

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele

**Differentielle Effekte einer PPAR γ -Aktivierung mit Pioglitazon in der
Barrettadenokarzinomzelllinie OE33 in vitro und in vivo**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Tilmann Graf

aus Göttingen

Würzburg, Januar 2007

Referent: Prof. Dr. med. J. Seufert

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2007

Der Promovend ist Arzt.

TABELLENVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 PPARγ.....	1
1.1.1 Struktur, Expression und Funktion	1
1.1.2 Wirkung auf Proliferation und Apoptose in malignen Tumoren	2
1.2 Barrett-Ösophagus und Barrettkarzinom.....	2
1.2.1 Epidemiologie und Pathogenese	2
1.2.2 COX-2, PPAR γ und Barrett-Ösophagus.....	3
1.3 Fragestellungen.....	4
2 MATERIAL UND METHODEN.....	5
2.1 Material.....	5
2.1.1 Biopsieproben	5
2.1.2 Zelllinien.....	5
2.1.2.1 OE33	5
2.1.2.2 Kyse-180	5
2.1.3 Balb/c nu/nu Mäuse	6
2.1.4 Verbrauchsmaterial und verwendete Reagentien	6
2.2 Methoden	10
2.2.1 Zellkultur und Stimulation mit Pioglitazon	10
2.2.2 RNA-Extraktion und reverse Transkription	10
2.2.3 kompetitive Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	11
2.2.4 Protein-Extraktion	13
2.2.5 Immunpräzipitation.....	14
2.2.6 Western Blot	14
2.2.7 Immunzyto- und histochemie	15

2.2.8 Proliferationsassay.....	16
2.2.9 FACS-Untersuchungen.....	16
2.2.9.1 Zellstimulation	16
2.2.9.2 Apoptose	16
2.2.9.3 Proliferation	17
2.2.10 Apoptoseanalyse mit Caspase3 Detektion	17
2.2.11 In vivo Stimulation von OE33-Zellen	18
2.2.12 Statistik	19
3 ERGEBNISSE.....	20
3.1 PPARγ-Expression	20
3.1.1 PPAR γ -Protein-Expression	20
3.1.2 PPAR γ 1-mRNA-Expression	21
3.2 In vitro Stimulation mit Pioglitazon von OE33 und Kyse-180.....	22
3.2.1 Kumulative Zellzahl.....	22
3.2.2 Apoptose und Proliferation nach <i>in vitro</i> Stimulation.....	24
3.3 In vivo Stimulation mit Pioglitazon von OE33.....	27
3.3.1 OE33 Barrettkarzinomzellen in Balb/c nu/nu Mäusen.....	27
3.3.2 In vivo Tumorwachstum unter systemischer PPAR γ -Aktivierung	28
3.3.3 Serumlevel von Insulin und Glucose in Balb/c nu/nu Mäusen.....	31
4 DISKUSSION	32
5 ZUSAMMENFASSUNG	38
LITERATURVERZEICHNIS	39
DANKSAGUNGEN	47
LEBENS LAUF	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial..... 6
Tabelle 2: verwendete Geräte 7
Tabelle 3: Puffer 8
Tabelle 4: Verbrauchskemikalien und kommerzielle Assays 9
Tabelle 5: Reaktionsbedingen kompetitive PCR 12
Tabelle 6: Reaktionsansatz kompetitive PCR 12
Tabelle 7: Antikörper für Immunhistochemie 15

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswertung kompetitive PCR.....	13
Abbildung 2: PPAR γ Western Blot von Biopsie- und Zellproben	20
Abbildung 3: Immunhistochmie auf PPAR γ von OE33 und Kyse-180	20
Abbildung 4: kompetitive PCR der Gewebeproben	21
Abbildung 5: kompetitive PCR der Zelllinien.....	22
Abbildung 6: OE33-Zellzahl nach Stimulation mit Pioglitazon	23
Abbildung 7: Kyse-180-Zellzahl nach Stimulation mit Pioglitazon	23
Abbildung 8: Proliferation nach in vitro-Stimulation mit Pioglitazon	24
Abbildung 9: Apoptose nach in vitro-Stimulation mit Pioglitazon	25
Abbildung 10: Caspase3-Aktivität in OE33 nach Behandlung mit Pioglitazon..	26
Abbildung 11: subkutaner OE33-Tumor in Balb/c nu/nu Nacktmaus.....	27
Abbildung 12: Trinkverhalten und Gewichtsverlauf	28
Abbildung 13: Tumorwachstum in Kurz- und Langzeitstudie.....	29
Abbildung 14: KI-67-Immunhistochemie der in vivo-OE33-Tumore.....	30
Abbildung 15: TUNEL-Assay von in vivo-OE33-Tumoren	30
Abbildung 16: Serumspiegel von Insulin und Glucose	31

1 Einleitung

1.1 PPAR γ

1.1.1 Struktur, Expression und Funktion

Der Peroxisomen Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) ist ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptor-Superfamilie, zu der außerdem Rezeptoren für Steroidhormone, Retinsäure, Schilddrüsenhormone und Vitamin D3 gehören¹. Es existieren 2 verschiedene Isoformen von PPAR γ , PPAR γ 1 und PPAR γ 2, die ein Produkt des gleichen Gens sind und durch alternatives Slicing generiert werden. Sie unterscheiden sich nur in den N-terminalen 30 Aminosäuren². Zusätzlich unterscheidet man 6 Domänen, wobei vor allem die DNA-bindende und die Liganden-bindende Domäne zu erwähnen sind³. Nach Aktivierung von PPAR γ kommt es zu einer Dimerisierung mit dem retinoid X receptor α (RXR α) und einer Bindung an responsive DNA-Elemente, um so die Expression von spezifischen Zielgenen zu regulieren^{4, 5}.

Die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ wird durch Liganden-abhängige Art und Weise reguliert. 15-Deoxy- Δ 12,14 Prostaglandin J2 und verschiedene mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden als natürliche Liganden von PPAR γ identifiziert⁶⁻⁸. Zusätzlich existieren synthetische PPAR γ -Liganden, Thiazolidindione wie Pioglitazon und Rosiglitazon, die als antidiabetische Therapeutika klinisch eingesetzt werden.

Im Fettgewebe ist PPAR γ sehr stark exprimiert und fungiert dort als Regulator der Differenzierung von Adipozyten^{9, 10}. Auch in einigen malignen Zellarten wie Liposarkomzellen und Brustkrebszellen findet sich eine starke PPAR γ -Expression, und nach PPAR γ -Aktivierung beobachtet man eine weitere, terminale Differenzierung^{11, 12}. Im Verdauungssystem trifft man eine mittlere Expression von PPAR γ 1 vorrangig im Dickdarm an, wohingegen im Dünndarm niedrige Expressionsraten beobachtet werden. PPAR γ 2 scheint im Verdauungstrakt kaum eine Rolle zu spielen¹³. Über die Expression von PPAR γ im Ösophagus

ist bisher wenig berichtet. In Plattenepithelkarzinomzelllinien des Ösophagus fand sich jedoch in allen untersuchten Zelllinien eine Expression von PPAR γ ¹⁴.

1.1.2 Wirkung auf Proliferation und Apoptose in malignen Tumoren

Mehrere in vitro Studien haben gezeigt, dass eine PPAR γ -Aktivierung das Wachstum unterschiedlicher maligner Tumore wie z. B. Liposarkome¹¹, Mammakarzinome^{12, 15}, kolorektale Karzinome^{16, 17}, Prostata-Karzinome¹⁸, Pankreaskarzinome¹⁹, Magenkarzinome²⁰ und Plattenepithelkarzinome des Pharynx²¹ hemmt. Für diese antineoplastischen Effekte einer PPAR γ -Aktivierung konnten verschiedene Mechanismen identifiziert werden: Induktion von terminaler Differenzierung, Zellzyklusarrest, Apoptose und nicht-apoptotischer Zelltod¹¹⁻²¹.

Zusätzlich zu den Effekten auf Zelldifferenzierung und Tumorstilnwachstum unterdrückt eine PPAR γ -Aktivierung die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, Metalloproteasen und NO-Synthetase²²⁻²⁴. Weiterhin führt eine Behandlung mit PPAR γ -Liganden in Tumorzellen des Kolons zu einer erniedrigten Expression von der Cyclooxygenase 2 (COX-2), ein Protein, das als onkogener Faktor beschrieben ist und in einer Reihe von Tumoren und deren Vorläufern in gesteigerter Expression gefunden wird²⁵. Vor diesem Hintergrund wird PPAR γ als ein neues potentiellcs Ziel für die Therapie von malignen Neoplasien des Menschen diskutiert.

1.2 Barrett-Ösophagus und Barrettkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Pathogenese

Der Barrett-Ösophagus ist eine prä-maligne Metaplasie des distalen Epithels der Speiseröhre mit einer Prävalenz bei über 60-jährigen Personen von ungefähr 1%, wobei Männer im Vergleich zu Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind²⁶. Aus bisher unbekanntcn Gründen ist die Inzidenz in den Industrienationen während der vergangenen Jahrzehnte sprunghaft angestiegen^{27, 28}.

Haupttrisikofaktor für die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus ist der chronische Reflux von duodenalem und gastralem Sekret. Es zeigte sich, dass Pati-

enten mit einem Barrett-Ösophagus überproportional häufig gastro-ösophagealen Reflux, Hiatushernien oder einen verminderten Tonus des unteren Ösophagussphinkters aufweisen²⁹. Histopathologisch ist der Barrett-Ösophagus charakterisiert durch Ersatz von normalem nicht-verhornenden Plattenepithel des distalen Ösophagus durch spezialisiertes, metaplastisches, einschichtig-hochprismatisches Epithel³⁰. Weitere histologische Phänomene dieser Veränderungen sind schleimbildendes Epithel, entero-chromaffine sowie gastrin- und somatostatin-produzierende endokrine Zellen. Selten finden sich auch Paneth-Zellen²⁹. Daher hat sich auch der Term intestinale Metaplasie etabliert. Weiterhin unterscheidet man Barrett-Metaplasien ohne, mit leichtgradigen und mit hochgradigen zellulären Dysplasien³¹. Auf dem Boden dieser Dysplasien kann ein Barrett-Adenokarzinom entstehen, wobei das höchste Risiko für Patienten mit hochgradigen diffusen Dysplasien besteht³². Das Barrett-epithel repräsentiert dabei einen prä-malignen Zustand vor Entwicklung eines Adenokarzinoms des distalen Ösophagus in einer sogenannten Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz³³. Dabei sind die pathogenetischen Mechanismen, die zur Transdifferenzierung des Plattenepithels des Ösophagus zum metaplastischen Barrett-Epithel und zur malignen Transformation zum Barrettkarzinom führen, jedoch nicht verstanden.

1.2.2 COX-2, PPAR γ und Barrett-Ösophagus

Eine Hochregulation der Cyclooxygenase 2 (COX-2) scheint an der Entwicklung von gastro-intestinalen Tumoren beteiligt zu sein³⁴. Auch in der metaplastischen Umwandlung des gesunden Plattenepithels zum Barrett-Ösophagus wird dieses Enzym frühzeitig verstärkt exprimiert³⁵. Diese Hochregulation von der COX-2 kann durch duodenalen und gastralen Reflux induziert werden^{36, 37}, was außerdem durch Hyperproliferation und PGE2-Freisetzung begleitet wird³⁸. Behandlung mit COX-Inhibitoren führt zu einer erniedrigten Inzidenz von Tumoren in einem Tiermodell für das Barrettadenokarzinom³². Unter einer Stimulation von PPAR γ sind die Expressionsraten der COX-2 in humanen Colon-Ca-Zellen

rückläufig²⁵. Doch bisher ist nicht klar, welche Rolle PPAR γ und dessen Stimulation im Barrett-Ösophagus und Barret-Adenokarzinom zukommen könnte.

1.3 Fragestellungen

In dieser Studie sollte geprüft werden, welche Rolle PPAR γ im Epithel des gastro-ösophagealen Übergangs zukommt. Dazu wurden Gewebeproben von Patienten mit Barrett-Ösophagus und die Barretadenokarzinomzelllinie OE33 sowie die Plattenepithelkarzinomzelllinie des Ösophagus Kyse-180 auf Expression von PPAR γ untersucht. Weiterhin wurden in vitro-Experimente nach Stimulation von PPAR γ durch das Thiazolidindion Pioglitazon zur Erhebung von Effekten auf Apoptose und Proliferation durchgeführt. Für die Übertragung dieser Ergebnisse auf ein in vivo-Modell wurden aus der Barretadenokarzinomzelllinie OE33 solide Tumore generiert und diese in Balb/c nu/nu Nacktmäuse transplantiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biopsieproben

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurden Biopsieproben aus gesunder Magen- und Ösophagusschleimhaut sowie von metaplastischem Barrett-epithel von 7 Patienten während Routineendoskopien zu diagnostischen und wissenschaftlichen Untersuchungen entnommen. Bei allen Patienten wurde vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg eine Zylinderepithel-metaplasie der distalen Ösophagusschleimhaut im Sinne einer Barrettmukosa ohne Dysplasien diagnostiziert. Die zur wissenschaftlichen Analyse auf PPAR γ entnommenen Proben wurden sofort in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 OE33

Die Zelllinie OE33, auch als JROECL33 bezeichnet, wurde von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, United Kingdom) bezogen. Es handelt sich um Zellen eines Barrettdenokarzinom des distalen Ösophagus einer 73-jährigen Patientin. Der Tumor wurde als Stage IIA (UICC) eingestuft und zeigte eine niedrige Differenzierung. Die Zellen wachsen adhärent und haben einen stark aneuploiden Chromosomensatz³⁹.

