

Aus der Charité Centrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Allgemein-, Vizceral- und Transplantationschirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

Habilitationsschrift

Therapie des Pankreaskarzinoms durch Inhibition des Sonic Hedgehog-Signaltransduktionsweges

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Marcus Bahra

geboren am 03.03.1970 in Wunstorf

Eingereicht: April 2008

Dekan: Univ. Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich/Berlin

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. H.-P. Bruch/Lübeck

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. A. Königsrainer/Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Hedgehog/Patched-Signaltransduktion	7
1.1.1	<i>Patched (Ptc)</i>	9
1.1.2	Smoothened (Smo)	10
1.1.3	<i>Gli</i>	10
1.2	Hedgehog/Patched-Signaltransduktion und Tumorigenese	11
1.2.1	Hedgehog/Patched in gastrointestinalen Tumoren	13
1.3	Pankreaskarzinom	15
1.4	Gemcitabine	16
1.5	Cyclopamin	17
1.6	Hh-Antag (G-024856; CUR)	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Geräte	20
2.2	Reagenzien	21
2.2.1	Kits	21
2.2.2	Lösungen und Zellkulturmedien	21
2.2.3	Vektoren	22
2.2.4	Pharmaka	22
2.3	Zelllinien	22
2.4	Untersuchungskollektiv humaner Pankreaskarzinome	23
2.5	Untersuchungskollektiv gesundes Pankreasgewebe	23
2.6	Isolierung von RNA	25
2.6.1	Isolierung von RNA mittels Rneasy	25
2.6.2	Behandlung der RNA mit DNase I	25
2.7	Synthese von cDNA / reverse Transkription	26
2.8	Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	26
2.8.1	Fällung von RNA, Aufreinigung von RNA	26
2.8.2	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.8.3	Fällung von DNA, Aufreinigung von DNA	29
2.8.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29

2.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.10.	Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren.....	30
2.10.1	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen.....	30
2.10.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.10.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	30
2.10.4	Kompetitive RT-PCR.....	31
2.10.5	Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle.....	32
2.11	Mutationsanalyse mit Hilfe des Einzelstrang Konformations-Polymorphismus.....	33
2.12	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	36
2.13	³ H - Thymidin-Inkorporations-Assay.....	42
2.14	Luciferase-Reporter-Assay.....	42
2.15	Zellproliferationstest (XTT).....	43
2.16	TaqMan Gen-Expressions Assay.....	43
2.17	Tierversuche.....	45
2.17.1	Tierhaltung.....	45
2.17.2	Tumor-Inokulation.....	45
2.17.3	Tumorextirpation.....	45
2.17.4	Vorversuche.....	47
2.17.5	Versuchsgruppen.....	47
2.17.6	Versuchsprotokoll.....	48
2.18	Histologie.....	52
2.18.1	Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	52
2.18.2	Elektronenmikroskopie.....	52
2.19	Immunhistochemische Untersuchungen.....	53
2.19.1	Ki67 (MIB-1).....	53
2.19.2	Zytokeratin 18 (M30).....	54
2.19.3	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).....	54
2.19.4	Cyclin D1, Cyclin E	55
2.19.5	TUNEL-Färbung.....	55
2.20	Statistik.....	56

3	Ergebnisse	57
3.1	Expressionsanalyse von <i>PTCH</i> im humanen Pankreaskarzinom und gesundem Pankreasgewebe	57
3.2	Expressionsanalyse von <i>GLI1</i> im humanen Pankreaskarzinom und gesundem Pankreasgewebe	58
3.3	Basale <i>GLI1</i> -Promoteraktivität in Pankreaskarzinomzellen	59
3.4	Mutationsanalyse von <i>PTCH</i> in humanen Pankreaskarzinomzelllinien sowie in humanen Pankreaskarzinomen	61
3.5	Veränderte Expression von <i>GLI1</i> in Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit Hh-Antag	63
3.6	Reduzierte <i>GLI1</i> -Luciferase-Aktivität nach Behandlung mit Cyclopamin	64
3.7	Verringerte Proliferationsaktivität von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit Cyclopamin	65
3.8	Proliferationshemmung humaner Pankreaskarzinomzelllinien (ASPC-1, Capan-1, MiaPaca) nach Behandlung mit Hh-Antag	68
3.9	Antiproliferativer Effekt von Gemcitabine	69
3.10	Kombination von Cyclopamin und Gemcitabine	71
3.11	Elektronenmikroskopischer Apoptosenachweis nach Therapie mit Cyclopamin	74
3.12	Tumorstadiumsverhalten nach Therapie mit Cyclopamin und/ oder Gemcitabine im Nacktmausmodell	73
3.12.1	Synchrone Behandlung	75
3.12.2	Verzögerte Behandlung	76
3.13	Tumorstadiumsverhalten nach Kombinationstherapie mit Cyclopamin und Gemcitabine im Nacktmausmodell	77
3.14	Nekrosen (HE-Färbung)	79
3.15	Proliferation (Ki67)	82
3.16	Apoptosenachweis mittels Zytokeratin 18 (M30)	84
3.17	Apoptosenachweis mittels Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)	85
3.18	Apoptosenachweis mittels TUNEL-Färbung	86
3.19	Expressionsanalyse von Cyclin D1 und Cyclin E	87
3.20	Veränderte <i>PTCH</i> -Expression in humanen xenotransplantierten Pankreaskarzinomen nach Behandlung Cyclopamin	89

4	Diskussion	90
4.1	Shh-Zielgene im humanen Pankreaskarzinom	91
4.2	Stellenwert von Mutationen im Shh-Signalweg	92
4.3	Reduktion des Tumorwachstums durch Shh-Inhibition <i>in vitro</i>	93
4.4	Inhibition des Hedgehog Signalwegs in xenotransplantierten Pankreaskarzinomen	94
4.4.1	Proliferation	97
4.4.2	Apoptose	97
4.4.3	Nekrose	98
4.4.4	Zellregulationsproteine	98
4.5	Hedgehog, Wnt, NOTCH: Vernetzte Signalwege	100
4.6	Klinische Möglichkeiten der Therapie mit Signalwegsinhibitoren	103
5	Zusammenfassung	105
6	Literaturverzeichnis	108
7	Abkürzungsverzeichnis	120
8	Danksagung	123

1 Einleitung

Der Pathologe Julius Cohnheim beobachtete vor mehr als 100 Jahren Ähnlichkeiten zwischen Tumorzellen und embryonalen Zellen. Ihm fiel auf, dass beide Zellarten morphologisch einfach aufgebaut sind, differenzieren können und die Möglichkeit zum expansiven Wachstum zeigen. Heutzutage ist bekannt, daß eine Vielzahl von Tumoren ihren Ursprung in meist undifferenzierten, embryonalen Vorläuferzellen haben. In den letzten Jahren hat das Verständnis für den Zusammenhang zwischen embryonaler Entwicklung, dem Verhalten von Stammzellen und der Entstehung von Tumoren stetig zugenommen. Das Wachstum undifferenzierte, embryonaler Zellen wird dabei durch spezifische Signaltransduktionswege, sog. Entwicklungskontrollsignalwege reguliert. Signalmoleküle binden an entsprechende membranständige Rezeptoren und aktivieren eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, welche eine transkriptionelle Aktivierung von Wachstums- und spezifischen Zielgenen zur Folge hat. Eine Überaktivierung dieser Entwicklungskontrollsignalwege im adulten Gewebe kann zur Tumorentstehung führen.

Eine gezielte Inhibition eines solchen, aktivierten Signalweges könnte ein neuartiges Therapiekonzept in der Behandlung maligner Tumoren darstellen. Dabei ist der Nachweis von aktiven Signalwegen in verschiedenen Tumorentitäten eine wichtige Voraussetzung. Ein weiterer Schritt zur gezielten Interferenz ist die Identifikation und Untersuchung geeigneter niedermolekularer Inhibitoren.

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hochmaligner Tumor mit einer schlechten Prognose. Trotz steigender Resektionsraten, verbunden mit einer sinkenden perioperativen Mortalität und Morbidität, liegt das 5 – Jahresüberleben nach Resektion bei etwa 20% [52, 135]. Konventionelle neoadjuvante sowie adjuvante Therapiekonzepte beeinflussen das Langzeitüberleben bisher nur mäßig [32, 71, 89, 129]. Neue adjuvante Therapien zur Reduktion der Rezidivrate nach erfolgreicher Resektion sind daher notwendig.

Dieser Sachverhalt legt nahe, daß eine Vernetzung der bereits etablierten Behandlungsmethoden mit neuen therapeutischen Ansätzen auf Grundlage moderner, molekulargenetischer und zellbiologischer Kenntnisse über die Pathogenese des Pankreaskarzinoms einen wesentlichen Beitrag in der Therapie dieses hochmalignen Tumors leisten könnte.

1.1 Hedgehog/Patched-Signaltransduktion

Der Hedgehog/Patched-Signalweg ist eine Signaltransduktionskaskade, welche eine Vielzahl von zellulären Prozessen steuert. Verschiedene Gene des Hedgehog (Hh)-Signalweges wurden erstmals in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert. Nüsslein-Volhard et al. beschrieben eine Gruppe von mutierten Larven, bei denen im Vergleich zum Wildtyp die Haut mit einem Rasen von kleinen Haaren übersät war, was an das Aussehen eines Igels (engl.: Hedgehog) erinnerte [99]. Das Morphogen Sonic Hedgehog (Shh) gehört neben Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) zur Hedgehogfamilie von Signalmolekülen in Vertebratenzellen, deren Mitglieder alle eine Homologie zum Hedgehog-Protein der Fruchtfliege aufweisen [30]. Die Aktivität der Hh-Proteinfamilie nimmt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebe und Organe ein. Nach der Proteinbiosynthese wird ein 45 kDa großes Vorläuferprotein autokatalytisch in zwei Teile gespalten: Ein N-terminales, 19 kDa großes Protein (N-Shh), welches für die Signalgebung verantwortlich ist, sowie ein 25 kDa großes C-terminales Fragment (C-Shh) mit Proteaseaktivität. Als posttranslationale Modifikation wird N-terminal ein Palmitoylschwanz sowie C-terminal eine Cholesterolgegruppe angehängt [105, 110]. Diese Modifikationen spielen bezüglich der Steigerung der Signalinduktion eine wichtige Rolle. Sonic Hedgehog bindet (Shh) mit hoher Affinität an einen membranständigen Rezeptor, den sog. Patched-Rezeptor (Ptc). Durch diese Bindung verliert Ptc seine inhibierende Wirkung auf Smoothed (Smo), ein weiteres transmembranes Protein. Dies führt zu einer Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade mit der Folge der Translokation von Mitgliedern der Familie der gli-Transkriptionsfaktoren in den Kern, wo spezifische Zielgene reguliert werden. Dabei wirkt *gli1* als Aktivator und *gli3* als Repressor. McMahon et al. konnten als Zielgene *gli1* sowie *ptc* selbst identifizieren [51]. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades während der Evolution findet man große Homologien zwischen dem *Drosophila*-System und dem Vertebratensystem. In Abwesenheit von Shh inhibiert *Ptc* Smo. Dadurch wird im *Drosophila*-System das Homolog der Gli-Proteine - cubitus interruptus (Ci) – über die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Ci befindet sich als 155kDa Ci-Isoform in einem Multiproteinkomplex mit Fused (Fu) und Costal 2 (Cos2) und wird nach proteolytischer Spaltung als 75 kDa-Form im Kern akkumuliert und fungiert dort als Repressor. Bezüglich der Signalrezeption von Hedgehog geht man von einer direkten Interaktion zwischen Ptc und Smo aus. Die Bindung von Hh scheint zu einer Konformitätsänderung von Ptc zu führen und hebt so die Inhibition von Smo auf [91, 131]. Die Bedeutung der

Signaltransduktion im Rahmen zellulärer Prozesse wurde umfassend untersucht. So spielt Hh eine wichtige Rolle in der Entwicklung der embryonalen Anterior/Posterior-Achse wie auch von Extremitäten, Flügel, Auge und Darm im Drosophila-System. In Vertebraten ist Shh an Prozessen der Angiogenese, der Entwicklung von Knochen, der Genese von Zellen des zentralen Nervensystems sowie der Entwicklung gastrointestinaler Organe beteiligt.

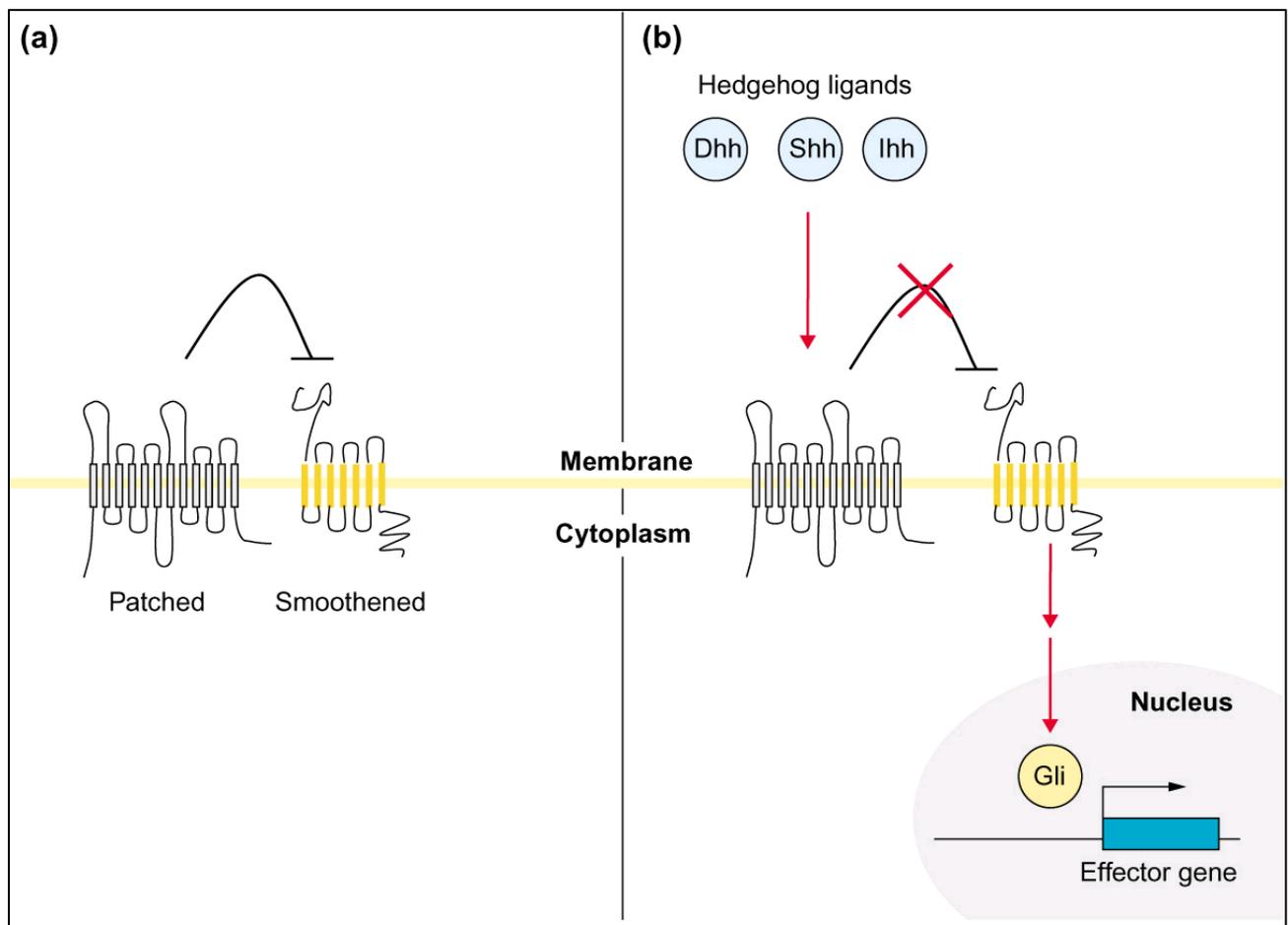


Abbildung 1: Darstellung des Shh/ Ptc-Signalweges.

a) In Abwesenheit des Liganden Hh inhibiert Ptc Smo.

b) Die Bindung von Shh/ Ihh/ Dhh an Ptc hebt die Inhibition von Smo auf und führt zur Translokation von Mitgliedern der Familie der Gli-Transkriptionsfaktoren in den Kern, wo spezifische, meist Wachstums-assoziierte Zielgene reguliert werden.

1.1.1 Patched (Ptc)

In Vertebraten sind zwei verschiedene *Patched*-Gene (*Ptc1* und *Ptc2*) bekannt. *Patched* (*Ptc*) kodiert für ein 1.500 Aminosäuren großes Protein, welches als Negativregulator für den Hh-Signalweg fungiert. Das Glykoprotein hat 12 transmembranale Domänen. Intrazellulär befinden sich je eine carboxyterminale und eine aminoternale Region. Zwei hydrophile extrazelluläre Schleifen bilden die Bindungsstelle für den Liganden Hh [77, 78, 113]. Ist die extrazelluläre Region durch eine *Ptc*-Mutation alteriert, kann Hh nicht mehr an den Rezeptor binden. Die Inhibition von Ptc auf Smo bleibt trotz der Anwesenheit von Hedgehog bestehen. Kommt es durch eine *Ptc*-Mutation zu einem Abbruch der intrazellulären C-terminalen Domäne, geht die Inhibition von Ptc auf Smo verloren, ohne dass es zu einer Veränderung in der Hh-Ptc-Rezeption kommt [17, 53]. Helms et al. konnten zeigen, daß Retinolsäure die Expression von Hh und Ptc in Hühnerembryonen hemmt [48]. Mutationen von Hh sowie Ptc können beim Menschen zu einer schweren Entwicklungsstörung, der sog. Holoprosencephalie, führen [83, 92].

Verschiedene Tumore sind mit einer Mutation von *Ptc* assoziiert. So konnten Mutationen im humanen *PTCH*-Gen u. a. bei Patienten mit nävoidem Basazellkarzinom, Medulloblastom, Mammakarzinom und Meningeom nachgewiesen werden (Tabelle 1).

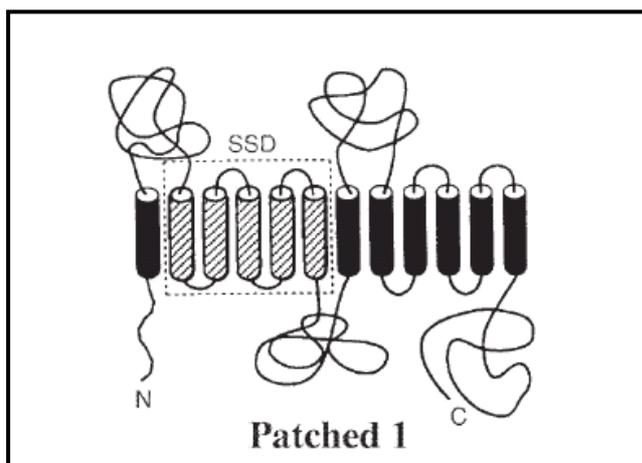


Abbildung 2: Darstellung von Patched, einem 12- transmembranen Glykoprotein, bestehend aus 1.500 Aminosäuren. Zwei hydrophile extrazelluläre Schleifen bilden die Bindungsstelle für den Liganden Shh.

1.1.2 Smoothened (Smo)

Smoothened ist ein aus 1.024 Aminosäuren bestehendes transmembranes Protein, welches für die Transduktion des Hh-Signals zuständig ist. Das Smo-Protein hat 7 transmembranale hydrophobe Domänen, eine extrazelluläre aminoterminal Region und eine intrazelluläre carboxyterminale Region. In Abwesenheit von Hh verhindert Ptc die Signalweiterleitung durch Smo. Wenn Hh an Ptc bindet, setzt Smo eine Signaltransduktionskaskade in Gang. Mutationen in Smo konnten z.B. beim sporadischen Basalzellkarzinom nachgewiesen werden [116]. Hierbei kann es zu einer Signalaktivierung ohne den Liganden Shh kommen. Eine Inhibition dieser Hh-Ptc-rezeptorunabhängigen Dysfunktion von Smo könnte ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Tumoren sein, in denen der Hh-Patched-Signalweg aktiv ist.

1.1.3 Gli

Die *Gli* Genfamilie (*Gli1*, *Gli2*, *Gli3*) wurde in den 80er Jahren durch Amplifikation von *Gli1* im humanen Glioblastom identifiziert [63, 64]. *Gli1* besteht aus 1.106 Aminosäuren und liegt in zwei Isoformen vor. *Gli1* agiert als Aktivator von Hedgehog-Zielgenen, scheint nicht proteolytisch abgebaut zu werden und hat keine Repressorfunktion [50]. Der genaue Mechanismus der Signalumsetzung von Smo durch Translokation von Gli in den Zellkern ist noch unklar [121, 139, 149]. Die zelluläre Antwort auf das Hedgehog-Signal hängt dabei nicht alleine von der Stärke der Ligandenexposition ab, sondern partiell auch von der Gli1-Gen-Expression selbst. *GLI1* ist gehäuft beim Basalzellkarzinom exprimiert. Eine Überexpression von *Gli1* in der transgenen Maus führt zur Ausbildung von Basalzellkarzinomen [96].

Syndrom	Mutation	Autor	Jahr
Holoprosencephalie	<i>SHH</i>	Nanni et al. [92]	1999
	<i>SHH</i>	Belloni et al. [11]	1996
	<i>PTCH</i>	Ming et al. [83]	2002
Nävoides	<i>PTCH</i>	Hahn et al. [43]	1996
Basalzellkarzinom			
Basalzellkarzinom	<i>PTCH</i>	Gailani et al. [34]	1996
	<i>PTCH</i>	Johnson et al. [53]	1996
	<i>SMO</i>	Reifenberger et al. [116]	2005
Medulloblastom	<i>PTCH</i>	Pietsch et al. [106]	1997
Mammakarzinom	<i>PTCH</i>	Xie et al. [146]	1997

Tabelle 1: Genetische Veränderungen und Tumore bedingt durch Mutationen im Hedgehog/Patched – System

1.2 Hedgehog/Patched-Signaltransduktion und Tumorigenese

Die Rolle des Hedgehog/Patched-Signalweges in der Tumorentstehung ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Signalweg auch in adulten Geweben anhaltend aktiv ist. Im gesunden Lungengewebe läßt sich Shh nicht nachweisen. Nach einer Schädigung mit Naphthalin werden jedoch vereinzelte Zellen Shh-positiv. Das kleinzellige Bronchialkarzinom zeigt ebenfalls eine positive Shh-Expression [142]. Als Erklärungsmodell für die Reaktivierung in nichtembryonalem Gewebe geht man von drei verschiedenen Aktivitätszuständen des Signalweges aus:

1. *Der inaktive Zustand.*
2. *Der physiologisch aktivierte Zustand im Sinne der Embryogenese, Gewebhomeostase und der Zellreparatur.*
3. *Der pathologisch aktivierte Zustand im Sinne der Tumorigenese.*

Im inaktiven Zustand fehlt der Ligand (Shh) und Ptc blockt die Aktivität von Smo. Im physiologisch aktivierten Zustand kommt es zur Signalwegsaktivierung durch die Shh-Ptc-Bindung. Van de Brink et al. zeigten, daß Shh-Zielgene im humanen Magengewebe aktiviert sind. Shh scheint somit nicht nur für die Organogenese wichtig zu sein, sondern scheint eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung komplexer Gewebsorganisationen zu haben [137]. Am Modell des Prostatakarzinoms konnten Sanches et al. den Zusammenhang zwischen einem inadäquaten Shh-Signal und dem

Tumorstadium zeigen. Eine Homeostase im Shh-Gli-System führt zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Prostataepithels. Eine Erhöhung des Shh-Signals oder Überregulation im Rahmen der Regeneration kann zur Tumorentwicklung führen [123]. Die Rolle der extrazellulären Matrix ist dabei noch nicht geklärt. So wird *GLI1* im Menschen in Epithelzellen exprimiert, bei Ratten hingegen in Stromazellen [111].

Liegt ein pathologisch aktivierter Zustand vor, kommt es auf Grundlage von Mutationen zur Signalwegsaktivierung. Dabei kann die Mutation entweder auf der Ebene des Liganden Shh, oder in Smo bzw. in Ptc vorliegen. Mutationen in Ptc sind dabei am häufigsten beschrieben [5]. Kommt es zu einer Stimulation des Tumorstadiums, indem das Tumorgewebe selbst den Liganden (Shh) sezerniert, spricht man von einer autokrinen Situation.

Bei der Induktion der DNA-Replikation durch Shh spielen Cycline eine wichtige Rolle. Nach Aktivierung der Zielgene kommt es zur Transkription von Cyclinen wie Cyclin D1 und Cyclin E [29]. Die Cyclin E-Expression z. B. wird dabei durch die Bindung von Gli1 an den Cyclin E-Promoter ermöglicht. Proliferative Mechanismen, vermittelt durch Shh, scheinen einen wichtigen Stellenwert in der Tumorentstehung zu haben (Abb. 3).

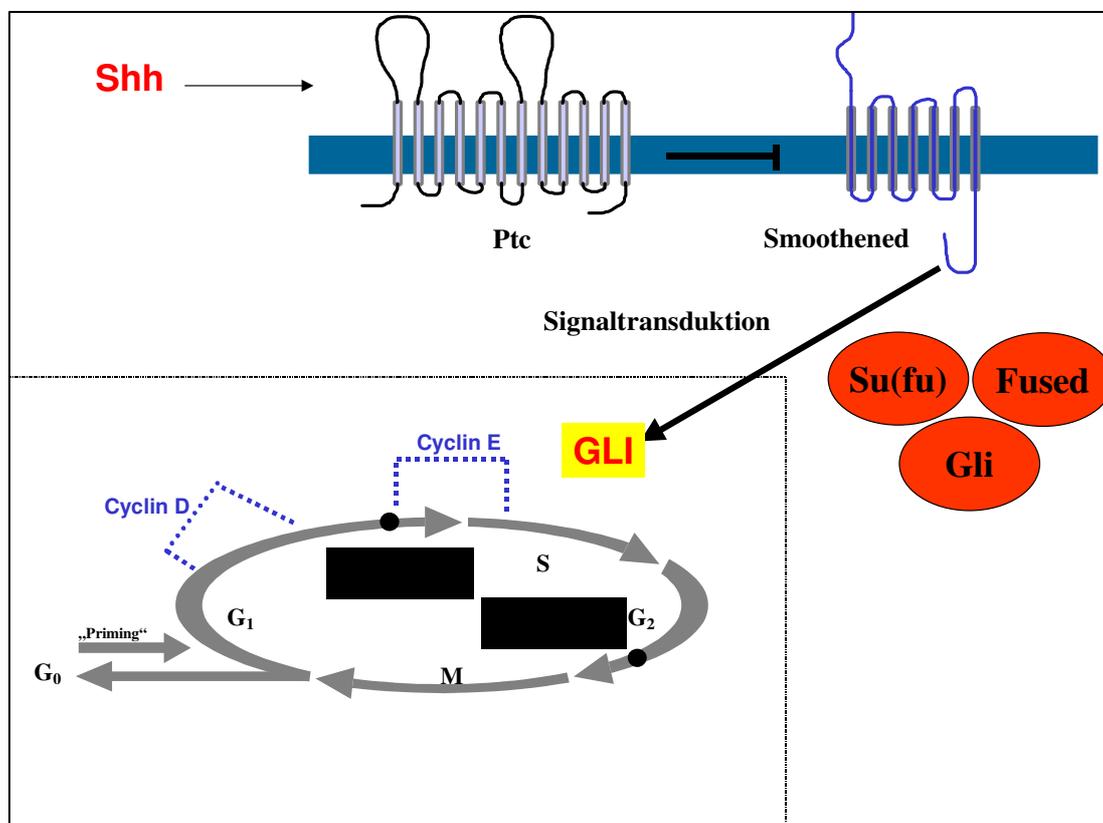


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Shh/Ptc-Signalwegs und der Zellzyklusregulation

1.2.1 Hedgehog/Patched in gastrointestinal Tumoren

In Zelllinien gastrointestinaler Tumoren konnte eine Aktivierung des Shh-Signalweges nachgewiesen werden. So fanden Beachy et al. Shh-mRNA im Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom sowie Gallengangskarzinom. In Zelllinien dieser Tumore ließ sich ebenfalls eine Expression der Zielgene *PTCH* und *GLI* nachweisen [12].

Während der Organogenese von Magen- bzw. Duodenalgewebe werden die beiden Liganden Shh und Ihh exprimiert. Endodermale Zellen, welche sich in pankreatische Strukturen weiterentwickeln, zeigen dagegen in frühen Entwicklungsstadien keine Shh/Ihh-Expression [5, 46]. Eine ektope Aktivierung des Hedgehog-Signals zu diesem Zeitpunkt führt zu einem Verlust pankreasspezifischer Markergene sowie zur Transformation des Pankreasmesenchyms in duodenales Mesoderm. Die Aktivierung von Hedgehog in transgenen Mäusen mit Mutationen in *Ptc* oder *Hhip* (Hedgehog-interacting protein) führt trotz des signalhemmenden Effektes der Mutation zur Fortsetzung der Entwicklung des Pankreas [60]. Die Hedgehogaktivität steht somit in einem engen Zusammenhang mit der Organogenese des Pankreas. Mäuse, welche ein Fehlen von Shh oder Ihh aufweisen, zeigen zahlreiche Defekte im Bereich des Gastrointestinaltraktes [114, 117].

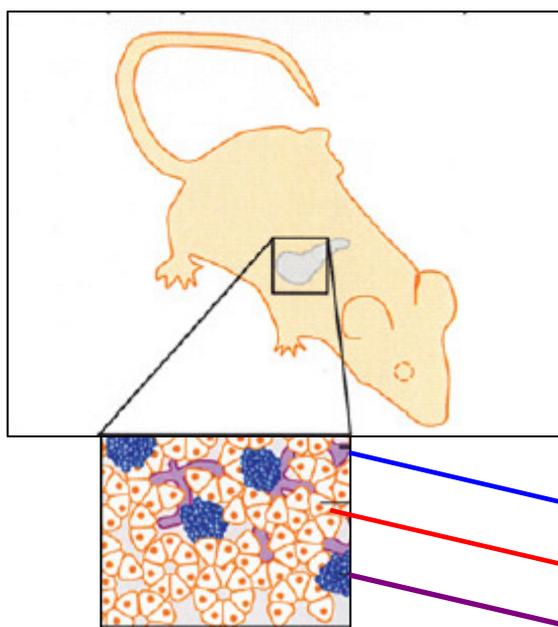


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Shh-Signals im Pankreas der adulten Maus. *Ihh*, *Ptc* und *Smo* werden in Inselzellen exprimiert. Die Expression von *Ptc* konnte in dukталen Zellen gezeigt werden. Unter physiologischen Bedingungen kommt es nicht zu einer Expression von Komponenten der Hedgehog Signalkaskade in exokrinen Zellen.

Modifiziert nach Lau et al., Cell Mol. Life Sci 2006

- Duktale Anteile (*Ptc*)
- Exokrine Anteile (kein Hh-Signal)
- Endokrine Anteile (*Ihh*, *Ptc*, *Smo*)

In einem transgenen Mausmodell (Pdx-Shh Maus), bei dem es schrittweise zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms kommt, konnte Shh in Pankreasepithelien nachgewiesen werden. Diese sog. pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) gelten als Vorläuferläsionen eines invasiven Karzinoms. In Epithelzellen humaner Pankreaskarzinomzellen konnte ebenfalls die Expression von Shh gezeigt werden [134]. Während der Progression von gesundem Pankreasgangepithel zu einem Carcinoma in situ verlieren die Zellen ihre kuboide Morphologie und Zellpolarität. Es kommt zu einer Akkumulation von Muzin und letztendlich zur Ausstülpung des Epithels und Infiltration in das angrenzende Gewebe. Die verschiedenen PanIN-Läsionen sind charakterisiert durch eine Akkumulation genetischer Mutationen auf Ebene der Tumorsuppressorgene wie *K-ras*, *DPC4* oder *p16* [10]. Immunhistochemische Untersuchungen konnten eine Überexpression verschiedener Hedgehog-Komponenten in einem signifikanten Anteil von PanIN 1 Läsionen zeigen. Dies deutet darauf hin, dass eine Dysregulation des Signalweges ein frühes Ereignis bei der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms darstellt [134].

Bisher sind gastrointestinale Karzinome noch nicht auf Mutationen der einzelnen Komponenten des Hedgehog-Signalwegs untersucht worden. In Bezug auf das Pankreaskarzinom ist bis auf weiteres unklar, inwiefern solche möglichen Mutationen eine Rolle bei der familiären Form des Pankreaskarzinoms spielen.

In nahezu allen gastrointestinalen Karzinomen konnten in der Zellkultur Shh-Liganden nachgewiesen werden. Es ist vorstellbar, dass ein Tumorwachstum nur unter den Bedingungen einer autokrinen Situation, d.h. durch die Persistenz der Signalwegsaktivität aufrechterhalten werden kann. Diese Vorstellung der Tumorigenese und Tumorprogression bildet eine Grundlage für mögliche therapeutische Ansätze.

1.3 Pankreaskarzinom

Das Adenokarzinom des Pankreas ist trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnostik und Therapie durch eine extrem schlechte Prognose gekennzeichnet [4]. Die Inzidenz beträgt in den westlichen Industriestaaten etwa 10/10.0000 Einwohner und Jahr. Dabei nimmt das Pankreaskarzinom unter den tumorbedingten Todesfällen die sechste Stelle ein [37]. Epidemiologische Untersuchungen konnten Rauchen, einen lange vorbestehenden Diabetes mellitus sowie eine lange bestehende chronische Pankreatitis als Risikofaktoren identifizieren [75]. Etwa 90% der humanen Pankreaskarzinome finden ihren Ursprung in den exokrinen Organanteilen und weisen einen duktafen Phänotyp auf. Der Pankreaskopf stellt mit 70% die häufigste Lokalisation des Adenokarzinoms dar [112]. Die Tumorausbreitung findet zunächst per continuitatem durch Infiltration des peripankreatischen Gewebes statt, einhergehend mit einer Infiltration der Perineuralscheiden. Die Metastasierung erfolgt frühzeitig in regionale Lymphknoten sowie hämatogen in Leber, Peritoneum, Lunge, Pleura, Skelettsystem und Nebenniere.

Trotz der Fortschritte in der chirurgischen Therapie des Pankreaskarzinoms liegt die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate nach erfolgreicher Resektion bei nur etwa 20% [148]. In diesem Kontext sind effektive adjuvante Behandlungsstrategien von großer Bedeutung. Die im Jahre 2001 veröffentlichten Ergebnisse einer prospektiv randomisierten Studie (European Study Group for Pancreatic Cancer, ESPAC-1) zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil für eine postoperative Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU), einem Analogon der Nukleinsäure Uracil, im Vergleich zur Beobachtungsgruppe [93]. Dieser Vorteil zeigte sich aber lediglich für Patienten nach R0-Resektion [94]. Eine neuere, prospektiv randomisierte Studie (CONKO-001) konnte einen signifikanten Vorteil hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens durch eine postoperative Therapie mit dem Nukleosidanalogon Gemcitabine zeigen. Im Vergleich zur ESPAC-1 Studie sind die Ergebnisse in der CONKO-001 Studie unabhängig vom R-Status der Patienten [100].

