

**Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

Dissertation

**Apoptoseinduktion bei multiresistenten Magen- und Pankreaskarzinomzellen
durch 2-Methoxyestradiol**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

**Janine Siebert
aus Werdau**

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schumacher
2. Priv.-Doz. Dr. med. F. A. Wenger
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Strik

Datum der Promotion: 01.06.2008

1. Einleitung

- 1.1. Die Tumorentstehung
- 1.2. Apoptose und Nekrose
- 1.3. Das Magenkarzinom
- 1.4. Das Pankreaskarzinom
- 1.5. Problematik der Chemoresistenz
- 1.6 Einfluss der Östrogene auf das Tumorwachstum
- 1.7 Metabolisierung des Östrogens
- 1.8 Wirkung des 2-ME auf das Tumorwachstum

2. Zielsetzung

3. Material und Methoden

- 3.1. Zellkultur
- 3.2. Proliferationsanalyse
 - 3.2.1. Aussaat der Zellen
 - 3.2.2. Behandlung der Zellen
 - 3.2.3. Präparieren der Zellen
- 3.3. FACS – Analyse
 - 3.3.1. Aussaat der Zellen
 - 3.3.2. Präparieren der Zellen
 - 3.3.3. Zellzyklusanalyse
- 3.4. Nativaufnahmen der Zelllinien unter Behandlung
- 3.5. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff
 - 3.5.1. Aussaat der Zellen
 - 3.5.2. Präparieren der Zellen
 - 3.5.3. Zellzählung

4. Ergebnisse

- 4.1. Wachstumshemmung durch 2-ME
- 4.2. Multiresistente Pankreaskarzinomzellen
- 4.3. Nativaufnahmen der Zelllinien unter Behandlung
- 4.4. FACS – Analyse
- 4.5. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff

5. Diskussion

- 5.1. Steroide und Tumorwachstum
- 5.2. Tumorchemmung durch 2-ME
- 5.3. Wirkung von 2-ME auf multiresistente Pankreas – und Magenkarzinomzellen
 - 5.3.1. Proliferationsanalysen
 - 5.3.2. Induktion von Apoptose
- 5.4. Wirkmechanismen von 2-ME bei multiresistenten Zellen
 - 5.4.1. Hemmung der Superoxiddismutase
 - 5.4.2. Senkung der IL-6-Sekretion
- 5.5. Toxizität von 2-ME
- 5.6. Klinischer Einsatz von 2-ME

6. Zusammenfassung

7. Danksagung

8. Literatur

1. Einleitung

1.1. Die Tumorentstehung

Tumorerkrankungen sind in den westlichen Industrieländern nach den Herz – und Kreislaufstörungen die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter. Zur Zeit stirbt jeder Vierte an einer Krebskrankheit (Krebstodesursachenstatistik, DKFZ Heidelberg). Aus klinischer Sicht stellt sich Krebs als eine große Gruppe mit bis zu 100 oder mehr Krankheitsbildern dar, welche in der Geschwindigkeit ihres Fortschrittes, in der zellulären Differenzierung , in ihrer Neigung zur Metastasenbildung , in ihrer Therapierbarkeit und somit nicht zuletzt in ihrer Prognose variieren.

Krebs kann ohne äußeren Einfluß spontan entstehen, aber auch durch chemische, physikalische und biologische Umwelteinflüsse induziert werden. Das macht deutlich, dass die Krebsentstehung sowohl von endogenen Faktoren als auch von exogenen Kanzerogenen aus der Umwelt beeinflusst wird.

Aus zell- und molekularbiologischer Sicht lässt sich die Ursache auf bestimmte gemeinsame ungerichtete und zufällig auftretende genetische Veränderungen in einzelnen Zellen des Organismus zurückführen.

Durch Störungen des Zellzyklus, des programmierten Zelltodes und durch zunehmenden Ausfall genetischer Kontrollpunkte kommt es zu vermehrtem ungebremsten Zellwachstum und zum Ausfall von Apoptosesignalen, was kontinuierlich proliferierende und langlebige Zellen entstehen lässt.

Die malignen Transformationen in den Zellen werden vor allem durch Defekte in den Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA–Mismatch-Reparaturgenen ausgelöst.

Im physiologischen Zustand der Zelle wirken die Protoonkogene generell wachstumsfördernd, unterliegen aber einem komplexen Kontrollsystem. Kommt es aber durch Mutation in einem dieser Gene, bzw. verminderter Kontrolle durch das komplexe Systems, zu einem verstärkten Wachstumsreiz, kann sehr schnell aus einer Zelle eine Zellpopulation entstehen. Das Protoonkogen ist dann zu einem Onkogen aktiviert wurden.

Ein Beispiel für Protoonkogene ist der Wachstumsfaktor PDGF und das mitochondriale Transportprotein bcl-2, ein Inhibitor der Apoptose.

Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation bzw. in der Tumorentstehung spielen die Tumorsuppressorgene.

Die Tumorsuppressorgene übernehmen in der gesunden Zelle wichtige Wachstumskontrollfunktionen und wirken wachstumshemmend. Das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen ist das p53 – ein Transkriptionsfaktor. Es ist entscheidend an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt.

Kommt es zu chemischen Veränderungen der DNA, führt dies zu einer Akkumulation von p53 durch verlangsamtten Abbau. Durch die schnelle Akkumulation großer Mengen des Proteins werden wiederum im Zellkern bestimmte Gene aktiviert. Diese Gene, p53-reguliert, führen ihrerseits entweder zu einem Stop des Zellzyklus der geschädigten Zelle, bis Reparaturmechanismen den genomischen Schaden ausgebessert haben, oder sie induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose), falls der Schaden zu groß ist. In jedem Fall müssen diese Kontrollmechanismen die Weitergabe des genomischen Schadens an die Tochterzellen während der Mitose, und somit die Entstehung von verändertem, genetisch instabilen Genom, verhindern, da diese Zellen sonst ein hohes Risiko für einen Übergang in Tumorzellen besitzen würden.

Somit besitzt das p53-Protein entscheidende regulatorische Funktionen, welche an den Restriktionspunkten des Zellzyklus wirksam werden : zum einen am Restriktionspunkt vor der S-Phase des Zellzyklus, wo es zur DNA-Neusynthese und somit zur Bildung eines neuen DNA-Stranges kommt und zum anderen vor der Mitose, in welcher das genetischen Material auf die Tochterzellen verteilt wird.

Kommt es aber zu Störungen dieser wichtigen Kontrollpunkte, wird die genetische Information dauerhaft verändert, und Fehler, welche sowohl in der Replikationsphase als auch in der fehlerhaften Verteilung des genetischen Materials in der Mitose entstanden sind, werden durch die Weitergabe an die Tochterzellen fixiert. Dies führt zur sogenannten chromosomalen Instabilität.

Eine andere Form der genetischen Instabilität ist davon abzugrenzen – jene, die durch den Ausfall des DNA-Mismatch-Reparatursystems bedingt ist.

Das DNA-Mismatch-Reparatursystem ist ein hocheffizientes Überwachungssystem, welches die DNA nach der Replikationsphase auf Fehler kontrolliert.

Während der S-Phase, also der Neusynthese der DNA, können einzelne DNA-Bausteine falsch eingebaut werden. Normalerweise wirken sich diese Fehler nicht aus, da das Überwachungssystem diese erkennt und ausbessert. Störungen in diesem DNA-Mismatch-Reparatursystems allerdings können wesentlich zur Krebsentstehung beitragen, wenn fehlerhaft eingebaute Nukleotide nicht erkannt und repariert werden und dann in bestimmten Abschnitten akkumulieren.

Tumorzellen sind letztendlich nicht nur durch punktuelle Veränderungen in den regulierenden und kontrollierenden Genen, wie z.B. Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene, gekennzeichnet, sondern vielmehr ist das Genom in so drastischer Weise gestört, dass etwa 15-30 % der gesamten genetischen Information einer Tumorzelle verändert ist. Diese Veränderungen treten nicht alle auf einmal auf, sondern akkumulieren allmählich im Laufe der Zeit der genotoxischen Exposition. Wesentlich für die Tumorentstehung sind letztendlich zwei Voraussetzungen. Zum einen müssen wichtige Reparaturmechanismen außer Kraft gesetzt werden, so dass eine Ausbesserung des fehlerhaften genetischen Materials vor der Kopie für die Weitergabe an die Tochterzellen nicht mehr erfolgen kann. Zum anderen müssen die Zellen den genetischen Schaden überleben und weiter proliferieren, was in der Regel mit einer verminderten Apoptose und erhöhten Zellteilungsrate der Zellen einhergeht.

Sind die Voraussetzungen erfüllt, ist ein Zustand drastisch erhöhter genetischer Instabilität geschaffen, was ein sehr hohes Risiko zur Tumorentstehung birgt.

1.2. Apoptose und Nekrose

Apoptose ist ein Begriff (aus dem Griechischen für „fallende Blätter“), der den Zelltod beschreibt, welcher durch eine Vielzahl zellulärer externer und interner Stimuli aktiviert wird und durch genetische Information der betroffenen Zelle selbst reguliert wird. Daher auch die Bezeichnung programmierter oder induzierter Zelltod, welcher, ist er einmal in seine Bahnen geleitet, nicht mehr reversibel ist.

Um apoptotische Zellen von gesunden Zellen mikroskopisch unterscheiden zu können, ist es notwendig auf die wichtigsten Veränderungen der Zellen während der Apoptose zu achten.

Dazu gehört zum einen das Schrumpfen der Zellen und zum anderen charakteristische Veränderungen im Kernchromatin. Es kommt zur Kondensation des Chromatins, welches sich dann typischerweise zu kleinen Kugeln ansammelt, zum sogenannten Membranblebbing. Dabei wird die Vollständigkeit der Plasmamembran gewahrt und es entstehen Apoptotic bodies. Schematisch sind diese Veränderungen in Abbildung 1 dargestellt.

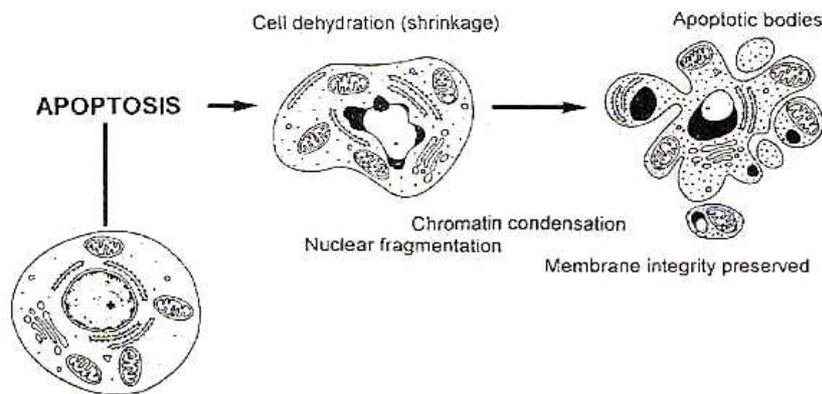


Abb. 1 : Morphologische Veränderungen während der Apoptose
 (aus *Cytometry 27:1-20*, von Z. Darzynkiewicz)

Ist die Zelle zerstört, so werden die Bestandteile von umgebenden Zellen phagozytiert, ohne dass eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird. Der programmierte Zelltod stellt einen essentiellen Prozeß im Leben eines Organismus dar. Beispielsweise ist er die Grundlage einer geregelten Embryogenese, wo es zum Absterben überflüssiger Organanlagen kommt, er hält die Gewebemöostase aufrecht durch Schutz vor Neubildungen oder es werden infizierte Zielzellen zerstört. Somit ist der natürliche Umsatz der Zellen ohne die Auslösung einer Autoimmunreaktion von zentraler Bedeutung.

Im Gegensatz dazu bezeichnet die Nekrose eine passiven, katabolischen Prozeß, welcher eine Antwort auf extreme exogene traumatische oder toxische Einflüsse auf die Zelle darstellt und, im Vergleich zur Apoptose, immer pathologisch ist. Es kommt zur irreversiblen Störung der zellulären homöostatischen Mechanismen. Die bei der Zellyse freigesetzten Inhalte induzieren eine inflammatorische Reaktion, welche histologisch durch die Gewebeeinfiltration von Leukozyten gekennzeichnet ist und z.B. zur Ausbildung von Narben führen kann.

1.3. Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist in Deutschland nach Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinom die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache beim männlichen Geschlecht mit rund 7% und die sechsthäufigste tumorbedingte Todesursache beim weiblichen Geschlecht mit rund 6%, auch wenn in den letzten Jahren die Inzidenz – und Mortalitätsraten stetig rückläufig waren. (Krebstodesursachenstatistik 1999, DKFZ Heidelberg).

Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen und der Erkrankungsgipfel liegt für beide Geschlechter zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr.

Allerdings finden sich weltweit erhebliche Häufigkeitsunterschiede in den Mortalitätsraten, teilweise bedingt durch ethnische und / oder Umweltfaktoren.

So gehört Japan zu den Ländern mit der höchsten Mortalitätsrate, gefolgt von Portugal, Ungarn und Polen. In den USA, Schweden und Frankreich sind die niedrigsten Mortalitätsraten beobachtet wurden.

Ursächlich für die Entstehung des immer seltener werdenden distalen Magenkarzinoms spielt, neben bestimmten Umweltfaktoren, auch eine genetische Prädisposition eine Rolle. Erkennbar wurde dies an der Assoziation mit der Blutgruppe A und an der familiären Häufung, besonders Verwandte ersten Grades haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln.

Im Gegensatz zu den distalen Magenkarzinomen nimmt die Zahl der Karzinome des proximalen Magens (Kardia und gastroösophagealer Übergang) zu. In Bezug auf die Ätiologie ist ein Zusammenhang mit Alkohol – und Nikotinkonsum und der steigenden Zahl an Barrett-Ösophagus-Erkrankungen sehr wahrscheinlich.

Bestimmte auslösende Umweltfaktoren, wie die Ernährung mit einem übermäßigen Verzehr von Salz, Kohlenhydraten und Nitraten (aus denen sich im Magen Nitrosamine bilden können) und verminderter Zufuhr von frischem Gemüse und Obst, sowie Alkohol- und Nikotinkonsum, werden diskutiert.

Viele Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten, dass auch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* in der Ätiologie des Magenkarzinoms von Bedeutung ist. (Ernst und Gold, 1999)

Auch bestimmte pathologische Organveränderungen des Magens begünstigen eine maligne Transformation zum Magenkarzinom. So sind hierbei die chronisch atrophische Gastritis Typ B und Typ A aufzuführen, die Riesenfaltengastritis (M. Ménétrier), sowie der Zustand nach Magenresektion, besonders nach Billroth II.

Die Tumorlokalisation im Magen ist unterschiedlich ausgeprägt : so befinden sich 31% der Karzinome im oberen, 14% im mittleren und 26% im unteren Drittel.

Etwa zwei Drittel der Magenkarzinome haben zum Zeitpunkt der Operation bereits die Serosa (viszerales Peritoneum) infiltriert bzw. penetriert. Die Lymphdrainage der Magenwand erfolgt durch ein dichtes Gefäßnetz, welches an der Magenoberfläche subserös läuft. Da die Lymphgefäße auch in großer Zahl bis in die Submucosa reichen, erklärt sich die relativ hohe lymphogene Metastasierungsrate des Magenfrühkarzinoms in die Nachbarorgane wie Leber, Milz, Pankreas, Colon transversum, Netz, Zwerchfell, Bauchwand und in bis zu 20% in das Duodenum. Über den Ductus thoracicus können Tumorzellen ebenfalls in den pulmonalen Kreislauf eingeschwemmt werden und in Lunge und Pleura Metastasen bilden.

Neben der frühzeitigen Metastasierung tragen auch die sehr unspezifischen Symptome, welche meist erst im fortgeschrittenen Stadium auftreten, zu einer späten Diagnostik, Therapie und letztendlich schlechten Prognose bei.

Zu den uncharakteristischen Symptomen gehören Oberbauchbeschwerden wie Appetitlosigkeit, Völlegefühl, Erbrechen, epigastrische Schmerzen, Leistungsschwäche und Gewichtsverlust.

Das einzige kurative Therapieprinzip des Magenkarzinoms bisher ist die operative Therapie. Doch auch dann ist nicht immer eine R0-Resektion gewährleistet, besonders wenn das Karzinom erst im bereits fortgeschrittenem Zustand diagnostiziert wurde. Die Tatsache, dass zwei Drittel aller Patienten bei Erstdiagnose bereits ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium und / oder Fernmetastasen vorliegen, macht deutlich, wie notwendig eine effektive Systemtherapie ist.

Bei gutem Allgemeinzustand des Patienten wird heute eine neoadjuvante Chemotherapie diskutiert. Da die Rezidivrate nach einer R0-Resektion sehr hoch ist, und bereits im Stadium II mindestens 50% beträgt, wurde in einer amerikanischen Studie (Macdonald et al. 2001) die Wirksamkeit einer adjuvanten kombinierten Radiochemotherapie erfolgreich nachgewiesen. Es zeigte sich ein signifikanter Vorteil für die Patienten bezüglich des progressionsfreien Intervalls als auch des Gesamtüberlebens. Allerdings ist der Nutzen dieser postoperativen Chemotherapie für R1- Resektionen noch nicht belegt.

Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie, dessen Wirkung auf die Lebenszeitverlängerung und Symptomreduktion nachgewiesen ist.

Betrachtet man allerdings die Prognose, welche stadienabhängig ist, so macht dies deutlich, wie wichtig zum einen die Früherkennung z.B. mittels Endoskopie ist und zum anderen, wie wichtig eine effektive Therapie ist.

So beträgt die 5-Jahresüberlebensrate im Stadium I zwar noch 70-80 %, im Stadium II allerdings nur noch 40-50%, im Stadium III 20-40 % und im Stadium IV nicht mal mehr 5%.

Ist bei einem lokal fortgeschrittenen Tumor keine R0-Resektion mehr möglich oder liegen Fernmetastasen vor, so beträgt die mediane Überlebensrate ohne Chemotherapie 4-6 Monate.

1.4. Das Pankreaskarzinom

Die bösartigen Neubildungen des Pankreas sind mit Anteilen von rund 5% nach dem Magenkarzinom auf Platz fünf der tumorbedingten Todesursachen mit einer Mortalitätsrate von 8,3 / 100 000 bei Männern und 5,7 / 100 000 bei Frauen (DKFZ Heidelberg, Krebstodesursachen 2002).Weltweit versterben etwa 150 000 Patienten pro Jahr. Der Altersgipfel dieser Krebserkrankung liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr, wobei Männer im Verhältnis 3:2 häufiger betroffen sind als Frauen.

Die Inzidenz des Pankreaskarzinom ist steigend – in den westlichen Industrienationen werden Inzidenzraten von 3-18 Neuerkrankungen pro Jahr angegeben.

Ätiologisch bedeutsame Faktoren , die zur Entstehung des Pankreaskarzinom beitragen, sind die chronische Pankreatitis, die hereditäre Pankreatitis, Diabetes Mellitus, Zigaretten – und Alkoholkonsum. 30-50 % aller Fälle bei Männern sowie 15-20% der Erkrankungsfälle bei Frauen sind dem Rauchen zuzuschreiben (La Vecchia et al. 1991).

Auch scheint hierbei die Ernährung eine Rolle zu spielen. So beschrieb Block et al. 1992 in 12 durchgeführten Studien eine dreifache Risikoerhöhung bei einem geringen Konsum von Gemüse und Früchten.

Die klinischen Symptome des Pankreaskarzinoms sind uncharakteristisch, was wiederum, wie beim Magenkarzinom, die Diagnostik und damit die frühzeitige Therapie erschwert.

Die Patienten klagen zunächst über unspezifische Oberbauchbeschwerden, Appetitlosigkeit und fortschreitenden Gewichtsverlust.

Symptome wie Ikterus, Fettstühle und Schmerzen sind schon den Spätsymptomen bei fortgeschrittenem Tumor zuzuschreiben, wobei dann meist schon mehr als die Hälfte aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen haben.

Die Metastasierung erfolgt sehr früh lymphogen und hämatogen in regionäre Lymphknoten, Leber und Peritoneum, sowie Magen, Duodenum und Dünndarm.

Die operative Resektion ist die einzige Möglichkeit der kurativen Therapie. Allerdings sind nur etwa 10-30 % aller Patienten für eine Resektion geeignet, da, wie oben bereits erwähnt, zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ausgedehnte Tumore und Metastasen vorliegen.

Vor und nach der operativen Entfernung des Tumors kann eine Chemotherapie und / oder kombinierte Radio- / Chemotherapie eingesetzt werden, wobei diese Art der Therapie vornehmlich in der palliativen Therapie eingesetzt wird.

Insbesondere wenn ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt, ist die Prognose ausgesprochen schlecht. Ohne Resektion liegt die 5-Jahresüberlebensrate nahezu bei 0% und die Überlebenszeit beträgt etwa 6-9 Monate. Nach einer Radikaloperation beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 30% .

Das macht deutlich, wie wenig effektive Behandlungsmethoden es bei diesem Karzinom gibt und wie wichtig Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet sind, um die sehr schlechte Prognose vielleicht irgendwann einmal deutlich bessern zu können.

1.5. Problematik der Chemoresistenz

Die Chemoresistenz der Tumorzellen gilt als der Hauptgrund für das Nichtansprechen der chemotherapeutischen Behandlung vieler Tumore. Obwohl Kombinationen verschiedener Therapeutika eine signifikante Wirkung auf diverse Malignitäten wie Hodentumore oder Hodgkin-Lymphome haben, so sind doch die Mehrzahl der Tumore entweder initial resistent, wie z.B. das Kolonkarzinom, oder sie sind initial sensibel und entwickeln dann eine Resistenz auf die fortwährende Behandlung, wie z.B. das Mammakarzinom (Goldstein L.J. 1995). Somit stellt dies ein großes Hindernis für die erfolgreiche Behandlung verschiedenster Tumore dar und umfasst ein wichtiges Thema in zahlreichen Studien und Untersuchungen, welche das Ziel verfolgen, molekulare Mechanismen zur Überwindung der Chemoresistenz in Tumorzellen zu identifizieren.

So sind z.B. relevante Mechanismen, welche zur Zellresistenz beitragen, der Anstieg bestimmter Abwehrfaktoren, welche die intrazelluläre Medikamentenkonzentration reduzieren. Auch kommt es zu Veränderungen an den zellulären Bindungsstellen der Chemotherapeutika oder zunehmender Fähigkeit der Tumorzellen, DNA-Schäden zu reparieren bzw. stärkere Stresssituationen zu tolerieren (Gatti L., Zunino F., 2005).

