



Fakultät für Medizin

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Caveolin-1 und Gallensalze in der Barrett-Metaplasie

Jörg Moritz Tobiasch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation

1. Prof. Dr. Roland M. Schmid
2. apl. Prof. Dr. Wolfgang L. E. Huber

Die Dissertation wurde am 05.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2016 angenommen.

Untersuchungen zu Caveolin-1 und Gallensalzen bei der Barrett-Metaplasie

„This paper concerns a condition whose existence is denied by some, misunderstood by others, and ignored by the majority of surgeons. It has been called a variety of names which have confused the story because they have suggested incorrect etiological explanations...“

Norman Barrett, 1957

“When I use a word,” Humpty Dumpty said, in rather a scornful tone, “it means just what I choose it to mean--neither more nor less.”

“The question is,” said Alice, “whether you can make words mean so many different things.”

Lewis Carroll, Alice im Wunderland

Inhalt

<i>Zusammenfassung</i>	7
<i>Hauptteil</i>	15
Grundlagen	15
Epidemiologie der Refluxerkrankung, der Barrett-Metaplasie und des Ösophaguskarzinoms	15
Historische Modellvorstellung zur intestinalen Metaplasie	17
Spezielle Pathologie der Barrett-Metaplasie und des Adenokarzinoms des Ösophagus	18
Histologie und pathologische Klassifikation	18
Risikofaktoren	20
Ätiologie und Pathogenese	23
Verlauf	25
Progression zum Adenokarzinom	25
Therapie und Prognose	26
Genetik der Barrett-Metaplasie	27
Epidemiologische Daten	27
Initiation der Metaplasie	29
Genetische Veränderungen in der Progression zum Adenokarzinom	30
Physiologische und biochemische Grundlagen	31
Embryologie des Ösophagus und des ösophago-gastralen Übergangs	31
Biologie und Physiologie der Gallensäuren	31
Signalwege	34
Nukleäre xenobiotische Rezeptoren	34
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	35
Cholesterin-Homöostase	36
Funktion von Caveolin-1	38
Pathophysiologie des gastroösophagealen Refluxes	40
Modelle zur Erforschung der gastroösophagealen Refluxerkrankung	41
Zelluläre Modelle	41
Tiermodelle	42
Ziel der Arbeit	44
Experimenteller Teil	45
Material und Methoden	45
Kulturmedien und Substanzen	45
Kulturmedien	45

Zellreihen	45
Gallensalze	46
Zelluläre Assays	46
Gene und Genabschnitte	46
Transfektion	48
MTT-Assay zur Analyse von Wachstumskurven und zur Toxikologie	49
Luciferase Reporter Assay	50
Expositionsversuche	50
Schnelle Zellaktivierung	50
Langzeitexposition	51
Färbetechniken	51
Routine-Histologie	51
Immunhistochemie	52
Immunfluoreszenzmikroskopie	53
Gewebe-Mikroarray	54
Proteinanalytik	54
SDS-Polyamidgel-Elektrophorese	54
ECL-Western Blot	55
LI-COR® Odyssey Western Blot	56
Nukleinsäureanalytik	56
Isolation von DNA	56
Isolation von RNA	57
cDNA-Synthese	57
Chromatin-Immunpräzipitation	57
Standard-PCR	59
Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	60
Bisulfit-Konversion von DNA	61
Methylierungsspezifische PCR	62
DNA-Gelelektrophorese	62
Computergestützte Analyse	63
Ergebnisse	64
Einfluss und Funktion von Caveolin-1 und seiner dominant-negativen Variante	64
Caveolin-1-Expression in verschiedenen Zelllinien	64
Stabile Transfektion von OE-19-Zellen	64
Wachstumskurve	65
Caveolin-1- und SREBP-1-Expression im Ösophagus	66

Stimulation des MAPKK-MAP-Erk-Signalwegs durch CDCA	68
Prognostische Relevanz der Caveolin-1-Expression im Barrett-Karzinom	69
Negativer Zusammenhang zwischen Caveolin-1-Expression und Gallensalzexposition	70
Untersuchungen zur Genexpression von Caveolin-1 in vitro	70
Caveolin-Expression und CDCA-Exposition in vivo	72
Interferenz mit dem SREBP-Signalweg	72
Funktionelle Promotoranalyse	73
Epigenetische Untersuchung	74
Zusammenfassung	75
Diskussion	76
Ergänzende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe	76
Ergebnisse dieser Arbeit	77
Biologische Unterschiede zwischen OE-21, EPC-htert und HET-1A	77
Beeinflussung der Cholesterinregulation durch Gallensäuren	77
Ergänzung des Modells der Pathogenese der Barrett-Metaplasie	78
Terminologie	79
Mechanismen der epithelialen Schädigung	80
Epitheliale und subepitheliale Schädigung	80
Unspezifische Schädigung	81
Unspezifische Signaltransduktionseffekte von Gallensäuren	82
Signaltransduktionseffekte spezifischer Gallensalzrezeptoren	83
Effekte anderer Hormone und Signalmoleküle	84
Veränderung des mikrobiellen Milieus	84
Reparaturmechanismen	84
Lineage Tracing	85
Tiermodell der Barrett-Metaplasie	86
Tiermodelle der Barrett-Metaplasie – Ausblick	86
Beschränkungen der Arbeit	88
Abschließende Bemerkungen	90
<i>Literaturverzeichnis</i>	91
<i>Anhang</i>	104
Sequenz des Caveolin-1-Promotors	104
Danksagungen	105

Zusammenfassung

Die Barrett-Metaplasie des Ösophagus ist eine Komplikation der gastroösophagealen Refluxerkrankung, deren Pathogenese auf zellbiologischer und molekularer Ebene bis heute umstritten ist. Sie stellt eine Vorstufe des Adenokarzinoms des Ösophagus dar, dessen Inzidenz in den letzten Jahrzehnten erheblich angestiegen ist.

Bislang sind keine chemopräventiven Strategien zur Verhinderung oder zur Therapie einer Barrett-Metaplasie bekannt. Auch eine Säuresuppression mit Protonenpumpenhemmern kann, der gegenwärtigen Studienlage folgend, diese Gewebsveränderung nicht effektiv behandeln. Andere, bislang nicht systematisch erforschte Bestandteile der Refluxflüssigkeit sind Gallensäuren, die als Ausscheidungsprodukt von Cholesterin und Steroidhormonen eine wichtige Rolle in der Verdauung von lipidhaltigen Nahrungsmitteln, aber auch als Signalmoleküle spielen. Die aktuelle Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Gallensäuren auf den zentralen Signalweg der Cholesterin-Regulation, der über das Sterol regulatory element binding protein (SREBP) vermittelt wird.

Als Zielgen dieses Stoffwechselwegs wurde Caveolin-1 untersucht, ein Gen, das drei mögliche sterol regulatory elements im Promotor trägt. Dieses fast ubiquitär vorkommende membranassoziierte Protein hat unter anderem die Funktion, die intrazelluläre Cholesterinverteilung zu regulieren. Im Zusammenspiel mit anderen Signalproteinen gilt Caveolin-1 in gesunden Geweben als ein differenzierungsrelevanter Faktor, der einer malignen Entartung entgegenwirkt. Untersuchungen an Resektionspräparaten menschlicher Ösophaguskarzinome gaben nun Hinweise darauf, dass in stark dedifferenzierten Tumoren Caveolin-1 auch negative Effekte im Hinblick auf Metastasierung und Invasion haben kann.

In Expositionsversuchen in Zellkulturen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Gallensäuren – insbesondere die stark hydrophoben Derivate Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure – Einfluss auf die Expression von Caveolin-1 haben. Diese Reaktion ist abhängig vom Gewebetyp: Zelllinien, die adenoiden Epithelien abstammen, zeigten eine Induktion ausgehend von einem sehr niedrigen Expressionsniveau. In Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Der Effekt ließ sich im Luciferase-Reporterversuch auch in anderen Zelllinien nachweisen. Die funktionellen Untersuchungen des Caveolin-1-Promotors bestätigten, dass mindestens ein SRE auf Gallensalzexposition die Expression des Cav-1-Gens verändern kann. Dieser Effekt geht einher mit einer Veränderung des Musters der proteolytischen Spaltprodukte von SREBP und ist durch Blockade der aktivierenden Proteolyse durch ALLN reversibel.

Mit der Aktivierung von SREBP konnte ein potentiell differenzierungsrelevanter Signalweg identifiziert werden, der durch Gallensäuren beeinflusst wird. Neben der unspezifischen, am ehesten inflammatorischen Schädigung des Epithels liegen nun Hinweise auf Veränderungen vor, die durch direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion auch im nichtentzündlichen Gewebe zu einer Veränderung der Genex-

pression führen kann. Die Modellvorstellung der Entstehung der Metaplasie kann daher im Lichte dieser Ergebnisse dahingehend erweitert werden, dass im Zuge der unspezifischen chemischen epithelialen Schädigung Signalwege aktiv werden, die eine Regeneration des Plattenepithels behindern und einer Regeneration aus Stammzellen im Cardia-Bereich Vorschub leisten, die ihrerseits eine adenoide Differenzierung aufweisen. Damit erhält die pathogenetische Vorstellung, dass die Barrett-Metaplasie aus der Cardia des Magens hervorgeht, weitere Unterstützung.

Zur weiteren Erforschung der Rolle der Gallensalze ist eine genauere biologische Charakterisierung der verschiedenen Gallensalze sowie ihr Einfluss auf das Plattenepithel des Ösophagus und die Kardialstammzelle notwendig.

Abstract

Barrett's metaplasia of the oesophagus is a complication of gastro-oesophageal reflux disease, whose cellular and molecular pathogenesis still is under discussion. It represents the premalignant precursor lesion of the oesophageal adenocarcinoma, of which the incidence has risen dramatically over the last decades.

Up to now, no chemopreventive strategies are known to suppress or to treat Barrett's metaplasia. Even acid suppression with proton pump inhibitors failed to show, according to current studies, a reversing effect. Other components of the refluxate are bile acids, excreted derivatives of cholesterol and steroid hormones, which serve as detergents in the digestion of lipid-rich foods, and as intestinal signalling agents. The presented work focuses on the effect of bile acids on one central pathway of cholesterol homeostasis, mediated by sterol regulatory element binding protein, SREBP.

As a target gene of this pathway with three putative sterol regulatory elements in its promotor, Caveolin-1 was investigated. This nearly ubiquitous membrane-associated protein plays a role in intracellular cholesterol trafficking. In interaction with other signalling molecules, it is seen as a pro-differentiating factor in healthy tissues, counterbalancing malignant progression. Research on resection specimen of human oesophageal adenocarcinoma now disclosed that in highly de-differentiated tumours Caveolin-1 may exert negative effects towards metastasis, and invasion.

In exposure trial in cell cultures, it could be shown in this work that bile acids – in particular the highly hydrophobic derivatives chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid – influence the expression of Caveolin-1. This reaction seems to be tissue specific, since cell lines derived from adenoid epithelia showed an increased expression, starting from a very low expression level, and squamous-derived cell lines showed the opposite effect. This effect was reproducible in other cell lines in the luciferase reporter assay. Functional investigation of the Cav-1-Promotor supported this finding and provided evidence that at least one of the three putative sterol regulatory elements can alter Caveolin-1 expression upon bile salt exposure. This effect is accompanied by differential SREBP cleavage patterns and may be reversed by blocking proteolytic cleavage with ALLN.

With the activation of SREBP cleavage a pathway potentially relevant for differentiation influenced by bile acids. Besides the well-described nonspecific inflammatory epithelial damage, there is evidence for changes induced by ligand-receptor interaction in noninflammatory tissues leading to changes in gene expression.

The model of the pathogenesis of Barrett's metaplasia can be expanded in view of these findings: parallel to the unspecific chemical damage to the tissue, pathways may be activated that block regeneration of the squamous epithelium and may enhance regeneration out of stem cells in the gastric cardia. Hence, the pathogenetic theorem of Barrett's metaplasia arising from cardia stem cells sees further support.

Further research should focus on the characterisation of the different bile acid derivatives and their influence on the squamous epithelium of the stomach, and the cardia stem cell.

Abbildungen und Tabellen

Tab. 1b: UICC-Einteilung der Ösophaguskarzinome	18
Tab. 1a: TNM-Einteilung der Ösophaguskarzinome	18
Abb. 1: Biosynthese der Gallensäuren	30
Abb. 2: Strukturformeln der untersuchten Gallensäuren	31
Tab. 2: xenobiotische Rezeptoren und ihre Liganden	32
Abb. 3: schematische Struktur xenobiotischer Rezeptoren	32
Abb. 4: SREBP-Signalweg	34
Abb. 5: Caveolin-1	35
Abb. 6: Caveolin-Promotor mit sterol regulatory elements	36
Tab. 3: Zelllinien zur Untersuchung söophagealer Erkrankungen	39
Tab. 4: Tiermodelle	40
Abb. 7: Western Blot auf Caveolin-1 in Lysaten der Zelllinien OE-19, OE-21 und OE-33	43
Abb. 8: Schema des Transfektionsplasmids auf der Basis eines pCNA3-Vectors	44
Abb. 9: Schema des Luciferase-Transfektionsplasmids	44
Tab. 5b: methylierungsspezifische Primer	45
Tab. 5a: cDNA-Primer	45
Tab. 6a: Standard-PCR-Probenansatz	56
Tab. 6b: Standard-PCR-Parameter	56
Tab 7a: Probenansatz qPCR	57
Tab 7a: Ablaufparameter qPCR	57
Abb. 10: Prinzip der Bisulfit-Konversion	58
Tab. 8b: methylierungsspezifische Primer	58
Tab. 8a: cDNA-Primer	58
Abb. 10b: Caveolin-1-Western-Blot, vorbekanntes Muster	61
Abb. 10a: Caveolin-1 in verschiedenen Zelllinien	61
Abb. 11: Cav-1-mRNA in stabil transfizierten OE-19-Klonen	62
Abb. 12a: Wachstumskurven der Klone, DMSO-Kontrolle	62
Abb. 12b: Wachstumskurven der Klone, Stimulation mit CDCA	63
Abb. 12c: Statistische Auswertung der Wachstumskurven	63
Abb. 13c: IHC auf Cav-1, Mensch	64
Abb. 13c: qPCR auf Cav-1, Maus	64
Abb. 13b: IHC auf Cav-1, Maus	64
Abb. 15a: Western Blot auf Phospho-Erk	65
Abb. 14: Immunhistochemie auf SREBP-1 und Caveolin-1, Maus	65

Abb. 15b: Ladekontrolle mit beta-Aktin	65
Abb. 17: Dynamik der Caveolin-1-Expression nach Gallensalzexposition	68
Abb. 18: Caveolin-1-Repression in OE-21 und EPC-htert-Zellen	68
Abb. 19: Cav-1-Repression in OE-21 und EPC-htert	68
Abb. 20: Caveolin-1-Repression und seine Hemmung mit ALLN	69
Abb. 21a: Quantifizierung des aktiven SREBP-1-Fragments	70
Abb. 21b: ECL-Western-Blot des aktiven SREBP-1-Fragments in Abhängigkeit von ALLN	70
Abb. 22: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von FBS, CDCA und ALLN	70
Abb. 23a: Chromatin-IP zur Untersuchung der Bindung von SREBP-1 an den Cav-1-Promotor.	71
Abb. 23b: Einfluss von ALLN auf die SREBP-1-Bindung	71
Abb. 24: Epigenetische Regulation von Cav-1 durch Methylierung des Promotors	72
Abb. 25: intrazelluläre Lokalisation von Caveolin-1 in OE-21 und -19-Zellen	73

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
18FDG-PET	18Fluor-Deoxyglucose-Positronenemissionstomografie
5-Aza	5-Azacytidin
5-FU	5-Fluorouracil
ADP	Adenosindiphosphat
AEG	Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction
ALLN	Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Barrett's esophagus (engl. für Barrett-Ösophagus)
BMI	body mass index
BMP-4	bone morphogenic protein 4
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	bovine serum albumin
CA	cholic acid, engl. für Cholsäure
CAR	constitutive androstane receptor
Cav-1, -2, -3	Caveolin-1, -2, -3
CCK-2	Cholecystokinin-2
CDCA	chenodeoxycholic acid, engl. für Chenodeoxycholsäure
cDNA	copy DNA
Cdx-1, -2	Caudal homeobox-related gene 1, 2
CIM	zylindrische intestinale Metaplasie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1, -2	Cyclooxygenase 1, 2
CpG	Cytosine-Guanin-Dinukleotid
.csv	comma separated value (Dateiformat)
CT	Computertomografie
ct	cycle threshold
CYP	Cytochrom-P450-Oxidoreduktase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCA	deoxycholic acid, engl. für Deoxycholsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, engl. für Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemoluminescence
EGF, -R	epidermal growth factor, - receptor
FCS	fetal calf serum
FISH	fluorescence in-situ hybridisation
FXR	Farnesoid X receptor
GERD	gastro-esophageal reflux disease (US-engl., gastroösophageale Refluxerkrankung)
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gln	Glutamin
GpBAR-1	G-protein coupled bile acid receptor 1, syn.: Tgr5
H. pylori	Helicobacter pylori
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGD	high grade dysplasia (engl. für hochgradige Dysplasie)
HMGCoAS	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase
Ihh	Indian hedgehog
IL-1, -4	Interleukin-1, -4
iNOS	induzierbare Nitroxid-Synthase
IP	Immunprezipitation
kD	Kilodalton, 1000 Dalton
KLF-4	Kruppel-like factor 4
LCA	lithocholic acid, engl. für Lithocholsäure
LD50	lethal dose 50 (Dosis, bei der 50% der Zellen sterben)
LGD	low grade dysplasia (engl. für niedriggradige Dysplasie)
LSBE	long-segment Barrett esophagus
LXR	Liver X receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase

mRNA	messenger RNA
MTT	Methylthiazoltetrazolium, korrekt: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
Muc-2	Mucin 2
mut	Mutante
NFkappaB	nuclear factor kappa B
PAGE	Polyamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, engl. für Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK-C	Proteinkinase C
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PPI	Protonenpumpeninhibitor
Ptch-1	Patched-1
qPCR	quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid, engl. für Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rt-PCR	reverse transcriptase PCR
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SDS	sodium dodecyl sulfate, engl. für Natriumlaurylsulfat
Shh	Sonic hedgehog
SIM	spezialisierte intestinale Metaplasie
SNP	single nucleotide polymorphism
SRE	sterol regulatory element
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein 1
SSBE	short-segment Barrett esophagus
TAE Buffer	Puffer aus Tris-Base, EDTA und Acetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF beta	transforming growth factor beta
Tgr5	Thyroid growth factor receptor 5, syn.: GpBAR-1
TLER	transient lower esophageal sphincter relaxations
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDCA	ursodeoxycholic acid, engl. für Ursodeoxycholsäure
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp
β2M	beta-2-Mikroglobulin

Hauptteil

Grundlagen

Epidemiologie der Refluxerkrankung, der Barrett-Metaplasie und des Ösophaguskarzinoms

Krebserkrankungen des Ösophagus sind insgesamt seltene Erkrankungen. Pro Jahr treten in Deutschland etwa 8,7/100.000 bei Männern und etwa 2,1/100.000 bei Frauen. Europaweit liegt die Inzidenz nur leicht niedriger (Tumorregister München, n.d.). Adenokarzinome des Ösophagus sind allerdings in ihrer Inzidenz in den letzten 30 Jahre dramatisch angestiegen – stärker als die jeder anderen Krebserkrankung. Die Prognose dieser Krebserkrankung ist schlecht; die Fünfjahresüberlebensrate nach gelungener Resektion beträgt über alle Stadien und Subtypen nur knapp 20%. Die Prognose konnte seit 1974 nur sehr geringfügig gesteigert werden (Tumorregister München, n.d.). Es besteht also dringender Bedarf, die Entstehungsmechanismen und die Biologie dieser Krebserkrankung zu erforschen, um die Prognose langfristig verbessern zu können.

Krebserkrankungen des Ösophagus sind in aller Regel Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome. Sehr selten können auch gastrointestinale Stromatumore (GIST), Lymphome, neuroendokrine Tumore und Leiomyosarkome auftreten. Wegen ihrer eigenen Biologie und der geringeren klinischen Relevanz werden diese selteneren Formen in dieser Arbeit nicht näher behandelt.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass sich Plattenepithel- und Adenokarzinome im Hinblick auf ihre jeweilige Epidemiologie, Pathogenese, ihrem Verlauf, ihrer Therapie und Prognose und nicht zuletzt auch in ihrer Tumorbiologie so deutlich unterscheiden, dass sie eher als eigenständige Krankheitsbilder und nicht lediglich als unterschiedliche Manifestationsformen einer malignen Speiseröhrenerkrankung angesehen werden sollten (Siewert, Rothmund, & Schumpelick, 2010). Leider wird diese Unterscheidung in den meisten klinischen Studien zum Ösophaguskarzinom nicht beachtet. Deren Aussagekraft ist daher in einigen Fragestellungen eingeschränkt. Auch die jüngste Version des ICD-10 teilt die Krebserkrankungen des Ösophagus unter dem Code C15.- lediglich anhand der anatomischen Lokalisation ein (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information, 2011). Da diese Einteilung auch in vielen Krebsregistern übernommen wird, wird eine datenbankbasierte Auswertung ebenfalls eingeschränkt (Tumorregister München, n.d.).

Plattenepithelkarzinome treten in der Mehrzahl der Fälle zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr auf.

Nikotinabusus und der Konsum hochprozentiger alkoholischer Getränke sind häufig, die Patienten haben demzufolge auch häufig entsprechende Begleiterkrankungen und einen eher unterprivilegierten sozioökonomischen Status. Patienten mit einem Adenokarzinom sind tendenziell älter, der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr. Sie leiden oft an Übergewicht und mit einer frappierenden Häufigkeit an einer gastroösophagealen Refluxerkrankung (Siewert et al., 2010; Thrift et al., 2011). An dieser Erkrankung leiden in westlichen Gesellschaften 10-20% der Gesamtbevölkerung (Dent, El-Serag, Wallander, & Johansson, 2005), Männer sind überrepräsentiert, die Erkrankung ist bei Menschen europäischer Abstammung häufiger als in anderen ethnischen Gruppen (X. Fan & Snyder, 2009). Gastroösophagealer Reflux ist damit eine der häufigsten Gesundheitsstörungen in unserem Kulturkreis.

Etwa ein Zehntel der GERD-Patienten entwickelt im Laufe seines Lebens eine Veränderung des Ösophagus-Epithels. Der Ösophagus ist physiologischerweise mit einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel ausgekleidet. Es stellte sich im Rahmen histopathologischer Studien heraus, dass das Epithel der Speiseröhre bei fast allen Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus verändert war: das physiologische Plattenepithel war durch zylindrisches Epithel ersetzt. Nach dem Autor der ersten englischsprachigen Publikation, Norman Barrett, wird diese histologische Veränderung Barrett-Metaplasie genannt (K. E. Bani-Hani & Bani-Hani, 2008; Barrett, 1950; 1957). Die molekularen und zellulären Mechanismen dieser Epithelveränderung sind weitgehend unklar. Es ist allerdings allgemein anerkannt, dass es sich bei der Barrett-Metaplasie um eine fakultative Präkanzerose handelt, in der sich im Laufe mehrerer Jahre Dysplasien entwickeln können.

Die frappant an Ursächlichkeit erinnernde Assoziation zwischen gastroösophagealer Refluxkrankheit und Barrett-Metaplasie wird in einigen Studien kritisch betrachtet: wenngleich das Vorliegen einer Refluxerkrankung der wichtigste Risikofaktor zu sein scheint, so wurde zumindest in einer größeren Studie von Fan und Snyder 2009 nachgewiesen, dass in der Kontrollgruppe ohne GERD-Symptomatik zusammen mehr Adenokarzinome, höhergradige Dysplasien und Barrett-Metaplasien (zusammen) zu finden waren als in der Gruppe der symptomatischen GERD-Patienten – wenngleich in der letztgenannten Gruppe die meisten alleinigen Metaplasien nachgewiesen wurden (X. Fan & Snyder, 2009). Es liegt nahe, dass diese Studie nicht in Betracht gezogen hat, dass die Refluxsymptome möglicherweise erheblich früher zu einer endoskopischen Kontrolle geführt haben und daher die Epithelveränderungen in einem deutlich früheren Stadium erkannt werden konnten, als dies bei den nicht symptomatischen Patienten der Fall war. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass Reflux-Symptome allein kein ideales Kriterium sind, um mit Vorsorgeuntersuchungen zu beginnen. Leider ist zur Zeit kein Parameter bekannt, der Patienten mit erhöhtem Risiko für ein Adenokarzinom des Ösophagus, aber ohne Refluxsymptome zuverlässig identifizieren könnte.

Historische Modellvorstellung zur intestinalen Metaplasie

Seit der ersten systematischen Beschreibung der Barrett-Metaplasie existieren verschiedene, jeweils unvollständige Theorien, mit der die Entstehung dieser Epithelveränderung erklärt werden soll. Norman Barrett war ursprünglich davon ausgegangen, dass es sich um eine dysontogenetische Veränderung handele, das Gewebe also von Geburt an verändert sei. Er nannte die Veränderung daher Endobrachyösophagus, was sich mit „innen verkürzte Speiseröhre“ übersetzen lässt. Allison und Lortat-Jacob folgten dieser Einschätzung nicht, sie beschrieben ihre eigenen Beobachtungen getrennt voneinander als erworbene Veränderung. Barrett schloss sich schließlich dieser Einschätzung an (Allison & Johnstone, 1953; K. E. Bani-Hani & Bani-Hani, 2008; S. R. DeMeester & DeMeester, 2000; Lortat-Jacob, 1951; 1957).

Pathophysiologisch wurde die intestinale Metaplasie mit einer Defektheilung erklärt, die vom Epithel des Magens ausgehe. Wie oben erwähnt ist diese Erklärung aber unvollständig. Sie erklärt nicht, warum das metaplastische Epithel eher postpylorischen Epithelien ähnelt, sie erklärt das Auftreten spezialisierter Zellen wie Becherzellen nicht. Erst jüngste Publikationen beschreiben eine Zellpopulation, von der aus diese Defektheilung ausgehen könnte: in menschlichen Feten wurde an der Grenze zwischen Plattenepithel und zylindrischem Epithel eine Gruppe von Cytokeratin-7-positiven Zellen beschrieben, die auch in C57BL/6-Mäusen zu beobachten sind und dort das Ausgangszellreservoir der intestinalen Metaplasie darstellen (Quante et al., 2012; X. Wang et al., 2011).

Eine weitere Theorie ging von einer Defektheilung aus den submukösen Drüsen des Ösophagus aus. Auch diese Theorie lässt sich mit den histologischen und molekularen Beobachtungen nicht widerspruchsfrei in Deckung bringen. Es gibt zwar Berichte über eine gewisse genetische Ähnlichkeit zwischen den Zellen der Ausführungsgänge der submukösen Drüsen und den Zellen der intestinalen Metaplasie, die Berichte sind allerdings rar und bislang nicht sicher reproduziert. Die direkte Umdifferenzierung ösophagealer Zellen ist unter der Voraussetzung möglich, dass man eine gewisse Plastizität der epithelialen Stammzelle des Ösophagus-Plattenepithel annimmt. Es gibt allerdings bislang keine Hinweise darauf, dass differenzierte Epithelien Stammzellen mit einer solchen Plastizität besitzen.

Die dritte und trotz ihrer inneren Widersprüche häufig vertretene Theorie geht von einer direkten Umdifferenzierung im Ösophagusepithel selbst aus, ohne dass dabei eine weitere Zellpopulation als die plattenepithelialen Stammzellen eine Rolle spielte. Tosh und Slack haben in verschiedenen Übersichtsarbeiten skizziert, welche Veränderungen dazu nötig sein könnten und auf welchem Wege diese Transdifferenzierung vonstatten gehen könnte (Slack & Tosh, 2001; Tosh & Slack, 2002). Sie unterscheiden dabei zwei mögliche Abläufe: entweder verändert sich die Determinierung der Stammzelle im jeweiligen Gewebe – bei der Barrett-Metaplasie also von der Plattenepithellinie hin zur intestinalen Linie – oder die differenzierten Zellen verändern ihren Phänotyp selbst. Sie waren sich bei der Formulierung ihres Artikels wohl der Hindernisse bewusst und beschreiben die Transdifferenzierungshypothese wie folgt:

„Transdifferentiation is the conversion of one differentiated cell type to another, with or without an

intervening cell division, so it challenges our preconceived ideas about the nature of the differentiated state.“ (Tosh & Slack, 2002)

Bei aller wissenschaftlichen Kontroverse bleibt das Problem bestehen, dass eine direkte Transdifferenzierung bei intestinalen Zellen bislang nicht zweifelsfrei beobachtet wurde. Die in jüngster Zeit durchgeführten Versuche lassen eher darauf schließen, dass die Barrett-Metaplasie wahrscheinlich nicht aus den Stammzellen des Plattenepithels hervorgeht, sondern auf ein Einwachsen von Kardialepithelzellen zurückzuführen ist.

Spezielle Pathologie der Barrett-Metaplasie und des Adenokarzinoms des Ösophagus

Histologie und pathologische Klassifikation

Auch über 50 Jahre nach der Erstbeschreibung ist nach wie vor unklar, welche Kriterien die Barrett-Metaplasie definieren (S. R. DeMeester & DeMeester, 2000). In den meisten Ländern der Welt gilt der Nachweis von Becherzellen im Epithel als zwingendes Kriterium (Weinstein & Ippoliti, 1996). Synonym dazu wird der Begriff der spezialisierten intestinalen Metaplasie (SIM) verwendet. Jede Veränderung des Epithels hin zu einem zylindrischen Epithel (cylindric intestinal metaplasia, CIM) ohne Becherzellen wird unter diesem Kriterium aber nicht als Barrett-Metaplasie erfasst und könnte daher in den statistischen Erfassungen übersehen werden. Es ist davon auszugehen, dass gerade durch diese unklare Definition ein großer Teil der Studien kritisch betrachtet werden muss. Grundsätzlich gilt, dass die Epithelveränderungen bis hin zum Karzinom ausschließlich aufgrund ihres histopathologischen Bildes eingeordnet werden. Es werden bisher keine molekularen Marker herangezogen (Cook et al., 2007). Einige Autoren kritisieren die enge Definition allerdings: Becherzellen sind bei Kindern oft nicht nachweisbar, auch bei Erwachsenen fallen etwa 30% der Patienten mit zylindrischem Epithel im distalen Ösophagus nicht unter die strenge Definition der Barrett-Metaplasie (Riddell & Odze, 2009).

Wenn die intestinale Metaplasie sich auf einer kürzeren Strecke als etwa 3 cm ausdehnt, spricht man von einem kurzstreckigen Barrett-Ösophagus (short segment Barrett esophagus, SSBE), ist die maximale Ausdehnung länger, von einem langstreckigen Barrett-Ösophagus (long segment Barrett esophagus, LSBE) (Pera, 2003). Zur Beschreibung des endoskopischen Befundes wurden die Prag C&M-Kriterien erarbeitet. Die maximale Ausdehnung eines Ausläufers des metaplastischen Epithels vom tatsächlichen gastroösophagealen Übergang wird in Zentimetern mit dem Präfix M angegeben. Mit dem Präfix C wird die Strecke angegeben, über die der Ösophagus in der vollen Zirkumferenz mit metaplastischem Epithel ausgekleidet ist. Dieses Stagingssystem wurde in mehreren Kohorten evaluiert und wird auch zur Charakterisierung von Studienpopulationen verwendet (Martinek et al., 2008; P. Sharma et al., 2006; Vahabzadeh et al., 2012).

Das metaplastische Epithel kann im Laufe der Zeit Auffälligkeiten in der histologischen Struktur entwickeln. Sind bei frühen, hoch differenzierten Formen der intestinalen Metaplasie gleichmäßig angeordnete Zellen mit einem kompakten, basalständigen Zellkern und leicht eosinophilen Zytoplasma zu finden, so finden sich in leicht dysplastischen Epithelien bereits schlankere, gedrängt stehende und hochgestreckte Zellen mit länglich verformten Zellkernen, ohne dass jedoch die einschichtige Architektur des Epithels aufgehoben wäre oder eindeutig atypische Zellen aufträten. Diese Stufe der Veränderung wird im Englischen als low grade dysplasia (LGD, für niedriggradige Dysplasie) beschrieben.

Hochgradige Dysplasien sind demgegenüber in der zellulären und epithelialen Architektur deutlich verändert. Die Zellen sind unterschiedlich groß, die Zellkerne sind heterogen, oft aufgelockert und nicht basalständig. Im Englischen wird dieses Stadium als high grade dysplasia (HGD) beschrieben. Die Zellen tragen bereits einige genetische Veränderungen in sich, die auch in invasiven Karzinomen auftreten. Es ist daher davon auszugehen, dass die dysplastische Barrett-Metaplasie die direkte Vorstufe eines invasiven Adenokarzinoms des Ösophagus ist. Diese Einschätzung wird von vielen klinischen Studien unterstützt; eine intestinale Metaplasie mit hochgradiger Dysplasie ist mit einem vielfach erhöhten Risiko für ein Adenokarzinom des Ösophagus verbunden (Hvid-Jensen, Pedersen, Drewes, Sørensen, & Funch-Jensen, 2011; Stein & Siewert, 1993).

Ösophaguskarzinome werden ihrerseits klinisch einerseits anhand ihres histologischen Subtyps, andererseits anhand der UICC- und TNM-Klassifikation und des Differenzierungsgrades eingeteilt. UICC- und TNM-Einteilung sind für Plattenepithel- und Adenokarzinome gleich. Sie sind in Tabelle 1a und 1b wiedergegeben (Tumorregister München, n.d.).