2.1.2.2 Kyse-180

Die Zelllinie Kyse-180 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen wurden aus einem Plattenepithelkarzinom des mittleren Ösophagus eines 53-jährigen männlichen Patienten isoliert. Der Tumor infiltrierte umgebende Strukturen und zeigte eine hohe Differenzierung. In der Zellkultur wachsen die diploiden Zellen adhärent⁴⁰.

2.1.3 Balb/c nu/nu Mäuse

Balb/c nu/nu Mäuse sind homozygot für das autosomal-rezessive nude-Gen. Sie besitzen kein Fell und es kommt infolge einer T-Zell-Reifungsstörung zu einer Athymie mit einem Fehlen der T-Zellen. Somit wachsen xenogene und autologe Transplantate von normalem und malignem Gewebe in diesem Mausmodell in der Regel gut an und werden nicht abgestoßen.

2.1.4 Verbrauchsmaterial und verwendete Reagentien

Art	Typ	Hersteller
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flasks 75 - 175 scm	BD Falcon
Zellkulturpetrischalen	Tissue Culture Dishes 60 - 100 mm	BD Falcon
Pipettierspitzen	costar 5 - 25 ml	Corning Incorporated
Zellschaber	Zellschaber, steril	Hartenstein
96 Well Platte	PS Microplatte 96 Well	greiner bio-one
96 Well Platte für Zellkultur	TC Microplatte 96 Well, steril	greiner bio-one
Glasobjektträger	SuperFrost plus	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	TipOne RNase/DNasefree	StarLab
Reaktionsgefäß	Easy Cap 1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt
PCR-Röhrchen	PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml	Hartenstein
FACS-Röhrchen	Reagenzgläser, starkwandig	Assistent
Membran für WB Film	Polyvinylidendifluorid-Membran Biomax MR-1	Sigma-Aldrich Kodak

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Art	Typ	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell Function Line	Heraeus Industries
laminar Airflow Arbeitsbank für Zellkultur	Hera Safe	Heraeus Industries
Zentrifuge	centrifuge 5415R	eppendorf
Zentrifuge	Protanta /RPC	Hettich
Mikroskop mit Digitalkamera	Eclipoc TE2000-U DXM 1200	Nikon Nikon
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio-Rad
SDS-PAGE-Kammer	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Blotkammer	Multipler II mit Nova-Blot	Pharmacia Bio Tech
ELISA-Reader	MR5000	Dynatech
FACS	FACScalibur	Becton Dickinson
Photometer	BioPhotometer	eppendorf
Sequenzierer	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermostyler	Gene Amp PCR Systems 9700	Applied Biosystems
Kroystat	HM 500 DM	Micron
Filmentwickler	optimax	Pro Tec
Geldokumentation	Vilber Lourmat	Fröbel Labor Technik
Dispergierer	DIAX 900	Heidolph
Heizblock	Thermomixer compact	eppendorf
Kühlschrank 4° C	Profi Line	Liebherr
Kühlschrank -20° C	Premium	Liebherr
Kühlschrank -80° C	Ultra Low	Genheimer
Kühlschrank -190° C	Espace 660	Air Liquide Kryotechnik
Schieblehre	Präzisionsschieblehre 1/10 mm	Hartenstein
Zählkammer	Neubauer Improved	Marienfeld
Pipette für 10-1000µl	research	eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand

Tabelle 2: verwendete Geräte

Material und Methoden

Puffer	Konzentration	Chemiekalie	Hersteller
RIPA-Puffer	150 mM	NaCl	Merck
	20 mM	Tris-Cl	Roth
	5 mM	NaF	Roth
	1 mM	EDTA	Sigma-Aldrich
	1%	NP-40	Sigma-Aldrich
	1%	DOC	Sigma-Aldrich
	0,1%	SDS	Sigma-Aldrich
ELB-Puffer	100 mM	NaCl	Merck
	5 mM	EDTA	Sigma-Aldrich
	1 mM	PMSF	Sigma-Aldrich
	0,5 mM	DTT	Sigma-Aldrich
	50 mM	Hepes	Sigma-Aldrich
	0,1%	NP-40	Sigma-Aldrich
	1 Tablette	complete Mini ad 10ml	Roche
PBS	137 mM	NaCl	Merck
	2,3 mM	KCl	Merck
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄	Merck
	1,4 mM	KH ₂ PO ₄	Merck
Lade-puffer für WB	20%	Glycerol	Invitrogen Life Technologies
	4%	SDS	Sigma-Aldrich
	0,125 mM	Tris-Cl, pH 6,8	Roth
		Bromphenolblue H ₂ O ad 36 ml	Sigma-Aldrich
Stacking Gel für WB	0,5M	Tris-Cl, pH 6,8	Roth
	375 µl	PAA 30%	Roth
	ad 2,5 ml	Aqua dest.	DeltaSelect
	7,5 µl	APS 40%	Roth
	3 µl	Temed	Roth
Running Gel für WB	1,5M	Tris-Cl, pH 8,8	Roth
	1,65 ml	PAA 30%	Roth
	ad 5 ml	Aqua dest.	DeltaSelect
	15 µl	APS 40%	Roth
	6 µl	Temed	Roth

Tabelle 3: Puffer

	Chemikalie	Hersteller
Verbrauchskemikalien:	Protein-A-Sepharose	Amersham Biosciences
	Tween	Calbiochem
	Aqua dest.	DeltaSelect
	FBS	Invitrogen Life Technologies
	l-Glutamin	Invitrogen Life Technologies
	PBS	Invitrogen Life Technologies
	PenStrep	Invitrogen Life Technologies
	Trypsin.EDTA	Invitrogen Life Technologies
	TRIzol	Invitrogen Life Technologies
	DNase I	Invitrogen Life Technologies
	Superscript II	Invitrogen Life Technologies
	Oligo-(dT)-Primer	Invitrogen Life Technologies
	5x First Strand Buffer	Invitrogen Life Technologies
	DTT	Invitrogen Life Technologies
	HCl	Merck
	KCl	Merck
	MgCl ₂	Merck
	NaOH	Merck
	Chloroform	Roth
	Ethanol	Roth
	Isopropanol	Roth
	Na-Acetat	Roth
	Phenol/Chloroform 3:1	Roth
	Tris-Cl	Roth
	DMSO	Sigma-Aldrich
	normal donkey serum	Sigma-Aldrich
	serum albumin	Sigma-Aldrich
ImmuMount	Shandon	
dNTP-Mix	Takara	
kommerzielle Assays:	Protein Assay	Bio-Rad
	Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit	Calbiochem
	Cell Titer 96 A _{queous} Non-Radioactive Proliferation Assay	Promega
	In Situ Cell Death Detection kit Flourescein	Roche
	AnnexinV Staining Kit	Roche
	BrdU Kit for Flow Cytometry	SpartaLabs

Tabelle 4: Verbrauchskemikalien und kommerzielle Assays

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Stimulation mit Pioglitazon

Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter der laminar Airflow-Arbeitsbank ausgeführt. Beide Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C mit 5-prozentiger CO₂-Atmosphäre in RPMI 1640 mit 10% hitze-inaktiviertem fetalem bovines Serum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei Konfluenz des Zellrasens wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach 2- bis 5-minütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA mit Kulturmedium vom Boden abgelöst. Bei 1.200 rpm abzentrifugiert, wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und die Konzentration der Zellen mit der Zellkammer bestimmt. 10⁴-10⁶ Zellen wurden wieder ausgesät und mit ausreichend Medium bedeckt. Pioglitazon-Reinsubstanz (Takeda) wurde in steril-filtriertem DMSO in einer Konzentration von 300 mM gelöst. Aus dieser Stock-Lösung wurden mit DMSO entsprechende Konzentrationen von 30, 60 und 90 µM Pioglitazon verdünnt, so dass letztendlich entsprechende Volumina zur Stimulation eingesetzt wurden. Als Kontrolle diente jeweils das Vehikel DMSO in äquivalentem Volumen.

2.2.2 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Zur RNA-Isolation wurden die mit PBS gewaschenen Zellen mit 1 ml TRIzol lysiert und mit einem Zellschaber von der Zellkultur-Petrischale abgelöst. Die Biopsieproben von Patienten mit Barrett-Ösophagus wurden ebenfalls in 1ml TRIzol mit Hilfe eines Dispergierers homogenisiert.

Das jeweilige Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Homogenisierung bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Überstand 200 µl Chloroform beigefügt und durch kräftiges Schütteln untergemischt. Nach erneuter Zentrifugation zur Trennung der Phasen wurde die RNA in der oberen, farblosen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zusatz von 500 µl Isopropanol in 10-minütiger Inkubation gefällt. Die RNA wurde nochmals

abzentrifugiert, das Pellet einmalig mit 75-prozentigem Ethanol bei -20 °C gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Danach wurde das RNA-Pellet mit 30 µl Aqua dest. resuspendiert und die Konzentration im Photometer bei 260 nm gemessen.

Zur Elimination einer eventuellen DNA-Kontamination wurde die isolierte RNA mit DNase I in einem Mix aus je 5 µl 0,1 M Tris-Cl, 0,5 M KCl und 15 mM MgCl₂, 40 Einheiten RNase Inhibitor, 10 Einheiten DNase I und Aqua dest. (Gesamtvolumen von 76 µl) verdaut. Nach 30-minütiger Reaktion bei 37° C wurde das Gesamtvolumen auf 300 µl erhöht und durch Zusatz von 200 µl Phenol/Chloroform 3:1 und kräftigem Schütteln die RNA isoliert. Zur Trennung der Phasen erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten und die wässrige, RNA-haltige obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Fällung der RNA durch Zusatz von 25 µl 3 M Na-Acetat und 100-prozentigem Ethanol bei -20 °C wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei -80 °C für 15 Minuten abzentrifugiert und das RNA-Pellet einmalig mit 75-prozentigem Ethanol bei -20 °C gewaschen. Die luftgetrocknete RNA wurde in 20 µl Aqua dest. resuspendiert und die Konzentration erneut photometrisch bei 260 nm gemessen.

Zur cDNA-Synthese mit Superscript II wurden 2 µg der DNase I-verdauten RNA eingesetzt. Nach Zugabe von 500 ng Oligo-(dT)-Primern wurde auf ein Gesamtvolumen von 9 µl aufgefüllt und dieser Mix bei 70 °C für 10 Minuten im Thermalcycler hybridisiert. Danach wurden 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 4 µl 2,5 M dNTP-Mix zugesetzt und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 Einheiten Superscript II beigefügt. Die Proben wurden für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert und nachfolgend bei 70 °C 15 Minuten lang inaktiviert.

2.2.3 kompetitive Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Analyse der Expression von PPAR_γ1 mRNA erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR nach einer bereits beschriebenen Methode⁴¹. Als Sense-Primer wurde die Sequenz 5'-TCTCTCCGTAATGGAAGACC-3' verwendet, als Antisense-Sequenz 5'-GCATTATGAGACATCCCCAC-3'. Sie kodieren für ein 474 bp lan-

ges Segment am 5'-Ende der PPAR γ 1 mRNA. Der Sense-Primer ist mittels FAM fluoreszenz-markiert, so dass das PCR-Produkt später photometrisch detektiert werden kann. Um den Gehalt an PPAR γ 1 mRNA einer Probe zu bestimmen, werden 4 Reaktionsansätze mit gleichem Gehalt an cDNA mit einem absteigendem Gehalt eines PPAR γ 1-Kompetitors versetzt, der auch durch dasselbe Primerpaar multipliziert wird, jedoch eine um 74 bp verkürzte Sequenz enthält. Je höher der Gehalt dieses Kompetitors, desto niedriger ist die Konzentration des PPAR γ 1-PCR-Produktes, die photometrisch bestimmt werden kann. Der PPAR γ 1-Kompetitor wurde von H. Vidal, Inserm 449, Lyon, Frankreich, zur Verfügung gestellt. Die Reaktionsbedingungen sind der „Tabelle 5: Reaktionsbedingen kompetitive PCR“, die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der „Tabelle 6: Reaktionsansatz kompetitive PCR“ zu entnehmen.

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94° C	5 min
Denaturierung	94° C	45 sec
Hybridisierung	55° C	45 sec
Extension	72° C	45 sec
Wiederholung in 40 Zyklen		
Abschlussextension	72° C	7 min

Tabelle 5: Reaktionsbedingen kompetitive PCR

Substanz	Volumen
10x Puffer	5 μ l
2,5 U Tag-Polymerase	1 μ l
cDNA aus RT	1 μ l
Kompetitor	1 μ l
Primer, 10pmol/ μ l	je 1 μ l
H2O ad 50 μ l	

Tabelle 6: Reaktionsansatz kompetitive PCR

Nach Ablauf der PCR wurden die überschüssigen dNTPs durch den Einsatz von AutoSeqTM G-50 Säulen (Amersham Biosciences) entfernt. Die fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden im ABI PRISMTM Genetic Analyzer mit Hilfe der mitgelieferten GeneScan Software (Applied Biosystems) aufgetrennt und

analysiert: Um die Konzentration von PPAR γ 1-mRNA zu bestimmen, wurde der Quotient der Flächen unter den Kurven gegen die eingesetzte Menge an Kom­petitor grafisch dargestellt und am Kompetitionsäquivalenzpunkt (ÄP) die Kon­zentration des PPAR γ -Gehaltes abgelesen (siehe „Abbildung 1: Auswertung kompetitive PCR“).