Somit wird deutlich, dass eine Vielzahl verschiedener Tumore über eine gewisse Zeit genetische Veränderungen durchmachen, die zu einer Resistenz gegenüber einem oder multiplen Chemotherapeutika führen.

Da in zahlreichen Studien die Wirksamkeit des 2-ME gegenüber nativen Tumorzellen mehrfach bewiesen wurde, so ist es nun das Ziel, die Wirksamkeit gegenüber multiresistenten Tumorzellen zu untersuchen, um so eventuell eine Möglichkeit aufzuzeigen, die klinischen Grenzen der Chemoresistenz zu überwinden.

1.6. Einfluss der Östrogene auf das Tumorwachstum

Die Östrogene werden sowohl in der Nebenniere, in Synzytiotrophoblasten, in den Thekaluteinzellen des sprungreifen Follikels und in den Granulosaluteinzellen des Corpus luteum gebildet, als auch in kleinen Anteilen in den Leydigzellen des Mannes.

Von den natürlichen Östrogenen hat Östradiol die größte biologische Wirksamkeit.

Die Induktion der Zellen durch die Hormone erfolgt über eine Bindung an spezifische Östrogenrezeptoren, sowie die Überführung des Komplexes in den Zellkern, die Bindung an die DNA und die Beeinflussung der Transkription spezifischer Gene.

Zahlreiche epidemiologische und zellbiologische Studien haben gezeigt, dass Östrogene Einfluss auf die Entwicklung von drei Krebsarten haben: Brustkrebs, welcher auf Platz eins der Krebstodesursachenstatistik für Frauen 2002 rangiert (Krebstodesursachen 2002, DKFZ Heidelberg), Ovarialkrebs, auf Platz 4 der Krebstodesursachenstatistik und das Uteruskarzinom auf Platz 10.

Östrogene und Testosteron haben ebenfalls Einfluss auf das Prostatakarzinom beim Mann.

Besonders längere Exposition hoher Werte des Östrogens sind ein Hauptrisikofaktor.

So steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken bei Frauen mit einem frühzeitigen Einsetzen der Menarche und einer späten Menopause an. Toniolo et al. zeigte in einer prospektiven Studie, dass Frauen, bei denen hohe Plasmawerte von Östradiol festgestellt wurden, fünf oder mehr Jahre später an Brustkrebs erkrankten. Es wurden auch viele Studien durchgeführt, um zu zeigen, dass bei einer Östrogensatztherapie während der Menopause nach 5-10 Jahren das relative Risiko, an Mammakarzinom zu erkranken, um 30 % steigt.

Die karzinominduzierenden Eigenschaften der endogenen bzw. exogenen Östrogene beruhen zum einen auf der starken östrogenrezeptorabhängigen Stimulation des Zellwachstums.

Mit zunehmender Zellproliferation nimmt die Zahl der Zellteilungen zu und somit verkürzt sich die Zeit, um mögliche Fehler und genomische Schäden der DNA während der Replikation zu reparieren.

Auf der anderen Seite werden die Östrogene in weitere Metaboliten umgewandelt, welche genotoxisch wirksam sein können. Diese beiden Aspekte der DNA-Schädigung schließen sich nicht aus, sondern wirken synergistisch bzw. additiv.

1.7. Metabolisierung des Östrogens

Obwohl die östrogeninduzierte Zellproliferation unzweifelhaft eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt, ist die Umwandlung der Östrogene in genotoxische Substanzen ebenso bedeutsam und hat in den letzten Jahren noch mehr an Aufmerksamkeit und Wichtigkeit gewonnen.

Die Metabolisierung des Östradiols erfolgt zunächst in drei Hauptkomponenten : das 16- α -hydroxyöstron, das 2-Hydroxyöstron und das 4-Hydroxyöstron – auch Catecholöstrogene genannt.

In der Leber wird das Östradiol zu 80-85% über die 2-Hydroxylase in 2-Hydroxyöstron umgewandelt und, wegen der Unspezifität des Enzyms, zu 15-20% in 4-Hydroxyöstron.

Aber 1996 entdeckte Sutter T. ein Enzym, CYP-P450/1B1, welches die Umwandlung von Östradiol in 4-Hydroxyöstron spezifisch katalysiert. Tatsächlich kommt dieses Enzym reichlich in Brustgewebe vor, ebenso in Uterus- und Ovarialgewebe.

In vielen Tiermodellen, so z.B. Liehr et al. an einem Syrian Hamster, konnte gezeigt werden, dass 4-Hydroxyöstron genauso karzinogen ist wie das Östradiol, während aber Tiere unter der Behandlung mit 2-Hydroxyöstron keinerlei Tumore entwickelten.

Doch nicht nur das 4-Hydroxyöstron führt zur Schädigung der DNA. Zahlreiche Enzyme können das 4-Hydroxyöstron in zwei Komponenten umwandeln, das 3,4-Semiquinone und das 4,3-Quinone. Beide Substanzen stehen über Redoxreaktionen im Gleichgewicht. Sie haben die Fähigkeit an die DNA zu binden und so zwei Basen, Adenin und Guanin, zu entfernen. Dies birgt ein hohes Risiko für eine Genmutation, und kann so zu Krebs führen. Ebenso entstehen bei der Umwandlung von Semiquinonen zu Quinone freie Sauerstoffradikale, die ebenso zu einer Schädigung der DNA führen können.

Doch es gibt auch einen anderen Weg, die die Metabolisierung des Östrogens einschlägt. Wie bereits erwähnt entsteht ebenfalls über die 2-Hydroxylase das 2-Hydroxyöstron, welches nicht zur Entstehung von Tumoren beiträgt.

Durch ein Enzym, die Catechol-O- Methyltransferase, entsteht aus dem 2-Hydroxyöstron die 2/4-Methoxyöstradiole. Durch das Einfügen der Methylgruppe verlieren die Metaboliten ihre Fähigkeit, sich in DNA-schädigende Substanzen wie die Quinone und Semiquinone umzuwandeln und es kommt auch nicht zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen.

Ganz im Gegenteil – die 2/4- Methoxyöstradiole hemmen sogar die Zellproliferation, die Tumorangio-genese und führen über verschiedene Mechanismen zur Apoptose von Tumorzellen.

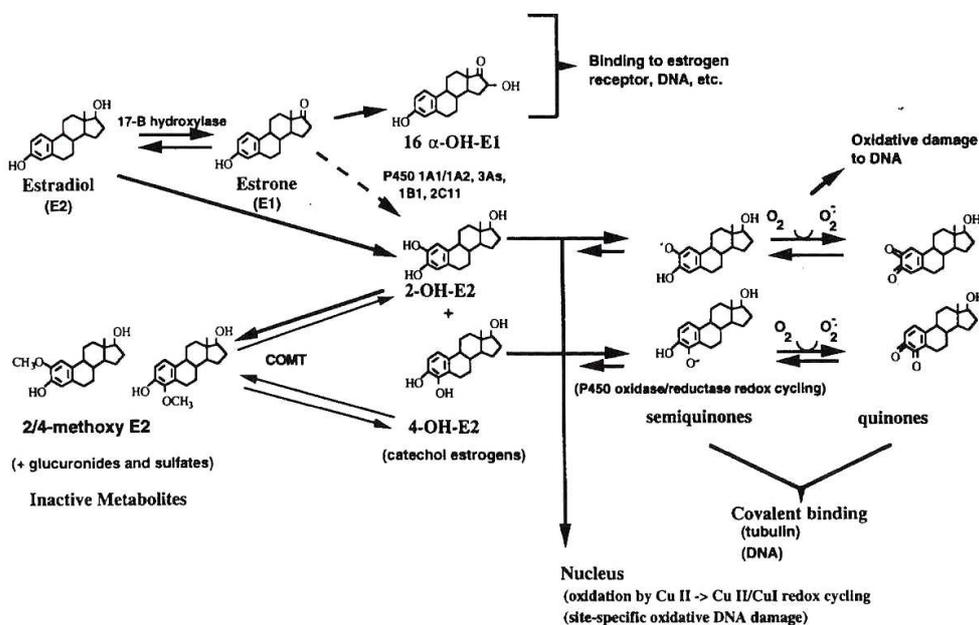


Abb.2: Wege der Metabolisierung von Östradiol und Östron ; Yager & Zurlo (154), Annual Reviews

1.8. Wirkung des 2-ME auf das Tumorwachstum

Das endogene 2-ME wird hauptsächlich in der Leber durch Hydroxilierung des Östradiols an Position 2 und dann durch O-Methylierung mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase synthetisiert. Die Catechol-O-Methyltransferase ist ein Enzym, welches in vielen Organen, wie die Leber, die Niere, das Gehirn, die Plazenta, der Uterus und die Brustdrüsen, vorkommt (Amin 1983).

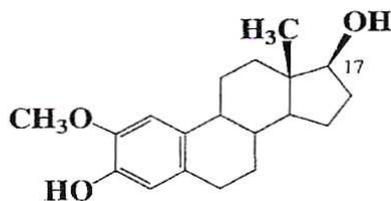


Abb. 3: Struktur des 2-Methoxyestradiol

Im Blutkreislauf bindet es bevorzugt an das sexualhormonbindende Globulin, mit einer viel höheren Affinität als Testosteron oder Östradiol. Die Plasmakonzentrationen des 2-ME können stark schwanken: von 10,3 pg/ml bei Männern bis zu 3768 pg/ml bei schwangeren Frauen (Berg 1983). Physiologisch wird das 2-ME im Urin ausgeschieden (Gelbke 1976).

Während der letzten 10 Jahre rückte das 2-ME als ein Hormon, welches das Tumorwachstum zu hemmen vermag, immer mehr in den Vordergrund.

Es wurden bisher zahlreiche Studien durchgeführt und das bemerkenswerte Ergebnis ist unter anderem, dass das 2-ME das Tumorwachstum von einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen hemmt und das sich die dafür erforderlichen Dosen um einen sehr engen IC₅₀ – Wert bewegen. Auffallend war auch, dass die Zielzellen des 2-ME nur aktiv proliferierende Zellen waren und keine „normalen“ Gewebszellen (Schumacher et al. 2000).

Beispielsweise wurde in vielen Studien die hohe Sensibilität von Brustkrebs auf 2-ME nachgewiesen (Klauber 1997; Seegers 1989; Lottering 1992; Cushman 1995; Zhu 1998; Zoubine 1999; Amorino 2000). Schumacher et al. wies 1999 die Wirkung von 2-ME auf

Pankreastumorzellen nach und nach 2000 die Hemmung des Zellwachstums im Hepatozellulären Karzinom von über 90% mit einer Dosis von nur 1,5 μM 2-ME.

Diese Daten begründen die signifikant niedrigere Inzidenz des Hepatozellulären Karzinom bei Frauen als bei Männern, bedingt durch den erhöhten Östrogenmetabolismus in der Leber bei Frauen und somit eine vermehrte Entstehung von Substanzen wie das 2-ME.

Dabei hängt die antiproliferierende und apoptotische Aktivität nicht von Östrogenrezeptoren ab – die Affinität des 2-ME an Östrogenrezeptoren α und β zu binden beträgt weniger als 0,5% und damit nur 0,008 % der Affinität des Östradiols.

Doch wie kommt es zu dem tumorhemmenden Effekt von 2-ME ? Die gesamten molekularen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Doch klar ist, dass 2-ME einen starken antiangiogenetischen Effekt hat – es hemmt die Proliferation, Migration und Invasion von Endothelzellen, es kann effektiv die Angiogenese in verschiedenen Stadien der Gefäßbildung zerstören, es induziert den programmierten Zelltod in den Endothelzellen und Tumorzellen und es wirkt nur auf proliferierende Endothelzellen und Tumorzellen.

Da die Angiogenese ein entscheidender Schritt für das Tumorwachstum ist, kommt es folglich durch Hemmung dieser zur Hemmung des Tumorwachstums.

2-ME wird klassifiziert als ein direkter und indirekter Angiogeneseinhibitor. Direkt wegen seines antiproliferierenden und proapoptischen Effektes auf proliferierende Endothelzellen und indirekt, weil es die Expression des sogenannten HIF-1 α hemmt. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription von verschiedenen angiogenesestimulierenden Proteinen, allen voran VEGF (vascular endothelial growth factor), stimuliert. Doch es werden auch andere Gene von HIF-1 α beeinflusst. Über 60 wurden bisher davon identifiziert, welche die Zellproliferation, das Zellüberleben, die Medikamentenresistenz der Zellen und die Zellinvasion und somit die Metastasenbildung betreffen (Semenza 2003).

Somit spielt HIF-1 α eine Rolle in verschiedenen entscheidenden Ereignissen der Krebsentwicklung und ist deshalb ein vielversprechendes therapeutisches Ziel. Semenza (2003) stellte sogar einen Zusammenhang bei einigen Krebsarten her, zwischen einem erhöhten HIF-1 α -Wert und einer daraus folgenden erhöhten Mortalität.

Eine Möglichkeit der HIF-1 α -Hemmung erfolgt über die 2-ME induzierte Mikrotubuli-Depolymerisation (Mabweesh et al., 2003). Mikrotubuli sind die Bestandteile der Spindelapparate, welche notwendig sind, während der Mitose die geteilten Chromosomen auf die

Pole zu verteilen. Durch Bindung an die Colchicine-binding-site erfolgt die Hemmung der Polymerisation der Tubuli. In einem Brustkrebsmodell wurde die Wirksamkeit von 2-ME auf die Mikrotubuli-Depolymerisation in vivo und in therapeutischen Dosen untersucht. Das Ergebnis waren deformierte Spindelapparate in Tumorzellen und in Endothelzellen (Mabweesh et al., 2003). Doch der Signalweg, welcher über die Mikrotubuli-Depolymerisation zur HIF-1 α -Hemmung führt, ist noch unbekannt.

Fest steht aber, dass die Fähigkeit des 2-ME, die Mikrotubuli zu schädigen, eine wichtige Rolle in der Antiangiogenese und Tumorchemmung spielt.

Ein sehr bedeutender Effekt des 2-ME auf Endothel- und Tumorzellen ist die Verwicklung in die Aktivierung der Apoptosekaskade. Dabei beeinflusst es sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg .

Der extrinsische Weg wird initiiert durch die Aktivierung eines Zelloberflächenrezeptors (Fulda & Debatin, 2003). In vielen Tumorzellen und Endothelzellen führt 2-ME zu einer verstärkten Expression des Death-receptor 5 (DR5), ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Death-receptor-Familie (La Vallee et al., 2003). Hierfür sind in vitro, als auch in vivo nur sehr niedrige, therapeutische Konzentrationen notwendig (La Vallee et al., 2003). Die Aktivierung dieser extrazellulären Domäne führt über Aktivierung verschiedener Liganden und eines Signalweges zur intrazellulären Aktivierung der Caspase 8 (Kim et al., 2001). Die Caspase 8 Aktivierung leitet die Caspasekaskade ein, was zur Caspase 9 Aktivierung führt, welche wiederum die Aktivierung der Caspase 3 initiiert. Caspase 3 ist eine Protease, welche in der Ausführung der Apoptose involviert ist, wo Zellen morphologische Veränderungen, wie DNA-Fragmentation oder Chromatinkondensation, durchlaufen (Porter & Janicke, 1999, Zou, 1999). Doch 2-ME beeinflusst nicht nur den extrinsischen Weg, sondern auch den intrinsischen Apoptoseweg. Nur geringe Konzentrationen an 2-ME führen in verschiedenen Tumorzellen, wie myeloische Zellen, Brust-, Prostata-, Colorektal- und Leberzellen, zur Aktivierung der sogenannten c-Jun NH₂ – terminal Kinase (JNK) (Chauhan et al., 2003). Der JNK – Aktivierung folgt ein wichtiger Apoptosesignalweg. 2-ME führt zur Phosphorylierung und Translokation der JNK ins Mitochondrium. Das initiiert eine erhöhte Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran, wodurch zwei Schlüsselmodulatoren der Apoptose freigesetzt werden – das Cytochrom c und ein Caspaseaktivator (Smac) (Chauhan et al., 2003). Experimentell wurde in multiplen myeloischen Zellen die JNK-Aktivierung verhindert, was zur Folge hatte, dass die Fähigkeit des 2-ME, die Apoptose zu induzieren ebenfalls stark gehemmt

wurde. Das macht deutlich, dass gerade in multiplen myeloischen Zellen die Apoptoseinitiierung über einen JNK-abhängigen Weg geschieht (Chauhan et al., 2003).

Intrazellulär führt die Aktivierung von JNK auch zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Apoptoseinhibitors Bcl-2. Dies geschieht in vielen Zelltypen als Antwort auf eine 2-ME-Applikation (Bu et al., 2002, Quanungo et al., 2002, Basu & Haldar, 2003, Shimada et al., 2003, Tinley et al., 2003).

Das macht deutlich, dass die Aktivierung von JNK wichtig für die apoptotische Wirkung von 2-ME ist.

Die genaue Identifizierung der verschiedenen Signalwege und Zusammenhänge der 2-ME induzierten Mechanismen müssen noch geklärt werden und es bleiben immer noch viele Fragen offen.

Auch der Einfluss des 2-ME auf p53, ein Tumorsuppressorgen, welches die Apoptose induzieren und Zellen in einen Zellarrest zur DNA-Reparatur überführen kann, wurde in vielen Studien untersucht. So wurde zum einen berichtet, dass 2-ME zu einer gesteigerten Expression von p53 und damit zu einem resultierenden programmierten Zelltod führt.

Auf der anderen Seite kann 2-ME in verschiedenen Tumorzelllinien den Zellzyklusarrest und die Apoptose unabhängig von p53 induzieren.

Andere Studien lassen darauf schließen, dass 2-ME einen protektiven Effekt in Anwesenheit von Östrogenen hat. Dawling et al. (2003) fand heraus, dass 2-ME konzentrationsabhängig die Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 hemmt, welche die Umwandlung von Östradiol zu 2- und 4-Hydroxyöstradiol katalysieren. Durch Hemmung dieser CYP450 – Enzyme in und außerhalb der Leber wird der Metabolismus von Östradiol in reaktive, schädigende Metaboliten begrenzt und hat somit einen protektiven Effekt in Bezug auf diesen Signalweg und mögliche andere, karzinogene CYP450 abhängige Reaktionswege.

Bisherige durchgeführte Studien zeigen in therapeutisch verwendeten Dosen von 2-ME keine Toxizität. Im Gegensatz zur Toxizität, welche normalerweise mit Chemotherapie assoziiert ist, liegen bei 2-ME keine Ergebnisse in Bezug auf Haarausfall, gastrointestinale Nebenwirkungen oder Leukozytenreduktion im Knochenmark vor. Ein leichter Abfall der B-Lymphozytenzahl in der Milz wurde nach 34 tägiger, kontinuierlich subcutaner Behandlungsdauer von 2-3 mg 2-ME beobachtet, obwohl die CD4+ und CD8+ Zellen unbeeinträchtigt waren (Josefsson E., Tarkowski A., 1997). In einigen Studien wurde auch ein signifikanter, durch 2-ME induzierter Abfall von Cholesterol im Plasma nachgewiesen (Liu D., Bachmann KA, 1998, Turner RT.,Evans GL., 2000).

In einigen Modellen war Körpergewichtsverlust eine inkonsequente Nebenwirkung gewesen, doch andere Zeichen für klinische Toxizität konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

2. Zielsetzung

Aufbauend auf den Ergebnissen der Experimente vieler verschiedener Tumorzellarten, die aus der Literatur bekannt sind, sollte gezeigt werden, dass das Wirkspektrum auf weitere solide Tumoren, das Pankreas – und Magenkarzinom, ausdehnbar ist. Bei den Untersuchungen zum Pankreas- und Magenkarzinom zeigten Vorarbeiten bereits eine tumorhemmende Wirkung durch 2-Methoxyestradiol, so dass eine andere Fragestellung primär verfolgt wurde. Hier sollte untersucht werden, inwieweit sich diese tumorhemmende Wirkung des 2-ME auf multiresistente Tumorzellen des Pankreas- und Magenkarzinoms übertragen lässt. Somit soll aufgezeigt werden, ob 2-ME in der Lage ist, diese Resistenz zu überwinden.

Zur besseren Vergleichbarkeit sollten sowohl native, chemosensible Tumorzelllinien, als auch chemoresistente Tumorzelllinien verwendet werden. Die Chemoresistenz spielt eine zunehmende Rolle in der Behandlung verschiedener Tumorarten. Insbesondere bei Rezidiven steigt die Resistenz vieler Tumore gegen die gängigsten Zytostatika. Dies schränkt die ohnehin begrenzten Behandlungsmöglichkeiten weiter ein. Die Untersuchung dieser Fragestellung und die Schaffung einer Grundlage für weitere präklinische und klinische Experimente hat somit eine große Bedeutung für die klinische Situation.

Eine entscheidende Rolle bei den Untersuchungen zu den Mechanismen spielt die Induktion der Apoptose. Stark tumorhemmende Substanzen wirken über diesen Mechanismus, der mit verschiedenen Techniken nachgewiesen werden kann.

Diese Arbeit soll als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, um 2-Methoxyestradiol dem klinischen Einsatz beim Pankreas- und Magenkarzinom näher zu bringen.

Denn sowohl für das Pankreaskarzinom, als auch das Magenkarzinom gibt es sehr begrenzte Therapieoptionen. Werden die Tumore in sehr frühen Stadien entdeckt, besteht die Möglichkeit einer kurativen Therapie mittels chirurgischer Resektion. Doch für fortgeschrittene Stadien, in den die meisten der Pankreas- und Magenkarzinome entdeckt werden, gibt es keine lebensverlängernde Therapie.

Daher besteht der Bedarf nach neuen Chemotherapeutika, vor allem solche, die die Grenzen, welche durch die Entwicklung der Chemoresistenz gesetzt werden, überschreiten.

Nach diesen Untersuchungen sollten die Möglichkeiten der Behandlung anderer multiresistenter Tumorzelllinien in Betracht gezogen werden, ebenso weitere Therapiemöglichkeiten etwa wie die Kombination verschiedener Zytostatika mit 2-ME oder die Kombination von 2-ME mit einer chirurgischen Resektion.

Erweisen sich die Proliferationsinhibition auf die Tumorzellen nach Behandlung mit 2-Methoxyestradiol in vitro als erfolgversprechend, müssen vor einer eventuellen Anwendung am Menschen weitere Versuche mit ähnlichen Fragestellungen in vivo an verschiedenen Tierarten durchgeführt werden.

Nach diesen Untersuchungen sollen klinische Studien geplant und durchgeführt werden, wie sie zum Teil in den USA bereits aktuell sind.

Eignet sich der Östrogenmetabolit 2-Methoxyestradiol zur Überwindung der Resistenzmechanismen und damit zur Behandlung multiresistenter Pankreas- und Magenkarzinomzellen ?