Ausbreitung des Tumors	TNM
Tumor durchbricht Basalmembran nicht	Tis
Infiltration der Lamina propria oder der Submucosa	T1
Infiltration der Lamina muscularis propria	T2
Infiltration der Lamina adventitia	T3
Infiltration benachbarter Organe	T4
keine Lymphknotenmetastasen	N0
Metastasen in regionären Lymphknoten	N1
keine Fernmetastasen	M0
Fernmetastasen in zöliakalen oder zervikalen Lymphknoten	M1a
Fernmetastasen in anderen Organen	M1b

Tab. 1a: TNM-Einteilung der Ösophaguskarzinome

UICC	TNM
0	Tis
I	T0 N0 M0
IIa	T2/T3 N0 M0
IIb	T1/T2 N1 M0
III	T3 N1 M0
	T4 N0/N1 M0
IVa	jedes T und N, M1a
IVb	jedes T und N, M1b

Tab. 1b: UICC-Einteilung der Ösophaguskarzinome

Adenokarzinome des Ösophagus treten meist im distalen Drittel der Speiseröhre auf und metastasieren häufig in Lymphknoten in Richtung des Truncus coeliacus. Fernmetastasen treten bei Karzinomen der Speiseröhre sowohl direkt in der Lunge als auch in der Leber auf. Karzinome des ösophago-gastralen Übergangs und der Kardia, entsprechend der Siewert-Klassifikation AEG Typ II und III, verhalten sich in dieser Hinsicht wie Magenkarzinome und bilden in erster Linie Lymphknotenmetastasen im kleinen und großen Netz sowie Lebermetastasen. Diese Eigenschaften erfordern ein differenziertes chirurgisches Vorgehen bei der Resektion (Siewert et al., 2010; Stein & Siewert, 1993).

Adenokarzinome neigen anders als Plattenepithelkarzinome nicht so häufig zu einem Lokalrezidiv. Daher ist bei der Rekonstruktion der Speisepassage beim erstgenannten Typ ein Magenhochzug im Ösophagusbett möglich. Bei Plattenepithelkarzinomen muss die Rekonstruktion retrosternal oder zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, um das alte Tumorbett ohne Gefahr nachbestrahlen zu können.

Risikofaktoren

Wie bereits erwähnt, ist gastroösophagealer Reflux der bekannteste Risikofaktor der Barrett-Metaplasie, auch wenn etwa 40% der Patienten mit intestinaler Metaplasie keine entsprechenden Symptome haben. Die Studienlage ist überdies widersprüchlich: in einer bevölkerungsbasierten Erhebung in Schweden, in der die Probanden endoskopisch und bioptisch untersucht worden waren, ergab sich eine Gesamtprävalenz der Barrett-Metaplasie von 1,6%. Interessanterweise war allerdings die Prävalenz unter den Reflux-Patienten mit 2,3% gegenüber der Kontrollgruppe mit 1,2% statistisch nicht signifikant erhöht. Refluxsymptomatik hat also, wie oben bereits erwähnt, nur einen geringen Vorhersagewert für das Vorliegen einer Barrett-Metaplasie. Die wichtigsten Risikofaktoren für Reflux sind Nikotinabusus, Genuss von Kaffee und Übergewicht, als Risikofaktor diskutiert wird auch männliches Geschlecht und Alter. Nichtsteroidale Antiphlogistika scheinen einen protektiven Effekt zu haben, der allerdings nicht in allen Studien statistische Signifikanz erreicht (L. A. Anderson et al., 2006; J. S. Wang et al., 2010b).

Die intestinale Metaplasie des Ösophagus ist ihrerseits ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines Adenokarzinoms. Dies gilt sogar unabhängig von der verwendeten Definition des Begriffs der intestinalen Metaplasie. Die Risikosteigerung wurde in früheren Publikationen mit einer bis zu 125fachen Risikosteigerung sehr hoch eingeschätzt, wie in einer Arbeit von Stein und Siewert (1993) zusammengefasst (Stein & Siewert, 1993); jüngere Veröffentlichungen kommen zu geringeren, aber dennoch bemerkenswert deutlichen Risikosteigerungen um den Faktor 11 (Hvid-Jensen et al., 2011). Das geringere Risiko ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Patienten mit dysplastischer intestinaler Metaplasie heute in der Regel engmaschig endoskopisch kontrolliert werden und bereits die Vorstufen des Adenokarzinoms therapiert werden. Es ist aber durchaus möglich, dass das Progressionsrisiko wegen der strengen diagnostischen Kriterien der Barrett-Metaplasie systematisch unterschätzt wird: Becherzellen, die zur Diagnosestellung einer Barrett-Metaplasie in vielen Studien zwingend nachge-

wiesen werden mussten, sind terminal differenzierte Zellen mit einer extrem geringen Entartungsrate. Adenokarzinome der Speiseröhre sind in aller Regel auch keine muzinösen Tumoren, so dass Becherzellen bestenfalls als Proxymarker für die Prognose und Risikoabschätzung in Frage kommen. Diese Einschätzung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass bis zu 41% der Adenokarzinome in zylindrischem Epithel ohne Becherzellen auftreten (Cameron, Souto, & Smyrk, 2002; Riddell & Odze, 2009).

Untersuchungen zum Einfluss von Übergewicht legen den Schluss nahe, dass bei der Barrett-Metaplasie eher die Verteilung des Körperfettes als die absolute Masse oder der Body-Mass-Index bedeutsam ist (L. A. Anderson et al., 2007; Zagari et al., 2008). Eine Waist-to-hip-Ratio von mehr als 0,9 bei Männern und mehr als 0,85 bei Frauen war in einer Studie mit einem relativen Risiko von 4,1 (95%-Konfidenzintervall: 1,7-10,0) für eine Barrett-Metaplasie assoziiert. Diese Daten wurden zwischenzeitlich durch andere Studien bestätigt, einschließlich einer kleinen CT-basierten Messreihe, bei der die Menge des viszeralen Fettes gemessen wurde. In Bezug auf Adenokarzinome des Ösophagus verändert sich das Bild etwas: einige Studien zeigen, dass das Risiko für diese Erkrankung signifikant mit dem BMI korreliert (L. A. Anderson et al., 2007).

Legt man die derzeit verfügbare, umfangreiche Datenlage zugrunde, ergibt sich für die übrigen bekannten Risikofaktoren für das Adenokarzinom ein ähnliches deutliches Bild. Eine US-amerikanische Multicenterstudie quantifizierte den Einfluss der einzelnen Risikofaktoren Übergewicht (definiert als ein Body-Mass-Index von 30 oder größer), Zigarettenrauchen, gastroösophageale Refluxerkrankung, und obst- und gemüsearme Diät mit jeweils 41%, 40%, 30% und 15% der Fälle in der Studienpopulation. Insgesamt war wenigstens einer der genannten Faktoren bei 79% der Patienten zu finden.

Fallberichten zufolge führt auch die operative Entfernung des Pylorus und des unteren Ösophagus-sphinkters langfristig zu einer Barrett-Metaplasie. Dies wurde insbesondere bei Patienten beobachtet, die wegen einer gutartigen Speiseröhrenerkrankung einer Ösophagektomie mit Magenhochzug unterzogen wurden. Nach derartigen Eingriffen wurde auch, mit einer Latenz von etwa 50 Jahren, von der Entstehung von Barrett-Karzinomen berichtet (Dunn, Robertson, Immanuel, & Griffin, 2010).

Anders als beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus spielt Alkoholmissbrauch keine bedeutende Rolle als Risikofaktor der Barrett-Metaplasie und des Barrett-Karzinoms (Freedman et al., 2011). Interessanterweise scheint die Besiedelung mit *Helicobacter pylori*, insbesondere mit CagA-positiven Stämmen, eine protektive Wirkung sowohl vor einer intestinalen Metaplasie als auch des ösophagealen Adenokarzinoms zu haben. Die genaue Ursache dieses Effektes ist bisher unklar. Eine Hypothese besagt, dass die chronische Gastritis, die durch *H. pylori* ausgelöst wird, die Säureproduktion des Magens hemmt und daher den schädigenden Einfluss der Refluxflüssigkeit mindert. Wird *H. pylori* eradiziert, so steigt das Risiko für ein Adenokarzinom des Ösophagus etwas an (Thrift et al., 2011). Da das absolute Risiko jedoch nach wie vor sehr gering ist und Komplikationen der H.-pylori-Besiedelung im Magen und Duodenum deutlich zurückgehen, wird derzeit kein Anlass gesehen, von einer Eradika-

tionstherapie abzuraten (Fischbach et al., 2009).

Die medikamentöse Behandlung der Reflux-Erkrankung mit Protonenpumpeninhibitoren wird ebenfalls als Risikofaktor für die Barrett-Metaplasie diskutiert. Protonenpumpeninhibitoren heben den pH-Wert im Magen wirkungsvoll an und sind in ausreichender Dosierung in der Lage, die Säureproduktion im Magen vollständig zu unterdrücken. Der ansteigende pH-Wert führt physiologisch zu einer kompensatorischen Sekretion von Gastrin, das seinerseits eigentlich dazu dient, die Säureproduktion wieder zu erhöhen. Der physiologische Gastrin-Spiegel liegt in der Regel um 40 pM (J. S. Wang et al., 2010b). In der Folge kommt es bei Patienten, die mit Protonenpumpeninhibitoren behandelt werden, zu einer Hypergastrinämie. Neben seiner prosekretorischen Wirkung gilt Gastrin auch als Wachstumsfaktor der Belegzellen. Nach langjähriger Gabe von Protonenpumpenhemmern ist bei vielen Patienten eine Belegzellhyperplasie zu erkennen. Es gilt zudem als gesichert, dass Gastrin über den CCK2-Rezeptor die Proliferation von Ösophagus-Zellen aktiviert und die Expression von COX-2 induzieren kann (Abdalla et al., 2004; Haigh et al., 2003; J. S. Wang et al., 2010b).

Auch die Spiegel proinflammatorischer Zytokine scheinen bei medikamentös behandelten Patienten gegenüber chirurgisch behandelten deutlich erhöht zu sein. Eine nicht-randomisierte Studie an einer verhältnismäßig kleinen, symptomfreien Patientengruppe (initial n=40) von Babar et al. (2010) (Babar et al., 2010) legt den Schluss nahe, dass die chirurgische Intervention mittels Fundoplicatio nach Rosetti-Nissen mit niedrigeren Spiegeln proinflammatorischer Zytokine einhergeht, als dies bei PPI-Behandlung der Fall ist. Untersucht wurden die p50- und p65-Untereinheit von NFkappaB, die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1alpha, Interleukin-1beta, Interleukin-8 und vascular endothelial growth factor (VEGF). Jedes dieser Proteine wurde bei PPI-Therapie signifikant stärker exprimiert als nach operativer Therapie. Die Expression des antiinflammatorischen Botenstoffes IL-4 war dagegen in beiden Gruppen etwa gleich.

Eine systematische Übersichtsarbeit von Chang und Morris (2007) (E. Y. Chang et al., 2007) gibt Anlass zur Vermutung, dass die medikamentöse Therapie das Lebenszeitrisiko für ein Barrett-Adenokarzinom deutlich erhöht. PPI-Studien ergaben ein Risiko von 6,3 Neuerkrankungen pro 1000 Patientenjahre (95%-Konfidenzintervall 3,6 bis 10,1), wohingegen chirurgische Studien eine Inzidenzrate von 2,8 pro 1000 Patientenjahren aufwiesen (95%-Konfidenzintervall 1,2 bis 5,3). Wurden lediglich kontrollierte Studien berücksichtigt, war der Trend noch vorhanden, aber nicht mehr signifikant: Für die chirurgisch behandelten Patienten ergab sich eine Inzidenzrate von 4,8 pro 1000 Patientenjahre, für PPI-Patienten betrug der Wert 6,5, der p-Wert war 0,38.

In Korrelationsstudien wie der kontrollierten Querschnittsstudie von Wang et al. (2010) (J. S. Wang et al., 2010b) wurde ein Zusammenhang zwischen sekundär erhöhten Serum-Gastrin-Spiegeln und höhergradiger Dysplasien im Barrett-Epithel festgestellt. Statistisch ergab sich zwar kein direkt linearer Zusammenhang zwischen dem Serumgastrinspiegel und einer fortgeschrittenen Neoplasie im Barrett-Epithel, das Risiko für eine derartige Veränderung war jedoch um das Fünffache erhöht, wenn der

Gastrinspiegel im höchsten Quartil der gemessenen Werte war. Die Autoren postulieren einen Grenzwert für Serum-Gastrin: „The association observed with the highest quartile of serum gastrin suggests a possible „threshold“ effect for gastrin“. Leider wird in dieser Publikation kein diskreter Wert angegeben, oberhalb dessen mit einem negativen Einfluss gerechnet werden muss. Eine frühere Fall-Kontroll-Studie hatte bereits einen ähnlichen Zusammenhang zwischen hohen Serumgastrinwerten und colorektalen Karzinomen beobachtet und einen Grenzwert von 90 pM ausgemacht. Diese Studie muss allerdings mit Zurückhaltung bewertet werden, da die Zeit zwischen der Probenentnahme und der Analyse 30 Jahre betrug und in der eingebundenen Fall-Kontroll-Studie lediglich eine kleine, angepasste Kontrollgruppe definiert werden konnte (Thorburn, Friedman, & Dickinson, 1998).

Insgesamt von größerer Bedeutung ist allerdings die Beobachtung der Studie von Jane Wang, dass kein Zusammenhang zwischen dem Gastrin-Spiegel und dem Vorliegen eines nicht-dysplastischen Barrett-Epithels besteht. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Hypergastrinämie nicht als initiales Ereignis oder als verursachender Faktor der Metaplasie anzusehen ist. Insgesamt es aber wahrscheinlich, dass ein deutlich erhöhter Gastrinspiegel ein Risiko für Dysplasie und Karzinom darstellt. Die Bandbreite der Serumgastrinspiegel bei Patienten ist aber so groß, dass auch der Einfluss von PPI nicht generell zu einem erhöhten Risiko beiträgt. Lediglich eine Subgruppe der PPI-Patienten muss wahrscheinlich mit einem höheren Risiko rechnen (J. S. Wang et al., 2010b).

Einige Forscher, wie Pei et al. (2004), sehen auch die bakterielle Besiedelung des distalen Ösophagus als Risikofaktor an. Die physiologische Standortflora im distalen Ösophagus besteht den Untersuchungen von Yang et al. zufolge vor allem aus Streptococcus-Species. Diese verändert sich in einer Ösophagitis und einer Barrett-Metaplasie in Richtung einer von anaeroben Bakterien dominierten Flora, wie sie auch im distalen Gastrointestinaltrakt vorherrscht. Es ist allerdings unklar, ob die Veränderung der Flora Ursache, Folge oder Begleiterscheinung der Metaplasie ist (Pei et al., 2004; L. Yang et al., 2009).

Ätiologie und Pathogenese

Wie oben bereits erwähnt lässt sich aus epidemiologischen Assoziationsstudien erschließen, dass eine intestinale Metaplasie der Speiseröhre mit frappierender Frequenz mit einer gastroösophagealen Refluxerkrankung assoziiert ist. Es gilt als gesichert, dass Reflux von Magenflüssigkeit in die Speiseröhre die Ursache für die Epithelveränderung darstellt. Bis heute unklar ist aber die Rolle der verschiedenen Bestandteile der Refluxflüssigkeit. Unterdrückt man die Produktion von Magensäure, so ist in den meisten Studien lediglich eine Stabilisierung der Metaplasie zu beobachten. Nur in den wenigsten Untersuchungen geht die Epithelveränderung wieder zurück. Daraus wird allgemein gefolgert, dass möglicherweise Gallensäuren, Pepsin oder gastrointestinale Hormone für die Epithelveränderung ursächlich verantwortlich sind.

Seit der Erstbeschreibung der intestinalen Metaplasie der Speiseröhre herrscht Uneinigkeit, ob das

metaplastische Epithel als eingewandert oder als an Ort und Stelle neu entstanden zu betrachten sei. Norman Barrett ging 1950 ausführlich auf die unterschiedlichen Vorstellungen ein und verlegte sich selbst auf die Einschätzung, es handele sich um einen nach kranial verlagerten Magen. Diese Einschätzung revidierte er im Laufe der Jahre, bis sich zunächst der Begriff des Endobrachyösophagus (ursprünglich von Lortat-Jacob geprägt (Lortat-Jacob, 1957)) einbürgerte.

Bis heute wird in einigen chirurgischen Lehrbüchern die Ansicht vertreten, das adenoide Epithel wachse vom Magen aus in die Speiseröhre vor (THIEME, 2010). Im Zuge dieser pathogenetischen Theorie wird demnach die Barrett-Metaplasie auch als Endobrachyösophagus bezeichnet. Anfangs wurde dies auf eine Fehlbildung oder einen nicht weiter spezifizierten pathologischen Prozess zurückgeführt. Diese Hypothese erklärt allerdings nicht, warum das metaplastische Epithel nicht der Magenschleimhaut, sondern dem Darmepithel ähnelt.

Ein anderer Ansatz geht davon aus, dass das adenoide Epithel im Zuge eines Regenerationsprozesses aus den submukösen Drüsen des Ösophagus in das Lumen vordringe (Leedham et al., 2008). Auch die Zellen der submukösen Drüsen entsprechen in ihrer Differenzierung jedoch nicht dem metaplastischen Epithel, so dass auch hier von einem echten Umdifferenzierungsereignis ausgegangen werden muss. Des Weiteren besteht die Einschränkung, dass insbesondere die Ausführungsgänge der Drüsen nur sehr selten proliferieren (van Nieuwenhove, Destordeur, & Willems, 2001).

Eine dritte Hypothese fordert eine direkte Umdifferenzierung des ortsständigen Plattenepithels zu einem intestinalen Epithel. Erklären lässt sich hiermit die sehr enge räumliche Korrelation zwischen der Schleimhautschädigung durch den Reflux – die Hypothese setzt aber einen grundlegenden Umdifferenzierungsprozess voraus, der sonst im Körper bisher nicht beschrieben wurde und ein grundlegendes Paradigma in Frage stellt: nach gegenwärtigem Verständnis ist es einer gesunden Zelle nicht möglich, die Differenzierungslinie zu verlassen oder sich gezielt zu dedifferenzieren. Eine direkte Transdifferenzierung, die mit den Beobachtungen im Einklang steht, muss auf der Ebene einer Stammzelle ablaufen, die sich noch in mehrere Zelltypen entwickeln kann (Tosh & Slack, 2002). Wird die Barrett-Metaplasie jedoch nach einem therapeutischen Eingriff wieder von Plattenepithel verdrängt, so scheint dieses neu entstandene Epithel keine Rückdifferenzierung des zylindrischen Epithels zu sein, sondern von einer anderen Stammzellpopulation auszugehen (Paulson et al., 2006).

Jüngere molekularbiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass die älteste Hypothese, die der vom Magen ausgehenden Ausbreitung des metaplastischen Epithels, unter etwas veränderten Voraussetzungen die Metaplasie erklären könnte. Wang et al. (2011) beschrieben im Mausmodell eine Zellpopulation der Kardia, aus der bei chronischer Schädigung des Plattenepithels eine Defektheilung in cranialer Richtung ausgeht. Unklar ist, ob diese Zellpopulation grundsätzlich vorhanden ist oder nur in dem verwendeten Mausstamm auftritt. Die Autoren beschreiben jedoch eine ähnliche Zellpopulation im Kardiabereich bei 21 Wochen alten menschlichen Föten (X. Wang et al., 2011). Bekannt ist lediglich, dass Kardia-Drüsen, anders als Korpus-Drüsen, molekular den intestinalen Krypten ähnlicher sind als

den Drüsen des Korpus. Dies lässt sich davon ableiten, dass in Kardial-Drüsen einige Lgr5-positive Zellen zu finden sind. Dieses Gen ist im Korpus nicht aktiv, wohl aber in den intestinalen Abschnitten.

Allein aus dem statistisch engen Zusammenhang zwischen Reflux und Metaplasie lässt sich der enorme Inzidenzanstieg der Barrett-Metaplasie nicht erklären. Es mag zutreffen, dass ein gewisser Teil dieses Anstieges darauf zurückzuführen ist, dass die Erkrankung bekannter geworden ist und dadurch häufiger diagnostiziert wird. Auch diese Annahme bietet aber unter realistischen Bedingungen keine zufriedenstellende Erklärung. Genetische Veränderungen werden, wie weiter unten aufgeführt, als Risikofaktoren diskutiert. Da aber nicht davon auszugehen ist, dass in den Jahren des Inzidenzanstieges auch die Prävalenz genetischer Veränderungen zugenommen haben könnte, ist ein besonderes Augenmerk auf Umweltfaktoren und epidemiologische Entwicklungen zu legen. So ist der Anteil Übergewichtiger Personen an der Gesamtbevölkerung im Beobachtungszeitraum deutlich angestiegen. Auch die Protonenpumpenhemmer werden deutlich häufiger eingesetzt. Zudem wird eine Infektion mit *H. pylori* konsequenter behandelt.

Verlauf

Progression zum Adenokarzinom

Die Barrett-Metaplasie wird als fakultative Präkanzerose betrachtet, der gegenwärtige Kenntnisstand um den Ablauf der Progression ist jedoch sehr lückenhaft. Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass das Risiko einer Progression zum Adenokarzinom abhängig ist vom Grad der epithelialen Dysplasie. Geringgradig dysplastische Epithelien haben ein deutlich geringeres Entartungsrisiko als hochgradige Dysplasien (Hvid-Jensen et al., 2011). Die genetischen Veränderungen in den Frühstadien scheinen vielfältig zu sein, der gegenwärtige Stand der Forschung zum Stellenwert und Zeitpunkt der Mutationen ist widersprüchlich.

Da das Risiko der malignen Entartung der Barrett-Metaplasie deutlich höher ist als das des unveränderten Plattenepithels und da zur malignen Entartung nach der gegenwärtigen Vorstellung notwendigerweise genetische Veränderungen auftreten müssen, muss davon ausgegangen werden, dass die genomische Stabilität im metaplastischen Epithel beeinträchtigt ist. Unklar ist bislang, ob dies auf genotoxischen Wirkungen des Refluxes oder auf beschädigten DNA-Reparaturmechanismen basiert. Gallensäuren stehen dabei ebenso wie der geringe pH-Wert im Verdacht, durch Bildung freier Radikale direkt die DNA zu schädigen.

Die Dysplasien im Epithel werden von einer Reaktion des Bindegewebes unterhalb der Basalmembran begleitet. Dieser Prozess wird Desmoplasie genannt und ist gekennzeichnet durch eine Zunahme extrazellulärer Fasern, einer Fibrose und einer Veränderung der Konzentrationen zwischen Matrix-abbauenden Enzymen – vor allem der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 – und ihren Inhibitoren (Gerg et

al., 2008). Der molekulare Mechanismus dieser Veränderung ist bislang ungeklärt. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass Myofibroblasten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark freigesetzt werden und an die Stelle der Dysplasie wandern (Direkze et al., 2004). Dort tragen sie auf bisher nicht vollständig geklärte Weise zur Veränderung der extrazellulären Matrix bei. Diese Veränderung begünstigt wahrscheinlich ihrerseits die Invasion der entarteten epithelialen Zellen in Lymph- und Blutgefäße.

Therapie und Prognose

Für die Behandlung des Ösophaguskarzinoms hat unabhängig vom histologischen Subtyp die radikale chirurgische Tumorextirpation bis heute einen unverzichtbaren Wert. Sie wird in den UICC-Stadien I-III mit kurativem Ansatz durchgeführt und je nach Lokalisation entweder als thorakoabdominelle Ösophagusresektion mit Magenhochzug oder Koloninterponat, Operation nach Merendino oder als transhiatal erweiterte Gastrektomie mit Magenhochzug durchgeführt. Die Zwei-Höhlen-Strategie dient der Behandlung von Ösophaguskarzinomen, die nicht am gastroösophagealen Übergang lokalisiert sind. Diese höher gelegenen Tumoren sind in der Regel Plattenepithelkarzinome. Karzinome des gastroösophagealen Übergangs können in den frühesten Stadien T1m und T1a durch endoskopische Mukosaresektion behandelt werden. Lokal begrenzt wachsende Tumoren ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen können durch Entfernung des distalen Speiseröhrenabschnittes mit anschließender Rekonstruktion mittels eines gefäßgestielten Jejunum-Interponates operiert werden. Lokal fortgeschrittene Formen bedürfen einer multimodalen Therapie mit chemotherapeutischer oder radiochemotherapeutischer Behandlung vor und nach der Operation.

Leider wird in vielen Studien zur adjuvanten und neoadjuvanten Behandlung des Ösophaguskarzinoms nicht zwischen den histologischen Subtypen unterschieden. Damit besteht für keinen der beiden Subtypen ein ausreichender Wirksamkeitsnachweis für diese Therapieform. Es scheint aber Konsens zu sein, dass Plattenepithelkarzinome in erster Linie mittels Radiochemotherapie und Barrett-Karzinome vor allem mittels Chemotherapie vor- und nachbehandelt werden. Bei Untersuchungen am Klinikum rechts der Isar zeigte sich, dass eine Subgruppe der Patienten mit Adenokarzinomen auf die Chemotherapie nicht reagiert. In dieser Subgruppe treten demzufolge auch mehr unvollständige Tumorresektionen auf, die Überlebensrate ist trotz neoadjuvanter Vorbehandlung nicht verbessert. Die gegenwärtige Forschung zielt darauf ab, Vorhersageparameter zu finden, die es erlauben, Patienten mit schlecht ansprechenden Tumoren vor der Chemotherapie zu erkennen und direkt der Chirurgie oder einer modifizierten Vorbehandlung zuzuführen.

Genauere molekulare Mechanismen der Resistenz und des Ansprechverhaltens auf die Chemotherapie sind bislang unbekannt. In einer retrospektiven Analyse von 47 Patienten mit lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs konnten Schauer et al. (2010) zeigen, dass insbesondere der Ephrin-B3-Rezeptor hinsichtlich seiner Expression bei Respondern deutlich höher exprimiert war als bei Non-Respondern (Schauer et al., 2009). Angesichts der geringen Fallzahl und

des unsystematischen Einschlusses kann aus diesen Ergebnissen keine klinische Strategie abgeleitet werden. Die Untersuchung ist jedoch im Zuge der Hypothesengenerierung sinnvoll und auch für die hier beschriebene Arbeit von Relevanz: Ephrin-Rezeptoren, zumindest des Subtyps B1, sind eng mit Caveolin-1 assoziiert.

Siewert et al. (2007) nutzten zu diesem Zweck die metabolische Aktivität des Tumors, die vor und nach dem ersten Zyklus Chemotherapie mittels 18FDG-PET gemessen wurde. Verwendet wurde hier Folinsäure und 5-FU zusammen mit Cisplatin, Oxaliplatin oder Paclitaxel. Sank die Aufnahme der Tracersubstanz auf weniger als 65% des Ausgangswertes, wurde der Tumor als „Responder“ klassifiziert und weiter chemotherapeutisch behandelt. Änderte sich die Aufnahme nicht oder nur sehr wenig, wurde die neoadjuvante Chemotherapie abgebrochen und der Patient direkt der Operation zugeführt. Mit dieser Strategie wollte man die zusätzliche, chemotherapiebedingte Morbidität bei nicht ansprechenden Tumoren verringern. Die Überlebensrate der Patienten, die gut auf die Chemotherapie angesprochen hatten, war signifikant geringer als die der schlecht ansprechenden Patienten. Diese Strategie scheint also durchaus in der Lage zu sein, zuverlässig gut ansprechende Patienten zu erfassen (Lordick et al., 2007). Leider sind die Rückschlüsse auf Unterschiede in der Tumorbiologie allein aufgrund der PET-Untersuchung sehr begrenzt. Eine nachträgliche Analyse der Biopsien auf eine VEGF 936C>T-Mutation konnte bei einem Großteil der Probanden durchgeführt werden. Patienten, die homo- oder heterozygot für die T-Form von VEGF waren, hatten eine deutlich schlechtere Prognose. Dieser Parameter scheint aber vom PET-Verhalten a priori unabhängig zu sein (Lorenzen et al., 2010).

Genetik der Barrett-Metaplasie

Epidemiologische Daten

Krebserkrankungen werden traditionell anhand ihrer histopathologischen Merkmale beschrieben. In jüngerer Zeit trat bei vielen Krebserkrankungen eine Analyse der ihr jeweils zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen hinzu. Für Kolon und Rektum konnte so die Adenom-Karzinom-Sequenz postuliert werden, die zu einem besseren Verständnis des Krankheitsprozesses auf genetischer und histopathologischer Ebene geführt hat (Vogelstein et al., 1988).

Ausgehend von rein histopathologischen Befunden wurde eine ähnliche Sequenz auch für die Entstehung eines Adenokarzinoms des Ösophagus auf dem Boden einer Barrett-Metaplasie formuliert. Diese Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz konnte allerdings bisher nicht mit charakteristischen genetischen Aberrationen in Verbindung gebracht werden. Eine Untersuchung von Rygiel et al. konnte unterschiedliche Amplifikationsfrequenzen in den verschiedenen Stadien dieser Sequenz nachweisen (Rygiel et al., 2008). Das am häufigsten betroffene Gen war in dieser Untersuchung das Proto-Onkogen c-myc mit einer Rate von 18% aller zytologisch untersuchten Barrett-Bürstenabstrichen, gefolgt von

dem Genlocus 20q13 (13%) und EGFR (11%). Mit zunehmender Dysplasie stieg die Rate der Amplifikationen signifikant an. Sind bei niedriggradigen Dysplasien in 22 % der Fälle Amplifikationen mit 3-4 Kopien mindestens eines dieser Loci feststellbar, so zeigen Adenokarzinome bereits in 94% der Fälle mindestens 4 und in 72% der Fälle mehr als 10 Kopien. Es bleibt aber festzuhalten, dass anders als beispielsweise bei Pankreaskarzinomen keine typische, sehr oft vorhandene spezifische Mutation bekannt ist, und die genetischen Veränderungen anders als beim kolorektalen Karzinom bisher nicht klar mit den histopathologischen Veränderungen korreliert werden konnten.

In verschiedenen Studien wurden eine Vielzahl bekannter und im Kontext solider invasiver Tumoren relevanter genetischer Veränderungen untersucht. Für die Barrett-Metaplasie konnte in einer methodisch aufwändigen Arbeit von van Baal et al. dargelegt werden, welche Veränderung in erster Linie im Epithel selbst und welche wahrscheinlich im Stroma auftreten (van Baal et al., 2008). In den primären epithelialen Zelllinien wurde eine verstärkte Expression von Lipocalin 2, SOX-4, Cytokeratin 7, Galectin 7 und Cyclin D1 nachgewiesen. Die bereits von anderen Autoren anhand von Biopsien nachgewiesenen Veränderungen in der Expression von Annexin A10 sowie von trefoil factor 1 und 2 konnten in dieser Arbeit reproduziert werden, finden sich aber eben nur in den Biopsien und nicht in den primären Zelllinien. Daher sei es wahrscheinlich, so schließen die Autoren, dass die letztgenannten Gene wahrscheinlich im Stroma exprimiert werden. Bei der Barrett-Metaplasie sei daher von einer Beteiligung des Stromas auszugehen.

Immunhistochemische Analysen von Haveri et al. zeigten, dass der Differenzierungsfaktor GATA-4 im gesunden Ösophagus mit immunhistochemischen Methoden nicht nachzuweisen ist (Haveri et al., 2008). Ein weiterer für die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts wichtiger Transkriptionsfaktor, GATA-6, war nebst seinem Ziel-Gen Indian Hedgehog lediglich am ösophagogastralen Übergang anfärbbar. Im Gegensatz dazu war die immunhistochemische Färbung in allen Barrett-Biopsien stark positiv.

In einer Untersuchung von Novotna et al. an 24 Patienten mit Barrett-Ösophagus und 21 mit invasivem Karzinom konnte in 9 der Barrett-Karzinom-Fälle, aber in keinem Patienten mit Barrett-Metaplasie eine Mutation des TP53-Genlocus nachgewiesen werden (Novotna et al., 2006). Die Autoren folgern daraus, dass eine TP53-Mutation wohl erst später im Krankheitsverlauf auftrete. Dies sei entweder beim Übergang einer niedergradigen Dysplasie zu einer hochgradigen Dysplasie oder beim Übergang der letztgenannten zum invasiven Karzinom möglich. Andere Autoren widersprechen dieser Ansicht; TP53-Mutationen seien schon früher im Krankheitsverlauf nachzuweisen (Pilger, Lopez, Segal, & Leisner-Segal, 2007).

Polymorphismen des Epidermal growth factors (EGF) stehen im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Barrett-Metaplasie und eines Adenokarzinoms des Ösophagus, führen aber nicht zu einem schnelleren Fortschreiten einer Krebserkrankung (Lanuti et al., 2008). Insbesondere der Genotyp EGF A61G G/G verdoppelt dieser Untersuchung zufolge das Risiko nahezu.

Allen Untersuchungen ist gemeinsam, dass sie von einem oligoklonalen oder vielleicht sogar mono-

klonalen Entstehungsprozess der Metaplasie und der Krebserkrankung ausgehen. Leedham et al. zeigten jedoch mittels Mikrodissektion von Ösophagus-Tumorproben, dass schon innerhalb eines einzigen Tumors erhebliche Unterschiede auf genetischer Ebene bestehen. Damit widersprechen die Autoren der bislang vielen Berichten unausgesprochen zugrunde liegenden Theorie des mono- oder oligoklonalen Ursprungs dieser Krebserkrankung (Leedham et al., 2008).

Initiation der Metaplasie

Welche Gene genau zur intestinalen Metaplasie beitragen, sie initiieren und unterhalten ist ein zentrales Thema der aktuellen Forschung und wäre für ein tieferes Verständnis essentiell. Dem steht bisher entgegen, dass es erst seit kurzem endogene Tiermodelle gibt, und bei Studium der Vorgänge in menschlichen Proben die in der Einleitung genannten unscharfen Definitionen – insbesondere die Beschränkung auf die spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen – zu einer verzerrten Probenauswahl.

