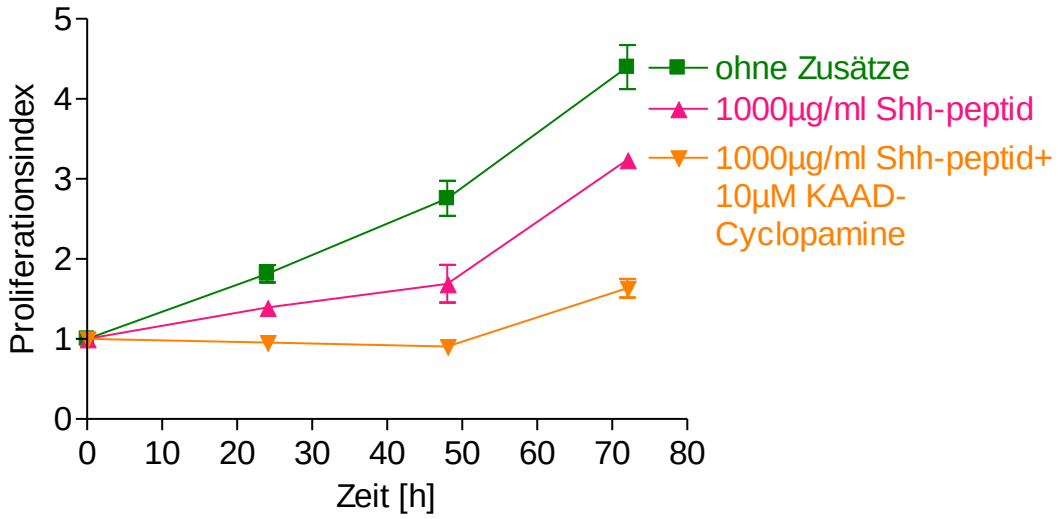


Abb. 42: Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 positive Zellen: Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	N.S.	
1000µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	< 0,001

3.6. Nichtstammzellen Lymphknotenmetastase LN1590

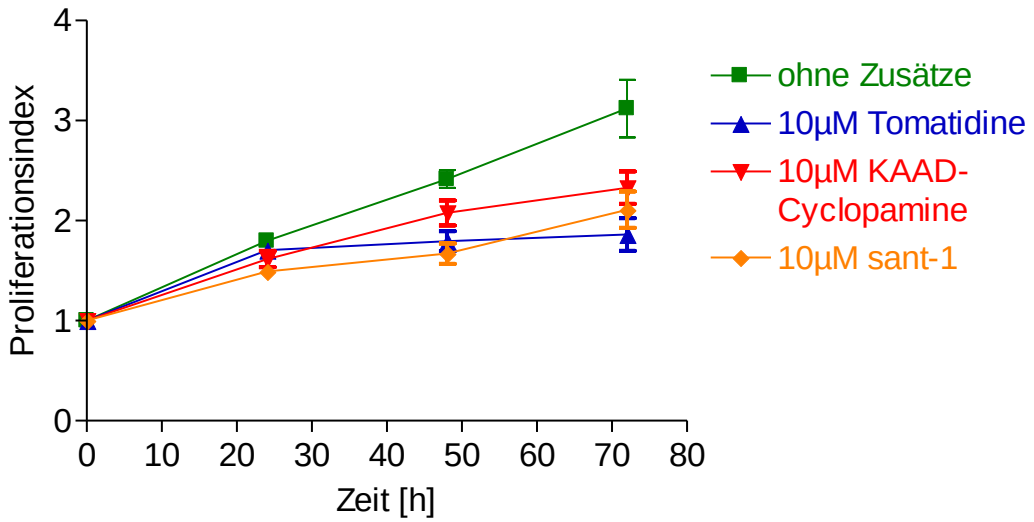


Abb. 43: Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 negative Zellen: Gabe von KAAD-Cyclopamine und sant-1 im Vergleich zu Tomatidine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	10µM Tomatidine	10µM KAAD-Cyclopamine
10µM Tomatidine	< 0,001		
10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.	
10µM sant-1	< 0,001	N.S.	N.S.

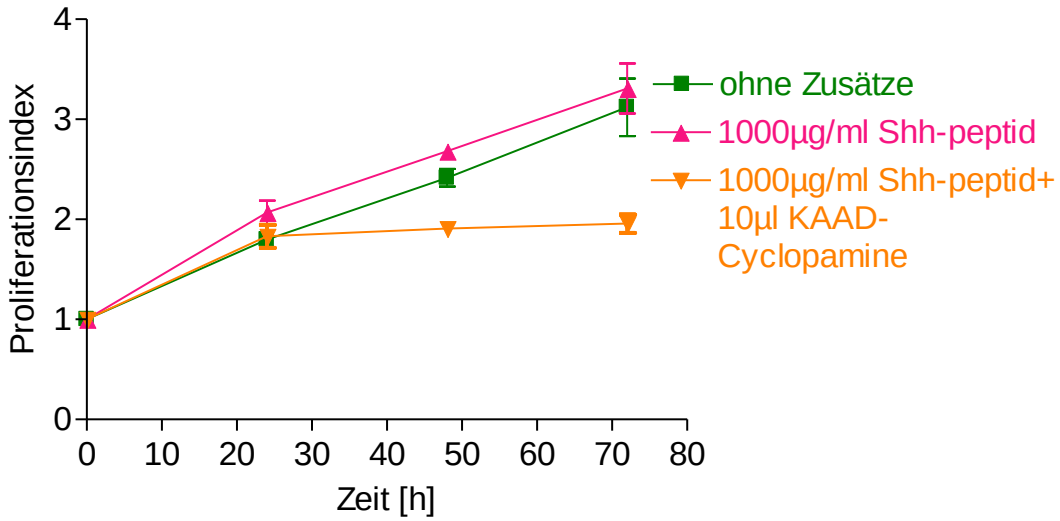


Abb. 44: Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 negative Zellen: Gabe von 1000µg/ml Shh-peptid und in Kombination mit KAAD-Cyclopamine

p-Werte (72h)

	ohne Zusätze	1000µg/ml Shh-peptid
1000µg/ml Shh-peptid	< 0,001	
1000µg Shh-peptid+10µM KAAD-Cyclopamine	< 0,001	N.S.

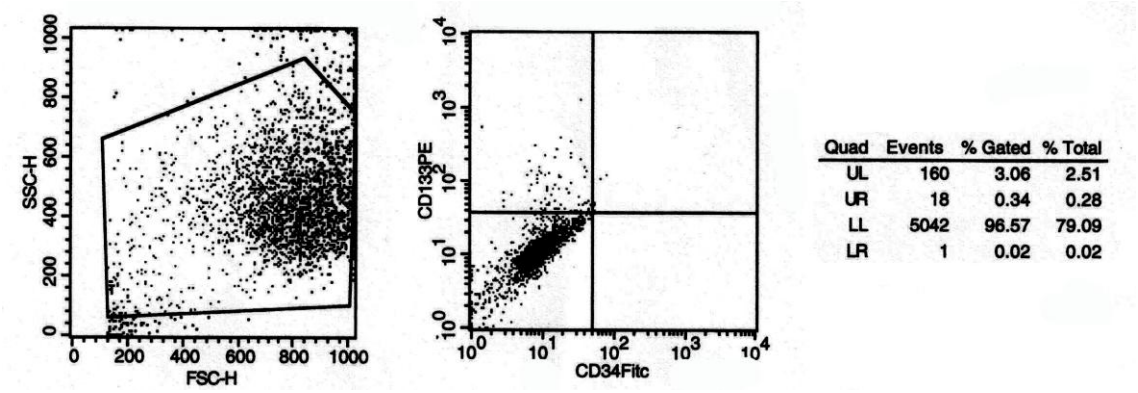
3.7. FACS-Ergebnisse

Mit dem FACS-Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass cd133 positive Zellen in der Zelllinie des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase vorhanden waren (Abb. 46, Abb. 48, Abb. 50).

Bei den Zellen des Primärtumors lag der Stammzellanteil mit 4 Prozent etwas niedriger als bei den Zellen der Metastase (6 Prozent).

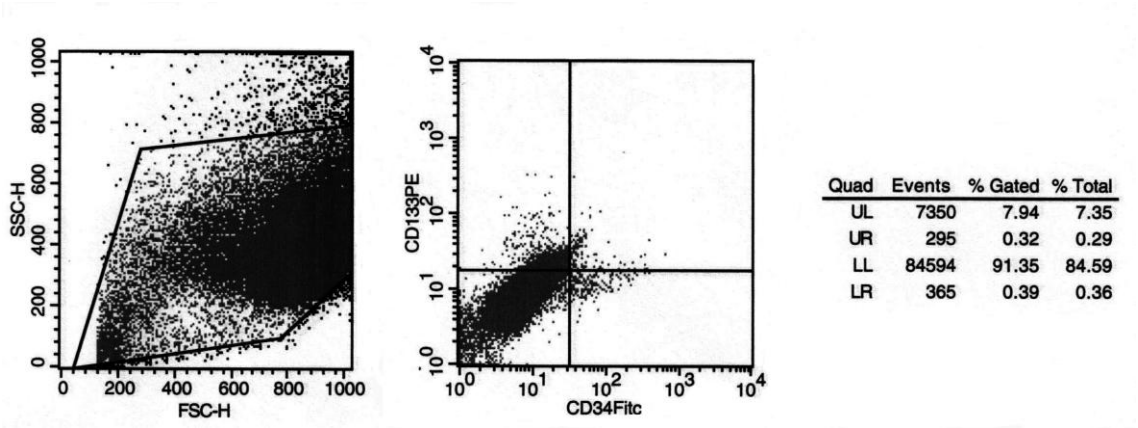
In einem ergänzenden Versuch wurde getestet wie stabil die Stammzellpopulation (cd133 positive Zellen) ist. Die mit dem MACS-Verfahren aufgetrennten Zellen wurden rekultiviert.

Nach mehreren Tagen wandeln sich offensichtlich Stammzellen in reife Tumorzellen um, so dass der Gehalt an Stammzellen kontinuierlich abnimmt. Dieses Phänomen ist beim Primärtumor getestet worden und in Abb. 47 zu sehen.



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	160	3.06	2.51
UR	18	0.34	0.28
LL	5042	96.57	79.09
LR	1	0.02	0.02

Abb. 45: Lymphknotenmetastase (LN1590): Anteil der cd133 positiven Zellen im linken oberen Feld (UL)



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7350	7.94	7.35
UR	295	0.32	0.29
LL	84594	91.35	84.59
LR	365	0.39	0.36

Abb. 46: Barrett-Karzinom (PT1590): Anteil der cd133 positiven Zellen im linken oberen Feld (UL) am 3.Tag nach Rekultivierung

3.7.39. Barrett-Karzinom PT1590 cd133 positive Zellen

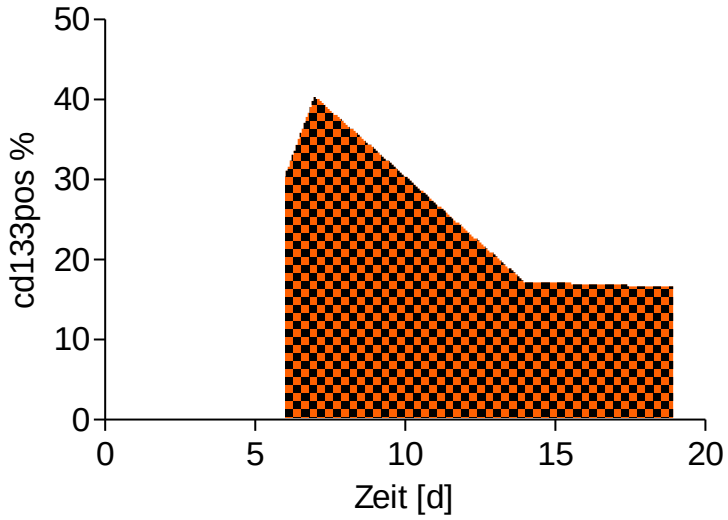


Abb. 47: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 positive Zellen: prozentualer Anteil der Stammzellen

Die Rekultivierung der Restpopulation beider Zelllinien ergibt eine biphasische Kurve. In den ersten zwei Tagen nimmt die Stammzellzahl stark zu, dann fällt die Kurve am dritten Tag ab, um dann am elften Tag einen zweiten, wenn auch nicht vergleichbar hohen Gipfel wie nach zwei Tagen, auszubilden (Abb. 49, Abb. 51).