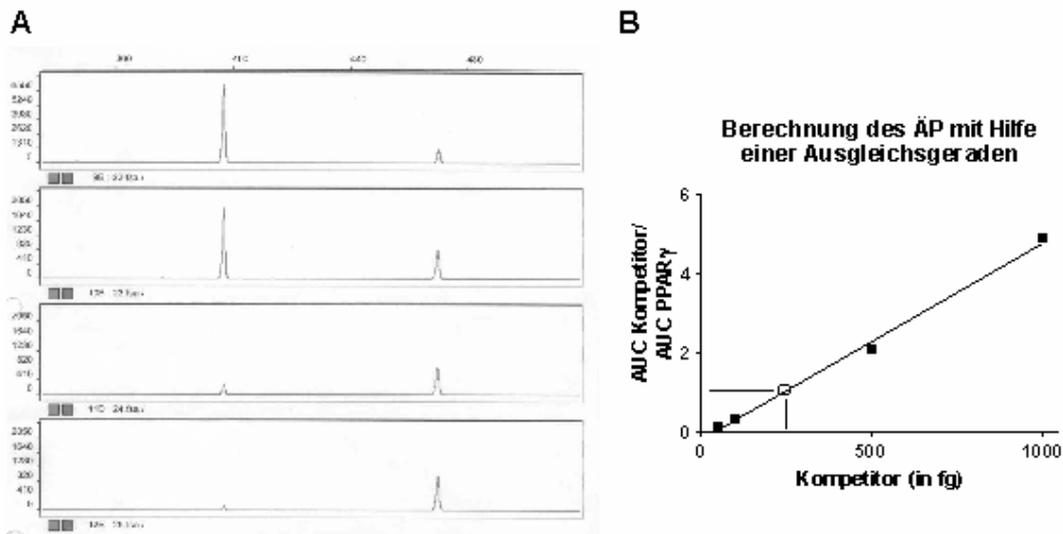


Abbildung 1: Auswertung kompetitive PCR

A: Rohdaten nach Analyse im ABI PRISM™ Genetic Analyzer. **B:** Das Verhältnis der Flächen unter den Kurven aus A wurde gegen die eingesetzte Menge an Kom­petitor grafisch dargestellt und der Äquivalenzpunkt (ÄP) rechnerisch ermittelt.

2.2.4 Protein-Extraktion

Zur Gewinnung von Proteinextrakten wurden die Zellen und Biopsieproben mit RIPA-Puffer lysiert, mit Hilfe von Zellschaber bzw. Dispergierer und Pipette ho­mogenisiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 5-minütiger Inkuba­tion auf Eis wurde bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay. Hier­zu wurde zu 1 μ l Probe 39 μ l Aqua dest. sowie 160 μ l Bradford-Reagenz (Prote­in Assay) gemischt und die Extinktion bei 650 nm gemessen. Zur Konzentrati-

onsbestimmung wurde bei jeder Messung eine Protein-Standardkurve mit den Konzentrationen 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5 und 10 mg/ml BSA erstellt.

2.2.5 Immunpräzipitation

Die Zellen einer konfluenten 10 cm-Zellkultupetrischale wurden mit 800 µl ELB-Puffer lysiert, mit Zellschaber und Pipette homogenisiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten wurde zu 500 µl des Überstandes 20 µl Protein-A-Sepharose gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C kontinuierlich geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 Minuten. Zum Überstand wurden 2,5 µl anti-PPAR γ -Antikörper (H-100, Verdünnung 1:200) zugegeben und über Nacht geschwenkt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch einstündige Inkubation bei 4 °C an 100 µl Protein-A-Sepharose gebunden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 500 µl ELB-Puffer gewaschen. Anschließend wurde es in 20 µl Loading-Buffer aufgenommen, auf 94 °C für 5 Minuten erhitzt, erneut kurz abzentrugiert und auf das SDS-Gel geladen.

2.2.6 Western Blot

Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE-Elektrophorese (Zusammensetzung der Gele: siehe „Tabelle 3: Puffer“) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert und fixiert.

Die Membran wurde in einer Blocklösung bestehend aus 1% Magermilchpulver in PBS-T (PBS und 4% Tween) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum Markieren der Proteine inkubierte man erneut mit PPAR γ -Antiserum (H-100, Konzentration 1:2000, in PBS-T) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden mit anti-rabbit-IgG Horseradish-Peroxidase-gekoppeltem Antikörper und ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (beides Amersham Biosciences) nach Herstellerinstruktionen visualisiert und in der Dunkelkammer mit einem Wasserbadentwickler auf Kodak-Filmen sichtbar gemacht.

2.2.7 Immunzyto- und histochemie

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zelllinien OE33 und Kyse-180 auf Glasobjektträgern ausgesät und über Nacht im Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet.

Die Tumore aus den Nacktmäusen wurden mit Hilfe eines Kryostats in 5 µm dicke Scheibchen geschnitten und auf Glasobjektträger aufgebracht.

Die Fixierung der Zellen bzw. Gewebeschnitte erfolgte mit Aceton/Methanol im Verhältnis 4:1 für 20 Minuten. Zum Blocken unspezifischer Reaktionen wurde 3%iges normal donkey serum und 2%iges bovine serum albumin in PBS für 30 Minuten auf die Objektträger aufgebracht. Bei Raumtemperatur wurden diese eine Stunde lang mit dem entsprechendem ersten Antikörper inkubiert (siehe „Tabelle 7: Antikörper für Immunhistochemie“). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden mit einem Cy3-gelabeltem anti-rabbit-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:500, dianova) die mit dem erstem Antikörper markierten Proteine visualisiert. Anschließend wurde 5 Minuten lang mit DAPI-Reagenz in PBS mit 2% BSA die Zellkerne markiert, bevor die Objektträger mit ImmuMount mounting medium bedeckt wurden.

1. AK	Bezeichnung	Quelle	Konzentration	Firma
anti-PPAR γ	H-100	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
anti-KI-67	H-300	Kaninchen	1:200	Santa Cruz

Tabelle 7: Antikörper für Immunhistochemie

DNA-Strangbrüche von apoptotischen Zellen wurden mit der TUNEL-Technologie (In Situ Cell Death Detection Kit Flourescein) nach Herstellerinstruktionen dargestellt.

Die Zellkerne wurden jeweils mit DAPI-Reagenz gegengefärbt, um Apoptose- und Proliferationsindizes zu erhalten. Dazu wurden die KI-67- bzw. TUNEL-positiven Zellen auf 1000 DAPI-positive Zellen normalisiert.

2.2.8 Proliferationsassay

Je 7000 Zellen pro well der Zelllinien OE33 und Kyse-180 wurden auf 96-well-Platten ausgesät, mit Nährmedium bedeckt und für 24 Stunden zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 30, 60, 90 μM Pioglitazon sowie dem Vehikel DMSO als Kontrolle. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde nach 0, 4 und 8 Tagen Stimulation mit dem Cell Titer 96 A_{queous} Non-Radioactive Proliferation Assay nach Herstellerinformationen gemessen. Dieser Test basiert auf einer zellulären Konversion eines Tetrazoliumsalzes in ein lösliches Formazanprodukt, das kolorimetrisch bei 490nm gemessen werden kann.

2.2.9 FACS-Untersuchungen

2.2.9.1 Zellstimulation

5×10^4 Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit 30, 60 und 90 μM Pioglitazon (Takeda) sowie dem Vehikel DMSO als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle für Apoptose wurde eine zusätzliche Schale mit 8 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin (Platinex®) für 24-48 Stunden stimuliert. Nach 4 bzw. 8-tätiger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) mit Kulturmediumwechsel nach 5 Tagen wurden die Zellen trypsiniert und in der Zellkammer gezählt.

2.2.9.2 Apoptose

10^6 Zellen aus 2.2.9.1 wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und bei 1.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 100 μl einer Labeling-Lösung aus 2 μl AnnexinV-Lösung, 2 μl Propidium Jodid-Lösung und 100 μl Assay Buffer pro Probe (AnnexinV-Staining Kit Fluorescence) suspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse im BectonDickinson FACScalibur mit Hilfe von CellQuest 3.3.

2.2.9.3 Proliferation

Die Proliferation wurde mit dem BrdU Kit for Flow Cytometry untersucht. 10^6 Zellen aus 2.2.9.1 wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit PBS auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Danach wurden die Proben für 5 Minuten von einer UV-Lichtquelle bestrahlt. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l PBS suspendiert und nach Zugabe von 70%igem Ethanol bei -20 °C tropfenweise untergemischt und danach für eine Stunde bei -20 °C fixiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die Zellen in 300 μ l PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen mit 1000 μ l Aqua dest. transferiert. Nach Zugabe von 50 μ l FACS-Puffer und 10 μ l anti-BrdU-FITC wurde die Probe für eine Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im BectonDickinson FACScalibur mit Hilfe von CellQuest 3.3 analysiert.

2.2.10 Apoptoseanalyse mit Caspase3 Detektion

In 175 cm²-Zellkulturflasche wurden 2×10^6 OE33-Zellen ausgesät und für mind. 24h inkubiert. Danach erfolgte die Simulation mit 30, 60 und 90 μ M Pioglitazon (Takeda) in DMSO oder dem Vehikel DMSO für 96 Stunden mit einmaligen Mediumwechsel nach 48 Stunden. Das Zellmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Abzentrifugation folgte eine Zellzählung in der Zellkammer.

Den Instruktionen des Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit folgend, wurde zunächst der Konversionsfaktor des ELISA-Readers bestimmt. Als Positivkontrolle dienten 30 IE Caspase 3 und als Negativkontrolle 90 μ l Assay Buffer. Anschließend lagerte man die Platte für einige Minuten bei 37°C, um sie auf Versuchstemperatur zu bringen. Mit dem Hinzufügen des Caspase-3-substrates startete man die Reaktion und maß in 10-minütigen Abständen die Adsorption bei 405 nm im ELISA-Reader. Diese Werte trägt man in ein Zeit-Adsorptions-Diagramm ein und bestimmt mit *prism3* die lineare Regressionsgrade sowie die zugehörige Steigung jeder Probe. Um die spezifische Aktivität der Zellprobe zu kalkulie-

ren, muss man die erhaltene Steigung der Regressionsgraden mit dem Probenvolumen (100 µl) und dem Konversionsfaktor multiplizieren.

2.2.11 In vivo Stimulation von OE33-Zellen

Alle Tierexperimente erfolgten mit Genehmigung des Ethischen Beirates der Universität Würzburg. 8-10 Wochen alte und 17-20 g schwere weibliche Balb/c nu/nu Mäuse (Charles River Laboratories) wurden in keimarmer Umgebung mit 20-22 °C, 30-50%iger Luftfeuchtigkeit und 12-stündigem Hell-Dunkel-Zyklus in Drahtkäfigen gehalten. Autoklavierte Futterpellets und Wasser waren frei verfügbar.

Die OE33-Tumore wurden wie zuvor beschrieben erhalten⁴². Nach 2 in vivo Passagen von jeweils 8 Wochen wurde der resultierende Tumor explantiert und in ca. 1mm³ große Stücke zerschnitten. 3-4 dieser Stückchen wurden subkutan in die Axillen transplantiert und die hierfür erforderlichen Schnitte mit 6.0 nicht-resorbierbarem Faden genäht. Nach 11 (Langzeitstudie) bzw. 17 Tagen (Kurzzeitstudie) wurden die Tiere zufällig auf Versuch- und Kontrollgruppen eingeteilt und das Füttern mit Pioglitazon begonnen. Dazu wurden Actos® Tabletten mit 30 mg Pioglitazon in Aqua dest. mit 2 mM NaOH gelöst. Als Kontrolle dienten 2 mM NaOH in Aqua dest ohne Actos®. Mit einer angenommenen Trinkmenge von 5ml/Tag/Tier wurde die Konzentration so berechnet, dass jedes Tier 20 mg/kg/d Pioglitazon aufnahm (0,075 mg/ml Pioglitazon). Mit dieser Dosis ist in Mäusen vollständige Glucose-erniedrigende Aktivität erreicht worden. Sie dient daher in experimentellen Modellen als Äquivalenzdosis zu den in Menschen genutzten Glucose-erniedrigenden Dosen⁴³. Es konnte in allen Serumproben von den Versuchstieren Spiegel von Pioglitazon und 3 aktiven Metaboliten nachgewiesen werden, die in äquivalentem Verhältnis zu einer Serumprobe eines menschlichen Probanden standen, der 3 Stunden zuvor eine Tagesdosis Actos® eingenommen hatte. In keiner Probe von Kontrolltieren wurde Pioglitazon oder seine Metaboliten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Während der Experimente wurden die Tiere regelmäßig gewogen, ihr Wasserverbrauch und der generelle Gesundheitszustand beobachtet und das Tumolvolumen mit einer Schieblehre ausgemessen und kalkuliert wie zuvor beschrie-

ben¹⁷. Am Ende der Beobachtungsphasen oder wenn das Tumorzellen zu groß wurde, so dass die Tiere beeinträchtigt waren, wurden sie mit Isofluran anästhesiert. Nach Laparatomie wurde venöses Blut aus der unteren cavalen Vene entnommen, um den Glucosegehalt im Serum mit Ascensia Dex2® (Bayer), den Insulingehalt im Serum mit einem kommerziellen Insulin-ELISA (Merckodia) sowie den Gehalt von Pioglitazon und dessen Metaboliten zu bestimmen. Anschließend wurden die Tumore explantiert, schnell in Tissue Tek OCT compound (Ted Pella Inc.) eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Anteile der Tumore wurden formalin-fixiert, HE-gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Tiere wurden durch Anbringen eines Pneumothorax getötet. Keine Maus starb spontan während der Experimente.