Für die spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen gilt caudal homeobox-related factor 2 (Cdx-2) als einer der zentralen Transkriptions- und Differenzierungsfaktoren, insbesondere für Becherzellen. Er wird direkt durch Gallensäuren aktiviert, die ihrerseits NFκB aktivieren (Avisar et al., 2009; Y. Hu, Jones, et al., 2007a; Y. Hu, Williams, et al., 2007b; Kazumori, Ishihara, Rumi, Kadowaki, & Kinoshita, 2005).

Ein Protein mit ähnlicher Funktion wie Cdx-2 ist Krüppel-like factor 4 (KLF-4). Kazumori et al. fanden Hinweise darauf, dass KLF-4 und Cdx-2 sich gegenseitig induzieren können; KLF4 ebenfalls durch NFκB aktiviert wird und seinerseits in der Lage ist, mit Muc-2 ein weiteres differenzierungsrelevantes Gen von Becherzellen zu induzieren (Kazumori, Ishihara, Takahashi, Amano, & Kinoshita, 2011).

Neben Cdx-2 scheint auch sein Homolog Cdx-1 relevant zu sein: In einer Untersuchung von Wong und Kollegen waren alle getesteten metaplastischen Proben positiv für Cdx-1-mRNA, währenddessen sowohl im Magen als auch im gesunden Ösophagus diese mRNA nicht nachweisbar war. Cdx-1 wird den Autoren zufolge durch konjugierte Gallensalze, Interleukin-1β und Tumornekrosefaktor α (TNF-α) NFκB-abhängig aktiviert – jedoch nur, wenn der Promotor unmethyliert oder nur teilweise methyliert ist. Sie folgern daraus, dass die Demethylierung des Cdx-1-Promotors einer der ersten Schritte der Metaplasie sein könnte (N. A. C. S. Wong et al., 2005).

Allen diesen Überlegungen ist gemein, dass auf dem Boden dieser Theorien kein funktionierendes Tiermodell generiert werden konnte.

Weitere, in einzelnen Publikationen beschriebene induzierte Gene sind die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS) (Ferguson et al., 2008; Vaninetti et al., 2008) sowie vascular endothelial growth factor (VEGF) (Burnat, Rau, Elshimi, Hahn, & Konturek, 2007). Auch Signalsysteme der epithelial-mesenchymalen Transition wie sonic hedgehog (SHH) sind aktiviert (D. H. Wang et al., 2010a).

Genetische Veränderungen in der Progression zum Adenokarzinom

Ausgehend von den Erkenntnissen der Krebsentstehung in anderen Geweben wurden vor allem an die bekannten Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene untersucht. Anders als im Colon konnte aber bisher keine charakteristische Sequenz oder gar Klassifikation der Erkrankungen gefunden werden. Die genetischen Studien werden an menschlichen Proben dadurch erschwert, dass die Ösophaguskarzinome in der Regel vor der chirurgischen Resektion chemotherapeutisch vorbehandelt werden. Die Studien beschränken sich daher in der Regel auf endoskopisch entnommene Biopsien.

Eine erste Einschätzung über die frühen genetischen Untersuchungen skizziert Morales in ihrer Übersichtsarbeit über genetische Veränderungen in der Barrett-Metaplasie und -Karzinogenese (Morales, Souza, & Spechler, 2002). Sie führt ihre Arbeit entlang der Theoreme von Hanahan und Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011) und folgert aus den theoretischen Überlegungen und den wenigen belastbaren empirischen Daten, dass eine Überexpression von CyclinD und TGFalpha, eine Methylierung oder ein Heterozyositätsverlust im p16-Gen, sowie eine erhöhte Expression von COX-2 am Anfang der malignen Entartung stehen. Im Verlauf folgten dann ein Verlust von p53 und von E-Cadherin und Catenin. Die Datenlage zu p53 ist dabei widersprüchlich, jüngere Untersuchungen postulieren eine Mutation bereits im Stadium der hochgradigen Dysplasie (Dulak et al., 2013; X. Li et al., 2014; 2008). Dieser Annahme liegt im Prinzip eine monoklonale Genese der Erkrankung zugrunde. Im Angesicht der seither publizierten Daten muss dies allerdings hinterfragt werden, eine Sequenz genetischer Veränderungen konnte nicht reproduziert werden.

Bei Barrett-Karzinomen sind häufig Chromosomenaberrationen mit vielfältigen Translokationen und Deletionen zu finden. Die chromosomale Instabilität wird in dieser Ausprägung in epithelialen Tumoren anderer Gewebe oder Differenzierung nicht beobachtet. Ursache dieses Phänotyps scheint eine Reaktivierung der Telomerase zu sein. Im Mausmodell stellte sich heraus, dass eine defekte Telomerase die Neigung zu malignen Tumoren indirekt proportional zur Länge der Telomeren erhöht (S. Chang, 2005). Wird die Telomerase nun erneut aktiviert, entstehen im Rahmen der Reparaturvorgänge vielfältige Chromosomenaberrationen (Bollmann, 2007; Campbell, 2012; Depinho & Polyak, 2004; Desmaze, Soria, Freulet-Marrière, Mathieu, & Sabatier, 2003; J. Hu et al., 2012). Insbesondere dieser letzte Schritt scheint erhebliche Auswirkungen auf das maligne Potential zu haben.

Amplifikationen spielen bei EGFR, ERBB2, c-myc und der Loci 20q.13 eine Rolle. Die Frequenz dieser Veränderungen ist bei nicht-dysplastischen Epithelien gering, steigt aber mit dem Grad der Dysplasie an. Bei invasiven Karzinomen ist in mehr als 50% der Fälle einer dieser Loci verändert (Rygiel et al., 2008). Loss-of-heterozygosity wurde wiederholt im Locus 17p beobachtet (X. Li et al., 2008).

Zur besseren Abgrenzung der nicht-dysplastischen und entarteten Veränderungen wurden in jüngster Zeit Studien mit gepaarten Biopsien desselben Individuums durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bereits hochgradige Dysplasien verhältnismäßig viele genetische Veränderungen zeigen und sich auf der weiteren Entwicklung zum invasiven Karzinom in erster Linie die Kopienanzahl verändert, die He-

terogenität aber in etwa fortbesteht (Ross-Innes et al., 2015). Dieser Befund ist mit einem polyklonalen Prozess der Krebsentstehung vereinbar. Die genetische Heterogenität der Barrett-Karzinome war dabei deutlich höher als die anderer Tumoren. Die Einzelnukleotidvarianz (single nucleotide variance, SNV)-Frequenz wurde mit 6,76 SNV pro 1 Million Basenpaare angegeben. Zum Vergleich: die in der Literatur angegebenen Frequenzen für das Multiple Myelom liegen bei 2,9 SNV/Mb, für Brustkrebs bei 1,1 SNV/Mb, für hepatozelluläre Karzinome 3,69 SNV/Mb sowie für das kolorektale Karzinom mit 5,9 SNV/Mb (nach Ross-Innes et al., 2015).

Die chromosomale Instabilität kann im Mausmodell durch Inaktivierung der murinen Telomerase simuliert werden. Untersuchungen an IL1 β -Mäusen, die mit dieser Mutante gekreuzt werden, könnten zum besseren Verständnis dieses Prozesses beitragen.

Physiologische und biochemische Grundlagen

Embryologie des Ösophagus und des ösophago-gastralen Übergangs

Speiseröhre und untere Atemwege teilen eine gemeinsame embryologische Anlage. Sie entstammen beide dem Endoderm und trennen sich während der Embryonalentwicklung (u.a. (Benninghoff & Drenckhahn, 2008)).

Der frühe Ösophagus bildet sich unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren Bone Morphogenic Protein-4 (BMP-4), Ptch und Gli, die in erster Linie über Sonic Hedgehog (Shh) gesteuert werden (Litingtung, Lei, Westphal, & Chiang, 1998). In dieser Phase ist der Ösophagus mit zylindrischem Epithel ausgekleidet. Im weiteren Verlauf der Differenzierung wird der Hedgehog-Signalweg unterdrückt, das Epithel wandelt sich in unverhorntes Plattenepithel um. Die dabei wichtigen Differenzierungsfaktoren sind bislang nicht eindeutig identifiziert (X. Wang et al., 2011), einer der essentiellen Faktoren scheint p63 zu sein, der essentiell ist für die Entwicklung von Plattenepithelien. p63-defiziente Mäuse haben einen vollständig von zylindrischem Epithel ausgekleideten Vormagen, der bei Wildtyp-Mäusen wie der Ösophagus Plattenepithel aufweist.

Biologie und Physiologie der Gallensäuren

Gallensäuren sind die Ausscheidungsform aller biologischen Moleküle mit Steran-Gerüst. Hierzu gehören neben dem Cholesterin auch die Steroidhormone. Für die Umwandlung stehen zwei Synthesewege zur Verfügung; ein neutraler Weg über CYP7A1 sowie ein saurer Weg über die mitochondriale 27-Hydroxylase CYP27A1. Der neutrale Weg umfasst dabei vierzehn Schritte, die im Cytoplasma, in Mikrosomen, in Peroxisomen sowie in Mitochondrien ablaufen. Zunächst wird das Sterol-Grundgerüst über eine Sättigung der Doppelbindung, Epimerisierung der 3 β -Hydroxylgruppe und Hydroxylierung an den Positionen 7 α und 12 α modifiziert; anschließend wird die Seitenkette oxidativ abgespalten. Im

sauren Weg steht die Seitenkettenmodifikation vor den Veränderungen am Sterol-Grundgerüst (Bloch, Berg, & Rittenberg, 1934; J. Y. L. Chiang, 2004). Abbildung 1 (nach (J. Y. L. Chiang, 2004)) gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf.

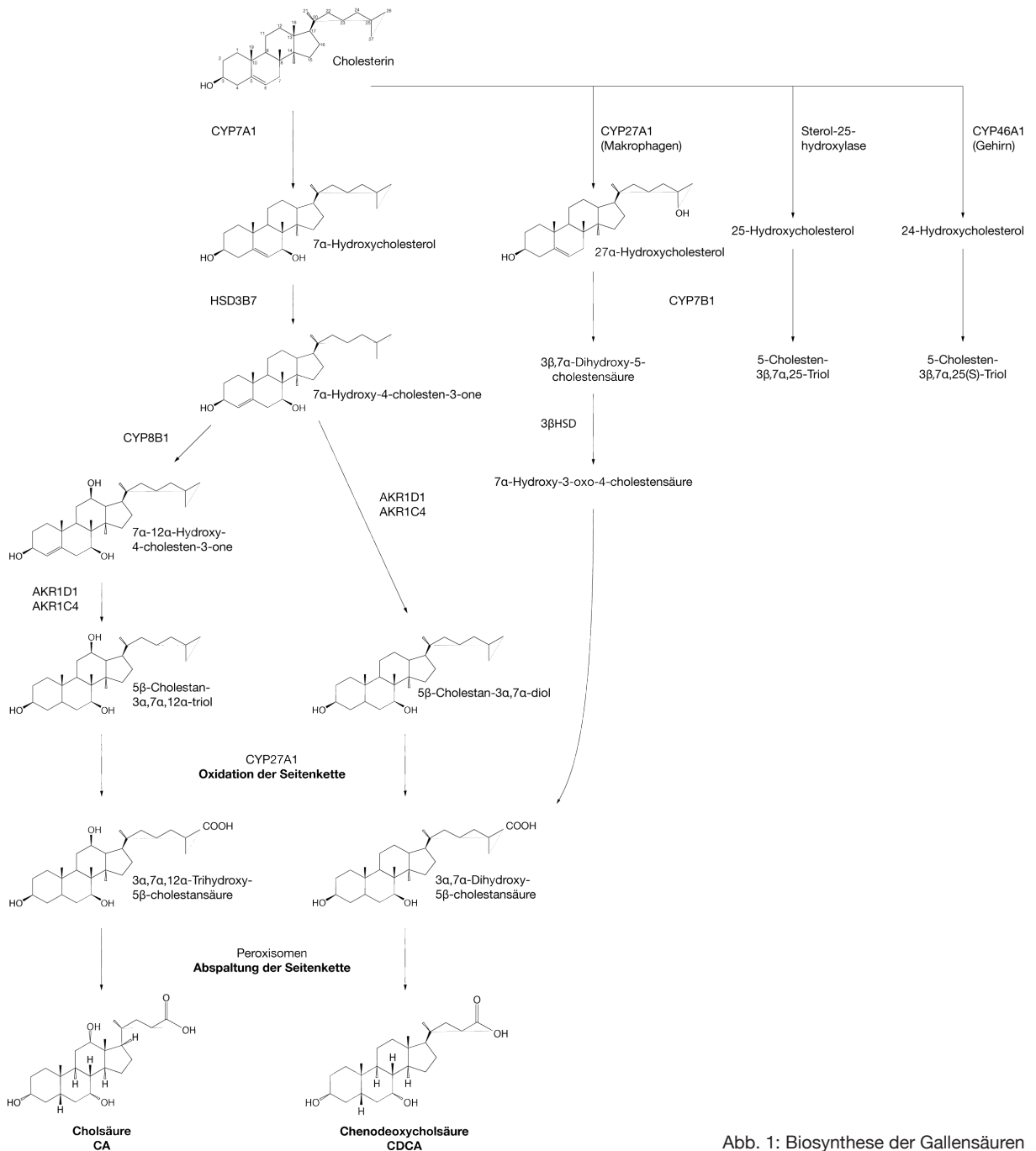


Abb. 1: Biosynthese der Gallensäuren

In diesem Prozess entstehen die primären Gallensäuren, beim Menschen in erster Linie Cholsäure (cholic acid, CA) und Chenodeoxycholsäure (chenodeoxycholic acid, CDCA). Sie sind schlecht wasserlöslich, daher werden sie an Position C24 mit Glycin oder Taurin konjugiert. Bei physiologischen pH-Werten liegen Gallensäuren als Natriumsalze vor. Im Darm wird ein Teil der konjugierten Cholsäure und Chenodeoxycholsäure dekonjugiert und durch eine bakterielle 7 α -Dehydroxylase zu sekundären Gallensäuren umgewandelt. Dies sind Deoxycholsäure (deoxycholic acid, DCA) und Lithocholsäure (lithocholic acid, LA).

re (lithocholic acid, LCA). Beide werden über den Stuhlgang ausgeschieden, während die primären Gallensäuren dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Ein sehr geringer Teil wird durch 3 α - und 7 β -Modifikationen zu Ursodeoxycholsäure (ursodeoxycholic acid, UDCA) umgewandelt. Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformeln der wichtigsten primären und sekundären Gallensäuren.

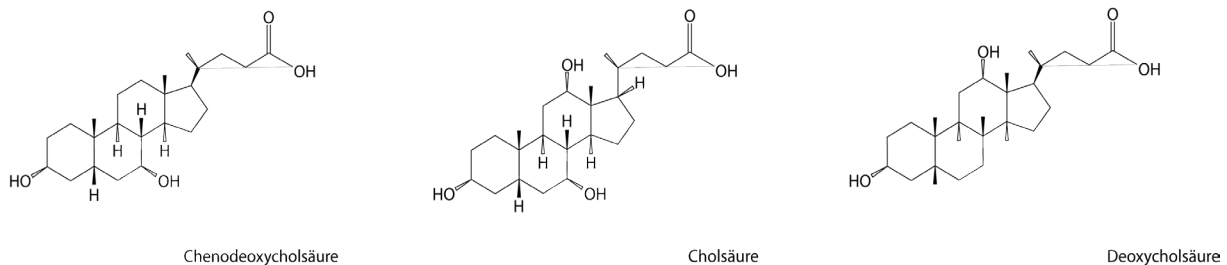


Abb. 2: Strukturformeln der untersuchten Gallensäuren

Neben der Gallensäurensynthese in der Leber wird Cholesterin auch in peripheren Geweben – vor allem in Hirn und Lunge – verstoffwechselt. Dabei findet in erster Linie eine Oxidation zu 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterol statt. Diese Stoffe gehen dann ihrerseits in die Gallensalzsynthese ein, sind aber auch wichtige Regulatoren des Cholesterinmetabolismus (J. Y. L. Chiang, 2004; Lefebvre, Cariou, Lien, Kuipers, & Staels, 2009).

Während Cholesterin lediglich an seinem 3'-C-Atom eine polare Gruppe aufweist und demnach stark lipophil ist, sind Gallensäuren – gleich ob primär oder sekundär – an mehreren Stellen hydroxyliert und können daher nicht mehr vollständig in biologische Membranen inserieren.

Des Weiteren sind die molekularen Charakteristiken von Gallensäuren vom pH-Wert der Umgebung abhängig. Glycin-konjugierte Gallensäuren sind vor allem bei niedrigen pH-Werten um 4, unkonjugierte Gallensäuren eher bei Werten um pH 6 als Risikofaktoren einer neoplastischen Veränderung anzusehen (Cronin et al., 2010). Dieser Unterschied ist von klinischer Relevanz, weil sich die Zusammensetzung der Gallensäuren abhängig von den Essgewohnheiten ändert und der pH-Wert der Refluxflüssigkeit durch Protonenpumpeninhibitoren medikamentös verändern lässt.

Die Sekretion der Gallensäuren in die Canaliculi biliferi erfolgt über einen Transporter mit ATP-Bindungskassette (ABCB11). Außerhalb des Gallengangssystems liegen sie im Duodenum in der größten Konzentration vor. In der Vergangenheit wurden Gallensäuren in erster Linie als Emulgatoren betrachtet, die der Resorption von Fetten dienen. Tatsächlich sind ihre physiologischen Funktionen weitaus vielfältiger. Es ist schon seit längerem bekannt, dass Gallensalze die Sekretion von Schleim, Flüssigkeit und Elektrolyten im Darms modulieren. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass Gallensalze entweder keine oder eine motilitätsfördernde Wirkung hätten. Poole et al. (2010) berichten dagegen, dass auf Neuronen des enterischen Nervensystems GpBAR-1-Rezeptoren zu finden sind. Die G-Protein-gekoppelten, Gallensalz-spezifischen Rezeptoren befinden sich vor allem auf den inhibitorischen Neuronen und führen zu einer verminderten Motilität und einer verspäteten Darmentleerung. Dieser Effekt wird über Stickstoffmonoxid vermittelt (Poole et al., 2010).

Bislang ist nicht vollständig geklärt, auf welche Weise Gallensäuren die Zellen des Ösophagus schädigen. Die weitaus meisten Untersuchungen führen eine unspezifische Membranschädigung mit anschließender Freisetzung von Sauerstoffradikalen an. Es gilt hingegen als gesichert, dass die Kombination aus niedrigem pH-Wert und Gallensalzen am stärksten schädigend wirkt (Dvorak, Payne, et al., 2007b; Kauer et al., 1995).

Signalwege

Nukleäre xenobiotische Rezeptoren

Mit dem Farnesoid-X-Rezeptor (FXR, (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; H. Wang, Chen, Hollister, Sowers, & Forman, 1999)), dem Pregnane-X-Rezeptor PXR, (Kliwer et al., 1998) (Kliwer, Goodwin, & Willson, 2002)), dem konstitutiven Androstan-Rezeptor (constitutive androstane receptor, CAR, (Honkakoski, Sueyoshi, & Negishi, 2003)), dem Vitamin-D-Rezeptor, dem Steroid-X-Rezeptor (Blumberg et al., 1998) und dem Liver-X-Rezeptor alpha (LXR α , (Janowski, Willy, Devi, Falck, & Mangelsdorf, 1996)) sind mehrere nukleäre Rezeptoren bekannt, die Einfluss auf Differenzierungsvorgänge, Stoffwechselprozesse und das Immunsystem nehmen (Tabelle 2). Diese Rezeptoren werden zusammengefasst als xenobiotische Rezeptoren bezeichnet. Zur dieser Gruppe gehört auch der Retinoid-X-

Name	Abkürzung	systematischer Name	bekannte Liganden
Liver-X-Rezeptor alpha	LXR α	NR1H3	Oxysterole
Liver-X-Rezeptor beta	LXR β	NR1H2	Oxysterole
Farnesoid-X-Rezeptor	FXR	NR1H4	primäre Gallensäuren, Androstenon, Farnesol
Pregnane-X-Rezeptor	PXR	NR1I2	Glucocorticoide, einige Medikamente, Lithocholsäure, Pregnenolon und -derivate
Constitutive Androstane Rezeptor	CAR	NR1I3	intrinsisch aktiv, kann reprimiert werden (Androstenon)
Vitamin-D-Rezeptor	VDR	NR1I1	Vitamin D3

Tab. 2: xenobiotische Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptor, der aber offenbar kein Rezeptor für Gallensäuren ist. Sie teilen sich eine gemeinsame Struktur: eine carboxyterminale, meist hydrophobe Ligandenbindungsstelle ist über eine Scharnierregion mit der DNA-Bindungsdomäne verbunden (Krasowski, Ni, Hagey, & Ekins, 2011). Dies ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.



Abb. 3: schematische Struktur xenobiotischer Rezeptoren

Die funktionellen Zusammenhänge dieser nukleären Rezeptoren sind noch Gegenstand der Forschung, insbesondere weil sie selbst direkt als Transkriptionsfaktoren wirken und in der Regel keine

Signalketten zwischengeschaltet sind. Sie scheinen insbesondere für die Regulation der Cytochrom-P450-Enzyme sowie der Fettstoffwechsellzyme in der Leber wichtig zu sein. FXR ist der bestuntersuchte Rezeptor dieser Gruppe und gilt als wichtiger Regulator des Gallensäurestoffwechsels. Er wurde 1998 erstmals kloniert. FXR bindet nach Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor an spiegelbildlich angeordnete AGGTCA-Sequenzen mit einem Nukleotid Abstand. Menschen haben ein FXR-Gen mit zwei funktionellen Promotoren; durch alternatives Spleißen entstehen vier Isoformen. Interessanterweise ist UDCA kein Ligand für FXR (Lefebvre et al., 2009; Mangelsdorf et al., 1995).

Yamada et al. berichten von Versuchen an Bic-1-Zellen, die von einem Adenokarzinom des Darmes ausgehen, dass sich mit Guggulsteron die Cdx-2-Expression nach Gallensalzexposition unterdrücken lässt (Yamada et al., 2010). Dies lässt darauf schließen, dass FXR an der Cdx-2-Regulation beteiligt ist. Patienten mit einer Barrett-Metaplasie haben eine deutlich höhere FXR-Expression als gesunde Probanden (Capello et al., 2008).

Im Zusammenhang mit der intestinalen Metaplasie des Ösophagus liegen lediglich für PXR und FXR Daten aus menschlichen Biopsien oder Zellkulturversuchen vor (Capello et al., 2008; van de Winkel et al., 2011); beide scheinen in der intestinalen Metaplasie höher exprimiert zu sein.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Bereits 1996 wurde beschrieben, dass Gallensäuren Einfluss nehmen auf die Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs (Brady, Beno, & Davis, 1996). 2003 beschrieben Kawamata et al., dass der thyroid growth receptor 5 (TGR-5) in der Lage ist, Gallensäuren zu binden und damit über cAMP Einfluss auf den intrazellulären Stoffwechsel zu nehmen (Kawamata et al., 2003). Wegen seiner Spezifität für Gallensäuren wird dieser Rezeptor auch G-Protein-gekoppelter Gallensalzrezeptor (G-protein coupled Bile Acid Receptor 1, GpBAR-1) genannt. Gallensalze erhöhen über diesen Rezeptor den intrazellulären Energieumsatz (Mitsuhiro Watanabe et al., 2006) und verringern die intestinale Peristaltik (Poole et al., 2010).

Neben diesen Funktionen scheint GpBAR-1 auch wichtige Funktionen bei der Regulation intestinaler Entzündungen zu erfüllen (Cipriani et al., 2011) sowie auch im Hirn auf Astrozyten und Neuronen exprimiert zu sein (Keitel et al., 2010).

Eine siRNA-vermittelte Suppression der GpBAR-1-Expression in FLO-Zellen verringerte die Expression von NOX5-S und damit auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Daher ist möglicherweise dem GpBAR-1-Signalweg eine gewisse Rolle bei der Schädigung des Ösophagusepithels zuzuschreiben (Hong et al., 2009).

Cholesterin-Homöostase

Als wichtiger Bestandteil biologischer Membranen ist Cholesterin ein lebensnotwendiges Molekül, dessen intrazelluläre Konzentration eng kontrolliert wird. SREBP-1 und -2 stellen die beiden wichtigsten Transkriptionsfaktoren Sterol- und Oxysterol-sensibler Gene dar (Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2007). Cholesterin stellt das Grundgerüst der Steroidhormone und der Gallensäuren dar.

Dieser Signalweg wurde vor allem durch die Arbeitsgruppe von Brown und Goldstein in Dallas (USA) aufgedeckt (R. G. Anderson, 2003; Goldstein, Debose-Boyd, & Brown, 2006; Radhakrishnan, Ikeda, Kwon, Brown, & Goldstein, 2007; Sun, Li, Goldstein, & Brown, 2005; Sun, Seemann, Goldstein, & Brown, 2007; Wang, Sato, Brown, Hua, & Goldstein, 1994). Er ist in Abbildung 4 schematisch wiedergegeben.

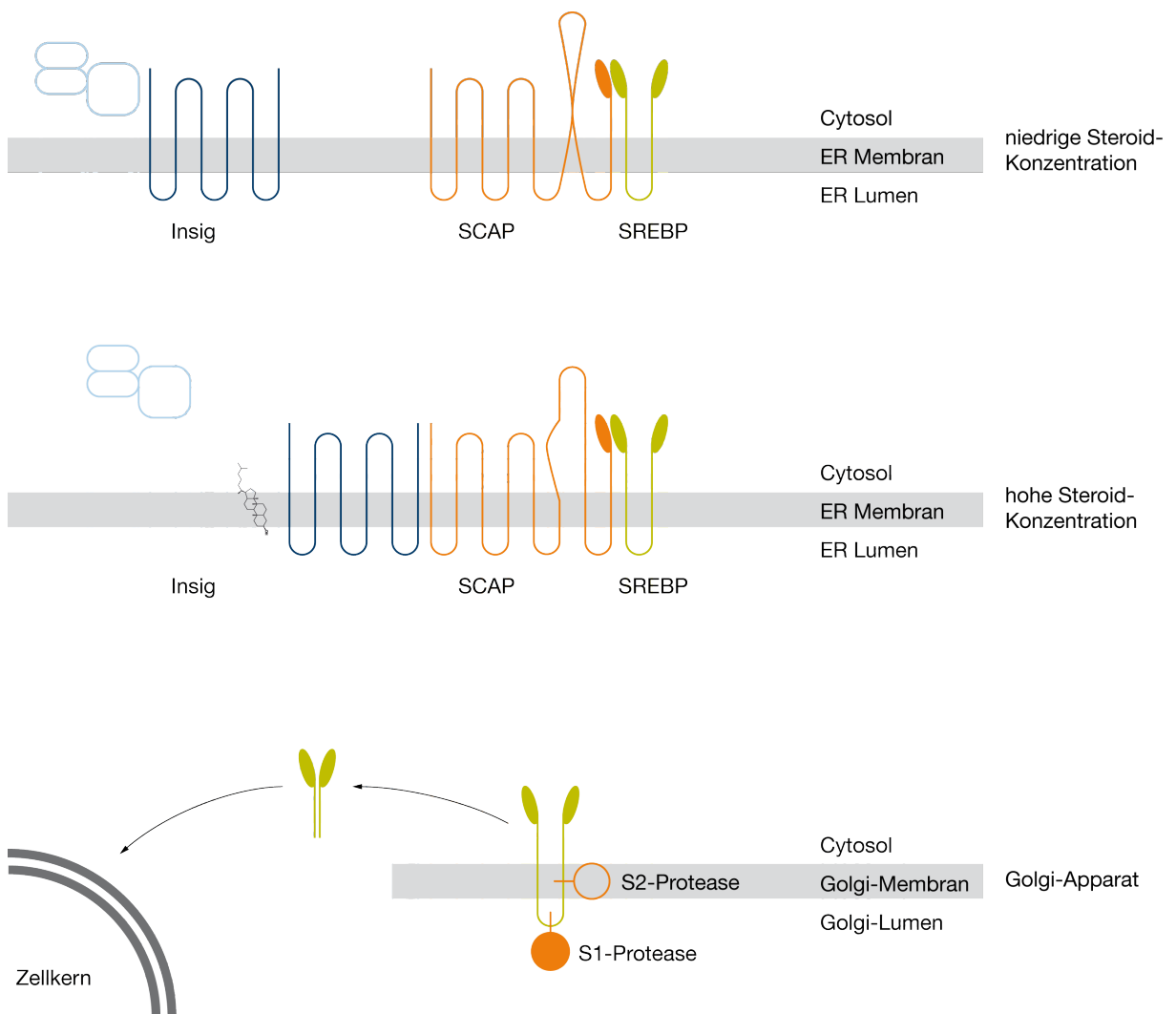


Abb. 4: SREBP-Signalweg

Cholesterin ist wegen seines lipophilen Charakters nicht im Zytoplasma, sondern innerhalb der Membran lokalisiert. Das Sensormolekül für Cholesterin ist SCAP (SREBP cleavage activating protein), das in der Membran-durchspannenden Domäne eine Bindungsstelle für Cholesterin trägt (Goldstein et al., 2006; Radhakrishnan, Sun, Kwon, Brown, & Goldstein, 2004) (Feramisco et al., 2005). Liegt ein Mangel an membrangebundenen Steroiden vor, wird SREBP zusammen mit SCAP zum Golgi-Apparat transportiert und dort proteolytisch durch zwei Proteasen gespalten. Auf diese Weise wird das aktive Fragment freigesetzt, das als Helix-loop-Helix/Leucizipper-Transkriptionsfaktor zunächst in den Zellkern wandert und dort ein Homodimer mit einem weiteren aktivierten SREBP-Molekül bildet. Nach dieser Dimerisierung bindet der Transkriptionsfaktor an SRE (sterol regulatory element) in Promotorbereichen steroidsensibler Gene bindet und moduliert dort die Transkription (Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2007).

In jüngeren Publikationen der Arbeitsgruppe von Brown und Goldstein konnte außerdem nachgewiesen werden, dass nicht nur Cholesterin, sondern auch Oxysterole Einfluss auf die SREBP-Aktivierung haben. Da Oxysterole nicht in die Membran inserieren können, sondern ihr lediglich anliegen, kann SCAP nicht als Bindungspartner fungieren. Dessen Rolle übernimmt Insig, ein membranassoziiertes Protein mit einer außerhalb der Membran gelegenen und damit nur für Oxysterole erreichbaren Sterol-Bindungsstelle (Feramisco, Goldstein, & Brown, 2004; Gill, Chow, & Brown, 2008; Gong, Lee, Brown, Goldstein, & Ye, 2006; Radhakrishnan et al., 2007).

Liegt in der Zelle ein Überschuss an Steroiden vor, so wird der regulatorische Komplex aus SREBP und SCAP durch Insig im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten, es erfolgt kein Transport zum Golgi-Apparat und keine proteolytische Aktivierung von SREBP. Auf vergleichbare Weise erfolgt die Inhibition durch Oxysterole und Insig (Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2007). Der SREBP-Signalweg wird durch proteolytischen Abbau der aktiven SREBP-Dimere beendet. Dies kann durch den Calpain-Inhibitor N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal (ALLN) verhindert werden, so dass eine unphysiologische Überaktivierung des Signalweges erfolgt (Hiwasa, Sawada, & Sakiyama, 1990; Sherwood, Kung, Roitelman, Simoni, & Schimke, 1993; Wang et al., 1994).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, den Einfluss der Gallensäuren auf die Cholesterin-Homöostase aufzuklären, um die Schädigung der epithelialen Zellen ergänzend zu den bereits etablierten Mechanismen – Membranbeschädigung und direkte DNA-Schädigung – besser beschreiben zu können.

Funktion von Caveolin-1

Eines der von SREBP regulierten Gene ist Caveolin-1, das auf dem Genlocus D7S522 auf Chromosom 7q31.1 lokalisiert ist und für ein 22 kD großes Protein codiert (Engelman, Zhang, & Lisanti, 1998). Caveolin-1 wurde zuerst als Bestandteil von nicht-Clathrin-abhängigen Membraninvaginationen, sogenannten Caveolae, beschrieben. Es handelt sich um ein Membranprotein, dessen intramembranäre Domäne die Membran nicht komplett durchspannt, sondern lediglich in diese inseriert. Interessanterweise ist nicht die hydrophobe Domäne des Proteins für die Verankerung verantwortlich: sie erfolgt durch Farnesylanker, die sich beidseits des membraninserierenden Abschnitts befinden (siehe Abbildung 5) (Cohen, Hnasko, Schubert, & Lisanti, 2004; Spisni, Tomasi, Cestaro, & Tosatto, 2005).