Diese Fragestellung erschien uns sinnvoll, um so möglicherweise die Grundlage einer neuen Therapieoption in der Behandlung von humanen Pankreas- und Magenkarzinomen zu schaffen.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Die Experimente wurden mit zwei Tumorzelllinien, 181 , Pankreaskarzinomzellen und 257 , Magenkarzinomzellen , durchgeführt .

Bei den Zelllinien werden jeweils parenterale chemosensible Tumorzellen , 181 P und 257 P, von multiresistenten Tumorzellen , 181 RNOV + 181 RDB und 257 RNOV + 257 RDB unterschieden , welche zu jeder Zeit identisch behandelt wurden. Dabei werden zwei Klone unterschieden. Zum einen die mdr-1 positiven chemoresistenten Klone 181 RDB und 257 RDB und die mdr-1 negativen resistenten Klone 181 RNOV und 257 RNOV.

Alle Pankreas – und Magenkarzinomzelllinien wurden als subkonfluente adhärenente Monolayerkulturen in einem Medium (“Minimum Essential Amino Acid Medium” with Earle’s Salts without L-Glutamine, 500 ml, Cat.-Nr. 21090-022 von GibcoBRL) mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (Foetal Bovine Serum Dialysed, 500 ml, Cat.-Nr. 10110-161 von GibcoBRL) , 1% Penicillin-Streptomycin (10000 IU/ML – 10000 UG/ML, 100 ml, Cat.-Nr. 15140114 von GibcoBRL), um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, 1% L-Glutamin (200 MM, 100x, 100 ml, Cat.-Nr. 25030-024 von GibcoBRL), 1% Sodumpyruvat (MEM 100 MM, 100 ml, Cat.-Nr. 11360-039 von GibcoBRL) und von 1% nicht essentiellen Aminosäuren (Non-essential Amino Acids, MEM, 100x, 100 ml, Cat.-Nr. 11140-035 von GibcoBRL) in einem Heraeus-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, und 95% O₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen (250 ml, Cat.-Nr. 3111 von Falcon) gehalten.

Die Zellen wurden alle 3 – 4 Tage passagiert : nach Absaugen des Mediums erfolgte die Zugabe von 2 ml 0,25% Trypsin (prepared in Gibco Sol. A, 1:250, 1x, 100 ml, Cat.-Nr. 25050-014 von GibcoBRL) , um durch vorsichtiges Schwanken der Zellkulturflasche die Zellen zu waschen . Nach nochmaligem Absaugen erfolgte die Zugabe von 3 ml 0,25 % Trypsin , um die Zellen nach kurzer Inkubation im Brutschrank vom Flachengrund enzymatisch abzulösen.

Die Trypsin-Zell-Suspension wurde in 15 ml bzw. 50 ml Kulturröhrchen (Cat.-Nr. 2095 bzw. 2070 von Falcon) gefüllt und für das jeweilige Experiment mittels einer Zählkammer nach Neubauer unter einem Durchlichtmikroskop von Olympus gezählt und in der gewünschten

Anzahl kultiviert. Durch Zugabe von 15 ml Medium in die Zellkulturflaschen wurde das restliche Trypsin inaktiviert.

Für alle Experimente wurden 1µl – 1000µl Finnpipetten der Fa. Eppendorf sowie 5 ml -, 10 ml – und 25 ml- Pipetten (serological pipet, Cat.-Nr. 7543, 7551, 7525 von Falcon) benutzt.

3.2. Proliferationsanalyse

3.2.1. Aussaat der Zellen

Zur Untersuchung der Proliferation der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des 2-ME wurden jeweils 4 Proliferationsassays durchgeführt.

Am Tag 1 wurden die Zellen der Zelllinie 181 P, 181 RNOV, 181 RDB und 257P, 257 RNOV, 257 RDB trypsiniert, in 50 ml Kulturröhrchen überführt, vorsichtig vereinzelt und nach Zugabe von 10 ml Medium mittels der Zählkammer nach Neubauer unter dem Durchlichtmikroskop gezählt. Zur Aussaat der Zellen wurden 96-well-Platten verwendet. Nach Berechnung wurden dann pro Well 500 Zellen der Zelllinien 181P + 257 P und 750 Zellen der Zelllinien 181 RNOV, 181 RDB, 257 RNOV und 257 RDB in je 100 µl Medium / Well ausgesetzt.

Für 48 h bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Inkubation der Zellen.

3.2.2. Behandlung der Zellen

Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen. Es werden je 6 wells pro Behandlungsgruppe verwendet. 16-E, ein unwirksamer Östrogenmetabolit, dient als Kontrollöstrogen.

Der Konzentrationsanstieg wurde wie folgt durchgeführt: 0,003 µM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM und 10 µM.

Für beide Substanzen wurde separate Platten verwendet.

Zum anderen wurde die humane Pankreaskarzinomzelllinie 181 P (sensibel), 181 RDB (mdr-1 positiv) und 181 RNOV (mdr-1 negativ) mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener bekannter Chemotherapeutika behandelt: Mitoxantrone, Daunorubicin, Etoposide, Teniposide, Amsacrine, Cisplatin, Paclitaxel und Vindesine.

3.2.3. Präparieren der Zellen

5 Tagen nach Behandlung wurde das Medium aus den Platten entfernt und die Zellen mit 200 µl eiskalter 10 % Trichloressigsäure für 1-2 h bei 4°C fixiert.

Danach wurde die 10% Trichloressigsäure entfernt, die Zellen mit Leitungswasser gewaschen und mit 100 µl 0,4%iger SRB-Lösung (0,4 % Sulphorhodamin B in 1% Essigsäure) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Zellen 5x mit 1% Essigsäure gewaschen und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet.

Nach 24 h wurde zu den gefärbten, getrockneten Zellen 300 µl 20mM Tris (pH=10) hinzugegeben und die Platten für 1-2 h geschüttelt, so dass sich die Zellen auflösen konnten.

Danach konnte die Extinktion bei 562 nm im EL-340 gemessen werden.

Aus den 4 durchgeführten Proliferationsassays wurde der Mittelwert gebildet und für die Auswertung verwendet.

3.3. FACS – Analyse

3.3.1. Aussaat der Zellen

Die Zellen der sechs Zelllinien wurden am Tag 1 vorsichtig trypsiniert, vereinzelt, nach Zugabe von 7 ml Medium mittels der Zählkammer nach Neubauer unter dem Durchlichtmikroskop gezählt und in 6-well-Platten mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 3ml Medium ausgesetzt.

Entsprechend der Behandlungsgruppen 2-ME, 16-E und der Kontrollsubstanz Medium, wurde pro Zelllinie eine 6-well-Platte benötigt.

Für 48 h bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Inkubation der Zellen.

Nach diesen 48 h wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 3ml frisches Medium hinzugefügt.

Danach wurden jeweils 2 Wells der 6-well-Platten einer Behandlungsgruppe zugeteilt und die Zellen jeder Zelllinie mit 2-ME und dem Kontrollöstrogen 16-E beimpft, in jeweils 2 Wells beließ man die 3ml Medium als Kontrollsubstanz. Die gewählten Konzentrationen für 2-ME und 16-E, mit denen die Zellen behandelt wurden, orientieren sich am Mittelwert der IC₅₀-Werte, entsprechend der Proliferationsanalysen, siehe 3.2., der jeweiligen Zelllinien.

So wurde für die Zelllinien 181 P, 181 RNOV, 181 RDB ein IC_{50} – Mittelwert von $0,7 \mu M$ und für die Zelllinien 257 P, 257 RNOV, 257 RDB ein IC_{50} – Mittelwert von $0,6 \mu M$ ermittelt. Die Platten wurden dann für weitere 48 bzw. 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.3.2. Präparieren der Zellen

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Ernte der Zellen enzymatisch mit 0,25% Trypsin. Nach vorsichtigem Ablösen der Zellen wurden diese zunächst zweimal mit jeweils 2 ml 1fach PBS gewaschen, zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge: 1000rpm für ca. 5 Min. bei RT) und der Überstand abgenommen. Dann erfolgte die Überführung des Pellet in ein 1,5 ml PCR-Reaktionsgefäß und die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 1 ml 70%igem Ethanol für mindestens 60 Minuten bei $4^{\circ}C$.

Danach wurden die Zellen erneut schonend zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge: 2000rpm für 5 Min. bei RT) , der Überstand abgenommen, mit 1fach PBS gewaschen und schließlich in jeweils 0,5 ml Dilution-Buffer (0,1% Triton X100, 0,5 % BSA in 1fach PBS), welcher 10 μ l RNase (Typ 1-A von Sigma, zuvor bis $100^{\circ}C$ erhitzt, um DNase zu inaktivieren) enthielt, resuspendiert.

Die Inkubation erfolgte erneut für 60 Minuten bei $37^{\circ}C$.

Dann wurde jeweils 0,5 ml einer Färbelösung, bestehend aus dem DNA-spezifischen Fluorochrom Propidiumjodid gelöst in Dilution-Buffer, hinzugegeben und die Zellen im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur Messung wurden die Zellen in Dunkelheit aufbewahrt.

Propidiumjodid gehört zu der Klasse der interkalierenden Fluorochrome, die sich periodisch zwischen die Basenpaare der DNA einfügen. Da sie sich auch in doppelsträngige RNA einlagern ist eine vorherige Behandlung mit RNase notwendig.

3.3.3. Zellzyklusanalyse

Die Analyse des Zellzyklus verschiedener Zellen mittels dem FACS-Gerät (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter ; FACScan / Becton Dickinson) beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie.

Die Zellen fließen einzeln durch eine dünne Messkammer, welche von einem Laser bestrahlt wird, und auf Grund des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid ist es möglich, die Fluoreszenz der Zellen zu messen.

Aus der Messung und der daraus folgenden Abbildung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zellen wird zum einen die Intensität der Anfärbung mit dem Kernfarbstoff wiedergegeben – dies entspricht der DNA-Menge und zum anderen die Anzahl der Zellen, welche sich zu dem Zeitpunkt in einer bestimmten Phase des Zellzyklus befinden.

Unter Zellzyklus werden die Vorgänge zwischen zwei Zellteilungen verstanden. Das heißt, wann immer sich eine Zelle vermehren will, muss sie den Zellzyklus durchlaufen, um ihre DNA zu verdoppeln und so die diploiden genetischen Informationen an die Tochterzellen weitergeben zu können.

Der Zellzyklus besteht dabei aus vier Schritten (siehe Abb.). In der G₀-Phase verbleiben ruhende Zellen, welche ihre spezifischen Funktionen erfüllen. Befindet sich die Zelle in der G₁-Phase, können äußere Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, den Zellteilungsprozeß induzieren. In der sogenannten S-Phase kommt es dann zur Replikation der DNA, wobei Fehler auftreten können, welche in der darauffolgenden G₂-Phase durch bestimmte Proteine erkannt und korrigiert werden, so dass eine Verteilung der verdoppelten DNA auf zwei entstandene Tochterzellen in der Mitose-Phase möglich ist.

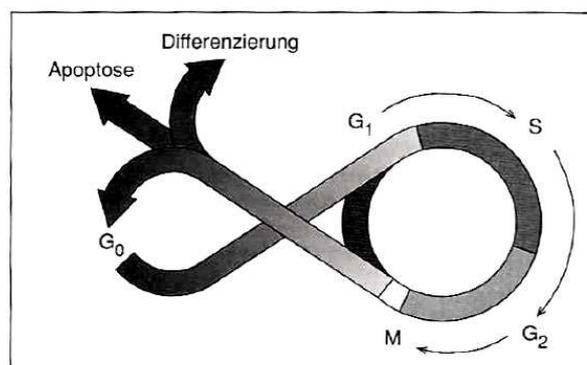


Abb. 4: Darstellung der einzelnen Zellzyklusphasen

(aus Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 3. Auflage, Verlag Urban & Fischer)

Da die Zellen nicht alle synchron den Zellzyklus durchlaufen, werden sie bei der Zellzyklusanalyse in unterschiedlichen Phasen angetroffen. Die meisten Zellen befinden sich in der G₁-Phase, weil diese zeitlich am längsten dauert, gefolgt von der etwas kürzeren S-Phase. Weniger Zellen befinden sich in der kurzen G₂-Phase und nur vereinzelte Zellen in der von allen am kürzesten Mitose-Phase.

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen wurde eine Zytometrie-Analyse am zweiten und dritten Tag nach der Behandlung mit 2-ME, 16-E und Medium als Kontrollsubstanz durchgeführt.

Es wurden pro Zelllinie 20.000 Zellen in einem Calibur flow cytometer von Becton-Dickinson (ausgestattet mit einem einzelnen 488-nm Argon-Ionenlaser und an einen Macintosh Quadra 650 Computer angeschlossen) analysiert. Die grüne Fluoreszenz (FITC) wurde durch einen 530/30-nm band-pass Filter, die rote Fluoreszenz (Propidiumjodid) durch einen 582/42-nm band-pass Filter gesammelt.

Somit konnte der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen bestimmt werden, in Abhängigkeit von der Zeit und der Substanz, mit der die Zellen behandelt wurden.

In den Graphiken ist der DNA-Gehalt auf der Abszisse aufgetragen und die Anzahl der Zellen auf der Ordinate. Mit „M1“ sind die Zellen bezeichnet, die nur wenig DNA enthalten, welches mit einer DNA-Fragmentation korreliert. Dieses ist ein charakteristisches Zeichen der Apoptose. Unter „M2“ sind die Zellen mit einem haploiden Chromosomensatz in der G₁- und beginnenden S-Phase zusammengefasst, worin sich die meisten gesunden Zellen befinden werden. Die übrigen Zellen weisen einen hohen DNA-Gehalt auf, sie haben die Synthesephase bereits durchlaufen und haben einen diploiden Chromosomensatz.

3.4. Nativaufnahmen der Zelllinien unter Behandlung

Nach dem Passagieren der Zellen wurde diese auf 6-well-Platten überführt, pro well 3 ml Medium hinzugefügt und bei 37°C für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, frisches Medium dazugegeben und die Zellen, entsprechend der IC₅₀ – Mittelwerte der Proliferationsanalyse, der Zelllinie 181 und 257 mit den Konzentrationen 0,7 µM und 0,6 µM beimpft.

Nach einer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 Stunden wurde das Medium erneut abgesaugt und durch 2 ml 1fach PBS ersetzt. Um nun die Veränderungen der Zellen nativ unter Behandlung nach 48 bzw. 72 Stunden darstellen zu können, wurden die Zellen unter dem Durchlichtmikroskop von Olympus mit integrierter Kamera betrachtet und Aufnahmen gemacht. Bereits bei dieser Betrachtung und ohne vorherige Anfärbung der Zellen konnten mikroskopisch gesunde von apoptotisch veränderten Zellen unterschieden werden.

3.5. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff

3.5.1. Aussaat der Zellen

Nach vorsichtigem passagieren der Zellen erfolgte die Zellzählung mittels der Zählkammer nach Neubauer unter dem Durchlichtmikroskop und das Aussetzen der Zellen auf sterile Deckgläschen in Kulturschalen in einer Menge von 10^4 Zellen pro Schale.

Pro Zelllinie wurden drei Schalen für die drei Behandlungsgruppen zugeteilt.

Nach Zugabe von 4 ml Medium erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank für 48 Stunden. Danach wurden die Zellen jeder Zelllinie mit 2-ME und 16-E beimpft und in einer Kulturschale wurde das Medium als Kontrollgruppe belassen. Die Konzentration von 2-ME und 16-E orientierte sich ebenfalls, wie in 3.3.1. beschrieben, an den IC_{50} – Mittelwerten entsprechend der Proliferationsanalyse. So wurde für die Zellen der Zelllinie 181 eine Konzentration von 0,7 μ M für 2-ME und 16-E gewählt und für die Zellen der Zelllinie 257 eine Konzentration von 0,6 μ M. Nach Beimpfung der Zellen erfolgte erneut die Inkubation für jeweils 48 bzw. 72 Stunden.

3.5.2. Präparieren der Zellen

Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und ca. 20 Tropfen einer Fixierlösung, bestehend aus 5 ml reiner Essigsäure und 15 ml absoluten Methanols, hinzugefügt. Nach ca. 2 Minuten wurde die Lösung abgesaugt und erneut 3 ml für 5 bis 10 Minuten dieser Fixierlösung hinzugefügt. Danach wurde die Lösung abgesaugt, die Deckgläschen vorsichtig aus

den Kulturschalen entfernt und die Zellen bei aufrechter Lagerung der Deckgläschen bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Danach wurde die Hoechst – Färbelösung (Hoechst – Nr. 33258, Cat.-Nr. B-2261 von Sigma) auf einen sauberen Objektträger zugegeben und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten aufgelegt. 5 mg des Hoechst - Pulvers wurden dabei vorher mit 100 ml Hank's BBS ohne NaHCO_3 und 10 mg Thimersol bei Raumtemperatur für 30-45 Minuten gemischt und, da der Farbstoff licht- und hitzeempfindlich ist, in einer braunen Flasche aufbewahrt. Der Hoechst – Farbstoff interkaliert mit der DNA und so erfolgt die Anfärbung der Zellkerne.

Nach ca. 10 Minuten wurde der Hoechst – Farbstoff durch dreimal spülen mit destilliertem Wasser von dem Deckgläschen entfernt. Auf einen neuen sauberen Objektträger wurden dann 3 Tropfen einer Zitronensäure-Eindecklösung gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten aufgelegt. Die Zitronensäure-Eindecklösung besteht aus 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Natriumhydrogenphosphat und Glycerin. Der pH – Wert der Lösung muss dabei 5,5 betragen, da dies für eine optimale Fluoreszenz notwendig ist.

Die Objektträger wurden dann in Dunkelheit bei -20°C gelagert.

3.5.3. Zellzählung

Durch die Anfärbung und Fixierung der Zellen war es nun möglich diese unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan HBO 100 von Zeiss) mit einem DAPI-Filter zu betrachten. Dabei wurde bei allen Zelllinien und bei jeder Behandlungsgruppe ein Abschnitt auf dem Objektträger zufällig ausgewählt und von diesem Aufnahmen gemacht, um die Zellkerne gesunder und apoptotischer Zellen so darstellen zu können. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels eines Kameraaufsatzes am Mikroskop (Kamera IMAC-CCD S30, Video Camera Module) unter 1000facher Vergrößerung (Okular E-PL: 10x/20; Objektiv Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil – Immersionsoel 518C von Zeiss) aufgenommen.

Die Zellzählung erfolgte ebenfalls in den zufällig ausgewählten Abschnitten. Dabei wurde zwischen gesunden und apoptotisch veränderten Zellen unterschieden und diese nach „gesund“ und „apoptotisch verändert“ getrennt gezählt. Zu der Gruppe der apoptotisch veränderten Zellen gehörte jede Zelle, welche eine Einfurchung des Zellkerns, Abschnürung von Kernfragmenten oder eine Auflösung des Zellkerns in Bruchfragmente aufwies.

Die Durchführung des Experimentes und die Durchführung der Zellzählung erfolgte nach 48 bzw. 72 Stunden jeweils zweimal, so dass danach ein Mittelwert berechnet werden konnte. Aus den vorliegenden Werten erfolgte dann die Berechnung des Verhältnisses der gesunden Zellen zu den apoptotisch veränderten Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe und der Dauer mit der die Zellen behandelt wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Wachstumshemmung durch 2-ME

Wie in 3.1. beschrieben, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-ME und 16 β -Hydroxy-17 β -estradiol behandelt und nach 5 Tagen die Zellzahl gemessen, so dass die Proliferation dieser Zellen, im Vergleich zu den mit Kontrollmedium behandelten Zellen, beurteilt werden konnte.

So wurde zunächst untersucht, ob 2-ME einen wachstumshemmenden Effekt auf sowohl sensible als auch multiresistente Pankreas – und Magenkarzinomzellen hat.

Wie in Abb. 4 und 5 dargestellt, konnte bei allen sechs Zelllinien der Kontrollgruppe, und der mit 16-E behandelten Gruppe ein gleichmäßiges und schnelles Wachstum über den Zeitraum von 5 Tagen und bei nahezu allen Konzentrationen von 16-E beobachtet werden. Dabei wurde das Zellwachstum und die gemessenen Zellzahlen der mit Medium behandelten Kontrollgruppe mit 100% gleichgesetzt und das Zellwachstum bzw. die gemessenen Zellzahlen der anderen Behandlungsgruppen im Verhältnis dem gegenübergestellt.

Betrachtet man dagegen das Zellwachstum unter der Behandlung mit 2-ME, so konnte, ebenfalls bei allen Zelllinien, eine signifikante Proliferations- und somit Wachstumsverminderung um bis zu 98 % beobachtet werden.