Aufgrund der vielversprechenden Daten der CONKO-001 Studie könnte sich eine adjuvante Therapie mit Gemcitabine als Standard in der Therapie des Pankreaskarzinoms etablieren. Eine Verbesserung der Ergebnisse könnte dabei durch eine Kombination zwischen Gemcitabine und anderen Substanzen erzielt werden. Moore et al. konnten zeigen, dass eine Kombination von Gemcitabine mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva™, OSI-774) im Vergleich zur alleinigen

Therapie mit Gemcitabine das Überleben beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom signifikant verbessert [85]. Im Idealfall sollte eine Kombination aus mehreren Substanzen die adjuvante Therapie verbessern oder im neoadjuvanten Konzept primär inoperable Karzinome resektabel machen.

1.4 Gemcitabine

Das Zytostatikum Gemcitabine (Gemzar®) (2'-Deoxy-2',2'-difluorocytidin Monohydrochlorid) ist ein Nucleosidanalogen der Gruppe der Pyrimidine. Im Unterschied zum natürlich vorkommenden zellulären Deoxycytidin sind an der 2'-Position des Zuckermoleküles zwei Fluoratome substituiert [138]. Der Wirkmechanismus läuft über den Einbau in die DNS als falsches Nucleotid nach Phosphorylierung durch die Deoxycytidinkinase zur Triphosphatform (dFdCTP). Die DNA-Elongation wird somit verhindert, was zu einem Strangabbruch und zum Zelltod führt. Verschiedene Mechanismen, welche die intrazelluläre Halbwertszeit von Gemcitabin verlängern und zu einer Verstärkung der zytostatischen Wirkung führen, wurden identifiziert. Zu diesen selbstpotenzierenden Wirkmechanismen gehört eine verzögerte Elimination durch die Desoxycytidineaminase [47]. Eine Besonderheit von Gemcitabine ist der sog. maskierte Kettenabbruch. Dabei wird nach dem Basenanalogen ein natürliches Nucleotid angefügt und damit Reparaturenzyme der DNA gehemmt.

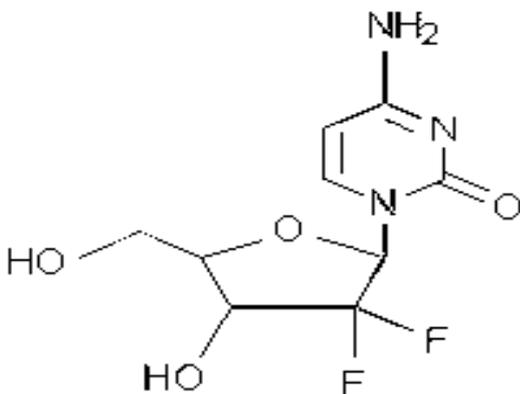


Abbildung 5:

Strukturformel von Gemcitabine (Gemzar®). An der 2'-Position des Zuckermoleküles sind zwei Fluoratome substituiert (Difluorodesoxycytidin – Hydrochlorid)

1.5 Cyclopamin

Cyclopamin ist ein steroidales Alkaloid aus der kalifornischen Kornlilie *Veratum californicum*. Das dem Cholesterol ähnliche Alkaloid hat eine ausgeprägte teratogene Potenz. So kommt es bei Nahrungsaufnahme durch trächtige Schafe bei neugeborenen Lämmern zur sog. Holoprosencephalie, einer dysraphischen Fehlbildung, welche sich unter anderem durch die Ausbildung eines cyclopischen Phänotypes auszeichnet [8].

Dies geschieht durch eine spezifische Inhibition des aktivierten Shh-Entwicklungssignalweges in den Schafembryonen. Cyclopamin-induzierte cyclopische Missbildungen sind phänotypisch nicht von Mißbildungen durch Verlust des Shh-Signales zu unterscheiden [24]. Der aktivierte Shh-Signalweg wird dabei durch Bindung und Blockierung von Smo inhibiert [21].

Die pharmakologische Inhibition des Signalweges mit Cyclopamin wurde in verschiedenen Tumormodellen untersucht. Sanchez et al. behandelten transgene Mäuse (*Ptc1*(+/-); *p53*(-/-) - Maus), bei denen es zur Ausbildung von Medulloblastomen kommt, und konnten eine signifikante Tumorverkleinerung durch Cyclopamin zeigen [124]. In einem weiteren transgenen Mausmodell (*Ptc1*(+/-) – Maus) konnte durch orale Gabe von Cyclopamin eine signifikante Reduktion des UVB-induzierten Basazellkarzinoms erreicht werden [7].

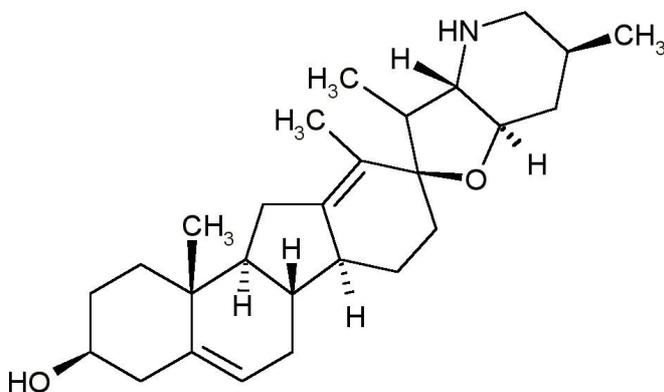


Abbildung 6:

Strukturformel von Cyclopamin (11-deoxyjervin). Das steroidale Alkaloid ähnelt strukturell dem Cholesterol.

1.6 Hh-Antag691 (G-024856; CUR)

Aufgrund der Möglichkeit der molekularen Modulation des Signalweges wurde verstärkt nach geeigneten spezifischen Inhibitoren gesucht, um therapeutische Ansätze zu generieren. Im Jahre 2003 konnten verschiedene den Shh-Signalweg inhibierende Substanzen, sog. niedermolekulare Antagonisten, identifiziert werden. Eine dieser Verbindungen ist das Benzimidazolderivat Hh-Antag691, welches sich im Vergleich zu Cyclopamin durch eine stärkere Affinität zu Smo auszeichnet [126]. In einem Medulloblastommodell (*Ptc1*(+/-); *p53*(-/-) – Maus) konnte eine dosisabhängige Inhibition der *Gli*-Expression nach Behandlung mit Hh-Antag691 gezeigt werden [119]. Die behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Rückgang der Tumorlast und ein deutlich verbessertes Langzeitüberleben. Niedermolekulare Inhibitoren bieten damit einen vielversprechenden Therapieansatz in Tumoren, in denen der Shh-Signalweg aktiviert ist.

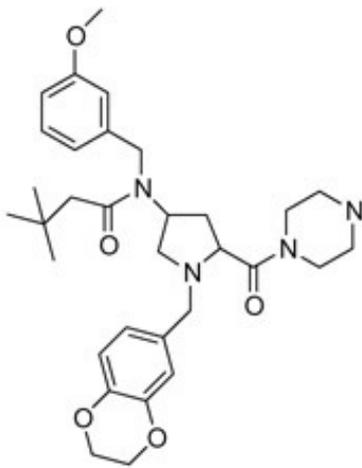


Abbildung 7:
Strukturformel des Benzimidazolderivats
Hh-Antag691.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teilbereiche untergliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung gewebespezifischer Zielgene des Shh-Signalweges im humanen Pankreaskarzinom sowie in humanen Pankreaskarzinomzelllinien.

Um die Aktivität des Hedgehog-Patched-Signalweges in Pankreastumoren zu belegen, wurde die mRNA-Expression der Hedgehog - Zielgene *PTCH* und *GLI1* analysiert. Für die Expressionsanalyse standen dabei 34 humane Pankreaskarzinome, korrespondierendes Normalgewebe und 3 verschiedene Pankreaskarzinom-Zelllinien (Mia Paca, Capan-1, ASPC-1) zur Verfügung.

Um nachzuweisen, inwiefern genetische Alterationen ursächlich für die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges im Pankreaskarzinom sind wurde der *PTCH*-Rezeptor im humanen Pankreaskarzinom auf Mutationen hin untersucht.

Aufbauend auf der Hypothese, dass ein aktiver Hedgehog-Patched-Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese humaner Pankreaskarzinome spielt, soll im zweiten Teil der Arbeit der antitumoröse Effekt von spezifischen Hedgehog-Signalweginhibitoren untersucht werden.

Es soll sowohl der niedermolekulare Smo-Inhibitor Hh-Antag691 als auch das steroidale Alkaloid Cyclopamin (alleine und in Kombination mit Gemcitabin) hinsichtlich antitumoröser Effekte *in vitro* untersucht werden. Zusätzlich soll geklärt werden, inwiefern eine Interferenz mit dem Hedhog-Signalweg eine Veränderung in der Expression der Zielgene *PTCH* und *GLI1* zur Folge hat.

Für in *in vivo* Untersuchungen stand ein etabliertes Tumormodell in der Nacktmaus zur Verfügung. Dabei wurden athymen Nacktmäusen (Nu-/Nu) Pankreastumorzellen subkutan in die dorsale Flanke appliziert. Nach Therapie mit Cyclopamin/Gemcitabine wurden die behandelten Tumore hinsichtlich der therapeutischen Wirkung auf Proliferations- und Apoptoseverhalten funktionell sowie morphologisch untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

CO ₂ Inkubator	CB 150	Binder
Deionisierungsanlage	Milli Q UF Plus	Millipore
Elektronenrastermikroskop	EM 906	Zeiss
Gelelektrophorese-Kammer	Wide Mini Sub Cell	Biorad
Inkubator	OV 5	Biometra
Kryostat	HM 560	Microm
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold
Luminometer	Microplate Reader 550	Biorad
Mikroskop	TMS	Nikon
Mikroskop	Axiovert 135	Zeiss
Page-Kammer	X Cell Sure Lock	Invitrogen
PCR-Gerät	Uno Thermoblock	Biometra
PCR-Gerät	Gen Amp 9600 Thermocycler	PerkinElmer
Phosphoimager	Fla-2.000	Fuji
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia
Pipetten	P10, P20, P100, P1.000	Gilson
Schüttelinkubator	3033	GFL
Schüttelmischer	Vortex Genie	Bender
Schüttler	3011	GFL
Sequenzierer	ABI 377	Applied Biosystems
Stickstofftank	Apollo Biosafe	Messer-Greisheim
Szintillationsmesser	NXT micoplate counter	Packard
Thermoblock	dri-block DN 3A	Techne
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Topcount NXT microplate scintillation and luminescence counter; Topcount Software version 1.6		
UV-Fixationsgerät	Stratalinker 1.800	Stratagene
UV-Transluminator	Gel Doc 1.000	Biorad
Waage		

Wassserbad	MGW RC6	Lauda
Zellerntegerät	Filtermate 96 Harvester System	Packard
Zellinkubator	IG 150	Juan
Zellkulturbank	antair BSK	Bioflow

2.2 Reagenzien

2.2.1 Kits

Apoptosis Antibody Nuclear (PARP)	Mobitec
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
ECL Kit	Amersham
FuGene6	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
NiPage Kit	Invitrogen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
PRISM Big Dye Terminator RR Mix	Applied Biosystems
Ready-togo DNA Labelling Beads Kit	Amersham
Rneasy.Mini Kit	Qiagen
SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA synthesis	Invitrogen
T7-Polymerase kit	MBI Fermentas
Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling-assay (TUNEL)	R&D Systems

2.2.2 Lösungen und Zellkulturmedien

PBS:

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄

RPMI:

500ml RPMI -Medium (Life Technologies) +
50ml FCS (Invitrogen)
5ml 200mM L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Streptomycin (Biochrom)

DMEM:

500ml DMEM-Mediumn(Life Technologies) +
50ml FCS (Invitrogen)
5ml 200mM L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Streptomycin (Biochrom)

2.2.3 Vektoren (Plasmide)

p8x3´Gli-BS-Luc

Dr. Bert Vogelstein,
The Johns Hopkins University, Baltimore

pmut8-3´Gli-BS-Luc

Dr. Hiroshi Sasaki, Developmental Biology,
RIKEN Kobe, Japan

2.2.4 Pharmaka

Cyclopamin

Toronto Research Company, Kanada

Gemcitabine

Lilly, USA

Hh-Antag

Genentech, USA

2.3 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um humane Pankreaskarzinomzelllinien (ASPC-1, MiaPaca and Capan-1). Alle Zellen sind von der „American Type Culture Collection“ (ATCC, Rockville, USA) bezogen und in entsprechenden Medien in Inkubatoren bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert worden. Dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen im 37° C-Wasserbad folgte eine Resuspension in 10 ml vorgewärmtem Medium. Durch dreimaliges Zentrifugieren bei 1.000g für 5 Minuten und Resuspendieren in

entsprechendem Medium wurden die Zellen gewaschen und danach in Zellkulturschalen ausgesät bzw. nach Auszählen für weitere Versuche verwendet. Nach vollständiger Abnahme des Mediums zur Entfernung aller Medienreste und toter Zellen folgte das zweimalige Waschen mit PBS. Durch Zugabe von 2-3 ml Trypsinlösung (Trypsin EDTA 1X in HBSS; Invitrogen) konnten adhären wachsende Zellen vom Zellkulturboden abgelöst werden. Es folgte das Stoppen der Trypsinaktivität durch Zugabe entsprechender Menge Medium, das Ablösen der Zellen durch mehrmaliges Pipettieren und das Sedimentieren durch Zentrifugation (10min, 1000g). Zum Einfrieren wurden die Zellen in 0,5 ml Medium resuspendiert und zum Gefrierschutz in Einfrierröhrchen mit vorgelegten 0,5 ml 20% DMSO vermenget. Nach Lagerung der Zellen über 1 h bei -20°C in einem Kühlaggregat für Einfrierröhrchen (8Cryo 1°C Freezing Container; Nalgene) konnten die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt werden. Für die spätere Kultivierung wurde für ASPC-1 RPMI und für MiaPaca bzw. Capan-1 DMEM verwendet.

2.4 Untersuchungskollektiv humaner Pankreaskarzinome

Alle Karzinome wurden im Rahmen von Pankreasresektionen in der Klinik für Allgemein-, Vizceral- und Transplantationschirurgie gewonnen (Tabelle 2). Alle Patienten hatten präoperativ ihr Einverständnis zur Asservierung von Tumormaterial gegeben. Nach Entfernung des Resektates konnte ex-situ zusammen mit einem erfahrenen Pathologen das Tumorgewebe aus dem Resektat entnommen und das frische Gewebe in flüssigem Stickstoff steril schockgefroren werden. Das schockgefrorene Gewebe wurde daraufhin in mit flüssigem Stichstoff gefüllte 1,8 ml Röhrchen transferiert und bei -80°C gelagert.

2.5 Untersuchungskollektiv gesundes Pankreasgewebe

Konnte durch den Pathologen ausreichend Normalgewebe im Resektat identifiziert werden, wurde zusätzlich zur Tumorgewebeentnahme komplementäres gesundes Pankreasgewebe asserviert (n = 14).

Tumor	TNM-Stadium
Pankreaskorpus -und schwanz mit einem duktalem Adenokarzinom	pT4, N0 (0/5), R0
Mittelgradig bis schlecht differenziertes duktales Adenokarzinom	pT3, N1 (9/13), G3, R1, L1, V0
Mäßig bis schlecht differenziertes, duktales Adenokarzinom d. Pankreaskopfes	pT3, N1 (2/20), G2-3
Hoch bis mäßig diff. Adenokarzinom des Pankreas	pT3, N1(2/18), G2, R1, L1, V0
Mäßig diff. Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2, R0
Niedrig differenziertes duktales Adenokarzinom mit Infiltration des Duodenums	pT3, N1 (3/17), G3, R0, L1, V1
Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT4, N1, G3, L1, R0
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1(4/16), G2, L1, V0, R0
Mittelgradig bis schlecht diff. duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT4, N0 (0/12), G3, R1, L1, V0
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom der Cauda pankreatis	pT4, N0 , G2, R0
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1 (4/16), G2, R0
Mäßig differenziertes Adenokarzinom Pankreaskopf	pT2, N0, G2, R0
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2, L1
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2
Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom ds Pankreaskopfes	pT3, N1 (1/13), G2, L1, R0
Mäßig differenziertes Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1 (8/11), G2, L1, R0
Schlecht differenziertes Adenokarzinom	pT4, N1 , G3, L1, V0
Niedrig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N0, G3, V1
Mäßig differenziertes Adenokarzinom des Pankreasschwanzes	pT3, N0 (0/14), G2, L0, V0
Schlecht differenziertes Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N0(0/15), G3, R0
Niedrig diff. Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1(7/12), G3, L1, V1, R0
Mittelgradig diff. Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2, R1, L1, V1
Mäßiggradig diff. duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2, R0
Mäßiggradig diff. duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N (1/2), G2, L1, V0, R0
Mäßiggradig diff. duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1(3/10), R0
Hoch bis mittel differenziertes Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1(4/31), G2, L1, R0
Duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1 (5/12), G3, R0
Niedrig differenziertes Adenokarzinom	pT3, N1, G3
Niedrig differenziertes Adenokarzinom	pT3, N1, G3, R0
Wenig diff. Adenokarzinom des Pankreas	pT3,N0, G3, R0
Mäßig differenziertes Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G2, L1, R1
Mäßig diff. duktales Adenokarzinom der Cauda pancreatis	pT4, N0, G2, R0
Gering differenziertes Adenokarzinom des Pankreaskopfes	pT3, N1, G3, V1, L1

Tabelle 2: Tumorgewebe nach Pankreasresektion (n = 34). Bei n = 14 Patienten konnte durch den Pathologen komplementäres gesundes Pankreasgewebe gewonnen werden.

2.6 Isolierung von RNA

Das in flüssigem Stickstoff gelagerte Tumor-und Kontrollgewebematerial wurde mittels Kryostat in 50 – 100 Schnitte à 10 µm geraspelt und in 750 µl Trizol-Reagenz (Invitrogen) resuspendiert. Zellen in Kultur kamen nach Kultivierung und nach Entfernen des Mediums bzw. Lösen vom Boden der Kulturschale ebenfalls zur Resuspension (750 µl Trizol-Reagenz (Invitrogen)). Es folgte die Zugabe von 180 µl Chloroform und das konsequente mehrmalige invertieren der Proben. Nach einer Inkubation von 3min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15min bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Nach Überführung der RNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und nach Zugabe von 250 µl Isopropanol erfolgte die Fällung der RNA und erneute Zentrifugation. Eine dritte Zentrifugation folgte nach Abnahme des Isopropanols und der Zugabe von 900 µl EtOH (75%). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet luftgetrocknet, in 25µl DEPC-H₂O resuspendiert bei – 80°C gelagert.

2.6.1 Isolierung von RNA mittels Rneasy

Zur RNA-Isolierung von in Zellkultur gehaltenen Zellen diente das Rneasy-Mini Kit (Qiagen). Nach Entfernen des Mediums folgte das Lösen adhären wachsender Zellen vom Boden der Kulturschale und die Resuspension bzw. Homogenisierung in 600 µl RLT-Puffer. Nach Zugabe von 70%igem EtOH wurde die RNA auf Rneasy-Säulchen gegeben, mittels Puffer RW1 und RPE gewaschen und dann in einem Volumen von 30 µl DEPC - H₂O eluiert und anschließend bei – 80° C gelagert.

2.6.2 Behandlung der RNA mit DNase I

Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde die RNA, welche für die Synthese von cDNA und anschließender RT-PCR eingesetzt werden sollte, einer DNase I – Behandlung unterzogen. 25 µl Trizol- bzw. Rneasy-isolierte RNA, 3 µl 10xDNase-Puffer, 1µl Dnase I (10U/µl; Roche) und 1 µl RNasin (40U/µl; Promega) kamen dafür über 2 Stunden bei 37°C in den Inkubator. Es folgte zur Entfernung von Enzymen eine weitere Trizol bzw. Rneasy-Extraktion. Die RNA wurde in 30 µl DEPC - H₂O resuspendiert und bei – 80° C gelagert.

2.7 Synthese von cDNA/reverse Transkription

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. 250-500 ng freie, gesamtzelluläre RNA wurde mit 1 µl Zufallsoligonukleotid (random hexamers; 50 ng/ml) durch Zugabe entsprechender Mengen DEPC - H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht, 10 Minuten bei 70° C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Mit Hilfe des SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) folgte unter Zugabe von 10x-PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, DTT und 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) die Synthese von cDNA. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere 50-minütige cDNA-Synthese bei 42° C. Erhitzen (15 Minuten) auf 70°C beendete die Enzymreaktion. Die cDNA wurde 1:5 bis 1:10 verdünnt und anschließend bei – 20° C gelagert.

2.8 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.8.1 Fällung von RNA, Aufreinigung von RNA

Materialien:

Tumor-(Kern-)-Lysispuffer:

155 mM	NH ₄ Cl
10 mM	Tris-Cl (pH 8,0)
10 mM	KHCO ₃
0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
0,1 mM	EDTA
0,5 %	SDS
pH 7,4,	autoklavieren

TE-Puffer:

10 mM	Tris- HCL	(pH 7,4)
1 mM	EDTA	(pH 8,0)

RNase, DNase frei (Roche)

Proteinkinase K (10 mg/ ml) (Roche)

Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1) (Life-Technologies)
PBS (Life-Technologies)

Zunächst wurden 10 ml des heparinisierten Blutes mit dem kalten Blut-Lysispuffer versetzt und nach kurzem Schütteln für 15 – 30 Minuten auf Eis lysiert. Im Anschluss fand eine 12 minütige Zentrifugation statt. Das dabei gewonnene Pellet wurde in 200 µl PBS gelöst, bevor es mit 6 ml Kern-Lysispuffer behandelt wurde. Als das Pellet vollständig resuspendiert war, erfolgte eine zunächst einstündige Inkubation mit RNase (100 µg/ml) bei 37° C. Nach kurzer Unterbrechung zwecks Zugabe von 60 µl Proteinkinase K (10 mg/ml), wurde diese bei 50° C über Nacht fortgesetzt. Zur Entfernung unerwünschter Proteine erfolgte die DNA-Aufreinigung, bei der zunächst 1 Vol des Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Gemisches im Verhältnis 25:24:1 zu den Proben hinzugefügt wurde. Nach 30 minütiger Durchmischung zentrifugierte man für weitere 10 Minuten bei 1800g. Die dabei entstandene wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde nun vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine erneute Interphase bildete. Noch zweimalig erfolgte die Zugabe von 1 Vol Chloroform, die beschriebene Durchmischung, Zentrifugation und Entfernung der wässrigen Phase. Dann erst wurde die DNA durch Behandlung mit 0,2 Vol 3M Ammoniumacetat (pH 5,3) und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, verwendete man abschließend zur Resuspension eine entsprechende Menge TE- Puffer.

Isolierung von genomischer DNA aus Tumor- und Normalgewebe:

Mit Hilfe des Kryostaten wurden jeweils 100 µm dicke Schnitte gewonnen. Diese untersuchte man nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin mikroskopisch, um sicherzugehen, dass die Proben nur das gewünschte Gewebe enthielten. Danach konnte die DNA-Extraktion unter Zugabe von 6ml Tumor-(Kern)-Lysispuffer begonnen werden.

2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient als Nachweisverfahren für PCR-Produkte von 0,5 bis 25kb Länge. Ihr liegt das Prinzip der Beweglichkeit geladener DNA-Moleküle im

elektrischen Feld zu Grunde [122]. Diese ist sowohl von der Größe, als auch von der Konformation der Moleküle abhängig. Durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der mit der DNA interkaliert, können die Banden des Amplifikationsproduktes sichtbar gemacht und unter Hinzuziehen eines Längenstandards bzgl. ihrer Größe eingeschätzt werden.

Material und Lösungen

2 %iges Agarosegel mit 1,5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ ml) pro 100 ml

Gellösung:

Agarose-Ladepuffer:

15 % Ficoll Typ 400 (Sigma)

0,25% Bromphenolblau (Sigma)

0,25% Xylencyanol (Merck)

zum Gebrauch 2:5 mit Aqua bidest verdünnt.

10 x TBE:

108 g Tris/ HCL

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA

ad 1 l aqua bidest.

Agarose-Laufpuffer:

0,5x TBE

Durchführung

Nach Hinzufügen von 5 µl Ladepuffer wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel geladen und in einer Pufferkammer mit 0,5x TBE unter einer Spannung von 180 – 200 Volt für 6-15 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei galt das Prinzip, dass unter verringerter Spannung und verlängerter Laufzeit eine schärfere Auftrennung der Produkte erzielt werden konnte.

2.8.3 Fällung von DNA, Aufreinigung von DNA

Durch Zugabe von 1/10 Volumen Ammoniumacetat (2 M, pH 4,0) bzw. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen EtOH abs. wurde die DNA gefällt, nach Zentrifugation für 15 Minuten (12.000g, 4°C) der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands folgte das Lufttrocknen des Sedimentes, die Resuspension (ddH₂O) und anschließende Lagerung bei – 20° C. Zur Aufreinigung der DNA diente ein High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). DNA wurde dabei in einem Volumen von 100 µl mit 500 µl Bindungspuffer vermengt und auf High Pure-Säulchen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer und Zentrifugation wurde die gereinigte DNA in 50 µl ddH₂O eluiert.

2.8.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der aromatischen Ringsysteme ihrer Basen liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm, das von Proteinen aufgrund aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung proportional zum dekadischen Logarithmus der Extinktion ($0 - 1$) und entspricht bei 260 nm und einem Strahlengang von 1 cm einer Optischen Dichte von 1 (OD1) von:

- 50 µg/ µl (doppelsträngige DNA)
- 40 µg/ µl (einzelnsträngige DNA/RNA)
- 33 µg/ µl (Oligonukleotide)

RNA- bzw. DNA-Proben wurden zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung 1:70 oder 1:35 in ddH₂O bzw. DEPC-H₂O verdünnt und anschließend photometrisch vermessen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} ist dabei ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung.

2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA diente das Plasmid Midi Kit (Qiagen). Die Plasmid-DNA wurde dabei aus einem Zellpellet einer 50 ml Über-Nacht – Blutkultur isoliert. Nach Zellyse durch sukzessive Zugabe der Puffer P1, P2 und P3 kommt es dabei zur Bindung der Plasmid-DNA an die Silica-Membran der Qiagen-tip-Säulchen. Nach

Waschen mit dem Puffer QC folgte die Elution durch Zugabe von 5ml QF-Puffer. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gefällt und 50 µl ddH₂O resuspendiert.

2.10 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

2.10.1 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige, palindromische DNA-Sequenzen erkennen und diese innerhalb der für eine bestimmte Restriktase spezifischen Erkennungssequenz schneiden (Typ II). Pro µg DNA kam es zum Einsatz von jeweils zwei Enzymeinheiten Restriktionsendonukleasen. Bei einem Temperaturoptimum zwischen 30° C und 37° C wurden je nach Endvolumen (10 – 20 µl) 1 – 2 µl spezifischer 10x Puffer eingesetzt und für 2 Stunden inkubiert. Nach Enzymaktivierung durch 15 – minütiges Erhitzen auf 70° C folgte die Aufreinigung und anschließende Lagerung des Ansatzes bei – 20° C.

2.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Zusammenfügen von DNA-Enden wird Ligation genannt. Eine Ligation kann nur erfolgen, wenn die DNA-Enden kompatibel in Bezug auf die Überhänge sind oder keine Überhänge existieren. Im Rahmen der Fragmentklonierung in einen Vektor führt man die Ligation in einem Molekülverhältnis von 3:1 durch. In einem 10 – 20 µl Ligationsansatz wurde 1/10 des Endvolumens 10x-Ligationspuffer und 1 µl T4- DNA-Ligase (5U/µl; MBI Fermentas) verwendet und bei 16° C über Nacht inkubiert.

2.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren, bei dem ausgewählte DNA Sequenzen exponentiell amplifiziert werden [88]. Für die Amplifikation werden kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu untersuchenden Sequenzen sind. Die PCR setzt sich dabei aus folgenden zyklisch repetitiven Schritten zusammen: Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing), Synthese des Doppelstranges (Extension) und abschließende Extension (final Extension).

Mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen Polymerase, wird aus RNA als Matrize eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die reverse Transkription und die nachfolgende PCR-Reaktion, bei der cDNA als Vorlage dient, wird RT-PCR genannt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Reaktionsvolumen von 10µl durchgeführt und 10-50 ng DNA (bzw. cDNA) als Vorlage eingesetzt. Zum

Einstellen der PCR-Bedingungen kann die MgCl₂-Konzentration, die Zugabe von DMSO sowie das PCR-Programm für jedes Primer-Paar variiert und optimiert werden. Die initiierende Denaturierung für 5 Minuten bei 94° C und die abschließende Extension für 10 Minuten bei 72° C ist bei jeder PCR unverändert. Ein typisches PCR-Basisprogramm gestaltet sich wie folgt:

1	Denaturierung	initial	5 Minuten	
2	Denaturierung	zyklisch	30 Sekunden	
3	Annealing	zyklisch	40 Sekunden	
4	Extension	zyklisch	40 Sekunden	Schritt 2 bis 4: 40 Zyklen
5	Extension	final	10 Minuten	

Komponenten für einen einfachen PCR-Ansatz:

1,0 µl	200mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen
1,0 µl	10x PCR-Puffer	Invitrogen
0,2–0,4 µl	50mM MgCl ₂ (für 1, 0 – 2, 0 mM)	Invitrogen
0,5 µl	forward primer (10 pmol/µl)	MWG
0,5 µl	reverse primer (10 pmol/µl)	MWG
0,05 µl	0,025 u Taq-Polymerase	Invitrogen
1,0 µl	DNA (10-50ng)	
evtl.	DMSO 10%	Sigma
ad 10 µl mit ddH ₂ O		

2.10.4 Kompetitive RT-PCR (cRT-PCR)

Bei der kompetitiven RT-PCR handelt es sich um ein sensitives Verfahren zur Analyse eines Zielgens in einem großen Probenkollektiv. Es werden exogene, sequenz-spezifische Kompetitor-RNA-Moleküle verwendet. Der Kompetitor besitzt dabei dieselbe Sequenz wie das entsprechende Zielgen, weist aber eine interne Deletion von ca. 10% auf, so dass dieser durch den Größenunterschied bei der gelelektrophoretischen Auftrennung vom Zieltranskript unterschieden werden kann.

Bei der Herstellung eines Kompetitors dient ein PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens als Ausgangspunkt. In einer einzigen PCR werden die Deletion mittels

Mutagenese-Primer und die Addition einer T7-Promotorsequenz mittels Primer mit entsprechendem Überhang generiert. In der folgenden *in-vitro*-Transkription entsteht das Kompetitor-RNA-Molekül. Dieses wird in verschiedenen Konzentrationen zur Zielgen-RNA zugegeben. Das Zielgen wird dann in der reversen Transkription mit derselben Effizienz wie die Zielgen-RNA transkribiert. In der anschließenden PCR wird der Kompetitor unter gleichen Bedingungen mit denselben, fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert. Durch die nun folgende Analyse der Relation Produkte aus *Zielgen-RNA* / *Produkte aus Kompetitor-RNA* kann eine Aussage über die mRNA-Menge des Zielgens gemacht werden [141].

2.10.5 Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle

Zur Herstellung exogener Kompetitoren wurde ein Pool aus verschiedenen cDNAs verwendet. Für die Expressionsversuche in Tumoren stand dabei ein cDNA-Gemisch von Tumoren und/oder Normalgewebe zur Verfügung. Zielfragmente konnten mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte aus Agarosegelen ausgeschnitten werden. Ca. 10 ng dienten als Matrize für die entsprechende Mutagenese-PCR. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde unter Verwendung eines reversen Mutagenese-Primers und eines forward-T7-Promoter-Primers ein PCR-Produkt mit einer internen Deletion von ca. 10 – 20 Basenpaaren und einer zusätzlichen T7-Promotersequenz amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung von 5 µl des Produkts folgte die Aufreinigung des Restvolumens und Elution in 30 µl DEPC-H₂O. Dabei waren die Bedingungen der Mutagenese und der PCR stets die gleichen. Zur Herstellung der RNA-Kompetitor-Moleküle wurde eine *in vitro*-Transkription in einem Volumen von 20 µl mit ca. 0,5 µg mutierter Template-cDNA und 1 µl T7-RNA-Polymerase (20U/µl; Invitrogen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers (T7 Transcription kit; MBI Fermatas) durchgeführt. Es folgte die Behandlung der RNA mit DNase. Nach Lösung der RNA 30 µl DEPC-H₂O konnte die Konzentration der synthetisierten Kompetitoren mittels Spektrophotometrie bestimmt werden.

Zur Bestimmung die Quantität der Zielgene diente eine Verdünnungsreihe der jeweiligen RNA-Kompetitoren von 500pg/µl bis 5fg/µl. Ein Pool einer jeden Verdünnung wurde dann mit 250 ng gesamtzellulärer RNA revers transkribiert. Mit Hilfe fluoreszenz-markierter Primer konnte der Punkt der optimalen Titration ermittelt werden. Als optimal galt diejenige Titration, bei der sich nach reverser Transkription

und kompetitiver PCR die Produkte des Kompetitors und des Zielgens quantitativ entsprachen (Abb. 8). Nach diesem Vorversuch wurden für alle zu analysierenden Gene die jeweiligen RNA-Kompetitoren in der optimalen Konzentration eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte gelang mit Hilfe des semi-automatischen Sequenzierers ABI377. Die quantitative Bestimmung der PCR-Produkte gelang mittels entsprechender Software („Genescan collection“ und „Genescan analysis“ Version 1.2.1, Applied Biosystems).

Zum Ausschluß von fehlerhaften Messungen durch Fluktuationen der zellulären RNA wurde der jeweilige Quotient durch den entsprechenden Quotienten eines Haushaltsgens dividiert. Dieses wird unter der Vorstellung durchgeführt, daß ein Haushaltsgen eine nahezu konstante Expression in unterschiedlichen Proben zeigt.