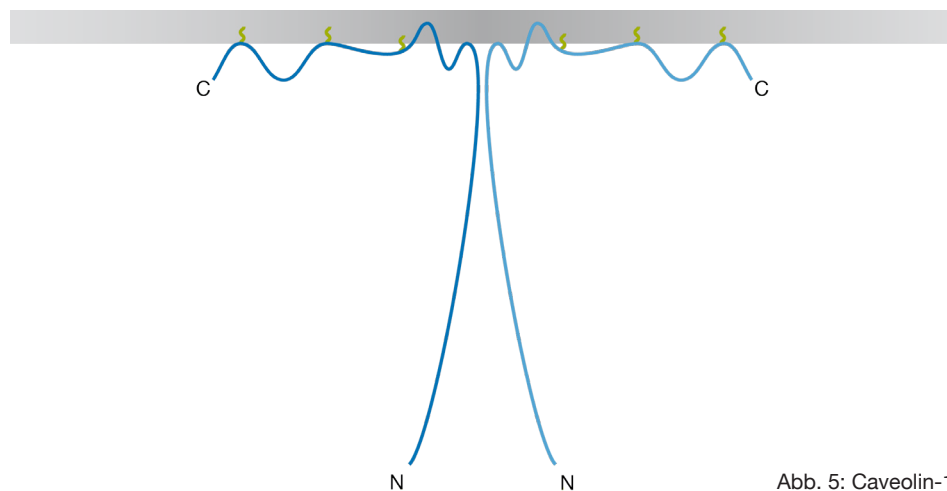


Abb. 5: Caveolin-1

Caveolin-1 trägt in seiner Promotorsequenz mindestens ein Steroid-reguliertes Element (SRE) an der Position -287 (Bist, Fielding, & Fielding, 1997; Cao et al., 2005). Zwei weitere mögliche SRE befinden sich weiter entfernt vom Transkriptionsstart an den Positionen -395 und -646, wobei deren transaktivierender Effekt geringer ist als der des erstgenannten SRE. Es gibt Hinweise, dass die Expression von Caveolin-1 – zumindest in Fibroblasten *in vitro* – durch freie Steroide als auch durch Oxysterole beeinflusst wird, wenngleich in unterschiedliche Richtung (C. J. Fielding, Bist, & Fielding, 1997). Abbildung 7 illustriert die Struktur des Caveolin-1-Promotors (nach Bist und Fielding (Bist et al., 1997))

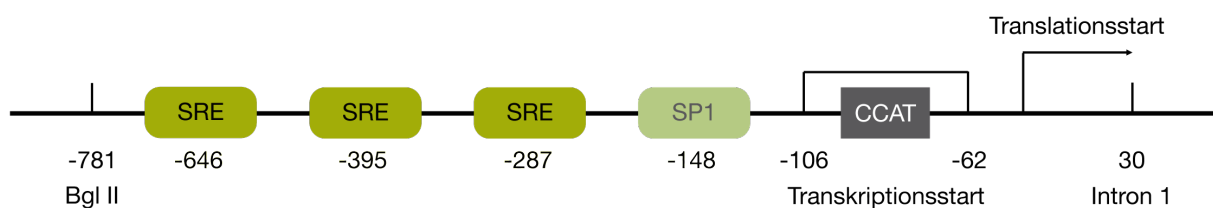


Abb. 5: Caveolin-Promotor mit sterol regulatory elements

Es sind bisher drei Caveolin-Isoformen bekannt, die sich vor allem durch ihr Expressionsprofil unterscheiden. Caveolin-2 ist vor allem im Nervengewebe exprimiert, Caveolin-3 in erster Linie in Muskeln (Engelman et al., 1998; Park et al., 2002). Caveolin-1-defiziente Tiere haben keine Caveolae, entwickeln sich aber normal und sind fertil. In einigen Geweben sind Wachstumsstörungen festzustellen; insbe-

sondere Lunge und Herz sind betroffen (Drab et al., 2001; Razani, 2001).

Bisherige Untersuchungen haben Caveolin-1 im einer Vielzahl innerer Organe, zum Beispiel im Gewebe des Magens (Daniel, Jury, & Wang, 2001; Shin et al., 2006), des Pankreas (P. Liu, Li, Machleidt, & Anderson, 1999; Witkiewicz et al., 2008), der Brustdrüse (T. Li et al., 2006; Salatino et al., 2006) und den Ovarien (Deregowski, Delhalle, Benoit, Bours, & Merville, 2002), der Prostata (Di Vizio et al., 2009; Katsogiannou et al., 2009; Thompson et al., 2010; Masami Watanabe et al., 2009), der Leber (Malerød, Juvet, Gjøen, & Berg, 2002; Yokomori, Oda, Ogi, Sakai, & Ishii, 2002), dem Endothel (Vepa, Scribner, & Natarajan, 1997) und in Fibroblasten (C. J. Fielding et al., 1997) nachgewiesen. Für die Expression im distalen Ösophagus fehlen bisher Daten.

Caveolin-1 hat im gesunden Gewebe eine Vielzahl an Funktionen, vor allem im Zusammenhang mit der Transzytose und Endozytose von Stoffen, in der Steuerung der intrazellulären Cholesterin-Verteilung und der Cholesterin-Homöostase (T.-Y. Chang, Chang, Ohgami, & Yamauchi, 2006; Razani, Woodman, & Lisanti, 2002) sowie in der Koordination der Signaltransduktion als Bestandteil der Lipid Rafts (Burgermeister & Seger, 2008; Patra & Bettuzzi, 2007). Caveolin-1 scheint in der Lage zu sein, Cholesterinmoleküle der Membranen zu binden und so als Adaptermolekül zu wirken (Soccio & Breslow, 2004). Speziell dieser Aspekt spielt bei der biologischen Rolle von Caveolin in Plattenepithelien eine Rolle, da diese einer großen mechanischen Belastung ausgesetzt sind und daher von einem hohen Cholesteringehalt in der Zellmembran profitieren, wodurch die Membranen steifer werden.

Die ersten Hinweise, dass Caveolin-1 eine Rolle in der Initiation und Progression von Krebserkrankungen haben könnte, wurden in systembiologischen Analysen gefunden. Bereits 1994 konnte anhand von RNA-Analysen postuliert werden, dass Caveolin-1 eine Rolle bei der Entstehung und Progression von Brustkrebs spielen könnte (Sager et al., 1994). Zudem war aufgrund von loss-of-heterozygosity- und Mikrosatelliten-Repeat-Analysen verschiedener Tumoren vermutet worden, dass sich im Genlokus 7q21 ein Tumor-Suppressor-Gen befinden könnte. Der Locus konnte mit dem Généthon-Marker D7S522 am genauesten eingegrenzt werden. Engelmann, Zhang und Lisanti führten eine FISH-Analyse dieses Locus durch und detektierten dort Caveolin-1 und -2 (Engelman et al., 1998). Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass Caveolin-1 und -2 eine tumorsuppressive Rolle spielen.

Zwischenzeitlich konnte dies durch direkte molekularbiologische und epidemiologische Untersuchungen bestätigt werden. Die ursprünglichen Beobachtungen an Brustkrebs wurden weitgehend bestätigt (Bouras, Lisanti, & Pestell, 2004; Patani, Martin, Reis-Filho, & Dowsett, 2012), zudem wurden das Protein auch mit Prostata-Karzinomen (Freeman, Yang, & Di Vizio, 2012), Pankreas-Karzinomen (Terris et al., 2002) und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in Verbindung gebracht (Y. Hu, Lam, Law, Wong, & Srivastava, 2001). In der Lunge scheint Caveolin-1 neben den Krebserkrankungen (H. L. Chen, Fan, Gao, Ouyang, & Zhang, 2011) auch in die Pathogenese der pulmonalen Hypertension und in regenerative Prozesse involviert zu sein.

Die konkrete Funktion in der Initiation und Progression von Krebserkrankungen ist nicht vollständig

aufgeklärt; wie die xenobiotischen Rezeptoren scheint auch Caveolin-1 in erster Linie über die Interaktion mit anderen Proteinen eine spezifische Funktion zu erlangen. Es sind demnach gewebs- und stadienabhängig unterschiedliche Effekte zu beobachten (Quest, Gutierrez-Pajares, & Torres, 2008; Williams & Lisanti, 2005). Diese Tatsache führt dazu, dass Caveolin-1 mit verschiedenen, scheinbar unabhängigen molekularen Prozessen bei der Initiation und Progression von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird.

Einige Untersuchungen beschreiben die Rolle von Caveolin-1 in Krebserkrankungen des Kopfes und des Halses. Hung et al. zufolge steigt der Anteil Caveolin-1-positiver Gewebeproben mit dem Grad der malignen Entartung. Während die normale Mukosa des Mundes lediglich in 8% der Fälle Caveolin-1-positiv ist, so waren 79% der primären oralen Plattenepithelkarzinome positiv. Parallel dazu stieg die Metastasierungsrate von 10% bei Caveolin-1-negativen Tumoren auf über 60% bei positiven Krebsgeschwüren (Hung et al., 2003). Unklar ist, ob die Caveolin-1-Expression Ausdruck einer epithelial-mesenchymalen Transition ist oder tatsächlich spezifisch ist für den Metastasierungsprozess.

Es gibt bisher keine Untersuchungen über die gewebsspezifische Verteilung von Caveolin im Plattenepithel, in der intestinalen Metaplasie oder im Adenokarzinom des Ösophagus. Dank der großzügigen Unterstützung von Prof. Dr. med. A. Walch und Dr. rer. nat. S. Rauser, Institut für Pathologie an der TUM, konnten hier neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Pathophysiologie des gastroösophagealen Refluxes

Reflux vom Magen in die Speiseröhre erfolgt in der Regel aufgrund einer höheren Frequenz spontaner Relaxationen des unteren Ösophagus sphinkters. Diese werden entsprechend des englischen Terminus – transient lower esophageal sphincter relaxations – TLER genannt. TLER sind physiologisch, können jedoch Beschwerden verursachen, wenn sie zu häufig auftreten oder der Ösophagus funktionell nicht in der Lage ist, die zurückgelaufene Säure schnell durch Propulsionsbewegungen wieder in den Magen zurückzubefördern. Eine andere Ursache kann in einer erworbenen Schwäche des unteren Sphinkters liegen, am häufigsten im Rahmen einer hiatalen Gleithernie.

Es wird davon ausgegangen, dass die Refluxbeschwerden in erster Linie durch die Magensäure verursacht wird. Die Rolle der anderen Inhaltsstoffe, also Schleim und Pepsin ist unklar. Abhängig von der Funktion des Pylorus kann es auch zum Rückfluss von Duodenum-Inhalt den Ösophagus erreichen; auf diesem Weg kann das Ösophagusepithel in Kontakt mit Gallensäuren kommen. Magensäure wie auch Gallensäuren führen in erster Linie zu einer chemischen Reizung und zu einer lokalen Entzündung.

Ein Großteil der sezernierten Gallensäuren wird reabsorbiert und unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf (Lefebvre et al., 2009). Ihre Serumkonzentration beträgt im nüchternen Zustand zwischen 0,46 µmol/l bei Cholsäure und 1,22 µmol/l bei Deoxycholsäure (Angelin & Björkhem, 1977). Eine Studie von Gotley, Morgan und Cooper fand bei Reflux-Patienten mit gesicherter erosiver Ösophagitis bei aufrechtem Oberkörper Konzentrationen von im Mittel unter 20 µmol/l, im Liegen von im Mittel 51 µmol/l

(Gotley, Morgan, & Cooper, 1988). Rund ein Viertel der Patienten wies dabei Konzentrationen über 200 $\mu\text{mol/l}$ auf. Die Sekretionsrate von Gallensäuren ist bei Patienten mit Refluxerkrankung möglicherweise erhöht, wenngleich hierzu keine methodisch verlässlichen Studien vorliegen: für eine Studie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar wurde zwar auch das Volumen des Refluxates gemessen; es wurde aber nicht angegeben, an welcher Stelle jeweils die Proben entnommen wurden. Es gibt Hinweise, dass eine hohe körperliche Aktivität mit einer geringeren Gallensalzsekretion korreliert (Wertheim et al., 2009).

Gallensäuren sind als wichtige Differenzierungsfaktoren insbesondere des Lebergewebes bereits seit längerem Gegenstand der Forschung. Eine Rolle in der Karzinogenese wurde bereits 1939 und 1940 diskutiert (H. Bernstein, Bernstein, Payne, Dvorakova, & Garewal, 2005). Weitere toxische Eigenschaften werden den Gallensalzen zugeschrieben, seit sie im Zuge der Erforschung der Barrett-Metaplasie in den Fokus des Interesses geraten sind, darunter insbesondere eine unspezifische Schädigung der DNA und der Zellmembranen durch eine Erhöhung intrazellulärer Sauerstoff-Radikale (Burnat, Majka, & Konturek, 2010; Jean-Louis et al., 2006). Es ist bislang kein toxischer Effekt bekannt, der über bekannte Rezeptoren oder Signalsysteme vermittelt wird.

Modelle zur Erforschung der gastroösophagealen Refluxerkrankung

Zelluläre Modelle

Die häufigsten Zelllinien ösophagealen Ursprungs, die derzeit in Publikationen erwähnt werden, sind die bereits Mitte der 1990er Jahre etablierten Reihen OE-19, OE-21 und OE-33. Einzelne weitere Publikationen erwähnen noch Seg-1, Flo-1 und Bic-1. Die ursprüngliche Publikation schlug zwei weitere Zelllinien vor (Rockett, Larkin, Darnton, Morris, & Matthews, 1997). Ein Kontrollexperiment ergab jedoch, dass es sich bei diesen zwei Linien um Kontaminationen mit HCT116-Zellen aus colorektalen Karzinomen handelte (Wijnhoven et al., 2000). Insgesamt sind in der Literatur nur 14 Zelllinien aus Barrett-Karzinomen zu finden, von denen wiederum drei – darunter eben Bic-1 und Seg-1 – jüngst ebenfalls als kontaminiert beschrieben wurden (Boonstra et al., 2010).

OE-19, -21 und -33 sind Zelllinien, die aus Karzinomen entwickelt wurden. Sie sind gegenüber gesunden Zellen genetisch deutlich verändert und eignen sich daher nicht ideal zur Erforschung physiologischer Signalwege. Nicht-maligne Zelllinien sind allerdings noch rarer: in der Literatur sind lediglich HET-1A (Stoner et al., 1991), CP-A, -B, -C (Palanca-Wessels et al., 1998) und EPC-hTert (Harada et al., 2003) beschrieben. Die Charakteristiken der in den Versuchen verwendeten Reihen sind in Tabelle 3 angegeben.

Name	Herkunft	Merkmale	Referenz
OE-19	Adenokarzinom der Kardia, mäßig differenziert (G2), Primärtumor, Patient europäischer Abstammung, Alter 72 Jahre	vielfältige genetische Veränderungen	(Rockett et al., 1997)
OE-21	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, mäßig differenziert (G2), Primärtumor, Patient europäischer Abstammung, Alter 74 Jahre	vielfältige genetische Veränderungen	(Rockett et al., 1997)
OE-33	Adenokarzinom des distalen Ösophagus, gering differenziert (G3), Primärtumor, Patientin europäischer Abstammung, Alter 73 Jahre	vielfältige genetische Veränderungen	(Rockett et al., 1997)
HET-1A	mit SIV-40 immortalisierte Zelllinie, die von primären ösophagealen Keratinozyten abstammt; isoliert aus einem Autopsiepräparat eines 25 Jahre alten männlichen Afroamerikaner	hypodiploid (34-40 Chromosomen), S2	(Stoner et al., 1991)
CPC	Biopsie einer dysplastischen intestinalen Metaplasie des Ösophagus; erwachsener Mann	hTert-transfiziert, CDKN2/p16 Wildtyp, p53 C238T, LOH 17p und 9p; Telomere 12 kb	(Palanca-Wessels et al., 1998)
EPC-hTert	humane Ösophagus-Keratinozyten, immortalisiert durch Retrovirus-vermittelte humane Telomerase	diploid, p14INK4a intakt, p53 intakt	(Harada et al., 2003)

Tab. 3: Zelllinien zur Untersuchung ösophagealer Erkrankungen

HET-1A sind primäre humane ösophageale Keratinozyten, die plasmidvermittelt durch das large T-antigen des Simian Virus 40 immortalisiert wurden. CP-C- und EPC-hTert-Zellen sind plasmidvermittelt durch hTert-Überexpression immortalisiert; bei beiden sind verlängerte Telomere feststellbar.

Tiermodelle

Operative Eingriffe am oberen Gastrointestinaltrakt, die eine kontinuierliche Verbindung zwischen dem Ösophagus und dem postpylorischen Intestinum herstellen, erhöhen das Risiko für eine Barrett-Metaplasie. Dies kann, wie bereits erwähnt, zum Beispiel bei Patienten nach Magenhochzug aufgrund einer peptischen Stenose oder anderer gutartiger Ösophaguserkrankungen beobachtet werden (Csendes et al., 2009; Dunn et al., 2010). Ausgehend von dieser Tatsache wurden chirurgische Tiermodelle entwickelt, indem experimentell eine Ösophagojejunostomie angelegt wurde. Die Methode wurde an verschiedenen Tieren erprobt, wie Ratten (Kazumori, Ishihara, & Kinoshita, 2009), Kaninchen und Mäusen (Raggi et al., 2010) und führte bei den Versuchstieren in einigen Fällen tatsächlich zur Ausbildung einer Barrett-ähnlichen Epithelveränderung (Attwood, Harrison, Preston, & Jankowski, 2008; Y. Li & Martin, 2007). Raggi et al. beschreiben bei Mäusen sogar eine Progressionsrate zum Adenokarzinom des Ösophagus von 60%, inklusive einer Maus mit multiplen Lungenmetastasen. Nachteil der chirurgischen Methode ist, dass sie eine große chirurgische Expertise voraussetzt: selbst Zentren mit großer Erfahrung in der Ösophaguschirurgie wie die Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar berichten, dass etwa ein Fünftel aller Versuchstiere allein an der Operation stirbt und der Eingriff eines hohen Maßes an Training bedarf (Raggi et al., 2010). Einen Überblick der Tiermodelle gibt Tabelle

Name	systemat. Name	diploider Chromosomensatz	Anzahl von Generationen zwischen Menschen und Spezies	Krebs tritt in der Spezies auch ohne Karzinogen auf	Histologie der Krebserkrankung
Mensch	Homo sapiens	46	N/A	ja	SCC und EAC
Maus	Mus musculus	40	15 Millionen	ja	SCC mit Karzinogenen, EAC bei schwerer Refluxschädigung
Ratte	Rattus norvegicus	42	15 Millionen	in Speiseröhre und Magen unter verschiedenen Bedingungen	SCC bei Induktion mit Karzinogenen, EAC bei schwerer Refluxschädigung mit Dünndarm-Inhalt
Kaninchen	Oryctolagus cuniculus	44	15 Millionen	nein	N/A
Meerschweinchen	Cavia porcellus	64	15 Millionen	nein	N/A
Hund	Canis familiaris	78	25 Millionen	im distalen Ösophagus induziert	bislang nur EAC induziert
Katze	Felis catus	38	25 Millionen	nein	N/A
Frettchen	Mustela putorius furo	40	25 Millionen	nein	N/A
Schwein	Sus scrofa	38	25 Millionen	nein	N/A
Opposum	Trichosurus vulpecula	22	80 Millionen	nein	N/A
Zebrafish	Danio rerio	50	195 Millionen	unbekannt	unbekannt

Tab. 4: Tiermodelle

4 (nach Attwood et al., 2008).

Erst in jüngster Zeit ist es gelungen, nicht-chirurgische Tiermodelle der Barrett-Metaplasie zu entwickeln (Quante et al., 2012; X. Wang et al., 2011). Das von Wang et al. entwickelte Modell basiert auf einer gezielten, chronischen Schädigung des Plattenepithels, indem das Gen p63 rekombinant ausgeschaltet wurde. P63 spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese aller Plattenepithelien im Körper. Die Tiere haben anstelle der physiologischen Plattenepithelien in Vormagen und Ösophagus zylindrisches Epithel. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass p63 durch Gallensalzexposition supprimiert werden kann (Roman et al., 2007), stellt diese Untersuchung einen interessanten Ansatz zum Verständnis der Erkrankung dar.

Quante et al. beschreiben ein Tiermodell, in dem eine plasmidvermittelte, chronische Entzündung im Ösophagus ebenfalls zu einer intestinalen Metaplasie führt. Hierbei wurde eine leicht modifizierte Sequenz des menschlichen Interleukin-1-beta-Gens (in der verwendeten Variante IL-1 β -Rezeptoraktivator genannt) unter Kontrolle des L2-Promotors des Epstein-Barr-Virus verwendet.

Ziel der Arbeit

Gastroösophagealer Reflux lässt Gallensäuren auf das Plattenepithel der Speiseröhre einwirken und kann so die Entwicklung der Barrett-Metaplasie und von Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs begünstigen. Während der Metaplasie geht Caveolin-1 verloren; dieses Protein ist aber, wie oben erwähnt, wichtig für die Barrierefunktion des Epithels. Zudem kann es als Tumorsuppressor wirken.

Die im folgenden beschriebenen Versuche sollen klären, ob hohe Gallensäure-Konzentrationen in der Refluxflüssigkeit zur Caveolin-1-Repression beitragen. Die enge strukturelle Verwandtschaft zwischen Gallensäuren und Cholesterin, insbesondere seiner hydroxylierten Derivate, könnte auch zu Gemeinsamkeiten bei Steroid-abhängigen Signalwegen führen. Dies soll auf der Ebene des sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) durch Analyse des Spaltungsmusters und der Bindungsaktivität an den Promotor untersucht werden. Des Weiteren soll durch ALLN-Behandlung eine Deaktivierung von SREBP-1 verhindert werden, um die Caveolin-1-Expression auch in diesem Versuchsaufbau zu untersuchen.

Da der Caveolin-1-Promotor über drei mögliche sterolregulierte Elemente verfügt und Caveolin-1 als Steroid-reguliertes Gen beschrieben ist, das eine wichtige Rolle im Cholesterinhaushalt spielt, könnte eine Expressionsveränderung von Caveolin-1 über diesen Signalweg erklärt werden.

Die Untersuchungen werden an etablierten ösophagealen Zellkultursystemen durchgeführt, darunter EPC-hTert und OE-21 als Modelle für Plattenepithelien und CP-C und OE-19 für zylindrische Epithelien. EPC-hTert und CP-C sollen dabei die nicht dysplastischen Stadien, OE-21 und -19 die malignen Stadien wiedergeben. Es wurden die Effekte der der beim Menschen quantitativ wichtigsten Gallensäuren CDCA, CA und DCA untersucht (vgl. Prade, 2011).

Experimenteller Teil

Material und Methoden

Kulturmedien und Substanzen

Kulturmedien

Zur Anzucht der Zellen wurden die Zellkulturmedien RPMI, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), OptiMEM, BEBM und Keratinozytenmedium verwendet. RPMI, Dulbecco's Modified Eagle Medium (im folgenden DMEM), Keratinozytenmedium und OptiMEM wurden von Gibco geliefert, fetales Kälberserum (im folgenden fetal calf serum, FCS) von Biochrom und Invitrogen, BEBM von Gibco. RPMI und DMEM wurde als Anzuchtmedium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Glutamin und 1% (v/v) der Mischung der Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Im Rahmen der Stimulations- und Expositionsversuche wurde kein FCS zugesetzt. Um die Toxizität bei Transfektionsversuchen zu verringern, wurde in diesen Ansätzen auf Antibiotika verzichtet.

Keratinozytenmedium wurde als Anzuchtmedium mit menschlichem rekombinantem Epidermal Growth Factor (hEGF) und Hypophysenextrakt vom Rind versetzt (beides Gibco).

Um in vitro die Stimulation des EGFR-Signalweges gegenüber einem supraphysiologischen Stimulator zu untersuchen, wurde TPA als direkter Ligand des EGF-Rezeptors eingesetzt.

Zellreihen

Die Zellreihen OE-21, OE-19, OE-33 und HEK295 waren im Labor etabliert, die Zellreihen EPC-hTert, HET-1A und CPC wurden freundlicherweise von Univ.-Prof. Dr. med. Oliver Opitz, Universitätsklinikum Freiburg/Breisgau, zur Verfügung gestellt. Alle Zelllinien sind humanen Ursprungs. Die Zelllinie OE-19 stammt von einem mäßiggradig differenzierten Adenokarzinom im des gastroösophagealen Übergangs (Kardia) im Stadium UICC III eines 72 Jahre alten männlichen Patienten. OE-33 wurde aus einem geringgradig differenzierten Adenokarzinom des Ösophagus im Stadium UICC IIa einer 73 Jahre alten Frau isoliert; OE-21 wurde aus einem mäßiggradig differenzierten Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Stadium UICC IIa eines 74 Jahre alten Mannes entwickelt. Diese drei Zelllinien wurden 1993 etabliert (s.o.). HEK294-Zellen entstammen aus embryonalem Nierengewebe und wurden bereits 1977 entwickelt (Graham, Smiley, Russell, Russell, & Nairn, 1977). Diese Zellen dienen der Optimierung der Versuchsprotokolle.

CPC-Zellen wurde analog zu EPC-Zellen aus metaplastischem Epithel isoliert. Sie stellt derzeit die einzige etablierte humane Zellreihe aus der Barrett-Metaplasie dar. HET-1A-Zellen wurden ebenfalls

von der Arbeitsgruppe Prof. Opitz in Freiburg zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Voruntersuchungen in der AG Prof. Ebert wurde die Caveolin-1-Expression in diesen Zelllinien untersucht. Abbildung 7 zeigt ECL-Immunoblots von EPC-htert, HET-1A, CPC sowie von den aus Malignomen derivierten Linien OE-19, -21 und -33.

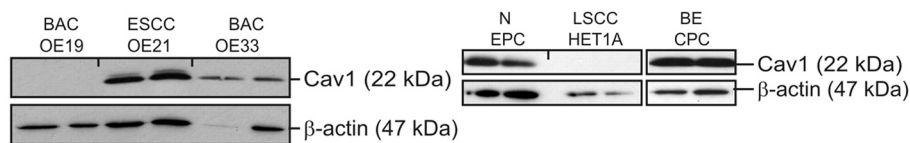


Abb. 7: Western Blot auf Caveolin-1 in Lysaten der Zelllinien OE-19, OE-21 und OE-33. Ladekontrolle mit beta-Actin

Die Kulturmedien wurden zur normalen Zellkultur mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% der. Zur Untersuchung der schnellen Zellaktivierung wurde Magerserum verwendet, das im Prinzip wie oben angegeben, jedoch ohne Zugabe von FCS hergestellt wird. Medium zur Transfektion enthält demgegenüber zwar FCS und Glutamin, nicht jedoch Penicillin und Streptomycin, da in Interaktion sonst erhebliche Toxizitätseffekte zu befürchten sind.

Gallensalze

Zur Stimulation der Zellen wurden die Gallensalze Chenodeoxycholsäure (im folgenden CDCA, Sigma) und Deoxycholsäure (DCA, Sigma) als die im menschlichen Körper physiologischerweise am häufigsten vorkommenden Gallensäuren verwendet. Beide wurden in ihrer unkonjugierten Form vor, um den physiologische Aufnahmeweg über die konjugierte Form systematisch auszuschließen. Die Gallensalze wurden in einer Konzentration von 1 M in Dimethylsulfoxid (im folgenden DMSO), geliefert von Sigma, gelöst und anschließend im Verhältnis 1:100 auf die Arbeitskonzentration von 10 mM in OptiMEM® verdünnt. Die weitere Verdünnung erfolgte dann in Zellkulturmedium, die Zielkonzentration lag hier zwischen 10 und 100 µM. Diese Konzentration liegt im Rahmen dessen, was bei invasiven Messungen im menschlichen Ösophagus gemessen wurde (siehe oben, Abschnitt Biologie der Gallensäuren).

Zelluläre Assays

Gene und Genabschnitte

Untersucht wurde sowohl die Funktion von Caveolin-1 als auch die Funktion der dominant-negativen Mutante P132L. Dazu wurde der codierende Genabschnitt von Caveolin-1 sowie der P132L-Mutante in ein pcDNA3.1-Plasmid (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) kloniert. Die Struktur des Transfektionsplasmids ist in Abbildung 9 wiedergegeben. Zur Klonierung wurden entsprechend der bereits publizierten Beschreibung (Burgermeister, Schmid, et al., 2007b) die in Tabelle 13 angegebenen Primer für humanes Caveolin-1 verwendet.

Die dominant-negative Variante des Caveolin-1-Gens diente der Negativkontrolle. Eine Punktmutation im Codon 132 von Cytosin-Cytosin-Adenin, das für Prolin codiert, zu Cytosin-Thymin-Adenin, das

cDNA-Primer	Sequenz Codestrang	Sequenz codogener Strang
β2-Mikroglobulin (human)	TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T	TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T
Caveolin-1 (human)	AAT ACG TAG ACT CGG AGG GAC A	GCG GTA AAA CCA GTA TTT CGT C
SREBP-1c (human)	TGC ATT TTC TGA CAC GCT TC	CCA AGC TGT ACA GGC TCT CC

Tab. 5a: cDNA-Primer

Methylierungsspezifische Primer	Sequenz Codestrang	Sequenz codogener Strang
Caveolin-1 (human, methyliert)	TTA TTT CGA AGC GTT TGG GAG	GCT AAT CTA CAT TTG CTC ACA A
Caveolin-1 (human, unmethyliert)	TTA TTT TGA AGT GTT TGG GAG	ACT AAT CTA CAT TTA CTC ACA A

Tab. 5b: methylierungsspezifische Primer

für Leucin codiert, für zu einer autosomal-dominanten Funktionsstörung des Proteins (Hayashi et al., 2001). Dieses Konstrukt wurde für die Wachstumskurven benötigt.

Zur Bestimmung der Promotor-Funktionalität des Caveolin-1-Gens wurde ein Reporterplasmid konstruiert, in dem das Luciferase-Gen unter Kontrolle des Caveolin-1-Promotors steht. Dazu wurde der Bereich -737 bis -37 bp, gerechnet ab Transkriptionsstart, aus normalen menschlichen Hepatozyten durch PCR kloniert und an KpnI/HindIII-Schnittstellen in das pGL3-luc Luciferase Reporter Plasmid (Promega Corporation, Madison, WI, USA) eingefügt (Cao et al., 2005). Die schematische Sequenz des pGL3-Plasmids ist in Abbildung 8 dargestellt, die Promotorsequenz ist im Anhang wiedergegeben (Prade, 2011).

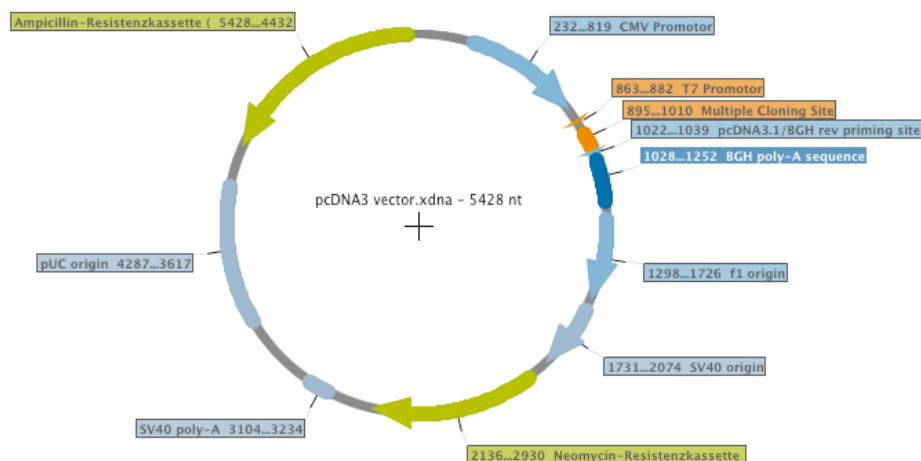


Abb. 8: Schema des Transfektionsplasmids auf der Basis eines pcNA3-Vectors

Die bislang bekannten und vermuteten SRE-Sequenzen befinden sich innerhalb dieses Genabschnitts. Wird im beschriebenen Plasmid der Caveolin-1-Promotor durch einen Transkriptionsfaktor aktiviert, so wird sich die Expression des hier artifiziell nachgeschalteten Luciferase-Gens erhöhen. Die Funktion des Genproduktes lässt sich photometrisch messen. In den unten beschriebenen Versuchen

wurde der Luciferase-Reporter-Assay insbesondere zur Überprüfung des theoretischen Konzeptes der Interaktion zwischen Gallensäuren und Caveolin-1-Expression verwendet.

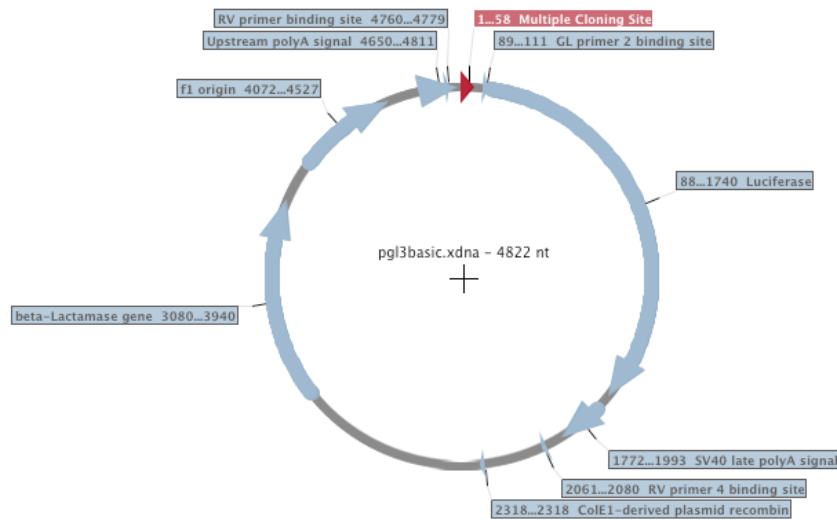


Abb. 9: Schema des Luciferase-Transfektionsplasmids

Transfektion

Zur Untersuchung des Effektes einer artifiziell erhöhten Expression von Genen wurden zunächst die Zielzellen in 15 cm-Zellkulturschalen zu 90% Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden vor Transfektion einen Tag mit Magerserum behandelt. Zur Transfektion wurden Lipofectamine LTX und Lipofectamine 2000 (Invitrogen) und verschiedene im Labor hergestellte Plasmide verwendet. Um stabile Zelllinien zu etablieren, wurde am zweiten Tag nach der Transfektion der Wachstumshemmstoff G418 zugegeben. Dabei wurde eine Hemmwirkung von 75% angestrebt. Die verwendete Dosis orientierte sich demnach an der zelltypspezifischen LD50 für G418, die jeweils in vorbereitenden Experimenten festgestellt wurde. Zur Stabilisierung der OE-19-Klone wurde eine Konzentration von zunächst 150 µg/ml eingesetzt, die später auf 250 µg/ml erhöht wurde.