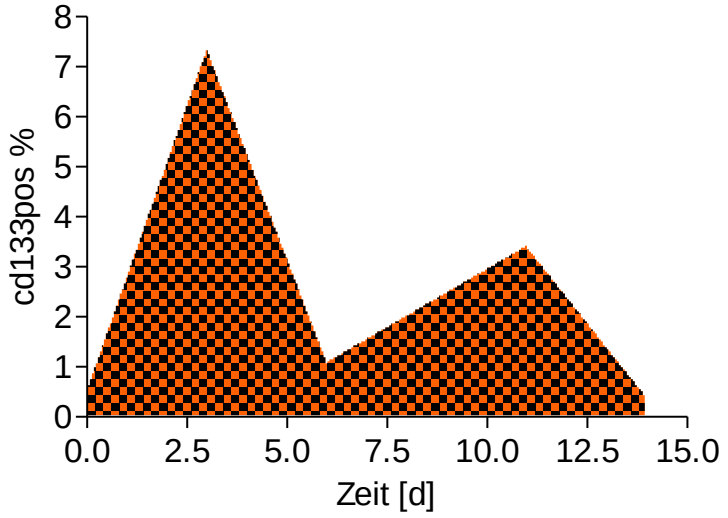


Abb. 48: Barrett-Karzinom (PT1590) cd133 positive Zellen: prozentualer Anteil der Stammzellen nach Rekultivierung

3.7.40. Lymphknotenmetastase LN1590 cd133 positiven Zellen

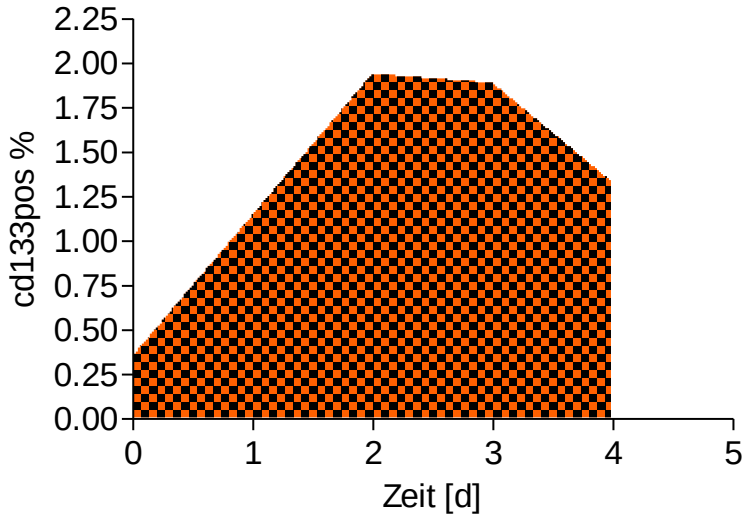


Abb. 49: Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 positive Zellen: prozentualer Anteil der Stammzellen

3.7.41. Barrett-Karzinom PT und Lymphknotenmetastase LN1590 cd133 positive Zellen

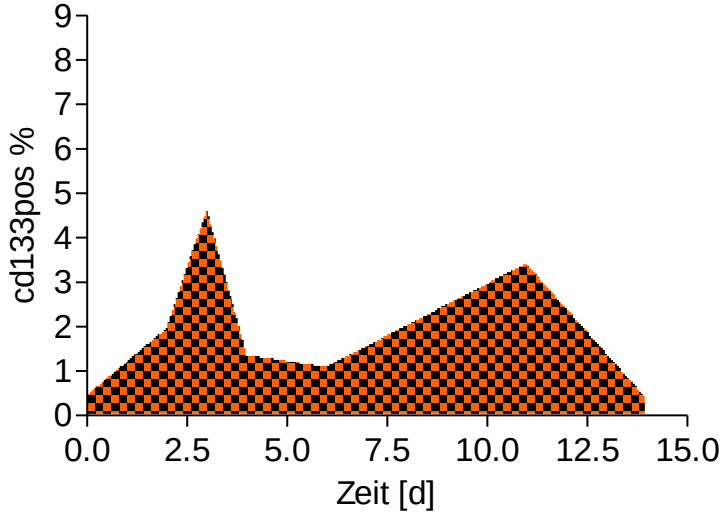


Abb. 50: Barrett-Karzinom (PT1590) und Lymphknotenmetastase (LN1590) cd133 positive Zellen: prozentualer Anteil der Stammzellen nach Rekultivierung

4. DISKUSSION

4.1. Barrett-Karzinom-Zellen (Primärtumor und Metastase)

Vor dem Hintergrund, dass Cyclopamine und sein synthetisches Analogon *KAAD-Cyclopamine*, nicht nur Missbildungen hervorrufen, sondern auch das Zellwachstum inhibieren können, wurde an Zellen eines Barrett-Karzinoms, die bei einer Ösophagusresektion gewonnen worden waren, in-vitro-Untersuchungen zur zytostatischen Wirksamkeit gemacht.

4.1.42. KAAD-Cyclopamine- und sant-1-Zytostase

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass KAAD-Cyclopamine in der Tat zytostatische Wirkung auf die Primärtumorzellen des Barrett-Karzinoms ausübt. Die proliferationhemmende Wirkung der zusätzlich verwendeten Substanz sant-1 fiel dagegen wesentlich schwächer aus. Noch schwächer war der zytostatische Effekt beider Substanzen auf die Zellen der Lymphknotenmetastase (Abb. 52, Abb. 53).

Dieses schlechtere Ansprechen der Metastasen könnte auf eine Malignitätssteigerung oder Dedifferenzierung zurückzuführen sein, die die Tumorzellen nach lymphogener Streuung und Ansiedelung in den Lymphknoten durchgemacht haben. Der lichtmikroskopisch ermittelte Malignitätsgrad des Primärtumors und seiner Metastasen wies zwar zytologisch in vitro keinen Unterschied auf, was allerdings bei den eingesetzten Methoden, wie Wachstumsgeschwindigkeit und Zellmorphologie wenig aussagekräftig ist. Es schließt zusätzliche genetische Veränderungen im Rahmen der Progression nicht aus. Diese Veränderungen könnten z.B. auch die Beteiligung anderer Signalwege in der Kanzerogenität der einzelnen Zelllinienklone widerspiegeln, die bei Blockade möglicherweise kompensatorisch die Proliferation unterhalten könnten.

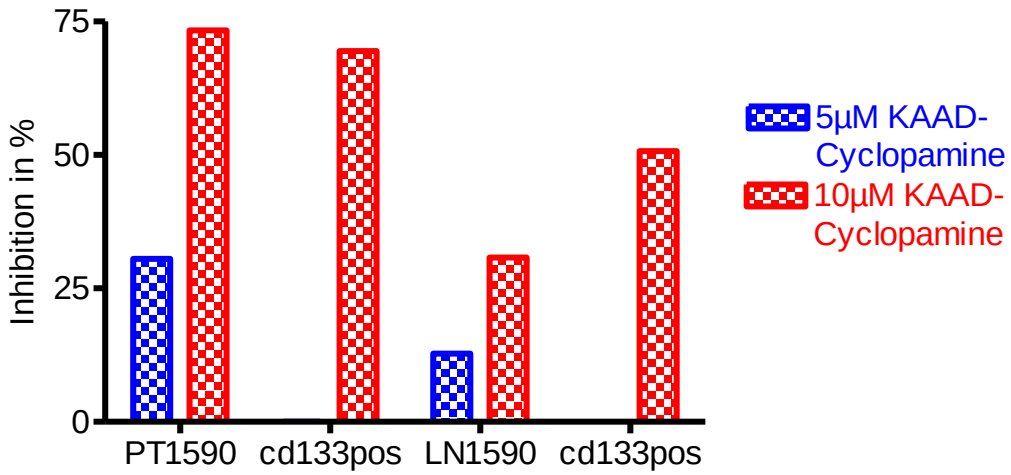


Abb. 51: Vergleich der zytostatischen Wirkung von KAAD-Cyclopamine bei den verschiedenen Zelllinien

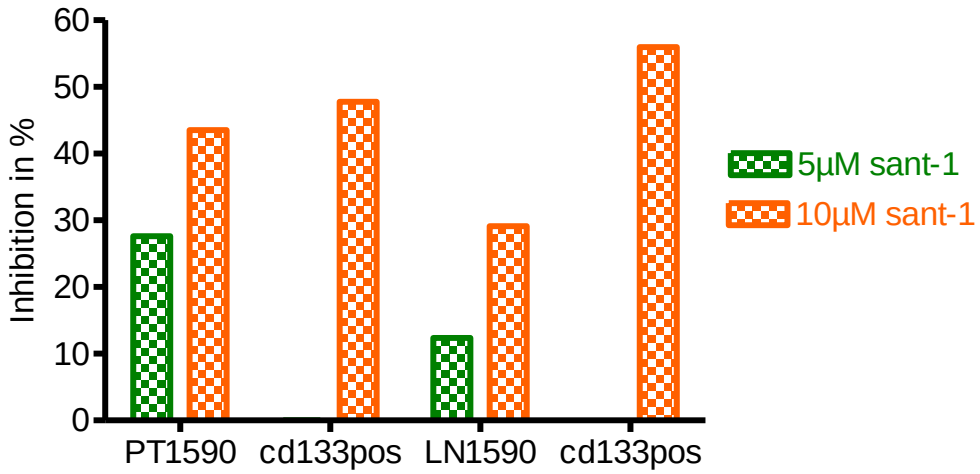


Abb. 52: Vergleich der Wirkung von sant-1 bei den verschiedenen Zelllinien

4.1.43. Cyclopamine-Wirkung bei anderen Tumoren

Die Substanz hemmt auch das Wachstum anderer Karzinome. So zeigte es eine Wirkung beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Hier wird der Zellzyklus in der G_0/G_1-Phase arretiert und zugleich eine Apoptose induziert. Bei Zellen eines großzelligen Lungenkarzinoms zeigte Cyclopamine jedoch keinen Effekt (Watkins et al. 2003).

Auch beim Pankreaskarzinom der Maus war der zytostatische Effekt in vitro wie in vivo vorhanden, so dass sich das Tumorwachstum verlangsamte (Thayer et al. 2003). Vergleichbare Resultate konnten Berman und Mitarbeiter auch an Medullablastomzellen (Berman et al. 2002) sowie an Zellen von

Karzinomen des Magens, der Gallenwege, des Pankreas und auch der Speiseröhre (Berman et al. 2003) erzielen.