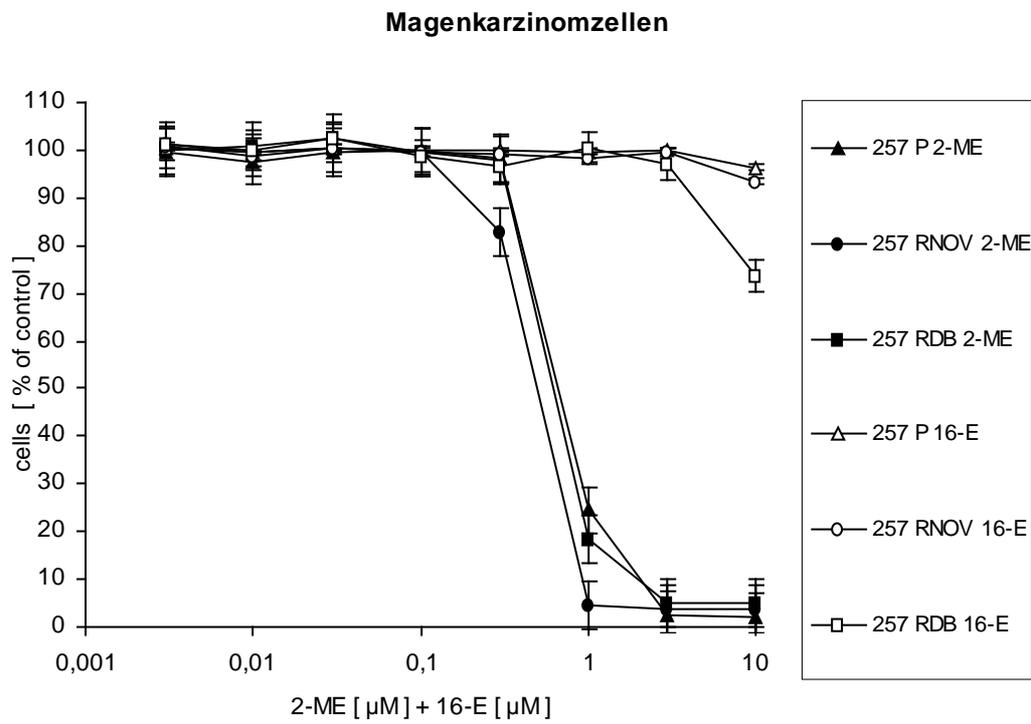


Abb. 5 : Proliferationsanalyse der Zelllinie 257 P, 257 RNOV, 257 RDB
 Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM (= System error of the mean)

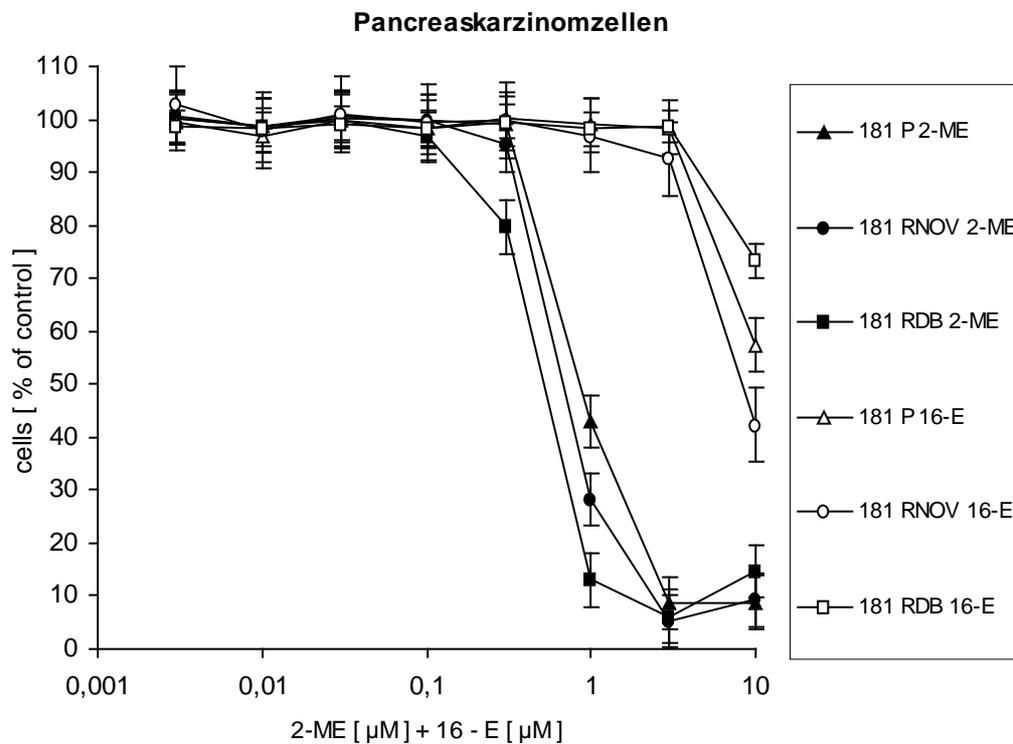


Abb. 6 : Proliferationsanalyse der Zelllinie 181 P, 181 RNOV, 181 RDB

Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM (= System error of the mean)

Vergleicht man die beiden Zelllinien 181 und 257, so wurde beobachtet, dass die Zellen der Zelllinien 257 P, 257 RNOV, 257 RDB sensibler auf die Behandlung mit 2-ME reagieren.

Bis zu einer Konzentration von 0,1 μ M 2-ME erfolgte sowohl bei Magen- als auch Pankreaskarzinomzellen keine signifikante Proliferationshemmung. Ab einer Konzentration von 0,3 μ M ist bereits eine Wachstumsinhibition von nahezu 18 % der Magenkarzinomzelllinie 257 RNOV und 20 % der Pankreaskarzinomzelllinie 181 RDB zu verzeichnen .

Betrachtet man die nächste Stufe des Konzentrationsanstieges von 0,3 μ M auf 1 μ M so fällt ein steiler Abfall der Wachstumskurven, eine signifikante Proliferationshemmung aller Zelllinien auf. Die Zelllinie 257 RNOV reagiert am deutlichsten mit einer Zellwachstumshemmung von nahezu 95 % auf 4,6 % der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Auch bei den Zelllinien 257 RDB und 257 P kam es zu einem signifikanten Zellwachstumsabfall auf 18,24 % und 24,5 %.

Betrachtet man die Pankreaskarzinomzelllinie 181 RDB, so konnte beobachtet werden, dass diese auf den Konzentrationsanstieg von 2-ME mit einer Proliferationshemmung von 87 % reagiert, also zu einer Verminderung der Zellzahl auf 13 %. Man kann dies als deutliche Wachstumsinhibition beurteilen, jedoch muss man feststellen, dass im Gegensatz zu den Magenkarzinomzellen die Zellen des Pankreaskarzinoms schwächer reagieren. Dies wird auch deutlich in der Proliferationshemmung der Zelllinien 181 RNOV und 181 RDB, wobei sich die Zellzahlen auf 28,1 % und auf 42,8 % vermindern.

Ab einer Konzentration von 3 μ M nähern sich die Wachstumskurven aller Zelllinien an. Bei den Magenkarzinomzellen ist eine Proliferationshemmung bis zu 98 % der Zelllinie 257 P, 97 % der Zelllinie 257 RNOV und bis zu 95 % der Zelllinie 257 RDB zu verzeichnen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Pankreaskarzinomzellen, so wird deutlich, dass sich bei dieser Konzentration von 2-ME die zuvor hervorgehobenen Unterschiede zu den Zellen des Magenkarzinoms relativieren. So ist eine Proliferationshemmung von 95 % der Zelllinie 181 RNOV, 94 % der Zelllinie 181 RDB und von 92 % der Zelllinie 181 P zu erkennen.

Dies macht deutlich, dass bereits bei diesen niedrigen Konzentrationen von 2-ME keine eindeutige Proliferationshemmung mehr zu erkennen ist – ein deutlicher Hinweis auf die Sensibilität der Zelllinien auf niedrige Konzentrationen des Östrogenmetaboliten 2-Methoxyestradiol.

Betrachtet man dagegen die Wachstumskurven der mit 16 β -Hydroxy-17 β -estradiol behandelten Zellen, so bestätigt der Verlauf der Kurven die Funktion des 16-E als unwirksames Kontrollöstrogen. Es ist keine signifikante Zellwachstumshemmung zu beobachten, in nahezu allen Konzentrationsbereichen wurden Zellzahlen zwischen 93 % und 100 % gemessen – eine Annäherung an den Zellwachstumsverlauf der mit Kontrollmedium behandelten Zellen, so dass die Unwirksamkeit des 16-E mit der des Medium verglichen werden kann.

Nur in hohen Dosen von 10 μ M 16-E wird eine gewisse Toxizität beobachtet.

4.2. Multiresistente Pankreaskarzinomzellen

Die Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie 181 P (sensibel), 181 RDB (mdr-1 positiv) und 181 RNOV (mdr-1 negativ) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitoxantrone, Daunorubicin, Etoposide, Teniposide, Amsacrine, Cisplatin, Paclitaxel und Vindesine sollte die Multiresistenz der mdr-1 positiven und negativen Zelllinien zeigen.

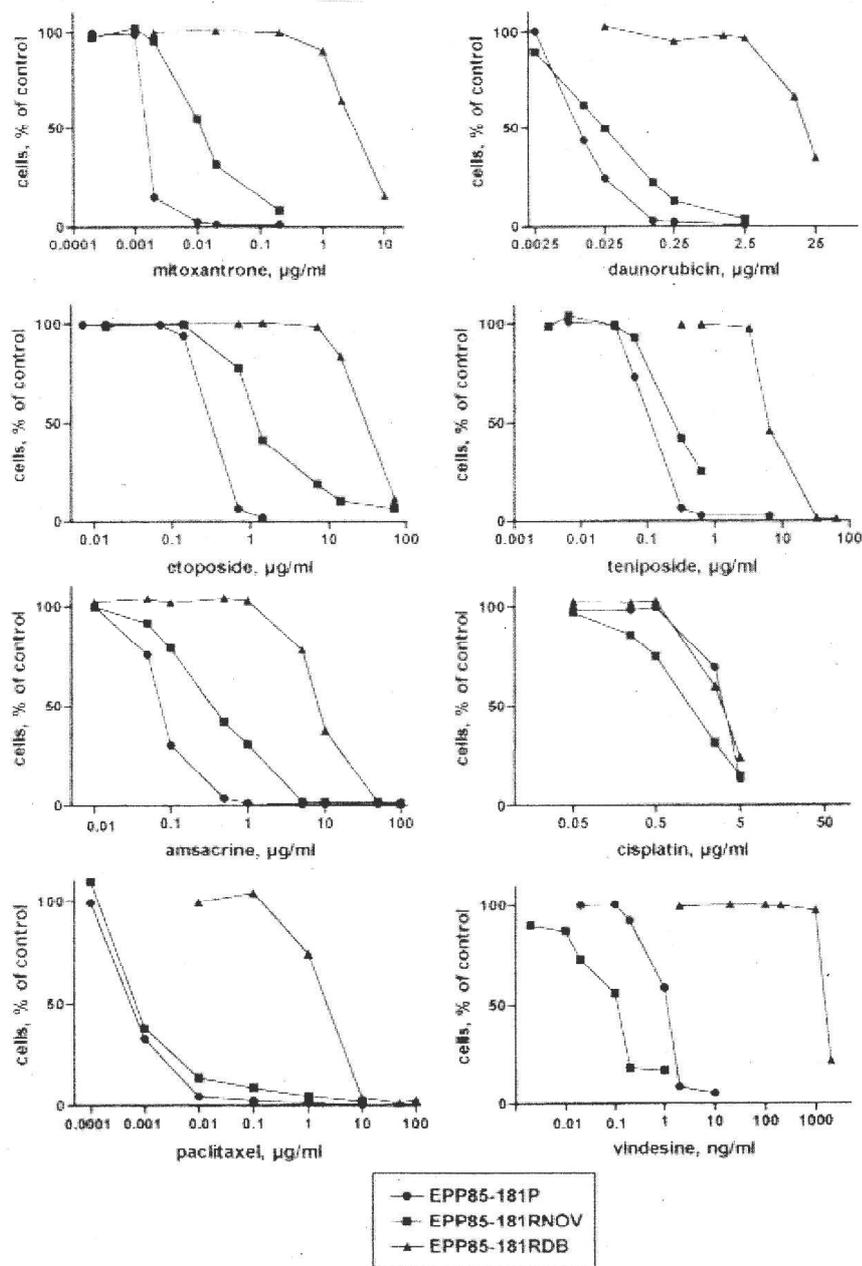


Abb. 7 : Resistenzniveau der drei Zellklone eines humanen Pankreaskarzinoms 181P (sensibel), 181RDB (mdr-1 Gen positiv) und 181RNOV (mdr-1 Gen negativ).

Wie aus den Proliferationsanalysen hervorgeht besteht eine Resistenz gegen die acht Chemotherapeutika.

Die mdr-1 positiven Zellen zeigten eine bis zu 1000-fach erhöhte IC₅₀ gegen Paclitaxel, Vindesine, Daunorubicin und Mitoxantrone. Mdr-1 negative Zellen waren etwas weniger resistent mit einer Zunahme der IC₅₀ um das 10-fache gegen Vindesine, Amsacrine und Mitoxantrone.

4.3. Nativaufnahmen der Zelllinien unter Behandlung

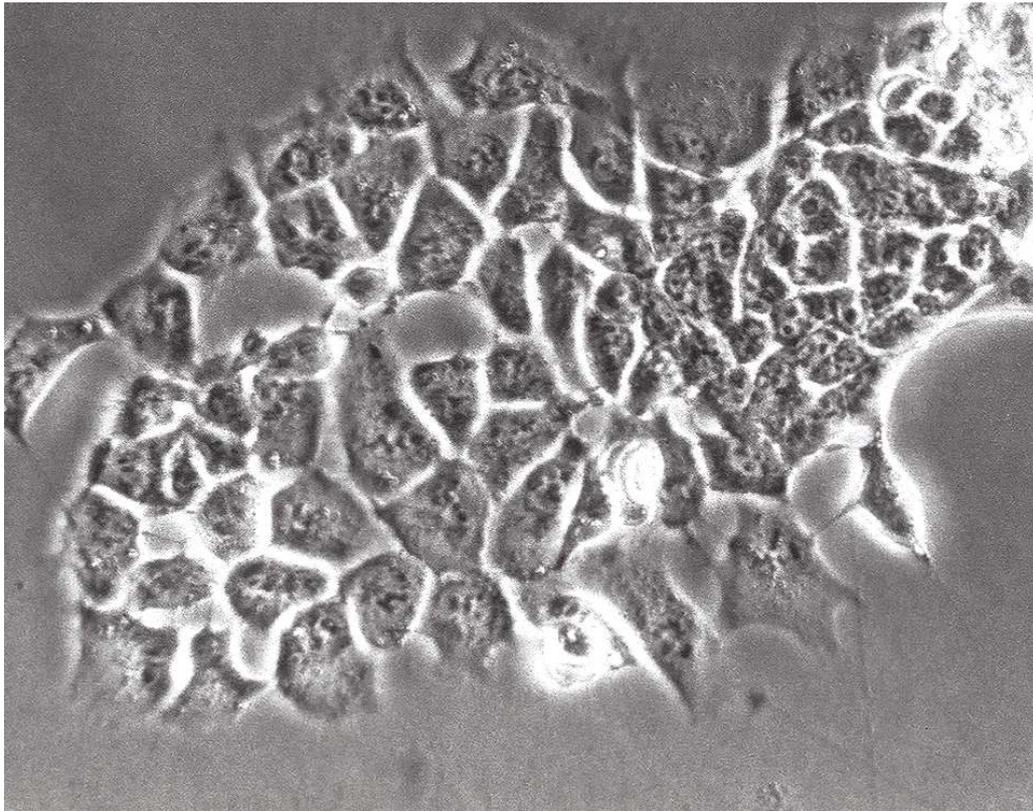
Nachdem die Proliferationshemmung und damit die Induktion der Apoptose behandelter Zellen mittels 2-ME in den in 3.2. und 3.3. beschriebenen Experimenten nachgewiesen werden konnte, wurden nun native Aufnahmen der behandelten Zellen entsprechend der Behandlungsgruppen durchgeführt. Die Aufnahmen der sechs Zelllinien erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop. Ziel war es, morphologische Veränderungen der mit Medium, 16-E und 2-ME behandelten Zellen nach 48 bzw. 72 Stunden mikroskopisch darzustellen.

Tatsächlich war es möglich, mikroskopisch apoptotisch veränderte Zellen von gesunden Tumorzellen zu unterscheiden.

Deutlich wurde auch der Unterschied zwischen Zellen, welche mit 2-ME behandelt wurden und den Zellen der Kontrollgruppen, Medium und 16-E. Mikroskopisch konnten bei diesen Zellen aller sechs Zelllinien nur sehr wenige apoptotisch veränderte Zellen beobachtet werden, was lediglich auf die natürliche Apoptoserate der Zellen zurückzuführen ist.

Betrachtet man dagegen die Aufnahmen der mit 2-ME behandelten Zellen, so fällt in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern und den nativen Aufnahmen eine Vielzahl apoptotisch veränderter Zellen auf – die zusammenhängenden Zellverbände sind aufgehoben, einzelne Zellen mit Zellkern sind durch die Fragmentation nicht mehr differenzierbar, durch die stattgefundenen Apoptose sind viele Zellen als solche nicht mehr erkennbar. Dies alles stellen morphologische Hinweise auf die proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung des 2-Methoxyestradiol dar.

Exemplarisch wurde unter den Aufnahmen aller sechs Zelllinien die Zelllinie 181 NOV herausgegriffen, da bei diesen Aufnahmen nach 48 Stunden die morphologischen Veränderungen deutlich erkennbar sind (Abb. 8a-c). Die Auswahl der Bildausschnitte erfolgte zufällig.



*Abb. 8 a : Nativaufnahme der Zelllinie 181 RNOV nach 48 Stunden Inkubation im Medium
(Kontrollgruppe)*

Die Zellen wurden nur mit Kontrollmedium behandelt. Erkennbar sind adhärenente Zellverbände im Proliferationsstadium mit intakten Zellmembranen und vollständigen Nuclei.

(Abb. 8 a)



Abb. 8 b: Nativaufnahme der Zelllinie 181 RNOV nach Behandlung mit $0,7 \mu\text{M}$ 16-E als Kontrollöstrogen nach 48 Stunden

Ebenfalls erkennbar sind morphologisch gesunde adhärenente Zellverbände in der Wachstumsphase, die sich von der Kontrollgruppe nicht unterscheiden.

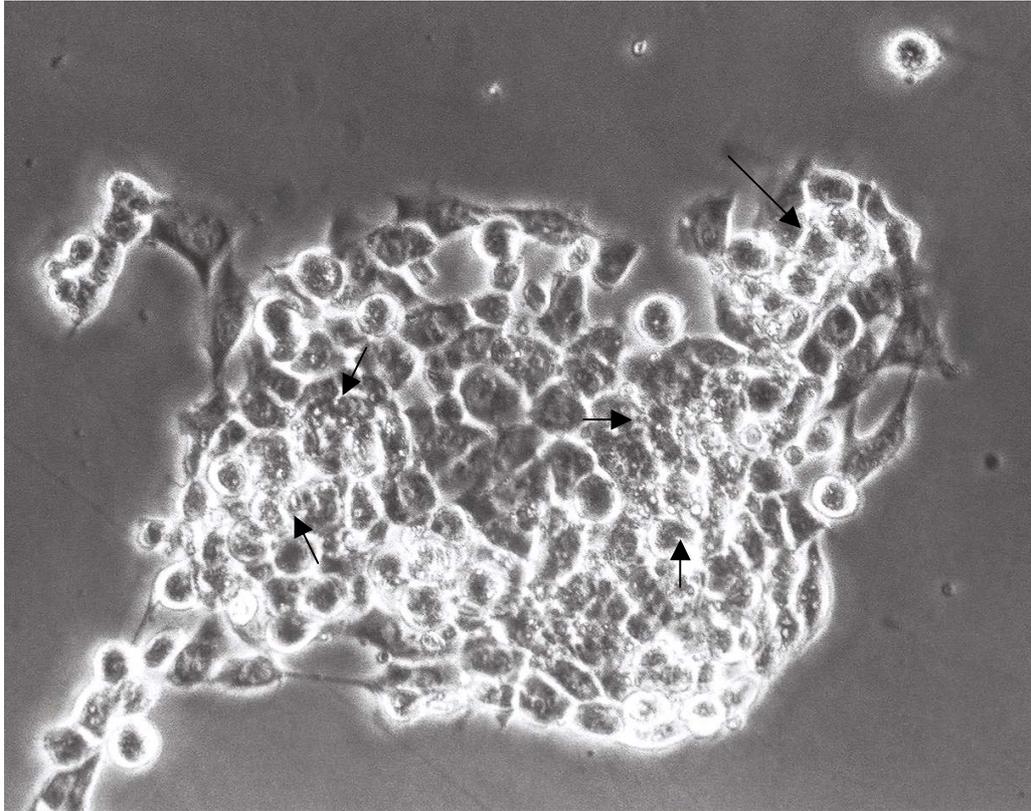


Abb. 8 c: *Nativaufnahme der Zelllinie 181 RNOV nach der Behandlung mit 0,7 μ M 2-ME nach 48 Stunden. Die Pfeile zeigen typische Veränderungen der Apoptose.*

Im Vergleich zu den Aufnahmen der Kontrollgruppen sind in der Aufnahme der behandelten Zellen mit 2-ME morphologische Veränderungen erkennbar.

Bei der Behandlungsdosis von 0,7 μ M zeigen sich Zellveränderungen wie Zellschrumpfung, „Membranblebbing“ und „apoptotic bodies“ (s. Pfeile). Diese Veränderungen sind charakteristische Zeichen der Apoptose.

Außerdem verringerte sich insgesamt die Anzahl der Zellen deutlich, ebenso nahm die Adhärenz der Zellen ab.

Eine ähnliche Morphologie zeigte sich auch in den Bildausschnitten der anderen Zelllinien, ebenfalls bereits bei einer Konzentration von 0,7 μ M bzw. 0,6 μ M bei der Pankreaskarzinomzelllinie 181 und der Magenkarzinomzelllinie 257. Quantitative Unterschiede der apoptotischen Zellen nach 48 bzw. 72 Stunden waren mikroskopisch nicht erkennbar.

4.4. FACS - Analyse

Wie im Versuch 3.3. beschrieben, konnte nach einer Anfärbung der Zellen mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid die Analyse der relativen Anzahl der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen vorgenommen werden. Die Zellzyklusanalyse der behandelten Zellen in den Behandlungsgruppen erfolgte in einem Durchflusszytometer nach 48 bzw. 72 Stunden.

Das Ziel war es, die vorher in der Proliferationsanalyse nachgewiesene Wachstumsinhibition der mit 2-ME behandelten Zellen nun auch anhand des Zellzyklus und der verschiedenen Phasen nachzuweisen.

In den folgenden Abbildungen sind die Zellzyklusphasen der Pankreas – und Magenkarzinomzellen nach unterschiedlicher Behandlung dargestellt. In den Graphiken ist der DNA-Gehalt auf der Abszisse aufgetragen und die Anzahl der Zellen auf der Ordinate.

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Medium (ohne Behandlung), mit 16-E und mit 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden.