Die Zellen wurden in 15-cm-Kulturplatten ausgesät und in RPMI mit FCS und Glutamin wie oben angegeben, aber ohne Zusatz von Antibiotika zu naher Konfluenz herangezogen. Gemäß dem Versuchsprotokoll des Herstellers wurde eine Mischung aus 1,5 ml Opti-MEM Medium, 100 µl Lipofectamine® und Caveolin-1-Plasmid auf die Zellen ausgebracht. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt. Nach einer Erholungsphase von 24 Stunden in RPMI mit FCS und Glutamin und ohne Antibiotika wurde mittels Selektionsmedium alle Zellen eliminiert, die das Resistenzgen nicht exprimierten. Die Zellen wurden eine Woche lang in Selektionsmedium herangezogen, bis einzelne Foci erkennbar waren. 24 dieser Foci wurden als Zellklon in jeweils ein Gefäß einer 24-fach-Kulturplatte überführt und dort weiter vermehrt. Vor weiteren Analysen wurde das Expressionsniveau von Caveolin-1 mittels rt-PCR und ECL-Western-Blot überprüft, die Klone wurden nach dieser Analyse in Tiefkühlmedium überführt und bei -80°C gelagert.

MTT-Assay zur Analyse von Wachstumskurven und zur Toxikologie

Der MTT-Test beruht auf der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid, einem gelben Farbstoff, zu Formazan, einem blau-violetten Farbstoff (Mosmann, 1983). Diese Reaktion hängt primär von der Glykolyserate der untersuchten Zellen ab (Berridge & Tan, 1993). Werden gleichartige Zellen in vergleichbaren Ausgangskonzentrationen ausgesät, kann dieser Test zur Abschätzung der Anzahl der lebenden Zellen dienen. Als solcher ist er gut etabliert. Methodische Beschränkungen bestehen insbesondere darin, dass Unterschiede in der Glykolyserate Veränderungen im Testergebnis bedingen. Auf alternative Methoden, wie der durchflusszytometrischen Messung der proliferierenden Zellfraktion, wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Zur Vorbereitung des Tests wurde zunächst eine definierte Zellzahl in eine 96-fach-Zellkulturplatte ausgesät. Die Anzahl orientierte sich dabei an der Art des Tests: bei Toxizitätsanalysen wurden 25.000 Zellen pro Gefäß, bei Wachstumskurventests 5.000 und 10.000 Zellen pro Gefäß ausgesät. Nach 24 Stunden wurde zunächst 50 µg des Farbstoffs pro Vertiefung zugegeben. Nach 4 Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit 100 µl eines SDS-Lysepuffers aufgelöst. Dieser Lysepuffer ist so zusammengesetzt, dass die endgültige Verdünnung von SDS im Kulturgefäß 1% (m/v) beträgt. Nach 24 Stunden wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgelesen. Nach Abgleich mit der Nullkontrolle wurde intern der Transmissionsgrad τ bestimmt:

$$\tau_{380} = \frac{I}{I_0}$$

Der Transmissionswert ist dabei exponentiell zur Dicke der untersuchten Probe. Daher muss auf identische Füllungszustände der Proben geachtet werden. Zur weiteren Analyse wurden die Messwerte als comma separated values-Datei (.csv) exportiert und in Microsoft Excel und Graph Pad Prism weiter berechnet.

Zur Analyse der Toxizität von Selektionsmedien und Versuchssubstanzen wurden pro Konzentrationsstufe jeweils 20.000 Zellen der zu untersuchenden Zellreihe – in hier beschriebenen Fall OE-19 und OE-21 – pro Gefäß auf einer 96-Gefäß-Kulturplatte verteilt. 24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen im 6-fach-Ansatz in verschiedenen Konzentrationen gegenüber dem Versuchsstoff, hier G418, exponiert. G418 wurde in Konzentrationen zwischen 10 mg/ml bis 0,01 µg/ml in log₁₀-Abstufungen verwendet, um einen möglichst weiten Bereich untersuchen zu können.

Zur Analyse der Proliferation wurden in einem 2x6-Ansatz von jedem zu untersuchenden Zellklon 5.000 und 10.000 Zellen in FCS-Gln-Kulturmedium auf einer 96-fach-Platte ausgesät. In der Regel wurden 8 Platten angesetzt. Während einer Woche wurde täglich eine Platte mit MTT-Reagens behandelt und detektiert.

Luciferase Reporter Assay

Untersuchungen zur Promotor-Aktivität wurden, wie oben bereits beschrieben, mit Hilfe des Luciferase-Tests durchgeführt. Grundlage des Tests ist, dass Zellen mit einem Plasmid transfiziert werden, das hinter einer beliebigen, durch Klonierung einfügbaren Promotorsequenz die Sequenz einer Luciferase trägt, deren Expression nach Transfektion vor allem von der Aktivität des Promotors abhängt. Wirtszellen können dabei prinzipiell beliebig gewählt werden. Wegen der guten Transfizierbarkeit wurden in der vorliegenden Arbeit für Luciferase-Messungen HEK293-Zellen verwendet. Die Transaktion wurde oben bereits beschrieben.

Die detektierte Reaktion beruht auf der Umsetzung von Luciferin in Anwesenheit von Sauerstoff, Magnesium-Ionen und ATP zu Oxiluciferin, katalysiert durch eine Luciferase. Bei dieser Reaktion wird neben AMP und Pyrophosphat ein kurzlebiges Intermediat aus der Gruppe der Dioxetane gebildet, das spontan unter Lichtemission zerfällt.

Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurden die transfizierten und stimulierten Zellen zunächst mit Hilfe eines Lysepuffers aufgelöst. Anschließend wurden 100 µl der Luciferin-Lösung in Detektionsküvetten vorgelegt und erst unmittelbar vor der Detektion Zelllysat hinzugegeben. Die Messung wurde in einem Luminometer durchgeführt, die Messzeit betrug 10 Sekunden pro Probe.

Expositionsversuche

Schnelle Zellaktivierung

Studien zum MAPKK-MAPK-Erk-Signalweg wurden an den Zelllinien OE-19 und OE-21 vorgenommen. Die Zellen wurden zunächst in einem 75-ml-Kulturfläschchen zu neunzigprozentiger Konfluenz herangezogen und anschließend auf 24-Gefäß-Kulturplatten verteilt. Pro Gefäß wurden etwa 25.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde den Zellen mittels Mediumwechsel auf RPMI-Magerserum gehungert und nach weiteren 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen CDCA stimuliert. Die verwendeten Konzentrationsstufen waren 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM und 250 µM. Zur Negativkontrolle wurde eine Lösung aus 0,1 % DMSO verwendet; dies entspricht der DMSO-Konzentration in der 100-µM-Probe.

Das Stimulationsmedium wurde 60, 30, 15 und 5 Minuten vor Beendigung des Experimentes auf die Zellen aufgebracht. Als zeitliche Negativkontrolle wurde eine Reihe nicht stimuliert, dies ist in der Grafik als Stimulationszeit von 0 Minuten gekennzeichnet.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde die Platte auf Eis gebettet, das Stimulationsmedium entfernt und durch auf 4°C gekühltes PBS ersetzt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit eigens hergestelltem Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6 mit 2% (w/v) SDS) noch im Kulturgefäß lysiert, die weitere Analyse ist im Abschnitt Proteinanalytik beschrieben.

Langzeitexposition

Die Langzeitexposition der Zellen zum Proteinnachweis, zur Expressionsanalyse und zur Chromatin-Immunopräzipitation wurde an Zellen der Zellreihen OE-21 und OE-19 durchgeführt, die in 6-fach-Kulturplatten zu 90% Konfluenz herangezogen wurden. Dazu wurden etwa 300.000 Zellen pro Gefäß benötigt, die Zellen wurden etwa zwei Tage in RPMI (Gibco) mit 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen) und jeweils 1% Glutamin und einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin gezüchtet. Zur Unterdrückung physiologischer Wachstumsimpulse während der Expositionsphase wurde Magermedium eingesetzt, das aus RPMI, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin hergestellt wurde.

Nach Erreichen einer etwa achtzigprozentigen Konfluenz wurde das Kulturmedium ausgetauscht und mit unterschiedlichen Konzentrationen von CDCA und DCA versetzt. Im Versuch über 30 Stunden wurden von beiden Gallensäuren die Konzentrationsstufen 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM und 100 μM untersucht. Im Versuch über sieben Tage wurde CDCA wie oben angegeben, DCA hingegen nur in den Stufen 50 μM und 100 μM untersucht. Zur Negativkontrolle wurde eine Lösung aus 0,1 % DMSO verwendet; dies entspricht der DMSO-Konzentration in der 100- μM -Probe. Nach Ablauf der im Versuchsprotokoll vorgesehenen Zeit wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden in gekühltem PBS zweimal gewaschen und anschließend im Kulturgefäß lysiert. Die Herstellung von Zelllysaten und deren Analyse ist im Abschnitt Proteinanalytik beschrieben.

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen SREBP-1 und Gallensäuren wurde der Protease-Inhibitor N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN, Biomol) verwendet. Diese Substanz verhindert den Abbau des aktiven SREBP-1 und führt damit zu einer supraphysiologischen Aktivierung dieser Signalkette (Sherwood et al., 1993; X. Wang, Sato, Brown, Hua, & Goldstein, 1994).

Färbetechniken

Routine-Histologie

Zur Untersuchung der Gewebestruktur wurden mittels Mikrotoms Mikroschnitte von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben angefertigt. Die Dicke der Schnitte betrug je nach Zustand der Paraffinblöcke 3 bis 10 μm . Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und anschließend in HistoClear (Roth GmbH, Karlsruhe) entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert: jeweils 3 Minuten in 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, und schließlich einmal 2 Minuten in destilliertem Wasser.

Die Schnitte wurden anschließend entsprechend dem im Labor etablierten Protokoll mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu wurden die Objektträger zunächst für 2 Minuten in Eosinlösung getaucht und nach einem Waschschrift für eine Minute in Hämatoxylin gegengefärbt.

Histologische Präparate von menschlichen Tumorproben wurden angefertigt vom Prof. Dr. med. A. Walch und Dr. rer. nat. S. Rauser (Institut für Pathologie der Technischen Universität München) und

dankenswerterweise zur Analyse zur Verfügung gestellt.

Immunhistochemie

Die Anfärbung spezifischer Proteine in Gewebeschnitten wurde mittels immunhistochemischer Färbung bewerkstelligt. Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben wurden zunächst mit einem Mikrotom in 3-10 µm Dicke geschnitten, im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger (Superfrost® Plus Objektträger, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) aufgebracht. Entsprechend der konventionellen histologischen Färbung wurden die Schnitte zunächst in HistoClear® (Roth GmbH, Karlsruhe) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Um die Antigene aufzuschließen und einer Detektion zugänglich zu machen, wurden die Schnitte in Demaskierungspuffer für 20 min aufgekocht (Vectastain antigen unmasking solution, Vector Laboratories, Inc.). Dies erfolgte in einer Mikrowelle. Nach dem Abkühlen – 30 Minuten bei Raumtemperatur im selben Puffer – wurden die Objektträger drei Mal für jeweils 2 Minuten in PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blocken, wurden die Schnitte für 20 Minuten in 3% (v/v) Wasserstoffperoxid in PBS inkubiert und anschließend erneut drei mal für 2 Minuten in PBS gewaschen. In einer feuchten Kammer wurden die Schnitte mit Normalserum aus Ziegen oder Rind für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Blockierungslösung wurde anschließend entfernt.

Zur spezifischen Anfärbung von Caveolin-1 wurde ein monospezifischer Antikörper (Caveolin-1 (N-20) sc-894, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:100 in 2% (m/v) BSA verwendet. Die Antikörperlösung wurde über Nacht bei 4°C auf den Schnitten belassen und am nächsten Tag entfernt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurde dieser Primärantikörper mit einem speziesspezifischen, biotinylierten Sekundärantikörper in Verdünnungen zwischen 1:1.000 und 1:5.000 detektiert. Während der Inkubationszeit (eine Stunde bei Raumtemperatur) wurde die Vectastain-Färbelösung entsprechend der Herstellervorgaben vorbereitet und nach der Sekundärinkubation und drei PBS-Waschschritten auf die Objektträger getropft.

Zur Anfärbung der Schnitte wurde entsprechend der Herstellervorgaben das DAB-Reagenz hergestellt (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) und auf die Objektträger aufgebracht. Der Farbumschlag wurde direkt visuell unter einem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion abgebrochen, sobald eine deutliche bräunliche Färbung zu erkennen war. Dies geschah durch dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS. Um die Zellkerne und die Gewebestruktur besser erkennen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin für einige Sekunden gegengefärbt. Überschüssige Farbe wurde unter Leitungswasser abgewaschen. Hämatoxylin-Lösung wurde freundlicherweise von PD Dr. med. J. Siveke zur Verfügung gestellt.

Nach der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit schließlich mit Pertex® (Medite GmbH, Burgdorf) und Deckgläsern eingedeckt.

Die Fast-Red-Färbung von Caveolin-1 in menschlichen Barrett-Karzinom-Proben im Gewebe-Mik-

roarray (siehe dort) wurde von PD Dr. med. A. Walch und Dr. rer. nat. S. Rauser, Institut für Pathologie der Technischen Universität München, durchgeführt.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur selektiven Anfärbung und bildlichen Darstellung von Proteinen innerhalb der Zelle wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen in Zellkulturflaschen herangezogen und mit Trypsin abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit FCS abgestoppt und die Zellen in Suspension gehalten. Zur Vorbereitung der Färbung wurden Deckgläschen in 6-fach-Platten gelegt und zunächst für eine Stunde bei 37°C mit einer Kollagenlösung inkubiert. Dies diente dazu, das Anheften der Zellen auf der Glasoberfläche zu erleichtern. Nach der Beschichtung wurde die vorbereitete Zellsuspension in die 6-fach-Platte mit den Deckgläschen überführt. Dabei wurde eine Zellzahl von etwa 100.000 Zellen pro Gefäß angestrebt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% pCO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Gefäße einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 4% (m/v) Paraformaldehyd in PBS über 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixierungsmedium wurde entfernt; die Deckgläschen wurden drei Mal in PBS gewaschen. Um eine optimale Bindung der Antikörper zu ermöglichen, wurden die Präparate mit 0,1% (v/v) Triton-X in PBS permeabilisiert. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde 100% FCS über 30 Minuten verwendet.

Die Färbungen wurden als Dreifachfärbungen durchgeführt. Caveolin-1 und SREBP-1 wurden mit Antikörpern detektiert und über fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper angefärbt. Aktin wurde mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin und DNA mit DAPI markiert.

Zur Antikörperfärbung wurden die Präparate zunächst für vier Stunden mit Primärantikörpern in Verdünnungen von 1:250 bis 1:500 behandelt. Die Primärantikörperlösung wurde danach abgesaugt und die Präparate drei Mal mit PBS gewaschen. Zusammen mit dem Sekundärantikörper wurde Phalloidin (beide Invitrogen GmbH) im Verhältnis 1:1000 (v/v) in 2% (v/v) FCS/PBS verdünnt, zu den Präparaten gegeben und über eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach drei weiteren PBS-Waschschritten wurde DAPI (Roth GmbH, Karlsruhe) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben und fünf Minuten auf den Präparaten belassen. Anschließend wurden sie letztmals gewaschen, mit Fluoreszenz-kompatiblen Eindeckmedium versehen (VectaShield, Vector Laboratories) und auf Objektträger gelegt.

Auf diese Weise angefertigte Präparate wurden unter Lichtschutz bei 4°C aufbewahrt.

Die Aufnahmen wurden an einem inversen Fluoreszenzlichtmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (AxioVert, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die Bilder wurden als Graustufen aufgenommen und gespeichert und anschließend rechnerisch in RGB-Farbbilder umgesetzt (AxioVision 4.4, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen). Dabei wurde für die Wiedergabe der DAPI-Färbung eine Darstellung in blau, für den eGFP/FITC-Kanal eine Darstellung in grün, für den Rhodamin/RFP-Kanal eine Wiedergabe in rot, sowie, falls notwendig, für eine Färbung im Infrarotbereich eine Codierung in Magenta gewählt. Diese Farbwahl entspricht den Gepflogenheiten in unserem Labor und ist

nicht barrierefrei, eine Codierung für Deuteranopie und Protanopie (Verwendung von Magenta statt rot) wurde nicht vorgenommen.

Gewebe-Mikroarray

Aus 150 zufällig ausgewählten Paraffin-fixierten Ösophaguskarzinom-Resektaten aus der Tumorbank des Instituts für Pathologie wurde an repräsentativen Bereichen Stenzen entnommen und in einer 10x5-Matrix erneut in Paraffin eingebettet. Von diesen Microarray-Blöcken wurden 10 µm-Schnitte angefertigt und mit FastRed(R) (siehe Abschnitt Immunhistochemie) angefärbt. Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Walch, Institut für Pathologie der TUM/Helmholtz-Zentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg bei München, durchgeführt. Die Aufnahmen wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Proteinanalytik

SDS-Polyamidgel-Elektrophorese

Zur Lyse der Zellen zum Zwecke der Proteinanalytik wurden die Zellen direkt im Kulturgefäß mit einem SDS-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6 mit 2% (w/v) SDS) aus eigener Herstellung versetzt und dadurch lysiert.

Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurden die Lysate in 1.500-µl-Reaktionsgefäße überführt und über 10 Sekunden mit Ultraschall bei 30% Systemleistung homogenisiert. Nach diesem Prozess wurden sie in über 10 Minuten bei 13.200 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1.500-µl-Reaktionsgefäße überführt und sofort bei -18°C tiefgefroren.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test wurden die Lysate aufgetaut und in einer 96-fach-Platte in Doppelansätzen zu jeweils 12,5 µl Probenvolumen und 12,5 µl Aqua Destillata ausgebracht. Parallel dazu wurden zur Eichung jeweils 25 µl eines Albumin-Konzentrationsstandards mit den Stufen 25 µg/ml, 50 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml und 2000 µg/ml getestet. Zusätzlich wurde auch eine Negativkontrolle mit 25 µl Aqua Destillata gemessen. Zu diesen Proben und Standards wurden jeweils 200 µl des Analysereagens gegeben (BCA® Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Inc., Surrey, GB). Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm Wellenlänge gemessen (Precision microplate reader, Molecular Devices GmbH, Ismaning). Die Standardkurve wurde mittels linearer Regression berechnet und zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Proben verwendet. Die einzelnen Proben wurden mit Aqua Destillata auf eine Zielkonzentration von 100 µg/ml verdünnt und im Verhältnis von 1:5 mit Auftragspuffer (62.5 mM Tris-base, pH > 10; 10% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 50% (v/v) Glycerol-Bromphenolblau) für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Lysate wurden sofort verwendet oder bei 4°C bei kurzfristiger Lagerung und -20°C bei langfristiger Lagerung aufbewahrt.

Zur Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele in einer Konzentration zwischen 15% und 10%

mit 1 mm Dicke hergestellt. Tabelle 8 gibt das Mischungsverhältnis an. Die Proben wurden zusammen mit einem Protein-Größenstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) aufgetragen und bei 100V unter visueller Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proben im Elektrobplot-Verfahren abhängig vom weiteren Procedere (siehe unten) entweder auf eine Nitrozellulose- oder eine PVDF-Membran übertragen.

ECL-Western Blot

Zur konventionellen Detektion im ECL-Verfahren wurden die Proben auf eine Nitrozellulose-Membran (PROTRAN BA 83, Schleicher&Schuell) transferiert. Unmittelbar danach wurde die Membran in einer Lösung aus 2% Milchpulver in PBS oder 5% bovinem Serum-Albumin (im folgenden BSA, Roth) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und anschließend dreimal in PBS mit 1% Tween (Sigma, im folgenden wird für diese Mischung die Abkürzung PBS-T verwendet) für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C bei konstanter Bewegung durchgeführt. Die Primärantikörper wurden dazu in einer Mischung aus fünfprozentigem BSA und PBS-T in Verdünnungen zwischen 1:250 und 1:5.000 angewendet.

Nach der Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran dreimal jeweils 10 Minuten in PBS-T gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem passenden, Meerrettich-Peroxidase markierten Sekundärantikörper. Dieser wurde hierzu im Verhältnis 1:5.000 in PBS-T verdünnt und eine Stunde lang auf der Membran belassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS-T über jeweils zehn Minuten wurde die Membran für kurze Zeit in ECL-Reagenz (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB) gelegt und unmittelbar anschließend in der Dunkelkammer mittels Röntgen-Filmmaterial (Amersham Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) detektiert. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Hyper processor SRX-101A, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) entwickelt und anschließend von Hand oder softwarebasiert (Quantity One 4.6, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ausgewertet.

Nach Detektion des Zielproteins wurde die Membran erneut drei Mal für jeweils 20 Minuten in PBS-T gewaschen und anschließend mit einem murinen Antikörper gegen β -Aktin zur Ladekontrolle inkubiert. Es folgte eine erneute Sekundärantikörper-Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-markierten, anti-IgG (Maus)-Antikörpern. Zur Detektion zu Ladekontrolle ist üblicherweise eine Filmexposition von 10-60 Sekunden ausreichend. In Einzelfällen wurde die Detektion über 20 min durchgeführt, um schwach exprimierte Proteine zuverlässig detektieren zu können.

LI-COR® Odyssey Western Blot

Im Unterschied zum ECL-Western Blot wurde hier zum Elektroblothing eine hydrophobe PVDF-Membran (Immobilon-FL®, Millipore Corporation, Billerica, USA) verwendet, die vor Benutzung zunächst in reinem Methanol aktiviert und danach kurz in Transferpuffer gespült wurde. Wegen des speziellen Detektionsverfahrens muss die PVDF-Membran im Odyssey-Verfahren mit einem generischen Blockpuffer geblockt werden (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg), da sonst eine unerwünschte unspezifische Fluoreszenz auftritt. Die Primär-Antikörper wurden im Grunde ebenso verwendet wie im ECL-Protokoll, wenngleich an keiner Stelle BSA oder Milchpuffer als Blockmedium eingesetzt wurde.

Abweichend vom ECL-Western-Blot-Protokoll ist es durch Verwendung unterschiedlicher Fluorophore und Koppelung an Spezies-spezifische Sekundärantikörper in dieser Technik möglich, Zielprotein und Ladekontrolle in einem Durchgang zu detektieren. Dazu muss der Antikörper gegen das Zielprotein von einer anderen Spezies stammen als der Primärantikörper zur Ladekontrolle. Als Ladekontrolle wurde ein muriner, polyklonaler Antikörper gegen β -Aktin in Konzentration von 1:1.000 bis 1:5.000 verwendet, der Antikörper gegen das Zielprotein stammte in allen Versuchen vom Kaninchen.

Nach einstündiger Inkubation mit der Mischung aus beiden Sekundärantikörpern, die in einer Verdünnung von 1:25.000 verwendet wurden und mit Fluorophoren mit 480 nm und 520 nm Wellenlänge gekoppelt waren, wurde die Membran drei Mal etwa fünf Minuten in PBS-T gewaschen und mit einem Infrarot-Scanner (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg) detektiert. Der Scanner wurde freundlicherweise von Dr. med. D. Saur zur Verfügung gestellt. Durch rechnergestützte Analyse des Fluoreszenzsignals wurden Falschfarbenbilder erstellt und die relativen Zielproteinkonzentrationen im Verhältnis zum Ladekontrollsignal berechnet. Dazu wurde das proprietäre Softwareprogramm der Firma LiCOR (Odyssey 1.2, LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmont, USA) verwendet.

Nukleinsäureanalytik

Isolation von DNA

Zur Routineanalyse von genomischer DNA aus Zellen wurden diese in Kulturschalen zu subtotaler Konfluenz herangezogen und entweder im Gefäß direkt lysiert oder zunächst mittels Trypsin abgelöst und bei 300 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das weitere Vorgehen entspricht den Herstellervorgaben des verwendeten Qlamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) (QIAGEN GmbH, 2010a).

Zur Analyse von DNA aus Gewebe wurde derselbe Kit gemäß den entsprechenden Herstellervorgaben verwendet (QIAGEN GmbH, 2010a). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die gewonnene DNA aus allen in der Biopsie vorkommenden Zelltypen stammt. Die Analyse zeigt daher lediglich einen Überblick über die genetische Information des Gewebes. Eine Interpo-

lation auf die genetische Information der einzelnen Zelle oder eines Zelltyps ist nicht möglich. Werden also bei der Analyse von Tumorproben in diesen DNA-Isolaten Hinweise auf Mutationen gefunden, so kann nicht auf den Zelltyp geschlossen werden, in dem die Mutation vorhanden ist.

Die Konzentration der DNA in den Isolaten wurde spektrophotometrisch durch Messung des Absorptionsspektrums und insbesondere der Absorption bei 260 nm und 340 nm bestimmt (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). In diesem Verfahren ist es auch möglich, die Reinheit der Probe abzuschätzen (Ausubel et al., 2004).

Isolation von RNA

Um Veränderungen in der Genexpression mittels quantitativer PCR abschätzen zu können und um Ergebnisse der Proteinanalytik zu validieren wurde mRNA isoliert und anschließend in cDNA transkribiert (siehe unten). Ausgangsmaterialien waren Zellkulturen und Gewebeproben. Zur Isolierung wurde in beiden Fällen der Rneasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß Herstellervorgaben verwendet (QIAGEN GmbH, 2010b). Zusätzlich wurden die Proben mit DNaseI behandelt, um eine Beeinträchtigung der weiteren Analyse durch genomische DNA auszuschließen. Bei der Prozessierung wurde besonders darauf geachtet, Kontaminationen mit fremder RNA oder RNasen auszuschließen.

Wie auch bei der DNA-Isolierung aus Geweben ist auch bei der RNA-Gewinnung nicht festzustellen, in welchem Zelltyp die Expressionsveränderung vor sich geht.

cDNA-Synthese

RNA kann in den im Labor etablierten Verfahren nicht direkt in der quantitativen PCR analysiert werden. Es ist vor der weiteren Verwendung nötig, sie durch eine reverse Transkriptase in DNA zu transkribieren. Zu diesem Zweck wurde der Verso™ cDNA-Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) gemäß der Herstellervorgaben verwendet (Thermo Scientific, 2011). Üblicherweise wurde 1 µg RNA in die Reaktion eingebracht. Als Transkriptionsprimer wurden zufällige Nukleotid-Hexamere verwendet, die rein zufällig an die zu transkribierende RNA binden. Zur Synthese wird die Reaktion für 30 min bei einer Temperatur von 42°C inkubiert. Die transkribierte DNA wurde anschließend in die quantitative PCR eingesetzt.

Nach der Transkription wurde die cDNA kurzzeitig bei 4°C oder über längere Zeit bei -80°C gelagert.

Chromatin-Immunpräzipitation

Zur Untersuchung der Bindung des Transkriptionsfaktors SREBP-1 an den Promotor von Caveolin-1 wurden OE-21-Zellen in 6-fach-Kulturplatten zu subtotaler Konfluenz herangezogen. Dazu wurden pro Gefäß etwa 500.000 Zellen ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden stimuliert mit Vollmedium, dem CDCA und DCA in den Konzentrationsstufen 50 und 100 µM zugegeben wurde. Als Negativkontrolle diente 0,1% DMSO in Vollmedium. Diese Verdünnung entspricht der DMSO-Konzentration in der 100 µM-Probe.

Bei dieser Methode wird ein Nebeneffekt der Formalinfixierung genutzt, der in anderen Protokollen oft eher unwillkommen ist: Formalin verbindet die DNA mit den DNA-gebundenen Proteinen, insbe-

sondere also Transkriptionsfaktoren und Histonen. Die DNA wird nach der Formalinbehandlung durch Ultraschall in kleine Fragmente zerbrochen. Über spezifische Antikörper lassen sich dann jene DNA-Fragmente isolieren, die einen der gewünschten Transkriptionsfaktoren gebunden haben. Die jeweilige Sequenz, an die der Transkriptionsfaktor gebunden hat, lässt sich anschließend über eine normale oder sogar über eine quantitative PCT detektieren. Die Chromatin-Immunpräzipitation gilt als das einzige valide In-vivo-Verfahren, um die spezifische Bindung eines Transkriptionsfaktors an eine spezifische Bindungsstelle bei einer klar definierten Zellstimulation zu erkennen.

Zunächst werden die Zellen in den Kulturgefäßen mit Formalin fixiert und damit die DNA mit den Proteinen quervernetzt. Dazu wird eine Formalin-Konzentration von 1% im Kulturgefäß angestrebt. In den hier beschriebenen Versuchen wurden 270 µl einer 36%-(m/v)-Formalinlösung zu 10 ml Zellkulturmedium gegeben. Diese Mischung wurde für 10 Minuten auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Fixierungsmedium sorgfältig abgesaugt und das Zellkulturgefäß zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Waschlösung wurden Protease-Inhibitoren zugesetzt (1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A). Die Zellen wurden mit einem Schaber abgelöst und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 min⁻¹ für 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Zur Lyse der Zellen wurde ein herkömmlicher SDS-Lysepuffer mit den oben beschriebenen Proteaseinhibitoren verwendet. Je 106 Zellen wurden 200 µl Lysepuffer verwendet und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden anschließend mit Ultraschall behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Diese Proben wurden dann bei 13.000 min⁻¹ und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, das Sediment verworfen und 200 µl des Überstandes in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Vor der weiteren Prozessierung wurde zunächst eine erste Aufreinigung der DNA durchgeführt, indem unspezifisch an Agarose bindende DNA mittels einer Lachssperma-Agarose-Mischung abgefangen wurde. Diese Substanz wurde anschließend durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert und entfernt. Zum Überstand wurde dann der Antikörper gegen den zu analysierenden Transkriptionsfaktor gegeben und für eine Stunde bei 4°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Die Antikörper-Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend wiederum über Agarose-Beads adsorbiert und anschließend in steigenden Salzkonzentrationen gewaschen.

Zur Isolierung der DNA wurde Elutionspuffer zugegeben (1% (m/v) SDS, 0,1 M NaHCO₃). Die Elution wurde in zwei Schritten mit jeweils 250 µl Elutionspuffer durchgeführt. Die Quervernetzungen wurden dann durch Inkubation bei 65°C für 4 Stunden wieder aufgehoben. Um die Proteinreste zu entfernen, wurde zudem eine Inkubation mit 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,5 und 2 µl 10 mg/ml Proteinase K über eine Stunde bei 65°C durchgeführt.

Die DNA wurde anschließend im Phenol-Chloroform-Verfahren isoliert: Zu den Proben wurde ein Volumen (hier 500 µl) Phenol hinzugegeben und für 5 Minuten leicht geschüttelt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 3.000 min⁻¹ und 4°C wurde der Überstand mit der wässrigen Phase abgehoben und

vorsichtig in frische 2-ml-Reaktionsgefäße überführt. Dieser Schritt wurde mit Chloroform statt Phenol wiederholt. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen (hier 1,25 ml) an reinem Ethanol zugegeben. Die DNA wurde so über 15 Minuten bei -20°C ausgefällt. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 min⁻¹ und 4°C für 15 Minuten wurde die präzipitierte DNA absedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA in 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die sedimentierte DNA wurde unter dem Abzug getrocknet und schließlich in 50-150 µl destilliertem Wasser gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch gemessen.

In der anschließenden PCR werden Primer verwendet, die in erster Linie regulatorische Sequenzen im Gen abdecken. In hier beschriebenen Fall wurden zwei Primerpaare verwendet, die den Caveolin-1-Promotor etwa 700 bp und etwa 300 bp vor dem Transkriptionsstart abdecken. In beiden Bereichen befinden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Standard-PCR

Zum sequenzspezifischen Nachweis isolierter DNA-Sequenzen, insbesondere genomischer DNA, wurde eine konventionelle PCR durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Die benötigten Substanzen und die Taq-Polymerase wurden als vorbereitete Mischung bezogen und nach Herstellerangaben verwendet (GO-Taq, Promega). Die Proben wurden nach Abschluss der Amplifikation auf 0,5 - 2%-Agarose-Gele aufgebracht und durch horizontale Gelelektrophorese bei 100 V aufgetrennt oder bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt. Um die Größe des amplifizierten Fragments abschätzen zu können, wurde je nach erwarteter Größe ein 100- oder 1000-bp-Größenstandard in der Gelelektrophorese mitgemessen.

Die Zusammensetzung einer typischen Standard-PCR-Reaktion ist in Tabelle 6a wiedergegeben.

Substanz	Menge	Volumen
DNA oder cDNA	40-50 ng	variabel
H ₂ O, PCR-geeignet	-	variabel
Primer	je 500 nM	je 1 µl
GoTaq® Green Master Mix (2x)	1x	10 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Tab. 6a: Standard-PCR-Probenansatz

Die Proben wurden in 200 µl-Reaktionsgefäße angesetzt und in Thermocycler-Geräten prozessiert. Je nach der Menge der isolierten DNA wurden zwischen 35 und 55 Zyklen durchgeführt. Ein typisches Protokoll ist in Tabelle 6b dargestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Präinkubation	94-95°C	2 min	1x
Amplifikation	Denaturierung	94-95°C	30 s
	Annäherung der Primer	55-68°C	30 s
	Elongation	72°C	30-60s
Abschlussinkubation	72°C	7 min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

Tab. 6b: Standard-PCR-Parameter

Die Annäherungstemperatur t_A ist abhängig von den verwendeten Primern und wurde aus der mathematisch abgeschätzten Schmelztemperatur t_M berechnet:

$$t_A = t_M - 5^\circ\text{C}$$

Die Elongationszeit ist abhängig von der erwarteten Länge des amplifizierten Fragments. Als Näherungswert für die Elongationsgeschwindigkeit der Taq-Polymerase gilt im allgemeinen 1000 bp/min.

Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zum halbquantitativen Nachweis von DNA-Abschnitten wurden die DNA- oder cDNA-Proben in Mikrotiterplatten im SYBR Green-Fluoreszenzverfahren gemessen. Der in dieser Reaktion verwendete Farbstoff ist in Lösung farblos und zeigt auch keine Fluoreszenz. Bindet der Farbstoff an doppelsträngige DNA, so entsteht hingegen ein deutliches Fluoreszenzsignal. Damit korreliert die Stärke des Fluoreszenzsignals mit der Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe.