Bei der ersten Untersuchung von Berman et al. verwendete man auch das potente Derivat KAAD-Cyclopamine, das in Konzentrationen von 1µM gegeben wurde und zytostatische Effekte hervorrief. Ein Erfolg bei der Behandlung von anderen Tumorentitäten – Primärkulturen eines Glioblastoms und eines Ependymoms – blieb aber aus, denn KAAD-Cyclopamine blieb wirkungslos (Berman et al. 2002).

Dahmane et al. erreichten 1997 mit Cyclopamine in Konzentrationen von 0,5µM und 5µM eine Inhibition des Wachstums von Gliomen, Glioblastomen und Astrozytomen. Die verschiedenen Zelllinien sprachen unterschiedlich stark auf die zytostatische Substanz an. Dieses Verhalten so vermuteten die Autoren, ist auf Mutationen des unten beschriebenen Zielsignalweges zurückführen (Dahmane et al. 2001).

In jüngster Zeit erreichte man auch bei Zellen von Mamma-Karzinomen einen zytostatischen Effekt mit Cyclopamine (Katano 2005).

Ma et al. stellten sowohl bei Adenokarzinomen des Magens, als auch bei 14 von 22 primären Ösophaguskarzinomen, von denen vier Adenokarzinome waren, eine signifikanten Wachstumsverminderung mit KAAD-Cyclopamine fest (Ma et al. 2005a; Ma et al. 2005b).

4.1.44. Zytostase chemisch verwandter Substanzen zu sant-1 bei anderen Tumoren

Romer und Mitarbeiter konnten bei in-vivo-Versuchen an Mäusen das Wachstum von Medullablastomzellen mit einem Benzimidazol, also einer dem sant-1 chemisch nah verwandten Substanz, signifikant hemmen. Dabei viel auf, dass im Vergleich zu Cyclopamine geringere Dosen notwendig waren (Romer et al. 2004; Romer u. Curran 2005).

4.1.45. Angriffspunkt KAAD-Cyclopamine und sant-1 am Signalweg

Die von uns nachgewiesene zytostatische Wirkung lässt sich an einem Befund von Cooper und Incardona erklären. Die Autoren wiesen nach, dass Cyclopamine am Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg, der bereits in der Einleitung auf S. 23-28 ausführlich beschrieben wurde, angreift (Cooper et al. 1998; Incardona et al. 1998). Es blockiert den Signalweg (Taipale et al. 2000). Die Blockade ist beim synthetischen Analogon KAAD-Cyclopamine um ein vielfaches stärker als bei Cyclopamine.

Cyclopamine bindet an das „heptahelical bundle“ des Smoothened-Proteins. Dadurch wird der Hedgehog-Signaltransduktionsweg unterbrochen, die Signalwirkung bleibt aus (Chen et al. 2002a). Ma und Mitarbeiter haben deshalb diese Substanz als Smoothened Antagonist bezeichnet (Ma et al. 2005b).

KAAD-Cyclopamine zeigt an den Lymphknotenmetastasezellen keine Wirkung mehr. Wir hatten das auf Seite 73 mit einer Dedifferenzierung erklärt. Vor dem Hintergrund des zytostatischen Angriffspunktes am Signalweg muss gefolgert werden, dass diese Interaktion in diesem fortgeschrittenen Tumorstadium nicht mehr möglich ist. So ließen sich auch die Befunde von (Dahmane et al. 2001; Berman et al. 2002; Watkins et al. 2003; Ma et al. 2005b) erklären, die an anderen Tumorentitäten keine Proliferationshemmung mit Cyclopamine beziehungsweise mit KAAD-Cyclopamine erreichen konnten.

Des Weiteren kann an unserem Lymphknotenmetasten-Befund wahrscheinlich gemacht werden, dass KAAD-Cyclopamine keinen generellen zytostatischen Effekt besitzt.

Eine weitere zytostatische Substanz ist sant-1. Chen und Mitarbeiter entdeckten es im Jahr 2002. Es ist eine niedermolekulare Substanz, die das Smoothened-Protein modulieren kann. Es bindet ebenfalls, jedoch an anderer Stelle, direkt an den Smoothened-Rezeptor (Abb. 7, S. 20) und kann somit gleichermaßen den Signalweg inhibieren. Dieser Effekt war auch an onkogenen Mutationen des Smoothened-Rezeptors nachweisbar, bei denen Cyclopamine keine Wirkung zeigte (Chen et al. 2002b).

4.1.46. Negativkontrollsubstanz Tomatidine

Die Substanz Tomatidine ist erstmals 1965 als steroidales Alkaloid des Nachtschattengewächses Solanum dulcamara beschrieben worden (Ronsch u. Schreiber 1965). Ein Jahrzehnt später konnte gezeigt werden, dass Tomatidine im Gegensatz zu der chemisch nah verwandten Substanz KAAD-Cyclopamine nicht teratogen ist (Keeler 1978).

Es greift auch nicht in den Sonic-hedgehog-Signalweg ein (Watkins et al. 2003). So ist es nicht verwunderlich, dass mit dieser Substanz keine vergleichbare zytostatische Wirkung erzielt werden konnte (Abb. 24, S. 4853, Abb. 31, S. 55). Die Substanz ist allerdings nicht wirkungslos. Sie bremst in höheren Dosen das Wachstum (Abb. 25, S. 49). Dieser Effekt ist vermutlich auf die allgemein toxische Wirkung dieser Substanz zurückzuführen.

Der unterschiedliche zytostatische Effekt von Cyclopamine und Tomatidine konnte auch bei Medullablastomzellen aufgezeigt werden. In vitro hemmt Cyclopamine zu 60-80 Prozent stärker das Tumorwachstum als Tomatidine (Berman et al. 2002).

Bei Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigte Tomatidine in vitro keine Verlangsamung des Zellwachstums (Watkins et al. 2003). Die Autoren hatten allerdings nur Konzentrationen bis 5µM verwendet.

Wenige Monate später setzten auch Thayer et al. Tomatidine erfolgreich als Negativkontrollsubstanz gegenüber Cyclopamine bei Pankreaskarzinomzellen ein (Thayer et al. 2003).

4.1.47. Wirkung des Proliferationsaktivators Shh-peptid

Versuche mit einem Proliferationsaktivator, dem amino-terminalen Fragment des Sonic hedgehog Proteins, das Sonic hedgehog peptide (Shh-peptid), das an Patched bindet und somit den Signaltransduktionsweg startet, zeigten eine geringfügige Wachstumssteigerung der Zellen.

Dieses auch von uns verwendete amino-terminale Stück des Sonic hedgehog Proteins (Shh-N) wirkt bei der neuronalen Entwicklung mit und kann je nach Konzentration diese beschleunigen (Roelink et al. 1995).

Die Aktivierung des Signalweges durch das rekombinante Peptid wurde zuerst von Nakamura und Mitarbeitern bei Osteoblasten entdeckt, die daraufhin eine progrediente Differenzierung durchliefen (Nakamura et al. 1997; van der Horst et al. 2003).

Wurde dieses Peptid in Verbindung mit den Zytostatika KAAD-Cyclopamine oder sant-1 gegeben, verstärkte sich in unseren Versuchen die wachstumshemmende Wirkung der Mittel zu Anfang, fiel im Verlauf allerdings wieder ab (Abb. 28, S. 52, Abb. 30, S. 54, Abb. 33, S. 57, Abb. 36, S. 60).

Ähnliches konnten Taipale und Mitarbeiter feststellen, die nach zwei Tagen Inkubationszeit bei einer kombinierten Gabe des Shh-peptids und KAAD-Cyclopamine bei einem Vergleich zweier Zelllinien – eine mit einem onkogenen Defekt im Smoothened Rezeptor eine weitere deren DNS das Shh-peptid transkribierte – zeigen konnten, dass bei der Zelllinie, die vom Shh-peptid aktiviert wurde, eine stärkere Wachstumsinhibition nachzuweisen war (Taipale et al. 2000).

Bei Versuchen mit Pankreas-, Magen-, Gallenwegs- und auch Ösophaguskarzinomzellen fanden Berman und Mitarbeiter einen zur Konzentration des Shh-peptids (0 - 40nM) proportionalen Wachstumsanstieg (Berman et al. 2003).

4.2. Tumorstammzellen

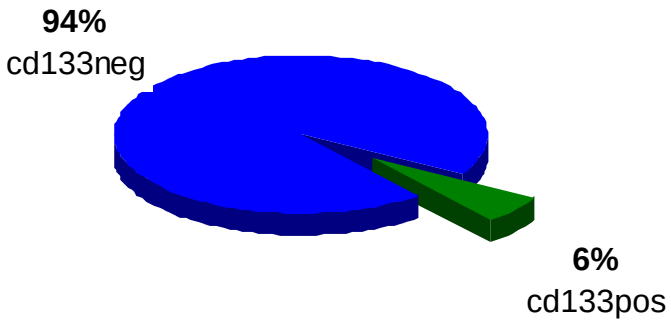


Abb. 54: prozentualer Anteil der Stammzellpopulation (cd133pos) im Vergleich zur Restpopulation (cd133neg)

In unserer Tumorpopulation fanden sich Zellen, die mit dem Antikörper gegen cd133 reagierten. Vermutlich handelt es sich dabei um adulte Tumorzellen, die sich durch eine größere Pluripotenz auszeichnen. Dabei könnte es sich um Tumorstammzellen handeln. Tumorstammzellen sind zwar bisher nur bei akuter und chronischer myeloischer Leukämie in der Blastenkrise (Bonnet u. Dick 1997), Medulloblastomen und Glioblastomen nachgewiesen worden (Singh et al. 2003). Zu ihrer Kennzeichnung diente uns das cd133-Antigen. Dieses Antigen tragen ebenfalls nicht tumoröse, gut charakterisierte und häufig untersuchte humane hämatopoetischen Stammzellen (Miraglia et al. 1997). Aber auch bei kindlichen Hirntumoren wurden cd133 positive Zellen nachgewiesen (Hemmati et al. 2003). Weitere Tumorentitäten waren kindliche Hämangiome (Yu et al. 2004), großzellige Bronchialkarzinome (Hilbe et al. 2004) sowie duktale Pankreaskarzinome (Yoshida et al. 2003).

So kann man annehmen, dass Tumorzellen hierarchisch gegliedert sind. An der Spitze steht die Tumorstammzelle, die den wachsenden Tumor mit ausdifferenzierten Tumorzellen versorgt.

Die von uns separierte Population, die wir aufgrund ihrer cd133-Positivität für Tumorstammzellen halten, zeigte eine ähnliche Proliferationsrate wie die unfraktionierte Tumorpopulation. Auffällig war allerdings, dass diese Tumorstammzellen nach wenigen Tagen in der Kultur ihr kennzeichnendes

Merkmal mehr oder weniger verloren hatten. Das deutet auf eine Ausreifung hin. Wenn diese Interpretation stimmt, muss man aber annehmen, dass die reiferen Exemplare ihr Wachstumsverhalten nicht geändert haben und weiterhin „unendlich lebende Zellen“ bleiben. Nicht ganz auszuschließen ist, dass in der cd133-positiven-Population einzelne cd133-negative-Zellen unerkannt geblieben sind und sich nach Vermehren an dem cd133-positiven Pool beteiligt haben.

In der cd133-negativen-Tumorpopulation waren nach einigen Tagen wieder cd133-positive-Zellen nachzuweisen, und zwar unter 10%, also etwa in der gleichen Größenordnung wie in der nicht separierten Ausgangspopulation. Das lässt sich kaum durch Konversion erklären. Vielmehr dürften primär nicht erkannte cd133-positive-Tumorzellen ausgereift sein.