2.2.12 Statistik

Alle statistischen Untersuchungen und Auswertungen wurden mit *prism3* (GraphPad) ausgeführt. Dabei wurden PPAR γ -Expression, Gewichtsverlauf, Wasseraufnahme, Apoptose- und Proliferationsraten als auch Glucose und Insulin-Level im Serum der Versuchs- und Kontrolltiere mit dem *student's t-test* untersucht. Die *in vitro*-Daten der Zelllinien OE33 und Kyse-180 wurden mit Hilfe des *one-way-ANOVA* analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden angenommen wenn der p-Wert < 0.05 ausfiel.

3 Ergebnisse

3.1 PPAR γ -Expression

3.1.1 PPAR γ -Protein-Expression

Mittels Western Blot konnte PPAR γ Protein sowohl in Biopsieproben gesunder Ösophagus- und Magenschleimhaut als auch Barrettepithel nachgewiesen werden. Zusätzlich war die Expression von PPAR γ -Protein in den Karzinomzelllinien Kyse-180 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) und OE33 (Barrettadenokarzinom) nachweisbar.

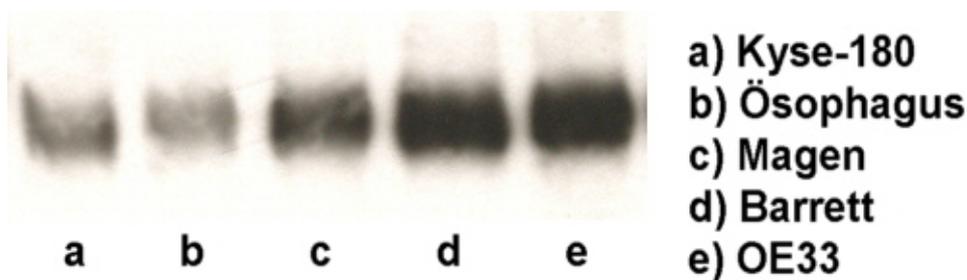


Abbildung 2: PPAR γ Western Blot von Biopsie- und Zellproben

Exemplarische Darstellung von den Gewebeproben von Magen-, Ösophagus- und Barrettepithel eines Patienten sowie den Karzinomzelllinien Kyse-180 und OE33

Die ebenfalls durchgeführte Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte in der Barrett-Adenokarzinomzelllinie OE33 eine deutliche Expression von PPAR γ Protein mit vornehmlich kernnaher Lokalisation. Dagegen zeigte die Plattenepithelkarzinomzelllinie Kyse-180 eine schwächere Expression mit einer gleichmäßigeren zytoplasmatischen Verteilung.

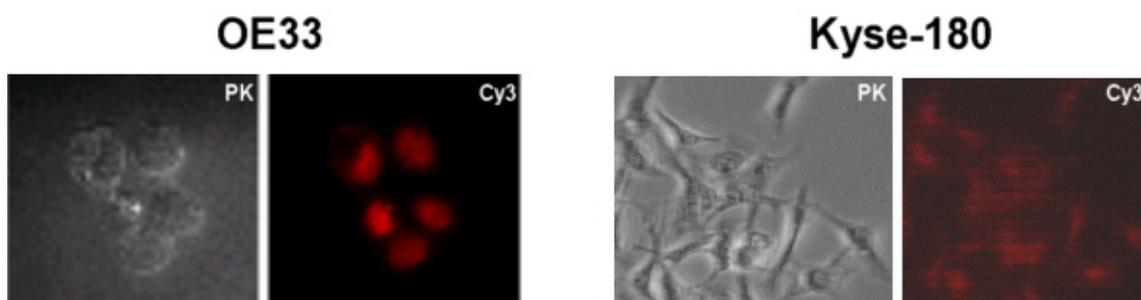


Abbildung 3: Immunhistochmie auf PPAR γ von OE33 und Kyse-180

Darstellung von Phasenkontrast- (PK) und Immunfluoreszenzbildern bei 575nm (Cy3)

Diese Ergebnisse legen eine deutlichere Expression und aktive Funktion in Barrettkarzinomzellen verglichen mit Plattenepithelkarzinomzellen nahe.

3.1.2 PPAR γ 1-mRNA-Expression

PPAR γ 1 mRNA Expression wurde in 7 Patienten mit histologisch gesicherter Barrett-Metaplasie ohne Dysplasie oder Karzinom mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Dabei zeigt sich im Barrettepithel eine PPAR γ -Überexpression im Vergleich zu korrespondierender gesunder Ösophagus- und Magenschleimhaut.

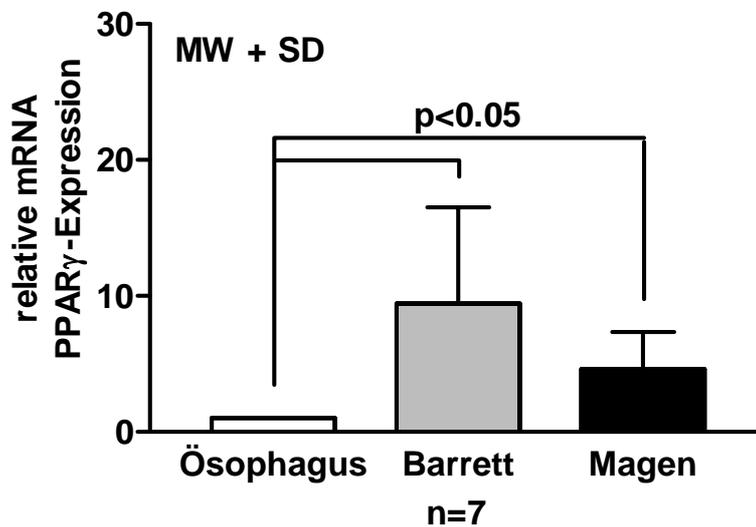


Abbildung 4: kompetitive PCR der Gewebeproben

Semi-quantitative Darstellung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) von n=7 Patientenproben nach Normalisierung auf die Ösophaguswerte (=1)

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Umwandlung von gesunder Ösophagusschleimhaut in metaplastisches Barrettepithel mit der Überexpression von PPAR γ 1 assoziiert ist.

Zusätzlich zu humanen Gewebeproben wurde die PPAR γ 1 mRNA Expression in den Karzinomzelllinien OE33 (Barrett-Adenokarzinom) und Kyse-180 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) untersucht. Dabei zeigte sich, dass in OE33-Zellen der PPAR γ 1 mRNA-Level ca. 15-fach über dem von Kyse-180-Zellen lag.

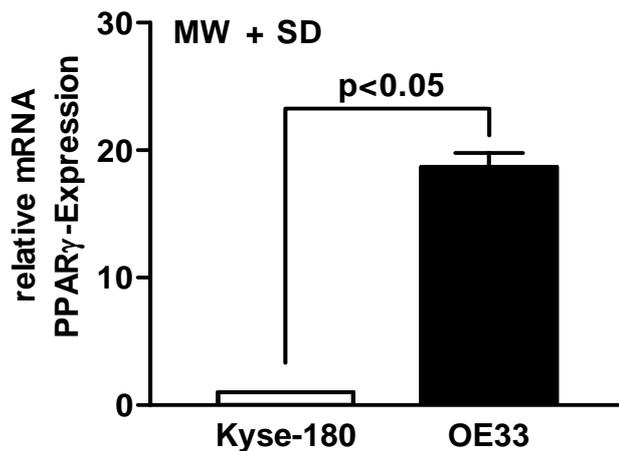


Abbildung 5: kompetitive PCR der Zelllinien

Semi-quantitative Darstellung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des PPAR γ -Gehaltes von OE33-Barrettadenokarzinomzellen nach Normalisierung auf die Plattenepithelkarzinomzelllinie Kyse-180 (=1)

Dies spiegelt sich auch in dem Ergebnis der immunzytologischen Untersuchung auf PPAR γ Protein wieder (siehe 3.1.1). Die PPAR γ 1-mRNA-Überexpression in humanem Barrettepithel und in Barrett-Adenokarzinomzellen deuten an, dass PPAR γ eine mögliche Rolle in der molekularen Pathogenese des Barrett-Ösophagus und des Barrettkarzinoms spielen könnte.

3.2 In vitro Stimulation mit Pioglitazon von OE33 und Kyse-180

3.2.1 Kumulative Zellzahl

PPAR γ -Aktivierung in OE33- und Kyse-180-Zellen erfolgte mit 30, 60, 90 μ M Pioglitazon und der Vehikelkontrolle DMSO über 8 Tage. Dabei zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der kumulativen Zellzahl von Pioglitazon-behandelten OE33-Zellen im Vergleich zu Vehikel-stimulierten OE33-Zellen.

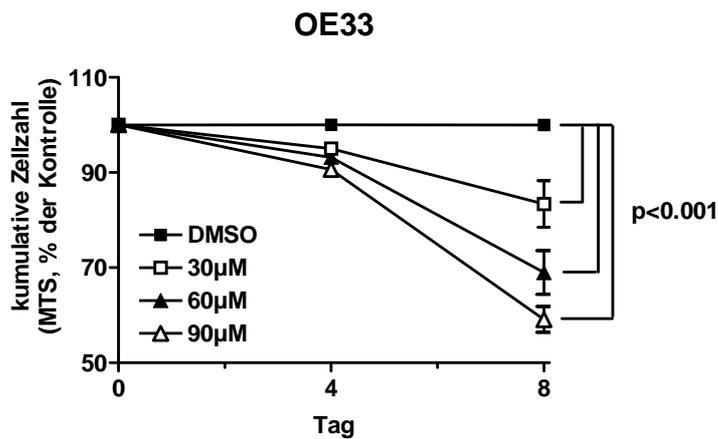


Abbildung 6: OE33-Zellzahl nach Stimulation mit Pioglitazon

Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der kumulativen Zellzahl nach 4- bzw. 8-tägiger Stimulation mit 30, 60 und 90 µM Pioglitazon nach Normalisierung auf die Vehikel-stimulierten OE33-Zellen (DMSO=100%)

Kyse-180-Zellen zeigten dagegen unter Stimulation mit 30 und 60µM Pioglitazon keine signifikante Reduktion der kumulativen Zellzahl, obwohl es einen Trend zu niedrigeren Zellzahlen bei der Stimulation mit 90µM Pioglitazon gab.

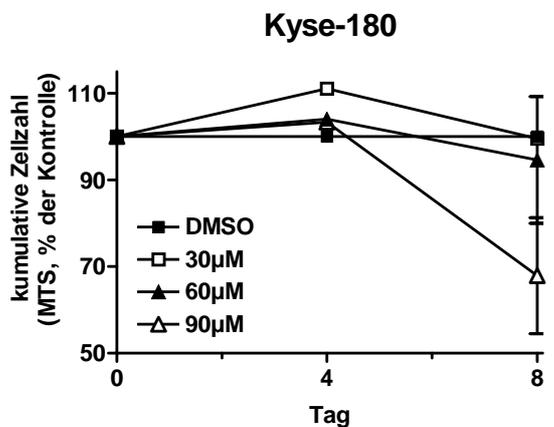


Abbildung 7: Kyse-180-Zellzahl nach Stimulation mit Pioglitazon

Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der kumulativen Zellzahl nach 4- bzw. 8-tägiger Stimulation mit 30, 60 und 90 µM Pioglitazon nach Normalisierung auf die Vehikel-stimulierten Kyse-180-Zellen (DMSO=100%)

Diese Ergebnisse deuten eine unterschiedliche Sensitivität auf das Wachstumsverhalten von humanen Barrett-Adenokarzinomzellen und Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus auf Stimulation von PPAR γ mit Pioglitazon an.

3.2.2 Apoptose und Proliferation nach *in vitro* Stimulation

Nach Stimulation von PPAR γ mit Pioglitazon konnte kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation in den Zelllinien OE33- und Kyse-180 festgestellt werden.