Berechnung der Expressionswerte:

$$\left(\frac{\text{Zielgen}_{\text{Probe}}}{\text{Zielgen}_{\text{Kompetitor}}} \right) / \left(\frac{\text{Haushaltsgen}_{\text{Probe}}}{\text{Haushaltsgen}_{\text{Kompetitor}}} \right)$$

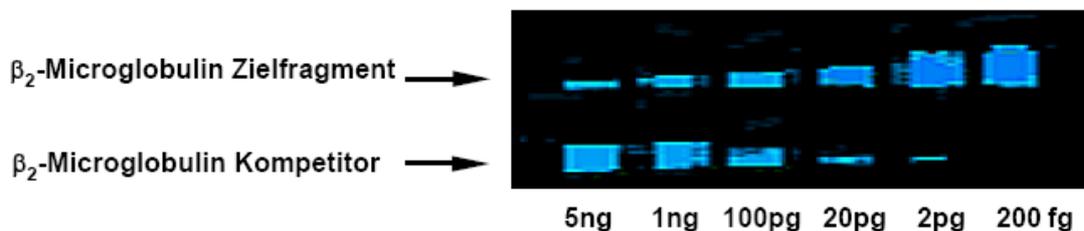


Abbildung 8:

Verdünnung des Kompetitors mit gepoolter zellulärer RNA. Wenn der Quotient aus Zielfragment-Produkt und Kompetitor-Produkt etwa gleich eins war, wurde die Verdünnung als optimal gewertet.

2.11. Mutationsanalyse mit Hilfe des Einzelstrang Konformations-Polymorphismus

Mit Hilfe des Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (single-strand conformation polymorphism; SSCP) können DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation auf Mutationen untersucht werden [45, 101]. Dabei nimmt einzelsträngige DNA, die eine Mutation trägt, in nicht denaturierenden Gelen häufig eine andere Konformation ein als

Wildtyp - DNA und zeigt daher in der Gelelektrophorese ein verändertes Laufverhalten. Die elektrophoretische Mobilität hängt somit von der Länge und der Konformation der Moleküle ab, welche durch die Sequenz bedingt ist. Schon eine einzige Basensubstitution kann in einer Konformationsänderung resultieren und bei optimalen Bedingungen mittels SSCP-Analyse detektiert werden. Die Temperatur des Gels, der Vernetzungsgrad der Polymere, der Zusatz von Glycerol oder die Ionenstärke von Gel – und Laufpuffer beeinflussen dabei die sterische Konformation des Einzelstranges und somit das Wanderungsverhalten. Die SSCP-Methode eignet sich besonders gut für eine routinemäßig durchzuführende Mutationsanalyse. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass in PCR-Produkten, die länger als 300 Basenpaare sind, nur noch deutlich weniger als 80% der Mutationen detektiert werden können. Tabelle 3 gibt die eingesetzten Primer wieder.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>PTCH</i> -exon1	GAAGG CGAGC ACCCA GAC	TCTTT CCCTC CTCTC CCTTC
<i>PTCH</i> -exon2	GTGGC TGAGA GCGAA GTTTC	TTCCA CCCAC AGCTC CTC
<i>PTCH</i> -exon3	CTATT GTGTA TCCAA TGGCA GG	ATTAGTAGGT GGACGCGGC
<i>PTCH</i> -exon4	GAGAATTTTTGTCTCTGCTTTTCA	CCTGA TCCAT GTAAC CTGTT TC
<i>PTCH</i> -exon5	GCAAA AATTT CTCAG GAACACC	TGGAA CAAAC AATGA TAAGCAA
<i>PTCH</i> -exon6	CCTAC AAGGTGGATG CAGTG	TTTGC TCTCC ACCCT TCTGA
<i>PTCH</i> -exon7	GTGAC CTGCC TACTA ATTCCC	GGCTA GCGAG GATAA CGGTTTA
<i>PTCH</i> -exon8	GAGGC AGTGG AAAC T GCTTC	TTGCA TAACC AGCGA GTCTG
<i>PTCH</i> -exon9	GTGCT GTCGA GGCTT GTG	ACGGA CAGCA GATAA ATGGC
<i>PTCH</i> -exon10	GTGCT GTCGA GGCTT GTG	ACGGA CAGCA GATAA ATGGC
<i>PTCH</i> -exon11	GTGTT AGGTG CTGGT GGCA	CTTAG GAACA GAGGAAGCTG
<i>PTCH</i> -exon12	TCTGC CACGT ATCTG CTCAC	CATGC TGAGA ATTGC AGGAA
<i>PTCH</i> -exon13	GGCCT ACACC GACAC ACAC	TTTTT TTGAA GACAG GAAGA GCC
<i>PTCH</i> -exon14	GACAG CTTCT CTTTG TCCAG	ACGCA AAAGA CCGAA AGGAC GA
<i>PTCH</i> -exon15	AGGGT CCTTC TGGCT GCGAG	TCAGT GCCCA GCAGC TGGAG TA
<i>PTCH</i> -exon16	AACCC CATT C TCAAA GGCCTCTGTTTC	CACCT CTGTA AGTTC CCAGA CCT
<i>PTCH</i> -exon17	AACTG TGATG CTCTT CTACC CTGG	AAACT TCCCG GCTGC AGAAA GA
<i>PTCH</i> -exon18	TTTGA TCTGAACCGA GGACACC	CAAAC AGAGC CAGAG GAAATGG
<i>PTCH</i> -exon19	TAGGA CAGAG CTGAG CATT ACC	TACCT GACAA TGAAG TCG
<i>PTCH</i> -exon20	TAGGA CAGAG CTGAG CATT ACC	TACCT GACAA TGAAG TCG

<i>PTCH</i> -exon21	AACAG AGGCC CCTGA AAAAT	GATCA CTTGG TGGGC AGG
<i>PTCH</i> -exon22	AGAAA AGGCT TGTGG CCAC	TCACC CTCAG TTGGA GCTG
<i>PTCH</i> -exon23	ATACCACCCTTCTAACCCACC	GGTTCCGAGGGTTGTGAGAACG

Tabelle 3: *Eingesetzte Primer für die Mutationsanalyse*

Material und Lösungen

10%ige Gelstocklösung mit einer Acrylamid:Bisacrylamid-Vernetzung von 29:1:

48,34ml 40% Acrylamid (Life Technologies)

33,34ml 2% Bisacrylamide (Life Technologies)

10ml 10x TBE

ad 200 ml aqua bidest.

5% Glycerol (je nach Gelbedingung)

200 µl 20% Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED als Starter der Polymerisation für
20 ml Gelstocklösung

SSCP-Ladepuffer:

90 % Formamid

10 % 10x TBE

0,01 % SDS

1 mM EDTA

0,25% Bromphenolblau (Merck)

0,25% Xylencyanol (Merck)

0,06 M NaOH

SSCP-Laufpuffer:

0,5x TBE

Durchführung

Das PCR-Produkt wurde mit dem SSCP-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Letzterer hatte neben einer denaturierenden Komponente (Formamid) die Aufgabe, die Proben so zu beschweren, dass sie in die Geltaschen pipettiert werden konnten. Bei ca. 94°C erfolgte nun die Denaturierung der Proben für 10 Minuten. Um eine

Reassoziation der Einzelstränge zu unterbinden, wurden die PCR-Produkte unmittelbar danach auf Eis gestellt.

Jeweils 5µ l der Proben konnten nun auf die Polyacrylamidgele geladen werden. Nach Anlegen einer Spannung von ca. 60Volt bei Raumtemperatur (bzw. 80 Volt bei einer Außentemperatur von 4 °C) wurden die Proben über einen Zeitraum von 14-16h (bzw. 18-20h) elektrophoretisch getrennt.

2.12 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis von DNA-Fragmenten in Polyacrylamidgelen [18]. Sie beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, bei niedrigem pH-Wert Silberionen zu binden und hat eine Nachweisgrenze von 5ng/ DNA-Bande. Mit Hilfe von alkalischem Formaldehyd gelingt es, komplexassoziierte Silberionen zu reduzieren. Hierdurch fällt das Silber aus und die währenddessen in Erscheinung tretenden DNA-Banden erscheinen braun bis schwarz.

Material und Lösungen

10 %	Ethanol	(Riedel de Häen)
1 %	Salpetersäure	(Merck)
0,2 %	Silbernitrat	(Serva)
10 %	Essigsäure	(Merck)

Natriumbicarbonatlösung:

150 g	Na ₂ CO ₃	(Merck)
2,5 ml	Formaldehyd 35%	(Merck)
ad 5 l aqua bidest		

Durchführung

Zur Fixierung der Nukleinsäuren in der Gelmatrix wurden die Gele zunächst für 5 Minuten in 10 %igem Ethanol geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 1-2 minütige Behandlung mit 10%iger Salpetersäure und ein einmaliges kurzes Waschen in Aqua dest. Daraufhin wurden die Polyacrylamidgele in 0,2%ige Silbernitratlösung gelegt und

dort unter leichtem Schwenken für mindestens 20 Minuten belassen. Der Entwicklungsvorgang konnte nun nach mehrmaligem sorgfältigen Waschen der Gele in Aqua dest. durch Zugabe von Natriumbicarbonat - Formaldehyd - Lösung eingeleitet werden. Unter Reduktion der Silberionen ist ein Sichtbarwerden der DNA –Produkte als Banden zu beobachten gewesen. Gestoppt wurde diese Reaktion, wenn die Banden deutlich braun gefärbt erschienen, durch Behandlung der Gele mit 10%iger Essigsäure für ca. 1 Minute. Nach gründlichem Auswaschen der Essigsäure mit aqua dest wurden die Polyacrylamidgele auf einem Vakuumtrockner bei ca 80°C für 2 Stunden getrocknet.

Isolierung der aberrant laufenden Banden aus dem SSCP-Gel und Reamplifizierung durch PCR geshiftete Proben, die wiederholt auftraten, wurden vor dem Trockenvorgang aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten und mit 50 µl Elutionspuffer versetzt. Bei 30°C wurden sie über Nacht geschüttelt, um die DNA aus dem Acrylamidgel zu lösen.

Material und Lösungen

DNA Elutionspuffer:

0,5 M	Ammoniumacetat
10 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
0,1 %	SDS

Durchführung

Nach erfolgter Elution wurde die DNA mit 125 µl Ethanol absolut gefällt und über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 4°C und 10.000g zentrifugiert. Im Anschluss daran ist das entstandene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und für weitere 10 Minuten im Speed Vac getrocknet worden. Die so gewonnene DNA konnte nun nach Resuspension in 10 µl aqua bidest erneut als Matrize in die sogenannte Reamplifizierung-PCR eingesetzt werden. Als Reaktionsvolumen wurden hierbei 40 µl gewählt; die PCR Bedingungen für das jeweilige Primerpaar blieben identisch. Nach erfolgreicher Reamplifizierung konnten die Proben aufgereinigt und schließlich sequenziert werden.

Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung

Ziel der Aufreinigung war es, Primer, überschüssige Nucleotide, Salze und die Taq-Polymerase zu entfernen, damit durch sie keine Signalüberlagerungen bei der Sequenzierreaktion entstehen könnten. Hierzu verwendete man Affinitätssäulen der Firma Qiagen (QIAquick-spin Purification Kit 250) und verfuhr gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Material und Lösungen

Puffer PB (Qiagen)

Puffer PE (Qiagen)

Puffer EB(10mM, Tris Cl, pH 8,5)

Säule Qiaquick

Durchführung

Nachdem das aufzureinigende Produkt mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB versetzt und durchmischt worden war, konnte es auf eine QIAquick-Säule mit dazugehörigem Sammelgefäß (Collection Tube) überführt werden. Dieses wurde dann für 1 min bei Raumtemperatur und 10.000g zentrifugiert. Der dabei im Collection Tube aufgesammelte Durchlauf konnte verworfen werden. Nun erfolgte das Waschen des Produktes durch Zugabe von zunächst 500 µl Puffer PE und erneute Zentrifugation zu gleichen Konditionen. Der Waschvorgang wurde anschließend unter Verwendung von 200 µl Puffer PE noch einmal wiederholt. Zur Elution der DNA wurde die Qiaquick-Säule in ein neues Tube überführt und mit etwa 30 µl Puffer EB versetzt. Nach 2 minütiger Inkubation erfolgte durch eine abschließende Zentrifugation die Herauslösung des nun aufgereinigten PCR-Produktes aus der Membran der Affinitätssäule. Dieses konnte direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden.

DNA Sequenzierung

Die Sequenzier-Methode nach Sanger et al. kann auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet werden [125]. Sie bietet die Möglichkeit, einzelsträngige cDNA sowie gDNA, die nach initialer Denaturierung als Einzelstrang in der Sequenzierreaktion vorliegt, zu analysieren. Hierbei kommt den normalen Nukleotiden zugesetzten 2',3'-Didesoxynukleotiden (ddATP/ddTTP/ddCTP/ddGTP)

eine besondere Bedeutung zu. Fluoreszenzmarkiert fungieren sie als Terminatoren der Amplifikation, so dass ihr Einbau den Kettenabbruch zur Folge hat. Bei ausreichender Menge eingesetzter und während der Reaktion neu synthetisierter Matrizen-DNA kann man auf diese Weise Fragmente erhalten, deren Größe im Bereich Primerlänge + 1 bis Gesamtfragmentlänge variiert. Gleich ist allen Produkten, dass die letzte zum Abbruch führende Base fluoreszenzmarkiert ist und ein für sie spezifisches Farbsignal abgibt. Dies bietet die Möglichkeit, die Basenabfolge eines Fragmentes mit Hilfe eines Sequenziergerätes zu visualisieren. Zur Durchführung der Sequenzierreaktion wurde das PRISM™;Ready Reaction Dye Deoxy™; Terminator Cycle Sequencing Kit von PerkinElmer/Applied Biosystems und der automatische Sequenzierer Abi 377 verwendet.

Material und Lösungen

PRISM™;Ready Reaction Dye Deoxy;

Terminator Cycle Sequencing Kit (PerkinElmer/Applied Biosystems)

Mix für die Sequenzierreaktion:

2 µl ;	Terminator Premix
20 ng	Template
1,6 pmol	Primer
ad 10 µl	aqua bidest.

6%iges Sequenziergel:

30 g	Harnstoff
9 ml	AA-Sstammlösung, 40% (LifeTechnologies)
6 ml	10x TBE
23,5 ml	aqua bidest.

Filter (Porengröße 0,2µm)

Reagentien zur Induktion der Polymerisation: 180 µl APS, 10%; 24 µl TEMED

Laufpuffer: 1x TBE

Ladepuffer: Formamid (98%) : EDTA (50mM, pH 8,0) = 4 : 1

Durchführung

Die Sequenzierreaktion, die mit Hilfe des Gene Amp 9600 Thermocycler der Firma PerkinElmer durchgeführt wurde, gliederte sich in folgende Teilreaktionen:

Initiale Denaturierung bei 96°C für 2 min; 25 Zyklen der Sequenz.

Denaturierung bei 96°C für 10sec; Alignment bei 50°C für 10 Sekunden.

Extension bei 60°C für 4 Minuten.

Anschließend erfolgte die Fällung der Proben mit 0,1 Vol 3M NaAc (pH 5,3) und 2,5 Vol Ethanol. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14 000g wurde der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 10min bei 4°C und 14.000g zentrifugiert und im Anschluss daran vakuumgetrocknet. In µl Ladepuffer konnten die Proben resuspendiert werden. Bei 94° C erfolgte dann über 2 min die Denaturierung. Um eine Reassoziaton der DNA-Doppelstränge zu vermeiden, wurden die Proben unmittelbar danach auf Eis aufbewahrt, bis sie auf das 6%ige Polyacrylamidgel geladen wurden. Mit den Programmen ABI Prism™ Collection version 2.5.1 und Sequencing Analysis 3.3 konnten die Proben ausgewertet werden. Alle Sequenzierungen erfolgten mit dem automatischen Sequenzierer Typ 377 der Firma ABI.

Elektrophoretische Spannung 1680 Volt

Elektrophoretischer Strom 50 mA

Elektrophoretische Arbeit 150 watts

Temperatur des Gels 51 °C

Laser Arbeit 40 mW

Laufzeit 7 std

Anzahl der Scans 8252

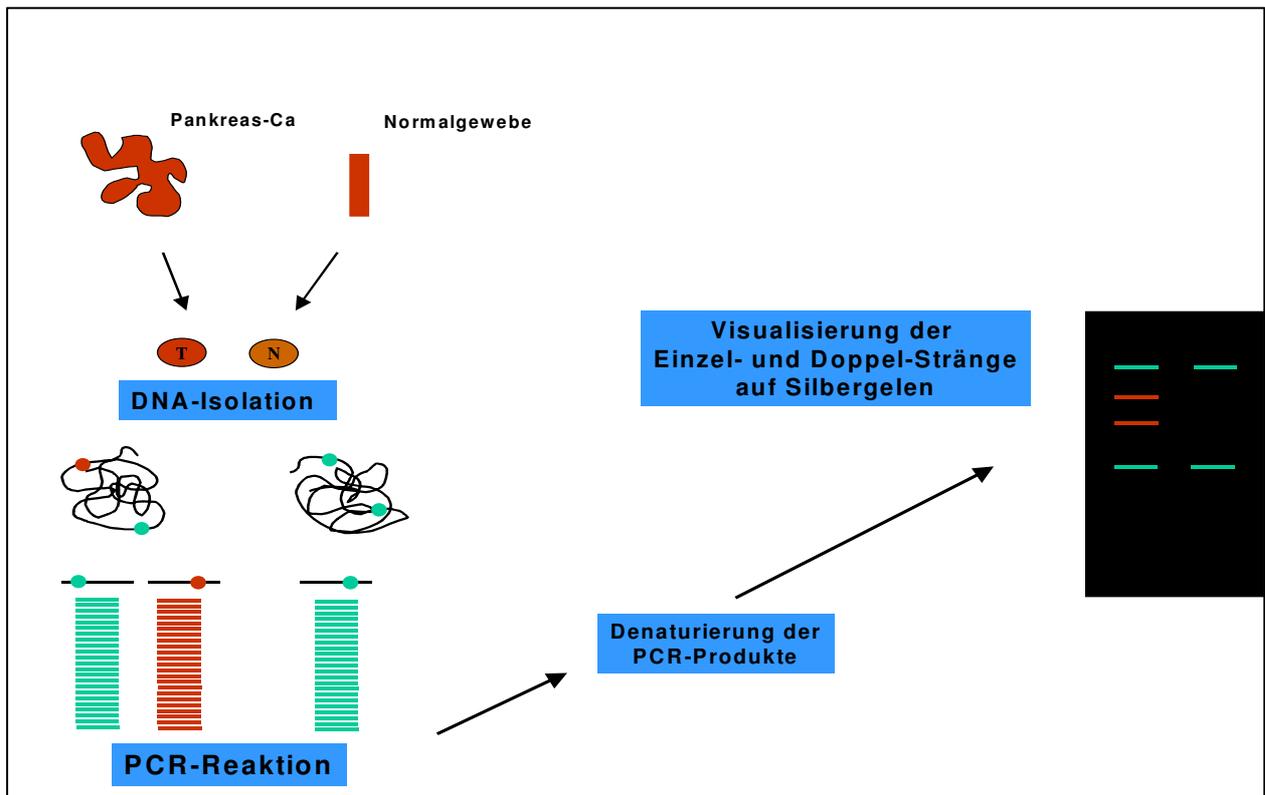


Abbildung 9: Prinzip der Mutationsanalyse mit Hilfe des Einzelstrang Konformations-Polymorphismus (SSCP). Die PCR – Produkte wurden auf Polyacrylamidgele mit verschiedenen Acrylamid/Bisacrylamid–Verhältnissen (1:99, 1:79, 1:29) aufgetragen und bei Raumtemperatur für 18-24 Stunden laufen gelassen. Die Visualisierung der Doppel– und Einzelstrang PCR-Produkte gelang mit Hilfe einer Silberfärbung. Banden mit aberrantem Laufverhalten wurden ausgeschnitten und das DNA-Produkt reamplifiziert. (QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Chatsworth)).

2.13 ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate der Pankreaskarzinomzelllinien (ASPC-1, MiaPaca und Capan-1) unter Einfluß verschiedener Signalweginhibitoren diente ein ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay.

Dabei wurden Pankreaskarzinomzellen in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 12 Stunden Kultivierung folgte die Himnzugabe von 12,5 µl Medium – verdünntem ³H-Thymidin (Methyl-³H-Thymidin, 3 µCi/ml; Amersham, Freiburg, Deutschland). Nach insgesamt 48 Stunden Kultivierung erfolgte die Übertragung der Zellen mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Filtermate 196 Harvester System, Packard) auf eine Membran und die Bestimmung der Inkorporationsrate mittels Szintillationsmessung (Topcount NXT microplate scintillation and luminescence counter; Topcount Software version 1.6).

2.14 Luciferase-Reporter-Assay

Anhand des Dual-Luciferase-Reporter Assay Systems (Promega) sollte die Aktivierung von subklonierten, potentiellen Promoterbereichen beschrieben werden. Das System zeichnet sich dadurch aus, dass zwei individuelle Reporter innerhalb eines Experiments simultan gemessen werden können. Die Menge der beiden fluoreszierenden Proteine (Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase) können dabei luminometrisch bestimmt werden. Dafür wurden Zelllinien in 12-Loch-Schalen kultiviert und mittels Lipofektion (FuGene, Roche) mit Expressions- und Reporterplasmiden transfiziert. Für die Untersuchung diente folgendes Expressions-Konstrukt:

Der *Gli-1* – Expressionsvektor pcDNA3-His-human*GLI1* (0.5 µg) sowie *Gli1* – binding site containing Firefly-Luciferase plasmid p8x3'*Gli-S-Luc* und eine nichtfunktionelle Variante, pmut8-3'*Gli-BS-Luc* (0.5 µg).

Ein Renilla SV40 – Konstrukt (0.01 µg) diente als interne Kontrolle für eine effiziente Transfektion. Die Gesamtmenge der DNA wurde durch die Zugabe von pcDNA3.1 (0.5 µg) konstant gehalten. 24 Stunden nach Transfektion begann die Behandlung jeder Zelllinie entweder mit Cyclopamin oder Hh-Antag für 24 Stunden. Bei Kulturende nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen durch Zugabe des Lysispuffer PLB aufgeschlossen. Nach Zentrifugation befanden sich die gelösten Proteine im Überstand. In einem semi-automatischen Luminometer folgte nun zur Anregung der Firefly-Luciferase die Zugabe von 50 µl LARII-Puffer zu je 10 µl Überstand. Es folgte

dann die Messung der Fluoreszenz und konsekutiv die Fluoreszenzauslöschung der Firefly-Luciferase sowie die Fluoreszenzanregung der Renilla-Luciferase durch Zugabe von 50µl Stop & Go Puffer. Auf diese Weise konnten in einer Probe die jeweilige Menge der beiden Reporterproteine gemessen werden.

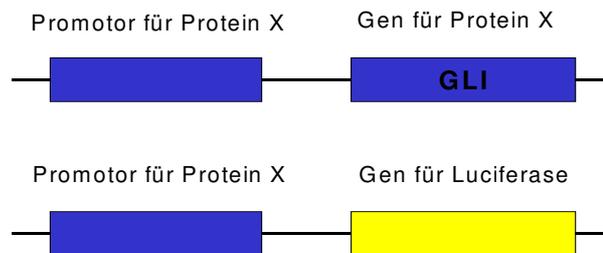


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Gli-Luciferase-Konstruktes. Mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assays soll die Aktivierung des subklonierten, potentiellen Promoterbereiches für GL1 beschrieben werden.

2.15 Zellproliferationstest (XTT)

Zur Bestimmung der Proliferation wurde des Weiteren der XTT-Proliferationstest (Cell Proliferation Kit II, Roche Molecular Biochemicals, USA) durchgeführt. Dabei werden Zellen in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit Tetrazolium [3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl-(2H)-tetrazolium-5-carboxianilide (XTT)] für 4 bis 24 Stunden inkubiert. Vitale Zellen wandeln mit Hilfe aktiver intramitochondrialer Dehydrogenasen das Tetrazolium-Salz XTZT in ein lösliches Formazan um und bekommen dabei eine orangene Farbgebung. Avitale Zelle, bei denen die intramitochondriale Dehydrogenase inhibiert ist, können kein Formazan bilden. Die Anzahl der vitalen Zellen korreliert somit direkt mit der Menge Zellen mit orangener Farbgebung. Die Formazanbildung wird photometrisch über ein Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450-500 nm abgelesen. Dadurch kann der Grad der Zytotoxizität einer Testsubstanz angegeben werden.

2.16 TaqMan Gen-Expressions Assays

Beim TaqMan- oder auch 5'-Nuclease-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, die so

genannte TaqMan-Probe. TaqMan-Proben sind Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden fluoreszenzauslöschenden Farbstoff, dem sog. Quencher, markiert sind. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan-Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5', 3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Erst nach Abspaltung des Reporters (R) vom Quencher (Q) durch die 5', 3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Reporterfluoreszenz messbar und zeigt die Synthese des spezifischen Zielstranges an. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der Menge des DNA-Templates im Tube. Die Taq-Polymerase fragmentiert nur an die Zielsequenz gebundene TaqMan-Sonden, nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Für eine real-time quantitative Multiplex-PCR, bei der mehrere Zielsequenzen in einer einzelnen PCR- Reaktion nachgewiesen werden, können Farbstoffe mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen als Reporter für die nachzuweisenden Sequenzen hinzugenommen werden.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Probe
Cyclin D1	CCGTCCATGCGGAAG ATC	AACAAGTTGCAGGG AAGTCTTAAGA	CCTCCAGCATCCAGG TGGCGA
Cyclin E	CCCCGCTGCCTGTA CTGA	AGCATGGAGTAAG AGACCTGGAA	TCAGTGCCGACTCT GCCACATGG

Tabelle 4: *Eingesetzte Primer für die TaqMan Gen-Expressions Assays zum Nachweis von Cyclin D1 und Cyclin E.*

2.17 Tierversuche

2.17.1 Tierhaltung

Die Tierversuche waren bei den zuständigen Behörden ordnungsgemäß beantragt und nach Erfüllung der geforderten Voraussetzungen genehmigt worden. Haltung und Überwachung der Versuchstiere unter S2-Bedingungen in Filterkästen während des Versuches sowie die ordnungsgemäße Entsorgung nach Beendigung der Versuche durch den zuständigen Veterinär und ausgebildete Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums des Virchow-Klinikums Berlin waren gegeben. Alle Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Für die hier beschriebenen Versuche wurden kommerziell erhältliche weibliche athym Nacktmäuse (Nu/Nu) der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland genutzt.

Die Tierexperimente sind in Übereinstimmung mit den "Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" durchgeführt worden.

2.17.2 Tumor-Inokulation

Zur Tumor-Inokulation wurden etwa 4×10^6 Zellen in 100 µl PBS gelöst subkutan in die dorsale Flanke einer 4 – 8 Wochen alten weiblichen Nacktmaus injiziert. Nach etwa 10 bis 14 Tagen haben die Tumore den gewünschten Durchmesser von 1 cm erreicht. Während der Wachstumsbeobachtung wurde zweitägig die Größe der Tumore gemessen.

2.17.3 Tumorextirpation

Nach Abschluß der Therapie, zu vorher definierten Zeitpunkten bzw. bei signifikanter Verschlechterung des Zustandes der tumortragenden Tiere, wurden die Tiere getötet und der Tumor subkutan herauspräpariert (Abb. 11 und 12). Die Tötung erfolgte durch Narkose mit Disoflourane. Nach Entnahme des Tumors folgte die Bestimmung der Größe sowie des Gewichtes. Zur weiteren Untersuchung wurden jeweils zwei frische Gewebeproben in 50 ml flüssigem Stickstoff steril schockgefroren. Nach Transferieren des schockgefrorenen Gewebes in mit flüssigem Stickstoff gefüllte 1,8 ml Röhrchen folgte die Lagerung bei $- 80^{\circ}$ C. Eine weitere Probe wurde zur späteren Paraffineinlage primär in Formalin verbracht.



Abbildung 11 und 12: Tumortragende Nu/Nu-Nacktmaus. Nach Eröffnung der Kutis zeigt sich ein großer, gut vaskularisierter Tumor.

2.17.4 Vorversuche

Im ersten Schritt wurden zur Evaluierung des *in-vivo*-Tumorstadiumsverhaltens der einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien jeweils drei Tieren 4×10^6 Zellen der Zelllinien MiaPaca, Capan-1 bzw. ASPC-1 subkutan in die dorsale Flanke appliziert und das Wachstum der Tumoren gemessen ($n = 9$).

In einem weiteren Schritt folgte zur Findung der optimalen Cyclopamindosierung die Behandlung von 12 tumortragenden Tieren nach folgendem Protokoll. Zwei Tiere wurden dabei als Kontrollgruppe mit PBS behandelt.

Dosisfindungsgruppe Cyclopamin:

Gruppe 1:	PBS	$n = 2$
Gruppe 2:	Cyclopamin 5mg/kg KG	$n = 3$
Gruppe 3:	Cyclopamin 10mg/kg KG	$n = 3$
Gruppe 4:	Cyclopamin 15mg/kg KG	$n = 3$
Gruppe 5:	Cyclopamin 20mg/kg KG	$n = 3$

Die Behandlung mit Cyclopamin begann nach 10-14 Tagen für 7 konsekutive Tage unter zweitägiger Messung der Tumorgroße. Die Applikation des Cyclopamin erfolgte dabei subkutan auf der kontralateralen Seite.

Nach Tumorextirpation wurde die mRNA-Expression des Zielgens *PTCH* in den einzelnen Tumorproben mittels kompetitiver RT-PCR gemessen.

2.17.5 Versuchsgruppen

Nach Applikation von 4×10^6 Zellen (Capan-1) subcutan in die dorsale Flanke und konsekutivem Wachstum der Tumore konnte mit der Therapie begonnen werden. Die acht Versuchsgruppen teilten sich wie folgt auf:

Gruppe 1	Kontrollgruppe (PBS)	$n = 6$
Gruppe 2	Cyclopamin 5 mg/kg KG	$n = 6$
Gruppe 3	Cyclopamin 5 mg/kg KG (synchrone Applikation)	$n = 6$
Gruppe 4	Cyclopamin 10 mg/kg KG	$n = 6$
Gruppe 5	Cyclopamin 10 mg/kg KG (synchrone Applikation)	$n = 6$
Gruppe 6	Cyclopamin 5 mg/kg KG + 80mg/kg KG Gemcitabin	$n = 6$
Gruppe 7	Cyclopamin 10 mg/kg KG + 80mg/kg KG Gemcitabin	$n = 6$
Gruppe 8	80mg/kg KG Gemcitabin	$n = 6$

2.17.6 Versuchsprotokoll

Nach Beginn des Tumorwachstums konnte mit Hilfe einer Schieblehre die TumorgroÙe alle zwei Tage bestimmt werden. Die Hälfte der Tiere jeder Versuchsgruppe wurde nach der Behandlung getötet, die andere Hälfte nach 8 Wochen. Desweiteren wurden die Tiere bei einem Tumordurchmesser von 3 cm getötet, wenn der Tumor Ulzerationen aufwies oder das Tier kachektisch geworden war.

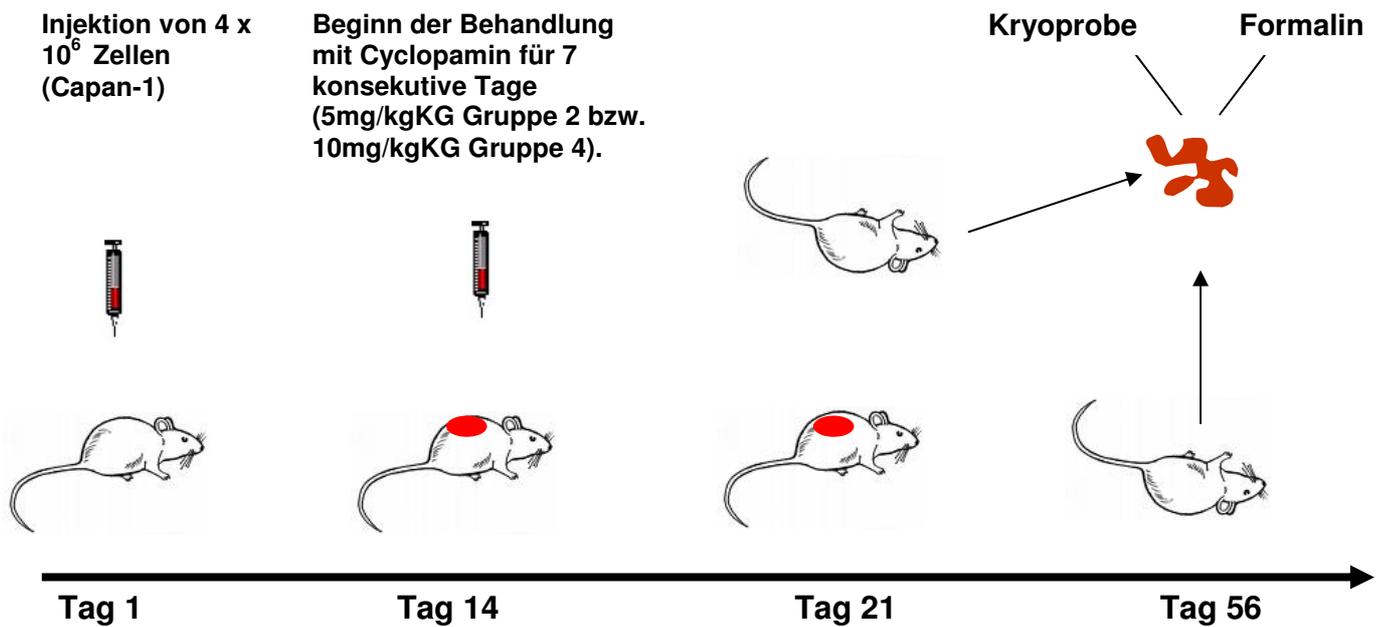


Abbildung 13: Versuchsprotokoll für die Versuchsgruppen 2 und 4.

Behandlungsplan für die Gruppen 3 und 5. Bei diesen Versuchsgruppen wurde synchron zur Tumorzellinjektion die Behandlung mit Cyclopamin 5 mg/kg KG (Gruppe 3) bzw. Cyclopamin 10 mg/kg KG (Gruppe 5) begonnen.