Wir sind der Frage nachgegangen, ob die beiden Zellpopulationen, die Antigen cd133-positive wie –negative unterschiedlich auf die Gabe des zytostatischen KAAD-Cyclopamine und sant-1 reagieren.

Die Zellen, die das cd133-Antigen nicht exprimierten und den überwiegenden Anteil der Zellpopulation ausmachten (>95 Prozent), verhielten sich, wie zu erwarten war, nicht anders als die Normalpopulation. Vermutlich kam es aber durch das Auftrennungsverfahren zu einer Schädigung einiger Zellen. Dies hatte Auswirkungen auf die Wachstumskurve dieser Zellen, die flacher verlief und stärker durch Tomatidine negativ beeinflusst wurde als bei den unaufgetrennten Zelllinien (Abb. 37, S. 61, Abb. 41, S. 65).

Auch die Tumorstammzelllinien (cd133postiv) wurden durch diese Vorschädigung stärker in ihrem Wachstum inhibiert.

Auffallend war, dass die Stammzellen der Lymphknotenmetastasen sowohl durch KAAD-Cyclopamine, besonders intensiv aber durch sant-1 signifikant in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Dabei fiel vor allem die starke Inhibition durch sant-1 in den ersten 48 Stunden auf. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Zellen der Normalpopulation war ein nennenswerter Unterschied ersichtlich (Abb. 42, S. 66).

Die folgenden Abbildungen fassen den Vergleich der Wirkung von KAAD-Cyclopamine und sant-1 zwischen den verschiedenen Zellarten zusammen:

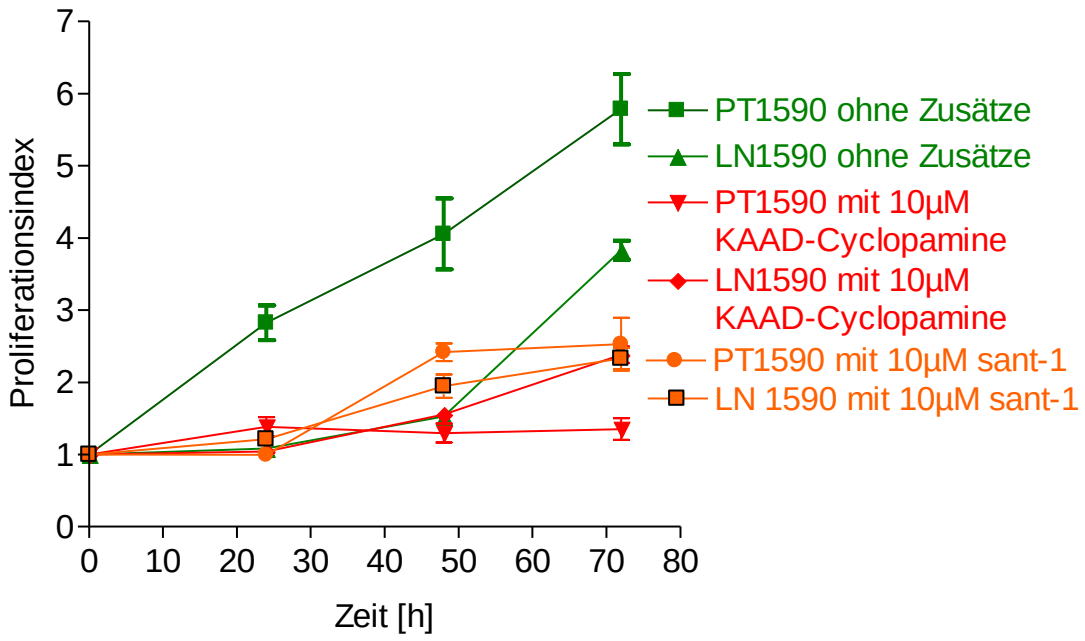


Abb. 54: Barrett-Karzinom (PT1590) und Lymphknotenmetastase (LN1590) sowie cd 133positive Zellen: Vergleich der Wirkung von KAAD-Cyclopamine und von sant-1

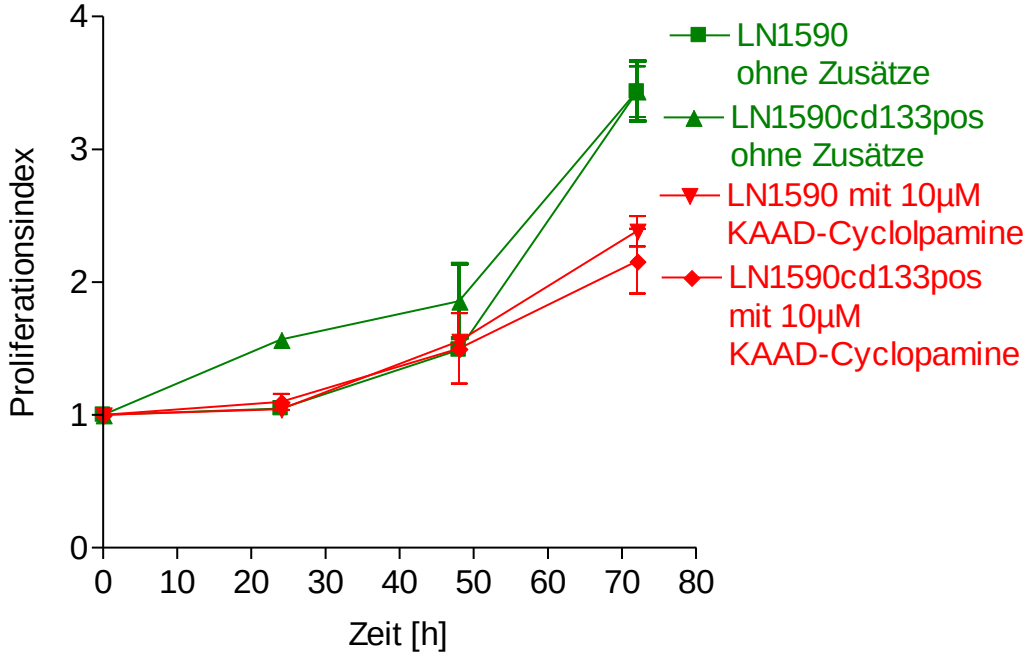


Abb. 55: Lymphknotenmetastase (LN1590) und cd133positive Zellen: Vergleich der Wirkung von KAAD-Cyclopamine

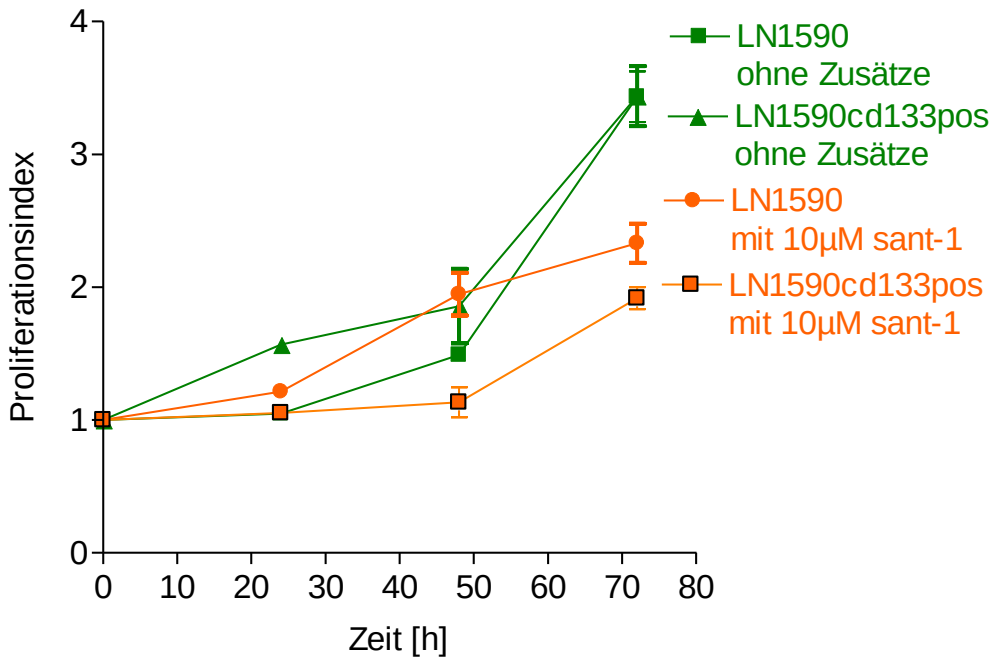


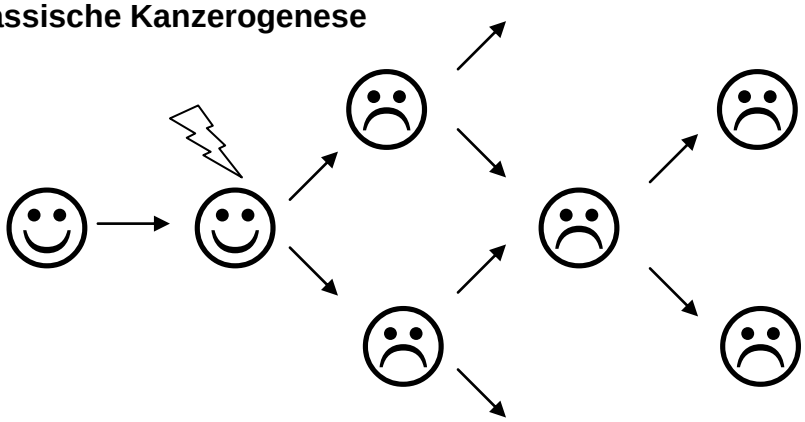
Abb. 56: Lymphknotenmetastase (LN1590) und cd133positive Zellen: Vergleich der Wirkung von sant-1

Zwischen Embryogenese und der Kanzerogenese gibt es Gemeinsamkeiten: so zeichnen sich Stammzellen und Tumorzellen durch eine weitgehend autonome Proliferationsneigung aus. Die einen sind noch undifferenziert, die anderen mehr oder weniger entdifferenziert, wobei die Tumorzellen sowohl die Progedienz zur Entdifferenzierung wie die Möglichkeit der Redifferenzierung in sich tragen. Die Gemeinsamkeit wird noch unterstrichen durch die Tatsache, dass Tumorzellen und adulte wie embryonale Stammzellen den Sonic-hedgehog-Signalweg beschreiten (Parisi u. Lin 1998; Zhu et al. 1999; Taylor et al. 2000; Bhardwaj et al. 2001; Reya et al. 2001; Kopper u. Hajdu 2004). Dafür spricht auch der Befund, dass proliferierende Haarstammzellen den Patched-Rezeptor exprimieren und somit den Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg aktivieren (Oro u. Higgins 2003).

Ruiz i Altaba und Mitarbeiter gehen sogar soweit, dass sie spekulieren, die Kanzerogenese könne in den einzelnen Geweben von den darin stets vorhandenen Stammzellen ausgehen (Ruiz i Altaba et al. 2002). In die gleiche Richtung wiesen Überlegungen von Meszoely et al. (Meszoely et al. 2001). Viele Befunde der experimentellen Kanzerogenese sprechen gegen die Stammzelltheorie: so beobachtete man bei Nagern lange vor Einsetzen einer autonomen Proliferation präkanzeröse Veränderungen, was dafür spricht, dass die Tumorinduktion die reife Gewebszelle trifft und hier die Tumortransformation beginnt und nicht bei der Stammzelle (=klassische Kanzerogenese).

Den neuen Theorien ist symbolisch der klassischen Krebsentstehungstheorie in Abb. 58 gegenübergestellt.