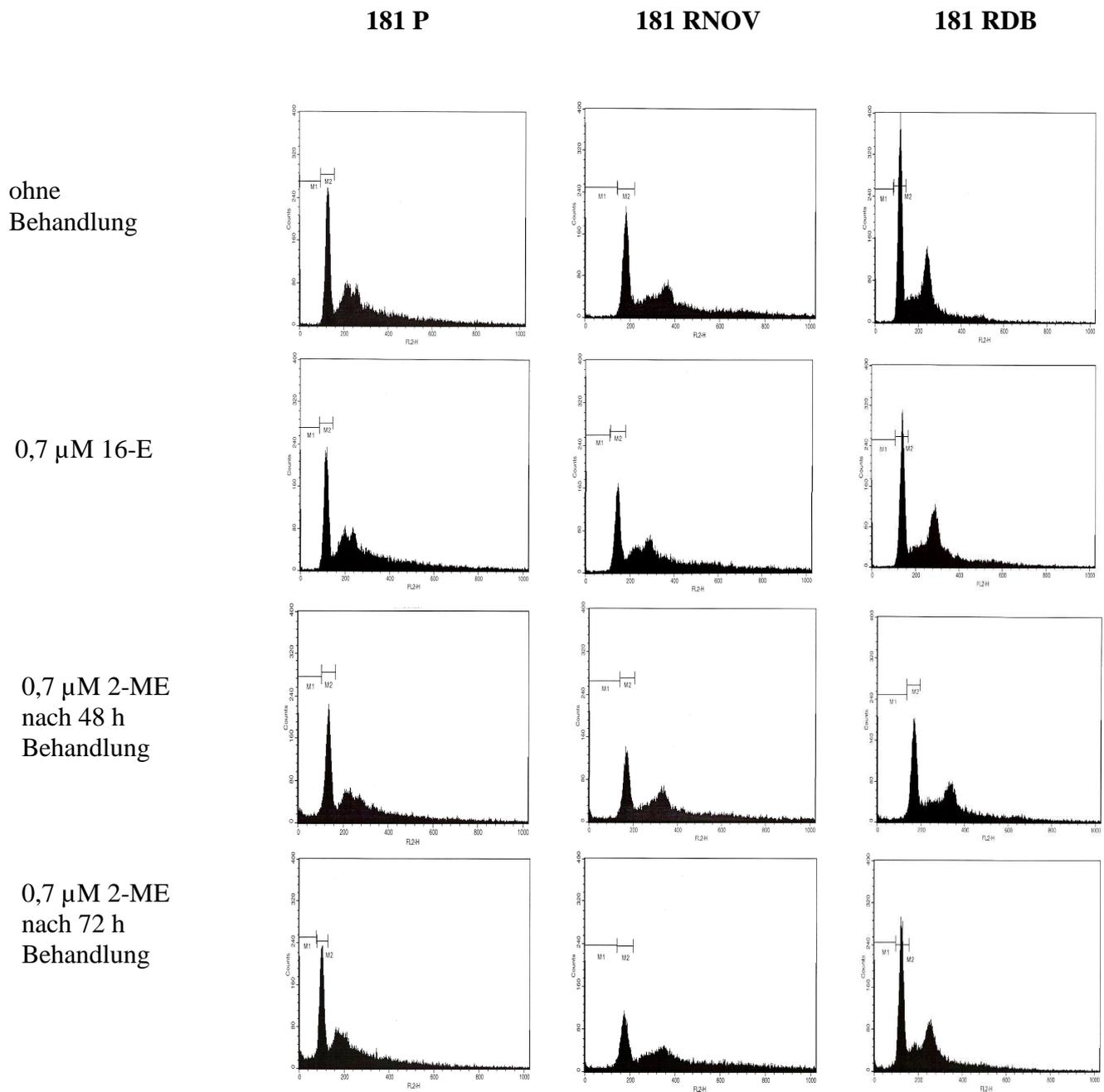


Abb.9 : Zellzyklusanalyse der Pankreaskarzinomzelllinien 181 P (nativ), 181 RNOV (*mdr-1* negativ) und 181 RDB (*mdr-1* positiv) nach der Behandlung mit Medium, dem unwirksamen Kontrollöstrogen 16-E und 2-ME

Nach Durchführung der Zellzyklusanalyse im Durchflußzytometer konnte man, anhand der Graphiken und der prozentualen Analyse der Zellzahlen in den verschiedenen Phasen, zunächst feststellen, dass bei allen drei Zelllinien nach der Behandlung mit Medium und 16-E ein regulärer Zellzyklus auftritt. D.h. die Mehrzahl der Zellen befindet sich in der G1- bzw. S-Phase mit intakter DNA und nur ein geringer Anteil an Zellen befindet sich in der sogenannten sub-G1-Phase, d.h. Zellen mit fragmentierter DNA, welche apoptotisch verändert sind.

Die Apoptoserate in den Kontrollgruppen der Zelllinien 181 P, 181 RNOV und 181 RDB beträgt zwischen 1 % und 3 %.

Nach der Behandlung mit 0,7 μM 2-ME aber verändert sich der Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen. D.h. die Zellen in der G1- bzw. S-Phase nehmen bei nahezu allen Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollgruppen ab und die Apoptoserate aller Zelllinien steigt an.

So steigt die Anzahl apoptotischer Zellen der sensiblen Zelllinie 181 P von 1,73 % nach Behandlung mit 0,7 μM 16-E auf 13,09 % nach 48 h Behandlung mit 0,7 μM 2-ME und auf 12,23 % nach 72 h Behandlung.

Betrachtet man sich die Zellzyklen der multiresistenten Pankreaskarzinomzelllinien, so reagieren diese ähnlich sensibel auf die Behandlung mit 2-ME wie die sensible Zelllinie 181 P. Der Anteil apoptotischer Zellen steigt bei der Zelllinie 181 RNOV von 3,09 % nach Behandlung mit 0,7 μM 16-E auf 11,02 % nach 48 h Behandlung mit 0,7 μM 2-ME und auf 9,97 % nach 72 h Behandlung. Die Apoptoserate der Zelllinie 181 RDB beträgt nach Behandlung mit 16-E 1,29 % und steigt nach 48 h Behandlung mit 2-ME auf 9,16 % und nach 72 h auf 8,12 %.

Zusammengefasst ist die prozentuale Analyse der Zellzahlen in den Zellzyklusphasen in Tabelle 1 und 2 .

		48h	
Zelllinie	Behandlung	sub G1 in %	G1 in %
181 P	Medium	1,69	30,44
	2-ME	13,09	31,17
	16-E	1,73	27
181 NOV	Medium	2,82	30,56
	2-ME	11,02	22,09
	16-E	3,09	23,35
181 DB	Medium	1,16	39,65
	2-ME	9,16	29,46
	16-E	1,29	34,62

Tab. 1

		72 h	
Zelllinie	Behandlung	sub G1 in %	G1 in %
181 P	Medium	1,39	29,02
	2-ME	12,23	28,69
	16-E	1,35	14,74
181 NOV	Medium	2,47	23,69
	2-ME	9,97	19,79
	16-E	2,20	29,17
181 DB	Medium	1,51	31,30
	2-ME	8,12	35,50
	16-E	1,41	34,53

Tab. 2

Tab. 1 + 2 : Ergebnisübersicht der Zellzyklusphasen der Zelllinien 181 P, 181 RNOV und 181 RDB nach 48 h und 72 h Behandlung. Sub-G1 in % entspricht der M1-Phase in den Graphiken, d.h. Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA. G1 in % entspricht der M2-Phase in den Graphiken, d.h. Anteil der Zellen mit intakter DNA.

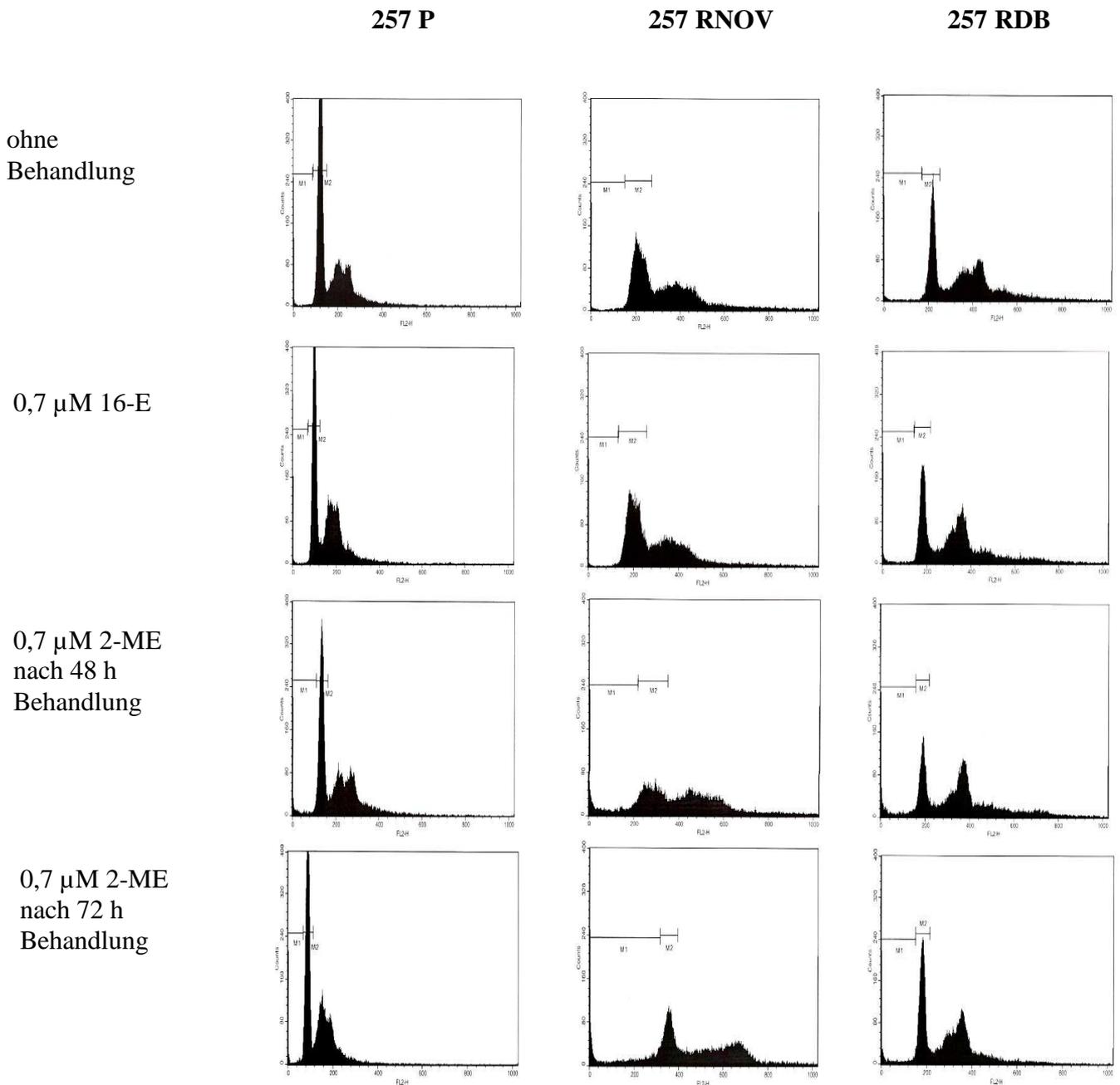


Abb. 10 : Zellzyklusanalyse der Magenkarzinomzelllinien 257 P (nativ), 257 RNOV (*mdr-1* negativ) und 257 RDB (*mdr-1* positiv) nach der Behandlung mit Medium, dem unwirksamen Kontrollöstrogen 16-E und 2-ME

Die Zellen des Magenkarzinoms verhalten sich ähnlich der Zellen des Pankreaskarzinoms.

Nach einer Behandlung mit Medium und 0,6 μM 16-E zeigen alle drei Zelllinien einen regulären Zellzyklus mit der Mehrzahl der Zellen in der G1- bzw. S – Phase und einer geringen Apoptoserate, welche zwischen 1 % und 4 % beträgt.

Nach der Gabe von 0,6 μM 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden verändern sich die Zellzahlen in den Zellzyklen deutlich. Der Anteil gesunder Karzinomzellen sinkt bei allen drei Zelllinien um bis zu 10 bis 20 % ab. Die Apoptoserate der sensiblen Zelllinie 257 P steigt von 2,1 % nach Behandlung mit dem Kontrollöstrogen auf 7,63 % nach 48 Behandlungsstunden mit 2-ME und auf 7,17 % nach 72 h Behandlung. Die multiresistenten Zellen des Magenkarzinoms reagieren dagegen sensibler auf die Gabe von 0,6 μM 2-ME. Nach 48 h Behandlung steigt der Anteil apoptotischer Zellen der Zelllinie 181 RNOV von 3,12 % auf 20,24 % und nach 72 h auf 23,84 %. Die Apoptoserate der Zelllinie 181 RDB stieg von 4,6 % auf 11,74 % nach 48 h Behandlung und auf 9,07 % nach 72 h Behandlung.

Zusammengefasst sind diese prozentualen Zellzahlen in Tabelle 3 und 4.

		48h	
Zelllinie	Behandlung	sub G1 in %	G1 in %
257 P	Medium	1,90	55,38
	2-ME	7,63	42,49
	16-E	2,10	46,71
257 NOV	Medium	3,23	43,60
	2-ME	20,24	26,40
	16-E	3,12	46,85
257 DB	Medium	4,46	32,51
	2-ME	11,74	20,89
	16-E	4,60	29,33

Tab. 3

		72 h	
Zelllinie	Behandlung	sub G1 in %	G1 in %
257 P	Medium	3,12	61,38
	2-ME	7,17	48,39
	16-E	2,60	59,51
257 NOV	Medium	3,03	49,93
	2-ME	23,84	24,23
	16-E	3,16	49,56
257 DB	Medium	2,60	43,25
	2-ME	9,07	33,86
	16-E	1,96	41,50

Tab. 4

Tab. 3 + 4 : Ergebnisübersicht der Zellzyklusphasen der Zelllinien 257 P, 257 RNOV und 257 RDB nach 48 h und 72 h Behandlung. Sub-G1 in % entspricht der M1-Phase in den Graphiken, d.h. Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA. G1 in % entspricht der M2-Phase in den Graphiken, d.h. Anteil der Zellen mit intakter DNA.

4.5. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff

Um die morphologischen Veränderungen der Zellen besser zu veranschaulichen, wurden die Zellkerne mittels eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, der sogenannte Hoechst-Farbstoff, angefärbt, wie in 3.5. genau beschrieben.

Da der Farbstoff mit der DNA interkaliert, ist es so möglich, die Zellkernmorphologie unter einem DAPI-Filter genau betrachten zu können. Die angefärbten Zellkern fluoreszieren blau und lassen so typische Apoptosezeichen, wie z.B. Kernfragmentation, sichtbar werden.

So wurden die Zellen der sechs Zelllinien nach 48 bzw. 72 Stunden Behandlung in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgezählt.

Wie schon in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, konnte auch hier bei allen Zelllinien die apoptotischen Veränderungen unter Behandlung mit 2-ME dargestellt werden.

Die in unterschiedlicher Ausprägung und Häufigkeit vorkommenden morphologischen Veränderungen werden in den Bildausschnitten mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

Insgesamt wurden bei den Zellen der Kontrollgruppen, Medium und 16-E, nach Anfärbung gleichmäßig intensiv leuchtende, reguläre Zellkerne beobachtet.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Hoechst-Färbung und die quantitative Auswertung der Zellzählung dargestellt, beginnend mit den Zellen des Pankreaskarzinoms.

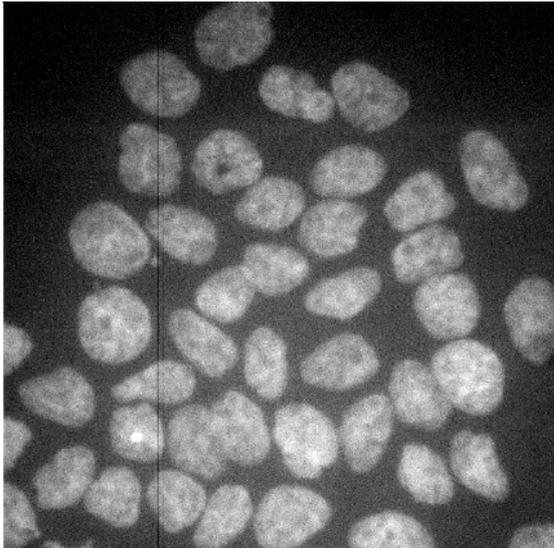


Abb.11 a: Zellen ohne Behandlung

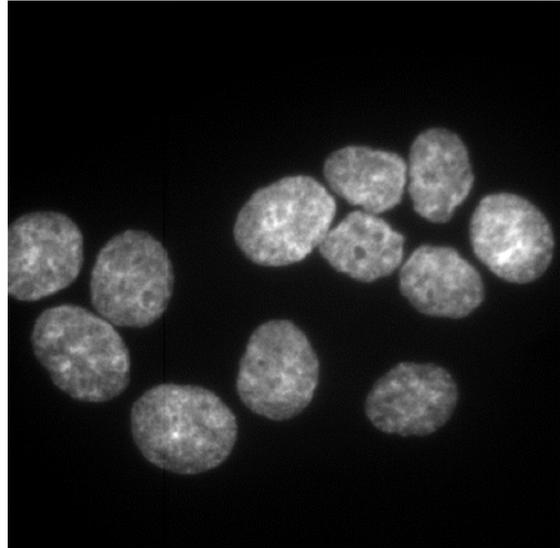


Abb.11 b: Zellen mit 0,7 μM 16-E behandelt

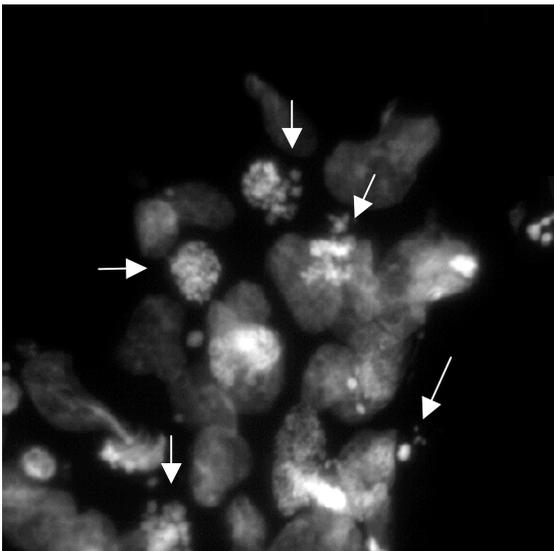


Abb.11 c: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 48h behandelt

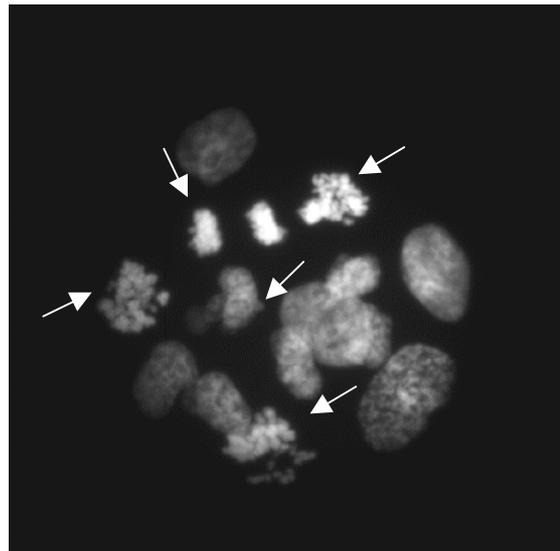


Abb.11 d: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 72h behandelt

Abb. 11 : Zellen der nativen Pankreaszelllinie 181 P in verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 11 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME

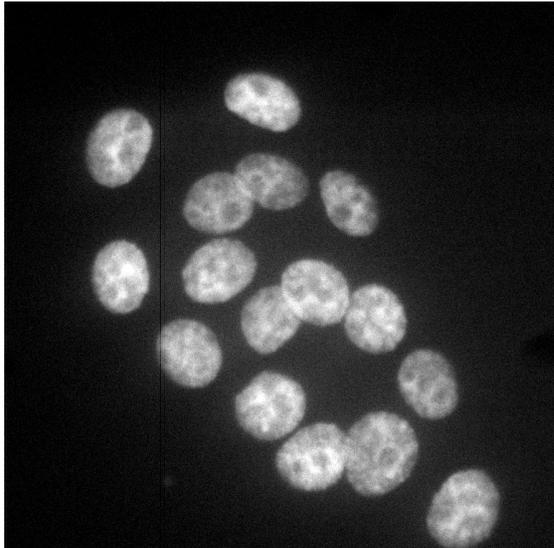


Abb.12 a: Zellen ohne Behandlung

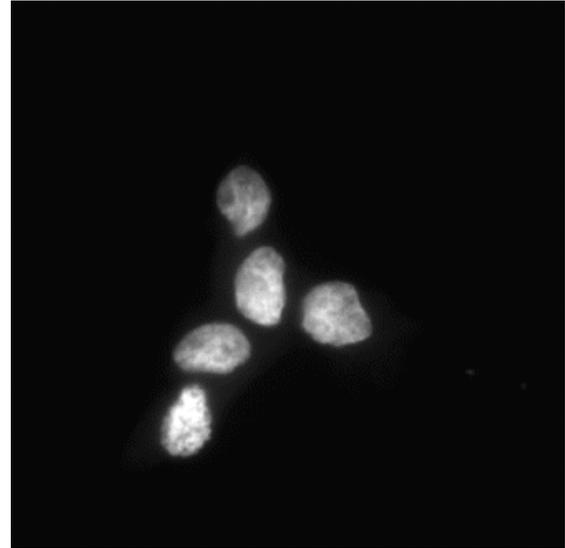


Abb.12 b: Zellen mit 0,7 μM 16-E behandelt

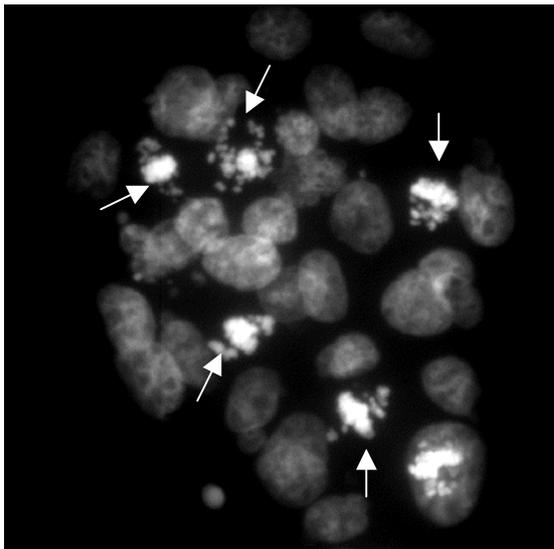


Abb.12 c: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 48h behandelt

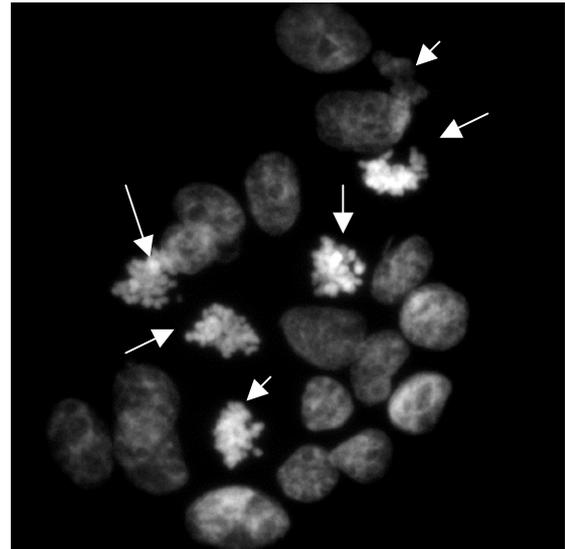


Abb.12 d: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 72h behandelt

Abb. 12 : Zellen der resistenten Pankreaszelllinie 181 RNOV (*mdr-1* negativ) in verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 12 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME.