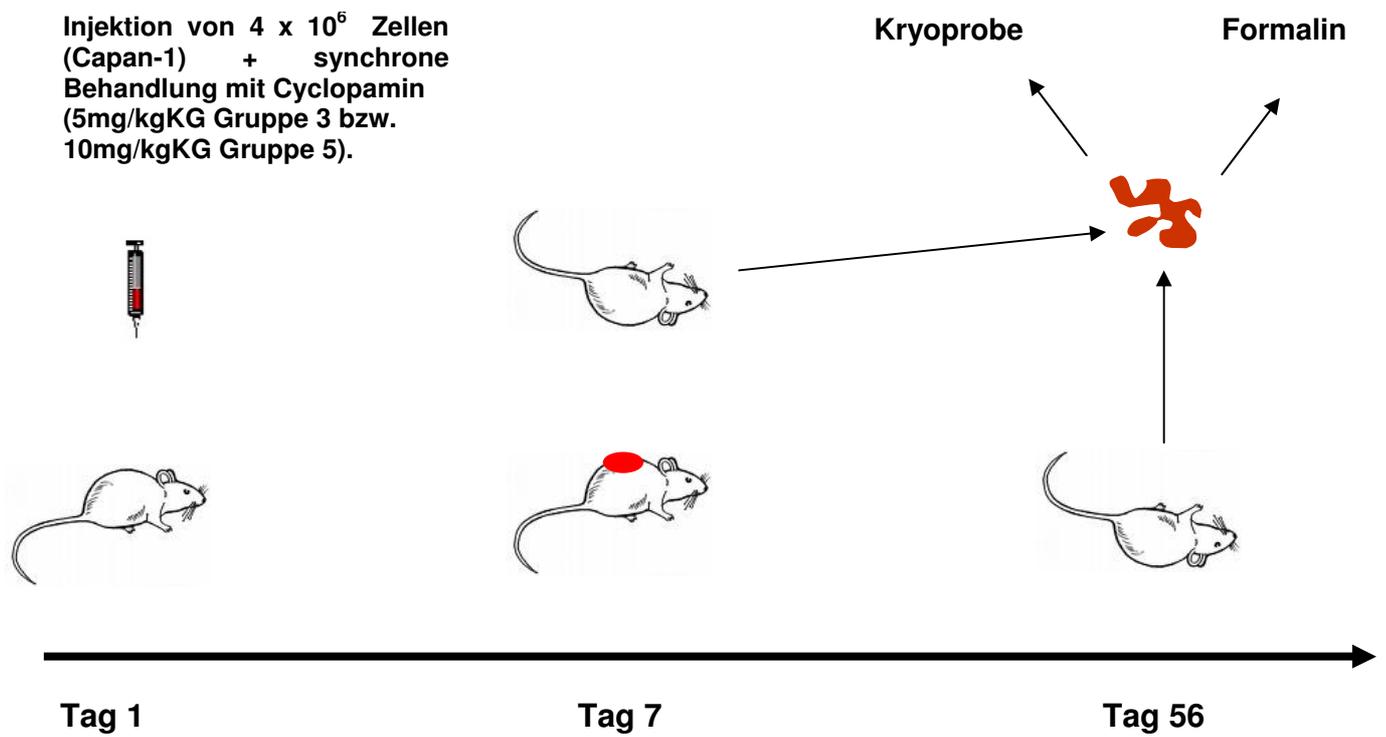


Abbildung 14: Versuchsprotokoll für die Versuchsgruppen 3 und 5.

Behandlungsplan für die Gruppen 6 und 7. Bei diesen Versuchsgruppen wurde zusätzlich zur Behandlung mit Cyclopamin eine Behandlung mit Gemzitabine 80mg/kg KG durchgeführt.

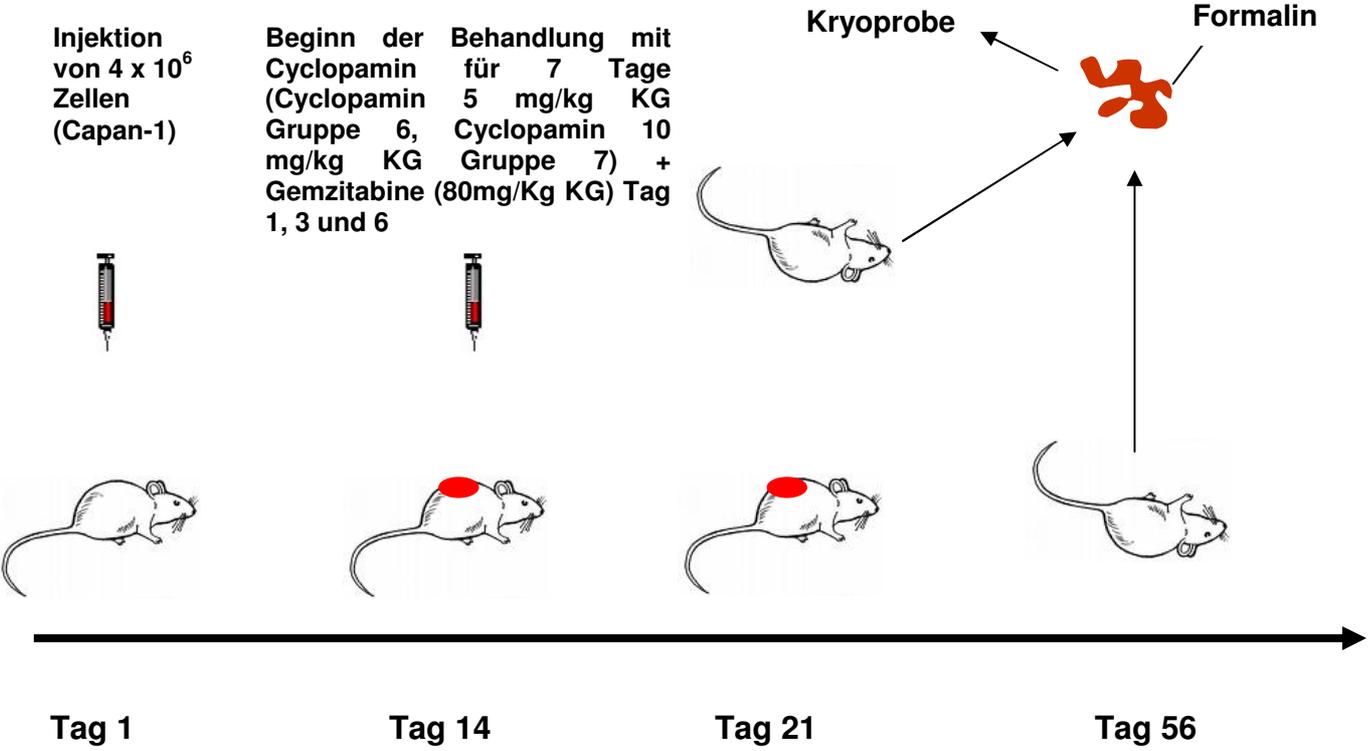


Abbildung 15: *Versuchsprotokoll für die Versuchsgruppen 6 und 7 (Kombinationsbehandlung):*

Behandlungsplan für die Versuchsgruppe 8. Bei dieser Versuchsgruppe wurde am Tag 1, 3 und 6 eine Monotherapie mit Gemcitabine (80mg/kg KG) durchgeführt.

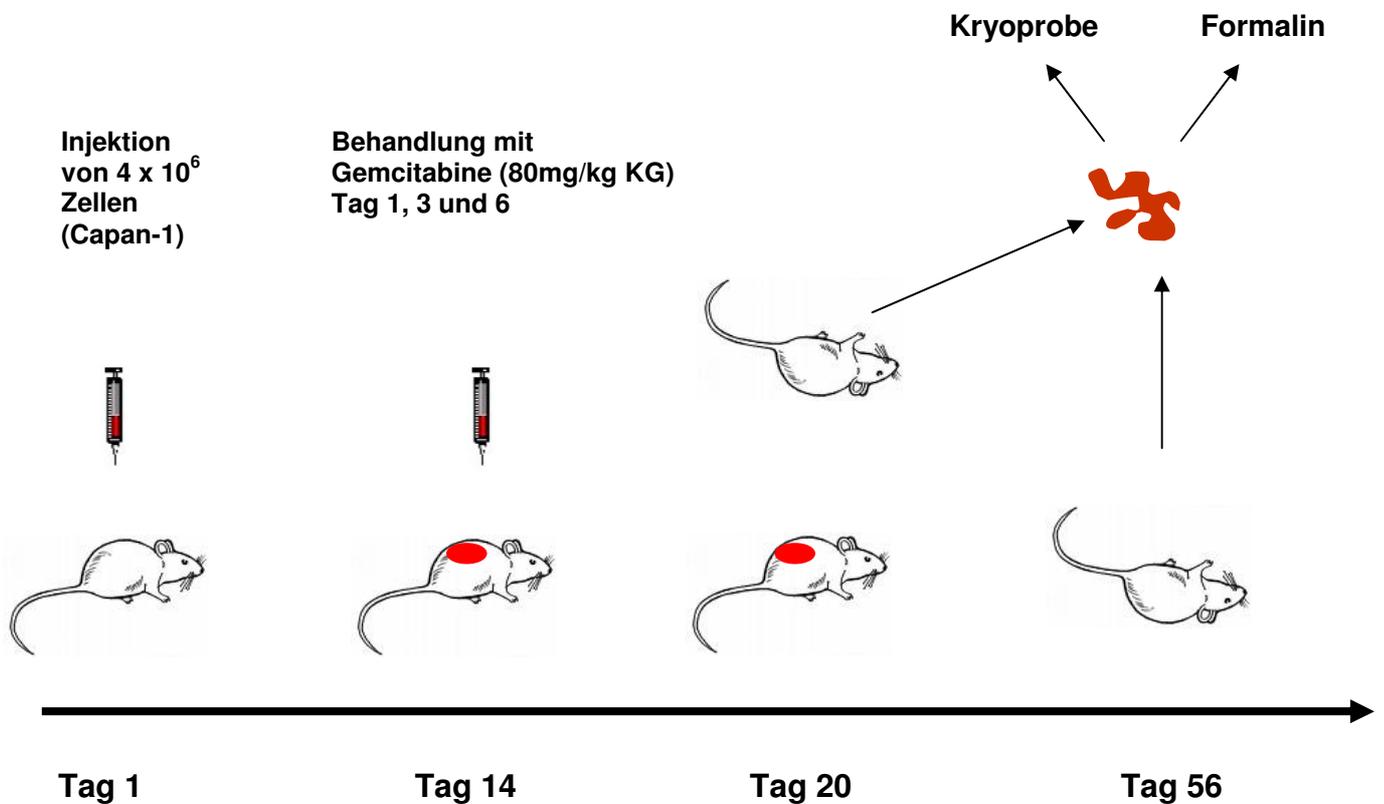


Abbildung 16: Versuchsprotokoll für die Versuchsgruppe 8 (Gemcitabine-Monotherapie).

2.18 Histologie

2.18.1 Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung

Zur Beurteilung der Gewebemorphologie wurden nach Entnahme des Tumors nach Paraffineinbettung serielle Schnitte mit einer Schichtdicke von jeweils 10 µm Dicke angefertigt und diese konsekutiv mit der Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung gefärbt. Dabei wurde ein Objektträger für 30 Sekunden in einer Hämalalaun-Lösung und danach für 5 Sekunden in einer Eosin-Lösung inkubiert. Nach jedem Färbeschritt folgte das vorsichtige Waschen des Objektträgers mit Leitungswasser und dann die Einbettung der Objekte. Bei der Färbung entsteht durch die Oxidation des Hämatoxylyls Hämatin, welches mit Aluminiumionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Negativ geladene Phosphatgruppen der Nukleinsäuren reagieren mit dem Farbkomplex, der Zellkern im Präparat erscheint Blau. Das Zytoplasma wird mit Eosin angefärbt und erscheint rosa. Anhand der Färbung können Nekrosen im Tumorgewebe quantifiziert und durch Auszählen der Mitosen der Mitoseindex angegeben werden.

2.18.2 Elektronenmikroskopie

Um die verschiedenen Apoptosestadien der behandelten Zellen darzustellen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Es erfolgte dafür die Ausplattierung von 4×10^6 Capan-1 Zellen in einer Zellkulturschale. Nach 48 Stunden folgte eine Behandlung mit Cyclopamin (5µM) gefolgt von weiteren 48 Stunden Inkubationszeit. Daraufhin wurden die Zellen mit Glutaraldehyd (2,5%) und PBS fixiert, in Kulturmedium verbracht und das Medium mit Osmium tetraoxid (2%) gefärbt. Nach Einbettung in Epon-Glycidether (Serva, Heidelberg, Deutschland) erfolgte nun das Schneiden von 60 – 70 nm messende Schnitten mittels Ultramicrotom (Leica Ultracut S, Bensheim, Deutschland). Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gegengefärbt. Nach 24 Stunden konnten die elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden (EM 906, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.19 Immunhistochemische Untersuchungen

Immunhistochemische Färbungen basieren auf dem Prinzip der genauen Phenotypisierung spezifischer Zelloberflächenantigene. Dabei werden diese in einem ersten Schritt mit monoklonalen Antikörpern markiert und in einem weiteren Schritt mit einem Sekundärantikörper beschichtet. Zur Definition der notwendigen Konzentration des Primärantikörpers wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Primärantikörper durchgeführt.

2.19.1 Ki67 (MIB-1)

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, der Zellen im Gewebe anfärbt, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion. Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G₁-, in der S-, in der G₂- und in der M-Phase exprimiert. Der Klon MIB -1 ist ein paraffingängiger Antikörper mit dem das Ki67-Antigen dargestellt werden kann. Die Ki 67 Färbung wurde nach dem Protokoll des Herstellers (K 0609, DAKO, Glostrup, Denmark) durchgeführt. Nach Entparaffinisierung der Proben erfolgten die Färbungen mit Hilfe einer Standard Avidin-Biotin-Komplex-Technik an 1-2µm durchmessenden Schnitten. Die Demaskierung der Epitope wurde hitzeinduziert in einem Dampfkochtopf unter 5minütigem Kochen mit Tris-HCl-Puffer bei pH6.0 durchgeführt. Nach Abkühlung und Waschen erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen mit einem Peroxidase Blocking Reagenz (S100, DAKO) und anschließend die Inkubation mit einem primären Maus anti-Human-Antikörper (M 7248, DAKO) in einer Verdünnung von 1:25 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Auswaschen des Überstandes folgte nun eine 10minütige Inkubation mit einem biotinylierten anti-Maus Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen erfolgte eine 10minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Abschließend wurden die Schnitte für 5min mit Hämalaun-Färbung (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Positive Zellen zeigten eine rötlich-braune Färbung im Bereich des Zellkerns.

2.19.2 Zytokeratin 18 (M30)

Mit Hilfe des M30-Antikörpers kann das formalinresistente Epitop des Zytokeratin 18 detektiert werden. Der Nachweis von Zytokeratin 18, welches die Caspase-3 Aktivität bestimmt, ist ein frühes Ereignis der Apoptose. Die M30-Färbung wurde zum Nachweis der Caspaseaktivität der behandelten Tumoren durchgeführt.

Nach Inkubation von Paraffinschnitten mit einer Dicke von 3-5 µm über Nacht bei 37° C folgte eine 15minütige Behandlung mit Xylol. Konsekutiv folgte die Behandlung der Proben für je 10 Minuten mit 100%, 96% und 70% Ethanol sowie Aqua dest. Zur Demaskierung des Citratpuffers wurden 18 ml Citronensäure-Monohydrat und 82 ml Natriumcitrat-Dihydrat mit Aqua dest auf 1.000 ml aufgefüllt (pH 6.0). Es folgte das Kochen der Objektträger in einem Dampfkochtopf für 20 Minuten. Nach Abkühlung und Waschen wurden die endogenen Peroxidasen wiederum mit dem Peroxidase Blocking Reagenz (S100, DAKO) geblockt und anschließend mit dem primären Maus anti-Human-Antikörper (M30, Cytodeath, Roche) behandelt. Nach Auswaschen des Überstandes erfolgte die 10minütige Inkubation mit einem biotinylierten anti-Maus Sekundärantikörper (DAKO K0679). Nach abermaligem Waschen folgte eine 10minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Abschließend wurden die Schnitte für 20 Sekunden mit Hämatoxylin (HHS32, Sigma) gegengefärbt.

2.19.3 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

Das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein Schlüsselenzym der DNA-Reparatur. Das Enzym katalysiert die sog. Poly ADP-Ribosylation von Histonen und anderen Proteinen. PARP ist nicht nur in die DNA-Reparatur involviert, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Transkription, der Zellzyklus-Regulation und der Apoptose. Die Aktivierung von PARP wird durch DNA-Einzelstrangbrüche der DNA vermittelt. Desweiteren supprimiert die Aktivierung von PARP die Apoptose [95]. Die PARP – Expression ist daher ein indirekter Marker für den Zellschaden.

Als primärer Antikörper wurde bei der PARP-Färbung der anti-Human-Antikörper (Apoptosis Antibody Nuclear (PARP), Mobitec) benutzt.

2.19.4 Cyclin D1, Cyclin E

Cycline spielen eine zentrale Rolle bei der Zellzyklusregulation. Mit cyclin-abhängigen Kinasen (CdKs) können Cycline Komplexe bilden und somit deren Kinasefunktion aktivieren. Die Konzentration von Cyclinen ist zellzyklusabhängig. Cyclin D ist dabei in schwankender Konzentration während des gesamten Zellzyklus vorhanden. Cyclin E bestimmt den Übergang von der G1- Phase zur S – Phase. Eine Überexpression von Cyclin D1 gilt als Indikator für eine Zellzyklusdysregulation [15]

2.19.5 TUNEL-Färbung

Nach Entnahme der Tumore erfolgte zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens der Zellen der sog. TUNEL Test (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling-assay, R&D Systems, Wiesbaden). Dabei läßt sich an kryokonserviertem Gewebe die Degradation der DNA nachweisen. Aus kurzzeitig kryokonserviertem Tumorgewebe wurden bei -24 C° 5 μm messende Kryoschnitten angefertigt und für zwei Stunden bei 37° C getrocknet. Es folgte die Fixierung der Schnitte für 10 Minuten in Formaldehyd-Lösung und daraufhin für weitere 10 Minuten in PBS. Nach Zugabe von Proteinase K-Verdau (R&D Systems, Minneapolis, USA) wurden die Schnitte nochmals zweimalig für je zwei Minuten gewaschen. Zur Fluoreszenzlöschung, dem sog. Quenching, erfolgte die Hinzugabe von 45 ml Methanol/5ml H_2O_2 30% und das nochmalige Waschen für 1 Minuten in PBS.

Die Schnitte wurden dann für 5 Minuten mit TdT-Labeling Puffer behandelt und dann mit TdT-dNTP für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Das Reaktionsende erfolgte mit Hilfe des TdT Stop-Puffers und der Hinzugabe von Streptavidin-HRP-Detection Solution (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA, USA) für 10 Minuten. Konsekutiv erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Methylgrün. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun bei 400facher Vergrößerung die TUNEL-positiven, braun angefärbten Zellen, ausgezählt und pro Gesichtsfeld angegeben.

2.20 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde aus allen Datensätzen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sowie die Standardabweichung (SD) berechnet. Bei Werten verbundener Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der statistische Unterschied zwischen nicht verbundenen Datensätzen wurde mit Hilfe des Student's t-test ermittelt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0.05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von *PTCH* im humanen Pankreaskarzinom und gesundem Pankreasgewebe

Die Analyse der Zielgenexpression des Hh-spezifischen Liganden bzw. Zielgens *PTCH* mittels kompetitiver RT-PCR zeigt Abbildung 17. Die Ergebnisse sind als representatives Verhältnis der *PTCH* mRNA Expression im Tumor zur *PTCH* Expression im Normalgewebe dokumentiert. Die Expression der einzelnen Proben (Tumor + Normalgewebe) wurde mit der jeweiligen Expression des Houskeepers verrechnet. In der Mehrzahl der untersuchten Proben zeigte sich eine deutliche Überexpression von *PTCH*. Die Tumor/Normalgewebe-Ratio zeigte einen Bereich von 1.10 – 46.59 (Mean: 6.94).

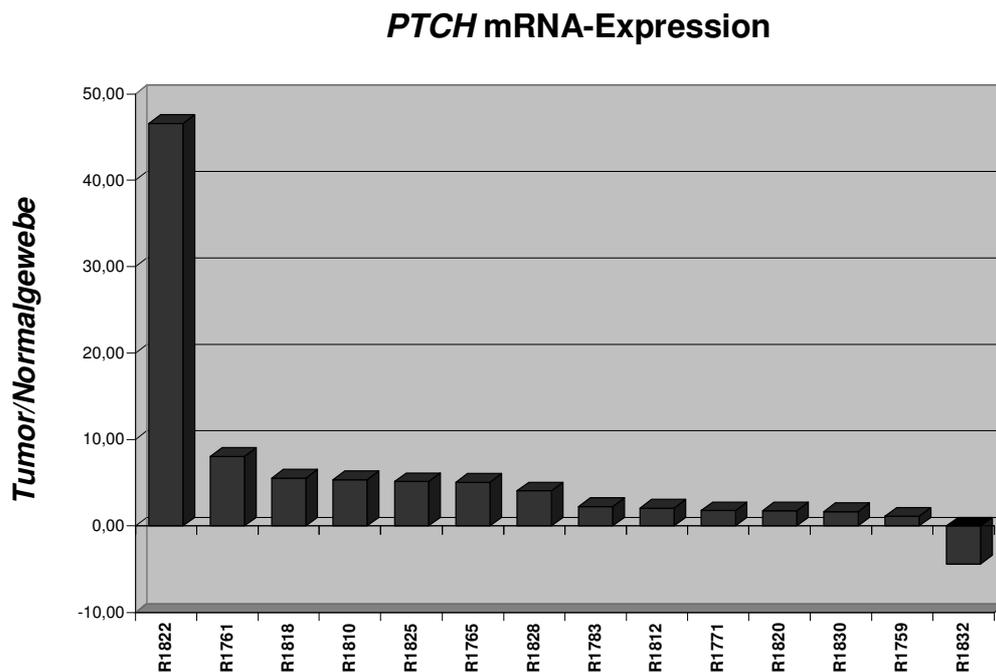


Abbildung 17: Expression von *PTCH* in 14 humanen Pankreaskarzinomen im Verhältnis zum komplementären Normalgewebe

3.2 Expressionsanalyse von *GLI1* im humanen Pankreaskarzinom und gesundem Pankreasgewebe

Die Analyse der Zielgenexpression von *GLI1* mittels kompetitiver PCR ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Ergebnisse sind ebenfalls als repräsentatives Verhältnis der *GLI1* mRNA Expression im Tumor zur *GLI1* Expression im Normalgewebe dokumentiert. Die Expression der einzelnen Proben (Tumor + Normalgewebe) wurde mit der komplementären Expression des Houskeepers verrechnet. 12 von 14 untersuchten Proben zeigten dabei eine deutlich höhere *GLI1*-Expression als das korrespondierende Normalgewebe. Die mRNA Expression lag zwischen 1.51 und 19.24 (Mean, 6.47).

Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen der *PTCH* und *GLI1* Expression. So fanden sich in der Tumorprobe R1832 eine reduzierte *PTCH* mRNA sowie eine reduzierte *GLI1* mRNA-Expression.

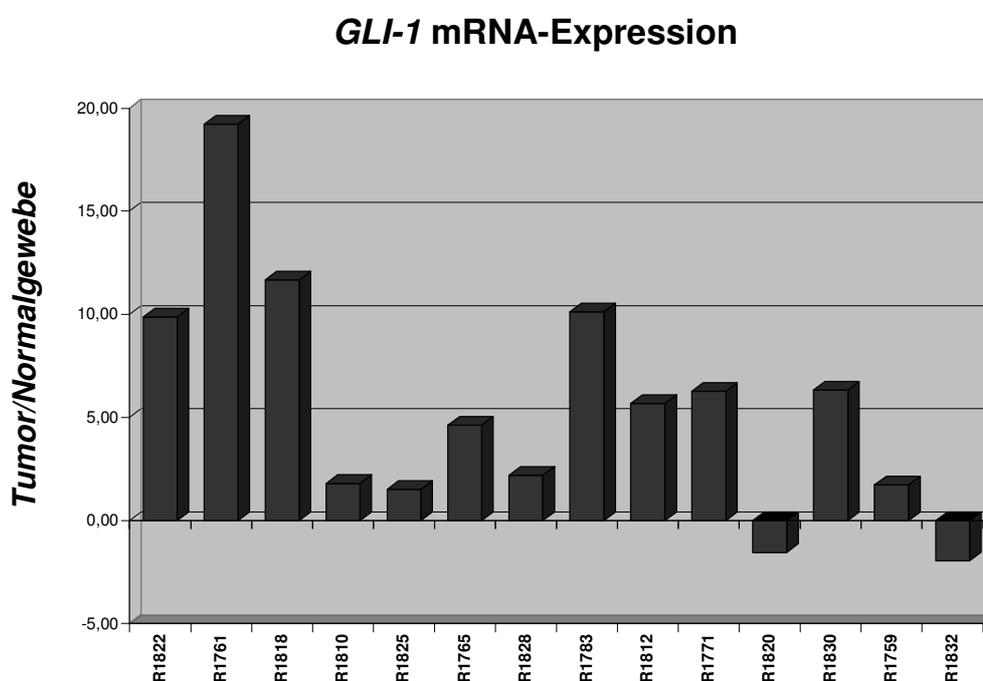


Abbildung 18: Expression von *GLI1* in 14 humanen Pankreaskarzinomen und komplementären Normalgewebe

3.3 Basale *Gli1*-Promoteraktivität in Pankreaskarzinomzellen

Um nachzuweisen inwiefern der Hedgehog-*PTCH*-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen aktiv ist, wurde die *GLI1*-Promoteraktivität mittels *GLI1*-Luciferaseassays bestimmt.

Die Tumorzelllinien ASPC-1, Mia Paca und Capan-1 wurden zunächst durch Lipofektion mit dem *GLI1*-Luciferase-Vektor *GLI1*-Luc transferiert, bei dem *GLI1*-Bindungsstellen vor den Promoter des Luciferasegens kloniert werden. Der mittlere Balken (Abb.19) gibt somit die basale GLI1-Aktivität der Zellen wieder. Co-Transfektion mit pcDNA*GLI1* führt zu einer deutlichen *GLI1*-Promoter -bzw. *GLI1*-Luciferase-Aktivität, womit sichergestellt ist, dass die Expressionplasmide funktionell aktiviert werden können (schwarzer Balken). Im Falle der dritten Säule (weisser Balken) wurden Pankreaskarzinomzelllinien mit einem Expressionsplasmid transfiziert bei dem die *Gli1*-Bindungsstellen mutiert sind, d.h. exprimiertes Gli1 kann zwar an den Promoter binden, die Luciferase wird aber nicht aktiviert. Daraus wird deutlich, dass sich im Gegensatz zu ASPC -1 in Capan -1 sowie in Mia Paca eine gesteigerte basale *Gli1*-Aktivität zeigt.

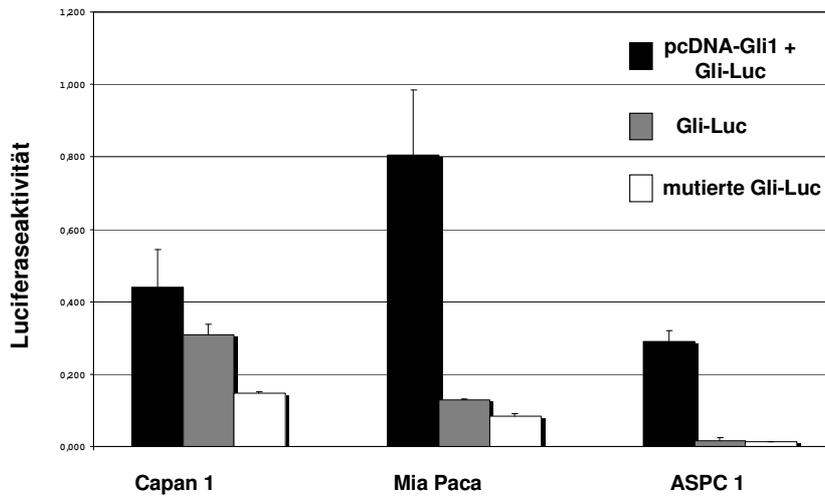


Abbildung 19: Basale Gli-Aktivität in den drei Zelllinien Capan- 1, Mia Paca und ASPC-1. Gli1-Luc ist ein Expressionsplasmid in welches GLI1-Bindungsstellen vor das Luciferasegen kloniert wurden. Nach Transfektion der Zellen mit dieser konstante wurde die GLI-Luciferase-Aktivität gemessen. Im Gegensatz zu ASPC –1 konnte in Capan -1 sowie in Mia Paca eine gesteigerte basale Gli1-Aktivität nachgewiesen werden.

3.4 Mutationsanalyse von *PTCH* in humanen Pankreaskarzinomzelllinien sowie in humanen Pankreaskarzinomen

34 Proben humaner Adenokarzinome und drei Tumorzelllinien wurden hinsichtlich Mutationen untersucht. Dafür wurden alle für das *PTCH* – Gen kodierenden Sequenzen und Exon-Intron-Grenzen mit Hilfe der SSCP-Analyse und durch Heterozygotensequenzierung untersucht. In zwei duktalem Adenokarzinomen wurde eine aberrante Bande in Exon 2 identifiziert (D1880 und D1900). Die Sequenzierung zeigte das Vorhandensein eines “silent single nucleotide polymorphism (SNP)” im Codon 76 (CCC-->CCG; P76P). Zusätzlich konnte in 50% der Tumorproben ein “silent SNP” in Exon 12 des *PTCH*-Genes gefunden werden. Die Sequenzierung erbrachte eine Guanin Adenosin - Transition im Codon 562 (A562A). Im Exon 11 des *PTCH*-Genes konnten in 12 von 34 Tumoren SNPs gezeigt werden. Die Sequenzierung der reamplifizierten DNA zeigte einen Aminosäureaustausch aufgrund eines Basenaustausches an der zweiten Position des kodierenden Triplets (Position G1526T kodiert für G509V). (Abb. 20).

Zusätzlich konnte in einer Pankreaskarzinomprobe ein Polymorphismus identifiziert werden (D1894). Dieser Polymorphismus resultiert in einem Aminosäureaustausch (Thr Ser) im Codon 1195 (Exon 22). Da diese Mutation im komplementären Pankreasgewebe ebenso gefunden wurde, handelt es sich nicht um eine somatische Mutation.

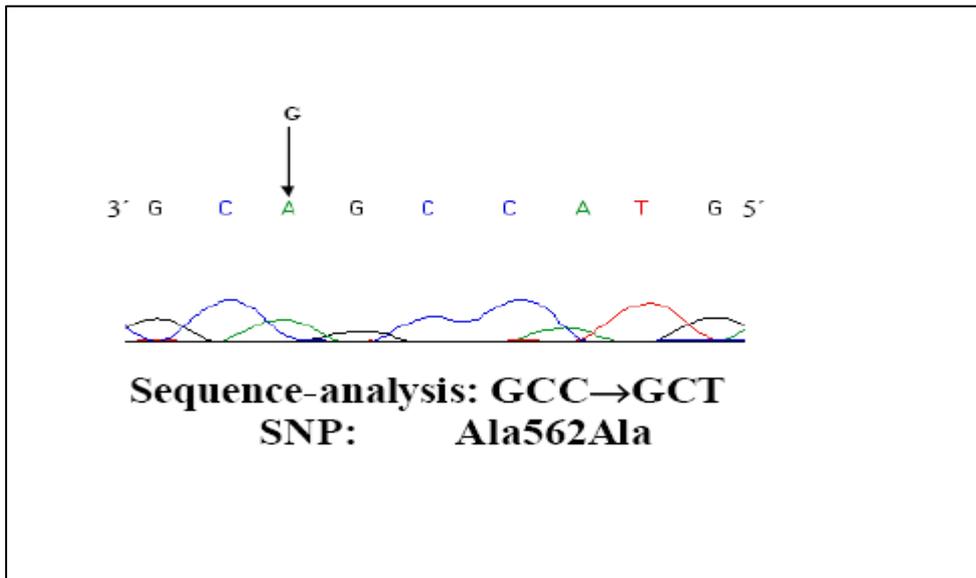


Abbildung 20 "Silent single nucleotide polymorphism (SNP)" im Codon 562 (GCC→GCT). mit der Folge einer Guanin Adenosin - Transition im Codon 562 (A562A)

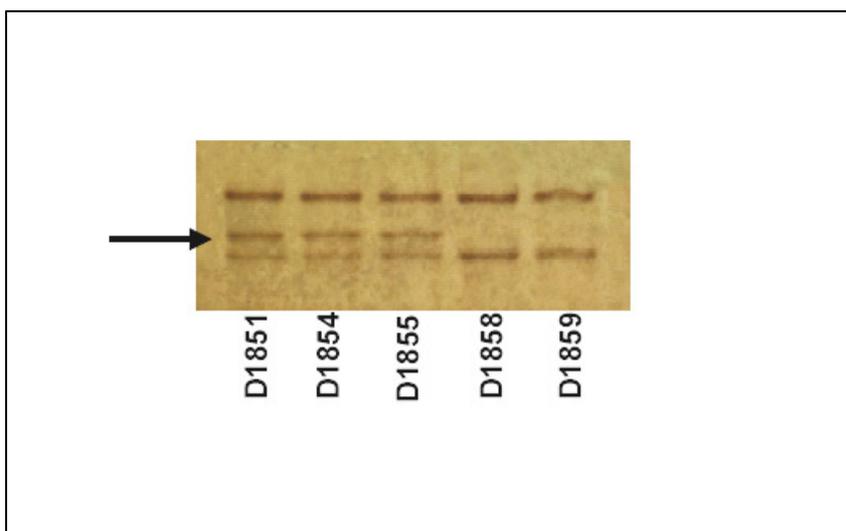


Abbildung 21: Ausschnitt mit 5 Tumorproben, die auf ein SSCP-Gel aufgetragen wurden. Die Tumorproben D1851, D1854 und D1855 zeigen ein aberrantes Laufverhalten der tumorabgeleiteten DNA-Amplikons (Pfeil), das in den Tumorproben D1858 und D1859 nicht zu erkennen ist. Die aberrant laufenden Banden wurden direkt aus dem noch nicht getrockneten SSCP-Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und mit dem gleichen Primer reamplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte über Affinitätsäulen wurden die Proben in eine Sequenzier-Reaktion eingesetzt. Die Sequenzierung zeigte eine Punkt-Mutation im Exon 11 des PTCH-Gens. In 12 von 34 Tumoren konnte ein Basenaustausch von G nach T nachgewiesen werden, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Guanin nach Valin im Codon 509 führte.

3.5 Veränderte Expression von *GLI1* in Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit Hh-Antag

Um nachzuweisen inwieweit eine Inhibition des Shh-*PTCH*-Signalweges in Pankreaskarzinomzellen die Expression von bekannten Hedgehog-Zielgenen beeinflusst, wurden Pankreaskarzinomzelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen des niedermolekularen Antagonisten Hh-Antag (G-024856; CUR) behandelt und nach einem Zeitintervall von 48 Stunden die *GLI1*-Expression gemessen.

Am Beispiel der Zelllinien ASPC-1 die mit 3 μM Hh-Antag für 48 Stunden behandelt wurde, konnte im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der Expression von *GLI1* nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Hh-Antag vermittelte Inhibition des Signalweges.