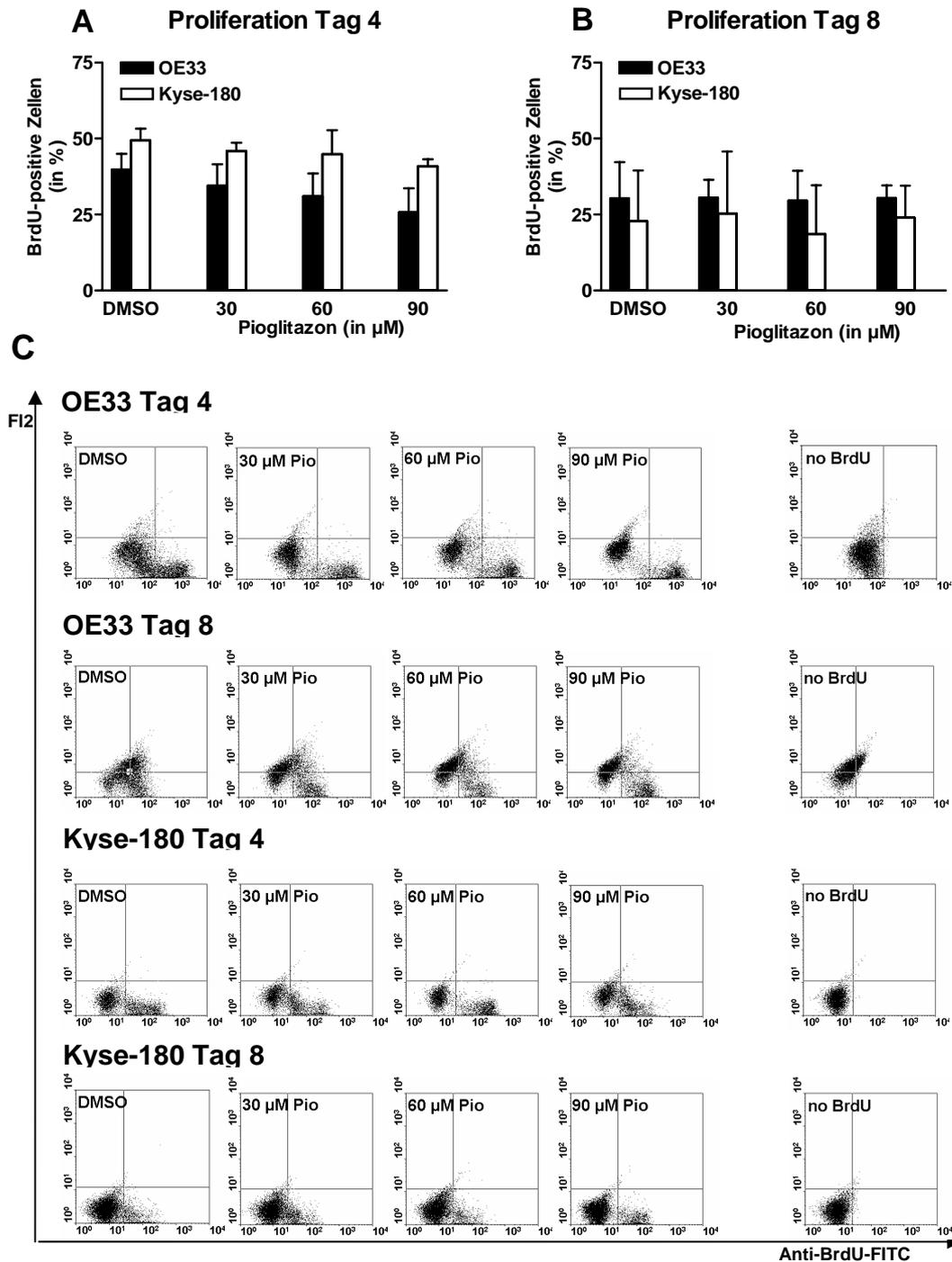


Abbildung 8: Proliferation nach *in vitro*-Stimulation mit Pioglitazon

Proliferationsraten von OE33- und Kyse-180-Zellen nach 4- (**A**) bzw. 8-tägiger (**B**) Stimulation mit 30, 60, 90 μM Pioglitazon (Pio) vs. Vehikel-stimulierte Zellen (DMSO) **C**: exemplarische FACS-Rohdaten, als Negativkontrolle dienten Zellen ohne BrdU im Nährmedium

Jedoch zeigte sich nach Behandlung mit Pioglitazon eine deutlich erhöhte Zahl an apoptotischen, AnnexinV-positiven Zellen bei OE33, während in Kyse-180-Zellen kein Effekt zu beobachten war.

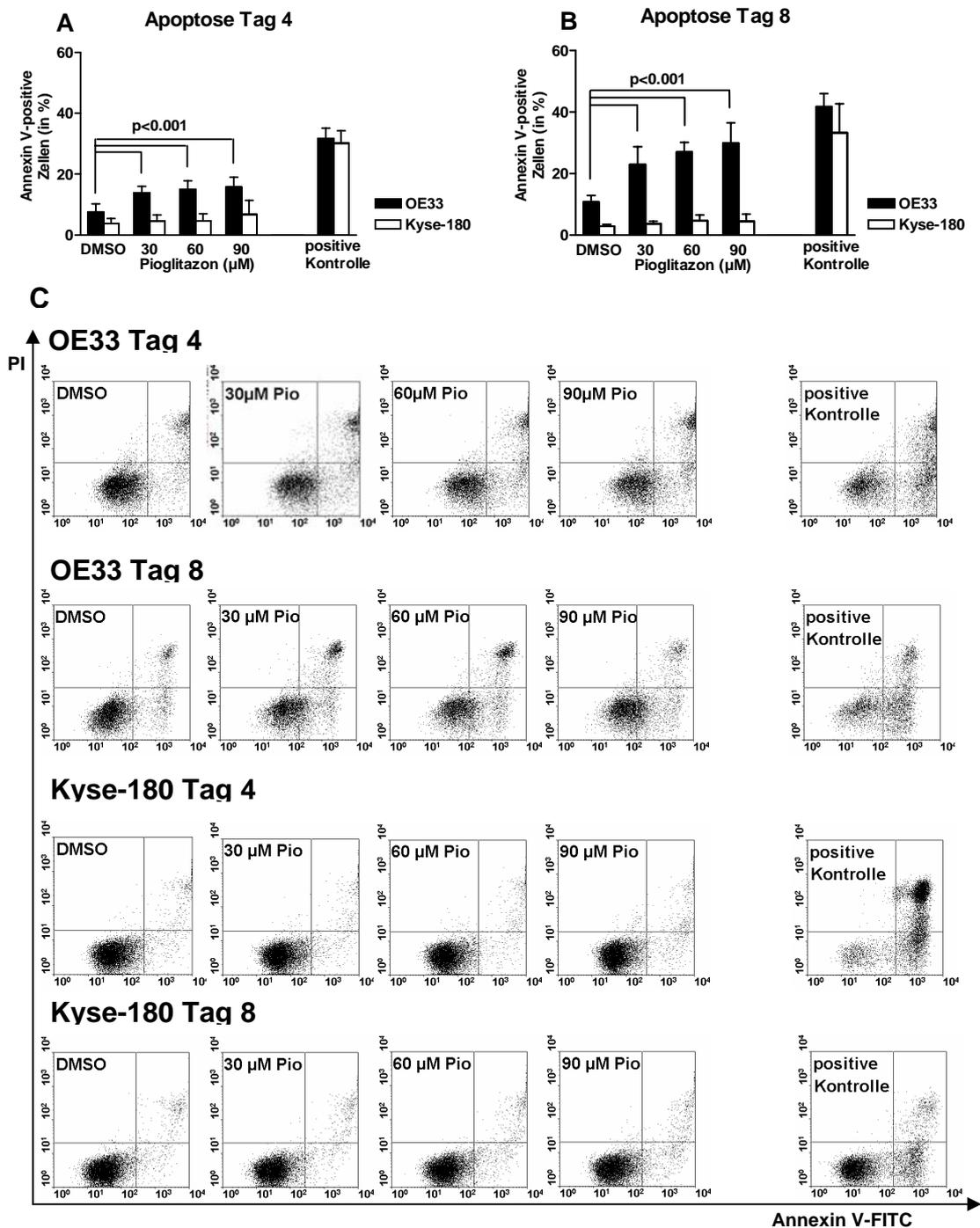


Abbildung 9: Apoptose nach in vitro-Stimulation mit Pioglitazon

Apoptoseraten von OE33- und Kyse-180-Zellen nach 4- (A) bzw. 8-tägiger (B) Stimulation mit 30, 60, 90 µM Pioglitazon (Pio) vs. Vehikel-stimulierte Zellen (DMSO) C: exemplarische FACS-Rohdaten, als Positivkontrolle dienten Zellen mit 80µg/ml Cisplatin im Nährmedium

Diese Erhöhung des Zellumsatzes durch Apoptose wurde durch eine deutlich stärkere Aktivität der Caspase3 nach Pioglitazonbehandlung begleitet.

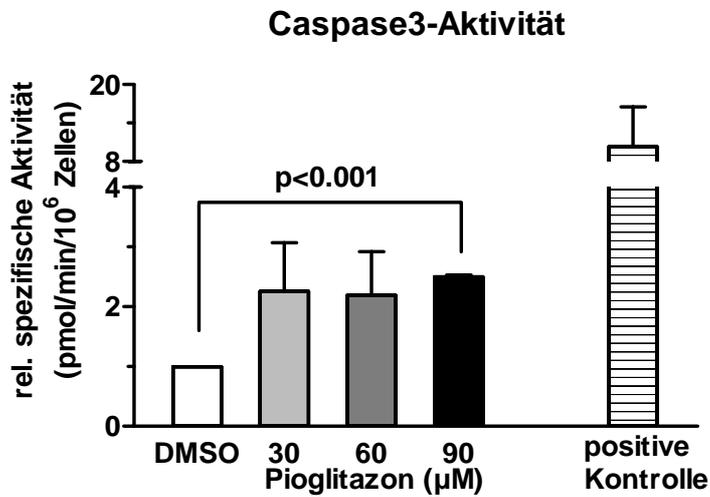


Abbildung 10: Caspase3-Aktivität in OE33 nach Behandlung mit Pioglitazon

Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichung nach 4-tägiger Stimulation von OE33-Zellen mit 30, 60 und 90 µg Pioglitazon. Als Positivkontrolle dienten 30 IU Caspase3.

Diese Ergebnisse verdeutlichen einen Effekt der PPAR_γ-Aktivierung auf den programmierten Zelltod in Barrettkarzinomzellen im Gegensatz zum Zellwachstum.

Zusammenfassend führt die Aktivierung von PPAR_γ durch Thiazolidindione in vitro zu einer Tumorstillungsinhibition von OE33 durch eine Induktion von Apoptose.

3.3 In vivo Stimulation mit Pioglitazon von OE33

3.3.1 OE33 Barrettkarzinomzellen in Balb/c nu/nu Mäusen

Nach subkutaner Injektion von $5 \cdot 10^6$ OE33-Barrettadenokarzinomzellen in Balb/c nu/nu Mäuse konnte ein Wachstum eines soliden Tumors beobachtet werden. Dieser Tumor wurde zur Transplantation in andere Mäuse verwendet, die als Versuchs- und Kontrolltiere für in vivo-Studien zum Pioglitazon-Effekt auf Barrettadenokarzinomzellen benutzt wurden. Alle explantierten Tumore wurden histologisch durch das Pathologische Institut der Universität Würzburg als solide wachsende, gering differenzierte Adenokarzinome mit Kernatypien und nekrotischen Arealen charakterisiert.

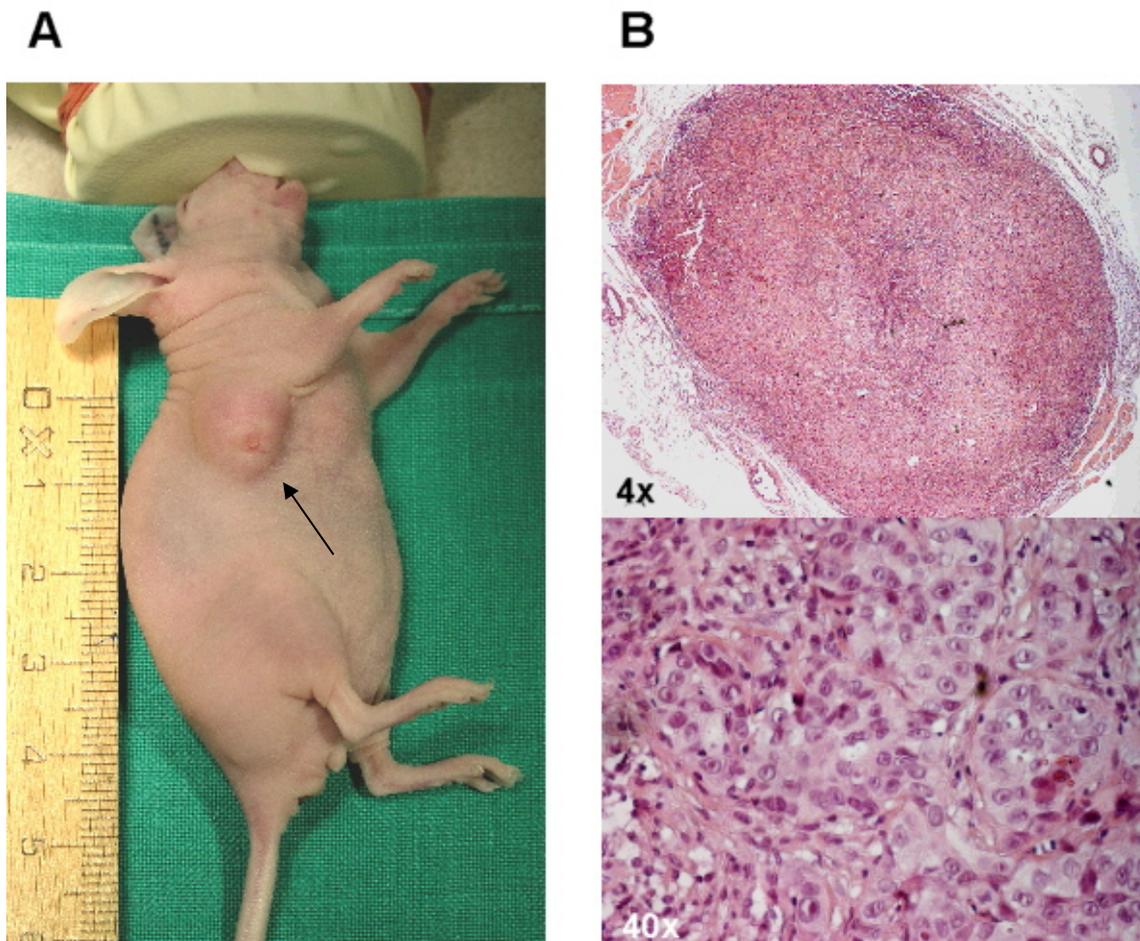


Abbildung 11: subkutaner OE33-Tumor in Balb/c nu/nu Nacktmaus

A: subkutaner Tumor (Pfeil) aus OE33-Zellen in Balb/c nu/nu Nacktmaus kurz vor Explantation.
B: Histologie von subkutanem Tumor aus OE33-Zellen nach HE-Färbung in 4-facher und 40-facher Vergrößerung.