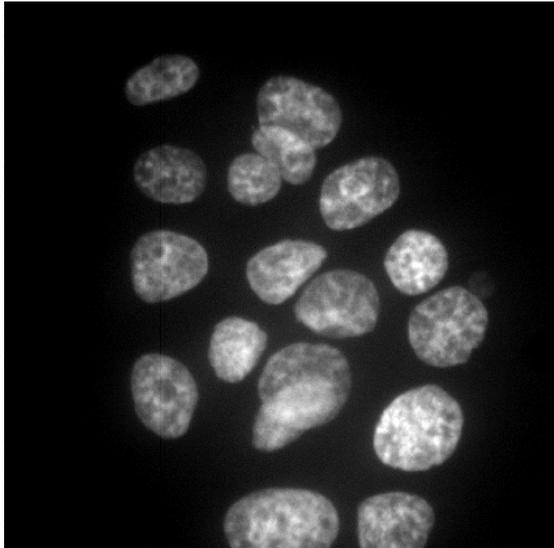


Abb.13 a: Zellen ohne Behandlung

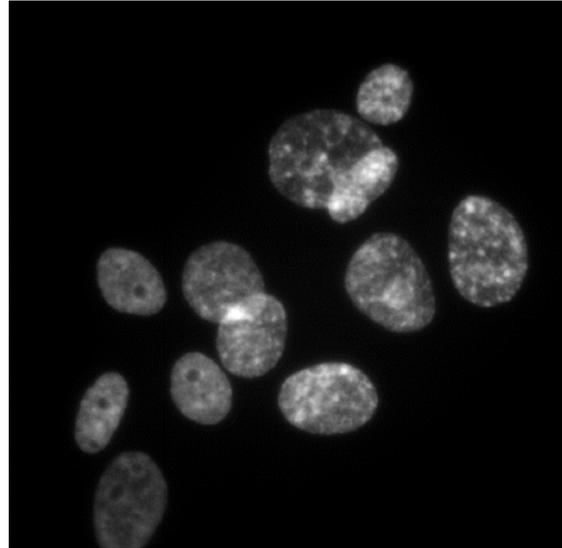


Abb.13 b: Zellen mit 0,7 μM 16-E behandelt

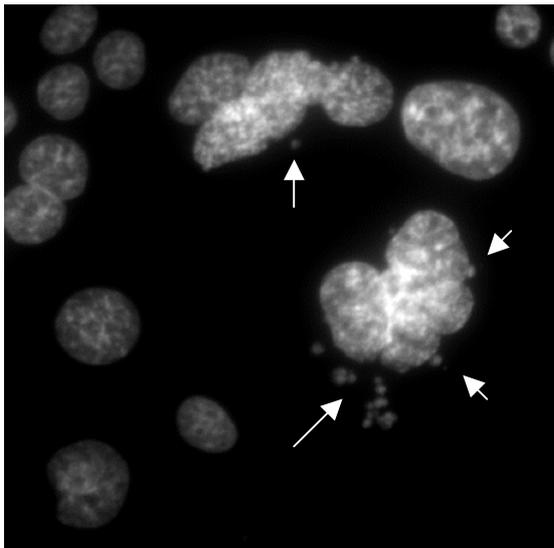


Abb.13 c: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 48h behandelt

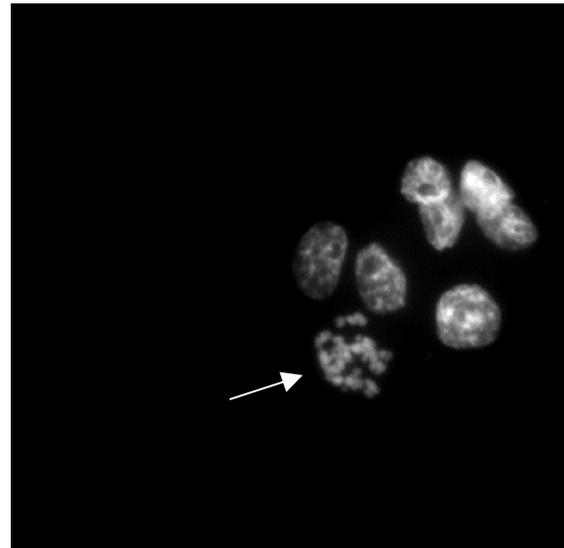


Abb.13 d: Zellen mit 0,7 μM 2-ME für 72h behandelt

Abb. 13 : Zellen der resistenten Pankreaszelllinie 181 RDB (*mdr-1* positiv) in Verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 13 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME.

In den Bildausschnitten 11-13 c-d der mit 2-ME behandelten Zellen weisen die weißen Pfeile auf die apoptotischen Veränderungen hin, welche deutlich sichtbar sind. Es trat eine Zellschrumpfung durch Zytoplasmaabnahme ein, eine nukleäre Fragmentation mit Chromatinkondensation sowie eine Bildung der Apoptotic bodies.

Die Zellen wurden ebenfalls in den jeweiligen Behandlungsgruppen in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt, um das Verhältnis der gesunden Zellen zu den apoptotisch veränderten Zellen quantitativ darstellen zu können. Es wurde pro Behandlungsgruppe mindestens 300 Zellen gezählt.

Die Ergebnisse der Zellzählung apoptotischer Pankreaskarzinomzellen sind zunächst in Abbildung 14 quantitativ und die absoluten Werte in % in Tabelle 5 dargestellt.

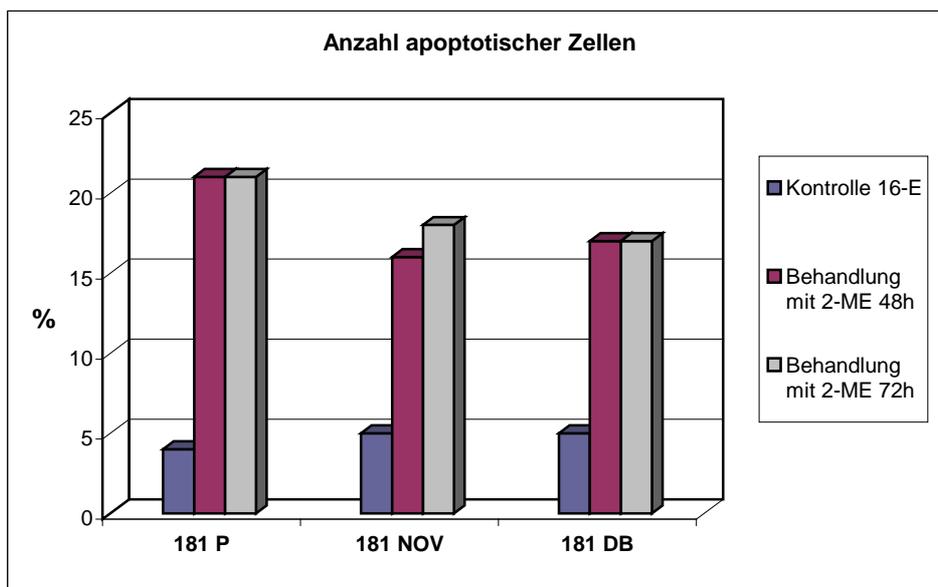


Abb. 14 : *Quantitative Darstellung apoptotischer Zellen der Pankreazelllinien 181 P, 181 RNOV und 181 RDB im Vergleich, nach Behandlung mit 0,7 μ M 16-E und 0,7 μ M 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden*

Zelllinie	Behandlung	Anzahl apoptotischer Zellen in %	
		48h	72h
181 P	16-E Kontrolle	3,96%	5,31%
	2-ME	20,52%	21,49%
181 NOV	16-E Kontrolle	4,90%	5,62%
	2-ME	16,33%	17,82%
181 DB	16-E Kontrolle	5,30%	5,29%
	2-ME	16,50%	17,49%

Tab. 5: Darstellung der absoluten Werte in % der apoptotischen Zellen der Pankreaszelllinien 181 P, 181 RNOV und 181 RDB im Vergleich, nach Behandlung mit 0,7 μ M 16-E(Kontrolle) und 0,7 μ M 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden

Nach Behandlung mit 0,7 μ M 2-ME steigt bei der chemosensiblen Zelllinie 181 P der Anteil der apoptotischen Zellen auf bis zu 21,49 %, bei den Zelllinien 181RNOV und 181 RDB beobachteten wir einen Anstieg auf bis zu 17,82 %. Die Apoptoserate der Zellen nach Behandlung mit dem Kontrollörogen 16-E betrug 5 %.

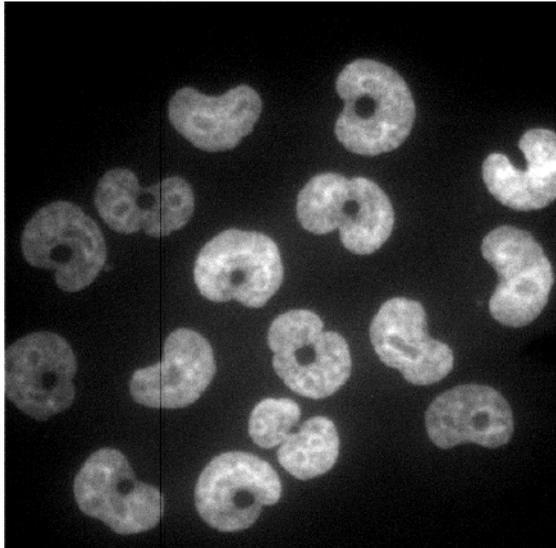


Abb.15 a: Zellen ohne Behandlung

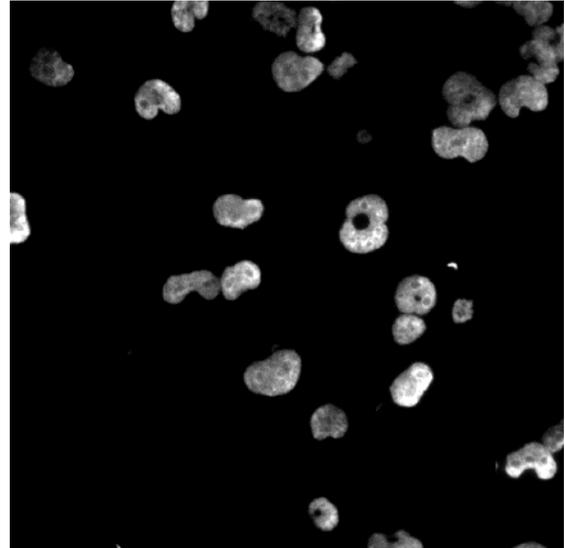


Abb.15 b: Zellen mit 0,6 μM 16-E behandelt

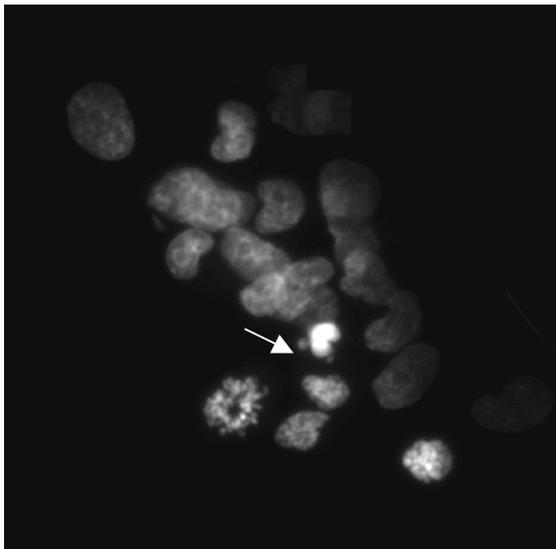


Abb.15 c: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 48 h behandelt

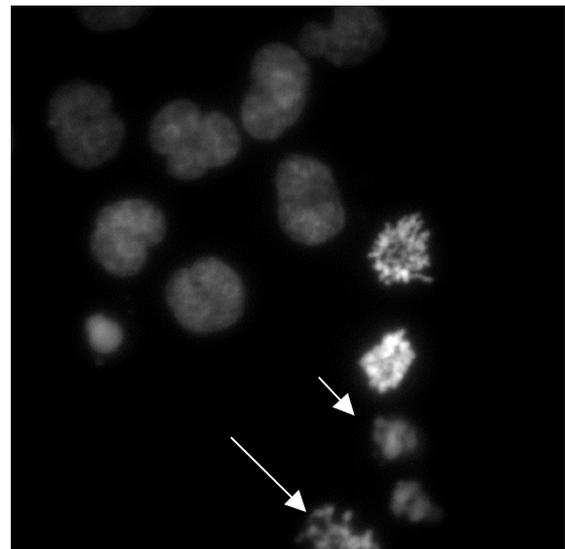


Abb.15 d: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 72 h behandelt

Abb. 15 : Zellen der nativen Magenkarzinomzelllinie 257 P in verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 15 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME.

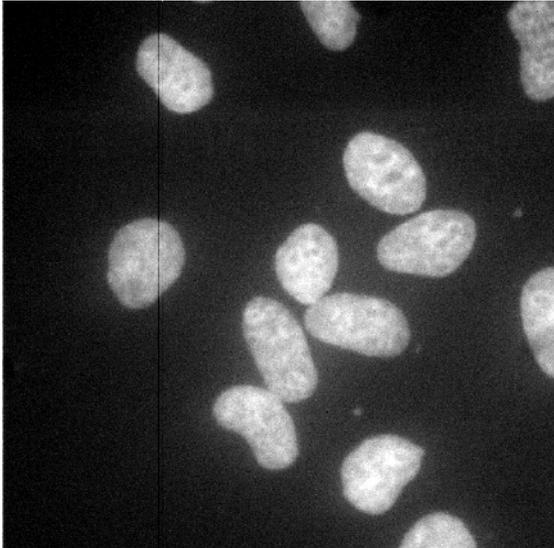


Abb.16 a: Zellen ohne Behandlung

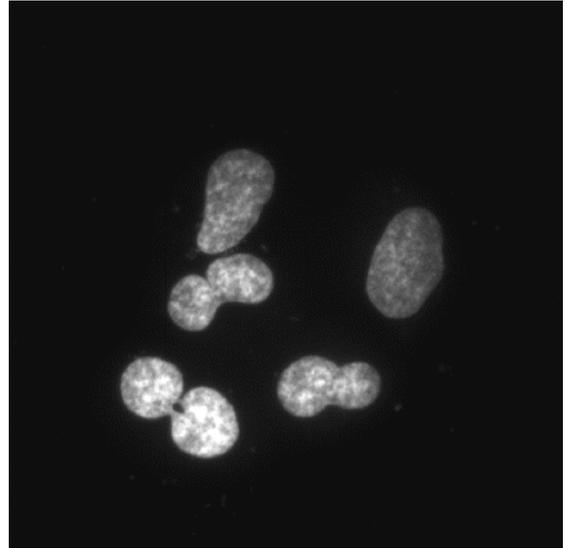


Abb.16 b: Zellen mit 0,6 μM 16-E behandelt

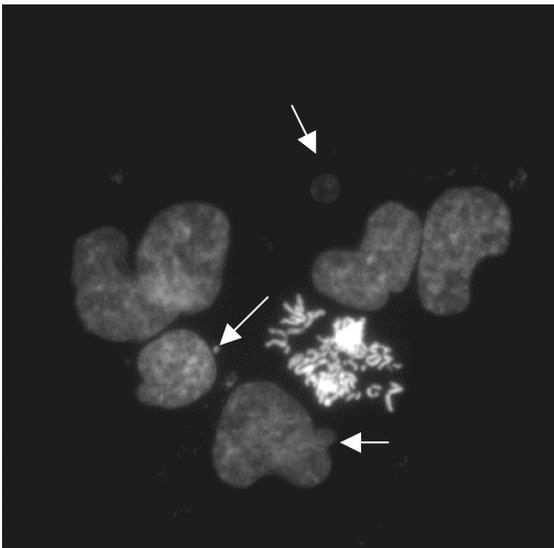


Abb.16 c: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 48h behandelt

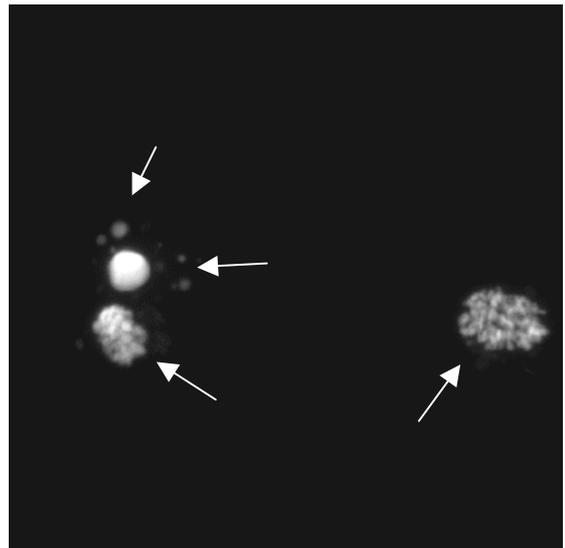


Abb.16 d: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 72h behandelt

Abb. 16 : Zellen der resistenten Magenkarzinomzelllinie 257 RNOV in verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 16 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME.

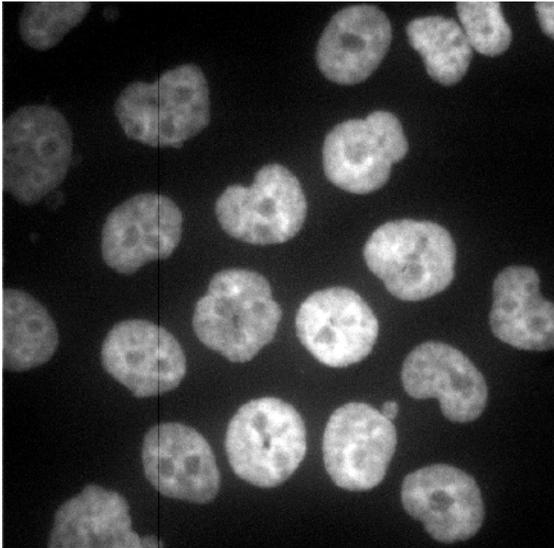


Abb.17 a: Zellen ohne Behandlung

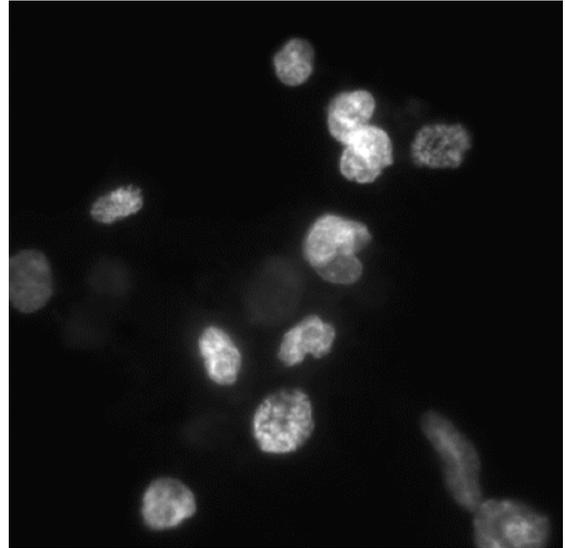


Abb.17 b: Zellen mit 0,6 μM 16-E behandelt



Abb.17 c: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 48h behandelt

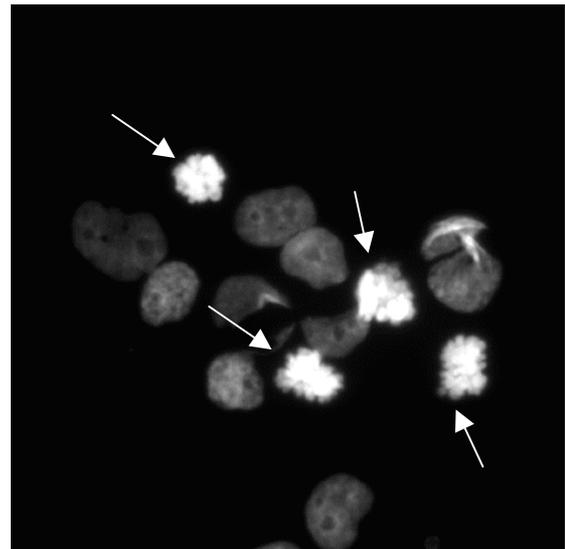


Abb.17 d: Zellen mit 0,6 μM 2-ME für 72h behandelt

Abb. 17 : Zellen der resistenten Magenkarzinomzelllinie 257 RDB in verschiedenen Behandlungsgruppen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile in den Abb. 17 c-d zeigen apoptotische Veränderungen nach unterschiedlicher Einwirkdauer des 2-ME.

Wie schon bei der Pankreaskarzinomzelllinie 181 beschrieben, treten auch bei der Magenkarzinomzelllinie 257 nach Anfärbung des Zellkerns charakteristische morphologische Veränderungen durch Apoptose auf.

Durch die weisen Pfeile in den Graphiken sichtbar werden besonders Kernfragmentation und Chromatinkondensation, sowie Apoptotic bodies und das Membranblebbing.

Die mit den Kontrollsubstanzen Medium und 16-E behandelten Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen, nur sehr selten konnten apoptotisch veränderte Zellen beobachtet werden.

Auch bei dieser Zelllinie wurden die Zellen getrennt nach gesunden und apoptotisch veränderten Zellen in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt und die apoptotisch veränderten Magenkarzinomzellen in folgendem Balkendiagramm dargestellt, wobei wieder der Vergleich der sensiblen Zelllinie 257 P mit den multiresistenten Zelllinien 257 RNOV und 257 RDB im Vordergrund steht. Die absoluten Werte in % sind in Tabelle 6 im Vergleich nach 48 h und 72 h Behandlung dargestellt.