Zur Vorbereitung der Messung wurde eine LightCycler®-(Roche)-kompatible 96-fach-Mikrotiterplatte über 30 Minuten unter UV-Licht inkubiert, um eventuell vorhandene DNA-Kontaminationen zu zerstören. Eine typische Reaktion bestand aus den in Tabelle 7a beschriebenen Komponenten.

Substanz	Menge	Volumen
DNA oder cDNA	40-50 ng	variabel
H ₂ O, PCR-geeignet	-	variabel
Primer	je 500 nM	je 1 µl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2x)	1x	10 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Tab 7a: Ablaufparameter qPCR

Die Reaktionen wurden zum Schutz vor Kontaminationen unter einer Plexiglashaube gemischt. Jede Reaktion wurde als Duplett angesetzt. Zum internen Abgleich wurde zusätzlich zum Zielgen ein Haushaltsgen, in der Regel β 2-Mikroglobulin, für jede Probe mitgemessen. Ein typisches qPCR-Protokoll ist in Tabelle 7b beschrieben.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Präinkubation	95°C	5 min	1x
Amplifikation	Denaturierung	95°C	10 s
	Annäherung der Primer	50°C	10 s
	Elongation	72°C	5-10s
Abschlussinkubation	72°C	2 min	1x
Kühlung	37°C	10 min	1x

Tab 7a: Probenansatz qPCR

Die Platten wurden in einem LightCycler® 480 der Firma Roche für 35 bis 55 Zyklen inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde jeweils am Ende jeder Elongationsphase durch detektiert und geräteintern als cycle threshold-Wert (ct-Wert) ausgegeben. Der ct-Wert beschreibt jenen Amplifikationszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet und damit als positiv gewertet wird. Da es sich bei diesem Wert um einen errechneten Wert handelt, ist sein Betrag nicht ganzzahlig und damit als hypothetischer Wert zu verstehen. Je geringer der Betrag, desto weniger Zyklen waren zur Amplifikation nötig, bis ein messbares Signal erfasst wurde. Damit spricht ein niedriger ct-Wert für

eine hohe Anzahl an DNA-Abschnitten.

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben durch konventionelle Agarosegel-Elektrophorese analysiert, um unspezifische Bindungen oder Amplifikationen unspezifischer Fragmente auszuschließen.

Tabelle 8a und b gibt einen Überblick über die verwendeten Primer.

cDNA-Primer	Sequenz Codestrang	Sequenz codogener Strang
β2-Mikroglobulin (human)	TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T	TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T
Caveolin-1 (human)	AAT ACG TAG ACT CGG AGG GAC A	GCG GTA AAA CCA GTA TTT CGT C
SREBP-1c (human)	TGC ATT TTC TGA CAC GCT TC	CCA AGC TGT ACA GGC TCT CC

Tab. 8a: cDNA-Primer

Methylierungsspezifische Primer	Sequenz Codestrang	Sequenz codogener Strang
Caveolin-1 (human, methyliert)	TTA TTT CGA AGC GTT TGG GAG	GCT AAT CTA CAT TTG CTC ACA A
Caveolin-1 (human, unmethyliert)	TTA TTT TGA AGT GTT TGG GAG	ACT AAT CTA CAT TTA CTC ACA A

Tab. 8b: methylierungsspezifische Primer

Bisulfit-Konversion von DNA

Eine von mehreren Möglichkeiten, die Expression von Genen zu steuern, stellt die epigenetische Modifikation von Basen der DNA dar. Dabei werden Cytosin-Reste mit einem Methylrest versehen. Dies verändert die dreidimensionale Struktur dergestalt, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA verändert wird. Diese Reaktion wird durch Cytosin-Methyltransferasen katalysiert. Behandelt man Zellen in vivo mit demethylierenden Wirkstoffen, im hier beschriebenen Versuch 5-Azacytidin (5-Aza), wird diese Reaktion gehemmt und Methylierungen abgebaut. Damit kann die Expression zuvor methylierter Gene wieder erhöht werden.

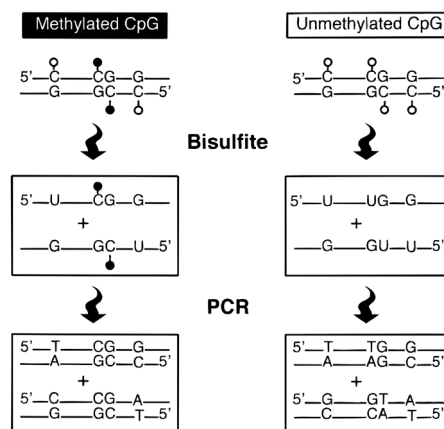


Abb. 10: Prinzip der Bisulfit-Konversion

(aus [177])

Eine direkte Detektion der methylierten Cytosin-Reste war zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in der Arbeitsgruppe nicht verfügbar. Im Labor war zur epigenetischen Analyse die sogenannte Bisulfit-Konversion etabliert. Durch Behandlung der isolierten DNA mit Natriumhydrogensulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt; in der Sequenzanalyse oder in der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse fällt dann eine Sequenzabweichung von C zu T auf. Methyliertes Cytosin bleibt dagegen unverändert. Auf diese direkte Analyseverfahren wurde in der vorliegenden Untersuchung verzichtet. Stattdessen wurde wiederum die Expression von Caveolin-1 mit und ohne Behandlung mit Natriumhydrogensulfit. Zur Bisulfit-Konversion wurde der EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen GmbH) wie vom Hersteller angegeben verwendet.

Methylierungsspezifische PCR

Die prozessierte DNA wurde mittels speziell angepasster Primer in einer real-time PCR analysiert. Diese Primer müssen die Genabschnitte enthalten, in denen die Sequenzveränderungen erwartet werden. Liegen in der Primersequenz CpG-Folgen vor, wird in einem verwendeten Primerpaar Cytosin durch Thymin ersetzt. Findet in der quantitativen PCR eine normale Amplifikation des DNA-Abschnittes statt, so ist von einer geringen Methylierung auszugehen. Ergibt die PCR nur ein geringes Signal, so wird dies als Zeichen gewertet, dass die Primer wegen vieler konservierter – also wahrscheinlich methylierter – Cytosin-Reste nicht binden konnten. Zur Kontrolle wird zusätzlich eine PCR mit den unveränderten Primern durchgeführt, die Interpretation der Signale ist genau umgekehrt zu sehen: ein starkes Signal weist hier auf einen hohen Methylierungsgrad hin.

Alternativ kann eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierbei wird die Probe nach der eigentlichen PCR zunächst auf etwa 55°C abgekühlt, um eine Bindung komplementärer Basensequenzen zu ermöglichen. Dann wird die Probe unter ständiger fluorometrischer Messung langsam bis zur vollständigen Denaturierung bei 94°C erhitzt und die Messwerte als Kurve aufgetragen. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer.

DNA-Gelelektrophorese

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung zusammen mit einem Größenstandard aufgetrennt. Dazu wurde Agarose-Pulver in TAE-Puffer (40 mM Tris-base, 1 mM EDTA pH 8,0, 20 mM Eisessig) bis zur vollständigen Auflösung aufgekocht, mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid vermischt und in eine Gussform gegeben (Sub® Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Wurden die zu analysierenden Proben einer Standard-PCR entnommen, konnten die Proben ohne weitere Prozessierung auf das Gel aufgetragen werden. Wurden sie einer qPCR-Reaktion entnommen, mussten sie vor der Gelelektrophorese mit Ladebuffer (6X orange loading dye, Fermentas GmbH) vermischt werden.

Die Auftrennung der Proben erfolgte im horizontalen Feld bei etwa 100 V. Die Auswertung erfolgte

nach Aufnahme des Bandenmusters unter UV-Licht (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) per Hand oder mittels Software (Quantity One 4.6, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Computergestützte Analyse

Zur Analyse numerischer Daten wurden Microsoft Excel for Mac 2008 (Microsoft, Inc., Richmond, VA, USA) sowie GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) eingesetzt. Dies betraf Messungen aus Absorptionsmessungen bei BCA- und MTT-Assays sowie die Abschätzung der Genexpression mittels quantitativer PCR. Immunfluoreszenz-Western-Blots wurden mit der proprietären Software des Geräteherstellers analysiert (Odyssey, Version 1.2, LI-COR Biosciences, GmbH, Bad Homburg). Die daraus gewonnenen Daten wurden in Microsoft Excel weiter berechnet. ECL-Western Blots wurden mit der proprietären Software des Aufnahmegeräts registriert und anschließend papierbasiert oder mittels der proprietären Software (Quantity One4.6, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Bilddateien aus mikroskopischen Aufnahmen wurden mit der proprietären Steuersoftware des Mikroskopherstellers aufgenommen (ZEISS AxioVision) und mit Fiji und Adobe Photoshop weiter bearbeitet.

Ergebnisse

Einfluss und Funktion von Caveolin-1 und seiner dominant-negativen Variante

Caveolin-1-Expression in verschiedenen Zelllinien

Zunächst wurden die verwendeten Zellreihen im Bezug auf ihre Caveolin-Expression charakterisiert. Die Zellreihe OE-19 entstammt einem Kardial-Karzinom und weist – wie andere von Magenzellen abstammende Linie, wie auch AGS – konstitutionell eine sehr geringe Expression von Caveolin-1 auf. Im Unterschied dazu ist die Caveolin-1-Expression in der Ösophaguskarzinom-Zelllinie OE-21 sehr hoch. Zwei andere Zelllinien mit plattenepithelialem Ursprung – HET1A und EPC-tert – zeigen jedoch deutliche Unterschiede in der Caveolin-1-Expression (Abb. 10a, vgl. Prade et al., 2012).

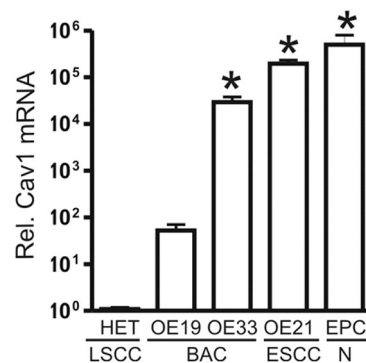


Abb. 10a: Caveolin-1 in verschiedenen Zelllinien

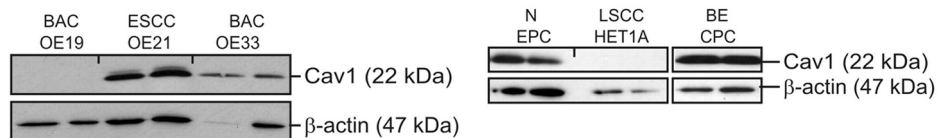


Abb. 10b: Caveolin-1-Western-Blot, vorbekanntes Muster

Um die biologischen Effekte dieses Unterschiedes abschätzen zu können, planten wir, zunächst in OE-19-Zellen die Auswirkungen der Wildtyp-Variante von Caveolin-1 zu testen. Im direkten Vergleich dazu sollten OE-21-Zellen mit der dominant-negativen Variante transfiziert werden. Das aktuell untersuchte Plasmid wurde bereits in früheren Untersuchungen verwendet (Burgermeister, Schmid, et al., 2007b).

Stabile Transfektion von OE-19-Zellen

OE-19-Zellen wurden in 15-cm-Zellkulturschalen zu subtotaler Konfluenz herangezogen und anschließend wie oben beschrieben mit der dominant-negativen Variante von Caveolin-1 transfiziert. Um eine biologische Kontrolle zur Verfügung zu haben, wurde gleichzeitig eine Transfektion mit unverändertem Caveolin-1 und eine Leervektorkontrolle durchgeführt. In der Literatur sind bisher nur sehr wenige Experimente mit stabil transfizierten OE-19-Zellen publiziert, da diese Zellreihe anders als beispiels-

weise HEK-Zellen anscheinend nur in sehr geringem Maße fremde DNA annimmt und die üblichen nichtviralen Transfektionsverfahren nur sehr eingeschränkt toleriert. Wir entschlossen uns dennoch für diese Zelllinie, da sie ihrer Herkunft nach die größte biologische Nähe zum Kardial-Karzinom hat.

Die mRNA-Analyse zeigte in fast allen Klonen erwartungsgemäß lediglich ein geringes Expressionsniveau. Es konnte auch nach Variierung der Transfektionsparameter nicht wesentlich gesteigert werden. Kontrolltransfektionen in HEK-Zellen waren mit hoher Effizienz bereits im Vorfeld der Versuchsplanung durchgeführt worden. Zur Untersuchung des biologischen Effektes wurden die OE-19-Klone funktionellen Tests unterzogen.

Die stabil transfizierten Klone konnten über mehrere Passagen in Kultur gehalten werden.

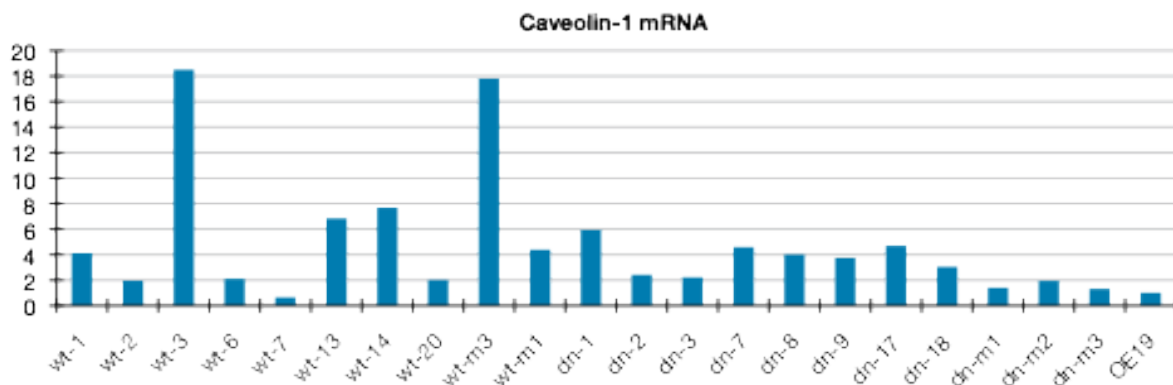


Abb. 11: Cav-1-mRNA in stabil transfizierten OE-19-Klonen

Wachstumskurve

Die Wachstumskurven der transfizierten Klone sind in Abbildung 11a dargestellt. Auffällig ist, dass die dominant-negativen Klone (grüne Graphen) bis Tag 5 offenbar schneller proliferierten als die Wildtyp-Klone (blaue Graphen). Um abzuschätzen, welchen Einfluss Gallensäure-Exposition auf die verschiedenen Klone hat, wurde der Versuch mit CDCA wiederholt (vgl. Prade, 2011). Die MTT-Messwerte sind in Abbildung 11b dargestellt. Wiederum sind die dominant-negativen Klone grün, die Wildtyp-Klone blau codiert. Es zeigt sich, dass die dominant-negativen Klone auch hier offenbar ein schnelleres Wachstum zeigen, der auch an Tag sechs noch messbar ist. Im Mittelwert scheint dabei CDCA die Proliferation bis Tag sechs bei Wildtyp-Klonen eher zu hemmen, währenddessen die dominant-negative Variante durch die Gallensalze eher stimuliert zu werden scheint (Abb. 11c). Dies unterstreicht die Rolle, die der P132L-Mutation in vivo zugeschrieben wird.

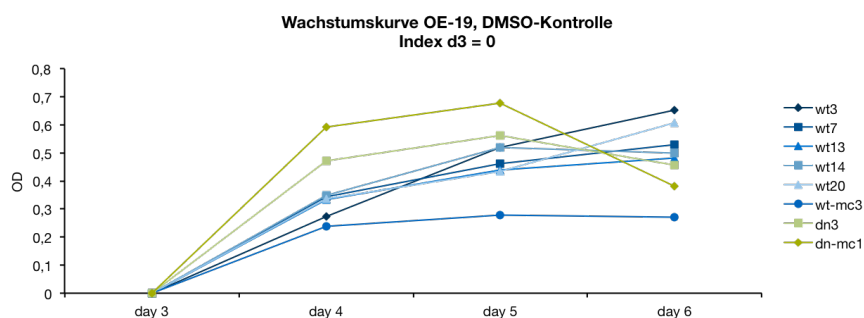


Abb. 12a: Wachstumskurven der Klone, DMSO-Kontrolle

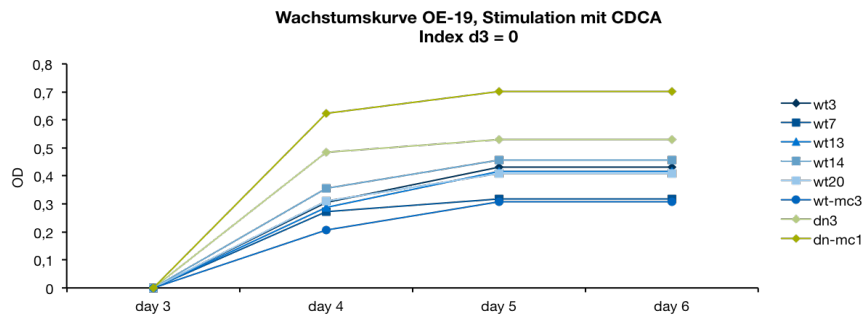


Abb. 12b: Wachstumskurven der Klone, Stimulation mit CDCA

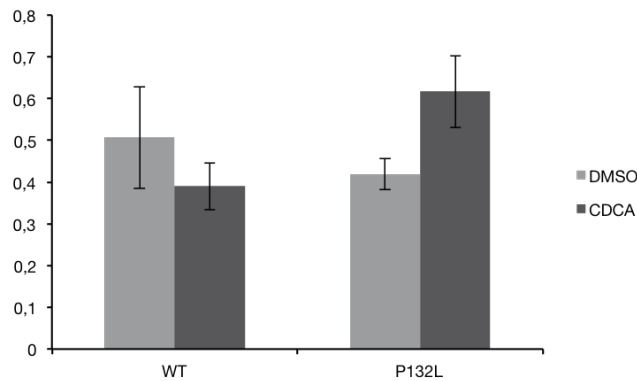


Abb. 12c: Statistische Auswertung der Wachstumskurven

Es ist zu diskutieren, inwiefern andere Transfektionsmethoden, insbesondere der virale Gentransfer, zu einem anderen Ergebnis geführt hätten. Angesichts der Erfahrungen bei der genetischen Veränderung dieser Zelllinie und mangels Zugang zu Laboreinrichtungen der Sicherheitsstufe S2 wurde bei der Durchführung der Versuche auf eine entsprechende Überprüfung verzichtet. Des weiteren ist zu diskutieren, ob die Kultur in G418-haltigen Medien trotz Resistenzfaktor die replikative Fitness insbesondere der OE-19-Zellen zu sehr einschränkt. Aufgrund dieser Erfahrung wurden die weiteren Transfektionsexperimente, insbesondere zur Interaktion des SREBP-Signalwegs mit der Caveolin-1-Expression, in HEK293-Zellen durchgeführt.

Caveolin-1- und SREBP-1-Expression im Ösophagus

Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebe-Microarrays von Ösophagus-Karzinomresektaten erlaubten es, die Expression von Caveolin-1 im menschlichen Ösophagus abzuschätzen. Es liegt in der physiologischen Situation in vesikulären, membranassoziierten Strukturen vor. Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Anfärbung des Stratum basale in einem menschlichen Ösophaguspräparat (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Walch und Dr. rer. nat. S. Rauser, Institut für Pathologie, Technische Universität München) mittels FastRed, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Aufnahme erfolgte an einem 2 µm dicken Paraffin-Schnittpräparat bei einer Objektivvergrößerung um den Faktor 40. Diese Lokalisation lässt sich im Mausversuch reproduzieren (Abb. 14). Ergänzende Expressionsstudien auf Proteinebene konnten die Beobachtung erhärten (Abb. 15). Die Färbung nimmt lumenwärts deutlich ab. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass lediglich die untersten Zell-

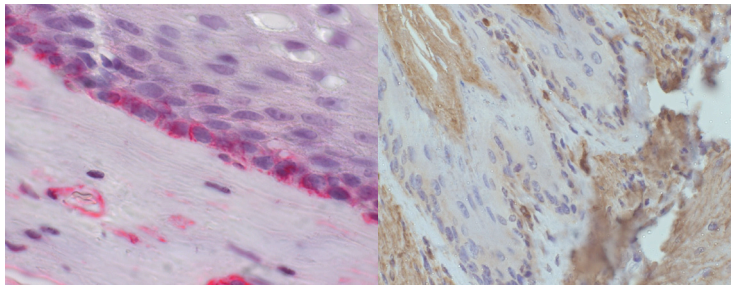


Abb. 13c: IHC auf Cav-1, Mensch

Abb. 13b: IHC auf Cav-1, Maus

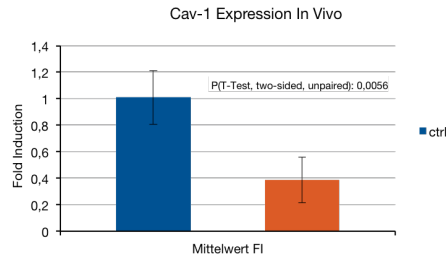


Abb. 13c: qPCR auf Cav-1, Maus

schichten Caveolin-1 exprimieren und das Protein mit fortschreitender Zellalterung verschwindet, oder im Zuge der Ausreifung der Zellen in einer Art maskiert wird, die eine immunhistochemische Detektion erschwert.

Die Funktion von Caveolin-1 umfasst mutmaßlich den intrazellulären Transport von Cholesterin-Molekülen, die innerhalb der Lipid-Doppelmembran liegen. Der Zusatz von Cholesterin macht biologische Membranen steifer, so dass ein hoher Cholesteringehalt bei Epithelien mit hoher mechanischer Beanspruchung – eben Plattenepithelien – eine funktionell wichtige Rolle spielt. Der Einbau von Cholesterin erfolgt mutmaßlich bereits in der Neubildung der Zellen in Stratum basale, da die weiter lumenwärts

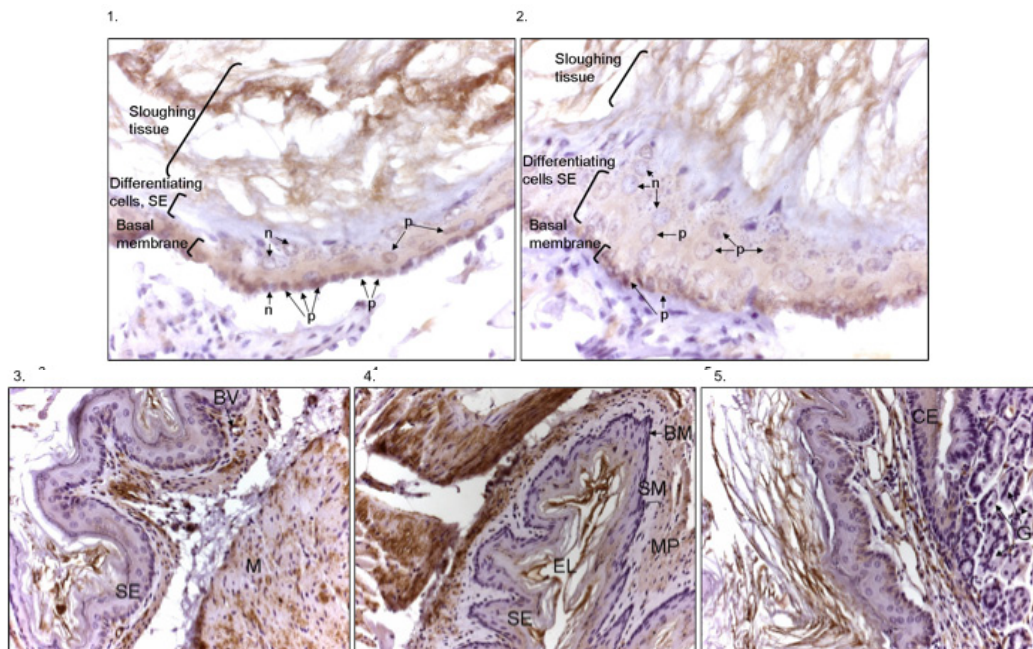


Abb. 14: Immunhistochemie auf SREBP-1 und Caveolin-1, Maus, gastroösophagealer Übergang.

1, 2: anti-SREBP-1-Antikörper, Verdünnung 1:100, 400x, Ösophagus

3, 4, 5: anti-Caveolin-1-Antikörper, Verdünnung 1:50, 200x. 3+4: Ösophagus, 5: Vormagen

Abkürzungen: SE: squamous epithelium; EL, esophageal lumen; BM, basement membrane; SM, submucosa; MP, muscularis propria; CE, columnar epithelium; G, glands; n, negativ; p, positiv.

liegenden Schichten einerseits weit von einer Blutgefäßversorgung entfernt sind und Cholesterin durch Diffusion aufgrund der Größe und der hydrophoben Eigenschaften nicht gut diffundiert, und da andererseits die lumenwärts liegenden Zellen bereits einen deutlich eingeschränkten Stoffwechsel haben oder gar bereits abgestorben sind.

Bei einem postulierten Zusammenhang zwischen der Caveolin-1-Expression und der Aktivität von SREBP-1 ist zu fordern, dass in der basalen Zellschicht auch SREBP-1 exprimiert ist. Diese Annahme wurde mittels Immunhistochemie untersucht (vgl. Prade et al., 2011, Abb. 14). Es zeigt sich, dass tatsächlich im selben Zellkompartiment SREBP-1 und Caveolin-1 nachzuweisen ist. Damit ist ein funktioneller Zusammenhang möglich.

Stimulation des MAPKK-MAP-Erk-Signalwegs durch CDCA

Wie bereits durch Brady (Brady et al., 1996) an Ito-Zellen, durch (Qiao, Stratagouleas, & Martinez, 2001) an primären Hepatozyten, sowie in der weiteren Folge auch an Zellen des Colon (Qiao et al., 2001) und schließlich auch an Zelllinien aus einem Barrett-Karzinom (Jaiswal et al., 2006) gezeigt werden konnte, stimulieren Gallensalze und darunter insbesondere CDCA den P-Erk-Signalweg. Erk wird im Zuge der Signalkaskade von MAPKK über MAPK phosphoryliert und damit aktiviert. Mittlerweile besteht weitgehend Konsens, dass diese Stimulation weder auf einer Form der Verschränkung von Signalwegen (receptor crosstalk) noch auf einer physiologischen Bindung von CDCA an den Epidermal Growth Factor (EGF) Rezeptor beruht. CDCA aktiviert zwar den Rezeptor direkt, aber nicht an seiner EGF-Bindungsstelle, sondern an einem anderen Epitop. Dies ist aber für die weitere Betrachtung der klinischen Relevanz nicht allzu bemerkenswert. Unabhängig von der Art der Aktivierung führt die Einwirkung unkonjugierter Gallensäuren auf das Epithel zu einer Aktivierung der Proliferation und des Überlebens. Es konnte in vielen Publikationen gezeigt werden, dass die Überstimulation von Proliferations- und Überlebensfaktoren ein Schritt in der Entwicklung eines Karzinoms ist.

Die Aktivierung des Phospho-Erk-Signalwegs konnte reproduziert werden. Die Abbildung 15a zeigt den eingeleseenen Immunfluoreszenz-Western-Blot der Untersuchung der schnellen Signalwege in den

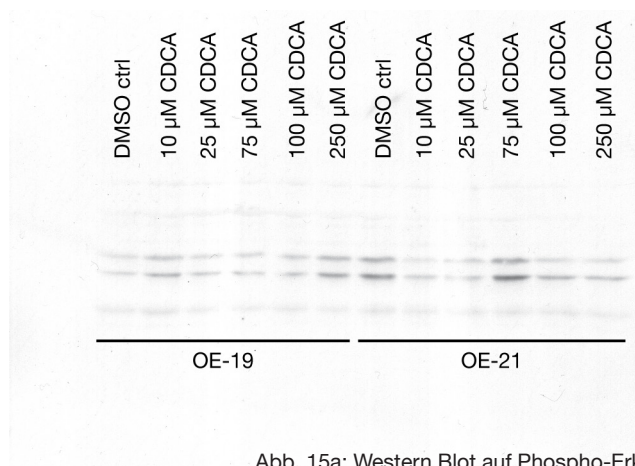


Abb. 15a: Western Blot auf Phospho-Erk

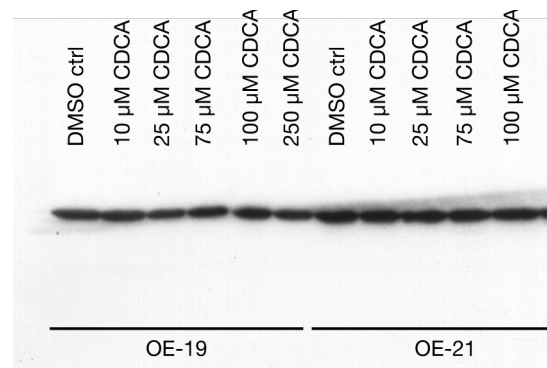


Abb. 15b: Ladekontrolle mit beta-Aktin

Zellreihen OE-19 und OE-21, dessen Durchführung im Abschnitt Material und Methoden dargestellt ist. Primärantikörper war ein vom Kaninchen stammender Antikörper spezifisch gegen phosphoryliertes Erk (P-Erk). Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen Aktivierung des Signalweges und CDCA-Konzentration zu erkennen. Zum Abgleich des Proteingehaltes wurde beta-Aktin auf der Blotmembran nachdetektiert (Abb. 15b). Dieses Ergebnis bestätigt den bereits in mehreren Voruntersuchungen beschriebenen Effekt von Chenodeoxycholsäure auf die Erk-Aktivierung in zwei weiteren Zelllinien.

Prognostische Relevanz der Caveolin-1-Expression im Barrett-Karzinom

Abbildung 13 zeigt eine FastRed-IHC-Färbung eines gesunden Plattenepithels. Caveolin-1 ist in deutlich erkennbaren intrazellulären Einschlusskörpern der Zellen der Basalschicht lokalisiert. Diese Beobachtung konnte an histologischen Schnitten an Speiseröhren der Maus reproduziert werden (s.o., Abb. 17). Voruntersuchungen durch Hung (Hung et al., 2003) wiesen bereits eine stadienspezifische Expression bei humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses nach.

Die Abbildung 18 zeigt exemplarisch Aufnahmen eines Tissue Microarray, angefertigt durch S. Rauser (Institut für Pathologie, TUM/Helmholtz-Zentrum für Gesundheit und Umwelt) verschiedener Differenzierungsstufen von Adenokarzinomen des gastro-ösophagealen Übergangs. Es handelt sich dabei um Resektionspräparate von AEG-Tumoren der Siewert-Klassen 1 und 2. Es ist festzustellen, dass die Expression von Caveolin-1 abhängig vom Differenzierungsgrad zunimmt. Stark dedifferenzierte Tumo-

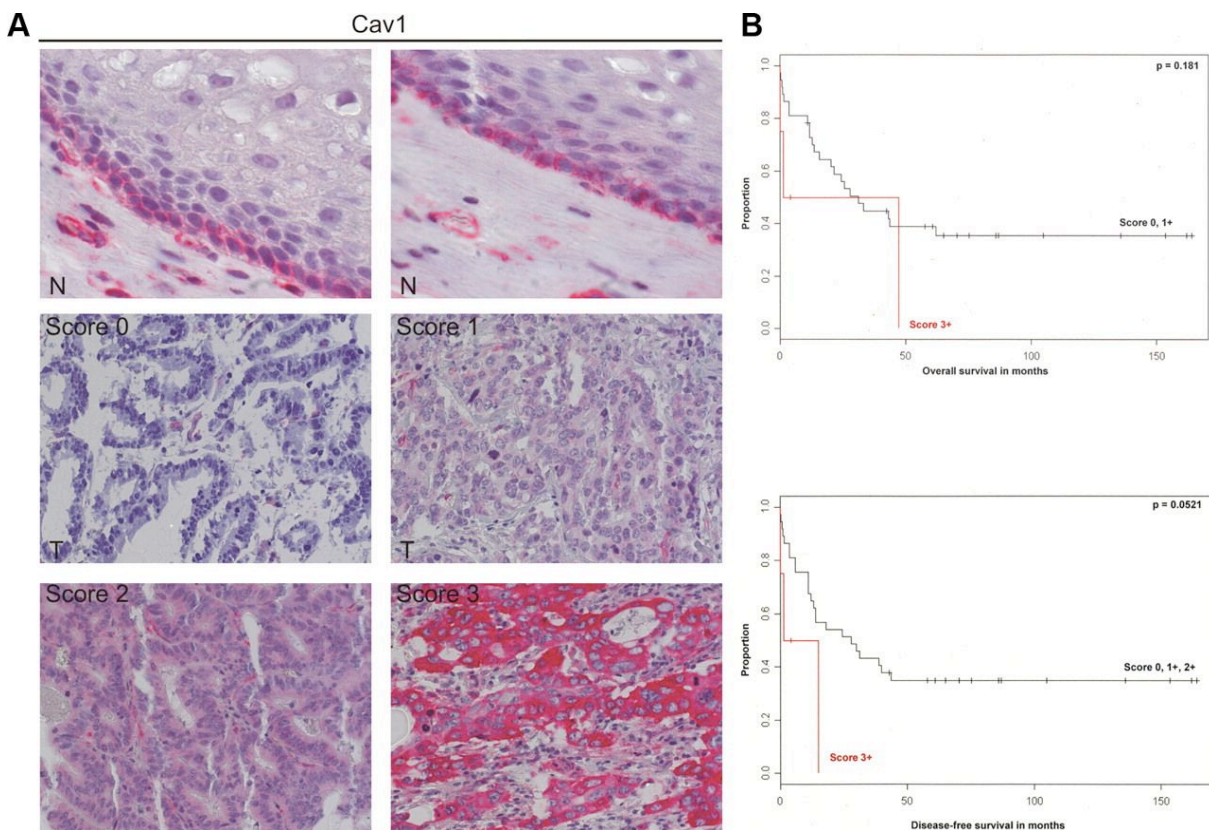


Abb. 16: Exemplarische Mikroskopieaufnahmen aus einem Tissue-Microarray ösophagealer Resektionspräparate. Immunohistochemische Färbung mit FastRed.