Klassische Kanzerogenese



Normale Proliferation

Stammzell-Kanzerogenese

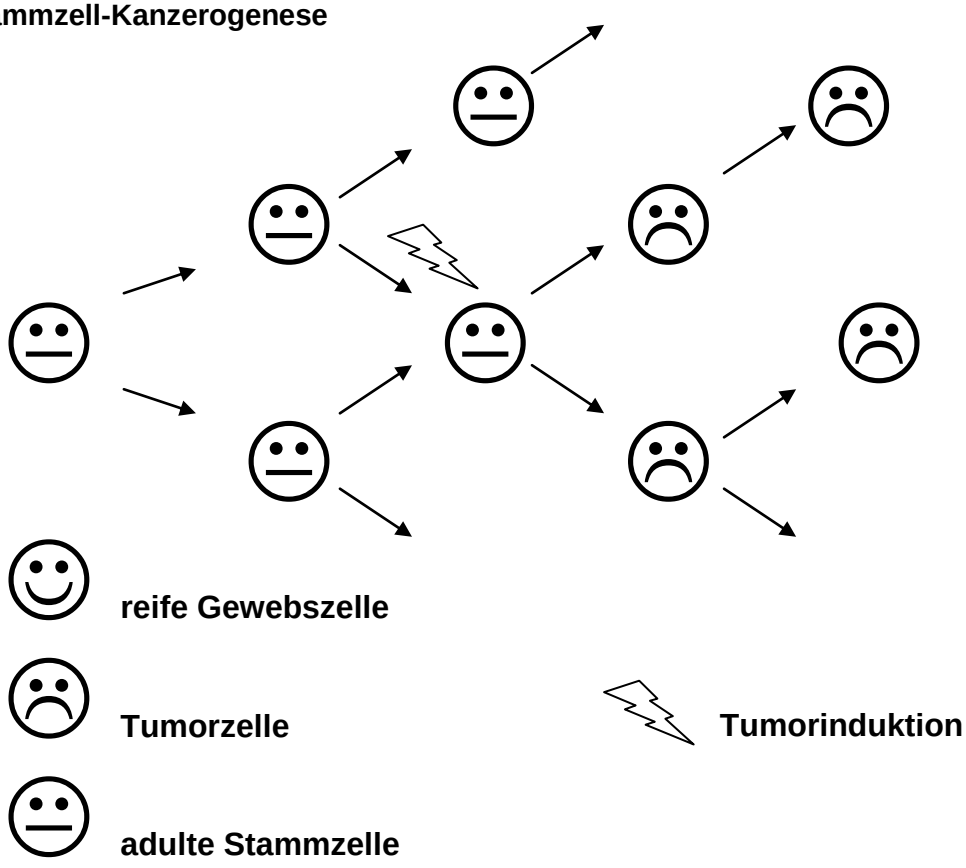


Abb. 57: Theorien der Kanzerogenese

Es konnte also gezeigt werden, dass die dargelegten Signalwege und ihre stimulierenden wie hemmenden Faktoren, eine bedeutsame Rolle bei der Proliferation und dem Wachstum spielen und deshalb auch bei der Kanzerogenese zu berücksichtigen sind. Wenn dem so ist, ist es folgerichtig, auch einen Zusammenhang mit der chemischen Zytostase herzustellen.

5. AUSBLICK

Der Speiseröhrenkrebs rangiert an sechster Stelle bei den tödlichen Krebserkrankungen (Pisani et al. 1999). Das war nicht immer so. Früher stand das Magenkarzinom als Tumor des oberen Verdauungstraktes ganz im Vordergrund. Seit einiger Zeit beobachten wir eine auffällige Verschiebung: das Magenkarzinom nimmt ab und der Speiseröhrenkrebs – vor allem das Barrett-Karzinom nimmt zu (Abb. 60, S. 91). Das hat zu mancherlei Spekulationen geführt. Die meisten Deutungsversuche basieren auf der Annahme veränderter Essgewohnheiten.

Einen neuen Aspekt hat das Forscherteam um Blaser ins Spiel gebracht. Blaser stellt einen Zusammenhang von Barrett-Karzinom und Helicobacter-pylori-Besiedlung her. Zum besseren Verständnis seien einige Bemerkungen zu dem erst jüngst wiederentdeckten Keim des Magens angeführt.

5.1. Helicobacter pylori

Helicobacter pylori (Abb. 59) ist zum ersten Mal vor etwa 100 Jahren beschrieben worden. Das Bakterium geriet in Vergessenheit, bis 1984 die australischen Ärzte Barry J. Marshall und J. Robin Warren wieder auf es aufmerksam wurden. Mit Spezialfärbungen konnten sie Helicobacter pylori leicht in Schleimhautschnitten des Magens identifizieren. Auch gelang ihnen die Anzüchtung (Marshall u. Warren 1984).

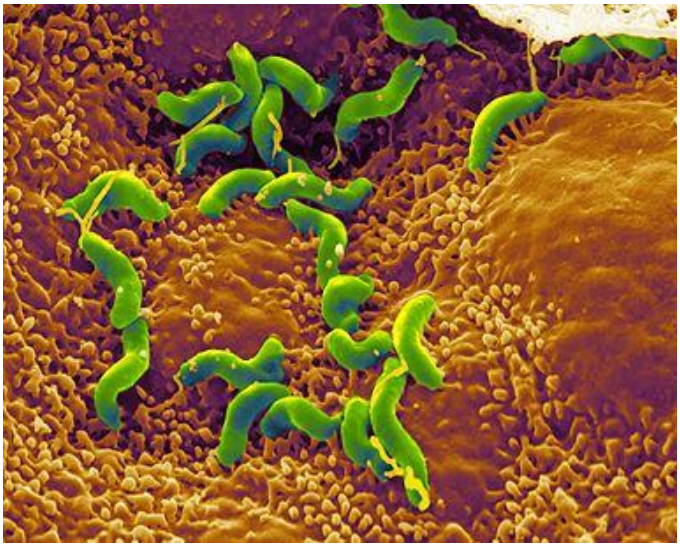


Abb. 58: Helicobacter pylori

Bald darauf erkannten die Mediziner (Blaser 2005) den Zusammenhang, dass die mit diesem Bakterium infizierten Personen ein erhöhtes Risiko für Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre haben. In Studien vieler Arbeitsgruppen zeigte sich, dass eine Koinzidenz von Helicobacter pylori Infektion und Magenkrebs besteht.

Seit den systematischen Studien über den Helicobacter fällt auf, dass Helicobacter pylori Infektionen in Europa und Nordamerika abnehmen. Während man in den 80er Jahren noch von einer Infektionsrate von wenigen Prozent ausging, sind inzwischen 35 bis 50 Prozent betroffen. In den weniger entwickelten Ländern ist dieser Rückgang nicht zu verzeichnen.

Der Rückgang der Helicobacter pylori Infektionen in den Industrienationen ist nach Ansicht der Epidemiologen auf den verbesserten Hygienestandard und den häufigen Einsatz von Antibiotika zurückzuführen. Dabei ist nicht an den gezielten Einsatz gegen den Helicobacter zu denken. Auch bei der Behandlung anderer bakterieller Infekte könnte der Helicobacter eradiziert werden.

Es ist verständlich, dass mit dem Rückgang der Helicobacter-Infektionen auch die Morbidität und die Mortalität der Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre sanken. Auch das Auftreten von Magenkarzinomen nimmt stetig ab, was für den Kausalzusammenhang spricht.

Blaser und Mitarbeiter gehen noch einen Schritt weiter: Sie postulieren auch einen Zusammenhang mit dem Barrett-Karzinom. Helicobacter-Infektionen, Refluxkrankheit, Barrett-Schleimhaut und Barrett-Karzinom zeigen ein reziprokes Verhältnis, denn mit dem Rückgang der Keime im Magen traten gehäuft Refluxkrankheit und Barrett-Schleimhaut auf; auch stieg die Zahl der Neuerkrankungen des Barrett-Karzinoms kontinuierlich an.

Mittlerweile hat man herausgefunden, dass der Erreger in vielen Varianten auftritt, die genetisch teils stark voneinander abweichen. Bald detektierte man wichtige Genabschnitte (=cagA/vacA), die als Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums anzusehen sind (Blaser 1996). Stoßen aktive Formen dieser Genvarianten auf Menschen mit einer ungünstigen Immunreaktion, die eine durch Helicobacter hervorgerufene Entzündung noch verstärken, ist die Wahrscheinlichkeit, ein Magenkarzinom zu entwickeln, erhöht.

Blaser und Mitarbeiter fragten sich, ob Helicobacter pylori zwar am Magen Krebsentstehung fördern, in der Speiseröhre dagegen hemmen würde, dass

also der Keim im Ösophagus eine Art Schutzfunktion ausüben könnte. Erste Hinweise sprechen dafür, dass die Helicobacter-Stämme, die das cagA-Gen tragen, diese Funktion haben.

In Zusammenarbeit mit Forschern vom Nationalen Krebsinstitut der USA in Bethesda (Maryland) konnte Martin Blaser in Studien belegen, dass mit solchen Stämmen Infizierte ein signifikant vermindertes Risiko für die aggressiven Schleimhautkarzinome der unteren Speiseröhre und des Mageneingangs aufweisen (Chow et al. 1998). Eine ähnliche Korrelation zeigten Studien sowohl zur Refluxkrankheit als auch zum Barrett-Ösophagus, die Wissenschaftler an der Cleveland-Klinik (Ohio) und vom Erasmus-Medizinzentrum in Rotterdam gemeinsam mit ihm durchführten (Goldblum et al. 2002; Kuipers et al. 2004).

Mittlerweile sind diese Korrelationen durch Untersuchungen in Großbritannien, Brasilien und Schweden bestätigt worden.

Die Verknüpfung von der Helicobacter pylori Besiedlung des Magens und dem Barrett-Karzinom ist nicht unwidersprochen geblieben, vieles spricht jedoch für die dargestellte Blasersche Hypothese.

Blaser erklärt sich diesen Zusammenhang dadurch, dass es ein Wechselspiel zwischen dem Erreger und seinem Wirt gibt. Es soll sich unter einem viele Jahrtausende währenden Selektionsdruck entwickelt haben. Sonderbarerweise hält es Helicobacter pylori im Magen jahrzehntelang aus, obwohl sich das Immunsystem dagegen wehren sollte. Möglich ist das nur, wenn sich eine nicht krankmachende Symbiose ausbildet oder sich der angerichtete Schaden einigermaßen in Grenzen hält. Der Wirt darf offenbar so die Hypothese nicht zu bald sterben, damit die Mikrobe ausreichend Chancen hat, einen neuen zu finden. Darum muss sich zwischen Mikroorganismus und Mensch ein Gleichgewicht einstellen. Irgendwelche Gegenkräfte müssen bewirken, dass sich die entzündlichen Reaktionen nicht zu sehr hochschaukeln. Vermutlich tauschen beide Beteiligten Signale aus wie bei einem Regelkreis mit negativer Rückkopplung. Eine so hergestellte Homöostase kennen wir zum Beispiel beim Blutzuckerregelkreis, wodurch Höchst- und Tiefstwerte verhindert werden.