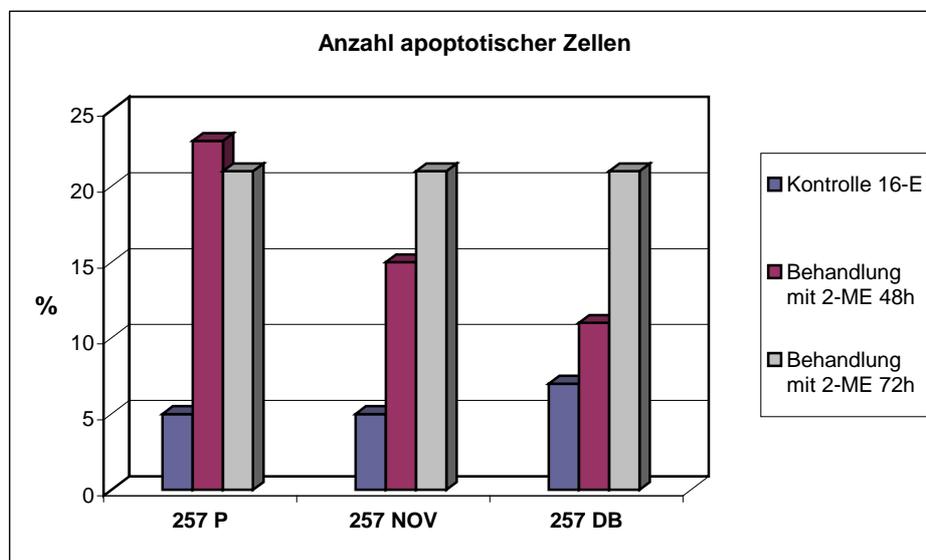


Abb. 18 : *Quantitative Darstellung apoptotischer Zellen der Magenkarzinomzelllinien 257 P, 257 RNOV und 257 RDB im Vergleich, nach Behandlung mit 0,6 μ M 16-E und 0,6 μ M 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden*

Zelllinie	Behandlung	Anzahl apoptotischer Zellen in %	
		48h	72h
257 P	16-E Kontrolle	4,90%	5,61%
	2-ME	22,90%	21,21%
257 NOV	16-E Kontrolle	5,30%	5,94%
	2-ME	15,11%	20,52%
257 DB	16-E Kontrolle	6,57%	5,29%
	2-ME	10,81%	20,52%

Tab. 6 : Darstellung der absoluten Werte in % der apoptotischen Zellen der Magenkarzinomzelllinien 257 P, 257 RNOV und 257 RDB im Vergleich, nach Behandlung mit 0,7 μM 16-E(Kontrolle) und 0,7 μM 2-ME für 48 bzw. 72 Stunden

Die Magenkarzinomzellen verhalten sich nach der Behandlung mit dem Kontrollöstrogen bzw. mit 2-ME ähnlich der Pankreaszellen, wobei bei der Zelllinie 257 mehr Unterschiede in der Zellzahl nach unterschiedlicher Behandlungsdauer zu beobachten sind.

Die sensible Zelllinie 257 P reagierte auf eine Behandlung mit 0,6 μM 2-ME mit einem Anstieg apoptotischer Zellen auf 23 % nach 48 h und auf 21 % nach 72 h.

Die multiresistenten Zelllinien 257 RNOV und RDB nähern sich dieser Apoptoserate nach 72 h Behandlung an. Beträgt die Apoptoserate nach 48 h Behandlung bei der Zelllinie 257 RNOV 15 % und bei der Zelllinie 257 RDB nur 11%, so steigt die Anzahl apoptotischer Zellen bei beiden Zelllinien nach 72 h auf 20,5 %.

Die Apoptoserate der Zellen nach Behandlung mit dem Kontrollöstrogen 16-E betrug rund 5 %.

5. Diskussion

5.1. Steroide und Tumorwachstum

Östrogene können bekanntermaßen Tumorwachstum, insbesondere das Mamma – und Endometriumkarzinom fördern, wenn eine chronische Exposition durch hormonelle Dysregulation oder iatrogen vorliegt (Ziehl et al. 1975; Mack et al. 1976; McDonald et al. 1977; Pike et al. 1993; Feigelson et al. 1996). Hierbei hängt die Wachstumsstimulation durch Östrogene und die Prognose der Erkrankung weitgehend von der Expression von Östrogenrezeptoren ab.

Ganz anders verhält sich 2-ME. Es wirkt nicht tumorfördernd, sondern tumorhemmend bei vielen Tumoren, weshalb es als „a good estrogen“ bezeichnet wurde (Pribluda et al. 1998).

Die Bindungsstelle ist hierbei nicht der Östrogenrezeptor, wodurch sich das Ausmaß der Einsatzmöglichkeiten von 2-ME auf östrogenrezeptornegative Organe erweitert. (Merriem et al. 1980 ; Seegers et al 1989 ; Cushman et al. 1995 ; Seegers et al. 1997 ; Wang et al. 2000 ; LaVallee et al. 2002).

5.2. Tumorhemmung durch 2-ME

Wie aus einer Menge an unterschiedlichen Publikationen ersichtlich, scheint 2-ME einen tumorhemmenden Effekt auf die meisten oder möglicherweise auf alle malignen Tumore zu haben.

Tumorarten	Autoren	Publikationsjahr
Endothelzellen	Fotsis et al	1994
	Yue et al	1997
	Tsukamoto et al	1998
Osteosarkom	Maran et al.	2002
	Golebiewska et al.	2002
Angiosarkom	Reiser et al	1998
	Arbiser et al	1999
Mammakarzinom	Lottering et al	1992
	Cushman et al	1995
	Klauber et al	1997
	Seegers et al	1998
	Zhu et al	1998
	Zoubine et al	1999
	Amorino et al.	2000
	Lippert et al.	2003
Bronchialkarzinom	Mukhopadhyay et al	1997
	Mukhopadhyay et al	1998
	Kataoka et al	1998
Pankreaskarzinom	Schumacher et al	1999
Hepatozelluläres Karzinom	Schumacher et al	2000
Neuroblastom	Nakagawa-Yagi et al	1996
	Wassberg et al	1999
Magenkarzinom	Heng-Liang et al	2000
	Lin et al.	2001
Multiples	Myelom Dingli et al.	2002
	Chauhan et al.	2002
Prostatakarzinom	Qadan	2001
	Kumar et al.	2001
	Bu et al.	2002
	Figg et al.	2002
Kolorektales Karzinom	Kinuya et al.	2001
	Carothers et al.	2002

Tab. 7 : *Literaturübersicht verschiedener Tumore, die in ihrem Wachstum erfolgreich durch 2-ME gehemmt werden konnte*

Besonders häufig wurde das Mammakarzinom untersucht. Die DNA-Synthese und die Mitoserate konnte bei den Mammakarzinomzellen MCF-7 bereits mit einer geringen Dosis von 10nM gehemmt werden (Lottering et al. 1992). Das Tumorwachstum von humanen Mammakarzinomzellen konnte bei Mäusen um 60 % mit einer Dosis von 75 mg/kg KG täglich ohne erkennbare Toxizitätszeichen gehemmt werden (Klauber et al. 1997).

Ebenfalls 2002 untersuchte man die Wirkung des 2-ME auf multiresistente multiple Myelom Zellen. Unter Behandlung mit 0,5 μ M – 20 μ M erfolgte ein kontinuierlicher Proliferationsabfall, so dass das Tumorzellwachstum unter Umgehung von Resistenzmechanismen signifikant gehemmt werden konnte. Hier wurde als Mechanismus der Wachstumshemmung eine Induktion von Apoptose gefunden, die über Cytochrom C Release und Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 3 erfolgte. Die Ursache der Überwindung der Resistenz konnte auch hier nicht abschließend geklärt werden (Chauhan et al. 2002).

Der tumorhemmende Effekt des 2-ME zeigte sich auch in der Behandlung multiresistenter Pankreaszellen und cisplatinresistenter Bronchialkarzinomzellen, wobei sich eine dosisabhängige Proliferationshemmung ergab (Schumacher et al. 2000).

5.3. Wirkung von 2-ME auf multiresistente Pankreas – und Magenkarzinomzellen

5.3.1. Proliferationsanalysen

Bei den von uns durchgeführten Versuchen konnten wir einen sehr starken, dosisabhängigen, tumorhemmenden Effekt von 2-Methoxyestradiol auf Zellen humaner Tumore aufzeigen, so des Pankreaskarzinoms und Magenkarzinoms. Beide Tumore haben eine eher schlechte Prognose, wenn eine kurative Operation nicht möglich ist. Zurückzuführen ist dies zum einen auf die meist späte Diagnostik auf Grund unspezifischer Symptome und auf frühe Metastasierung. Zum anderen besteht das Problem der zunehmenden Chemoresistenz.

Doch in dem Vergleich der mit 2-Methoxyestradiol behandelten sensiblen und multiresistenten Pankreas – und Magenkarzinomzellen zeigten sich in den Proliferationsanalysen IC₅₀ – Werte der multiresistenten Zelllinien von 0,7 μ M und 0,6 μ M, was in etwa dem der sensiblen Zelllinien entspricht.

Sowohl unsere Daten als auch die Ergebnisse des multiplen Myeloms (Chauhan et al. 2002) und des multiresistenten Pankreaskarzinoms und cisplatinresistenten Bronchialkarzinoms

(Schumacher et al. 2000) zeigen, dass 2-ME in keiner Weise durch die Resistenz gegenüber den herkömmlichen Zytostatika beeinflusst wird.

Die Mechanismen der Überwindung der Resistenz sind noch weitgehend unklar und bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

Die Expression des Resistenzgens *mdr-1* scheint für 2-ME keine wesentliche Bedeutung zu haben, da die Klone der Pankreas – und Magenkarzinomzelllinien mit oder ohne Expression des *mdr-1* Gens gleichermaßen sensibel waren.

5.3.2. Induktion von Apoptose

Zahlreich beobachtete Proliferationshemmungen verschiedenster Tumorzellen nach Behandlung mit 2-ME basieren auf der Induktion eines Zellzyklusarrestes oder eines apoptotischen Zelltodes. Stattgefundenen Zellzyklusarrest äußert sich in Veränderungen in den G1 – bzw. G2/M – Phasen, welche in Zellzyklusanalysen dargestellt werden können.

Derartige Beobachtungen wurden schon in vielen Studien beschrieben.

Der Wachstumsarrest in der G2/M – Phase des Zellzyklus konnte als Folge der Zerstörung der Mikrotubuli durch 2-ME in einigen Karzinomzellen beobachtet werden. So z.B. in Prostatakarzinomzellen (Qadan et al. 2001) oder in Leberkarzinomzellen (Lin et al. 2000).

Bei einer Studie an Schilddrüsenzellen kam es nach Behandlung mit 2-ME zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M – Phase, wobei nach längerer Exposition der Zellen gegenüber 2-ME eine Apoptose-Induktion sowie die Freisetzung von Autoantigen gefunden wurde (Wang et al. 2000).

Es wurden aber auch andere Verteilungen in Zellzyklen beobachtet. So resultierte die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit 2-ME in einer Anhäufung der Zellen in der G1-Phase (Lottering et al. 1992), wohingegen Pankreaskarzinomzellen in der S - Phase akkumulierten (Schumacher et al. 1999).

Kommt es dagegen zur Induktion des apoptotischen Zelltodes, so wird dies deutlich in einer Zunahme der sub-G1-Region. Unsere Untersuchungen ergaben eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen in der sub-G1-Region nach Behandlung mit 2-ME, sowohl der multiresistenten Pankreaskarzinomzellen als auch der multiresistenten Magenkarzinomzellen.

Diese Zunahme der Apoptose entspricht in etwa der sensibler Pankreas – und Magenkarzinomzellen. Damit entsprechen diese Ergebnisse denen in verschiedenen Studien beobachteten Apoptose-Induktionen zahlreicher Tumorzellen nach 2-ME Behandlung.

Neuroblastomzellen erlitten bereits nach 10nM den apoptotischen Zelltod (Nakagawa-Yagi et al. 1996). Weitere Zelltypen wie Prostatakarzinomzellen (Qadan et al. 2001; Bu et al. 2002), Mammakarzinomzellen (LaVallee et al. 2002), Leukämiezellen (Huang et al. 2000), Magenkarzinomzellen (Lin et al. 2001), Osteosarkom (Maran et al. 2002) und andere folgten, die durch 2-ME in den apoptotischen Zelltod überführt werden.

Diese Resultate lassen vermuten, dass 2-ME verschiedene Mechanismen benutzt, um das Wachstum vieler verschiedener Tumorzellen zu hemmen.

Dadurch ist es möglich, den Verlust der Apoptosekapazität, denen die Tumorzellen unterliegen, so therapeutisch beeinflussen zu können.

5.4. Wirkmechanismen von 2-ME bei multiresistenten Zellen

Wie es zur Überwindung der Chemoresistenz in verschiedensten Tumorarten durch 2-ME kommt, wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Dabei zeigten sich verschiedene Ansatzpunkte, die man in 3 Hauptgruppen unterteilen kann, welche in Tabelle Nr. 8 zusammengefasst sind.

Antiangiogenese

Hemmung der Neovaskularisierung

Induktion von Apoptose bei Endothelzellen

Hemmung der bFGF und VEGF induzierten Neovaskularisierung

Herunterregulierung von VEGF

Hemmung der Mikrotubuli

Bindung an der Colchicinbindungsstelle

Hemmung der Tubulinpolymerisation

Mitosearrest ohne Tubulinpolymerisation

Induktion von Apoptose

p53 Stabilisierung

p53 unabhängige Apoptose

bcl-2 Phosphorylierung

bcl-2 Herunterregulierung

Herunterregulierung von p34cdc2 und Cyclin B1

Erhöhung von intrazellulärem NOS (Nitric Oxigen Synthase) und NO

Hemmung der Superoxiddismutase

Senkung der Il-6-Sekretion

Tab. 8: Bislang untersuchte Wirkmechanismen von 2-ME auf Tumorzellen

5.4.1. Hemmung der Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase ist ein essentielles Enzym, welches in Zellen entstandene Superoxidradikale zu H_2O_2 reduziert und anschließend durch eine Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff umwandelt. Die Superoxidradikale gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies, welche die Zellen schädigen und so Apoptose induzieren können. Schon geringe Mengen dieses Enzyms können Zellen und damit auch Tumorzellen vor den schädigenden Einflüssen schützen, sind verantwortlich für die Resistenz der Tumorzellen gegen bestimmte Chemotherapeutika und

verhindern die Oncogen-induzierte Apoptose (Pani et al.2004) . Dieser Umstand macht die Tumorzellen abhängig von dem Vorhandensein dieses Enzyms.

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass 2-ME zur Hemmung dieses Enzyms führt, und es somit zur Akkumulation des zellulären reaktiven Sauerstoffs kommt. Dies führt zur Schädigung der Mitochondrienmembranen, zur Freisetzung von Cytochrom c, welches die Caspase 9 und 3 aktiviert und so die Apoptose der Tumorzellen induziert (Huang et al. 2000; Jakub et al. 2003; Pani et al. 2004).

Huang et al. zeigte diesen Effekt in seiner Studie an Leukämiezellen und normalen Lymphozyten, wobei das Wachstum der malignen Zellen wesentlich durch die Hemmung der Superoxiddismutase beeinträchtigt wurde, die normalen Lymphozyten blieben zum größten Teil unbeeinflusst.

5.4.2. Senkung der IL-6-Sekretion

Chauhan et al. (2002) untersuchte in seiner Studie die Wirksamkeit von 2-ME auf multiresistente multiple myeloische Zellen. Die Untersuchungen ergaben, dass 2-ME das Wachstum der malignen Zellen signifikant beeinträchtigt und somit einen Mechanismus überwindet, welcher vorher für den Erfolg anderer Chemotherapeutika ein Hindernis darstellte.

Eine Überwältigung des Resistenzmechanismus wurde in der Beeinflussung der IL-6-Sekretion der Knochenmarkstromazellen gesehen. So kommt es durch Adhäsion multipler myeloischer Zellen an Knochenmarkstromazellen zu einer Sekretion von verschiedenen Faktoren wie IL-6. Ein hoher Serumwert von IL-6 allerdings trägt zur klinischen Chemoresistenz und zum Scheitern von Behandlungen bei (Kyrstsonis et al.1996).

Deshalb untersuchte Chauhan et al. den Einfluss des 2-ME auf die IL-6-Sekretion und stellte fest, dass 2-Methoxyestradiol die adhäsion-induzierte IL-6-Sekretion senkt und so die Chemoresistenz der malignen Zellen überwindet. Inwieweit es bei Pankreas- und Magenkarzinomen zu einer erhöhten IL-6-Sekretion kommt und ob dieser Mechanismus dann eine Bedeutung bei multiresistenten Zelllinien hat, muss noch geklärt werden.

5.5. Toxizität von 2-ME

Turner et al. 2000 untersuchte in einer Studie die Wirkung des 2-ME auf das Knochenwachstum in 3 Monate jungen weiblichen Ratten. Seine Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit 2-ME für 13 Tage in einer Dosis von 100 mg/kg/d das Längenwachstum der Knochen erheblich beeinträchtigte, während das radiäre Knochenwachstum unbeeinflusst blieb. Ein Hinweis darauf, dass 2-ME in der Lage ist, zwischen schnell proliferierenden Chondroblasten, wie sie in der Längenwachstumszone des Knochens zu finden sind und zwischen geringer proliferierenden Osteoblasten differenzieren kann. Die Inhibition des Längenwachstum ist dabei möglicherweise auf die Hemmung der Angiogenese zurückzuführen (Turner et al. 2000).

Diese Beobachtung sollte besonders beim Einsatz von 2-ME bei schwangeren Frauen bzw. Kindern bedacht werden, wo das Längenwachstum noch nicht abgeschlossen ist.

In einer weiteren Studie an Hamsterembryofibroblasten in vitro beobachtete man eine karzinogene Wirkung von 2-ME. Dabei kam es zu Chromosomenaberrationen und Chromosomenbrüchen schon in Dosen ab 0,3 µg/ml 2-ME.

Damit scheint 2-ME genotoxisch auf kultivierte embryonale Säugetierzellen zu wirken.

Das weist auf eine mögliche Fruchtschädigung in vivo unter einer Behandlung mit 2-Methoxyestradiol hin, allerdings wurde dieser Effekt des 2-ME nur in dieser Studie beobachtet. Schwangere Frauen sollte man bei den klinischen Versuchen auf jeden Fall ausschließen.

5.6. Klinischer Einsatz von 2-ME

Der Einsatz des 2-Methoxyestradiol am Menschen erfolgte bereits in einigen ausgewählten Studien an Patienten, allerdings nur in den USA, da 2-ME unter dem Namen PanzemTM durch die US amerikanische Firma EntreMed vertrieben wird.

Tabelle Nr. 9 zeigt eine Übersicht über die derzeit laufenden klinischen Studien.

Ort der Studie	Tumortyp	Phase
Mayo Clinic, Rochester, MN Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA	Multipl. Myelom	II
National Cancer Institute, Bethesda, MD	Fortgeschrittene solide Tumoren	I
Mayo Clinic, Rochester, MN	Fortgeschrittene solide Tumoren	I
Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN	Metastasierendes Mamma-Ca	I
University of Wisconsin, Madison, WI Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN	Prostata-Ca	II

Tab. 9: Kliniken der USA, in denen derzeit klinische Phase I oder Phase II Studien mit 2-ME durchgeführt werden.

Die Phase I der Mammakarzinomstudie und die Phase II der Prostatakarzinomstudie sind bereits abgeschlossen und einige Ergebnisse der Mammakarzinomstudie wurden beim Jahreskongress 2002 der American Association of Clinical Oncology (ASCO) vorgestellt (Sledge et al. 2002).

Es wurden Patientinnen mit vorbehandeltem metastasierendem Mammakarzinom behandelt.

2-ME wurde oral einmal (200–1000mg/Tag) oder zweimal täglich (200–800mg/12h) verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug 28 Tage, gefolgt von einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Die maximalen Serumspiegel von 2-ME wurden 2-4 Stunden nach Applikation gemessen, wobei eine Akkumulation von 2-ME nach täglich einmaliger Gabe nicht zu verzeichnen war, allerdings in den ersten Tagen bei der täglichen zweimaligen Gabe. Die Halbwertszeit von 2-ME lag bei ca. 10 Stunden. Die Behandlung wurde von den Patientinnen gut vertragen und es konnten auch keine Veränderungen des Östrogenspiegels, des LH oder des FSH beobachtet werden.

Mit diesen guten Ergebnissen wurde eine zweite Studie durchgeführt, mit einer Kombination aus 2-ME und Docetaxel als Phase I Studie, ebenfalls beim metastasierenden Mammakarzinom an der Indiana Universität in Indianapolis (Miller et al. 2002).

Dabei wurde Docetaxel wöchentlich in 4 von 6 Wochen und 2-ME einmal täglich oral verabreicht.

Auch hier wurde die Behandlung gut vertragen, verschiedene Nebenwirkungen traten auf in unterschiedlicher Ausprägung, jedoch nie schwere Nebenwirkungen, die zum Abbruch führten. Erwähnt seien hierbei Müdigkeit, Durchfall, Übelkeit, Myalgien, Haarausfall, Obstipation und Kopfschmerzen.

Bei sehr wenigen Patienten kam es zu erhöhten Leberwerten, welche sich aber nach Absetzen des 2-ME rasch wieder normalisierten.

Die Auswertungen zeigten, dass nur bei einem Drittel der Patientinnen eine Tumorprogression auftrat.

Ähnliche Verträglichkeiten und Nebenwirkungen konnten bei der Prostatakarzinomstudie beobachtet werden (EntreMed). Bei vielen Patienten kam es zur Stabilisierung und zum Rückgang des PSA, sowie zu einer Abnahme der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF im Plasma um bis zu 55% nach dreimonatiger Behandlungszeit mit 2-ME.

Diese Studien und die bereits vorhandenen Ergebnisse zeigen, dass 2-ME eine Substanz zu sein scheint, welche in der Klinik ihre Indikation und Anwendung finden wird.

Es sollten weitere Untersuchungen in Kombinationen mit anderen Zytostatika durchgeführt werden, da auch hier vielversprechende additive Wachstumshemmungen in vitro beobachtet wurden, so z.B. beim Hepatozellulären Karzinom nach Behandlung mit 2-ME mit Gemcitabine kombiniert (Schumacher et al. 2003).

Auch beim Pankreas- und Magenkarzinom sollte eine klinische Studie initiiert werden, da außer einer kurativen Operation keine zufriedenstellende Chemotherapie existiert.

6. Zusammenfassung

Das Magen – und Pankreaskarzinom, beides sehr aggressive Tumore, stehen in der Krebstodesursachenstatistik auf Platz vier und fünf in der Bundesrepublik Deutschland. Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms nimmt sogar stetig zu, während die des Magenkarzinoms rückläufig ist, aber trotz dieser Rückläufigkeit macht die Stellung des Tumors in der Krebstodesursachenstatistik deutlich, wie aggressiv das Karzinom ist und wie wenig wirklich effektive, kurative Therapieoptionen es für beide Karzinomarten doch gibt. Die einzige kurative Therapiemöglichkeit für sowohl Magen- als auch Pankreaskarzinom stellt die chirurgische Resektion dar, welche allerdings bei beiden Tumoren durch fortgeschrittene Tumorstadien bei Erstdiagnose und ausgedehnten Metastasierungen limitiert wird. Als weitere Möglichkeit besteht noch die adjuvante bzw. palliative Chemotherapie, welche auch in ihrer Ausschöpfung durch toxische Nebenwirkungen und bestehende Resistenzen der Krebszellen gegen eine Vielzahl von Zytostatika begrenzt ist.