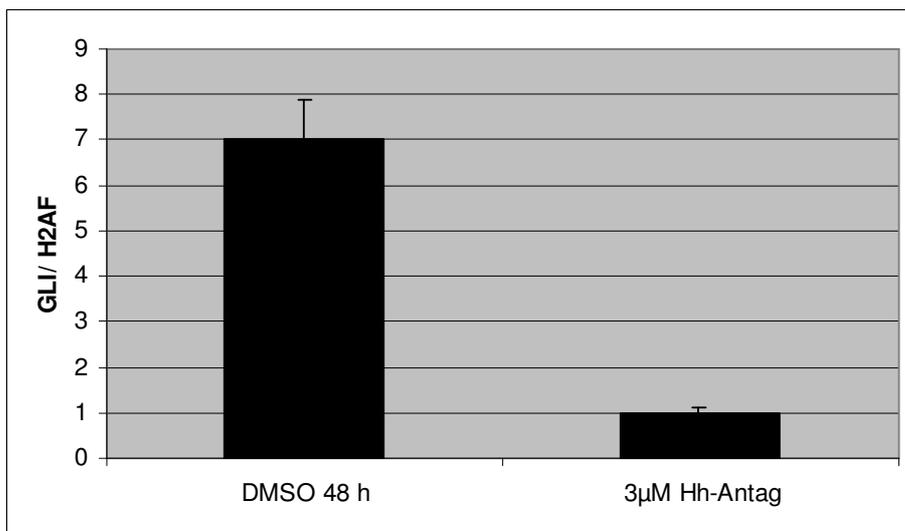


Abbildung 22: Die Expression von *GLI1* in ASPC-1 nach Behandlung mit 3 μM Hh-Antag für 48 Stunden. Dargestellt ist die mRNA-Expression von *GLI1* verrechnet mit der Expression des Houskeeping-Gens *H2AF*.

Abbildung 23 zeigt die Wirkung des Smo-Inhibitors Cyclopamin auf die *Gli1*-Aktivität in den drei Zelllinien (Capan-1, Mia Paca und ASPC-1). Es wird eine dosisabhängige Reduktion der Luciferaseaktivität 24 Stunden nach Cyclopamin-Gabe deutlich. Da eine basale Gli-Luciferase-Aktivität nach Transfektion mit dem Luciferasekonstrukt nur in Capan-1 sowie Mia Paca gezeigt werden konnte, zeigt sich auch nur hier eine pharmakologische Interferenz durch Cyclopamin im Sinne einer Inhibition des Signalweges. Zusätzlich wird eine Dosis-Wirkungs-Relation deutlich.

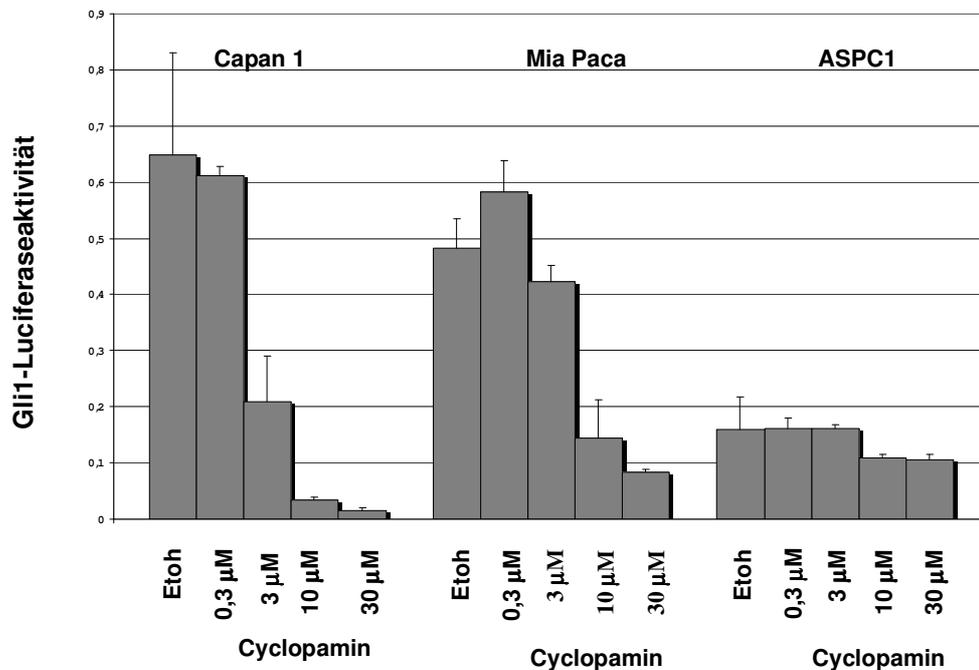


Abbildung 23: Pankreastumorzelllinien nach Behandlung mit Cyclopamin. Dargestellt ist die basale *Gli1*-Luciferase-Aktivität 48 Stunden nach Behandlung. Es zeigt sich eine Dosis-Wirkungs-Relation für Capan-1 und Mia Paca.

3.7 Verringerte Proliferationsaktivität von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit Cyclopamin

Um nachzuweisen, inwieweit die Inhibition des Hedgehog-*PTCH*-Signalweges das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen beeinflusst, wurden die Zelllinien mit dem bekannten Hedgehog-Inhibitor Cyclopamin behandelt und die Zellproliferation im XTT-Test untersucht. Die Tumorzellen (ASPC-1, Capan-1 und Mia Paca) wurden in verschiedenen Dosierungen mit Cyclopamin behandelt und an den Tagen 1, 3 und 5 die Proliferation gemessen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums nach Behandlung mit Cyclopamin für die Karzinomzelllinien ASPC-1 und Capan-1 (Abb. 23 und 24). Bei der Behandlung von Mia Paca zeigt sich lediglich für die ersten drei Tage eine Proliferationshemmung. Ab Tag 3 kommt es erneut zum Tumorzellwachstum (Abb. 25)

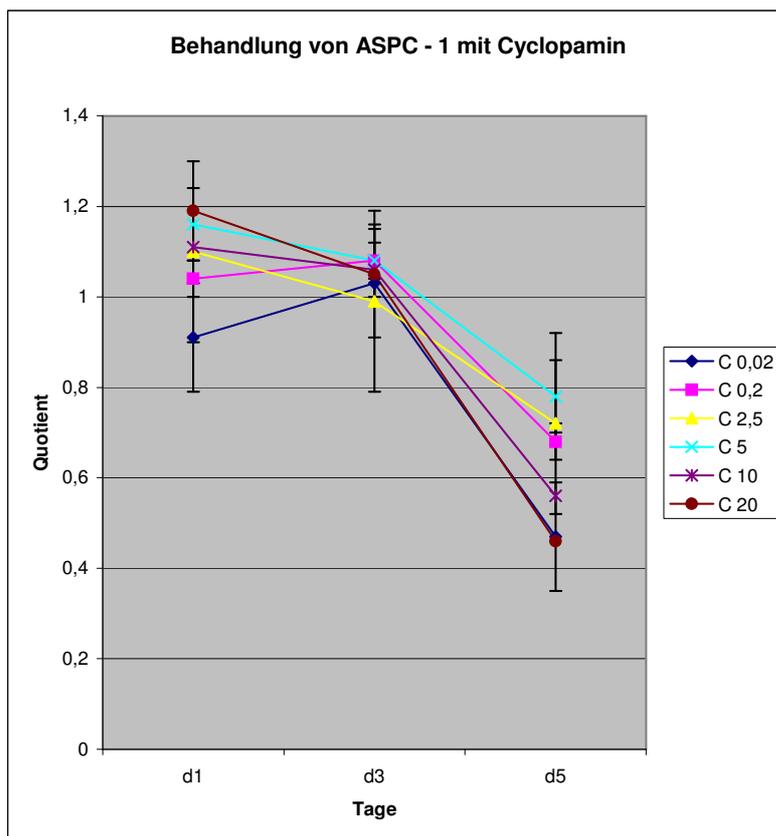


Abbildung 23: Antiproliferativer Effekt von Cyclopamin auf ASPC-1 Zelllinien im XTT-Test. Die Zellen wurden in Dosierungen zwischen 0,02 μM und 20 μM behandelt und über 5 Tage gemessen.

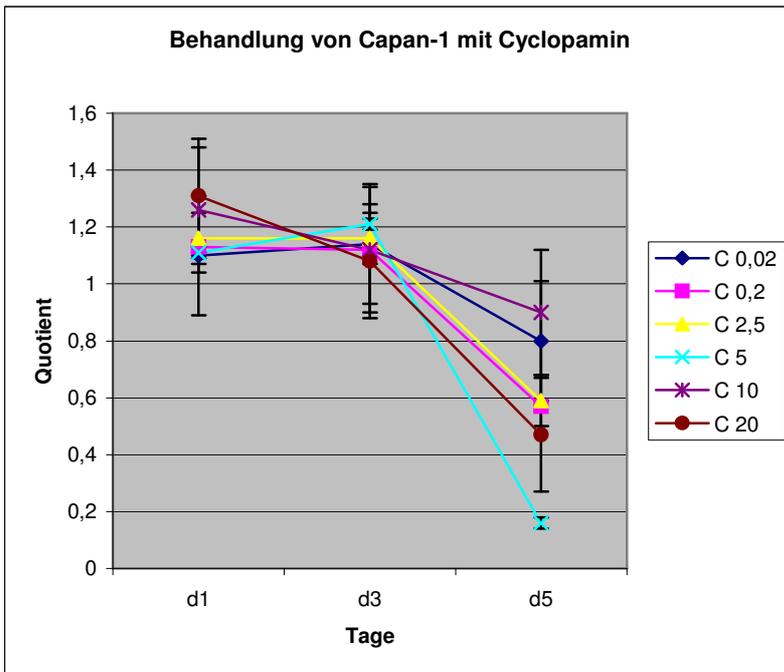


Abbildung 24: Antiproliferativer Effekt von Cyclopamin auf Capan-1 Zelllinien im XTT-Test. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Proliferation ab dem 3 Tag. Die Zellen wurden in Dosierungen zwischen 0,02 µM und 20µM behandelt und über 5 Tage gemessen.

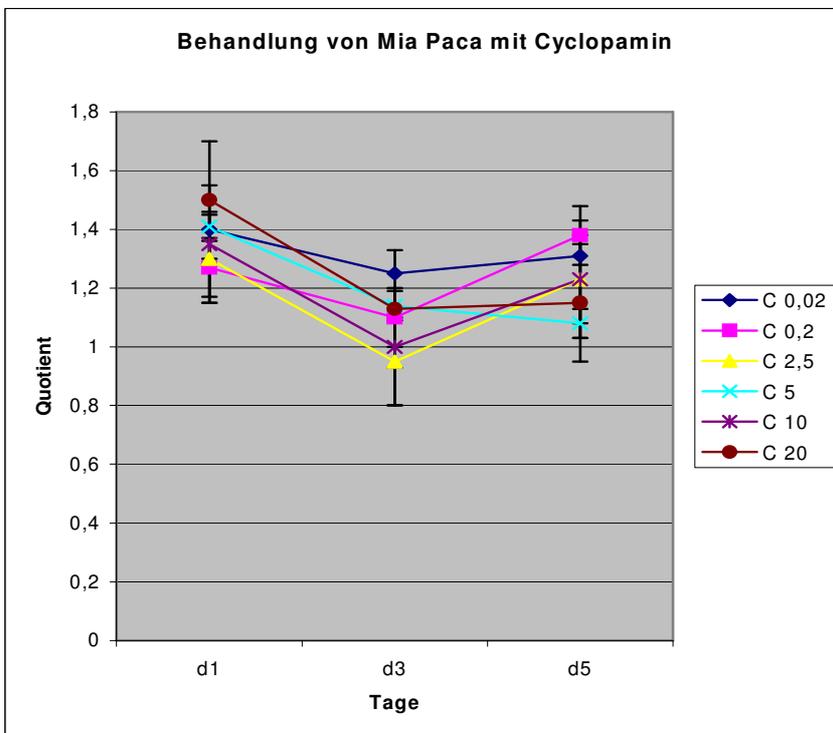
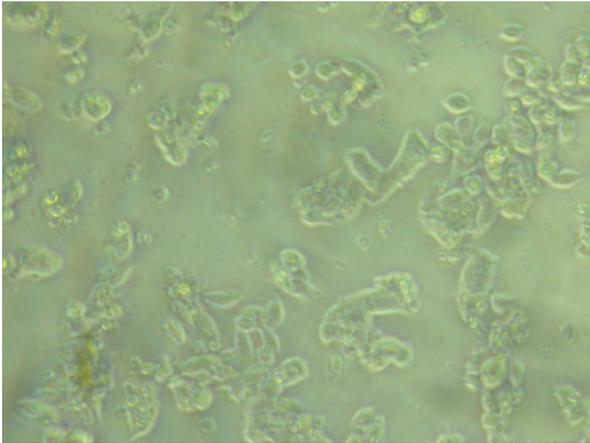
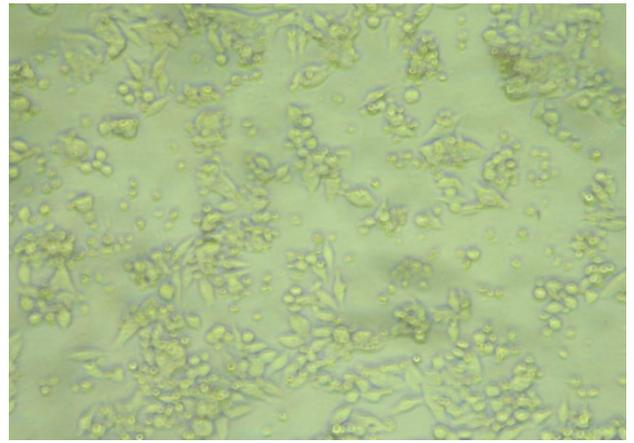


Abbildung 25: Effekt von Cyclopamin auf Mia Paca Zelllinien im XTT-Test. Es zeigt sich ein Rückgang der Proliferation zwischen dem 1 und 3 Tag. Ab Tag 3 kommt es wieder zur Proliferation.

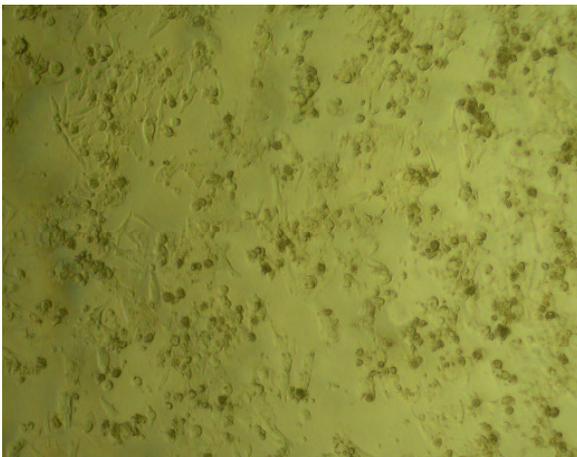
Capan - 1: Kontrolle Tag 1 (x40)



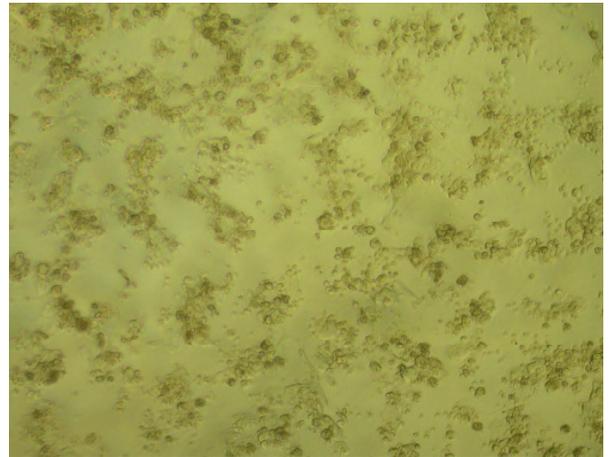
Capan - 1: Cyclopamin 5 μ M Tag 1(x40)



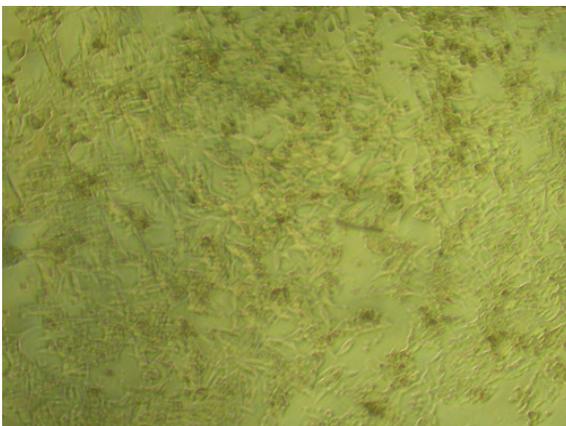
Capan - 1: Kontrolle Tag 3 (x20)



Capan - 1: Cyclopamin 5 μ M Tag 3 (x20)



Capan - 1: Kontrolle Tag 5 (x20)



Capan - 1: Cyclopamin 5 μ M Tag 5 (x20)

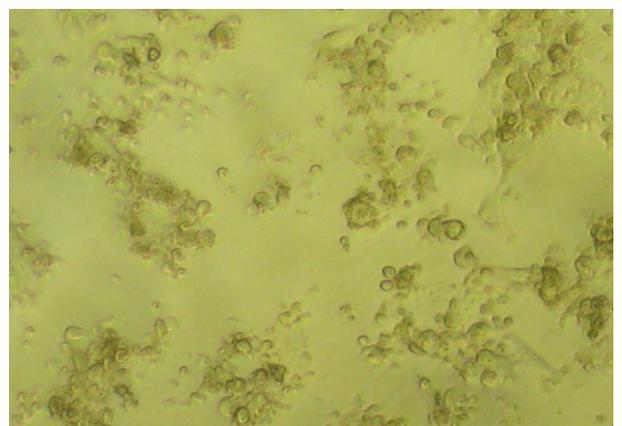


Abbildung 26: Die Behandlung von Capan - 1 Zellen mit Cyclopamin führt zu einem deutlichen Rückgang der Zelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fotos über 5 Tage).

3.8 Proliferationshemmung humaner Pankreaskarzinomzelllinien (ASPC-1, Capan-1, MiaPaca) nach Behandlung mit Hh-Antag

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Hh-Antag den Hedgehog-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen inhibiert, welches in einer reduzierten Expression von *GLI1* resultiert, wurde untersucht, ob diese Inhibition auch Einfluß auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen hat. Die Pankreaskarzinomzelllinien (ASPC-1, Capan-1, Mia Paca) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen für 48 Stunden mit Hh-Antag (0.03 μM bis 30 μM) inkubiert. Das Ergebniss des ^3H -Thymidin-Inkorporationsassays zeigt in allen drei Zelllinien eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellproliferation.

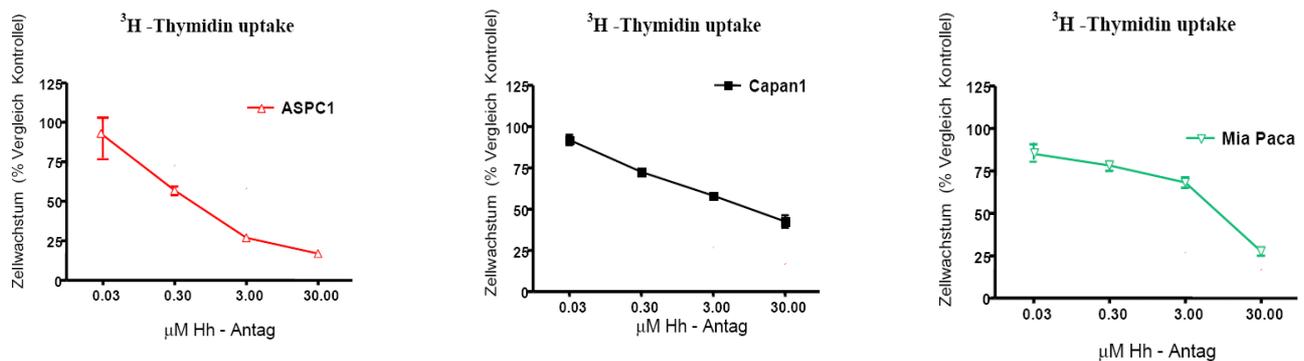


Abbildung 27: Effekt des SHH/PTCH-Inhibitors Hh-Antag auf das Tumorzellwachstum im ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay (cpm). Die Tumorzelllinien wurden 48 Stunden vor der Messung mit Hh-Antag inkubiert. Die Daten werden als prozentuale Änderung im Vergleich zur Kontrolle als Mean SEM von vier unabhängigen Experimenten angegeben.

3.9 Antiproliferativer Effekt von Gemcitabine

Um die Wirkung einer Kombinationstherapie von Cyclopamin und Gemcitabine zu untersuchen, wurden die etablierten Zelllinien in einem weiteren Versuch mit Gemcitabine behandelt. Dabei zeigte sich eine deutliche Proliferationsinhibition unter Gemcitabinetherapie für die Zelllinien ASPC-1 sowie Capan-1 (Abb. 28 und 29). In der Dosierung zwischen 0,1 μM und 1 μM kam es für beide Karzinomzelllinien ab dem 3. Tag zu einer deutlichen Proliferationshemmung. Bei der Behandlung von Mia Paca zeigte sich kein homogener antiproliferativer Effekt (Abb 30).

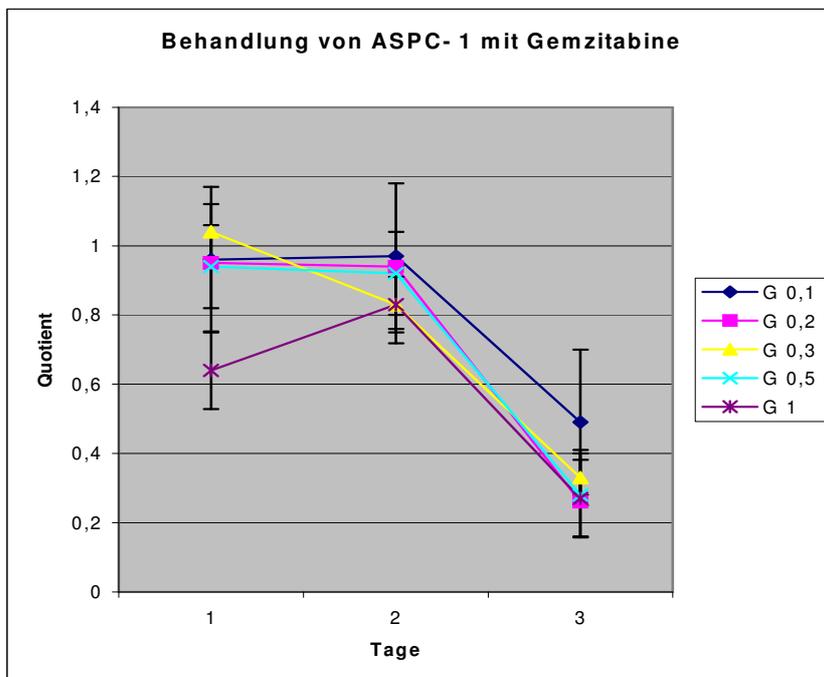


Abbildung 28: Antiproliferativer Effekt von Gemcitabine auf Capan-1 Zelllinien im XTT-Test. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Proliferation ab dem 3. Tag. Die Zellen wurden in Dosierungen zwischen 0,1 μM und 1 μM behandelt und über 5 Tage gemessen.

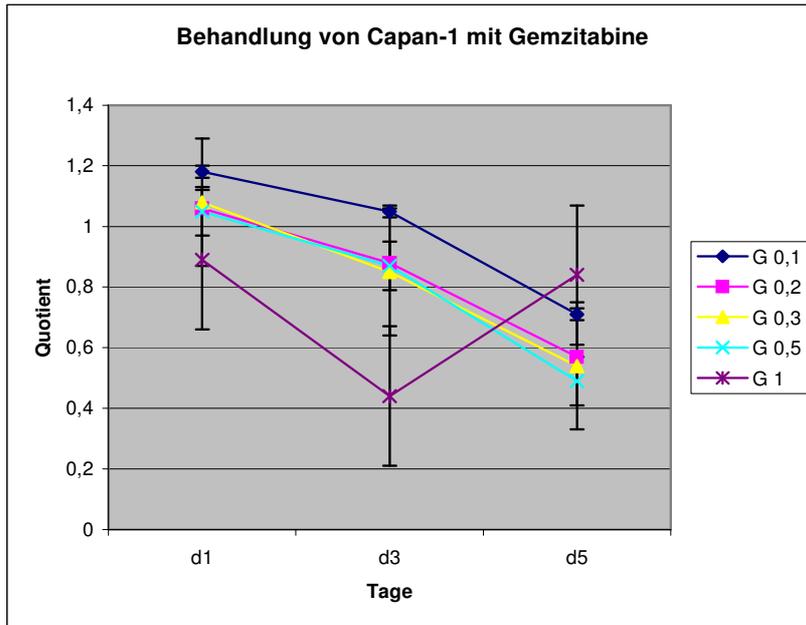


Abbildung 29: Antiproliferativer Effekt von Gemcitabine auf Capan-1 Zelllinien im XTT-Test. Die Zellen wurden in Dosierungen zwischen 0,1 μM und 1 μM über 5 Tage behandelt.

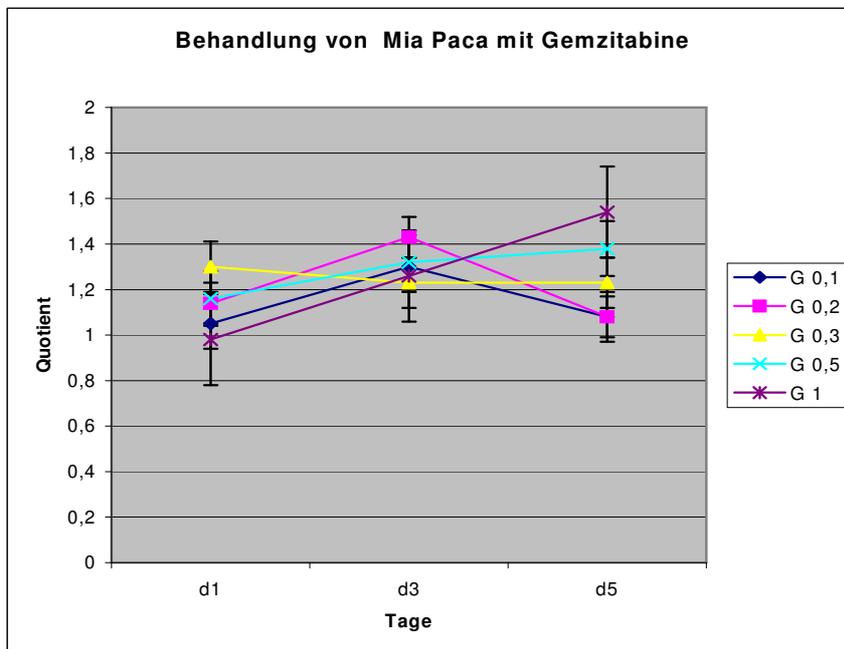


Abbildung 30 : Effekt von Gemcitabine - Monotherapie auf Mia Paca Zelllinien im XTT-Test. Es findet sich kein homogener Rückgang der Proliferation. Lediglich bei den Dosierungen 0,1 μM und 0,2 μM und kommt es am dritten Tag zu einer Proliferationshemmung.

3.10 Kombination von Cyclopamin und Gemzitabine

Nachdem der antiproliferative Effekt von Cyclopamin bei ASPC-1 und Capan-1 gezeigt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt die Kombinationstherapie von Cyclopamin und Gemzitabine untersucht. In den Zelllinien zeigte sich ein deutlich antiproliferativer Effekt der Kombinationstherapie. Die Dosierungen für Cyclopamin lagen zwischen 0,02 μM und 20 μM , für Gemzitabine zwischen 0,1 μM und 1 μM . Es fand sich ein stetiger Abfall der Proliferation im XTT-Test über drei Messungen.

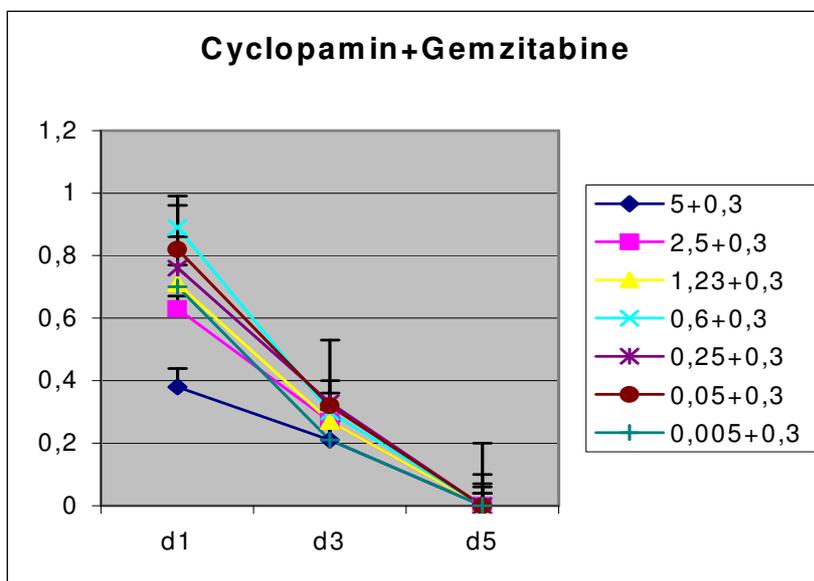


Abbildung 31: Antiproliferativer Effekt von Cyclopamin in Kombination mit Gemcitabine auf Capan-1 Zelllinien im XTT-Test.

3.11 Elektronenmikroskopischer Apoptosenachweis nach Therapie mit Cyclopamin

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Capan – 1 Zellen nach Behandlung mit Cyclopamin (5 μ M) ist in den Abbildungen 32 – 35 dargestellt. Im Gegensatz zur Nekrose, die eine unkontrollierte, diffuse Schädigung zeigt, handelt es sich bei der Apoptose mit seinen fragmentierten Zellkernbestandteilen um einen „geordneten Abbau“ des Zellkerns. Es sind die verschiedenen Stadien der Apoptose zu sehen. Abbildung 32 zeigt das Stadium der Kondensation. Dabei bilden sich kleine runde Zytoplasmakörperchen aus den Zellen. In diesen Einschlüssen findet sich kondensiertes, nukleäres Chromatin. Das anschließende sog. „Budding“ zeigt das Bild einer beginnenden Fragmentation (Abb. 33 und 34). Die kleinen Körperchen sind von einer Membran umgeben und enthalten völlig intakte Zellorganellen. Der endgültige Abbau erfolgt durch Phagozytose (Abb. 35).

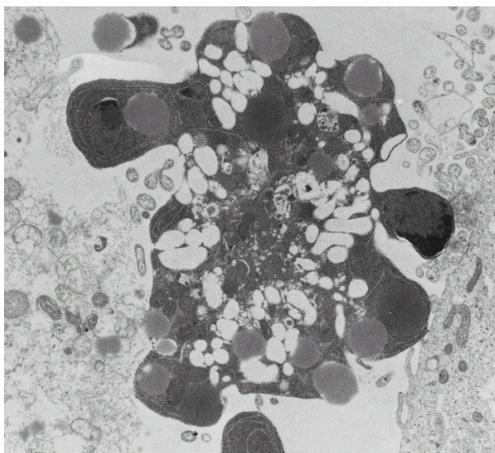


Abbildung 32: *Kondensation*

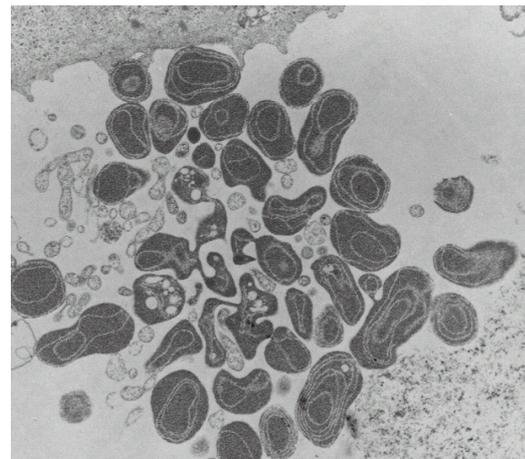


Abbildung 33:
beginnende Fragmentation

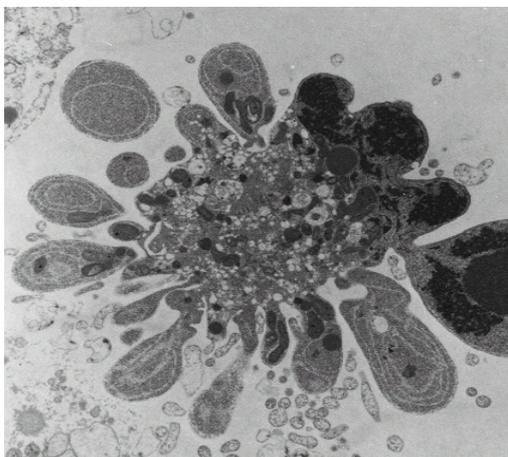


Abbildung 34: *Fragmentation*

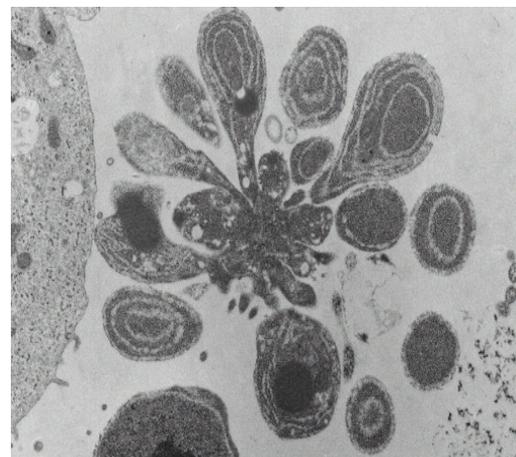


Abbildung 35: *Phagozytose*

3.12 Tumorwachstumsverhalten nach Therapie mit Cyclopamin und /oder Gemcitabine im Nacktmausmodell

Nachdem *in vitro* ein zellwachstumshemmender Effekt von Cyclopamin gezeigt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt dieser Effekt *in vivo* untersucht. Dafür wurden primär zur Dosisfindung jeweils drei weibliche Nu/Nu-Nacktmäuse 14 Tage nach Tumor-Inokulation mit Capan-1, ASPC-1 oder Mia Paca für 7 Tage mit Cyclopamin in Dosierungen zwischen 5 mg/kg KG, 10 mg/kg KG, 15 mg/kg KG und 20 mg/kg KG behandelt.

Abbildung 36 gibt das dosisabhängige Tumorwachstum nach Behandlung mit verschiedenen Cyclopamin-Dosen für Capan-1 wieder. Aufgrund dieser Vorversuche entschied man sich für den eigentlichen Versuchsablauf für die Zelllinie Capan-1. Aufgrund der deutlichen Wachstumshemmung in Konzentrationen über 10mg/kg KG wurden für den eigentlichen Versuch Dosierungen von 5 mg/kg KG sowie 10mg /kg KG gewählt. Somit war gewährleistet, nach Beendigung der Therapie ausreichend Tumorgewebe für weiterführende Untersuchungen (Apoptose, Proliferation, Nekrosen) zur Verfügung zu haben.