Diese Vorstellung überträgt Blaser auf das System Zellen der Magenwand/Helicobacter. Dieses System hat er über Jahre hinweg mit den Mathematikern Denise Kirschner von der Universität von Michigan in Ann Arbor und Glenn Webb von der Vanderbilt-Universität in Nashville (Tennessee)

verfeinert und ausgebaut. Dieses Konzept besagt, dass es zu einer Population von Helicobacter pylori, die in einem Magen siedelt, eine Reihe miteinander sowohl kooperierende wie konkurrierende Stämme gehört. Diese wetteifern um Nährstoffe, Lebensnischen im Magen oder auch Schutz vor menschlichen Abwehrmaßnahmen. Unser Organismus hat während der langen Koevolution gelernt, mit dem Erreger umzugehen und den Schaden möglichst gering zu halten (Kirschner u. Blaser 1995; Webb u. Blaser 2002).

Der Mensch nimmt die Äußerungen der Bakterien als Signale, auf die er zu seinen Gunsten mit gegenregulierenden Maßnahmen reagiert – wie umgekehrt die Bakterien auch auf solche für sie ungünstige Vorgänge im Magen im Laufe der Evolution Gegenstrategien entwickelt haben, auf die der Magen zu ihrem Vorteil antwortet. Zu den Signalen auf menschlicher Seite gehören etwa Immunreaktion, Veränderungen des Magendrucks und des Säuregehalts des Magensafts. Helicobacter pylori kann seinen Wirtszellen beispielsweise signalisieren, den Stress auf ihn zu verringern.

So sind beispielsweise für die Mikrobe ein zu hoher wie ein zu niedriger Säuregrad ungünstig. Ein zu hoher Säuregrad bringt die Bakterien um, trotz des zu niedrigen Säuregehaltes könnte es anderen weniger säuretoleranten Bakterien, wie dem Darmbakterium Escherichia coli erlauben, den Magen zu besiedeln und dort die Oberhand zu gewinnen. Helicobacter pylori vermag den Säuregehalt seiner Umgebung zu regulieren. Stämme mit dem cagA-Gen nutzen dazu das CagA-Protein als Signalmolekül. Herrscht ein zu starker Säurewert, bilden sie große Mengen des Signalproteins – denn die dadurch beim Wirt erzeugte Entzündung wirkt sich störend auf die hormonelle Regulation der Säureproduktion von Magenzellen aus. In dieser Weise sorgen die Bakterien selbst für eine Säureabnahme. Wird der Wert geringer, vermindert sich dadurch die Bildung des CagA. Auch die Entzündung schwächt sich nun ab.

Die gesundheitlichen Auswirkungen einer Helicobacter-Infektion hängen weit gehend davon ab, in welchem Maße und mit welcher Intensität Wirt und Erreger sich in dieser Weise austauschen. Dass das Magenkrebsrisiko durch Stämme mit dem cagA-Gen erheblich steigt, hängt sicher damit zusammen, dass solche Stämme die Magenzellen über Jahrzehnte mit dem CagA-Protein schädigen. Stämme ohne das Gen alterieren das Magengewebe viel weniger.

Andererseits aber nützen Stämme mit einem cagA-Gen dazu, die Magensäureproduktion zu regulieren. Schon wenn die Bakterienpopulation das Gen nicht aufweist, werden Spitzenwerte weniger gedämpft. Bei Nichtinfizierten fehlt diese Kontrolle völlig, sodass starke Säureschwankungen mit hohen Spitzenwerten auftreten können. Das mag ein wesentlicher Faktor für die Erkrankungen des distalen Ösophagus sein, die ja offensichtlich durch den Kontakt des Gewebes mit stark saurem Mageninhalt hervorgerufen werden.

Sollten diese Thesen tatsächlich zutreffen, müssten Ärzte fortan abwägen, ob ein Infizierter wirklich von Helicobacter befreit werden muss. Die Überlegung könnte schon deshalb lohnen, weil bei der Maßnahme unter Umständen auch andere einflussreiche Erreger mit verschwinden würden.

Welche Therapie geraten ist, kann der Arzt nur im Einzelfall entscheiden, etwa nach dem Alter des Patienten, seiner medizinischen Vorgeschichte und seiner genetischen Veranlagung.

Martin J. Blaser geht sogar soweit zu sagen, dass möglicherweise in Zukunft besondere Helicobacter-Stämme als Probiotika verabreicht werden könnten.

Gesetzt den Fall, es würde sich tatsächlich herausstellen, dass gewisse Helicobacter-pylori-Stämme manchen Menschen eher zum Nutzen als zum Schaden gereicht, könnten solche Überlegungen vielleicht Realität werden.

Seit über hundert Jahren fahnden Mediziner und Heilpraktiker nach Probiotika – Präparaten mit speziellen Mikroorganismen, die der Gesundheit halber zugeführt werden.

Ob Probiotika zukünftig bei der Behandlung des distalen Speiseröhrenkrebses eine Rolle spielen werden, hängt vom besseren Verständnis der mit uns lebenden Mikroorganismen ab. Laut Blaser ereignen sich komplexe Wechselwirkungen, wo immer Mikroben unseren Körper besiedeln, sei es im Dickdarm, im Mund, auf der Haut oder in der Vagina. Wegen des Andrangs konkurrierender Organismen lassen sich diese Vorgänge aber nur schwer erkennen. Helicobacter pylori ist in dieser Hinsicht ein Sonderfall: Der Erreger beansprucht den Magen fast für sich allein. Er könnte nun zu einem Modellorganismus werden, um die Mikroökologie des Menschen zu erforschen.

Kennen die Wissenschaftler erst die für den Menschen entscheidenden Stämme und deren jeweiligen Einfluss auf die Magenzellen, könnte daraus ein

ganz neues Arsenal an Maßnahmen gegen Erkrankungen des Verdauungstrakts erwachsen.

Vielleicht bestimmen Ärzte zukünftig die genetische Disposition von Patienten für bakterielle Interaktionen, dann könnten sie entscheiden, ob sie zur Prophylaxe eine bestimmte Helicobacter-Mixtur verschreiben sollen oder nicht.

Dass auch beim Magenkarzinom der Sonic-hedgehog-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt und ein Zusammenhang zwischen der Expression des Weges und einer Helicobacter-pylori-Infektion besteht, konnte von Shiotani und Mitarbeitern gezeigt werden (Shiotani et al. 2005).

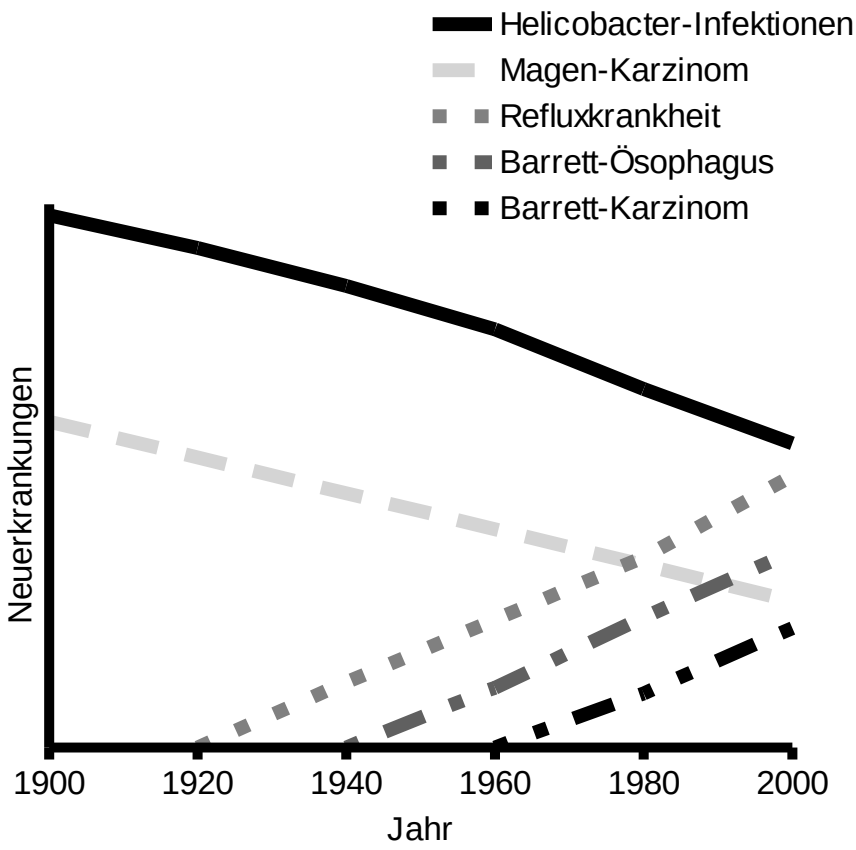


Abb.59: Veränderungen der Inzidenz wichtiger Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes in den letzten 100 Jahren

Die Prävention des Speiseröhrenkrebses ist das Eine, seine Behandlung das Andere.

Große Fortschritte hat es da bei den Frühstadien gegeben. Die Mukosektomie erspart den Betroffenen einen sehr großen Eingriff und sichert bei zuvor gründlich durchgeführtem Staging den Heilerfolg. Sind jedoch erst einmal die Organgrenzen vom Tumor überschritten, bleiben nur eingreifende chirurgische

Sanierungsversuche, die Bestrahlung und adjuvante oder bei Inoperabilität und Metastasierung die Chemotherapie. Alle Adenokarzinome sprechen auf die zurzeit üblichen Zytostatika nur bedingt an. Die Medizin ist deshalb gefordert, nach neuen Präparaten zu suchen.

Die beiden Substanzen Cyclopamine und KAAD-Cyclopamine haben bei einigen Tumoren und wie bei uns nur am Primärtumor eine zytostatische Wirkung gezeigt. Letzteres ist negativ zu bewerten, da ja gerade metastasierende Tumoren zytostatisch behandelt werden müssen.

Positiv ist dagegen, dass bei den in der Tumorpopulation vorhandenen Stammzellen die Testsubstanz sant-1 wachstumshemmend war.

Aus den vorgelegten Befunden sollte der Schluss gezogen werden, vor der in vivo-Testung zu prüfen, ob in den Tumorzellen der Sonic-hedgehog-Signalweg existiert, ist er doch eine Voraussetzung für das Ansprechen der drei Substanzen Cyclopamine, KAAD-Cyclopamine und sant-1.

Die vorgestellten Substanzen verdienen es ihre zytostatische Wirkung, nach eigenen und Fremdergebnissen weiter erforscht zu werden, ob sie nicht nur in vitro und bei Tieren, sondern einmal auch beim Adenokarzinom, speziell der Speiseröhre zum Einsatz kommen können.

Die bisherigen in-vivo-Versuche zeigten keine Nebenwirkungen bei Nagern (Berman et al. 2003; Thayer et al. 2003; Athar et al. 2004; Sanchez u. Ruiz i Altaba 2005). Die bekannte Teratogenität verbietet jedoch strikt den Einsatz bei Schwangeren und Kindern.

Dass das pflanzliche Alkaloid Cyclopamine nicht nur durch seine direkte zytostatische Wirkung durch den Angriffspunkt am Sonic-hedgehog-Signalweg zu Einsatz kommen könnte, sondern auch in Kombination mit den Zytostatika Adriamycin und Vinblastine zeigten Lavie und Mitarbeiter. Bei diesen Versuchen hatte neben Cyclopamine auch Tomatidine den Effekt den Resistenzmechanismus der humanen Tumorzellen gegen diese Chemotherapeutika auszuschalten (Lavie et al. 2001).

Diese Alkaloide bieten also mehrere therapeutische Anwendungsmöglichkeiten, die weiter erforscht werden sollten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Seit langem kennt man die teratogenen Eigenschaften von Cyclopamine, einem steroidalen Alkaloid der Pflanze Veratrum californicum, und von seinem synthetischem Derivat KAAD-Cyclopamine.