Deshalb besteht der Wunsch nach einer Therapie, welche sowohl tumorhemmend und gering toxisch wirkt und möglicherweise sogar die Resistenzmechanismen der Krebszellen überwindet.

2-Methoxyestradiol ist ein Hormon, welches hauptsächlich in der Leber durch Metabolisierung von Östradiol entsteht und physiologischerweise im Urin ausgeschieden wird. Die inhibitorische Wirkung des 2-ME auf das Tumorzellwachstum wurde erfolgreich in zahlreichen Studien auf viele verschiedene Tumorarten untersucht und nachgewiesen, so dass dies auch für das Magen – und Pankreaskarzinom, möglicherweise sogar für die multiresistenten Karzinomzellen, eine weitere Therapieoption darstellen könnte.

Die bisher durchgeführten in vitro und in vivo Experimente zeigten gute tumorhemmende Eigenschaften des 2-ME, wie Proliferationshemmung und Hemmung der Neovaskularisation, welche auf zahlreiche verschiedene Induktionswege des 2-ME zurückzuführen sind.

Dass das 2-ME auch das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen (Schumacher et al.) und Magenkarzinomzellen (Lin et al.) hemmt, wurde schon in einigen Studien nachgewiesen. Wir aber stellten uns die Frage, ob 2-ME auch eine ebenso wirksame Hemmung auf multiresistente Magen – und Pankreaskarzinomzellen zeigt und somit als weitere Therapieoption in Frage kommen könnte.

Dazu führten wir verschiedene in vitro Experimente durch, welche unter dem Vergleichsaspekt Wirkung des 2-ME auf sensible und multiresistente Karzinomzellen betrachtet und untersucht wurden.

Dazu wurde zunächst eine Proliferationsanalyse von jeweils einer sensiblen und zwei multiresistenten Zelllinien der Magen – und Pankreaskarzinomzellen durchgeführt. Ziel dieser Proliferationsanalyse war es, herauszufinden, ob die Substanz 2-ME die Resistenzmechanismen der multiresistenten Karzinomzelllinien überwindet und das Tumorzellwachstum zu hemmen vermag. Die Wachstumsanalysen aller drei Zelllinien der beiden Karzinome zeigten nach 5tägiger Behandlungsdauer mit 2-ME eine dosisabhängige Proliferationshemmung, welche teilweise bis zu 98 % erreicht werden konnte.

Diese Ergebnisse gaben Anlass zu weiteren Experimenten, wo der qualitative und quantitative Apoptosenachweis im Mittelpunkt stand.

Als nächstes stellten wir die Zellzyklusphasen mittels einer FACS-Analyse dar. Dadurch konnte geklärt werden, ob die Proliferationshemmung der Karzinomzellen durch Apoptoseinduktion oder Zellzyklusarrest geschieht. Tatsächlich konnte in den FACS-Analysen bei allen drei Zelllinien des Magen – und Pankreaskarzinoms eine Zunahme der sub – G1 – Phase beobachtet werden, welche die Menge der fragmentierten DNA darstellt, was einer Wachstumsinhibition durch Induktion der Apoptose entspricht. Ein Hinweis auf einen möglichen Zellzyklusarrest durch Zunahme der G1 – Phase oder G2/M - Phase konnte nicht erbracht werden.

Ein weiterer Apoptosenachweis erfolgte in der Anfärbung der Zellkerne der behandelten und nicht behandelten Zelllinien mittels eines Hoechst - Fluoreszenzfarbstoffes. Da der Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA interkaliert, war es möglich, nach Behandlung der Karzinomzellen mit 2-ME unter einem DAPI-Filter deutliche morphologische Veränderungen der Zellkerne nachweisen zu können. Veränderungen wie Zellschrumpfung, nukleäre Fragmentation mit Chromatinkondensation oder Bildung von sogenannten Apoptotic bodies weisen auf apoptotische Zellen hin. Diese Veränderungen wurden durch Mikroskopaufnahmen von zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern dargestellt.

Zur quantitativen Darstellung des Verhältnisses gesunder und apoptotischer Zellen in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsdosen und Behandlungsdauer erfolgte eine Zellzählung und eine Darstellung im Balkendiagramm. Bei allen drei Zelllinien des Magen – und Pankreaskarzinoms konnte eine Zunahme apoptotischer Zellen der behandelten Gruppe im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe verzeichnet werden.

Ebenfalls wurden von allen Zelllinien nach Behandlung mit 2-ME bzw. mit Kontrollsubstanz Medium und 16-E Nativaufnahmen angefertigt und ausgewählte Beispiele dargestellt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sprechen für die wachstumshemmende Wirkung des Östrogen-Derivates 2-ME auf sowohl sensible und multiresistente Magen – und Pankreaskarzinomzellen. Durch diese nachgewiesene Proliferationshemmung könnte das 2-Methoxyestradiol als mögliche Therapiemedikation bei der Behandlung der Pankreas – und Magenkarzinome, auch bei der Behandlung bereits therapieresistenter Pankreas – und Magenkarzinome, bedacht werden. Es muss jedoch bedacht werden, dass hiermit die Wirkung des 2-ME für die Behandlung gerade der multiresistenten Zelllinien *in vivo* noch nicht nachgewiesen ist, was natürlich noch hinsichtlich des Ausmaßes der Proliferationshemmung und der dabei notwendigen Dosierungen hinreichend geklärt werden muss.

Auch müsste die Wirkung des 2-ME auf den restlichen Organismus in Tierexperimenten bzw. ersten klinischen Studien beobachtet werden, um mögliche toxische Nebenwirkungen bzw. hemmende Wirkungen des 2-ME auf normales Pankreas – und Magengewebe bzw. schnell proliferierendes Gewebe wie Gastrointestinaltrakt, Knochenmark und Haarfollikel nachweisen zu können.

Auch wenn die zuletzt genannten Versuche noch nicht durchgeführt sind, so lässt sich doch aus den Erfahrungen anderer Tierexperimente bzw. erste klinische Studien an anderen Tumorarten eine gute Prognose für die Verträglichkeit des 2-ME im menschlichen Organismus vorhersagen. Unklar ist jedoch noch, ob die proliferationshemmende Wirkung *in vivo* mit der *in vitro* korreliert.

Trotzdem ist mit dem erfolgreichen Nachweis der Wachstumshemmung multiresistenter Pankreas – und Magenkarzinomzellen ein erster Schritt in Richtung erweiterte Therapieoptionen getan. Spätere Einsatzgebiete könnten in einer Monotherapie oder Kombinationstherapie liegen, wobei gerade auch die Kombinationstherapie sehr vielversprechend ist, auf grund der synergistischen Wirkung des 2-ME mit anderen Behandlungsoptionen wie z.B. Bestrahlung oder Photodynamische Therapie.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes für Pathologie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn PD Dr. H. Lage, welche stets mit Rat und Hilfe zur Seite standen und die Arbeit im Labor möglich machten. Ebenso möchte ich Herrn Dr. T. Cramer danken, welcher mit Enthusiasmus und Hilfsbereitschaft unsere neuen Ideen aufgriff und Konzepte zur Verwirklichung entwarf.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Guido Schumacher, und dessen stetige Motivation und Engagement.

8. Literatur

1. Wyllie A.H. et al Cell death: the significance of apoptosis. *International Reviews of Cytology* 68: 251-305 (1980)
2. von Knebel Doeberitz M. und C. : Störungen des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes – Ursachen der Tumorentstehung. *Chirurg Gastro* 1999; 15: 120-127
3. Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen , Sept. 2001
4. Deutsches Krebsforschungsinstitut Heidelberg (DKFZ)
5. *Medicine – Worldwide ,Onkologie, Das Pankreaskarzinom*
6. Interdisziplinäre Leitlinie Pankreaskarzinom
7. M. Müller – Lehrbuch der Chirurgie 2004/ 05, 7.Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach
8. Robert F. Service, New role for estrogens in cancer ? *Science*, Vol 279, Issue 5357, 1631-1633, 13 March 1998
9. James D. Yager , Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation *J Natl Cancer Inst* No. 27, 2000 p 67-73
10. Jefcoat R., Liehr G., Santen J., Sutter R., Yager D., Wie Yue, Santner J., Tekmal R., Demers L., Pauley R., Naftolin F., Mor G., Berstein L. , Tissue-specific synthesis and Oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst* No. 27, 2000 p 95-112
11. Liehr JG, Fang WF, Sirbasku DA, Ari-Ulubelen A., Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem.* 1986 Jan;24(1): 353-6 (Abstract)
12. Yager JD, Liehr JG, Molecular mechanism of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:203-32 (Abstract)
13. Emminger H.A. , Exaplan, Kompendium der klinischen Medizin. 4.Auflage, Verlag Urban& Fischer
14. Löffler, Petrides, Biochemie und Pathobiochemie. 6.Auflage, Springer-Verlag
15. Mooberry SL., Mechanism of action of 2-methoxyestradiol : new developments. *Science*, Vol.6, Issue 6, Dec 2003, p 355-361
16. Schumacher G., Neuhaus P., The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* (2001) 127: 405-410
17. Pribluda VS., Gubish ER., Jr., La Vallee TM., Treston A., Swartz GM., Green SJ., 2-methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate. *Cancer and Metastasis Review* 19: 173-179, 2000

18. Chauhan D., Catley L., Hideshima T., Li G., Leblanc R., Gupta D., Sattler M., Richardson P., Schlossman RL., Podar K., Weller E., Munshi N., Anderson KC., 2-methoxyestradiol overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood*, Sept. 2002, Vol.100, Number 6
19. Schumacher G., Kataoka M., Roth JA., Mukhopadhyay T., Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Can Res* Vol.5, 493 – 499, March 1999
20. Lin HL., Liu TY., Wu CW., et al., 2-methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells. *Cancer (United States)*, Aug 1 2001, 92(3) p 500-509
21. La Vallee TM., Zhan XH., Herbstritt CJ, et al., 2-methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res (United States)*, Jul 1 2002, 62 (13) p 3691-7
22. Kiuru PS., Wahala K., Short synthesis of 2-methoxyestradiol and 2-hydroxyestradiol *Steroids (United States)*, Apr 2003, 68(4) p 373-5
23. Suzuki RN., Newman SP., Purohit A., Leese MP., Potter BVL., Reed MJ, Growth inhibition of multi-drug-resistant breast cancer cells by 2-methoxyestradiol-bis-sulphamate and 2-ethylestradiol-bis-sulphamate. *J Steroid Biochem & Molec Biology* 84 (2003) 269-278
24. Böcker , Denk , Heitz , Pathologie , 3. Auflage, Verlag Urban & Fischer
25. Ormerod, M.G. , Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry . *J Immunological Methods* 265 (2002) 73-80
26. Ormerod, M.G. , Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade. *Redox Report* 6, 275 – 287 (2001)
27. Schumacher G., Kataoka M., Roth JA., Mukhopadhyay T., 2-Methoxyestradiol induces p53 independent apoptosis in pancreatic carcinoma and inhibits growth of lung metastasis. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998; 115 (Abstract)
28. Qanungo S., Basu A., Das M., Haldar S., 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene (2002)* 21, 4149 – 5157
29. Goldstein L.J. Clinical reversal of drug resistance. *Curr Probl Cancer.* 1995 Mar-Apr; 19(2): 65-124

30. Ryschisch E., Werner J., Gebhard M.M., Klar E., Schmidt J., Angiogenesis inhibition with TNP-470, 2-Methoxyestradiol, and Paclitaxel in experimental pancreatic cancer. *Pancreas* Vol. 26, No.2, pp. 166 – 172 (2003)
31. Zhi-Jian Liu, Bao Ting Zhu, Concentration – dependent mitogenic and antiproliferative actions of 2-Methoxyestradiol in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 88 (2004) 265-275
32. Lottering M.-L., Kock de M., Viljoen T. C., Grobler C., Seeger J. C., 17 β -Estradiol metabolites affect some regulators of the MCF-7 cell cycle. *Cancer Letter* 110 (1996) 181 – 186
33. Han G.-Z., Liu Z.-J., Shimoi K., Zhu B.T., Synergism between the anticancer actions of 2-Methoxyestradiol and microtubule – disrupting agents in human breast cancer. *Cancer Research* 65, 387-393, January 15, 2005
34. Zhu B.T., Conney A.H., Is 2-Methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis ? *Cancer Research* 1998, Jun 1, 58(11) : 2269 – 77 (Abstract)
35. Lottering M.L., Haag M., Seegers J.C., Effects of 17 β -Estradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Research* 1992 Nov 1; 52(21): 5926-32 (Abstract)
36. Chauhan D., Li G., Auclair D., Hideshima T., Richardson P., Podar K., Mitsiades N., Mitsiades C., Li C., Kim R.S., Munshi N., Chen L.B., Wong W., Anderson K., Identification of genes regulated 2-Methoxyestradiol in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Blood*, 1 May 2003, Vol. 101, Number 9
37. Dobos J., Timár J., Bocsi J., Burián Z., Nagy K., Barna G., Peták I., Ladányi A., In vitro and in vivo antitumor effect of 2-Methoxyestradiol on human melanoma. *International Journal of Cancer*, Vol. 112, Issue 5, pp. 771-776
38. Tinley T.L., Leal R.M., Randall-Hlubek D.A., Cessac J.W., Wilkens L.R., Rao P.N., Mooberry S.L., Novel 2-Methoxyestradiol analogues with antitumor activity. *Cancer Research* 63, 1538-1549, April 1, 2003
39. Qadan L.R., Perez-Stable C.M., Anderson C., D'Ippolito G., Herron A., Howard G.A., Roos B.A., 2-Methoxyestradiol induces G2/M- arrest and apoptosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 1259-1266 (2001)
40. Ireson C.R., Chander S.K., Purohit A., Perera S., Newman S.P., Parish D., Leese M.P., Smith A.C., Potter B.V., Reed M.J., Pharmacokinetics and efficacy of 2-Methoxyestradiol and 2-Methoxyestradiol-bis-sulphamate in vivo in rodents. *Br J Cancer* 2004, Feb 23; 90 (4): 932-7 (Abstract)

41. Newman S.P., Leese M.P., Purohit A., James D.R.C., Rennie C.E., Potter B.V., Reed M.J., Inhibition of in vitro angiogenesis by 2-Methoxy- and 2-ethyl-estrogen sulfamates. *Int. J Cancer* : 109, 533-540 (2004)
42. Berg F.D., Kuss E., Serum concentration and urinary excretion of „classical” estrogens, catecholestrogens and 2-methoxyestrogens in normal human pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 1992; 251 (1): 17-27 (Abstract)
43. Pani G., Colavitti R., Bedogni B., Fusco S., Ferraro D., Borrello S., Galeotti T., Mitochondrial superoxid dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Curr Med Chem.* 2004 May, 11 (10): 1299-308 (Abstract)
44. Huang P., Feng L., Oldham E.A., Keating mJ., Plunkett W., Superoxid dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407, 390-395 (21 Sept. 2000)
45. Golab J., Nowis D., Skrzycki M., Czczot H., Baránczyk-Kuzma A., Wilczyński G.M., Makowski M., Mróz P., Kozar K., Kaminski R., Jalili A., Kopec M., Grzela T., Jakóbiński M., Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-Methoxyestradiol. *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 1, 407- 414, January 3, 2003
46. Seegers J.C., Lottering M.-L., Grobler C.J.S., van Papendorp D.H., Habbersett .C., Shou Y., Lehnert B.E., The mammalian metabolite, 2-Methoxyestradiol, affects p53 levels and apoptosis induction in transformed cells but not in normal cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 62, No.4, pp. 253-267, 1997
47. Turner R.T., Evans G.L., 2-Methoxyestradiol inhibits longitudinal bone growth in normal femal rats. *Cacif Tissue Int* (2000) 66: 465-469
48. Tsutsui T., Tamura Y., Hagiwara M., Miyachi T., Hikiba H., Kubo C., Barrett J.C., Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-Methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis* Vol. 21, No. 4, pp. 735-740, 2000
49. Huober J.B., Nakamura S., Meyn R., Roth J.A., Mukhopadhyay T., Oral administration of an estrogen metabolit-induced potentiation of radiation antitumor effects in presence of wild-type p53 in non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 48, No. 4, pp. 1127-1137, 2000
50. Sledge G.W., Miller K.D., Haney L.G., Nguyen D.D., Storniolo A.M., Phillips E.N., Pribluda V., Gubish E.R., A Phase I Study of 2-Methoxyestradiol in patients with refractory metastatic breast cancer. Indiana University, Indianapolis; EntreMed

51. Wilding G., Sweeney C., King D.M., Horvath D., Staab M.J., Fife K., Armstrong V., Soriano J.V., Pribluda V.S., Gubish E.R., Sidor C., Phase II multicenter, randomized, double-blind, safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy study of two doses of 2-Methoxyestradiol administered orally in patients with hormone refractory prostate cancer. University of Wisconsin, Madison; EntreMed
52. Ibelgauft H., Cytokines online pathfinder encyclopaedia: Apoptosis and Apoptotic bodies
53. Harris J., Bruckner H., Adjuvant and neoadjuvant therapies of pancreatic cancer: a review. *Int J Gastrointest Cancer* 2001; 29 (1): 1-8 (Abstract)
54. Delpero J.R., Surgical resection of pancreatic adenocarcinoma: indications and contraindications, prognostic factors and survival, recent advances. *Cancer Radiother.* 2004, Nov; 8 Suppl 1: S 73-9 (Abstract)
55. Flandin I., Mornex F., Claude L., Kubas A., Khodri M., Wautot V., Mazon R., Partensky C., Chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Radiother.* 2004, Nov; 8 Suppl 1: S 80-7 (Abstract)
56. Ziehl H., Finke W. Increased Risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 1975, Dec 4;293 (23): 1167-70
57. Maran A., Zhang M., Kennedy A., Sibonga J., Rickard D., Spelsberg T., Turner R. 2-methoxyestradiol induces interferon gene expression and apoptosis in osteosarcoma cells. *Bone* 2002 Feb;30(2):393-8
58. McDonald T., Annegers J., O'Fallon W., Dockerty M., Malkasian G. Jr, Kurland L. (1977) Exogenous estrogen and endometrial carcinoma: casecontrol and incidence study. *Am J Obstet Gynecol.* Mar 15;127(6):572-80.
59. Pike M., Spicer D., Dahmouch L, Press M. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.*(1993);15(1):17-35. Review. No abstract available
60. Feigelson H., Henderson B. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis.* (1996) Nov;17(11):2279-84. Review. No abstract available.
61. Pribluda V., Green S. (1998) A good estrogen. *Science*;280:987-988
62. Merriam G.R., MacLusky N.J., Picard M.K., Naftolin F. Comparative properties of the catechol estrogens, I: Methylation by catechol-o-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors. *Steroids* 1980: 36(1): 1-11
63. Seegers J.C., Aveling M.L., Van Aswegen C.H., Cross M., Koch F., Joubert W.S. The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestrogens and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J Steroid Biochem.* (1989) Jun;32(6):797-809

64. Cushman M., He H.M., Katzenellenbogen J.A., Lin C.M., Hamel E. Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *J Med Chem.* (1995) Jun 9;38(12):2041-9.
65. Wang S.H., Myc A., Koenig R.J., Bretz J.D., Arscott P.L., Baker J.R.. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces thyroid cell apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 165(1-2): 163-172.
66. Klauber N., Parangi S., Flynn E., Hamel E., D'Amato R.J. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-Methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* (1997) Jan 1;57(1):81-6
67. Lin H.L., Liu T.Y., Chau G.Y., Chi C.W. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 2000; 89(5): 983-994
68. Nakagawa-Yagi Y., Ogane N., Inoki Y., Kitoh N. The endogenous estrogen metabolite 2-methoxyestradiol induces apoptotic neuronal cell death in vitro. *Life Sci* (1996) ; 58(17):1461-7
69. Bu S., Blaukat A., Fu X., Heldin N.E., Landstrom M. Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett* 2002 Nov 6;531(2):141-51
70. Maran A., Zhang M., Kennedy A.M., Sibonga J.D., Rickard D.J., Spelsberg T.C., Turner R.T. 2-methoxyestradiol induces interferon gene expression and apoptosis in osteosarcoma cells. *Bone* 2002 Feb;30(2):393-8
71. Clarke P. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanism. *Anat. Embryology* 181: 195-213 (1990)
72. Denecker G. et al Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cellular and Molecular Life Science* 58(3): 356-70 (2001)
73. Ranganath R.M., Nagashree N.R. Role of programmed cell death in development. *International Reviews of Cytology* 20: 2159-242 (2001)
74. Gatti L., Zunino F. Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanism
Volume II: In Vivo Models, Imaging, and Molecular Regulators, pps. 127-148, Febr. 2005
75. Kaye S.B. Clinical drug resistance: the role of factors other than P-glycoprotein
Am J Med. 1995 Dec. 29;99(6A): 40S-44S
76. Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors.
Brain Res Brain Res Rev. 2001 Apr ; 35(2) :161-204

77. Tolomeo M., Simoni D. Drug resistance and apoptosis in cancer treatment: development of new apoptosis-inducing agents active in drug resistant malignancies.

Curr Med Chem Anticancer Agents. 2002 May; 2(3): 387-401

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Janine Siebert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Apoptoseinduktion bei multiresistenten Magen- und Pankreaskarzinomzellen durch 2-Methoxyestradiol“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Publikationsliste

Originalarbeit

Schumacher G, Siebert J, Cramer T, Spinelli A, Jacob D, Bahra M, Pratschke J, Pfitzmann R, Schmidt S, Lage H. Antineoplastic activity of 2-Methoxyestradiol in human pancreatic and gastric cancer cells with different multidrug-resistant phenotypes. J Gastroenterol Hepatol 2007 Sep;22(9):1469-73.

Abstract Publikation

Guido Schumacher, Janine Siebert, Hermann Lage, Jan M. Langrehr, Antonino Spinelli, Peter Neuhaus. 2-Methoxyestradiol induces strong apoptosis in multi-drug-resistant human pancreatic cancer and gastric cancer cells. Proc Amer Assoc Cancer Res 2005;46:[Abstract #]

Poster

Guido Schumacher, Janine Siebert, Hermann Lage, Jan M. Langrehr, Antonino Spinelli, Peter Neuhaus. 2-Methoxyestradiol induces strong apoptosis in multi-drug-resistant human pancreatic cancer and gastric cancer cells. Annual meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, USA; Apr 17; 2005.