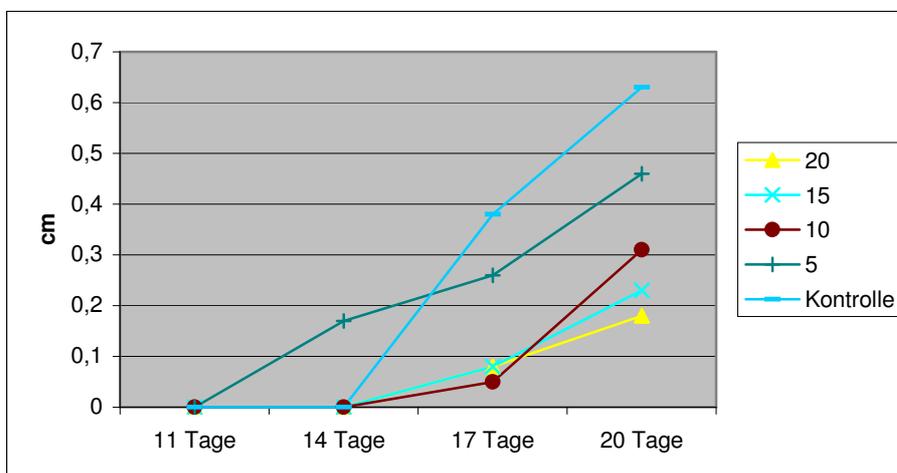


Abbildung 36: Behandlung von tumortragenden Nu/Nu-Nacktmäusen (Capan-1) mit Cyclopamin. Folgende Dosierungen wurden gewählt: Kontrolle (PBS): $n = 2$, 5 mg/kg Kg Cyclopamin ($n=3$), 10 mg kg KG Cyclopamin ($n=3$), 15 mg/kg KG ($n=3$) sowie 20 mg /Kg KG ($n =3$). Es zeigt sich ein dosisabhängiges Tumorwachstum. Auf der Grundlage dieser Vorversuche wurden die eigentlichen Behandlungsdosierungen (5 mg/kg KG und 10mg/kg KG) gewählt.

Das Tumorwachstumsverhalten nach Beendigung der Behandlung für die Gruppen Cyclopamin 5 mg/ kg KG bzw. Cyclopamin 10 mg/ kg KG sowie Gemzitabine 80mg/ kg KG ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Behandlung mit Cyclopamin 5mg zeigt ein vergleichbares Tumorwachstum wie die Gemzitabine – Monotherapie. Der in den Dosisfindungsexperimenten gezeigte Dosis-Wirkungs-Bezug ließ sich hier nicht reproduzieren. Die Tumore nach Behandlung mit 10 mg Cyclopamin zeigten eine geringere Wachstumshemmung als die der Gruppen 5 mg/Cyclopamin bzw. 80 mg Gemzitabine.

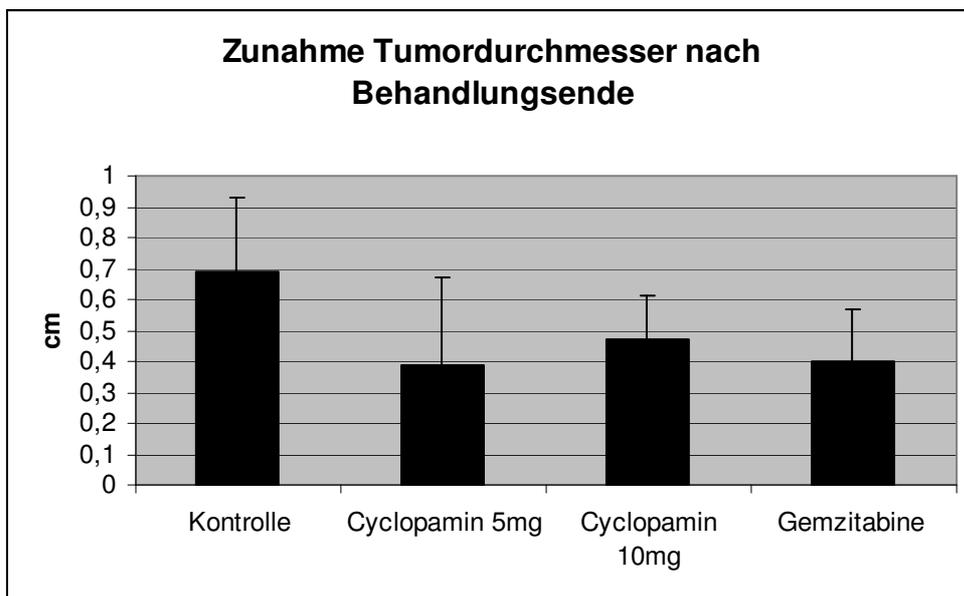


Abbildung 37: Tumorwachstum nach Inokulation von Capan-1 Zellen und Behandlung in Nu/Nu-Nacktmäusen. Dargestellt ist die Zunahme des Tumordurchmessers nach Behandlungsende gemessen bis Tag 56 nach Tumorinokulation. Die Werte sind als Mittelwerte und SEM ("Standard Error of the Mean ") angegeben.

3.12.1 Synchrone Behandlung

In der Abbildung 38 ist das Tumorstadiumsverhalten nach Tumorstadium-Inokulation und synchronem Behandlungsbeginn dargestellt (Versuchsgruppen 1, 3 und 5). Es zeigt sich keine Änderung des Wachstumsverhaltens in den Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrolle (PBS). Die synchrone Applikation des Signalweginhibitors zur verabreichten Zellsuspension (Capan-1 4×10^6) verhindert nicht die Etablierung eines soliden, subkutanen Tumors.

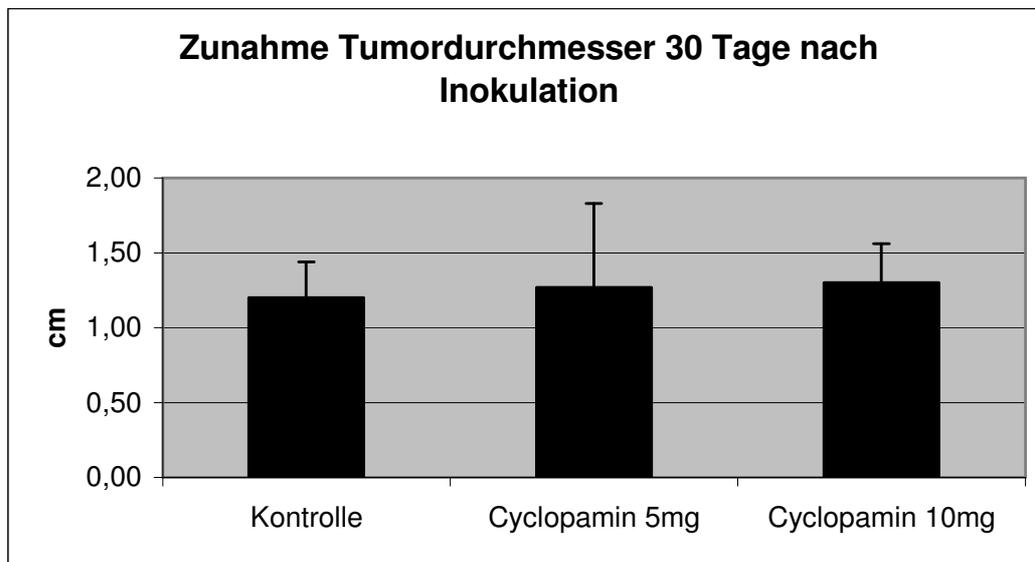


Abbildung 38: Tumorstadiumwachstum nach Inokulation von Capan-1 Zellen und synchroner Behandlung in Nu/Nu-Nacktmäusen. Dargestellt ist die Zunahme des Tumordurchmessers 30 Tage nach Behandlungsende. Die Werte sind als Mittelwerte und SEM ("Standard Error of the Mean") angegeben.

3.12.2

Verzögerte Behandlung

Das Tumorwachstum nach verzögerter Behandlung ist in Abbildung 39 wiedergegeben. Dargestellt sind die Versuchgruppen 1, 2, 4 und 8 (jeweils n = 6). Es zeigen sich keine Unterschiede im Tumorwachstum im definierten Zeitraum, d.h. den ersten 30 Tagen nach Tumorinokulation. Alle hier aufgeführten Monotherapien wurden nach sichtbarem Beginn des Tumorwachstums initiiert.

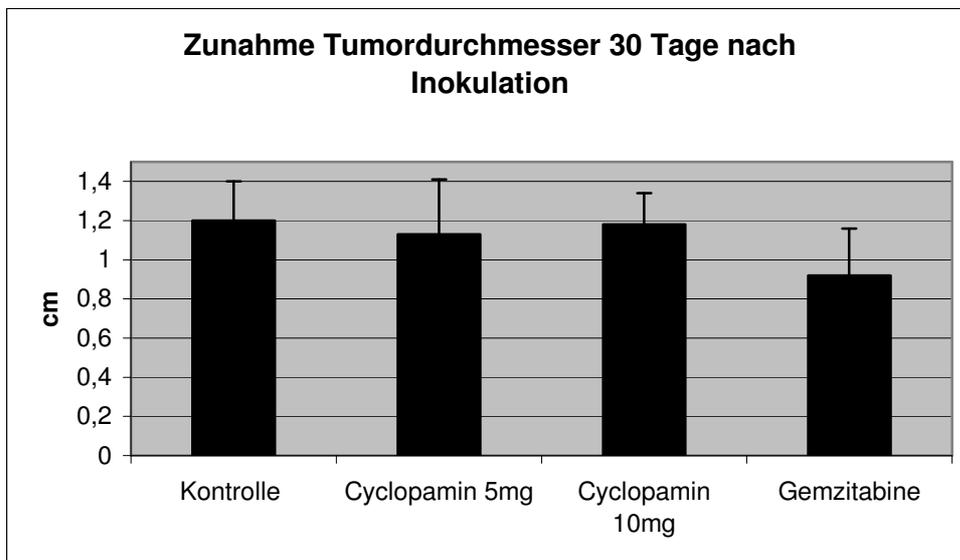


Abbildung 39: Tumorwachstum nach Inokulation von Capan-1 Zellen und verzögerter Behandlung in Nu/Nu-Nacktmäusen. Dargestellt ist die Zunahme des Tumordurchmessers 30 Tage nach Behandlungsende. Die Werte sind als Mittelwerte und SEM ("Standard Error of the Mean") angegeben.

3.13 Tumorwachstumsverhalten nach Kombinationstherapie mit Cyclopamin und Gemcitabine im Nacktmausmodell

Abbildung 40 gibt das Tumorwachstum unter der Kombinationstherapie Cyclopamin und Gemcitabine (Cyclopamin 5 mg/kg KG + Gemcitabine 80mg/kg KG bzw. Cyclopamin 10 mg/kg KG + Gemcitabine 80mg/kg KG) im Vergleich zur PBS – Kontrolle bzw. Gemcitabine-Monotherapie (80mg/kg KG) wieder. Gemessen wurde der Langzeitverlauf nach Beendigung der Therapie bis zum Tag 56 nach Tumorapplikation. Es zeigt sich ein deutlich antitumoröser Effekt in den Kombinationstherapien. Der Unterschied im Tumorwachstumsverhalten zwischen der Kombinationstherapie und der Gemcitabine – Monotherapie war signifikant (Gem vs. Cyclopamin 5mg + Gemcitabine: $p < 0.05$, Gem vs. Cyclopamin 10mg + Gemcitabine: $p < 0.05$)

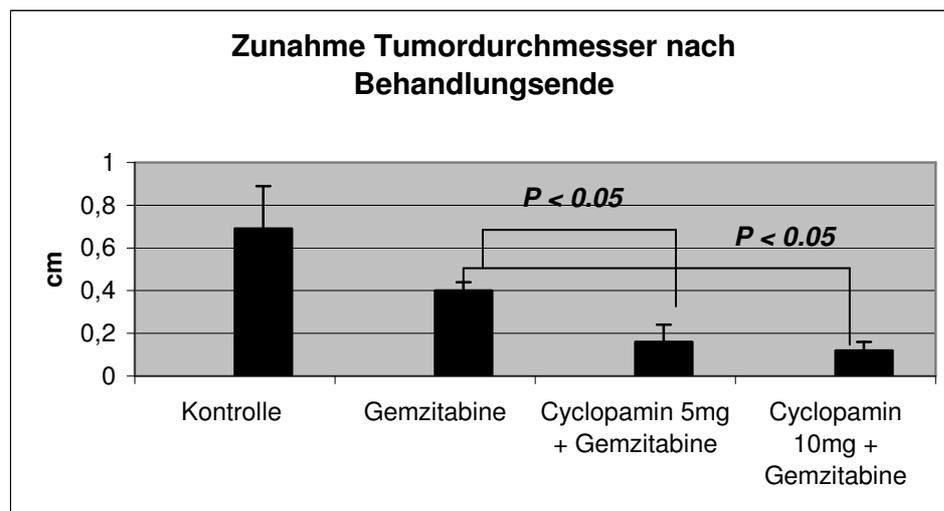


Abbildung 40: Tumorwachstum nach Inokulation von Capan-1 Zellen und Behandlung in Nu/Nu-Nacktmäusen. Dargestellt ist die Zunahme des Tumordurchmessers unter Kombinationsbehandlung (Cyclopamin + Gemcitabine) verglichen mit Gemcitabine – Monotherapie nach Behandlungsende gemessen bis Tag 56 nach Tumor-Inokulation. Die Werte sind als Mittelwerte und SEM (“Standard Error of the Mean“) angegeben.



Abbildung 41 und 42: Darstellung des Tumorwachstums (Capan –1) nach Explantation des Tumors. Links ein Tumor der Kontrollgruppe, rechts nach Kombinationsbehandlung Cyclopamin und Gemcitabine. Die Entnahme für beide Tumoren war nach 56 Tagen.

3.14 Nekrosen (HE-Färbung)

Die histomorphologischen Untersuchungen der *in vivo* - Proben zur Beurteilung von Nekrosen sind in Tabelle 5 sowie Abbildung 43 bis 46 wiedergegeben. Es findet sich ein inhomogenes Bild der Nekrosenbildung in den untersuchten Tumoren. Die Werte sind in % angegeben. Die Ausbildung von Nekrosen ist bei den Tieren deutlich ausgeprägt, welche im Langzeitverlauf untersucht wurden. In den Gruppen, die nach Behandlung getötet wurden, zeigte sich in 5 von 7 Gruppen ein geringer Anteil (0 – 5%) von Nekrosen in den untersuchten Tumoren. Den höchsten Anteil an Nekrosen zeigte die Gruppe 7 (Cyclopamin 10 mg/ kg KG + Gemzar (Gemcitabine) 80 mg/kg KG). Eine synchrone Applikation wirkt sich trotz der fehlenden Tumorstadiumsreduktion auf die Ausbildung von Nekrosen aus. Die Tiere, welche eine synchrone Applikation mit folgender Langzeitbeobachtung erhielten, zeigten das Bild ausgeprägter Nekrosen. Auffallend ist, dass die Nekrosen sich nicht gleichmässig über das Gewebe verteilt finden, sondern fleckenförmig über das Gewebe verteilt sind.

Gruppe	Therapie	Nekrosen (%)
1	Kontrolle	5
2	5mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	10
2	5mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	36
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, nach Behandlung getötet	0
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, Langzeitverlauf	25
4	10mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	15
4	10mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	30
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, nach Behandlung getötet	0
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, Langzeitverlauf	45
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	0
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	15
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	5
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	50
8	80mg/kg KG Gemcitabine, nach Behandlung getötet	0
8	80mg/kg KG Gemcitabine, Langzeitverlauf	45

Tabelle 5: Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung des Tumorgewebes für die Kontrollgruppe sowie für die Therapiegruppen.

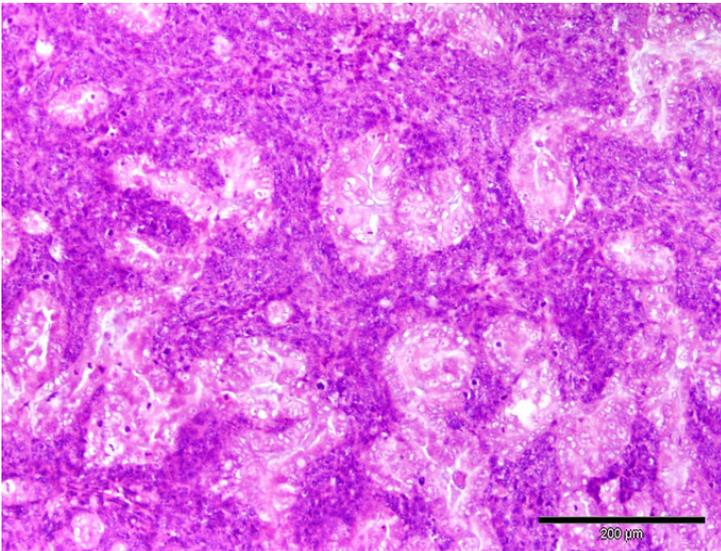


Abbildung 43:

HE gefärbtes Präparat einer unbehandelten Tumorprobe. Man erkennt einen in der Übersicht epithelial differenzierten Tumor mit Ausbildung zahlreicher adenoider Strukturen.

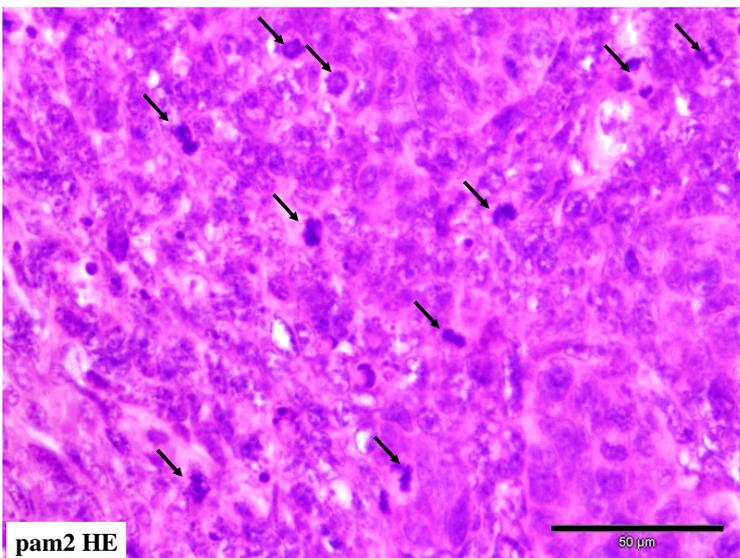


Abbildung 44:

Bei höherer Vergrößerung stellen sich mittelgroße Tumorzellen dar, die rundliche oder ovale feingranuläre Zellkerne besitzen, zumeist mit Nachweis prominenter Nukleolen. Die Tumorzellen besitzen gut ausgebildete eosinophile Cytoplasmata ohne Tendenz zur Fortsatzbildung. Im Vordergrund stehen zahlreiche, teils abnorme Kernteilungsfiguren (Mitosen; s. Pfeil), unbehandelter Tumor

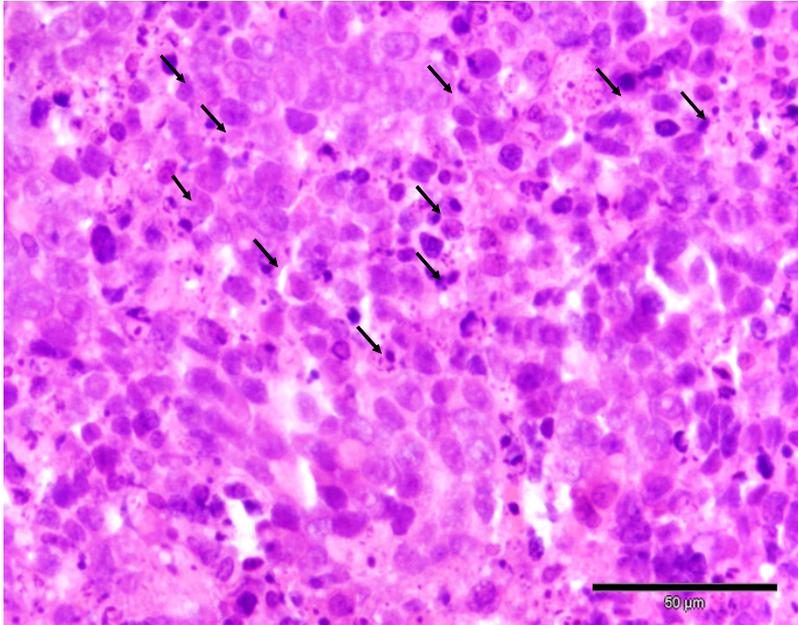


Abbildung 45:

Darstellung eines behandelten Tumors (Kombinationstherapie). Der Tumor wirkt weniger zell dicht, im Vordergrund stehen hier zahlreiche Apoptosen (s. Pfeile), die mitotische Aktivität ist im Gegensatz zum nicht behandelten Tumor geringer. Zudem sieht man beginnende nekrotische Veränderungen der Tumorgewebsmatrix.

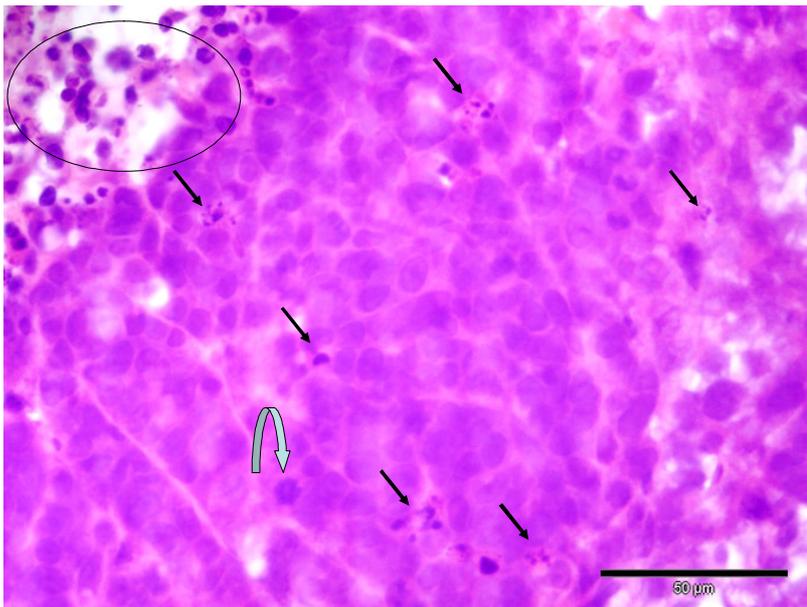


Abbildung 46:

HE gefärbtes Präparat eines behandelten Tumors nach Gemcitabine und Cyclophosphamid - Kombinationstherapie. Man sieht beginnende Nekrosen (Ellipse) sowie zahlreiche Apoptosen (Pfeile). Man sieht lediglich eine Mitosefigur (gebogener Pfeil).

3.15 Proliferation (Ki67)

Die immunhistochemische Aufarbeitung der Tumore nach Behandlung und Explantation bezüglich des Proliferationsverhaltens ist in Tabelle 6 dargestellt, histomorphologische Bilder sind in Abbildung 47 und 48 dargestellt. Die Ergebnisse wurden in % MIB-1 positiver Zellen angegeben. Dabei zeigte sich bezüglich der Proliferation ein inhomogenes Bild der einzelnen Tumoren. Es zeigten sich Areale mit einem hohen Anteil Ki67 - positiver Zellen alternierend mit Arealen, welche einen geringen Anteil Ki67 - positiver Zellen aufwiesen. In den Versuchsgruppen wurde jeweils nochmals eine Unterteilung für die Kriterien "Tötung nach Behandlung" sowie "Langzeitverlauf" getroffen. Bei den Tieren, welche nach Behandlung getötet wurden, fand sich ein geringerer Anteil Ki67 – positiver Zellen als bei Tieren nach Langzeitverlauf. Bei den Tieren, welche eine synchrone Behandlung (Tumorinokulation + Therapie) bekommen hatten, fand sich kein Wert unter 50% (Ki67 – positiver Zellen).

Gruppe	Therapie	Ki67 (%)
1	Kontrolle	70
2	5mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	40
2	5mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	50
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, nach Behandlung getötet	50
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, Langzeitverlauf	50
4	10mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	40
4	10mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	50
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, nach Behandlung getötet	50
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, Langzeitverlauf	50
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	50
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	50
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	50
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	30
8	80mg/kg KG Gemzitabine, nach Behandlung getötet	50
8	80mg/kg KG Gemzitabine, Langzeitverlauf	40

Tabelle 6: Immunhistochemische Untersuchung in der MIB-Färbung der Tumorexplantate nach Behandlung.

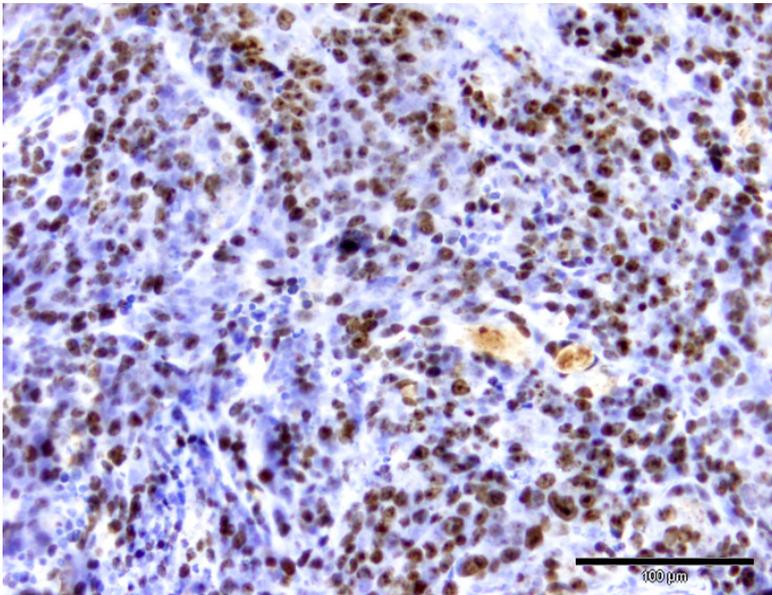


Abbildung 47:

Immunohistochemische Färbung eines Tumors der Kontrollgruppe mit einem Antikörper gegen das proliferationsassoziierte Antigen Ki67 (MIB-1). Man sieht eine kräftige, gleichmäßige nukleäre Akkumulation in über 80% der Tumorzellkerne.

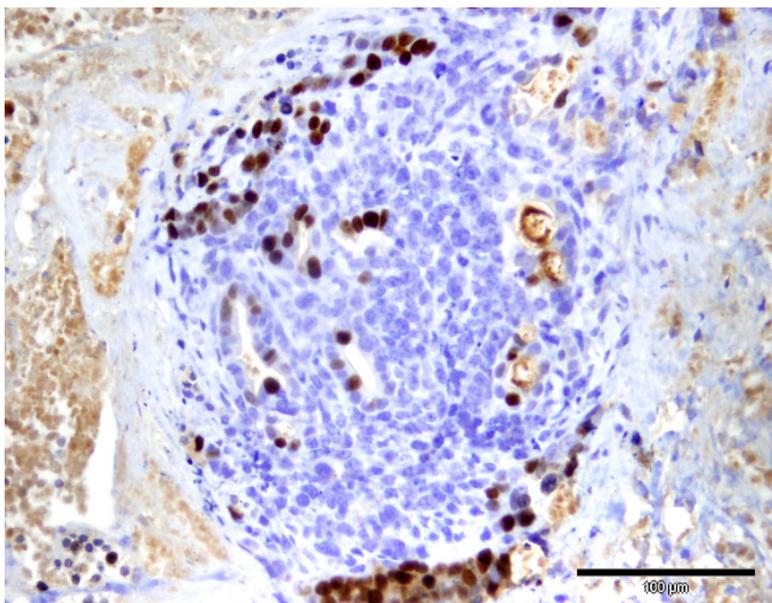


Abbildung 48:

Der Proliferationsmarker MIB-1 zeigt in der behandelten Probe lediglich eine heterogene Akkumulation der Tumorzellen im Gegensatz zu der gleichmäßig kräftigen Färbung in der nicht-behandelten Tumorprobe. Randständig finden sich zusätzlich nekrotischen Veränderungen.

3.16 Apoptosenachweis mittels Zytokeratin 18 (M30)

Tabelle 7 gibt den Nachweis von Zytokeratin 18 wieder. In der M30-Färbung wird ein frühes Ereignis des Apoptose erfasst. In den untersuchten Gruppen fanden sich keine deutlichen Gruppenunterschiede bezüglich des Anteils M30-positiver Zellen. Eine deutliche Aufhebung früher anti-apoptotischer Signale konnte in keiner der untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Wert der M30 - positiven Zellen lag bei 50%. In der Kombinationsgruppe (10 mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80 mg/kg KG im Langzeitverlauf) wurde eine geringe Anzahl M30-positiver Zellen erfasst, obwohl diese Tumoren makroskopisch das geringste Tumorwachstum zeigten.

Gruppe	Therapie	M 30 positive Zellen
1	Kontrolle	50%
2	5mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	50%
2	5mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	50%
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, nach Behandlung getötet	50%
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, Langzeitverlauf	50%
4	10mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	40%
4	10mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	50%
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, nach Behandlung getötet	50%
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, Langzeitverlauf	50%
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	50%
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	50%
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	50%
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	30%
8	80mg/kg KG Gemzitabine, nach Behandlung getötet	40%
8	80mg/kg KG Gemzitabine, Langzeitverlauf	50%

Tabelle7: Nachweis von Zytokeratin 18 in der M30 - Färbung in den Tumorexplantaten der Kontrollgruppe sowie der behandelten Gruppe.

3.17 Apoptosenachweis mittels Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

Der Nachweis der Enzymaktivität der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, einem indirekten Marker für den Zellschaden, ist in Tabelle 8 dargestellt. Es finden sich in der Kontrollgruppe wenige PARP-positive Zellen, was für eine deutlich reduzierte Apoptoseaktivität spricht. In den Gruppen nach Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Cyclophosphamid ist der Zellschaden am stärksten ausgeprägt. Synchron behandelte Tiere in der niedrigen Cyclophosphamid-Dosierung zeigen im Langzeitverlauf keine Apoptosen.

Die Behandlung mit 80 mg / kg KG Gemcitabine (Monotherapie) führt ebenfalls zu einer messbaren Apoptoseaktivität. Diese wird durch die Kombination mit Cyclophosphamid deutlich gesteigert.

<i>Gruppe</i>	<i>Therapie</i>	<i>Anti-PARP pos Zellen</i>
1	Kontrolle	(+)
2	5mg/kg Cyclophosphamid, nach Behandlung getötet	++
2	5mg/kg Cyclophosphamid, Langzeitverlauf	+
3	5mg/kg Cyclophosphamid, synchron, nach Behandlung getötet	(+)
3	5mg/kg Cyclophosphamid, synchron, Langzeitverlauf	(-)
4	10mg/kg Cyclophosphamid, nach Behandlung getötet	+
4	10mg/kg Cyclophosphamid, Langzeitverlauf	+
5	10mg/kg Cyclophosphamid synchron, nach Behandlung getötet	(+)
5	10mg/kg Cyclophosphamid synchron, Langzeitverlauf	++
6	5mg/kg KG Cyclophosphamid + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	++
6	5mg/kg KG Cyclophosphamid + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	+++
7	10mg/kg KG Cyclophosphamid + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	+++
7	10mg/kg KG Cyclophosphamid + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	+++
8	80mg/kg KG Gemcitabine, nach Behandlung getötet	++
8	80mg/kg KG Gemcitabine, Langzeitverlauf	+

Tabelle 8: *Semiquantitative Bestimmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-positiven Zellen der Kontrollgruppe sowie der behandelten Gruppen (Färbeintensität- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel).*

3.18 Apoptosenachweis mittels TUNEL-Färbung

Tabelle 9 gibt die Apoptoseaktivität der einzelnen Versuchsgruppen bestimmt mittels TUNEL-Färbung wieder. Am geringsten ist hier die Apoptoseaktivität in den Kontrollgruppen. Ähnlich wie in der PARP-Färbung ist die stärkste Apoptoseaktivität in den Tumorproben der Kombinationsgruppe zu finden. Dies korreliert mit dem makroskopischen Bild des geringen Tumorwachstums dieser Gruppen. Ebenfalls identisch zu den Ergebnissen der PARP-Färbung ist die weniger ausgeprägte Apoptoseaktivität in den Gruppen nach Gemzitabin - Monotherapie.

Die Therapie mit Cyclopamin (Mono) führt ebenfalls zur Induktion von Apoptosen, wie die Gruppen 2 und 4 zeigen. Die synchrone Applikation vom Cyclopamin hat einen zu vernachlässigenden Effekt auf das Apoptoseverhalten.

<i>Gruppe</i>	<i>Therapie</i>	<i>TUNEL-positive Zellen</i>
1	Kontrolle	(+)
2	5mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	++
2	5mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	++
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, nach Behandlung getötet	+
3	5mg/kg Cyclopamin, synchron, Langzeitverlauf	(-)
4	10mg/kg Cyclopamin, nach Behandlung getötet	+
4	10mg/kg Cyclopamin, Langzeitverlauf	++
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, nach Behandlung getötet	(+)
5	10mg/kg Cyclopamin synchron, Langzeitverlauf	++
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	(+)
6	5mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	+++
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, nach Behandlung getötet	+++
7	10mg/kg KG Cyclopamin + Gemzar 80mg/kg KG, Langzeitverlauf	+++
8	80mg/kg KG Gemzitabine, nach Behandlung getötet	++
8	80mg/kg KG Gemzitabine, Langzeitverlauf	+

Tabelle 9: *Semiquantitative Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der Kontrollgruppe sowie den behandelten Gruppen (Färbeintensität- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel).*

3.19 Expressionsanalyse von Cyclin D1 und Cyclin E

Abbildung 49 und 50 geben die Ergebnisse der TaqMan Gen-Expressions Assays zur Bestimmung der Expression der Zellregulationsproteine Cyclin E und Cyclin D1 wieder. Die Daten sind als relative Transkription im Sinne des Cyclin/ β_2 -Mikroglobulin-Verhältnisses aufgetragen. Die höchste Expressionsrate ist dabei nicht wie erwartet in der Kontrollgruppe zu finden. Sowohl Cyclin E als auch Cyclin D1 zeigen die höchsten Expressionswerte in den Gruppen, in denen das Tumorwachstum am geringsten war. Es scheint in den Gruppen mit der höchsten apoptotischen Aktivität gleichzeitig die größte mitotische Aktivität vorzuherrschen. Es ist unklar, inwiefern diese deutliche Hochregulation von Cyclin D1 und E eine Folge des Zellstress im Rahmen der Exposition mit dem Zytostatikum (Gemcitabine) ist. Wenn man diese Ergebnisse mit den Daten zur Apoptose bzw. mit dem Tumorwachstumsverhalten vergleicht, scheint möglicherweise die zytostatische Wirkung von Gemcitabine in Kombination mit dem Cyclopamin, welches eine antiproliferative Wirkung hat, einen additiven Effekt auf die Apoptose zu haben.