3.3.2 In vivo Tumorwachstum unter systemischer PPAR γ -Aktivierung

Der wachstumshemmende Effekt von einer in vitro Aktivierung von PPAR γ auf die Barrett-Adenokarzinomzelllinie OE33 wurde nach Implantation von transplantierbaren OE33-Tumoren in Balb/c nu/nu Nacktmäuse in 2 von einander unabhängigen Experimenten in vivo untersucht. Die Versuchsgruppen wurden mit Pioglitazon (Actos®, im Trinkwasser gelöst) behandelt. Hierbei unterschieden sich das Trinkverhalten und der Gewichtsverlauf der Tiere sowohl in der Langzeit- als auch in der Kurzzeitstudie zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen nicht signifikant.

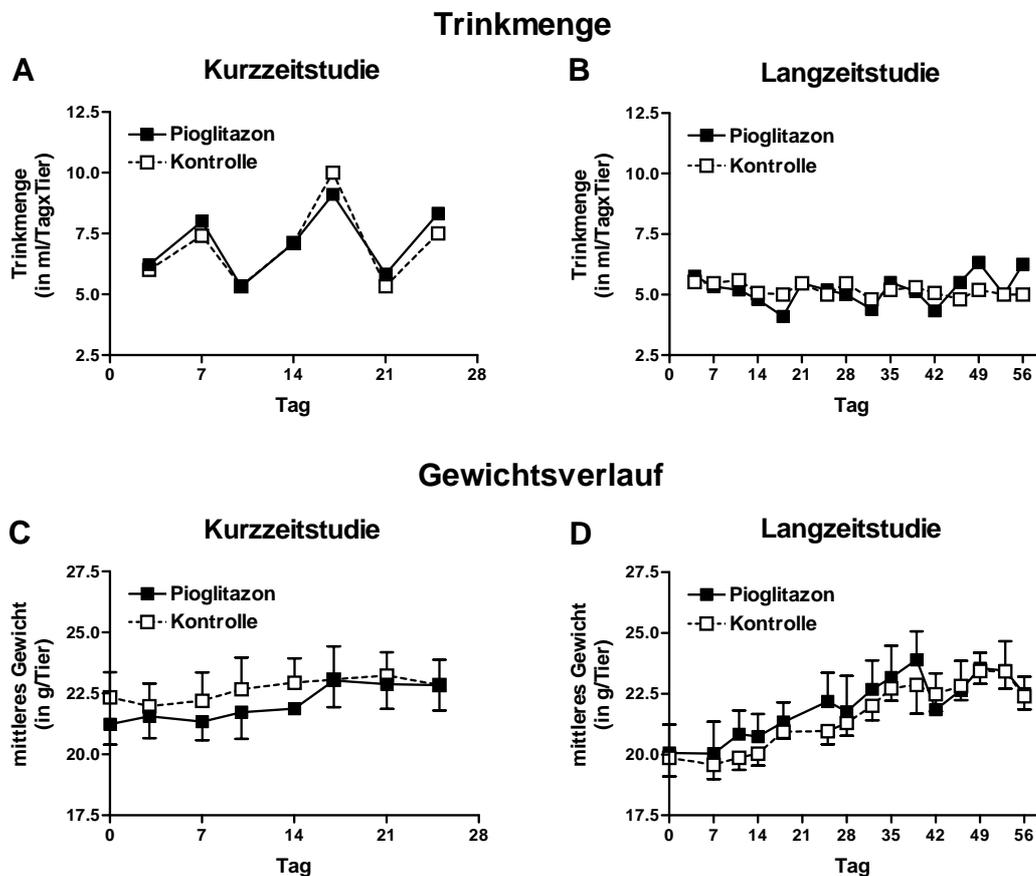


Abbildung 12: Trinkverhalten und Gewichtsverlauf

Darstellung des durchschnittlichen Trinkverhaltens (A,B) und des Gewichtsverlaufs (C,D) von Pioglitazon-behandelten- und Kontrolltieren der Kurz- (A,C) und Langzeitstudie (B,D)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der in vitro Experimente fand sich in beiden in vivo Experimenten unter Pioglitazon-Stimulation eine signifikante Steigerung des Tumorzvolumens der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren.

mittleres Tumorstadium

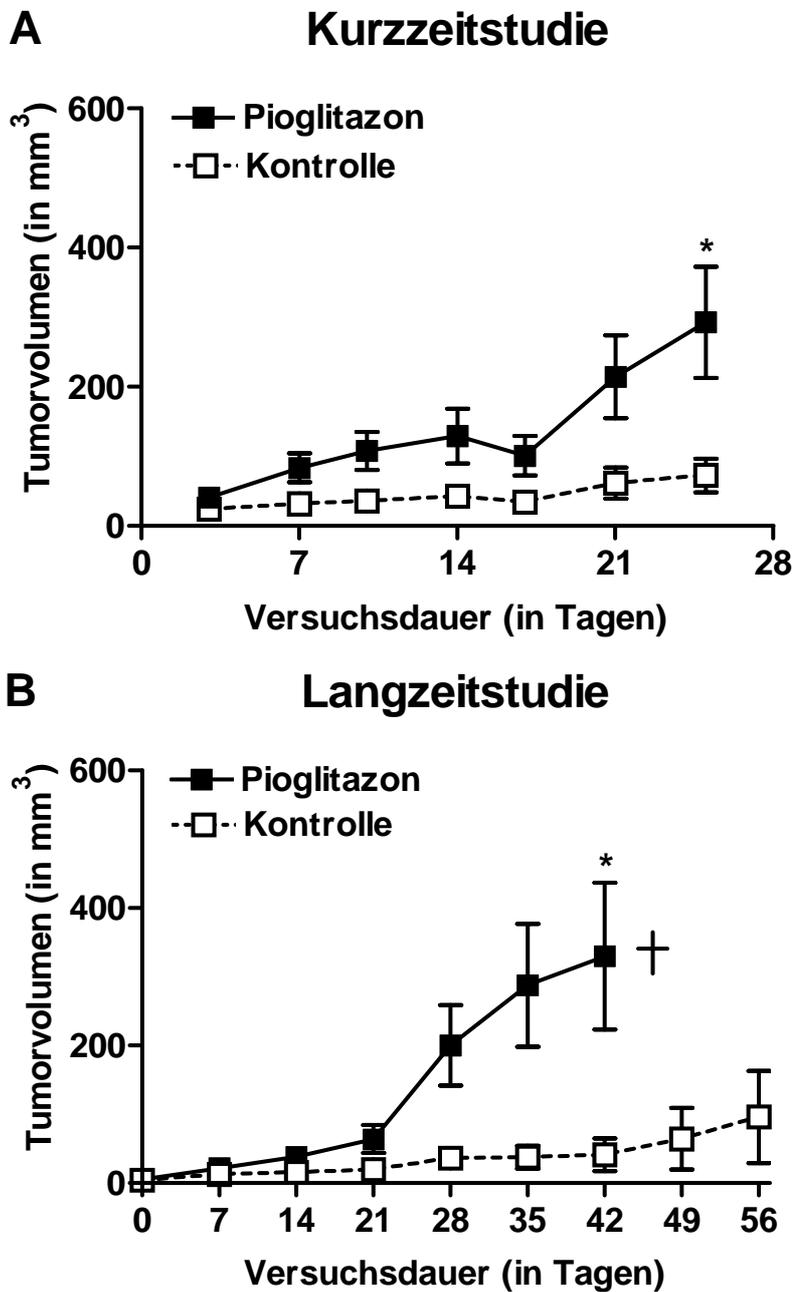


Abbildung 13: Tumorstadium in Kurz- und Langzeitstudie

Darstellung des mittleren Tumorstadiums und Standardfehler von Pioglitazon-behandelten und Kontrolltieren **A:** Kurzzeitstudie. **B:** Langzeitstudie. Versuchsbeendigung in Versuchsgruppe nach 7 Wochen aufgrund hohen Tumorstadiums

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen zeigte sich *in vivo* in den von OE33 abgeleiteten Tumoren unter Pioglitazon-Stimulation eine Induktion der Proliferation.

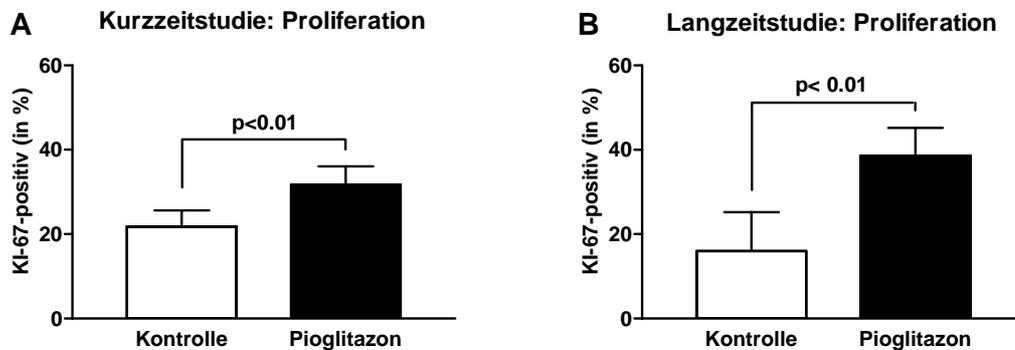


Abbildung 14: KI-67-Immunhistochemie der *in vivo*-OE33-Tumore

Mittelwerte und Standardabweichungen von Proliferationsraten nach KI-67-Immunhistochemie der Tumore von Pioglitazon-behandelten und Kontrolltieren aus Kurz- (A) und Langzeitstudie (B).

Im Vergleich zu den *in vitro*-Untersuchungen zeigten sich auch bezüglich der Effekte einer Pioglitazon-Stimulation auf die Apoptose *in vivo* gegensätzliche Ergebnisse. Während sich im Kurzzeitversuch kein Effekt auf die Apoptoserate der Tumore darstellte, fand sich im Langzeitversuch eine Reduktion der Apoptoserate in den mit Actos® behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

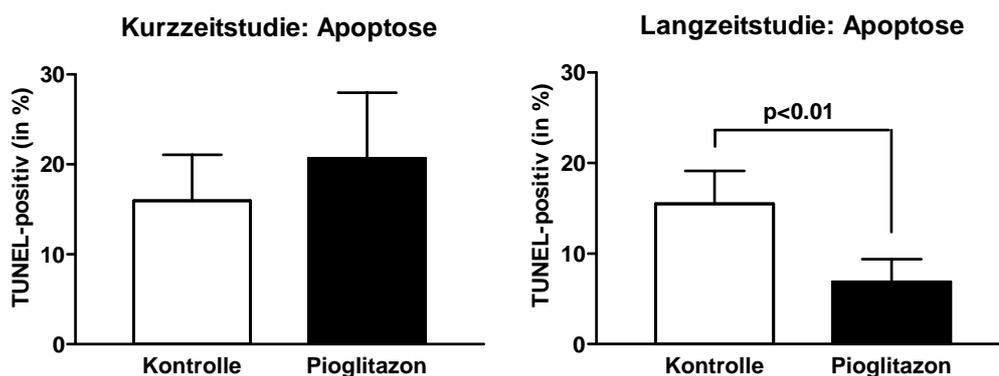


Abbildung 15: TUNEL-Assay von *in vivo*-OE33-Tumoren

Mittelwerte und Standardabweichungen von Apoptoseraten nach TUNEL-Assay der Tumore von Pioglitazon-behandelten und Kontrolltieren aus Kurz- (A) und Langzeitstudie (B).