Erste in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen einiger Forscher haben auch ihre zytostatische Wirkung aufgezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob KAAD-Cyclopamine das Wachstum von menschlichen Zellen eines Karzinoms des distalen Ösophagus (Barrett-Karzinom) in vitro hemmen kann. Ein eindeutiger Effekt war mit 5µM und vor allem mit 10µM-Lösung zu erzielen. Die Proliferationshemmung war dagegen an den Zellen der Lymphknotenmetastase nicht mehr nachzuweisen.

Die zytostatische Wirkung dürfte darin liegen, dass KAAD-Cyclopamine des Sonic-hedgehog-Signaltransduktionsweg blockiert, der in vielen Tumoren nachgewiesen worden ist. Für diese Annahme spricht, dass die Proliferationsblockade zumindest vorübergehend aufgehoben wurde, nachdem wir das den Sonic-hedgehog-Signalweg aktivierende Shh-Peptid zugeführt hatten.

Sant-1, ein niedermolekulare Substanz, greift ebenfalls an dem Sonic-hedgehog-Signalweg an. Wir konnten deshalb mit dieser Substanz ein vergleichbaren zytostatischen Effekt an den Tumorzellen der Primärgeschwulst in-vitro wie bei KAAD-Cyclopamine erreichen.

Ein chemischer Verwandter des KAAD-Cyclopamine, das Tomatidine beeinflusste das Tumorwachstum so gut wie nicht. Das war zu erwarten, da Tomatidine keine Wirkung auf den Shh-Signalweg entfaltet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden aus der Population der Tumorzellen „Stammzellen“ isoliert und mit KAAD-Cyclopamine behandelt. Bei diesen Zellen war die zytostatische Wirkung von sant-1 bei den Lymphknotenmetastasenzellen ausgeprägter als bei den „reifen“ Tumorzellen.

7. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Dr. Uta Reichelt und Herrn Dr. Björn-Christian Link für die Überlassung des Themas, die fachkundige, wissenschaftliche Betreuung der Doktorarbeit und die Bereitstellung eines optimalen Arbeitsplatzes bedanken. Neben den Anregungen und Ideen, ohne die, die Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre, gaben sie mir die Gelegenheit, meine eigenen Vorstellungen umzusetzen.

Herrn Professor Dr. Jakob R. Izbicki danke ich für die vortrefflichen Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung und die gewährte Unterstützung.

Bei Herrn Privatdozent Dr. Emre F. Yekebas möchte ich herzlich danken, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit zu begutachten und zu vertreten.

Ebenso gilt mein Dank den weiteren Gutachtern und Vertretern meiner Arbeit Herrn Privatdozent Dr. Heinz-Eckart Laack und Herrn Professor Udo Schumacher.

Einen besonderen Dank für die sehr gute Zusammenarbeit möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie aussprechen, insbesondere der MTA Frau Antje Heinecke und der MTA Frau Kathleen Schlagner der Abteilung für hepatobiliäre Chirurgie. Sie sind mir bei vielen Experimenten hilfreich zur Hand gegangen und haben nicht an guten Ratschlägen gespart.

Des Weiteren möchte ich mich für die gute Kameradschaft und gegenseitige Unterstützung meiner Mitdoktoranden und -doktorandinnen bedanken. Besonders Frau Andrea Strelow danke ich aufrichtig für die gute Einarbeitung in die experimentelle Arbeit im Labor. Auch für die Mithilfe von Herrn Christoph-Philip Reiss und Herrn Maximilian Dämmrich möchte ich mich bedanken.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name:	Tobias Romen
Geburtsdatum/-ort:	12.07.1980/Würzburg
Konfession:	römisch-katholisch
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Ohlsdorfer Str. 1, 22299 Hamburg
Tel.:	040-40187012
Email:	tobias.romen@web.de
Eltern:	Vater: Prof. Dr. med. Werner Romen Mutter: Astrid Romen, geb. Grüter
Geschwister:	Dr. rer. nat. Fabian Romen

Ausbildung

1987-1991	Grundschule Edelfingen
1991-2000	Deutschorden-Gymnasium Bad Mergentheim Abitur in den Fächern: Physik, Erdkunde, Deutsch, Mathematik

Studium

2002	Beginn des Studiums für Humanmedizin an der Universität Hamburg 1.Staatsexamen 2004: 3

Zivildienst

07/2000-05/2001	Tätigkeit als Rettungshelfer/-sanitäter Deutsches Rotes Kreuz Bad Mergentheim e.V.

Ausbildung und Tätigkeit

	Ausbildung Rettungshelfer (08/2000) und Rettungs-sanitäter (03/2001) in der DRK-Landesschule Pfalz-grafenweiler
08/2001-05/2002	Ausbildung zum Rettungsassistent in der DRK-Landesschule Pfalzgrafenweiler (Abschluss: 1,3)
06-2002-09/2002 08/2003-09/2003 05/2005-06/2005 09/2007	Tätigkeit als Rettungsassistent Deutsches Rotes Kreuz Bad Mergentheim e.V.

Hobbys

Schwimmen, Segeln, Badminton, Skifahren

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1 http://www.hkcfp.org.hk/article/2002/12/image/p594f01.jpg (24.09.2005)

Abb.2 Romen, Tobias

Abb.3 Romen. Tobias

Abb.4 http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-87000.JPG (07.04.2006)

Abb.5 Romen, Tobias

Abb.6 http://ww1.clunet.edu/wf/mtn/flowers/picts/mtn-693.jpg (26.07.2005)

Abb.7 http://www.fda.gov/cder/calendar/meeting/pregsup2000/friedman/img011.gif (26.07.2005)

Abb.8 http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Watson/shh1.jpg (10.08.2006)

Abb.9 http://www.heraeus-instruments.de/Kendro/img-prod/hs2.jpg (03.05.2005)

Abb.10 http://www.superior.de/zk/zk1.gif (26.07.2005)

Abb.11 Romen, Tobias

Abb.12 http://www.emdbiosciences.com/docs/images/STR/239804.gif (08.06.2005)

Abb.13 http://www.emdbiosciences.com/docs/DISP/614350-000.gif (08.06.2005)

Abb.14 http://www.emdbiosciences.com/docs/PDS/559303-000.pdf (08.06.2005)

Abb.15 http://www.pnas.org/content/vol96/issue20/images/large/pq2092878004.jpeg (10.08.2006)

Abb.16 http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbfile/Praktikum-Script.pdf?id=1489 (08.06.2005)

Abb.17 http://www.scientific-equipment.com/equipment/Dynatech_MR5000.jpg (08.06.2005)

Abb.18 http://www.bdbiosciences.com/pdfs/brochures/23-3090-03.pdf (08.06.2005)

Abb.17 http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/brochures//images/CalInner.jpg (08.06.2005)

Abb.18 http://www.miltenyibiotec.com/datasheets/files2/DS130-042-201-041-301-06.pdf (20.05.2005)

Abb.19 http://www.miltenyibiotec.com/macs/products/sep/imgs/vario.jpg (20.05.2005)

Abb.20 http://www.miltenyibiotec.com/macs/products/sep/imgs/vario-detail.jpg (20.05.2005)

Abb. 59 http://thenightwriterblog.powerblogs.com/files/helicobacter.jpg (10.08.2006)

Abb.87 http://www.bio.com/pics/04-Sonic_the_Hedgehog.jpg (26.07.2005)

Abb.90 Romen, Tobias [in Anlehnung an: (Ruiz i Altaba et al. 2002)]

Abb.98 Romen, Tobias [in Anlehnung an: (Blaser 2005)]

10. LITERATURVERZEICHNIS

Adler R H (1963) The lower esophagus lined by columnar epithelium. Its association with hiatal hernia, ulcer, stricture, and tumor. J Thorac Cardiovasc Surg 45:13-34

Amin A, Li Y, et al. (1999) Hedgehog activates the EGF receptor pathway during Drosophila head development. Development 126:2623-30

Apidianakis Y, Grbavec D, et al. (2001) Groucho mediates a Ci-independent mechanism of hedgehog repression in the anterior wing pouch. Development 128:4361-70

Athar M, Li C, et al. (2004) Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. Cancer Res 64:7545-52

Aza-Blanc P, Kornberg T B (1999) Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. Trends Genet 15:458-62

Aza-Blanc P, Lin H Y, et al. (2000) Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities. Development 127:4293-301

Aza-Blanc P, Ramirez-Weber F A, et al. (1997) Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. Cell 89:1043-53

Barrett N R (1950) Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. Br J Surg 38:175-82

Barrett N R (1957) The lower esophagus lined by columnar epithelium. Surgery 41:881-94

Berman D M, Karhadkar S S, et al. (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. Science 297:1559-61

Berman D M, Karhadkar S S, et al. (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. Nature 425:846-51

Bhardwaj G, Murdoch B, et al. (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. Nat Immunol 2:172-80

Binns W, James L F, et al. (1963) A Congenital Cyclopian-Type Malformation In Lambs Induced By Maternal Ingestion Of A Range Plant, Veratrum Californicum. Am J Vet Res 24:1164-75

Binns W, Thacker E J, et al. (1959) A congenital cyclopiantype malformation in lambs. J Am Vet Med Assoc 134:180-3

Blaser M J (1996) Role of vacA and the cagA locus of Helicobacter pylori in human disease. Aliment Pharmacol Ther 10 Suppl 1:73-7

Blaser M J (2005) An endangered species in the stomach. Sci Am 292:38-45

Boch J A, Shields H M, et al. (1997) Distribution of cytokeratin markers in Barrett's specialized columnar epithelium. Gastroenterology 112:760-5

Bollschweiler E, Hölscher A H (2004) In: Epidemiologie. Meyer H-J, Buhr H J, Wilke H (Hrsg) Management des Magen- und Ösophaguskarzinoms. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 16-20

Bollschweiler E, Schroder W, et al. (2000) Preoperative risk analysis in patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br J Surg 87:1106-10

Bollschweiler E, Wolfgarten E, et al. (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. Cancer 92:549-55

Bonnet D, Dick J E (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3:730-7

Brewster R, Mullor J L, et al. (2000) Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. Development 127:4395-405

Cameron A J (1997) Epidemiology of columnar-lined esophagus and adenocarcinoma. Gastroenterol Clin North Am 26:487-94

Chen J K, Taipale J, et al. (2002a) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. Genes Dev 16:2743-8

Chen J K, Taipale J, et al. (2002b) Small molecule modulation of Smoothened activity. Proc Natl Acad Sci U S A 99:14071-6

Chiang C, Litingtung Y, et al. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. Nature 383:407-13

Chow W H, Blaser M J, et al. (1998) An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. Cancer Res 58:588-90

Coebergh J W, Janssen-Heijnen M L, et al. (1999) Serious co-morbidity among unselected cancer patients newly diagnosed in the southeastern part of The Netherlands in 1993-1996. J Clin Epidemiol 52:1131-6

Colin-Jones D G, Langman M J, et al. (1992) Postmarketing surveillance of the safety of cimetidine: 10 year mortality report. Gut 33:1280-4

Cooper M K, Porter J A, et al. (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. Science 280:1603-7

Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. Am J Pathol 147:545-60

Dahmane N, Lee J, et al. (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. Nature 389:876-81

Dahmane N, Sanchez P, et al. (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. Development 128:5201-12

Detmer K, Thompson A J, et al. (2005) Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. Blood Cells Mol Dis 34:60-70

Duman-Scheel M, Weng L, et al. (2002) Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. Nature 417:299-304

Ekker S C, Ungar A R, et al. (1995) Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. Curr Biol 5:944-55

Ericson J, Muhr J, et al. (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. Cell 81:747-56