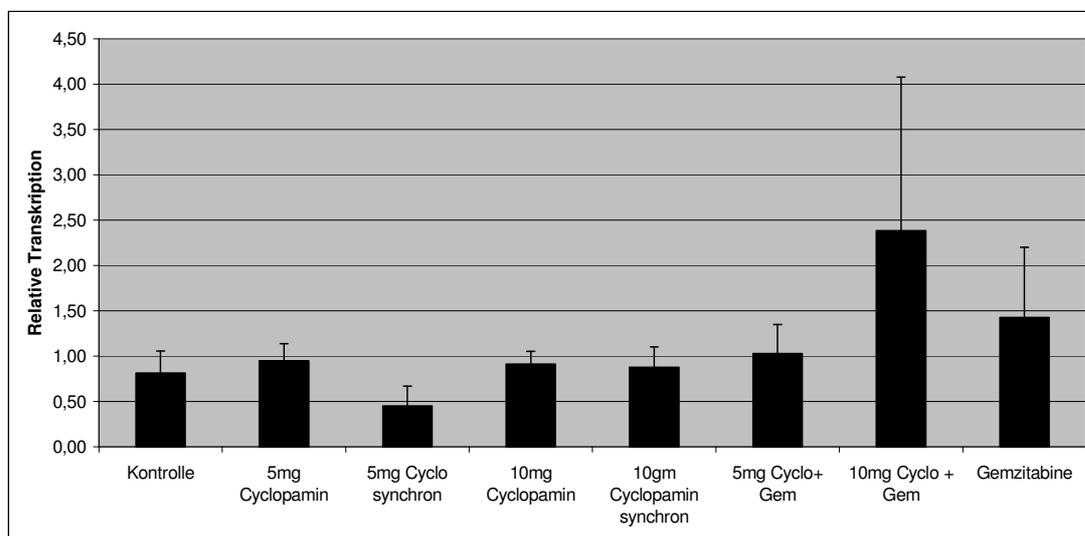


Abbildung 49: Darstellung der Expression von Cyclin E in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Messung wurde mittels TaqMan Gen-Expressions Assays durchgeführt. Die Werte sind als relative Transkription (Cyclin E/ β_2 -Mikroglobulin-Quotient) aufgetragen.

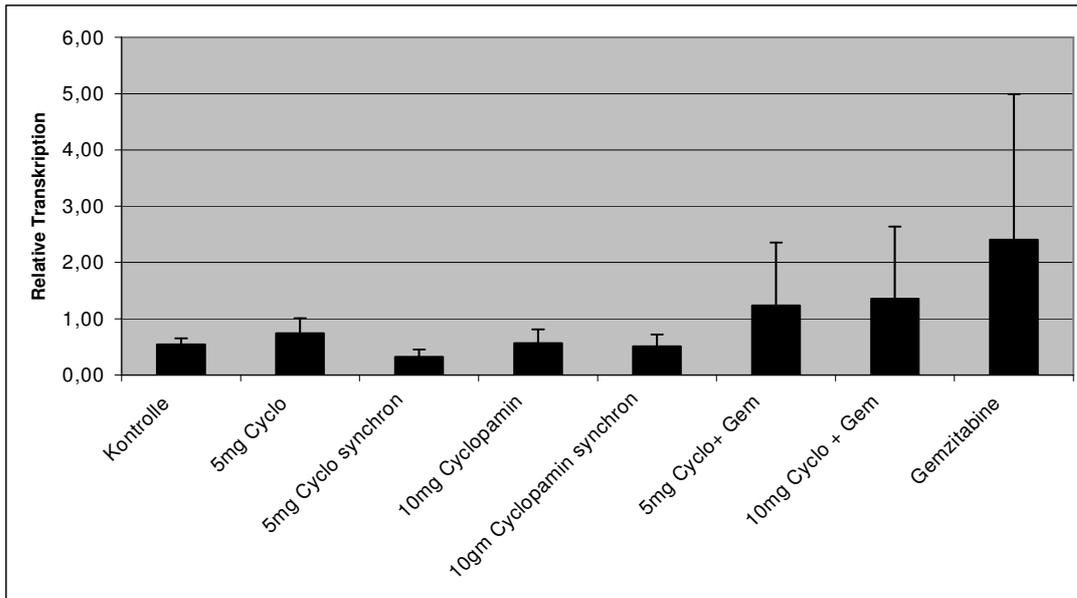


Abbildung 50: Darstellung der Expression von Cyclin D1 in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Messung wurde mittels TaqMan Gen-Expressions Assays durchgeführt. Die Werte sind als relatives Transkript (Cyclin D/ β_2 -Mikroglobulin-Quotient) aufgetragen.

3.20 Veränderte *PTCH*-Expression in humanen xenotransplantierten Pankreaskarzinomen nach Behandlung mit Cyclopamin

Im Rahmen der Evaluierung des *in vivo*-Tumorstwachstumsverhaltens wurde die *PTCH*-Expression in den Tumoren aus den Tieren der Cyclopamin-Dosisfindungsgruppe (Gruppe 3) untersucht. Exemplarisch ist in Abbildung 51 die Expression von *PTCH* nach Behandlung mit Cyclopamin im Vergleich zur Kontrolle (Gruppe 1, PBS) dargestellt. Die pharmakologische Inhibition der Signalkaskade geht mit einer reduzierten Zielgenexpression einher, was für eine cyclopamin-vermittelte Inhibition des Signalweges spricht. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR gewonnen und als Verhältnis *PTCH*/ H2AF aufgetragen.

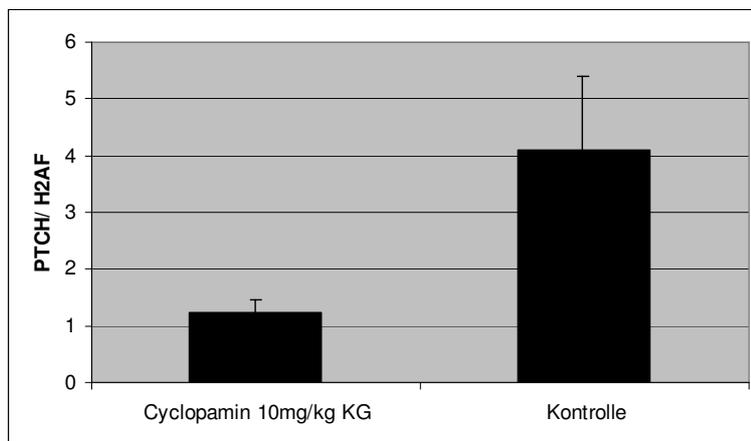


Abbildung 51: Die Expression von *PTCH* in Tumoren nach Behandlung mit Cyclopamin (10 mg/kg KG), verrechnet mit der Expression des entsprechenden Houskeeping-Gens *H2AF*. Cyclopamin führt zu einer deutlichen Expressionshemmung des Hh-Zielgenes *PTCH* im Vergleich zu unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe.

4 Diskussion

4.1 Shh-Zielgene im humanen Pankreaskarzinom

Der Natur steht eine begrenzte Anzahl von Mechanismen zur Steuerung einer Vielzahl von Prozessen zur Verfügung. Die Steuerung zellulärer Abläufe mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden ist daher ein evolutiv hoch konservierter Prozess, welcher speziesübergreifend beobachtet werden kann. Die Aufgaben der einzelnen Signalwege sind dabei hoch diversifiziert. Die Geschichte der Entdeckung des *Hedgehog*-Gens begann vor 25 Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Es folgte die Entdeckung der *Hedgehog*-Gene (Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog, Desert Hedgehog) in Vertebraten [38, 70, 79]. Der Zusammenhang zwischen Mutationen im Hedgehog-Signalweg und der Tumorentstehung wurde erst in den 90er Jahren erkannt. Dabei konnte das Vorliegen von Mutationen in *PTCH1* (einem Inhibitor des Hh-Signals) bei Patienten mit familiären Krebserkrankungen wie dem nävöiden Basalzellkarzinom bzw. Gorlin-Syndrom gezeigt werden [43 54, 39]. Hierbei wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen sporadisch auftretenden Basalzellkarzinomen und der Aktivierung des Hh-Signalweges beschrieben [26]. In allen untersuchten Tumorproben konnte dabei eine Überexpression des Zielgens *GLI1* gezeigt werden. Der Nachweis von Zielgenen des Hh-Signalweges gilt weithin als zuverlässiger Parameter für eine Signalwegsaktivierung [72]. So wurde beispielsweise *GLI* als ein Amplifikationsgen in Gliomzelllinien beschrieben [63]. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Hh - Signalweges zur Entstehung von Medulloblastomen führt [49, 144]. Der Nachweis des Hh - Signals scheint typischerweise in sich entwickelnden Geweben oder auch in sich regenerierenden Geweben zu gelingen. In Tumoren dagegen gelingt dieser Nachweis erst dann, wenn Mutationen den Signalweg im Sinne eines liganden-unabhängigen Status aktiv halten, der sog. konstitutiven Aktivität. Primär konnte Shh in embryonalem Gewebe nachgewiesen werden. Epitheliale Gewebe, welche der Ursprung von etwa 90% der adulten Tumore sind, benötigen eine permanente Erneuerung zum Erhalt ihrer Gewebeintegrität. Diese Erneuerung unterliegt der Kontrolle verschiedener Entwicklungskontrollwege, vergleichbar der embryonalen Situation. Dysregulationen in der Steuerung dieser Prozesse kann zu einem unkontrollierten Wachstum führen. Dies legte den Schluß nahe, dass eine Aktivierung des Hh-Signalweges ebenfalls eine Rolle bei gastrointestinalen Tumoren spielen könnte.

Beachy et al. konnten eine gesteigerte Expression von Shh, einem wichtigen Liganden im Hedgehog-Signalweg, in Ösophaguskarzinom-, Magenkarzinom-, Gallengangskarzinom und Pankreaskarzinomzelllinien zeigen [12]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein repräsentatives Kollektiv von 34 Pankreaskarzinomen hinsichtlich der Expression der Hh-Zielgene *PTCH* und *GLI1* untersucht. Im Vergleich zu komplementärem Normalgewebe (n = 14) zeigte sich *PTCH* und *GLI1* mittels kompetitiver RT-PCR in über 85% der Karzinome überexprimiert. Dies spricht für eine Aktivierung des Signalweges in humanen Pankreaskarzinomen. Aktuelle Daten unterstützen diese Ergebnisse. So konnten Steg et al. immunhistochemisch eine signifikante Expression von PTCH, SMO und GLI1 in Pankreaskarzinomen verglichen zum Normalgewebe nachweisen [130]. Ob es sich dabei ursächlich um eine autokrine Situation handelt, d.h. inwieweit der Prozess ligandengebunden abläuft, ist dabei primär unklar. Denkbar ist auch eine “downstream” – lokalisierte, ligandenunabhängige Aktivierung. Die Fragestellung, ob es sich beim Shh-Signal im Pankreaskarzinom um den Zustand der konstitutiven Aktivität handelt bleibt vorerst unbeantwortet.

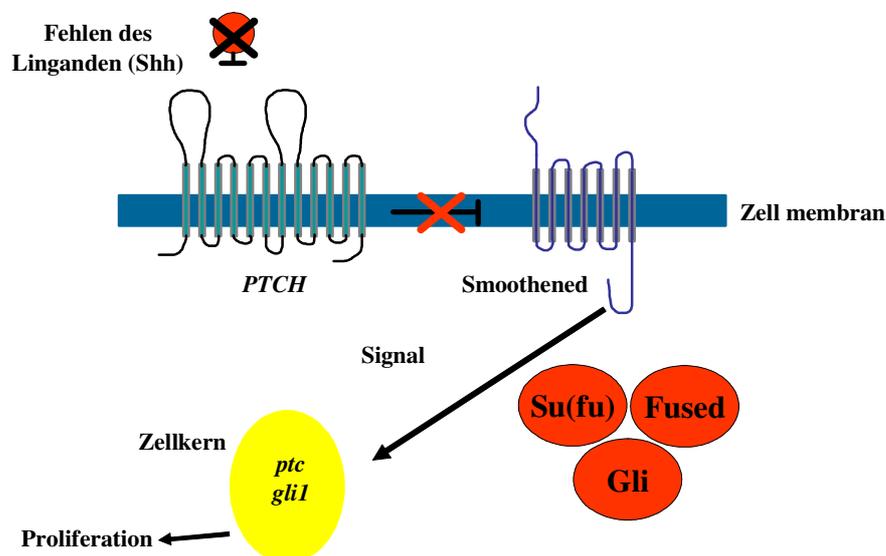


Abbildung 52: Konstitutive Aktivität: Die Aktivierung des Signalwegs geschieht ligandenunabhängig, d.h. ohne Shh - PTCH-Bindung.

4.2 Stellenwert von Mutationen im Shh-Signalweg

Seit der ersten Beschreibung von erblichen *PTCH*-Mutationen wurde der Stellenwert dieser Gene in der Pathogenese sporadischer Tumore zunehmend untersucht. *PTCH* Mutationen finden sich u .a. beim Ösophaguskarzinom und Blasenkarzinom [76, 81]. Mutationen können aber auch bei weiteren Mitgliedern der Shh-Signalkaskade auftreten, so bei *Shh* selbst. Mutationen in *SMO* werden in ca. 20% der Fälle des sporadischen nävoiden Basalzellkarzinoms gefunden.

In der vorliegenden Analyse wurde in humanen Pankreaskarzinomen der membranständige Rezeptor *PTCH* auf mögliche Mutationen hin untersucht. Mit Hilfe der Einzelstrangpolymorphismus (SSCP) Analyse konnten in 26 untersuchten Pankreaskarzinomen „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) in den Exonen 2, 11, 12, und 22 des *PTCH*-Gens nachgewiesen werden. Es fanden sich jedoch im untersuchten Kollektiv keine somatischen Mutationen in *PTCH*. Aus den hier vorliegenden Daten läßt sich ein Zusammenhang zwischen Genmutationen in *PTCH* und der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms nicht herstellen. Weitergehende Untersuchung anhand der vorhandenen Tumorpoben zur Untersuchung von *SMO* hinsichtlich möglicher Mutationen stehen noch aus.

PTCH wird die Rolle eines Tumorsuppressorgens zugesprochen. Tumorsuppressorgene fungieren normalerweise als Inhibitor des Zellwachstums. Für das nävoide Basalzellkarzinom wird vermutet, dass Mutationen in *PTCH* notwendig sind, um den genetischen Grenzbereich der Tumorentstehung zu durchbrechen [128]. Kommt es zu einer Inaktivierung beider Allele, so kann dies im weiteren zu einer klonalen Expansion führen, vergesellschaftet mit weiteren genetischen Ereignissen inklusive weiterer Genmutationen z. B. im *Ras*-Gen [6].

Diese Beobachtung wurde inzwischen für weiterführende tierexperimentelle Untersuchungen nutzbar gemacht. So entwickeln Mäuse nach Verlust eines *Ptc1*-Allels (*Ptc1*^{+/-}) aufgrund der fehlenden Inhibition des Shh-Signals Medulloblastome. Curran et al. konnten zeigen, dass diese Tumore auf hohem Niveau *gli1* exprimieren [127]. In einem weiteren Model wurden (*Ptc1*^{+/-} *p53*^{-/-}) Mäuse mit einem spezifischen, die Funktion von Smo blockierenden, niedermolekularen Inhibitor behandelt. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums bis hin zur vollständigen Elimination der Medulloblastome [119]. In unserem eigenen Versuchsaufbau wurde nun zunächst die Wirkung des Smo-Inhibitors (Hh-Antag) *in vitro* untersucht.

4.3 Reduktion des Tumorwachstums durch Inhibition von Smo *in vitro*

Hh-Antag zeichnet sich im Vergleich zu Cyclopamin durch eine deutlich erhöhte Affinität zu Smo aus. Die Ergebnisse von Curran et al. bezüglich des Effektes von Hh-Antag lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Hh-Antag zeigte eine Inhibition des Shh-Signalweges *in vitro* ohne das Zellwachstum zu beeinflussen. Dies konnte durch Transfektion mit einem Gli-Luciferase-Reportersystems gezeigt werden. Die Behandlung mit Hh-Antag führte zu einer Aktivitätsminderung der durch Shh stimulierten *GLI1*-Luciferase-Aktivität.

Im eigenen Versuchsaufbau wurde zunächst die Expression von *GLI1* in ASPC-1-Zelllinien nach Behandlung mit 3 μ M Hh-Antag untersucht. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der Expression von *GLI1*. Dies spricht für eine Hh-Antag vermittelte Inhibition des Signalweges auch in Pankreaskarzinomzelllinien. Diese Inhibition führte im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Medulloblastom auch zu einer Beeinflussung des Zellwachstums im Sinne einer dosisabhängigen Proliferationshemmung in allen drei Pankreaskarzinomzelllinien.

Warum eine Proliferationshemmung durch Hh-Antag in Pankreaszelllinien möglich ist, nicht aber in Medulloblastomzelllinien, bleibt unklar. Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung könnte das nicht ausreichendes "Microenvironment" der Zellkultur sein.

Die Behandlung der Zelllinien mit Cyclopamin zeigte eine deutliche Hemmung der Zellproliferation für ASPC-1 und Capan-1, nicht aber für Mia Paca. Ursächlich dafür könnte eine Mutation der Smo nachgeschalteten Signalkaskade sein, da die Cyclopaminwirkung selbst über eine Inhibition von Smo vermittelt wird. Thayer et al. konnten anhand von Expressionsanalysen hinsichtlich Smo eine Cyclopaminresistenz solcher Zelllinien nachweisen, welche Smo nicht exprimieren (z. B. Smo-negative Panc 01.28). Untersuchungen an BxPC3-Smo^{low} Mäusen demonstrierten eine fehlende Apoptoseinduktion sowie einen nur gering ausgeprägten antiproliferativen Effekt [134]. Interessant scheint nun die Möglichkeit einer Kombinationstherapie von Cyclopamin mit einem konventionellen Zytostatikum, wie z. B. Gemcitabine. Die *in vitro* Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt der beiden Substanzen für die Zelllinien ASPC-1 sowie Capan-1. Diese Ergebnisse waren die Grundlage für weiterführende *in vivo* – Untersuchungen in der Nacktmaus.

4.4 Inhibition des Hedgehog Signalwegs in xenotransplantierten Pankreaskarzinomen

Eine erfolgreiche Inhibition des Signalweges führt zu einer verminderten Expression der Zielgene (*PTCH*, *GLI1*). Dies ist nicht zwangsläufig mit einer Veränderung des Zellwachstums vergesellschaftet. Somit ist der therapeutische Erfolg auf zwei verschiedenen Ebenen zu diskutieren.

1. Wirkt sich die Inhibition der Shh-Signalwegs auf die Zielgenexpression aus ?
2. Wirkt sich die Inhibition Shh-Signalwegs auch auf das Zellwachstum aus ?

Im Rahmen der Dosisfindung für die tierexperimentellen Analysen wurde die Expression von *PTCH* nach Behandlung tumortragender (Capan-1) Nacktmäuse mit Cyclopamin mittels kompetitiver RT-PCR bestimmt. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe fand sich dabei eine deutlich reduzierte Expression von *PTCH* der behandelten Gruppe. Aktuelle Daten von Feldmann et al. bestätigen diese Ergebnisse [31].

Bezüglich des Wachstumsverhaltens zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion des Tumorwachstums unter Kombinationsbehandlung (Cyclopamin + Gemcitabine) verglichen mit Gemcitabine – Monotherapie gemessen bis Tag 56 nach Tumorinokulation. Die Gruppen, in denen Tumorzellen synchron zum Behandlungsbeginn appliziert wurden, zeigten keine Unterschiede im Zellwachstumsverhalten verglichen mit der Kontrollgruppe.

Als Ursache für diese Beobachtung könnte wiederum das Nichtvorhandensein eines adäquaten zellulären Milieus im Sinne eines fehlenden Microenvironments diskutiert werden. Es ist denkbar, dass ein solches Milieu erst nach der Formation eines soliden Tumors entsteht. Vorstellbar ist auch das Vorliegen eines heterogenen Bildes hinsichtlich der Aktivität des Signalweges, d. h. einer temporären Synchronizität von autokriner Situation und konstitutiver Aktivität. Kommt es im weiteren Wachstumsverlauf zur Dominanz der ligandenabhängigen Signaltransduktion, kann erst dann eine Smo-abhängige Blockade des Signals und somit eine effektive Repression des Tumorwachstums stattfinden. Curran et al. konnten zeigen, dass Medulloblastome, die in *Ptc1*^{+/-} *p53*^{-/-} - Mäusen entstanden sind, nach Rekultivierung in der Zellkultur das Hh-Signal verlieren. Nach erneuter *in vivo*-Inokulation war das

Signal jedoch wieder nachweisbar [118]. Unklar ist weitgehend, ob die antitumoröse Wirkung in erste Linie auf antiproliferative oder auf apoptotische Mechanismen zurückzuführen ist. Daten bezüglich der Smo-Inhibition von Medulloblastomen zeigen eine hohe basale Apoptoserate der Tumore, so dass eine Inhibition der Proliferation zu einer deutlichen Tumorreduktion führt [119].

Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass es eine Interaktion zwischen dem tumorfördernden IGF2 (Insulin growth factor-2) und dem Shh-Signalweg gibt [44]. IGF2 aktiviert normalerweise Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) [86]. Dies führt zu einem Anstieg der Mitoserate und gleichzeitig zu einer Reduktion der Apoptoserate, was primär aufgrund der Aktivierung des RAS/Raf/Mapk-Signalweg bzw. dem PI3K/Akt/PKB –Signalwegs geschieht [143]. In Tumoren (Rhabdomyosarkom) von *Ptc*-heterozygoten Mäusen findet sich eine deutliche Aktivierung des Zellzyklus-fördernden PI3K/Akt/PKB-Signalwegs [56] (Abbildung 53). Desweiteren finden sich in diesen Tumoren eine verminderte Expression des Zellzyklus-inhibierenden p27 sowie des Zellwachstums – fördernden Gadd45. Dieses Phänomen lässt sich anhand von Ki67-Messungen bestätigen. Bezüglich der Apoptose zeigte sich in den Rhabdomyosarkomzellen eine Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins in Verbindung mit einer niedrigen Expression des pro-apoptotischen Bax [55]. Diese Daten unterstützen die These, dass eine Deregulation des Shh-Signalweges sowohl antiproliferative Signale als auch anti-apoptotische Signale nach sich zieht.

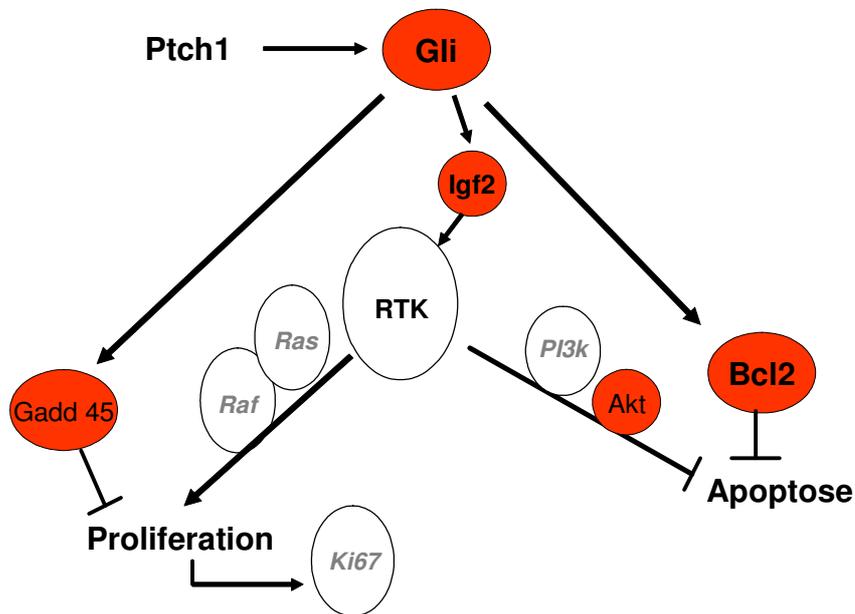


Abbildung 53: Schematische Darstellung von Proliferation und Apoptose in Rhabdomyosarkomzellen von $Ptc1^{neo67/+}$ Mäusen. Es überwiegen anti-apoptotische Signale, wohingegen proliferative Signale nur schwach ausgeprägt sind (Modifiziert nach Kappler et al.)
 Igf: Insulin growth factor; RTK: Receptor – tyrosine kinase; Ras: rat sarcoma (Proto-onkogen); Raf: rapidly-growing fibrosarcoma; Gadd45: Growth arrest and damage-inducible Gen; PI3K: Phosphatidylinositol 3- kinase; Bcl2: B-cell-Lymphoma; p27: gehört zur Familie der CDK's (cyclin-dependent kinase)

4.4.1 Proliferation

Zur Darstellung des Proliferationsverhaltens von humanen Pankreastumoren unter der Therapie mit Cyclopamin wurden die Tumore in dem hier beschriebenen Tumormodel mit Hilfe der MIB-1 – Färbung untersucht. In der semiquantitativen Analyse fand sich eine erniedrigte Anzahl Ki67- positiver Zellen in allen behandelten Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe. Es fand sich aber kein durchgehend homogenes Bild der Proliferationshemmung in den untersuchten Tumoren. Warum ein heterogenes Bild alternierender Areale der Proliferationshemmung sowie der unveränderten Proliferation vorliegen ist letztlich nicht klar. Dies mag an einer nicht homogenen Exposition der Zellen mit dem Smo-Inhibitor liegen. Als Applikationsform wurde die subkutane Applikation gewählt. Bestimmungen der Serumkonzentrationen der einzelnen Substanzen in ihren Dosierungen wurden nicht durchgeführt. Die niedrigste Ki67 – Rate zeigte die Kombinationsbehandlung 10 mg/ kg KG Cyclopamin + Gemcitabin 80 mg/ kg KG im Langzeitverlauf. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnissen des Tumorwachstumsverlaufes.

4.4.2 Apoptose

Zur Messung der Apoptoseaktivität der behandelten Tumore wurde unter anderem der Nachweis von Zytokeratin 18 (M30) durchgeführt. In der M30-Färbung wird dabei ein frühes Ereignis des Apoptose gezeigt. Es fanden sich keine deutlichen Unterschiede bezüglich des Anteils M30-positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen. Eine deutliche Aufhebung früher anti-apoptotischer Signale konnte in keiner der untersuchten Gruppen nachgewiesen werden.

Weiterführende Untersuchungen mittels TUNEL-Färbung zeigen dagegen eine deutliche Zunahme der Apoptose in den behandelten Gruppen. Gleiches gilt für den Apoptosenachweis mittels Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Färbung. Hier findet sich ein nahezu identisches Bild wie bei den Ergebnissen der TUNEL -Färbung. Unter der Vorstellung eines Überwiegens anti-apoptotischer Signale unter den Bedingungen der Signalwegsaktivierung ist die Zunahme der Apoptose in den behandelten Gruppen mit dem fehlenden Tumorwachstum gut zu vereinbaren. Trotz des sich heterogen darstellenden histologischen Bildes wirkt sich scheinbar sowohl der antiproliferative Effekt als auch der pro-apoptotische Effekt negativ auf das Wachstumsverhalten der Tumore aus. Dem Smo-Inhibitor Cyclopamin ist dabei eine

signifikante Rolle zuzuschreiben, da die Monotherapie mit Gemcitabine sowohl in der TUNEL-Färbung als auch in der PARP-Färbung eine vergleichbar weniger proapoptotische Aktivität zeigt. Die medikamentöse Inhibition des Shh-Signalweges wirkt sich scheinbar wirksam auf die Apoptose aus, was zu einer Inhibition des Tumorwachstums führt.

4.4.3 Nekrosen

In den HE-Färbungen der Kontrollgruppe finden sich epithelial differenzierte Tumorareale sowie die Ausbildung zahlreicher adenoider Strukturen. Es fehlen aber nekrotische Areale. Nekrosen finden sich hingegen ausgeprägt in den behandelten Gruppen. Hier sieht man aber, ähnlich wie bei der Zellproliferation, ein diskontinuierliches Bild. Es wechseln sich Areale mit starker und weniger ausgeprägter Nekrosenbildung.

Interessant ist, dass in den Tumoren, bei denen die Therapie synchron mit der Inokulation der Tumorzellen begann, keinerlei Nekrosen zu finden sind. So scheint sich die antitumoröse Wirkung erst im Langzeitverlauf zu entwickeln. Die Tiere, welche nach Beendigung der Therapie getötet wurden, zeigten keinerlei Nekrosen in den untersuchten Tumoren. Hierbei scheint sich die Hh-antagonisierende Wirkung erst dann zu manifestieren, wenn ein solider Tumor bestimmter Größe, d. h. ein bestimmter Grad an Gewebekomplexität erreicht wurde.

Da es im Langzeitverlauf trotz des Vorhandensein des Cyclopamins zu einem stetigen Tumorwachstum kommt, finden sich dort auch in den Tumoren nach synchroner Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr Nekrosen. Nach Applikation von 10 mg/kg KG Cyclopamin sieht man etwa 45% Nekrosen in den untersuchten Geweben. Dies spricht für einen antitumorösen Effekt von Cyclopamin auch in der Monotherapie, auch wenn sich dies nicht im Tumorwachstumsverhalten der Monotherapiegruppen widerspiegelt.

4.4.4 Zellregulationsproteine

Die Aktivierung von Shh in verschiedenen malignen humanen Tumoren konnte bereits gezeigt werden. Unklar ist weiterhin, wie es zur Tumorentstehung kommt, d. h. wie Shh auf zellregulatorischer Ebene agiert. Duman - Scheel et al. konnten zeigen, dass Hh über die Transkription von Cyclin D1 und Cyclin E die Zellproliferation reguliert

[29]. Die Hochregulation der Cyclin E - Expression wird dabei durch die Bindung von Gli1 an den Cyclin E - Promoter vermittelt. Dies scheint eine Schlüsselfunktion für die Induktion der DNA-Replikation durch Shh zu sein [22]. Es wird postuliert, dass die Hochregulation von Cyclin D1 durch Shh verantwortlich für die Fähigkeit von Shh ist, das Zellwachstum zu fördern. Daten zum Einfluss von Shh auf Cyclin D1 und Cyclin E in malignen Tumoren liegen zur Zeit nicht vor. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in Pankreaskarzinomen nach Therapie mit Cyclopamin die Expression von Cyclin D1 und Cyclin E analysiert. Eine erwartete reduzierte Expression von Cyclin D1/Cyclin E in den Gruppen mit reduziertem Tumorwachstum konnte dabei nicht angedeutet werden. Es fanden sich keinerlei Unterschiede in der Expression der Cycline für die Tumore nach Monotherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiede fanden sich lediglich für die Gruppen nach Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine. Hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von Cyclin D1 und E in den mit Gemcitabine behandelten Gruppen. Eine erhöhte Cyclin-D1- Expression ist mit einer schlechten Prognose beim humanen Pankreaskarzinom vergesellschaftet [35]. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin D1 zur Apoptoseresistenz führen kann. Der Effekt von Cyclin D1 kann dabei pro - und antiapoptotisch sein, je nach Proliferationsstatus bzw. Differenzierungsgrad der Zellen. Beispielsweise führt eine Überexpression von Cyclin D1 in postmitotischen Neuronen zur Apoptose [69]. Der gleiche Effekt konnte anhand bestrahlter Fibroblasten gezeigt werden [103]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die hohen Cyclinwerte in den Gemcitabingruppen könnte eine „stressbedingte“ Überexpression als Antwort auf das Basenalogon sein. Gemcitabine verhindert durch Strangabbruch die DNS – Elongation. Durch eine verstärkte Überführung der Zellen von der G1 - Phase in die S-Phase wird diesem Prozess möglicherweise entgegengesteuert. In den mit Gemcitabine behandelten Gruppen konnte das Tumorwachstum signifikant reduziert werden. Scheinbar handelt es sich bei der Kombinationstherapie von Cyclopamin und Gemcitabine um einen additiven Effekt. Die antiapoptotischen Signale, die von Shh ausgehen, werden durch den Smo-Inhibitor reduziert. Es kommt vermehrt zur Apoptose. Die Überexpression von Cyclin D1 scheint die Induktion der Apoptose zusätzlich zu fördern.

4.5 Hedgehog, Wnt, NOTCH: Vernetzte Signalwege

Ebenso wie der Shh-Signalweg spielt der *Wnt*-Signalweg eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von embryonalen Entwicklungsschritten [57-59]. Die einzelnen Komponenten des Signalweges gehören zur sog. "low-density lipoprotein receptor-related (LRP)" - Proteinfamilie bzw. zur Frizzled -Proteinfamilie [107, 13]. Bei fehlender Stimulation des Signalweges wird das Protein β -Catenin durch einen zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, bestehend aus Axin, "adenomatous polyposis coli" (APC) und der Glycogensynthese-Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryliert und über das Proteasomen-System abgebaut [14]. Folge ist eine Reduktion des β -Catenin-Spiegels [104, 108]. Erniedrigte β -Catenin-Spiegel führen zu einer Repression von Wnt-Zielgenen. Ist dieser Signalweg aktiv binden Wnt-Proteine an membranständige Rezeptoren der Frizzled-Familie mit der Folge einer Inaktivierung der GSK-3 β -Kinase durch das Molekül Dishevelled [13, 147].

Wnt-Signale blockieren die Aktivität der GSK-3 β -Kinase, was zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma führt. Der entscheidende Schritt, der das β -Catenin vermehrt als Transkriptionsfaktor aktiv werden läßt, scheint in der Erhöhung seiner zytoplasmatischen Konzentration zu bestehen, die auch zu einer erhöhten nukleären Translokation führt [120, 140].

Diese nukleäre Akkumulation bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung von spezifischen *Wnt*-Zielgenen, wie z.B. dem c-myc-Onkogen von Cyclin D1 [133]. Diese Zielgene sind u.a. für die Stimulation der Zellproliferation sowie der Inhibition der Apoptose verantwortlich [68]. Eine onkogene Aktivierung des Wnt-Signalwegs kann durch inaktivierende Mutationen im *APC*-Gen oder durch aktivierende Mutationen im β -Catenin-Gen selbst ausgelöst werden. Analysen von heterozygoten Trägern des *APC*-Genes konnten helfen, das Verständnis der frühen Tumorigenese des Colonkarzinoms zu verstehen. So spielen Mutationen des *Wnt*-Signalweges eine wichtige Rolle bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) [9, 16, 33]. Auch in Pankreaskarzinomen konnten aktivierende β -Catenin - Mutationen identifiziert werden [36].