3.3.3 Serumlevel von Insulin und Glucose in Balb/c nu/nu Mäusen

Da das Antidiabetikum Pioglitazon ein Senkungspotenzial der Blutglucosespiegel besitzt, wurden die Serumlevel von Glucose und Insulin in den Versuchs- und Kontrolltieren mit den transplantierten Tumoren der Barrettadenokarzinomzelllinie OE33 am Ende der Versuchsperiode untersucht. Dabei zeigte sich bei Vorliegen identischer Blutglucosespiegel eine signifikante Erniedrigung des Insulinlevels in den mit Pioglitazon behandelten Tieren.

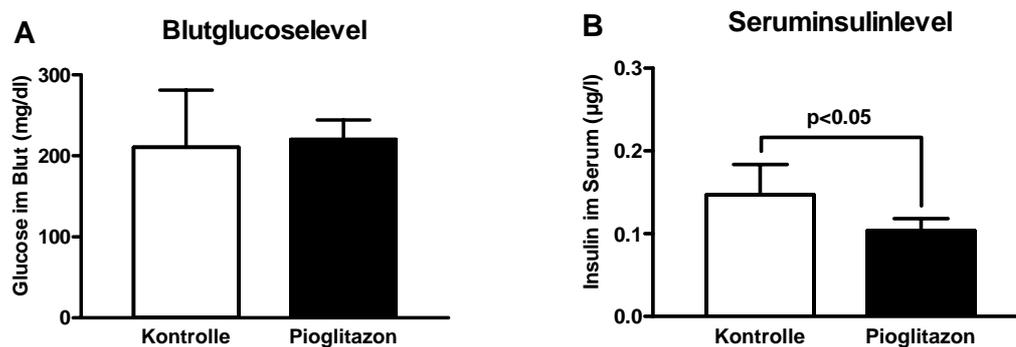


Abbildung 16: Serumspiegel von Insulin und Glucose

Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von Glucose- (A) und Insulin-Serumspiegeln (B) von Pioglitazon-behandelten und Kontrolltieren.

Dies deutet auf eine erhöhte Insulinsensitivität der mit Pioglitazon behandelten Versuchstiere hin, so dass sie im Vergleich zu den Kontrolltieren niedrigere Insulinlevel benötigten, um metabolische Homöostase zu bewahren.

4 Diskussion

Die Inzidenz des Barrettadenokarzinoms auf dem Boden eines Barrettösophagus hat sich in den Industrieländern während der vergangenen Jahrzehnte stetig erhöht^{27, 28}. Dabei scheint der gastro-ösophageale Reflux mit konsekutiver chronischer Entzündung der distalen Speiseröhre eine bedeutende Rolle für die Entwicklung des Barrettösophagus zu spielen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der epithelialen Transdifferenzierung zur Barrettmetaplasie und der malignen Transformation zum Barrettadenokarzinom sind bisher noch unzureichend geklärt. Aufgrund der Effekte von PPAR γ auf Differenzierung, Proliferation und Apoptose in verschiedenen anderen Geweben und Karzinomen untersuchten wir die Bedeutung von PPAR γ in der Pathogenese des Barrett-Ösophagus und des Barrettadenokarzinoms.

In unseren Untersuchungen konnten wir eine Überexpression von PPAR γ 1 mRNA sowohl in humanen epithelialen Biopsieproben von Barrettmukosa als auch in der humanen Barrettadenokarzinomzelllinie OE33 im Vergleich zu gesunder Schleimhaut des Ösophagus oder der Plattenepithelkarzinomzelllinie des Ösophagus Kyse-180 demonstrieren. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse einer kürzlich publizierten Studie, in der ebenfalls erhöhte Expressionslevel von PPAR γ im Barrettepithel im Vergleich zu gesunder Ösophagusschleimhaut⁴⁴ gezeigt wurden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Überexpression von PPAR γ eine wichtige Rolle bei der Transformation von gesundem Plattenepithel zur Barrettmetaplasie spielt.

Dieser Überexpression von PPAR γ im Barrett-Ösophagus könnten verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Frühere Studien haben eine Beteiligung von PPAR γ in Entzündungsprozessen verschiedener Gewebe gezeigt. Zahlreiche Gene, z.B. NF κ B, AP-1, STATs oder Zytokine wie TNF α , IL-6, IL-1 β oder COX-2, die an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt sind, werden durch PPAR γ reguliert⁴⁵. Einige dieser Gene (NF κ B, TNF α und COX-2) zeigen ebenfalls eine erhöhte Expression in Barrettepithel und tragen vermutlich zur Entwicklung eines Barrett-Ösophagus oder Barrett-Adenokarzinoms bei^{35, 46, 47}.

Daher könnte auch PPAR γ an der Regulation der mukosalen Entzündungsprozesse bei gastro-ösophagealen Refluxes beteiligt sein und ein neues molekulares Ziel bei einer anti-entzündlichen und chemo-präventiven Therapie für Patienten mit Barrettmetaplasie darstellen.

In Ergänzung zu den Untersuchungen an Geweben des ösophago-gastralen Übergangs haben wir die Expression von PPAR γ in verschiedenen Ösophaguskarzinomzelllinien untersucht. Dabei konnten wir eine Expression von PPAR γ sowohl in der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie Kyse-180 als auch in der Barrettdenokarzinomzelllinie OE33 nachweisen. Insbesondere fand sich eine deutliche Überexpression von PPAR γ mRNA in OE33 Barrettdenokarzinomzellen verglichen mit Kyse-180 Plattenepithelkarzinomzellen, die vergleichbar ist mit der Überexpression von PPAR γ mRNA im Barrettepithel im Vergleich zu gesunder Ösophagus- und Magenschleimhaut. Erhöhte PPAR γ Expression wurde auch in verschiedenen anderen Karzinomzelllinien von Liposarkomen¹¹, Mammakarzinomen^{12, 15}, kolorektalen Karzinomen^{16, 17}, Prostatakarzinomen¹⁸, Pankreaskarzinomen¹⁹, Magenkarzinomen²⁰ und Plattenepithelkarzinomen des Pharynx²¹ nachgewiesen. Expression von PPAR γ in Kyse-180-Zellen ist schon in einer anderen Studie beschrieben worden, wo im Vergleich zu zehn anderen Kyse-Zelllinien ebenfalls eine vergleichsweise niedrige PPAR γ Expression festgestellt wurde¹⁴.

Zur Charakterisierung der biologischen Effekte einer Aktivierung von PPAR γ auf das Wachstum von malignen Tumoren des ösophago-gastralen Übergangs stimulierten wir OE33- und Kyse-180-Zellen mit dem PPAR γ -Liganden Pioglitazon und untersuchten die Veränderungen auf Zellzahl, Proliferation und Apoptose. Dabei beobachteten wir eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der kumulativen Zellzahl aufgrund einer Induktion von Apoptose, während kein Effekt auf die Proliferation festzustellen war. Zahlreiche Studien zeigten ebenfalls eine Apoptoseaktivierung durch unterschiedliche Mechanismen wie Zellzyklusarrest via p21, p27, p18^{48, 49}, Inhibition von E2F/DP DNA-bindender Aktivität⁵⁰, Block von G1-S-Transition durch Inhibition vom Retinoblastom-Protein-Phosphorylation⁵¹ und Induktoren der Expression von zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren⁵². Zu-

sätzlich zu den Effekten auf die Apoptose induziert eine Aktivierung von PPAR γ einen Arrest im Zellzyklus, terminale Differenzierung und nicht-apoptotischen Zelltod in vielen anderen Karzinomzellen, obwohl der jeweilige Mechanismus sich von dem in anderen Studien unterschied^{11, 12, 15 - 21}. Diese Ergebnisse deuten an, dass PPAR γ die Expression von einem großen Spektrum von Zielgenen beeinflusst, die multiple biologische Effekte regulieren und sich in einer gewebespezifischen Art und Weise unterscheiden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in OE33-Zellen hatte die in vitro Stimulation von Kyse-180-Zellen mit Pioglitazon keinen Einfluss auf Apoptose oder Zellwachstum. Dies impliziert, dass eine PPAR γ Aktivierung weniger stark den Zelldurchsatz von Epithelien beeinflusst, die sich von Plattenepithel ableiten, als von solchen, die sich von Barretepithel ableiten. Man kann aber nicht ausschließen, dass dieser unterschiedliche Effekt nur in den zwei untersuchten Zelllinien beobachtet werden kann und dies aufgrund der unterschiedlichen Malignität oder des unterschiedlichen Differenzierungsstatus. Ob man diese Ergebnisse auf humanes Barrett-Epithel übertragen kann, müssen weitere Untersuchungen erst noch zeigen. Interessanterweise wird aber auch das Wachstum von der Zelllinie Kyse-270 durch ein Thiazolidindion, nämlich Troglitazon, gehemmt¹⁴. Diesem gegensätzlichen Effekt einer PPAR γ Aktivierung in unterschiedlichen Plattenepithelkarzinomzelllinien des Ösophagus könnte aber auch eine unterschiedliche biologische Aktivität der verschiedenen Thiazolidindione zugrunde liegen, die schon in anderen Studien beobachtet worden war⁵³.

Neuere Studien zeigten, dass anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte einer PPAR γ -Aktivierung in Nacktmäusen bestätigt werden konnten, in denen Tumore transplantiert worden waren, die sich von den in den in vitro Studien verwendeten Zelllinien ableiteten^{14, 17, 54}. In vivo Studien solcher Tiermodelle von kolorektalen⁵⁵ und Mammakarzinomen^{56, 57} zeigten ebenfalls wachstumshemmende Effekte nach PPAR γ Aktivierung. Dagegen förderten PPAR γ Liganden die Entstehung von kolorektalen Tumoren von genetisch prädisponierten Mäusen^{13, 58}. Um die von uns in OE33-Zellen beobachteten in vitro Effekte einer PPAR γ Aktivierung in vivo zu bestätigen, untersuchten wir das Tumor-

wachstum von in Nacktmäusen transplantierten, von OE33-Zellen abgeleiteten Tumoren, wobei die Tiere oral mit Pioglitazon behandelt wurden. Unerwarteterweise zeigten die mit Pioglitazon behandelten Tiere im Vergleich mit Vehikel-behandelten Kontrolltieren ein deutlich stärkeres Wachstum der transplantierten Tumore auf dem Boden einer gesteigerten Zellproliferation bei reduzierter Apoptose. Unseres Wissens ist dies der erste Bericht eines konträren Effekts einer PPAR γ Aktivierung auf Tumore desselben Ursprungs in vitro und in vivo. Im Moment sind die zugrunde liegenden Mechanismen für diese Beobachtung unklar, wobei man sich mehrere Erklärungsansätze vorstellen kann.

Die Entwicklung eines malignen Tumors ist ein Prozess mit mehreren Schritten, währenddessen die Krebszellen mehrere Veränderungen in ihrer zellulären Physiologie erwerben müssen. Hierzu zählen u.a. die Fähigkeit zur Produktion selbst verstärkender Wachstumssignale, eine Insensitivität auf wachstumshemmende Signale, die Unabhängigkeit der Zellen gegenüber Mechanismen des fremd- oder selbstausgelösten programmiertem Zelltodes, ein ständiges Potenzial zur Replikation, die Fähigkeit zur Auslösung einer Angiogenese sowie zur Gewebeinvasion und Metastasierung⁵⁹. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Effekten der PPAR γ Aktivierung in OE33-Zellen in vitro und in vivo könnte darauf beruhen, dass die Komplexität der in vivo Situation mit Gewebeinteraktionen nicht durch Zellkulturstudien widerspiegelt werden kann. Weiterhin ist aufgrund des weiten Spektrums an Zielgenen, die durch PPAR γ beeinflusst werden, ein unterschiedlicher Ablauf einer PPAR γ vermittelten Rekrutierung von Genen in vitro und in vivo denkbar, die für die Proliferation von Tumorzellen wichtig sind. Z.B. würde eine Veränderung der Angiogenese das Tumorwachstum in vitro nicht beeinflussen, während dieser Faktor in vivo eine wesentliche Relevanz im Hinblick auf die Progression der Tumorentwicklung besitzt. Dieser Aspekt der funktionellen Relevanz von PPAR γ -Zielgenen für Tumorwachstum und -entwicklung wird auch dadurch verkompliziert, dass in vielen Karzinomzelllinien und Tumoren in diesen Bereichen Mutationen vorhanden sind.

In einer neueren Studie konnte außerdem festgestellt werden, dass PPAR γ gegensätzliche Effekte in neoplastischen Zellen hervorrufen kann, die abhängig

von der Stärke der PPAR γ Beeinflussung sind⁶⁰. Daher können wir nicht ausschließen, dass der von uns beobachtete Gegensatz des PPAR γ -vermittelten Wachstumsverhalten von OE33-Zellen in vitro und in vivo auf Unterschieden im Ausmaß der PPAR γ -Aktivierung beruht. Die von uns in den Tierexperimenten eingesetzte Dosierung von Pioglitazon führt in den Tieren zu Pioglitazonserumkonzentrationen, wie sie bei Patienten mit Diabetes mellitus unter Pioglitazontherapie auftreten⁴³. Eine Analyse der Serumproben der Versuchstiere ergab, dass in den mit Pioglitazon-behandelten Tieren Pioglitazon selbst sowie 3 weitere aktive Metabolite nachweisbar waren und ihre Serumspiegel in einem vergleichbaren Bereich wie der Serumspiegel eines menschlichen Probanden 3 Stunden nach Einnahme einer zur Behandlung des Diabetes mellitus üblichen Tagesdosis Actos® (30 mg) lag. In den Kontrolltieren fanden sich weder Pioglitazon noch seine Metabolite (Daten nicht gezeigt).