Rechte Seite: Kaplan-Meier-Überlebenskurven, getrennt nach den Expressionsstadien 0/1/2 (oben) und 3 (unten).

ren, entsprechend einem histopathologischen Grading G3, zeigen eine deutlich erhöhte Reaktivität gegenüber anti-Caveolin-1-Antikörpern. Zur Anfärbung wurde in dieser Untersuchung ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Caveolin-1 verwendet. Für die statistische Auswertung wurden insgesamt 100 Resektate in Gewebe-Microarrays untersucht. Die große Mehrzahl der Tumorproben wies keine signifikante Erhöhung der Caveolin-1-Färbung auf. Einige wenige Tumoren (n=5) wiesen jedoch stark positive Färbesignale auf. Das verwendete Scoring-System ist in der Abbildung 18 illustriert: 0 steht für ein negatives Färbeergebnis, +1 für ein schwaches, +2 für ein mittelstarkes und +3 für ein starkes Färbesignal. Der Differenzierungsgrad wurde durch einen Experten festgelegt (vgl. (Prade et al., 2012)) In einer Auswertung der Überlebensdaten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Caveolin-Überexpression und Mortalität gezeigt werden. Dies wird in der Abbildung durch die Kaplan-Meier-Kurven für Gesamtüberleben (oben) sowie für das krankheitsfreie Überleben (unten) illustriert (Abbildung aus Prade et al., 2012).

Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da dedifferenzierte Tumoren in der Regel mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergehen. Erwähnenswert ist allerdings, dass Caveolin-1 in den stark dedifferenzierten Tumoren zytoplasmatisch lokalisiert war, in gesundem Plattenepithel aber membranständig ist. Es ist anzunehmen, dass mit dieser veränderten Lokalisation auch die biologische Funktion verändert ist. Caveolin-1 hat keine eigene enzymatische Aktivität und wirkt in vivo in erster Linie als Modulator anderer Signalkaskaden, so dass hier insbesondere die Studien zur diesen Interaktionen an Relevanz gewinnen (Burgermeister & Seger, 2008; Burgermeister, Chuderland, et al., 2007a; Burgermeister, Schmid, et al., 2007b; Tencer, Burgermeister, Ebert, & Liscovitch, 2008).

Negativer Zusammenhang zwischen Caveolin-1-Expression und Gallensalzexposition

Untersuchungen zur Genexpression von Caveolin-1 in vitro

Da die Effekte von Caveolin-1 auf verschiedene Signalkaskaden und ihre Interferenzen bereits Ziel mehrerer Untersuchungen waren, konzentrierte sich die aktuelle Untersuchung auf die Regulation der Expression von Caveolin-1. Des weiteren stand im Fokus dieser Arbeit, einen Signalweg zu beschreiben, der Inhaltsstoffe des gastroösophagealen Refluxes mit genetischen Regulationsmechanismen verbindet. In dieser Hinsicht diente Caveolin-1 als Surrogatparameter.

Die Promotorstruktur und einige funktionelle Zusammenhänge wurden oben bereits ausgeführt. Zur Untersuchung wurden die Gallensalze Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure verwendet, die aufgrund ihrer Häufigkeit (CDCA) und ihrer lipophilen Eigenschaften (DCA) von besonderem Interesse sind. Der Zusammenhang zwischen der Expression von Caveolin-1 und der CDCA-Konzentration wurde bereits an Colonkarzinom-Zelllinien (Akare, Akare, & Martinez, 2005; Feldman & Martinez, 2009; Jean-Louis et al., 2006) untersucht. Dabei wurde eine Induktion der Caveolin-1-Expression ersichtlich.

In unseren Reproduktionsversuchen konnte dieser Effekt auch an OE-19-Zellen nachvollzogen werden. Dies ist in Abbildung 17 (rechts) dargestellt. Der Effekt scheint also zumindest Zellen, die von zylindrischen Epithelien abstammen, gemein zu sein.

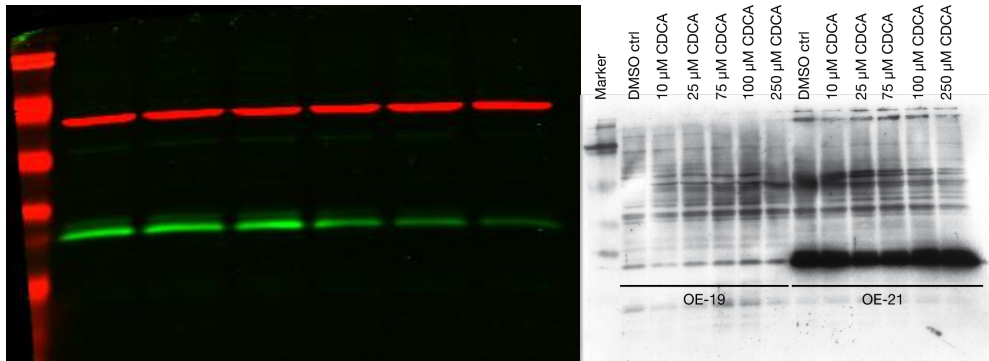


Abb. 17: Dynamik der Caveolin-1-Expression nach Gallensalzexposition

links: Immunfluoreszenz-Western-Blot auf Caveolin-1, Primärantikörper-Verdünnung 1:100 (anti-Caveolin-1, Kaninchen), 1:500 (anti-beta-Aktin, Maus), Sekundärantikörper anti-Kaninchen-IgG/Alexa Fluor 680, Verdünnung 1:20.000 (grün codiert), anti-Maus-IgG/Alexa Fluor 800, Verdünnung 1:20.000 (rot codiert)

rechts: ECL-Western-Blot in Zelllysaten aus OE-19 und -21, Primärantikörper anti-Caveolin-1, Verdünnung 1:100, Sekundärantikörper anti-Maus-IgG, Verdünnung 1:1000 Exposition 20 min

Interessanterweise konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass in OE-21-Zellen keine Induktion, sondern im Gegenteil eine Repression der Expression zu beobachten ist. Dies ist im oben angeführten Western Blot (rechte Bahnen) wegen des stark positiven Signals nicht zu erkennen. Der Versuch wurde als Fluoreszenz-Immunoblot wiederholt. Abbildung 17 (links) zeigt beispielhaft einen Western-Blot mit klar ersichtlicher Verringerung der Caveolin-1-Konzentration – in der Falschfarbendarstellung grün wiedergegeben – im Verhältnis zu β -Aktin. Diese Ladekontrolle wurde mit roter Farbe codiert. Dieses Ergebnis konnte in drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

Auch in der nicht maligne transformierten Zelllinie EPC-htert konnte die Repression von Caveolin-1 in der quantitativen PCR gezeigt werden. Die Abbildungen 18 und 20a zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung für OE-21 und EPC-htert nach jeweils 24-stündiger Exposition.

Die Expression ist nicht allein dosisabhängig. In einer Untersuchung über einen Zeitraum von insgesamt 36 Stunden nahm die Reaktivität im Immunoblot bei EPC-htert-Zellen kontinuierlich ab. Auffallend ist dabei, dass auch das aktive Fragment von SREBP in dieser Zeit abnahm (Abbildung 19).

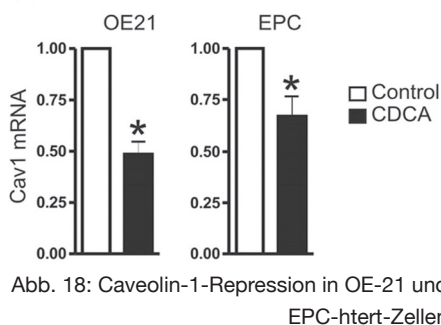


Abb. 18: Caveolin-1-Repression in OE-21 und EPC-htert-Zellen

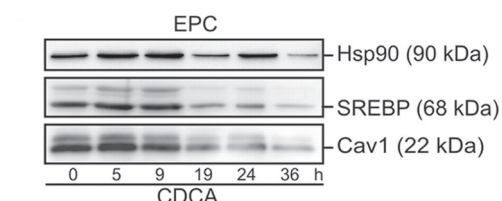


Abb. 19: Cav-1-Repression in OE-21 und EPC-htert

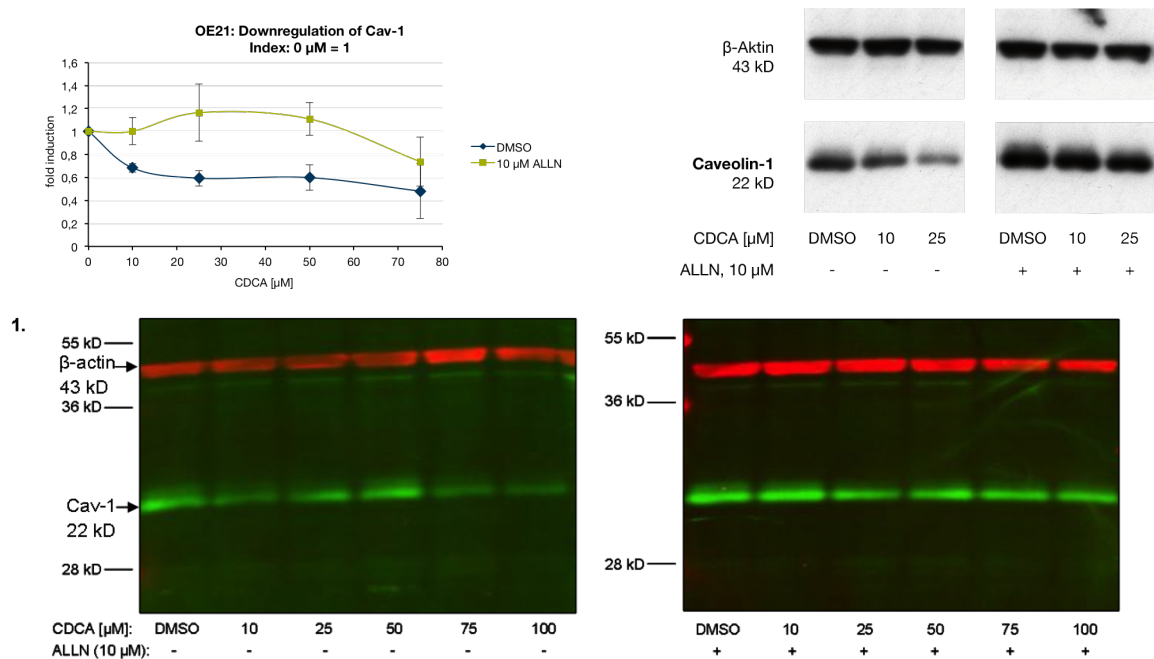


Abb. 20: Caveolin-1-Repression und seine Hemmung mit ALLN. links oben: Cav-1-mRNA in Abhängigkeit der CDCA-Konzentration, rechts oben: ECL-Western-Blot auf Caveolin-1 mit und ohne ALLN, unten: Fluoreszenz-Western-Blot zur Ergänzung

Caveolin-Expression und CDCA-Exposition in vivo

In der Arbeitsgruppe Prof. Ebert wurden durch Xiang Xianbing (unpublizierte Daten) in-vivo-Expositionsversuche an Mäusen durchgeführt. CDCA wurde dabei dem Futter zugesetzt. Gemessen wurde die Expression von Caveolin-1 in den Speiseröhren von Mäusen. Eine erste Auswertung ergab, dass auch in vivo die Expression von Caveolin-1 im Trend zurückging (Abb. 13c). Eine Quantifizierung der Caveolin-1-Expression auf Proteinebene gelang im Tiermodell nicht.

Interferenz mit dem SREBP-Signalweg

Da Caveolin-1 als wichtiges Gen im Cholesterin-Stoffwechsel über drei postulierte Sterol-regulative Elemente in seinem Promotor verfügt, wurde SREBP-1 als möglicher transaktivierender Faktor identifiziert. Bei einer beobachteten Verringerung der Caveolin-1-Reaktivität im Immunoblot wäre also eine Abnahme des aktiven Fragments von SREBP-1 zu fordern. Der funktionelle Zusammenhang wird theoretisch durch die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Cholesterin und den Gallensalzen gestützt. Die Transkriptionsfaktoren der SREBP-Gruppe gehören zu den zentralen Regulatoren des Cholesterinhaushalts. In der Literatur war ALLN bereits als supraphysiologischer Aktivator des SREBP-Signalwegs beschrieben (Bengochea-Alonso & Ericsson, 2007), so dass diese Substanz diesen beobachteten Effekt abschwächen oder gar umkehren könnte.

Die Expositionsversuche von OE-21-Zellen gegenüber CDCA wurden zunächst mit und ohne ALLN wiederholt. Die Abbildung 20 zeigt den Verlauf der Signalstärke im Fluoreszenz-Immunoblot von Caveolin-1 über einen CDCA-Konzentrationsgradienten von 0 bis 75 µM. Dabei nimmt, wie bereits im initialen Fluoreszenz-Immunoblot gezeigt, ohne ALLN-Zugabe die Expression von Caveolin-1 ab (blauer

Graph). Unter Einfluss von ALLN ist dieser Repressionseffekt nicht zu beobachten (grüner Graph). Dieses Ergebnis ist auch im Fluoreszenzimmunoblot sowie im ECL-Western-Blot visuell nachvollziehbar. In der quantitativen statistischen Auswertung sind die Veränderungen signifikant, bei einem alpha-Fehler von 5%.

Auf Ebene der SREBP-Aktivierung lässt sich feststellen, dass die Exposition gegenüber Gallensalzen die Freisetzung des aktiven Fragments von SREBP verringert. Die Auswertung der Immunoblots ist wegen unspezifischer Antikörperreaktionen aufwändig, die Quantifizierung im Fluoreszenz-Immunoblot ist in Abbildung 21a zu sehen, der entsprechende ECL-Immunoblot in Abbildung 21b.

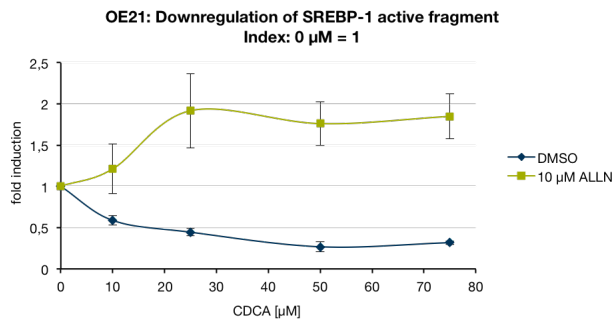


Abb. 21a: Quantifizierung des aktiven SREBP-1-Fragments in Abhängigkeit der CDCA-Konzentration

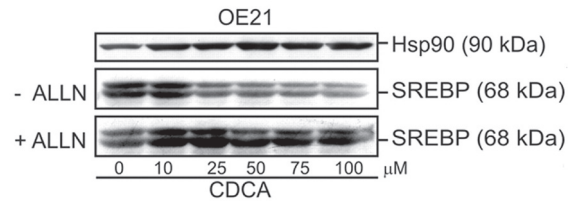


Abb. 21b: ECL-Western-Blot des aktiven SREBP-Fragments in Abhängigkeit von ALLN

Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass das aktive Fragment von SREBP-1 und die Caveolin-1-Expression bei Exposition gegenüber Gallensäuren, im untersuchten Fall gegenüber CDCA, gleichsinnig verlaufen. Eine funktionelle Interaktion ist angesichts der physiologischen Funktion von Caveolin-1 und der Promotorstruktur möglich.

Funktionelle Promotoranalyse

Um den Einfluss von Gallensalzen auf den Promotor von Caveolin-1 selbst messen zu können, wurde ein etwa 1000 bp umfassendes Fragment des Promotors in ein Luciferase-Reporterplasmid kloniert und in HEK293-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden dann entsprechend der Versuchen mit OE19- und OE21-Zellen mit Gallensalzen stimuliert und anschließend in einem Luminometer ausgelesen. Die Aktivität des Caveolin-1-Promotors verhielt sich in diesen Versuchen reziprok zur Gallensalzkonzentration. Es ließen sich sogar, wenn auch nicht auf statistisch signifikantem Niveau, leichte Unterschiede zwischen den einzelnen verwendeten Gallensalzen erkennen. Abbildung 22 zeigt die kumulierten

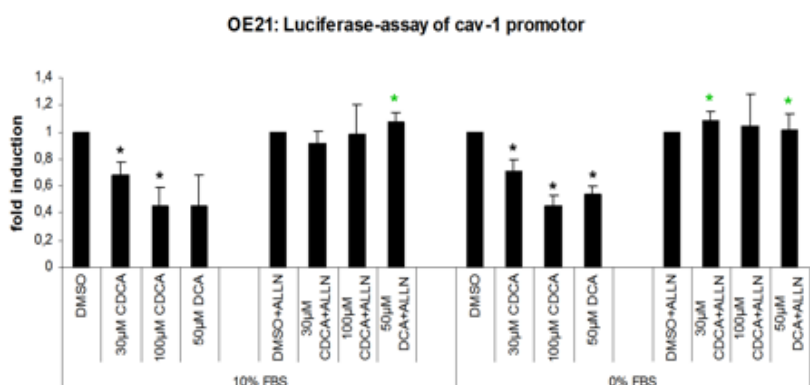


Abb. 22: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von FBS, CDCA und ALLN

Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Assays in OE21-Zellen.

Damit ist festzuhalten, dass die Exposition gegenüber Gallensäuren über den Caveolin-1-Promotor zu einer Beeinflussung der Expression des Zielgens führt. Dieser Effekt ist in HEK-293-Zellen gleichsinnig wie in OE-21-Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Repression tatsächlich durch SREBP-1 vermittelt wird, das an den Promotor bindet, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation an OE-21-Zellen durchgeführt. Die Untersuchung wurde wie zuvor mit einer ALLN-Kontrolle zur Überaktivierung des Signalwegs durchgeführt. Abb. 23a zeigt das relative Cav-1-DNA-Niveau in Abhängigkeit von CDCA jeweils mit und – als Negativkontrolle – ohne anti-SREBP-Antikörper. Testbedingt ist das Signal in der quantitativen PCR stärker, wenn mehr Transkriptionsfaktor an die Promotorabschnitte bindet. Die DNA kann – ebenfalls prinzipbedingt – nur dann in einer relevanten Menge nachgewiesen werden, wenn Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor hinzugegeben wurden, da alle nicht-proteingebundenen DNA-Abschnitte im Laufe der Aufreinigung verloren gehen. Das Signalniveau, das durch die rechten beiden Säulen der Abb. 23a dargestellt wird, ist daher als unspezifische Reaktion zu werten.

Abb. 23b illustriert in den Einfluss von ALLN auf die Promotorbindung von SREBP-1. Unter supraphysiologischer Aktivierung des Signalwegs ist erheblich mehr Promotor-DNA nachweisbar. Der Einfluss von CDCA ist hier nicht mehr nachweisbar.

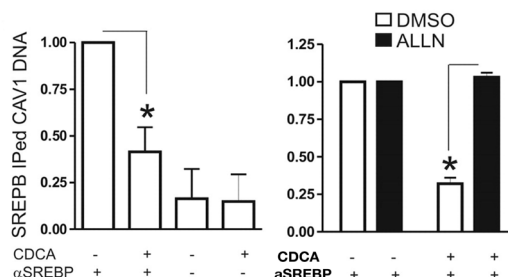


Abb. 23a: Chromatin-IP zur Untersuchung der Bindung von SREBP-1 an den Cav-1-Promotor. Abb. 23b: Einfluss von ALLN auf die SREBP-1-Bindung

Epigenetische Untersuchung

Der Promotor von Caveolin-1 weist einige Cytosin-Guanin-Dinukleotide auf, die zur epigenetischen Regulation der Genexpression methyliert sein können. Insbesondere bei Zelllinien mit sehr geringer Expression kann dieser Mechanismus zum Tragen kommen. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden OE-19-Zellen mit 5-Azacytidin behandelt und anschließend die Caveolin-1-Expression untersucht. Abb. 24 zeigt die beobachteten Veränderungen.

In OE-19-Zellen kann eine demethylierende Behandlung die Expression von Caveolin-1 erhöhen. Damit ist eine epigenetische Repression von Caveolin-1 anzunehmen. Anhand dieser Untersuchung ist aber nicht festzustellen, ob die Demethylierung des Promotors allein zur Reaktivierung der Expression führt. Denkbar ist, dass wichtige Coaktivatoren oder transaktivierende Sequenzen ebenfalls demethyliert werden und damit die Expression steuern.

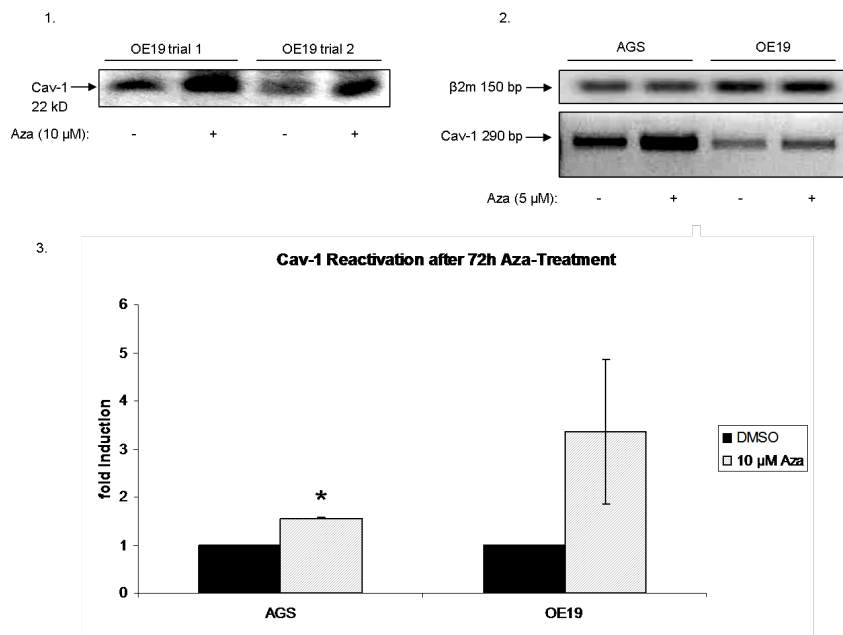


Abb. 24: Hinweise auf die epigenetische Regulation von Cav-1 durch Methylierung des Promotors

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist also gezeigt, dass die mittelfristige Exposition gegenüber Gallensäuren über 30 Stunden zu einer signifikanten, reproduzierbaren Verringerung der Expression von Caveolin-1 führt. Dieser Effekt ist in plattenepithelialen Zellen vom Typ OE-21 und EPC-htert beobachtbar. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich um einen Mechanismus handelt, der zumindest für Plattenepithelien typisch ist. Bei anderen Zelllinien stellt sich dieser Zusammenhang umgekehrt dar (OE-19, AGS), so dass hier möglicherweise ein organspezifischer Effekt vorliegt.

Die Repression von Caveolin-1 ist mit einer Verringerung der Aktivität von SREBP-1 vergesellschaftet. Promotorstrukturanalysen lassen vermuten, dass mindestens ein Teil der Repression auf eine Interaktion von Caveolin-1 und SREBP-1 zurückzuführen ist. Die verringerte Aktivierung von SREBP-1 kann darauf zurückzuführen sein, dass Gallensäuren in den Zellen durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Cholesterin eine Überladung der Zelle mit Cholesterin anzeigen und damit den Steroidhaushalt beeinflussen.

Diskussion

Ergänzende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen zum Einfluss von Gallensäuren auf die Expression von Caveolin-1 und die Aktivität des Signalwegs von SREBP wurden durch Elke Prade weitergehende zellbiologische Untersuchungen durchgeführt (Prade, 2011). Die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit DNA-Abschnitten konnte dabei mittels electrophoretic mobility shift assay (EMSA) erneut bestätigt werden.

Des weiteren wurde mittels Immunfluoreszenz die intrazelluläre Lokalisation von Caveolin-1 und von SREBP untersucht. Wie bereits aus den Voruntersuchungen zu erwarten war, ist in OE-19-Zellen praktisch kein Caveolin-1 anfärbbar. OE-21-Zellen zeigen dagegen ein sehr deutliches Färbesignal. Interessant ist hierbei, dass Cav-1 insbesondere in zytoplasmatischen Strukturen lokalisiert ist. Dies stellt einen Unterschied zur physiologischen Situation dar, wo das Protein in erster Linie an die Membranen assoziiert erscheint. Die Translokation des aktiven Fragments von SREBP-1 auf dem Zytoplasma in den Kern konnte mittels Sucrose-Gradient-Ultrazentrifugation nachgewiesen werden.

In einer weiteren Versuchsreihe von Isabel Demmer (Demmer, 2010) wurde versucht, die Translokation von SREBP vom Zytoplasma in Richtung Zellkern in HEK293-Zellen mikroskopisch nachzuvollziehen. Dabei war die Anfärbung von SREBP-1 grundsätzlich möglich, die Translokation konnte allerdings optisch nicht nachgewiesen werden.

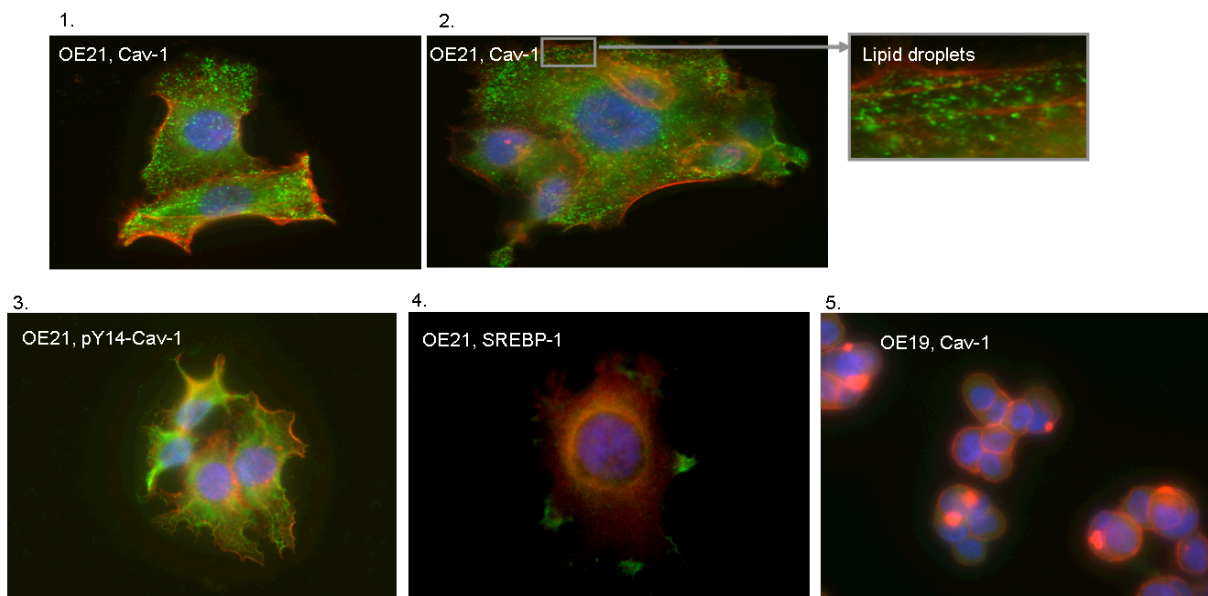


Abb. 25: intrazelluläre Lokalisation von Caveolin-1 in OE-21 und -19-Zellen

Ergebnisse dieser Arbeit

Biologische Unterschiede zwischen OE-21, EPC-htert und HET-1A

Bereits der erste Versuch der hier beschriebenen Untersuchungen erbrachte ein aufschlussreiches Ergebnis. Die in den veröffentlichten Untersuchungen häufig verwendeten Zelllinien OE-21, HET-1A und EPC-htert unterscheiden sich in ihrer Caveolin-1-Expression deutlich. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen am gesunden Plattenepithel des Menschen und der Maus. Die Caveolin-1-Expression ist dort strikt auf das Stratum basale beschränkt. In dieser Schicht sind die adulten Stammzellen lokalisiert, aus denen sich das Plattenepithel regeneriert. Die Zelllinie EPC-htert konnte nach gentechnologischer Aktivierung der humanen Telomerase gewonnen werden. Dies stellt die einzige relevante Veränderung gegenüber der physiologischen Situation dar. Es ist denkbar, dass die hier etablierten Zellen entweder tatsächlich dem Stammzellkompartiment entstammen oder sehr frühe transitamplifizierende Zellen darstellen. HET-1A wurden hingegen durch viralen Gentransfer gewonnen. Es ist einerseits möglich, dass die genetische Veränderung als solche zu einer Suppression geführt hat, oder aber dass hierbei eine Zelllinie etabliert wurde, die nicht aus Zellen der Basalschicht entstammt. Anhand der immunhistochemischen Daten ist ersichtlich, dass bereits in der direkt angrenzenden Zellschicht keine relevante immunhistochemische Reaktivität gegenüber Caveolin-1 besteht.

OE-21 stellt hingegen eine maligne transformierte Zelllinie dar. Der ursprünglichen Charakterisierung ist zu entnehmen, dass sie einem mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinom entstammt. Wie oben ausgeführt ist in epidemiologischen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der Caveolin-1-Expression und dem Differenzierungsgrad in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches beschrieben worden. Es ist möglich, dass das Ursprungsgewebe der OE-21-Zelllinie tatsächlich entdifferenzierter war als ursprünglich angegeben.

Anhand dieser Überlegungen ist die von Prof. Opitz in Freiburg etablierte Zelllinie EPC-hTert aufgrund der minimalen Abweichungen von der physiologischen Situation bei Studien zur Biologie des Plattenepithels des Ösophagus zu bevorzugen. Komplexe, dreidimensionale organotypische Zellkultursysteme tragen dem Rechnung: hier wird bevorzugt diese Zelllinie eingesetzt (Kalabis et al., 2012).

Beeinflussung der Cholesterinregulation durch Gallensäuren

Unserer Kenntnis nach ist diese Untersuchung eine der ersten, die eine Interferenz zwischen der kanonischen Regulation des Cholesterinhaushalts und den Gallensäuren belegt. Auf molekularer Ebene kann dies durch ihre strukturelle Verwandtschaft erklärt werden. Zugleich sind Gallensäuren damit einer der wenigen Inhaltsstoffe des duodeno-gastroösophagealen Refluxates, für die spezifische Rezeptorstrukturen mit direkter regulatorischer Wirkung auf die Transkription bekannt sind. Bislang wurde

das nur für Pepsin und Gastrin postuliert. Die beobachteten Effekte sind in einer Konzentration zu beobachten, die weit über der im Blut zu erwartenden Gallensalzkonzentration liegt. Damit ist anzunehmen, dass die beobachteten Effekte nur bei Kontakt mit Galleflüssigkeit selbst oder eben Refluxat zu beobachten sind, andere Körpergewebe aber nicht betroffen werden. Des Weiteren weisen die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass Gallensäuren eine direkte toxische Wirkung auf Zellen haben. Daher ist anzunehmen, dass der Einfluss auf das Epithel multifaktoriell ist: einerseits bedingt die Exposition gegenüber Gallensäuren eine Veränderung der SREBP-abhängig regulierten Gene, andererseits tritt mit zunehmender Konzentration eine chemisch-toxische Gewebsschädigung in den Vordergrund.

Ergänzung des Modells der Pathogenese der Barrett-Metaplasie

Im Kontext mit den jüngsten Forschungsergebnisse im Mausmodell lässt sich nun das bisherige Bild der Entstehung der Barrett-Metaplasie ergänzen: neben der direkten chemisch-toxischen Schädigung des Epithels durch den niedrigen pH-Wert und die hohen Gallensäurekonzentrationen im Refluxat ist die Regenerationsfähigkeit des Plattenepithels eingeschränkt, da der Cholesterinhaushalt durch die Interferenz mit den Gallensäuren beeinträchtigt ist. Gleichzeitig ist zu postulieren – was in der aktuellen Untersuchung allerdings mangels eines geeigneten Zellkulturmodells nicht untersucht werden konnte – das die Zellen der Kardialien weniger anfällig für diese Interferenz sind. Für Magen-Zelllinien scheint die Interferenz tatsächlich zu anderen Effekten zu führen, wie exemplarisch an der Expression von Caveolin-1 in den Zellreihen OE-21 und OE-19 gezeigt werden konnte.

Wenn nun die Zellen der Kardialien durch den Reflux weniger beeinträchtigt sind, können sie die ortsständigen Zellen des distalen Ösophagus verdrängen und dort zu einer Defektheilung führen.

Effekte auf differenzierungsrelevante Transkriptionsfaktoren konnten in der aktuellen Untersuchung nicht sicher reproduziert werden. Daher lassen sich die Ergebnisse dieser Untersuchung eher mit der Theorie einer Defektheilung in Einklang bringen, wenngleich sie nicht als Argument gegen die Transdifferenzierungshypothese herangezogen werden kann. Dies könnte an FXRnull-Mäusen, die mit dem von Quante publizierten IL1 β -Mausmodell gekreuzt werden, genauer untersucht werden. Ersten Ergebnissen zufolge führt die Gallensäurebelastung im IL1 β -Mausmodell zu einer schnelleren Krebsentstehung. Die Kombination mit FXRnull könnte eine Aussage über die möglicherweise protektive Funktion dieses xenobiotischen und zumindest in der Leber sicher differenzierungsrelevanten Transkriptionsfaktors ermöglichen.

Zusammenfassend fügen die hier beschriebenen Versuche dem Verständnis des ersten Schrittes der Metaplasie der Speiseröhre – der epithelialen und subepithelialen Schädigung durch Reflux – einige molekulare Erklärungsmuster hinzu. Neben der in der Literatur gut beschriebenen und ausführlich experimentell untersuchten unspezifischen Schädigung durch den niedrigen pH-Wert, lösungsmittel-ähnliche Eigenschaften der Gallensäuren auf Lipidmembranen und eine oxidative Schädigung der DNA ist anzunehmen, dass auch Interferenzen mit spezifischen Signalkaskaden wie dem SREBP-System

zur Schädigung beitragen.