In Analogie zum Wnt-Signalweg ist bezüglich des Shh-Signalweges bekannt, daß ebenfalls eine vollständige transkriptionelle Antwort Voraussetzung für eine Aufhebung der *Gli*-Repression ist [132]. Neuere Untersuchungen bezüglich des Kolonkarzinoms lassen vermuten, dass ein Gleichgewicht zwischen Wnt und Hedgehog eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Kolonkarzinom-Zelllinien zeigen keinerlei Shh-

Aktivität [12, 136]. Ein Anstieg der nukleären β -Catenin – Konzentration als Zeichen eines aktivierten Wnt-Signalweges aber ist assoziiert mit der Entwicklung eines Kolonkarzinoms. Es scheinen sich Hh und Wnt gegenseitig zu antagonisieren, um eine Homöostase der undifferenzierten Progenitorzellen (Wnt-positive Zellen) und der differenzierten Zellen (Hh positive Zellen) aufrechtzuerhalten. Das Hedgehog-Signal scheint nötig, um eine weitere Differenzierung der Zellen über eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zu ermöglichen. Kommt es nun zu einer Reduktion des Hh-Signals, so führt dies zu einer unkontrollierten Proliferation von Progenitorzellen[136]. Nach dieser Hypothese würde der Hedgehog-Signalweg im Kolonkarzinom als eine Art Tumorsuppressor fungieren (Abb. 54). Die Aktivierung von Shh in anderen endodermalen Organen wie Ösophagus, Magen oder Pankreas spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Die normale Rolle von Shh in diesen Organen scheint die Aufrechterhaltung der Proliferationskapazität einer kleinen Anzahl von Zellen zu sein. Die Rolle von Wnt im Pankreas ist noch nicht völlig geklärt. Neuere Daten deuten aber darauf hin, dass Wnt auch im Pankreaskarzinom aktiv ist [23, 27, 150].

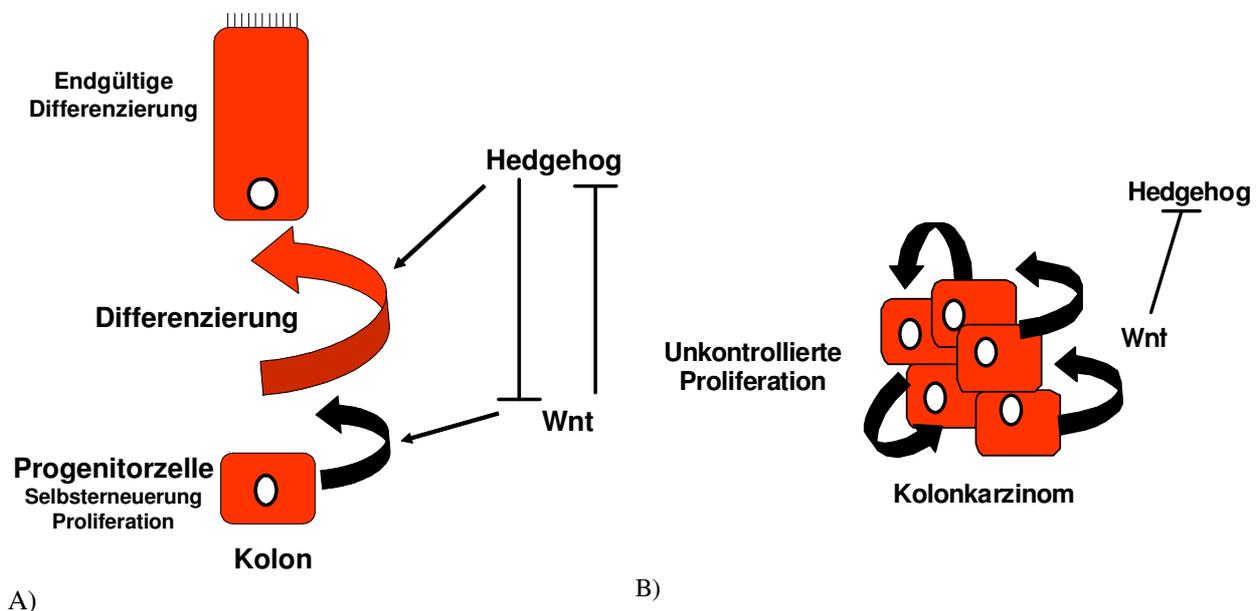


Abbildung 54 A) Hypothetische Darstellung des Gleichgewichts von Hedgehog und Wnt im Kolon. B) Eine Störung dieses Gleichgewichts, z.B. durch eine Mutation im Wnt-Signalweg führt zu einer Reduktion der Hedgehogaktivität und einem konsekutiven Anstieg der Differenzierung von Progenitorzellen, was zu einem Kolonkarzinom führen kann

Eine weitere Interaktion der beiden Signalwege scheint über die Komponente „Suppressor of Fused“ (Su(fu)) des Shh-Signalwegs vermittelt zu werden. Su(fu) inhibiert den Hh-Signalweg über die Bindung von *Gli*-Transkriptionsfaktoren und verhindert so deren Aktivität [28, 90, 67]. Neuere Daten deuten darauf hin, dass Su(fu) auch β -Catenin bindet wodurch die Bindung von β -Catenin an die Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie verhindert, und somit die transkriptionelle Aktivierung von wachstumsassoziierten Zielgenen unterdrückt wird [82].

Ein weiterer Signalweg ist der sog. NOTCH-Entwicklungssignalweg. Der Signalweg ist nach dem Rezeptor „NOTCH“ benannt, der einen membranständigen Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen bindet [20, 66]. NOTCH spielt eine Rolle bei der Entstehung verschiedener maligner Tumore [61, 109]. So konnte tierexperimentell gezeigt werden, daß Mutationen in NOTCH eine wichtige Funktion bei der Entstehung des Mammakarzinoms haben [19].

Für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist bekannt, dass sowohl Shh als auch NOTCH einen Stellenwert haben [62, 74, 87]. Obwohl eine direkte Interaktion bisher nicht gezeigt werden konnte, gibt es Hinweise auf eine Vernetzung beider Signalwege. In Bezug auf das Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des EGF- Rezeptors den NOTCH-Signalweg aktiviert. NOTCH selbst ist notwendig für die Aktivierung von TGF α , einem Liganden des EGF - Rezeptors [84, 97]. Palma et al. konnten bezüglich der Proliferation neuraler Stammzellen demonstrieren, daß für die Regulation der Proliferation eine enge Kooperation zwischen Shh und dem EGF-Rezeptor notwendig ist [102]. Aus dem Drosophila-Model ist bekannt, dass Shh die Expression des EGF-Rezeptors induziert [3].

Das weitere Verständnis der Interaktionen verschiedener Entwicklungskontrollsignalwege in der Tumorigenese ist eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung weiterführender Therapieansätze im Sinne der Kombination verschiedener Signalwegsinhibitoren.

4.6 Klinische Möglichkeiten der Therapie mit Signalwegsinhibitoren

Verglichen mit anderen gastrointestinalen Tumoren ist die Prognose des Pankreaskarzinoms sehr schlecht. Aufgrund der hohen Rezidivquote, auch nach R0-Resektion, gilt eine adjuvante Therapie zum Erreichen einer langfristigen Tumorfreiheit als immanent wichtig [40]. In den letzten 20 bis 30 Jahren wurden verschiedene prospektive Studien zur Effektivität adjuvanter Therapien durchgeführt [1, 65, 98].

Gemcitabine, die wirksamste Substanz zur Behandlung des fortgeschrittenen, irresektablen Pankreaskarzinoms, wurde in diesem Rahmen ebenfalls in der adjuvanten Situation evaluiert. Im sog. RTOG-(Radiation Therapy Oncology Group)-9714 Trial konnte eine deutliche Überlegenheit von Gemcitabine gegenüber 5-Fluoruracil (5-FU) in einem Studienprotokoll einer 5-FU-basierten Chemoradiotherapie gezeigt werden [115].

Zur Verbesserung der Wirksamkeit von Gemcitabine sind verschiedene Studien bei Patienten in der palliativen Situation durchgeführt worden. Diese Studien basieren auf der Hinzunahme von monoklonalen Antikörpern in das Gemcitabine-Protokoll. Eine Studie der Southwest Oncology Group (SWOG SO205), in der eine Kombinationstherapie von Gemcitabine plus Cetuximab (einem Antikörper vom Typ IgG1 gegen den Wachstumsrezeptor EGFR) prospektiv mit einer Gemcitabine - Monotherapie untersucht wurde, zeigte weder bezüglich des medianen Überlebens noch bezüglich des progressionsfreien Überlebens einen Vorteil [2]. Ebenfalls ohne Einfluß auf das mediane Überleben blieb die Hinzunahme von Bevacizumab zur Gemcitabinetherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, wie eine prospektiv randomisierte Studie mit 600 Patienten der „Cancer and Leukemia Group“ (CALB 80303) zeigt [42].

Aufgrund der ernüchternden Ergebnisse der Kombination von Gemcitabine mit Antikörpern sind weiterführende Therapieansätze gefragt. Die Inhibition aktivierter Signalwege in Tumoren, könnte einen neuartigen Therapieansatz zur Behandlung maligner Tumore darstellen. Zur Zeit liegen lediglich präklinische Daten zur Therapie mit Inhibitoren des Hedgehog-Signalweges vor. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Kombination von Gemcitabine mit Cyclopamin eine deutliche Tumorreduktion im Nacktmausmodell zur Folge hat.

Erste Schritte zur Einführung von Signalwegsinhibitoren in die klinische Behandlung des Pankreaskarzinoms sind durch den Nachweis der Aktivität des Hedgehog-Signalweges im humanen Pankreaskarzinom gemacht worden.

Es wird in Zukunft darum gehen weitere sog. niedermolekulare Antagonisten zu identifizieren, welche selektiv und effektiv aktivierte Signalwege im Tumor inhibieren [80]. Neben den schon bekannten Hh-Inhibitoren Cyclopamin und Hh-Antag ist das Aminoprolin Cur-61414 zu nennen [145]. Alle hier genannten Hh-Antagonisten binden an Smo und unterbrechen damit die Signaltransduktionskaskade. Weitere Inhibitoren könnten an anderen Stellen der Transduktionskaskade ansetzen.

Hinsichtlich der Interaktionen verschiedener Signalwege, könnte auch die gleichzeitige Inhibition verschiedener, aktivierter Signalwege ein interessanter Therapieansatz sein. Bezüglich des Wnt-Signalweges stehen beispielsweise Antagonisten zur Verfügung, welche die Bindung von β -Catenin an den T-cell - Faktor (Tcf) hemmen und damit den Signalweg inaktivieren [25, 41, 73]. Liegt eine Aktivierung beider Signalwege (Shh und Wnt) wie im Pankreaskarzinom vor, ist durchaus an eine erfolgreiche Inhibition beider Signalwege zu denken.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Entwicklungskontrollsignalwegs Sonic-Hedgehog (Shh) im humanen Pankreaskarzinom untersucht. Die Aktivierung dieses Signalwegs, welcher durch die Bindung von Hedgehog-Proteinen an den Transmembranrezeptor PTCH oder durch Mutationen im *PTCH*-Gen selbst aktiviert wird, spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung verschiedener Tumore, insbesondere in der Genese des nävöiden Basalzellkarzinoms und desmoplastischen Medulloblastoms. Aktuelle Daten belegen, dass Tumoren des Gastrointestinaltraktes, unter anderem Pankreaskarzinome, ebenfalls eine Überaktivierung dieses Signalwegs aufweisen.

Um die Aktivität des Hedgehog-Patched-Signalwegs im humanen Adenokarzinom des Pankreas zu belegen, wurde zunächst mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR-Methodik molekulargenetisch die Expression der spezifischen Hedgehog-Zielgene *PTCH* und *GLI1* in Pankreaskarzinomen analysiert. Für die Expressionsanalyse stand eine Tumorbank mit 34 Pankreaskarzinomen, und korrespondierendes Normalgewebe zur Verfügung. In der Untersuchung hinsichtlich der Aktivierung des Signalweges fand sich eine deutliche Überexpression der Zielgene *PTCH* und *GLI1*, was für eine Aktivierung des Signalwegs in unserem repräsentativen Kollektiv humaner Pankreaskarzinome spricht.

Um nachzuweisen, ob die Aktivierung dieses Signalwegs aufgrund von Alterationen des *PTCH*-Gens resultiert, wurde dieser membranständige Rezeptor in diesem Kollektiv auf Mutationen hin untersucht. Mit Hilfe der Einzelstrangpolymorphismus (SSCP) Analyse wurden „Single Nucleotide Polymorphisms“, sog. SNPs, in spezifischen Exonen des *PTCH*-Gens nachgewiesen. Die Sequenzierung zeigte das Vorhandensein eines „SNP“ im Codon 76 des Exon 2. Zusätzlich konnte in 50% der Tumorproben ein „silent SNP“ in Exon 12 des *PTCH*-Genes gefunden werden. Desweiteren konnte in einer Pankreaskarzinomprobe ein Polymorphismus identifiziert werden. Dieser Polymorphismus resultiert in einem Aminosäureaustausch (Thr Ser) im Codon 1195 (Exon 22). Da diese Mutation aber im komplementären Pankreasgewebe ebenso gefunden wurden, handelt es sich nicht um somatische Mutationen.

Anhand von Promoter-Studien an Pankreaskarzinomzellen konnten wir belegen, dass der Hedgehog-Signalweg insbesondere in zwei Tumorzelllinien aktiv ist. Um nachzuweisen inwieweit eine Inhibition des Signalwegs Einfluß auf die Proliferation

unserer Tumorzellen hat wurde die Hemmung des Signalweges in der Zellkultur (Pankreaskarzinom-Zelllinien: ASPC-1, Mia Paca, Capan-1) mittels spezifischer Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich mittels ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay, dass der Smo-Antagonist Hh-Antag einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf Pankreaskarzinomzellen hat. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von *GLI1*, einem spezifischen Zielgen des Hedgehog-Signalwegs, in Abhängigkeit von Hh-Antag vermindert ist.

In einem weiteren Schritt wurde der antitumoröse Effekt von Cyclopamin, einem steroidal Alkaloid aus der kalifornischen Kornlilie *Veratum californicum* in der Zellkultur untersucht. Cyclopamin ist ähnlich wie Hh-Antag ein Inhibitor des Transmembranproteins Smo. Es fand sich nach Behandlung der Zellen ein deutlich antiproliferativer Effekt auf Pankreaskarzinomzelllinien. Dieser Effekt konnte durch die Kombination mit Gemcitabine, einem Nukleosidanalogen der Gruppe der Pyrimidine, weiter gesteigert werden.

Diese Ergebnisse sollten nun *in vivo* reproduziert werden. Dafür wurde ein im Vorfeld etabliertes heterotopes Nacktmausmodell (Nu/Nu) verwendet. Zur Tumor-Inokulation wurden 4 – 8 Wochen alten weiblichen Nacktmäusen 4×10^6 Zellen (Capan-1) in 100 μl PBS gelöst subkutan in die dorsale Flanke injiziert. Nach etwa 10 bis 14 Tagen erreichten die Tumore den gewünschten Durchmesser von 1 cm und wurden dann mit Cyclopamin (Monotherapie) sowie mit einer Kombinationstherapie (Cyclopamin + Gemcitabine) behandelt.

Untersuchungen hinsichtlich der Zielgen-Expression der behandelten Tiere zeigten eine Reduktion der Expression von *PTCH* nach Behandlung mit Cyclopamin, was für eine Inaktivierung des Signalweges auch *in vivo* spricht.

Systematische Untersuchungen hinsichtlich des Tumorwachstumsverhaltens unter der Therapie mit Cyclopamin zeigten eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums nach Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und Gemcitabine. Die Tumore der so behandelten Tiere waren weit weniger ausgeprägt als unbehandelte Kontrolltiere. Es fanden sich in der Kombinationsgruppe deutlich vermehrt Apoptosen sowie Nekrosen. Ki67 - Messungen erbrachten eine reduzierte Proliferation in den behandelten Tumoren.

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, daß der Sonic-Hedgehog-Signalweg im humanen Pankreaskarzinom aktiviert ist. Eine medikamentöse Inhibition des Signalweges ist *in vitro* sowie *in vivo* möglich. Dies zeigt

sich nicht nur anhand einer reduzierten Expression von Hedgehog-Zielgenen unter der Therapie, sondern spiegelt sich auch im reduzierten Tumorwachstum wider.

Die Inhibition des Sonic-Hedgehog-Entwicklungssignalweges stellt einen neuartigen, interessanten Therapieansatz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms dar. In weiteren Studien sollten die Möglichkeiten der Signalwegsinhibition in der Behandlung maligner Tumore weiter verfolgt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 59:2006-2010
2. A Philip JB, C Fenoglio-Preiser,, M Zalupski HL, E O'Reilly, R Wong, J Atkins, J, Abbruzzese CB (2007) Phase III study of gemcitabine (G) plus cetuximab (C) versus gemcitabine in patients (pts) with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma (Pca): SWOG S0205 study. ASCO 2008
3. Amin A, Li Y, Finkelstein R (1999) Hedgehog activates the EGF receptor pathway during Drosophila head development. *Development* 126:2623-2630
4. Andren-Sandberg A, Neoptolemos JP (2002) Resection for pancreatic cancer in the new millennium. *Pancreatology* 2:431-439
5. Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997) Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 7:801-804
6. Aszterbaum M, Beech J, Epstein EH, Jr. (1999) Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4:41-45
7. Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, Tying SK, Kopelovich L, Hebert J, Epstein EH, Jr., Bickers DR, Xie J (2004) Inhibition of smoothed signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. *Cancer Res* 64:7545-7552
8. Bale AE (2000) Sheep, lilies and human genetics. *Nature* 406:944-945
9. Ballhausen WG (2000) Genetic testing for familial adenomatous polyposis. *Ann N Y Acad Sci* 910:36-47; discussion 47-39
10. Bardeesy N, DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2:897-909
11. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:353-356
12. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425:846-851
13. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225-230

14. Bienz M, Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103:311-320
15. Biliran H, Jr., Wang Y, Banerjee S, Xu H, Heng H, Thakur A, Bollig A, Sarkar FH, Liao JD (2005) Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin Cancer Res* 11:6075-6086
16. Bodmer WF (2006) Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 51:391-396
17. Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G (2001) A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7:1279-1291
18. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-144
19. Callahan R (1998) Somatic mutations that contribute to breast cancer. *Biochem Soc Symp* 63:211-221
20. Callahan R, Egan SE (2004) Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:145-163
21. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16:2743-2748
22. Chen X, Oh SW, Zheng Z, Chen HW, Shin HH, Hou SX (2003) Cyclin D-Cdk4 and cyclin E-Cdk2 regulate the Jak/STAT signal transduction pathway in *Drosophila*. *Dev Cell* 4:179-190
23. Chetty R, Serra S, Salahshor S, Alsaad K, Shih W, Blaszyk H, Woodgett JR, Tsao MS (2006) Expression of Wnt-signaling pathway proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a tissue microarray analysis. *Hum Pathol* 37:212-217
24. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413
25. Clevers H (2004) Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* 5:5-6
26. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 389:876-881
27. Dessimoz J, Grapin-Botton A (2006) Pancreas development and cancer: Wnt/beta-catenin at issue. *Cell Cycle* 5:7-10

28. Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C (1999) Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* 9:1119-1122
29. Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W (2002) Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417:299-304
30. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430
31. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A (2007) Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 67:2187-2196
32. Ferrone CR, Brennan MF, Gonen M, Coit DG, Fong Y, Chung S, Tang L, Klimstra D, Allen PJ (2007) Pancreatic Adenocarcinoma: The Actual 5-Year Survivors. *J Gastrointest Surg*
33. Fodde R (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38:867-871
34. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Uden AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgard R (1996) The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 14:78-81
35. Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N, Beger HG (1997) Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* 57:1634-1637
36. Gerdes B, Ramaswamy A, Simon B, Pietsch T, Bastian D, Kersting M, Moll R, Bartsch D (1999) Analysis of beta-catenin gene mutations in pancreatic tumors. *Digestion* 60:544-548
37. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI: Krebs in Deutschland ü, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken, . (2006)
38. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP (1996) Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 10:301-312
39. Gorlin RJ (2004) Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med* 6:530-539
40. Griffin JF, Smalley SR, Jewell W, Paradelo JC, Reymond RD, Hassanein RE, Evans RG (1990) Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 66:56-61

41. Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, Klein P, Suh ER, Lynch JP (2004) Cdx1 inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem* 279:36865-36875
42. H. L. Kindler DN, D. Hollis, E. Oraefo, D. Schrag, H. Hurwitz, H. L. McLeod, M. F. Mulcahy, R. L. Schilsky, R. M. Goldberg (2007) A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine (G) plus bevacizumab (B) versus gemcitabine plus placebo (P) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (PC): A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 80303. ASCO 2007
43. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85:841-851
44. Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L (2000) Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* 275:28341-28344
45. Hayashi K (1992) PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79
46. Hebrok M, Kim SK, Melton DA (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12:1705-1713
47. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1992) Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res* 52:533-539
48. Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G (1997) Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187:25-35
49. Hurtado-Lorenzo A, Millan E, Gonzalez-Nicolini V, Suwelack D, Castro MG, Lowenstein PR (2004) Differentiation and transcription factor gene therapy in experimental parkinson's disease: sonic hedgehog and Gli-1, but not Nurr-1, protect nigrostriatal cell bodies from 6-OHDA-induced neurodegeneration. *Mol Ther* 10:507-524
50. Ingham PW MA (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 1;15(23):3059-3087
51. Jeong J, McMahon AP (2001) Developmental biology. Vesicles and the spinal cord. *Nature* 412:136-137
52. Johnson CD, Schwall G, Flechtenmacher J, Trede M (1993) Resection for adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *Br J Surg* 80:1177-1179

53. Johnson RL ML, Scott MP (2000) In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration. *Mol Cell*. 6(2):467-78
54. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr., Scott MP (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272:1668-1671
55. Kappler R, Bauer R, Calzada-Wack J, Rosemann M, Hemmerlein B, Hahn H (2004) Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 23:8785-8795
56. Kappler R, Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Koleva M, Herwig A, Piontek G, Graedler F, Adamski J, Heinzmann U, Schlegel J, Hemmerlein B, Quintanilla-Martinez L, Hahn H (2003) Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma. *J Pathol* 200:348-356
57. Katoh M (2007) Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev* 3:30-38
58. Katoh Y, Katoh M (2006) Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 18:1019-1023
59. Katoh Y, Katoh M (2006) WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int J Mol Med* 17:171-175
60. Kawahira H, Ma NH, Tzanakakis ES (2007) Combined activities of Hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Development*
61. Kiaris H, Politi K, Grimm LM, Szabolcs M, Fisher P, Efstratiadis A, Artavanis-Tsakonas S (2004) Modulation of notch signaling elicits signature tumors and inhibits hras1-induced oncogenesis in the mouse mammary epithelium. *Am J Pathol* 165:695-705
62. Kimura K, Satoh K, Kanno A, Hamada S, Hirota M, Endoh M, Masamune A, Shimosegawa T (2007) Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci* 98:155-162
63. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236:70-73
64. Kinzler KW RJ, Bigner SH, Vogelstein B (1988) The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 24;332(6162):371-374
65. Klinkenbijn JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, Arnaud JP, Gonzalez DG, de Wit LT, Hennipman A, Wils J (1999) Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 230:776-782; discussion 782-774

66. Koch U, Radtke F (2007) Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 64:2746-2762
67. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Unden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Zaphiropoulos PG (1999) Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1:312-319
68. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275:1784-1787
69. Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A (1996) Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *Embo J* 15:46-54
70. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW (1993) A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75:1431-1444
71. Krejci T, Leffler J, Poloucek P (2007) [Long-term results after radical resections for pancreatic ductal adenocarcinoma--10 years experience]. *Rozhl Chir* 86:174-179
72. Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A (1997) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537-2552
73. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA (2004) Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5:91-102
74. Liu MS, Yang PY, Yeh TS (2007) Sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cystic neoplasms and ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 34:340-346
75. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L (1993) Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328:1433-1437
76. Maesawa C, Tamura G, Iwaya T, Ogasawara S, Ishida K, Sato N, Nishizuka S, Suzuki Y, Ikeda K, Aoki K, Saito K, Satodate R (1998) Mutations in the human homologue of the *Drosophila* patched gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21:276-279
77. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ (1996) Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384:176-179
78. Marigo V, Laufer E, Nelson CE, Riddle RD, Johnson RL, Tabin C (1996) Sonic hedgehog regulates patterning in early embryos. *Biochem Soc Symp* 62:51-60
79. Marigo V, Scott MP, Johnson RL, Goodrich LV, Tabin CJ (1996) Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122:1225-1233

80. Masdeu C, Faure H, Coulombe J, Schoenfelder A, Mann A, Brabet I, Pin JP, Traiffort E, Ruat M (2006) Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothed to G15. *Biochem Biophys Res Commun* 349:471-479
81. McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB (1998) PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 17:1167-1172
82. Meng X, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui CC, Alman B (2001) Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 276:40113-40119
83. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, Stratton RF, Sujansky E, Bale SJ, Muenke M (2002) Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet* 110:297-301
84. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe MS, Hruban RH, Ball DW, Schmid RM, Leach SD (2003) Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3:565-576
85. Moore M. J. GD, Hamm J., Kotecha J., Gallinger S., Au H. J. , Nomikos D., Ding K. , Ptaszynski M. , Parulekar W. (2006) Erlotinib improves survival when added to gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [NCIC-CTG. ASCO, Abstract
86. Morrione A, Valentinis B, Xu SQ, Yumet G, Louvi A, Efstratiadis A, Baserga R (1997) Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3777-3782
87. Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, Wright CV, Hebrok M, Lewis BC (2007) Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5103-5108
88. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27
89. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T (2008) Postoperative adjuvant chemotherapy improves survival after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Gastrointest Surg* 12:534-541
90. Murone M, Luoh SM, Stone D, Li W, Gurney A, Armanini M, Grey C, Rosenthal A, de Sauvage FJ (2000) Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nat Cell Biol* 2:310-312
91. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* 9:76-84

92. Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M (1999) The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:2479-2488
93. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW (2001) Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 358:1576-1585
94. Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, Almond J, Beger HG, Pederzoli P, Bassi C, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Buckels J, Deakin M, Adab FA, Sutton R, Imrie C, Ihse I, Tihanyi T, Olah A, Pedrazzoli S, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW (2001) Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann Surg* 234:758-768
95. Newton CJ, Bilko D, Tichomirowa M, Renner U, Stalla GK (2005) The role of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase in the response of pituitary tumor cells to reactive oxygen species. *Endocrinology* 146:1119-1127
96. Nilsson M, Uden AB, Krause D, Malmqwist U, Raza K, Zaphiropoulos PG, Toftgard R (2000) Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3438-3443
97. Nueda ML, Baladron V, Sanchez-Solana B, Ballesteros MA, Laborda J (2007) The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J Mol Biol* 367:1281-1293
98. Nukui Y, Picozzi VJ, Traverso LW (2000) Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy improves survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 179:367-371
99. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801
100. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutterlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 297:267-277
101. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-2770

102. Palma V, Ruiz i Altaba A (2004) Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131:337-345
103. Pardo FS, Su M, Borek C (1996) Cyclin D1 induced apoptosis maintains the integrity of the G1/S checkpoint following ionizing radiation irradiation. *Somat Cell Mol Genet* 22:135-144
104. Peifer M, Polakis P (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609
105. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 273:14037-14045
106. Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C (1997) Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 57:2085-2088
107. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407:535-538
108. Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851
109. Politi K, Feirt N, Kitajewski J (2004) Notch in mammary gland development and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 14:341-347
110. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, Beachy PA (1996) Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86:21-34
111. Pu Y, Huang L, Prins GS (2004) Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol* 273:257-275
112. Puchalski Z, Ladny JR, Polakow J, Razak H, Deeb A (1996) Diagnosis and surgical treatment of pancreatic carcinoma. *Rocz Akad Med Bialymst* 41:210-217
113. Quirk J, van den Heuvel M, Henrique D, Marigo V, Jones TA, Tabin C, Ingham PW (1997) The smoothed gene and hedgehog signal transduction in *Drosophila* and vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:217-226
114. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP (2000) Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127:2763-2772

115. Regine WK, Abrams R , et al. (2006) RTOG 9704 a phase III study of adjuvant pre and post chemoradiation (CRT') 5 - FU vs. gemcitabine (G) for fresected pancreatic adenocarcinoma (oral presentation). *J Clin Oncol*
116. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G (2005) Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152:43-51
117. Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ (1998) Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 125:2791-2801
118. Romer J, Curran T (2005) Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 65:4975-4978
119. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* 6:229-240
120. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272:1023-1026
121. Ruiz i Altaba A (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126:3205-3216
122. Sambrook J, Gething MJ (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225
123. Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12561-12566
124. Sanchez P, Ruiz i Altaba A (2005) In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mech Dev* 122:223-230
125. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265:687-695
126. Sasai K, Romer JT, Kimura H, Eberhart DE, Rice DS, Curran T (2007) Medulloblastomas derived from Cxcr6 mutant mice respond to treatment with a smoothed inhibitor. *Cancer Res* 67:3871-3877
127. Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T (2006) Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res* 66:4215-4222

128. Sidransky D (1996) Is human patched the gatekeeper of common skin cancers? *Nat Genet* 14:7-8
129. Smeenk HG, van Eijck CH, Hop WC, Erdmann J, Tran KC, Debois M, van Cutsem E, van Dekken H, Klinkenbijn JH, Jeekel J (2007) Long-term survival and metastatic pattern of pancreatic and periampullary cancer after adjuvant chemoradiation or observation: long-term results of EORTC trial 40891. *Ann Surg* 246:734-740
130. Steg A, Vickers SM, Eloubeidi M, Wang W, Eltoum IA, Grizzle WE, Saif MW, Lobuglio AF, Frost AR, Johnson MR (2007) Hedgehog pathway expression in heterogeneous pancreatic adenocarcinoma: implications for the molecular analysis of clinically available biopsies. *Diagn Mol Pathol* 16:229-237
131. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384:129-134
132. Taipale J, Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411:349-354
133. Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426
134. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425:851-856
135. Tran KT, Smeenk HG, van Eijck CH, Kazemier G, Hop WC, Greve JW, Terpstra OT, Zijlstra JA, Klinkert P, Jeekel H (2004) Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors. *Ann Surg* 240:738-745
136. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP (2004) Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 36:277-282
137. van den Brink GR, Hardwick JC, Tytgat GN, Brink MA, Ten Kate FJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2001) Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. *Gastroenterology* 121:317-328
138. van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Pinedo HM, Peters G (1996) Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 51:911-918

139. Von Ohlen T, Lessing D, Nusse R, Hooper JE (1997) Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2404-2409
140. Wagner U, Brownlees J, Irving NG, Lucas FR, Salinas PC, Miller CC (1997) Overexpression of the mouse dishevelled-1 protein inhibits GSK-3 β -mediated phosphorylation of tau in transfected mammalian cells. *FEBS Lett* 411:369-372
141. Waha A, Watzka M, Koch A, Pietsch T, Przkora R, Peters N, Wiestler OD, von Deimling A (1998) A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes. *Brain Pathol* 8:13-18
142. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422:313-317
143. Werner H, Le Roith D (2000) New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 57:932-942
144. Wetmore C, Eberhart DE, Curran T (2001) Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res* 61:513-516
145. Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, Xu Y, Chai L, Wichterle H, Kon C, Gatchalian C, Porter JA, Rubin LL, Wang FY (2003) Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4616-4621
146. Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH, Jr. (1997) Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 57:2369-2372
147. Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R (1995) The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* 9:1087-1097
148. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA (1995) Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 221:721-731; discussion 731-723
149. Yoon JW, Liu CZ, Yang JT, Swart R, Iannaccone P, Walterhouse D (1998) GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain. *J Biol Chem* 273:3496-3501
150. Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, Monga NK, Bell A, Sood A, Malhotra V, Sood N, Midda V, Monga DK, Kokkinakis DM, Monga SP (2006) Aberrant Wnt/ β -catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia* 8:279-289

7**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Abb	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
APC	Adenomatous Polyposis Coli
bp	Basenpaar
BcL2	B-cell-Lymphoma
CALB	Cancer and Leukemia Group
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CDK	cyclin-dependend kinase
Ci	cubitus interruptus
Cos2	costal 2
CONCO	Charité Oncology
cRT-PCR	kompetitive RT-PCR
Da	Dalton
Dhh	Desert Hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESPAC	European Study Group for Pancreatic Cancer
FU	5-Fluoruracil
Gadd45	Growth arrest and damage-inducible Gen
g	Gramm
G	Guanin
GSK-3 β	Glycogensynthese-Kinase-3 β
Hhip	Hedgehog interacting Protein
Igf	Insulin-like growth factor
Ihh	Indian Hedgehog
kb	Kilobasem
kDA	KiloDalton
M	molar

mg	miligramm
μ	micro 10 ⁻⁶
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
n	nano 10 ⁻⁹
NTB	Nukleosidtriphosphat
p	pico 10 ⁻¹²
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat buffered saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PKA	Proteinkinase A
Ptc	Patched
PTCH	Patched
Raf	rapidly-growing fibrosarkom;
Ras	rat sarkoma (Proto-onkogen)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Reverse Transkription
RTK	Receptor – tyrosine kinase
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
s	Sekunde
SD	Standard deviation
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SNP	silent single nucleotide polymorphism
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Thymidin
Tcf	T-cell - Faktor
T7	Bakteriophage
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
wnt	Wingless
%	Prozent

°C
3^H

Grad Celsius
Tritium

Mein tiefster Dank gilt meinem chirurgischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus für die jahrelange Ausbildung in Klinik und Wissenschaft sowie für die Überlassung des Themas. Die Möglichkeit, mich selbstständig und unabhängig an diesem Thema arbeiten zu lassen, war Grundlage und Motivation für das Gelingen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. J. M. Langrehr für seinen uneingeschränkten Einsatz zur Ermöglichung der Experimente.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Koch und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Neuropathologie der Universität Bonn für die engagierte Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente hinsichtlich der molekularbiologischen Untersuchungen.

Frau Sabine Boas-Knoop möchte ich danken für den außergewöhnlichen Einsatz und das Durchhaltevermögen bei der Durchführung der Tierexperimente. Ohne ihren unermühtlichen Arbeitseifer auch in schwierigen Phasen wäre diese Arbeit nicht gelungen. Dank gilt auch Herrn Steffen Lippert für die Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung.

Herrn PD. Dr. med. Ulf Neumann möchte ich danken für die Begleitung und Ausbildung in meiner wissenschaftlichen Arbeit seit Beginn meiner Tätigkeit in der Klinik.

Bei meinen Kollegen Dr. med. Dietmar Jacob und Dr. med. Sven-Christian Schmidt möchte ich mich für die langjährige freundschaftliche Unterstützung im klinischen Alltag bedanken.

Meiner Freundin Sandra Bayraktar möchte ich von Herzen danken für die Unterstützung und Geduld während der Zeit der Erstellung dieser Arbeit.

EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- **weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,**
- **die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die Verwendeten Hilfsmittel die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden**
- **mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,**

.....

Datum

.....

Unterschrift