Fan H, Oro A E, et al. (1997) Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. Nat Med 3:788-92

Fitzgerald R C, Triadafilopoulos G (1998) Recent developments in the molecular characterization of Barrett's esophagus. Dig Dis 16:63-80

Goldblum J R, Richter J E, et al. (2002) Helicobacter pylori infection, not gastroesophageal reflux, is the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa. Am J Gastroenterol 97:302-11

Grachtchouk M, Mo R, et al. (2000) Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. Nat Genet 24:216-7

Haggitt R C, Tryzelaar J, et al. (1978) Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus. Am J Clin Pathol 70:1-5

Hahn H, Wicking C, et al. (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. Cell 85:841-51

Hawe A, Payne W S, et al. (1973) Adenocarcinima in the columnar epithelial lined lower (Barret) oesophagus. Thorax 28:511-4

Hemmati H D, Nakano I, et al. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 100:15178-83

Hilbe W, Dirnhofer S, et al. (2004) CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. J Clin Pathol 57:965-9

Ho K S, Scott M P (2002) Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. Curr Opin Neurobiol 12:57-63

Hosch S, Kraus J, et al. (2000) Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. Cancer Res 60:6836-40

Incardona J P, Gaffield W, et al. (1998) The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. Development 125:3553-62

Ingham P W, McMahon A P (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev 15:3059-87

Ioannides A S, Henderson D J, et al. (2003) Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. J Pediatr Surg 38:29-36; discussion 29-36

Ismail-Beigi F, Horton P F, et al. (1970) Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. Gastroenterology 58:163-74

Ismail-Beigi F, Pope C E, 2nd (1974) Distribution of the histological changes of gastroesophageal reflux in the distal esophagus of man. Gastroenterology 66:1109-13

Jamieson J R, Stein H J, et al. (1992) Ambulatory 24-h esophageal pH monitoring: normal values, optimal thresholds, specificity, sensitivity, and reproducibility. Am J Gastroenterol 87:1102-11

Johnson R L, Rothman A L, et al. (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science 272:1668-71

Katano M (2005) Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. Cancer Lett 227:99-104

Kawan T (2002) In: Palliative Therapieverfahren. Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 135-141

Keeler R F (1978) Cyclopamine and related steroidal alkaloid teratogens: their occurrence, structural relationship, and biologic effects. Lipids 13:708-15

Keeler R F, Binns W (1968) Teratogenic compounds of Veratrum californicum (Durand). V. Comparison of cyclopian effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. Teratology 1:5-10

Kenney A M, Cole M D, et al. (2003) Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. Development 130:15-28

Kirschner D E, Blaser M J (1995) The dynamics of Helicobacter pylori infection of the human stomach. J Theor Biol 176:281-90

Köppen U (2002) In: Brachytherapie in kurativer Intention. Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 117-128

Kopper L, Hajdu M (2004) Tumor stem cells. Pathol Oncol Res 10:69-73

Krauss S, Concordet J P, et al. (1993) A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. Cell 75:1431-44

Krishnan V, Pereira F A, et al. (1997) Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. Science 278:1947-50

Kuipers E J, Nelis G F, et al. (2004) Cure of Helicobacter pylori infection in patients with reflux oesophagitis treated with long term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. Gut 53:12-20

Lagergren J, Bergstrom R, et al. (1999) Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. N Engl J Med 340:825-31

Lavie Y, Harel-Orbital T, et al. (2001) Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells. Anticancer Res 21:1189-94

Levine D S (1997) Management of dysplasia in the columnar-lined esophagus. Gastroenterol Clin North Am 26:613-34

Lüllmann G, Mohr K, et al. (2003) In: Zytostatika. Lüllmann G (Hrsg) Taschenatlas Pharmakologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S 300-304

Ma X, Chen K, et al. (2005a) Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. Carcinogenesis

Ma X, Sheng T, et al. (2005b) Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. Int J Cancer

Madison B B, Braunstein K, et al. (2005) Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. Development 132:279-89

Marigo V, Davey R A, et al. (1996) Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. Nature 384:176-9

Marigo V, Roberts D J, et al. (1995) Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. Genomics 28:44-51

Marshall B J, Warren J R (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1:1311-5

Marti E, Bumcrot D A, et al. (1995) Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. Nature 375:322-5

Menin C, Santacatterina M, et al. (2000) Anomalous transcripts and allelic deletions of the FHIT gene in human esophageal cancer. Cancer Genet Cytogenet 119:56-61

Mergenthaler H-G (2002) In: Neoadjuvante Chemotherapie. Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 129-134

Merkle P (2002) In: Chirurgische Therapie des Ösophaguskarzinoms. Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 41-59

Meszoely I M, Means A L, et al. (2001) Developmental aspects of early pancreatic cancer. Cancer J 7:242-50

Mill P, Mo R, et al. (2003) Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. Genes Dev 17:282-94

Miraglia S, Godfrey W, et al. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 90:5013-21

Montesano R, Hollstein M, et al. (1996) Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. Int J Cancer 69:225-35

Morson B C, Belcher J R (1952) Adenocarcinoma of the oesophagus and ectopic gastric mucosa. Br J Cancer 6:127-30

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55-63

Motoyama J, Liu J, et al. (1998) Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. Nat Genet 20:54-7

Mullor J L, Sanchez P, et al. (2002) Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. Trends Cell Biol 12:562-9

Murone M, Luoh S M, et al. (2000) Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. Nat Cell Biol 2:310-2

Nakamura T, Aikawa T, et al. (1997) Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. Biochem Biophys Res Commun 237:465-9

Nilsson M, Unden A B, et al. (2000) Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. Proc Natl Acad Sci U S A 97:3438-43

Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature 287:795-801

Nybakken K, Perrimon N (2002) Hedgehog signal transduction: recent findings. Curr Opin Genet Dev 12:503-11

Olsen C L, Hsu P P, et al. (2004) Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. BMC Cancer 4:43

Oro A E, Higgins K (2003) Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. Dev Biol 255:238-48

Oro A E, Higgins K M, et al. (1997) Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. Science 276:817-21

Parisi M J, Lin H (1998) The role of the hedgehog/patched signaling pathway in epithelial stem cell proliferation: from fly to human. Cell Res 8:15-21

Parkin D M, Whelan S L, et al. (1997) Cancer incidence in five continents. Volume VII. IARC Sci Publi-xxxiv, 1-1240

Pasca di Magliano M, Hebrok M (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. Nat Rev Cancer 3:903-11

Pathi S, Pagan-Westphal S, et al. (2001) Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. Mech Dev 106:107-17

Paull A, Trier J S, et al. (1976) The histologic spectrum of Barrett's esophagus. N Engl J Med 295:476-80

Pisani P, Parkin D M, et al. (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer 83:18-29

Porter J A, von Kessler D P, et al. (1995) The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. Nature 374:363-6

Reid B J, Weinstein W M (1987) Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Annu Rev Med 38:477-92

Respondek M (2002) In: Photodynamische Therapie und endoskopische Resektion (Mukosektomie). Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 74-87

Reya T, Morrison S J, et al. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 414:105-11

Roelink H, Porter J A, et al. (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. Cell 81:445-55

Roessler E, Belloni E, et al. (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. Nat Genet 14:357-60

Romer J, Curran T (2005) Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. Cancer Res 65:4975-8

Romer J T, Kimura H, et al. (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. Cancer Cell 6:229-40

Ronsch H, Schreiber K (1965) [15-Alpha-hydroxy-soladulcidine and 15-alpha-hydroxy-tomatidine, 2 new steroid alkaloids from Solanum dulcamara L.]. Tetrahedron Lett 24:1947-52

Ruiz i Altaba A, Sanchez P, et al. (2002) Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. Nat Rev Cancer 2:361-72

Ruiz I A A (1999) The works of GLI and the power of hedgehog. Nat Cell Biol 1:E147-8

Ruiz I A A, Palma V, et al. (2002) Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. Nat Rev Neurosci 3:24-33

Salo J A, Kivilaakso E O, et al. (1996) Cytokeratin profile suggests metaplastic epithelial transformation in Barrett's oesophagus. Ann Med 28:305-9

Sanchez P, Ruiz i Altaba A (2005) In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. Mech Dev 122:223-30

Sarbia M, Arjumand J, et al. (2001) Frequent c-myc amplification in high-grade dysplasia and adenocarcinoma in Barrett esophagus. Am J Clin Pathol 115:835-40

Sarbia M, Müller W (2004) In: Tumorbiologie und molekulargenetische Aspekte. Meyer H-J, Buhr H J, Wilke H (Hrsg) Management des Magen- und Ösophaguskarzinoms. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 26-34

Scheunemann P, Izbicki J R, et al. (1999) Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes. N Engl J Med 340:1687

Schmidt B F (2002) In: Perkutane Strahlentherapie und Radiochemotherapie. Zoller W G, Köppen U (Hrsg) Ösophaguskarzinom Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart New York, S 88-115

Seitz G (1999) [Biopsy differential diagnosis of gastroesophageal reflux (GERD)]. Verh Dtsch Ges Pathol 83:27-36

Shiotani A, Iishi H, et al. (2005) Evidence that Loss of Sonic Hedgehog is an Indicator of Helicobater pylori-induced Atrophic Gastritis Progressing to Gastric Cancer. Am J Gastroenterol 100:581-7

Siebert J R, Cohen M M, et al. (1990) Holoprosencephaly: Overview and Atlas of Cases, Wiley-Liss, New York

Singh S K, Clarke I D, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63:5821-8

Stone D M, Hynes M, et al. (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. Nature 384:129-34

Taipale J, Chen J K, et al. (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. Nature 406:1005-9

Taylor G, Lehrer M S, et al. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. Cell 102:451-61

Thayer S P, di Magliano M P, et al. (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature 425:851-6

Traiffort E, Charytoniuk D, et al. (1999) Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. Eur J Neurosci 11:3199-214

van der Horst G, Farih-Sips H, et al. (2003) Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated KS483 cells. Bone 33:899-910

Vaughan T L, Farrow D C, et al. (1998) Risk of esophageal and gastric adenocarcinomas in relation to use of calcium channel blockers, asthma drugs, and other medications that promote gastroesophageal reflux. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7:749-56

Vogelstein B, Lane D, et al. (2000) Surfing the p53 network. Nature 408:307-10

Wang H H, Hsieh C C, et al. (1994) Rising incidence rate of esophageal adenocarcinoma and use of pharmaceutical agents that relax the lower esophageal sphincter (United States). Cancer Causes Control 5:573-8

Watanabe H, Jass J R, et al. (1998) Histological Typing of Oesophageal and Gastric Tumors - World Health Organization, International Histoliogical Classification of Tumors, Springer, Berlin Heidelberg New York

Watkins D N, Berman D M, et al. (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. Nature 422:313-7

Webb G F, Blaser M J (2002) Dynamics of bacterial phenotype selection in a colonized host. Proc Natl Acad Sci U S A 99:3135-40

Wolfgarten E, Rosendahl U, et al. (2001) Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany. Onkologie 24:546-51

Xie J, Murone M, et al. (1998) Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. Nature 391:90-2

Yin A H, Miraglia S, et al. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 90:5002-12

Yoshida K, Ueno S, et al. (2003) Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. Cancer Sci 94:263-70

Yu Y, Flint A F, et al. (2004) Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. Blood 103:1373-5

Zacherl J, Sendler A, et al. (2003) Current status of neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the distal esophagus. World J Surg 27:1067-74

Zhu G, Mehler M F, et al. (1999) Sonic hedgehog and BMP2 exert opposing actions on proliferation and differentiation of embryonic neural progenitor cells. Dev Biol 215:118-29

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....