Einige Studien zeigten auch biologische Effekte einer Behandlung mit Thiazolidindionen auf Tumorwachstum, die unabhängig von einer PPAR γ -Aktivierung erfolgte^{21, 23, 61}. Obwohl in diesen Studien hauptsächlich von einer Inhibition von Tumorwachstum berichtet wurde, kann man nicht ausschließen, dass die Tumorprogression durch Pioglitazon in den von uns durchgeführten Tierexperimenten auf solchen bisher unbeschriebenen PPAR γ -unabhängigen Effekten von Thiazolidindionen beruht.

1998 beschrieben unabhängig voneinander zwei Arbeitsgruppen^{13, 58}, dass eine PPAR γ Aktivierung durch Thiazolidindione in APC^{min}-Mäusen die Entwicklung von Kolonpolypen und kolorektalen Tumoren fördert und deren Malignität bestärkt. Die geäußerte Hypothese dieser Beobachtung einer insulin-vermittelten Verbesserung der metabolischen Situation dieser Tumore korreliert mit der von uns festgestellten verminderten Seruminsulinkonzentration bei nicht-diabetischen Mäusen in der mit Pioglitazon behandelten Versuchsgruppe. Gleichzeitig unterschieden sich die Serumglucosespiegel nicht signifikant voneinander. Daher könnte man annehmen, dass systemische PPAR γ -Aktivierung die Insulinresistenz verringert, so dass weiterhin niedrigere Insulinspiegel benötigt werden, um metabolische Homöostase in diesen nicht-diabetischen Mäusen aufrecht zu erhalten. Erhöhte Insulinsensitivität könnte auch die Metabolisierung

von Nährstoffen in Tumorzellen verbessern und so zu einer beschleunigten Zellwachstumsrate mit Stimulation der Progression führen.

Folglich könnte zwar das beschleunigte Tumorwachstum von transplantierten OE33-Barrettadenokarzinomtumoren unabhängig von einer PPAR γ -Aktivierung sein, aber durch die geförderte Glucoseverwertung der Tumorzellen als Reaktion auf erhöhte Insulinsensitivität nach systemischer PPAR γ -Aktivierung noch unterstützt worden sein. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die in vivo OE33-Tumore bei Pioglitazon behandelten Tieren eine vermehrte Proliferationsrate bei gleichzeitig unveränderter Apoptoserate zeigten, während in vitro OE33-Zellen nach PPAR γ Aktivierung mit Pioglitazon eine vermehrte Apoptose ohne Änderungen der Proliferation aufweisen.

Zum Schluss bleibt noch zu erwähnen, dass zwei klinische Phase 2-Studien, die den klinischen Einsatz einer palliativen Therapie mit Thiazolidindionen bei Patienten mit Mammakarzinomen⁶² sowie Liposarkomen⁶³ untersuchten, jeweils vorzeitig aufgrund einer Progression des Tumorwachstums bzw. der Symptomatik abgebrochen werden mussten. Dies betont noch einmal die kritische Interpretation von in vitro Daten zu Effekten einer PPAR γ Aktivierung in Tumorzelllinien im Vergleich zu biologischen Daten von in vivo Studien. Es muss aber auch angemerkt werden, dass bei Patienten mit malignen vaskulären Tumoren die anti-angiogenetischen Therapie mit Pioglitazon, Rofecoxib und Trofosamid zu einer signifikanten Regression des Tumorumfanges in der Mehrzahl der Patienten führte⁶⁴.

5 Zusammenfassung

Der intrazelluläre Hormonrezeptor PPAR γ spielt eine Rolle in vielen Differenzierungsprozessen. Zudem konnte in multiplen malignen Tumoren verschiedenen Ursprungsgewebe gezeigt werden, dass sowohl Proliferation als auch Apoptose beeinflusst werden können und so eine neuartige antiproliferative Therapieoption bestehen könnte. Im Barrettadenokarzinom des distalen Ösophagus, einer malignen Neoplasie auf dem Boden von Magensäure- und Dünndarmsekretreflux, sind diese Zusammenhänge bisher nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Studie sollte eine Untersuchung von Proliferation und Apoptose des Barrettadenokarzinoms unter dem Einfluss von einer PPAR γ -Aktivierung durch den synthetischen Agonisten Pioglitazon sein. Dazu wurden in vitro Zelllinien von Barrettadenokarzinomen und von Plattenepithelkarzinomen sowie humane Barrettgewebeproben auf Expression von PPAR γ untersucht. Zudem wurde nach Stimulation mit Pioglitazon die Wirkung auf Proliferation und Apoptose gemessen. Nach Generierung von soliden Tumoren in immundepletierten balb/c nu/nu Mäusen wurden diese mit Pioglitazon-haltigem Actos® stimuliert und das Tumorwachstum mit einer Kontrollgruppe verglichen. Zudem wurden nach Explantation der Tumore histologisch Apoptose- und Proliferationsverhalten bestimmt.

Wir konnten zeigen, dass PPAR γ in humaner Barrettmukosa und in der humanen Barrettadenokarzinomzelllinie OE33 überexprimiert ist. PPAR γ Aktivierung inhibiert das Wachstum von OE33-Barrett-Adenokarzinomzellen in vitro durch eine Induktion von Apoptose, während das Wachstum von transplantierten Tumoren, die von OE33-Zellen abgeleitet wurden, in vivo durch systemische PPAR γ -Aktivierung auf dem Boden einer gesteigerten Proliferation und einer Hemmung der Apoptose verstärkt wurde. Diese Ergebnisse charakterisieren PPAR γ als einen potentiellen molekularen Mediator, der in die Entwicklung eines Barrettepithels mit Metaplasie aus normalem Plattenepithel in dem gastroösophagealen Übergang involviert ist.

Literaturverzeichnis

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
2. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779-89.
3. Wahli W, Martinez E. Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J* 1991;5:2243-9.
4. Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, Nadzan AM, Paterniti JR, Jr., Heyman RA. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997;386:407-10.
5. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992;355:446-9.
6. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
7. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-9.
8. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4318-23.
9. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant

- expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994;135:798-800.
10. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-56.
 11. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:237-41.
 12. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998;1:465-70.
 13. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* 1998;4:1053-7.
 14. Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A, Ito T, Kawamura J, Kawabe A, Kaganoi J, Maeda M, Watanabe G, Imamura M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2003;39:2239-46.
 15. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8806-11.
 16. Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 1998;115:1049-55.
 17. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation

- and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998;4:1046-52.
18. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998;58:3344-52.
 19. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:5558-64.
 20. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 1999;455:135-9.
 21. Nakashiro K, Begum NM, Uchida D, Kawamata H, Shintani S, Sato M, Hamakawa H. Thiazolidinediones inhibit cell growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Oral Oncol* 2003;39:855-61.
 22. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.
 23. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52.
 24. Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble GW, Leesnitzer LM, Stimmel JB, Willson TM, Rosen E, Sporn MB. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2003;9:2798-806.
 25. Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1379-83.
 26. Cameron AJ, Arora AS. Barrett's esophagus and reflux esophagitis: is there a missing link? *Am J Gastroenterol* 2002;97:273-8.

27. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998;83:2049-53.
28. Bareiss D, Stabenow R, Muller R, Eisinger B, Stegmaier C, Daubler P, Zeitz M, Scherubl H. [Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1367-74.
29. Conio M, Lapertosa G, Bianchi S, Filiberti R. Barrett's esophagus: an update. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46:187-206.
30. Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002;346:836-42.
31. Riddell RH. Premalignant and early malignant lesions in the gastrointestinal tract: definitions, terminology, and problems. *Am J Gastroenterol* 1996;91:864-72.
32. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-12.
33. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SE. Barrett's oesophagus: microsatellite analysis provides evidence to support the proposed metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:49-60.
34. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69-78.
35. Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma. *Histopathology* 2003;42:457-65.
36. Zhang F, Altorki NK, Wu YC, Soslow RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Duodenal reflux induces cyclooxygenase-2 in the esophageal mucosa of rats: evidence for involvement of bile acids. *Gastroenterology* 2001;121:1391-9.

37. Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 2000;118:487-96.
38. Kaur BS, Triadafilopoulos G. Acid- and bile-induced PGE(2) release and hyperproliferation in Barrett's esophagus are COX-2 and PKC-epsilon dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G327-34.
39. Rockett JC, Larkin K, Darnton SJ, Morris AG, Matthews HR. Five newly established oesophageal carcinoma cell lines: phenotypic and immunological characterization. *Br J Cancer* 1997;75:258-63.
40. Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer* 1992;69:277-84.
41. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1319-27.
42. Illert B, Otto C, Thiede A, Timmermann W. Detection of disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:549-54.
43. Frantz S, Hu K, Widder J, Bayer B, Witzel CC, Schmidt I, Galuppo P, Strotmann J, Ertl G, Bauersachs J. Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 2004;141:9-14. Epub 2003 Dec 8.
44. Konturek PC, Nikiforuk A, Kania J, Raithel M, Hahn EG, Muhldorfer S. Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors. *Dig Dis Sci* 2004;49:1075-83.
45. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:748-59.

46. Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, Stuart RC, Wright N, Harrison R, Jankowski JA. Tumour necrosis factor- α in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene* 2002;21:6071-81.
47. Abdel-Latif MM, O'Riordan J, Windle HJ, Carton E, Ravi N, Kelleher D, Reynolds JV. NF- κ B activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg* 2004;239:491-500.
48. Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Zhan Q, Shelhamer JH, Wu T. PPAR γ ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21 pathway. *Hepatology* 2003;38:167-77.
49. Koga H, Sakisaka S, Harada M, Takagi T, Hanada S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Sasatomi K, Kimura R, Hashimoto O, Ueno T, Yano H, Kojiro M, Sata M. Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 2001;33:1087-97.
50. Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. PPAR γ induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* 1997;11:1987-98.
51. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000;275:22435-41.
52. Morrison RF, Farmer SR. Role of PPAR γ in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:17088-97.
53. Sporn MB, Suh N, Mangelsdorf DJ. Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPAR γ modulators (SPARMs). *Trends Mol Med* 2001;7:395-400.
54. Keshamouni VG, Reddy RC, Arenberg DA, Joel B, Thannickal VJ, Kalemkerian GP, Standiford TJ. Peroxisome proliferator-activated

- receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2004;23:100-8.
55. Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagama H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 2003;124:361-7.
56. Pighetti GM, Novosad W, Nicholson C, Hitt DC, Hansens C, Hollingsworth AB, Lerner ML, Brackett D, Lightfoot SA, Gimble JM. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res* 2001;21:825-9.
57. Suh N, Wang Y, Williams CR, Risingsong R, Gilmer T, Willson TM, Sporn MB. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1999;59:5671-3.
58. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* 1998;4:1058-61.
59. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
60. Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Trimboli AJ, Fonteh AN, High KP, Chilton FH. Magnitude of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation is associated with important and seemingly opposite biological responses in breast cancer cells. *J Investig Med* 2001;49:413-20.
61. Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001;61:6213-8.
62. Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

- gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:391-7.
63. Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciote R, Debiec-Rychter M, Oyen R, Van Oosterom A. A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 2003;89:1409-12.
64. Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, Landthaler M, Andreesen R, Reichle A. Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trofosfamide in patients with advanced malignant vascular tumors. *Cancer* 2003;98:2251-6.

Danksagungen

Prof. Dr. med. J. Seufert

Dr. med. O. Al-Taie

Dr. rer. nat. G. Päth

Priv.-Doz. Dr. med. B. Illert

Dr. med. H.-U. Barthelmes

Dr. rer. nat. M. Christensen

Dr. med. V. Kunzmann

Daniela Dietrich

Nadine Kehl

Patrizia Seeberger

Heidi Runknagel

Dr. med. K. Laubner

Peter Kühnen

Anne Opel

Veit Rothhammer

Torsten Ott

und allen weiteren Mitarbeitern im Hormonlabor

sowie meiner Familie und Freunden für ihre große Unterstützung

Lebenslauf

persönliche Daten

Geburtstag: 16. August 1978
Geburtsort: Göttingen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schullaufbahn

1985 - 1987 Grundschule Glarum, Friesland
1987 - 1989 Grundschule Allerstraße, Wilhelmshaven
1989 - 1990 OS Franziskusschule, Wilhelmshaven
1990 - 1991 OS Augustinusschule, Hildesheim
1991 - 1998 Bischöfl. Gymnasium Josephinum, Hildesheim
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1999 - 04/1999 Sanitätsregiment 1, Hildesheim

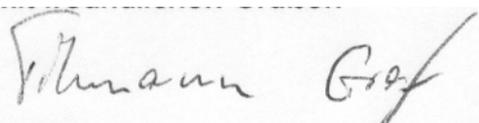
Studium

05/1999 – 11/2005 Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/2001 Ärztliche Vorprüfung
04/2002 Ärztliche Prüfung, 1. Teil
09/2004 Ärztliche Prüfung, 2. Teil
10/2005 Ärztliche Prüfung, 3. Teil
11/2005 Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2006 Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität
Münster

Münster, den 5.01.2007


Tilmann Graf