Terminologie

Ausgehend vom bekannten Wissen über die Erkrankung und den Ergebnissen und Postulaten der hier beschriebenen Versuche kann das Modell der Barrett-Metaplasie detaillierter dargestellt werden. Wegen der in der Einleitung bereits angesprochenen begrifflichen Unschärfe sei dem aber eine kurze Festlegung der Terminologie vorangestellt. Tosh et al. haben in einer ausführlichen Übersichtsarbeit Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Phänomenen zusammengestellt, die in der medizinischen Literatur als Metaplasie beschrieben werden (Tosh & Slack, 2002). Zellen des Knochenmarks wurden bereits als mögliche Ursprungszellen von Skelett- und Herzmuskelzellen, Hepatozyten, endothelialen Zellen, und sogar Purkinje-Neuronen beschrieben. Unklar ist allerdings, ob die ursprüngliche Zelle in all diesen Fällen bereits als vollständig ausdifferenziert bezeichnet werden kann, und ob die verwendeten Reportergene tatsächlich ausreichend spezifisch sind, um nicht im Rahmen einer unspezifischen Expression eine Verfälschung des Ergebnisses zu provozieren.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt ist schon die histopathologische Definition – mit oder ohne Becherzellen – umstritten. Aber auch der Begriff der Metaplasie selbst geht mit mechanistischen Grundannahmen einher: es handelt sich der gebräuchlichsten Definition zufolge um eine erworbene Epithelveränderung. So kann die Metaplasie von einer Heterotopie abgegrenzt werden, die eine vermutlich angeborene Epithelveränderung beschreibt. Diese Definition ist aber nicht allgemein akzeptiert, die Abgrenzung zur Heterotopie ist unscharf (Rosztóczy et al., 2012; Slack & Tosh, 2001).

Wendet man sich den möglichen Ursachen einer erworbenen Veränderung von Geweben zu, muss man wenigstens drei verschiedene Konzepte voneinander abgrenzen. Gut etabliert ist der Begriff der Defektheilung: wie bei einer Narbe wird das ursprünglich vorhandene, beschädigte Gewebe nicht durch denselben Gewebstyp im Rahmen der normalen Regeneration ersetzt. Die Heilung geht von ortsständigen, benachbarten oder eingewanderten Zellen aus und bildet ein Gewebe, das an dieser Stelle normalerweise nicht vorkommt. Dabei bleiben alle beteiligten Zellen ihrer Differenzierung und Determinierung treu. Im Bezug auf die Barrett-Metaplasie unterstützen insbesondere die jüngsten Studien in transgenen Mausmodellen diese Auffassung (Quante et al., 2012; X. Wang et al., 2011). Verkompliziert wird die Theorie der Defektheilung durch Studien, in denen eine Einwanderung und Ausdifferenzierung von Knochenmarkszellen in intestinale Epithelien postuliert wurde (Houghton et al., 2004). Die Ergebnisse insbesondere der Arbeit von Houghton sind in ihrer Methodik und Interpretation nicht unumstritten und auch nur teilweise reproduziert. Erwiesen sie sich als zutreffend, bestünde allerdings erheblicher Forschungsbedarf, um diesen Mechanismus im Detail nachzuvollziehen.

In der Literatur ist in Abgrenzung zu diesem Konzept die Transdifferenzierung zu finden. Dabei nimmt das ortsständige Gewebe nach einer Schädigung eine andere Differenzierung an. Legt man das derzeitige Verständnis der Stammzellnische und der Differenzierung adulter Gewebe zu Grunde, muss

die Veränderung in epithelialen Stammzellen ablaufen. Alle aus ihnen hervorgehenden Zellen sind dem gegenwärtigen Verständnis folgend erstens strikt auf eine Differenzierung festgelegt (determiniert) und werden zudem nach einigen Teilungen selbst absterben. Veränderten sie nun ihre Differenzierung, wäre die Veränderung nach einem Regenerationszyklus bereits wieder verschwunden. Jüngeren Untersuchungen zufolge könnte diese Annahme allerdings unzutreffend sein; Schwitalla et al. haben in ihren Untersuchungen zur Wnt-Aktivierung in intestinalen Epithelien eine bidirektionale Konversion zwischen Tumor-initiiierenden Zellen und intestinalen Stammzellen gefordert (Schwitalla et al., 2013). Diese Ergebnisse sind bislang nicht sicher reproduziert und beschränken sich auf die Initiation von Krebserkrankungen. Es ist zu diskutieren, ob die Ergebnisse die bislang angenommene irreversible Determinierung von transitamplifizierenden Zellen im Kontext einer nicht-malignen Metaplasie widerlegen.

Neben der Frage, welcher Nische die Metaplasie-initiiierenden Zellen angehören, ist auch die Frage der Plastizität der Stammzellen zu diskutieren. Nimmt man an, dass die Metaplasie tatsächlich eine Transdifferenzierung beinhaltet, folgt daraus direkt, dass zumindest die Gewebstammzellen in ihrer Differenzierung nicht vollständig determiniert sein. Unklar ist dabei, ob diese Veränderungen reversibel oder irreversibel sind.

All diese Begriffe – Defektheilung, Metaplasie, Heterotopie, Transdifferenzierung, Transdeterminierung – werden aber in der Literatur verwendet, ohne sie einer eindeutigen Definition zu unterwerfen. Dies erschwert wie schon bei der klinischen Diagnose der Barrett-Metaplasie den Vergleich, die statistische Analyse und die wissenschaftliche Diskussion. Für die Zukunft ist zu fordern, dass diese begriffliche Beliebigkeit zugunsten einer einheitlichen Terminologie aufgegeben wird.

Mechanismen der epithelialen Schädigung

Epitheliale und subepitheliale Schädigung

Trotz der relativ hohen Prävalenz der Epithelveränderungen im Ösophagus beschränkt sich das Verständnis über die Erkrankung wie oben beschrieben weitgehend auf histomorphologische Beschreibungen und daraus abgeleitete Hypothesen. Ein zugrunde liegender molekularer oder zellbiologischer Mechanismus konnte bislang nicht formuliert werden, insbesondere aufgrund der unklaren Begrifflichkeit: wie oben erwähnt weisen nur etwa zwei Drittel der Patienten mit einer ösophagealen Epithelveränderung eine spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen auf. Es ist möglich, dass hier ein signifikanter systematischer Stichprobenfehler vorliegt: die untersuchten Gene, insbesondere caudal homeobox-related 2 (Cdx-2) und Mucin-2 (Muc-2) sind charakteristisch für Becherzellen, nicht aber für zylindrische Epithelien im Allgemeinen. Da man sich aber erhofft, durch die Genexpressionsanalyse tiefere Einblicke in die Entstehung und der Metaplasie zu gewinnen, ist besondere Sorgfalt bei der Auswahl der Stichprobe und der Datenanalyse nötig. Für eine umfassende Analyse wäre eine Studie sinnvoll, die alle zylindrischen Epithelien genetisch untersucht und die Proben anhand ihres histologi-

schen Bildes genau klassifiziert – also zylindrische intestinale Metaplasie von spezialisierter intestinaler Metaplasie trennt und den Grad der epithelialen Dysplasie genau beschreibt (Quante, in Arbeit).

Unabhängig vom Ursprung des metaplastischen Epithels muss zunächst postuliert werden, dass die Epithelveränderung nicht spontan geschieht, sondern eine Reaktion auf den Rückfluss von Magen- und Duodenalsekret ist. Diese deutlich saure Flüssigkeit enthält neben Pepsin und Gallensäuren eine Reihe weiterer Enzyme und Botenstoffe, die das Epithel des Ösophagus schädigen können. Der erste Schritt in der Entstehung der intestinalen Metaplasie des Ösophagus ist daher eine Schädigung des Epithels. Wie schon ausgeführt beschrieben die bisher bekannten molekularen Mechanismen die mehr oder weniger unspezifische Schädigung von Zellstrukturen. Die Zellmembran wird durch die seifenartigen Eigenschaften der Gallensäuren beschädigt; ein niedriger pH-Wert und auch die Gallensäuren selbst führen zu einer oxidativen Schädigung verschiedener Zellstrukturen einschließlich der DNA. Einzelne Bestandteile der Refluxflüssigkeit aktivieren spezifische Signalwege. Dies betrifft Signalwege intestinaler Hormone, aber auch wie gezeigt den SREBP-SCAP-Signalweg.

Inwiefern neben dem Epithel auch andere Kompartimente durch den Reflux betroffen sind, ist bisher weder in histopathologischen Studien noch im Mausmodell untersucht worden. Insbesondere bei der narbigen Ausheilung mit Strikturen muss aber von einer Beeinträchtigung des subepithelialen Bindegewebes ausgegangen werden.

Unspezifische Schädigung

Jean-Louis et al. publizierten 2006 einen Artikel mit dem Titel „Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations“ (Jean-Louis et al., 2006). Im diesem Artikel wird beschrieben, wie Gallensäuren, vom Körper als potente Detergenzien in den Dünndarm sezerniert, auch auf körpereigene Zellen seifenähnlich wirken und die Membranen direkt schädigen können. Auf diese Weise würden, so die Autoren, intrazelluläre Signalwege aktiviert. Insbesondere Deoxycholsäure scheint hier einen besonderen Effekt zu zeigen.

Der erwähnte Artikel formuliert aber keine nachvollziehbare Hypothese, auf welche Weise differenzierungsrelevante Gene durch eine unspezifische Membranschädigung aktiviert werden können. Man kann aber vermuten, dass die schädigenden Einflüsse der Säure und die seifenähnlichen Eigenschaften der Gallensäuren tatsächlich einen unspezifischen membranschädigenden Einfluss haben. Weitere Publikationen erklären den schädigenden Prozess mit der erhöhten Permeabilität für reaktive Sauerstoffspezies und einer daraus folgenden Schädigung intrazellulärer Strukturen, einschließlich der DNA (Dvorak, Payne, et al., 2007b; Jolly, Wild, & Hardie, 2004; 2009; Song, Guha, Liu, Buttar, & Bresalier, 2007). Es gibt also experimentelle Hinweise darauf, dass Reflux tatsächlich eine gewisse Destabilisierung der DNA bewirkt.

Anderen Berichten zufolge gibt es Hinweise auf eine Störung des Golgi-Apparates, was sich an einer veränderten Glykosylierung und Fucosylierung verschiedener Glykoproteine nachweisen ließ. Dieser Effekt wurde von Byrne und Kollegen als Golgi-Fragmentierung beschrieben, die vor allem durch

DCA hervorgerufen wurde (Byrne, Sharma, Duggan, Kelleher, & Long, 2012).

In Zellkulturversuchen konnte außerdem mehrfach nachgewiesen werden, dass Gallensäuren den nuclear factor kappa B (nfkB) aktivieren – ein zentraler Schritt bei entzündlichen Reaktionen (Quante & Wang, 2008). Das Tiermodell von Quante (2012) rekapituliert diesen Weg, indem ein artifizieller IL1 β -Rezeptoragonist im Epithel der Speiseröhre überexprimiert wird. Die Krebsentstehung auf dem Boden entzündlicher Prozesse ist in der Literatur gut beschrieben und in der Inflammation-Karzinom-Sequenz zusammengefasst (Karin & Greten, 2005).

Unspezifische Signaltransduktionseffekte von Gallensäuren

Eine Reihe von Signalkaskaden werden durch Gallensalze beeinflusst, obgleich sie bisher anderen funktionellen Liganden zugeordnet waren. Gallensäuren und ihre Salze wirken dabei auf verschiedenen Ebenen meist als bislang unbekannte Liganden an Rezeptorstrukturen ein.

Einer der ersten beschriebenen Effekte von Gallensäuren auf epitheliale Zellen ist die Aktivierung des Phospho-Erk-Signalwegs durch unspezifische Bindung an den epidermal growth factor receptor (EGFR). Dieser Effekt scheint bei konjugierten Gallensalzen deutlicher zu sein als bei ihren dekonjugierten Derivaten. Die Beobachtung ist wie in den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen gut reproduzierbar, auf molekularer Ebene aber nicht vollständig aufgeklärt (Jaiswal et al., 2006). Auch der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg scheint aktiviert zu werden (Jaiswal et al., 2004). Die PI-3-K/Akt-Aktivierung ist Andl zufolge Folge der EGFR-Aktivierung (Andl et al., 2003). Beide Signalwege sind wegen ihrer pro-proliferativen und anti-apoptotischen Effekte relevante Systeme, ihre Effekte sind aber äußerst vielfältig und nicht besonders spezifisch, insbesondere nicht im Hinblick auf die Determination oder Differenzierung von Zellen. Die Zusammenhänge sind möglicherweise recht komplex, da in nicht-ösophagealen Zellkultursystemen der EGFR-Signalweg funktionell auch mit CD95 und damit pro-apoptotischen Signalwegen verknüpft zu sein scheint. Dies geschieht über eine Yes-abhängige EGFR-Aktivierung (Reinehr, Becker, Wettstein, & Häussinger, 2004; Sommerfeld, Reinehr, & Häussinger, 2009).

Giorgio und Kollegen konnten in vitro Hinweise auf eine reversible und kompetitive Bindung von Lithocholsäure an den EphA2-Rezeptor finden. Diese Interaktion hat auch Auswirkungen auf nachgelagerte Signalkaskaden. Dabei spielt offenbar eine hochkonservierte Region der Eph-Rezeptorfamilie eine wichtige Rolle (Giorgio et al., 2011). Diese Untersuchungen wurden allerdings bisher nicht in vivo nachvollzogen und zudem lediglich an Zelllinien durchgeführt, die dem Colon entstammen; die Aktivität des Eph-ephrin-Systems in der Barrett-Metaplasie ist bisher auch nicht sicher beschrieben. Daher ist die Aussagekraft für die Barrett-Metaplasie eingeschränkt. Die Ergebnisse sind aber möglicherweise von einer gewissen Relevanz, weil das Eph-ephrin-System eines der wichtigen regulativen Systeme der Regeneration intestinaler Epithelien darstellt. Damit könnte dieses System ein wichtiger Baustein sein, um die Defektheilungshypothese der Barrett-Metaplasie auf molekularer Ebene zu unterfüttern.

Signaltransduktionseffekte spezifischer Gallensalzrezeptoren

Von den bekannten Rezeptoren für Gallensäuren sind mindestens Insig und FXR (Capello et al., 2008; de Gottardi et al., 2006) im Plattenepithel des Ösophagus exprimiert. Insig ist wie oben beschrieben eng mit der Regulation des Steroid- und Cholesteralhaushalts der Zelle verknüpft; die Rolle von FXR ist vor allem im Ösophagus bislang nicht vollständig aufgeklärt. Einzelne Berichte führen eine Rolle von GpBAR1 (syn: TGR-5) an.

Hong et al. fanden in ihren Experimenten eine funktionelle Verbindung zwischen GpBAR1 und NOX5S: Die Expression von NOX5-S und damit zusammenhängend die Produktion von H₂O₂ war in ihren Versuchen abhängig von der Dosis an Taurin-DCA. Wurde GpBAR1 nun siRNA-vermittelt supprimiert, so sank auch die Expression von NOX5-S und die H₂O₂-Produktion ab (Hong et al., 2009). Die Gruppe führte die Untersuchungen an FLO- und BAR-T-Zellen ausschließlich *in vitro* durch; die Expression von GpBAR1 konnte allerdings in unseren Versuchen an den Zelllinien CP-C, EPC-hTert, OE-19, OE-21 und OE-33 nicht reproduziert werden, so dass der von Hong et al. beschriebene Effekt zwar möglicherweise *in vivo* vorhanden ist, aber wahrscheinlich noch weitere Effekte angenommen werden müssen.

Es ist unklar, ob Gallensalze mit ihrer Bindung an Oxysterol-Rezeptoren das Epithel direkt schädigen können. Die oben beschriebenen Versuche lassen den Schluss zu, dass Gallensalze wie Oxysterole wirken können und damit auch die entsprechenden Signalwege aktivieren können. Anhand der Expression von SREBP-Zielgenen, anhand von Bindungsanalysen von Transkriptionsfaktoren an Promotorsequenzen und anhand von Reporter-Konstrukten ist dies *in vitro* nachvollziehbar. Es gibt allerdings nur einen einzigen Bericht über ein *in-vivo*-Modell einer intestinalen Metaplasie, das ausschließlich auf einer hohen Gallensalzzufuhr beruht (Dvorak, Guy, et al., 2007a). Dieses Modell wurde jedoch lediglich als Kongressplakat veröffentlicht; bislang wurde noch keine Reproduktion publiziert.

Die Rolle der xenobiotischen nukleären Rezeptoren ist wie erwähnt Gegenstand der Forschung. De Gottardi et al. sowie Demars et al. beschreiben, dass eine FXR-Aktivierung durch Guggulsteron oder 6 α -Ethyl-CDCA Apoptose induziert (de Gottardi et al., 2006; Demars, Buttar, Anderson, Papenfuss, & Wang, 2007). Die Kreuzung von IL1 β RA-Tieren mit FXR-defizienten Tieren könnte interessante Einblicke in die Homöostase der Gewebe bei chronischer Entzündung geben, insbesondere bei Belastung mit Gallensäuren.

Bislang konnte keiner dieser Rezeptoren funktionell mit der Barrett-Metaplasie oder einer ihrer vermuteten zentralen Gene in Zusammenhang gebracht werden, es existieren zu dieser Fragestellung bislang auch keine Tiermodelle.

Legt man die Theorie der direkten Umdifferenzierung zu Grunde, muss allerdings ein hochspezifischer differenzierungsrelevanter Signalweg existieren, der nach der Schädigung des Epithels die Umdifferenzierung auslösen könnte. Die Tatsache allein, dass bislang zumindest kein solcher Signalweg gefunden werden konnte, stellt einen zentralen Schwachpunkt der Umdifferenzierungstheorie dar. Die Befunde sind allerdings bis zu einem gewissen Grad mit der Theorie der Defektheilung in Einklang zu

bringen. Diese Gewebe haben bereits die richtige Differenzierung und müssen zur Ausheilung der Defekte lediglich expandieren.

Effekte anderer Hormone und Signalmoleküle

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird ein hoher Spiegel an Gastrin als Risikofaktor für die Barrett-Metaplasie angesehen. Dies beruht in erster Linie auf klinischen Korrelationsanalysen; funktionelle Analysen *in vitro* oder im Tiermodell sind bisher selten. Metaplastisches Epithel exprimiert den Cholecystokinin-2-Rezeptor um fast zwei Größenordnungen stärker als normales Plattenepithel. Es ist möglich, dass einzelne Einflussfaktoren in der Refluxflüssigkeit zu einer lokalen Gastrin-Expression führen, so dass dann die Zellen über autokrine und parakrine Wege beeinflusst werden. Die Hypothese einer autokrinen Gastrin-Wirkung ist unter anderem durch die Ergebnisse zweier Untersuchungen von Kochman und DeValle sowie Singh und Xu gestützt worden (Kochman, DeValle, Dickinson, & Boland, 1992; Singh et al., 1994): beide Gruppen beschrieben eine deutliche Überexpression von Gastrin-Vorläuferformen in colorektalen Krebszellen. Transgene Mäuse, die Gastrin überexprimieren, zeigen ebenfalls eine erhöhte CCK-2-Expression. Wird auch dieser Rezeptor inaktiviert, reduziert sich die Zahl intestinaler Stammzellen und Kryptenspaltungen (Jin et al., 2009). Zumindest im Kolon scheint also die Gastrin-CCK-2-Signalkaskade einen wichtigen Stellenwert zu haben. Es ist jedoch unklar, inwiefern diese Untersuchungen auch auf die Epithelzellen der Kardia und des gesunden und metaplastischen Ösophagus übertragen werden können.

Veränderung des mikrobiellen Milieus

Yang et al. zeigten, dass beim Barrett-Ösophagus neben den oben ausführlich beschriebenen Veränderungen im Bereich der Genexpression auch die Mikroflora im Ösophagus deutlich verändert ist. Statt der üblicherweise auf Plattenepithelien vorkommenden *Streptococcus* spp. sind in der Mehrzahl der Fälle einer Ösophagitis oder einer Barrett-Metaplasie anaerobe Bakterienspezies ähnlich der im unteren Gastrointestinaltrakt zu finden (Pei et al., 2005; L. Yang et al., 2009). Ob diese Veränderung nun Ursache oder Konsequenz der Metaplasie ist, bleibt derzeit Gegenstand der Diskussion. Die klinische Relevanz dieser Untersuchungen fußt auf der Beobachtung, dass eine Eradikationstherapie von *H. pylori* mit einem geringgradig erhöhten Risiko für ein Barrett-Adenokarzinom vergesellschaftet ist. Auch hier ist der funktionelle Zusammenhang bislang unklar.

Reparaturmechanismen

Im Anschluss an die epitheliale Schädigung beginnt die Heilungsphase. In den meisten Fällen regeneriert dabei das Plattenepithel, in einigen Fällen entsteht eine zylindrische Metaplasie mit oder ohne Becherzellen. Narben und Strikturen bilden sich nur selten. Es ist möglich, dass das Ausmaß und die Dauer der Schädigung einen Einfluss auf den Heilungserfolg hat. Es ist anzunehmen, dass die Refluxflüssigkeit nicht allein das Epithel schädigt, sondern auch die Regeneration des ortsständigen Epithels in seiner typischen Differenzierung erschwert. Damit wäre für benachbarte Zelltypen, die von

der Refluxflüssigkeit nicht beeinträchtigt sind, eine neue Nische geschaffen.

Es wäre also angesichts der bekannten Daten zu fordern, dass kurzfristige und auf zellulärer Ebene nur geringgradig schädigende Refluxepisoden eine vollständige Regeneration des Plattenepithels ermöglichen. Eine längerdauernde, gering- bis mäßiggradige Schädigung würde einerseits das Epithel direkt schädigen, aber auch die Regeneration des Plattenepithels behindern, so dass von den Kardiazellen eine Defektheilung im Sinne einer zylindrischen Metaplasie ausgehen kann. Ist die Refluxschädigung so massiv, dass das Epithel lokal zerstört wird und die Regenerationskapazität der Kardiazellen erschöpft ist, kommt es zu einer narbigen Defektheilung mit Strikturen.

Es muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar bleiben, ob Becherzellen für die Klassifikation und Prognose der Metaplasie relevant sind. Diesbezüglich sind die Ergebnisse der Tiermodell-Studien zur Notch-Aktivierung in der zylindrischen Metaplasie des gastroösophagealen Übergangs sowie der BarrettNet-Studie im Menschen abzuwarten (Höhl und Quante, jeweils in Arbeit).

Lineage Tracing

Einen wichtigen Hinweis könnten Lineage-Tracing-Versuche in Barrett-Tiermodellen liefern. In diesen Versuchen wird eine vererbte Veränderung selektiv in eine bestimmte Zellpopulation eingebracht. Alle Zellen, die nach einer gewissen Beobachtungszeit dieses Merkmal tragen, stammen also von derselben Zellpopulation ab. Gegenwärtig werden in erster Linie genetische Modifikationen verwendet, die zeit- und zellspezifische Markierungen von einzelnen Zellpopulationen erlauben. Eines der am häufigsten verwendeten Konstrukte ist das Cre-loxP-System in Verbindung mit einer durch das LacZ-Gen codierten beta-Galaktosidase. Hierbei wird eine Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase durch homologe Rekombination unter die Kontrolle eines gewebs- oder sogar zellpopulationsspezifischen Promotor (z.B. Lgr5) gebracht und damit in vivo idealerweise ausschließlich in diesen Zellen exprimiert. Das LacZ-Konstrukt steht in der Regel unter der Kontrolle des Rosa26-Promotors. Der Rosa26-Locus ist ubiquitär aktiv, ein Genprodukt ist nicht bekannt (Soriano, 1999). Daher ist auch ein homozygoter Knockout möglich. Die für die beta-Galaktosidase kodierende Sequenz liegt hinter einem loxP-flankierten poly-A-Signal, das als Transkriptionsstoppsignal dient. Daher ist ohne Cre-vermittelte Rekombination keine Expression des LacZ-Gen möglich. Erst nach Induktion mit Tamoxifen wird Cre aktiviert und das poly-A-Segment aus dem Rosa26-Locus entfernt. Die beta-Galaktosidase wird exprimiert und führt in einer speziellen Färbetechnik zu einer intensiven Blaufärbung. Die Entfernung des Stop-Codons ist dabei vererbbar auf alle Nachkommen der betreffenden Zelle. Die aus der einzelnen rekombinierten Zelle hervorgegangenen Nachkommen sind demnach in der Färbung ebenfalls blau gefärbt.

Wenn die Metaplasie von einem Stammzellkompartiment in der Kardiazelle ausgeht, dann sollten diese Versuche Tochterzellen dieser Stammzellen in der Metaplasie nachweisen können. Studien von Quante und Wang haben zumindest im Mausmodell diese Vorstellung untermauert (Quante et al., 2012). Eine Reproduktion der Tierversuchsergebnisse im Menschen ist aus methodischen Gründen – es müssen

Zellen in ihrer DNA verändert werden – nicht in vergleichbarer Art und Weise möglich. Es ist allerdings denkbar, spezifische Spontanmutationen im metaplastischen Gewebe, die nicht auch parallel im Plattenepithel bestehen, an verschiedenen Stellen der Barrett-Metaplasie nachzuweisen sind. Wenngleich dieser Biopsie- oder Resektat-basierte Ansatz methodologisch nicht denselben Evidenzgrad eines strikten Lineage-Tracing-Experiments hat, so wären doch prinzipiell Hinweise auf eine Klonalität der Metaplasie im Menschen gefunden.

Tiermodell der Barrett-Metaplasie

Tiermodelle der Barrett-Metaplasie – Ausblick

„Animals clearly do not smoke, consume alcohol, or laze around eating fatty diets, so it is difficult to address the comorbid factors involved in human cancer.“ Mit diesem Satz leiten Attwood et al. ihre Gedanken zu Tiermodellen der intestinalen Metaplasie ein (Attwood et al., 2008) und beschreiben plastisch, welche Beschränkungen ein Tiermodell dieser Erkrankung hat. Die Barrett-Metaplasie und das Adenokarzinom sind eine komplexe Krankheitsentität, zu deren Entstehung sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse beitragen. Gerade die Umwelteinflüsse sind aber im Tiermodell nur unter artifiziellen Bedingungen herzustellen.

Da in mehreren Untersuchungen in transgenen Tiermodellen eine ektopische Cdx-2-Aktivierung im Plattenepithel allein nicht zur Entstehung einer Barrett-Metaplasie geführt hat, muss davon ausgegangen werden, dass entweder mindestens ein weiterer Faktor an der Epithelveränderung beteiligt ist oder die Metaplasie nicht vom Plattenepithel ausgeht. Ein zweiter Faktor ist bisher nicht identifiziert. Diskutiert wird neben einer Funktionsveränderung des Bone morphogenetic protein 4 auch ein verändertes Mikromilieu in der Stammzellnische sowie ein erhöhter Gastrin-Einfluss. Grundsätzlich muss aber bei allen weiteren Untersuchungen verstärkt die Möglichkeit ins Auge gefasst werden, dass die Metaplasie eine von der Kardia ausgehende Defektheilung darstellt und daher endogene Modelle eher dort ansetzen müssen. Wenigstens im Rückblick bleibt festzustellen, dass Cdx-2 als Ziel der genetischen Modifikation wahrscheinlich ungeeignet ist: es handelt sich um einen zentralen Differenzierungsfaktor spezialisierter intestinaler Epithelien, insbesondere von Becherzellen. Wahrscheinlich ist die spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen aber nur ein Sonderfall der Barrett-Metaplasie. Unbekannt ist auch, welcher Phänotyp in der Entstehung zuerst auftritt.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben sind mindestens acht verschiedene chirurgische Modelle etabliert, die alle eine Reflux-Situation zu simulieren versuchen. Die Autoren teilen diese acht Modelle wiederum in drei Gruppen ein: jene, die lediglich eine Entzündung des Ösophagus hervorrufen, jene, die eine Ösophagitis mit Barrett-Metaplasie, aber kein Adenokarzinom des Ösophagus provozieren, und schließlich jene, die alle Stufen bis hin zum Karzinom reproduzieren. Zur ersten Gruppe zählen

Attwood et al. eine Ligatur des Pylorus, eine Ösophagogastroplastie nach Wendel, und die externe Perfusion der Speiseröhre. In die zweite Gruppe fallen die totale Gastrektomie, die Mukosaexzision und die chirurgische Anlage einer axialen Hiatushernie. Die dritte Gruppe schließlich beinhaltet die Ösophagojejunostomie sowie die Anlage einer ösophagoduodenalen oder ösophagogastroduodenalen Anastomose (Attwood et al., 2008).

Aus diesen Tiermodellen wurde der Verdacht abgeleitet, dass insbesondere Reflux aus dem Duodenum zur malignen Progression führt. Dies ist aber auf nicht-chirurgischem Weg schwer zu simulieren.

Bislang vor kurzem sind so alle Versuche, ein nicht-chirurgisches Tiermodell einer Barrett-Metaplasie zu entwickeln, ohne Erfolg geblieben. Der erste Bericht eines endogenen Tiermodells, ein p63null-Modell, wurde von Wang und Kollegen erst im Jahr 2011 publiziert (X. Wang et al., 2011). Dem Team um Dr. Timothy C. Wang am Columbia University Medical Center in New York gelang es, eine transgene Maus zu generieren, bei der ein Interleukin-1-Rezeptoragonist unter dem EBV-Promotor steht. Diese Mäuse entwickeln eine Entzündung am ösophagogastralen Übergang, die bei einigen Tieren von einer spezialisierten intestinalen Metaplasie begleitet wurde. Bei einigen wenigen Mäusen konnte sogar ein Adenokarzinom festgestellt werden. Die Ergebnisse wurden Anfang 2012 publiziert.

Da IL-1beta lediglich zu einer unspezifischen Entzündung führt und auch das p63null-Modell lediglich Plattenepithelien im Allgemeinen schädigt, sind Aussagen zum Mechanismus der Metaplasie nicht direkt abzuleiten. Dazu wären Veränderungen nötig, die weniger pleiotope Effekte aufweisen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Entzündung deutlich stärker ausfiel, wenn Gallensalze im Trinkwasser aufgelöst wurden. Beide Mausmodelle geben aber wichtige Hinweise zum zugrundeliegenden Mechanismus. Die p63null-Maus ist der erste Beleg dafür, dass eine Zellpopulation besteht, von der eine Metaplasie im Sinne einer Defektheilung ausgehen kann, ohne dass grundlegende Dogmen der Stammzeldeterminierung in Frage gestellt werden müssen.

Ausgehend von der beim Menschen beobachteten Pathophysiologie scheint das IL1 β -Modell etwas realitätstreuer zu sein, da eine vollständig nicht-entzündliche Schädigung des Plattenepithels beim Menschen nicht beschrieben wurde. Das p63-Modell ist aber aufgrund einzelner zellkulturbasierter Versuche durchaus relevant: sollte sich bestätigen, dass p63 tatsächlich durch Gallensäuren reprimiert wird wie von Roman et al. (Roman et al., 2007) beschrieben, dann ist von einem funktionellen Zusammenhang zwischen Gallensalzeinfluss und direkter Schädigung der Reifung von Plattenepithelien auszugehen.

Da der wichtigste Risikofaktor, der gastroösophageale Reflux, durch transgene Modelle nicht zu modellieren ist und das Wissen über die molekularen Mechanismen immer noch begrenzt sind, bleibt die Entwicklung und Verbesserung der endogenen Tiermodelle auch weiterhin herausfordernd. Auf Basis der bislang beschriebenen Mechanismen kommen jedoch einige Signalwege in Betracht, deren gezielte Modifikation zum Erfolg führen könnte. Gezielte Kreuzungsversuche könnten zudem dazu beitragen, die Kontroverse um die Herkunft des metaplastischen Epithels zu lösen.

Um die Barrett-Metaplasie und ihre Progression zum Adenokarzinom im Tiermodell noch präziser modellieren zu können, sind weitere zentrale genetische Veränderungen zu überprüfen. Menschliche Barrett-Epithelien mit hochgradiger intraepithelialer Dysplasie haben sehr instabile Telomere und neigen daher zu Chromosomenaberrationen. Dies kann im Mausmodell durch mTert-defiziente Tiere nachvollzogen werden. Die Kombination aus dem etablierten pL2-IL1beta-Modell mit der mTertnull-Maus könnte weitere Hinweise auf die genetischen Mechanismen liefern. In diesem Zusammenhang ist aber anzumerken, dass bislang nicht bekannt ist, welche chromosomalen Aberrationen zu onkogenen Genprodukten führen. Um die beim Menschen beobachteten Veränderungen nachvollziehen zu können, ist wahrscheinlich auch eine Verkreuzung mit einer p53-Maus mit ähnlichen genetischen Veränderungen assoziiert.

Andere kombinierte genetische und metabolische Untersuchungen widmen sich dem Einfluss von Gallensäuren im Entzündungsmodell wie auch in FXR-defizienten Mäusen. Dies dient dazu, die Wirkung von Gallensäuren auf die jeweiligen Regelkreise zu erforschen.

Beschränkungen der Arbeit

Diese Arbeit stützt sich in erster Linie auf Zellkulturversuche. Schon aus diesem Grund sind die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Ebene des Gesamtorganismus zu extrapolieren. Des weiteren stammten die verwendeten Zelllinien von menschlichen Krebsgeschwulsten ab. Es ist anzunehmen, dass angesichts der mannigfaltigen genetischen Veränderungen, wie sie insbesondere in Ösophaguskarzinomen vorkommen, die Signaltransduktionmechanismen zum Teil erheblich verändert sind.

Des weiteren besteht die grundsätzliche Problematik, dass die Regulation der Steroidsynthese und des Cholesterinhaushalts bislang hauptsächlich im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen erforscht wurde. Die differenzierungsbezogenen Forschungsprojekte widmeten sich vor allem der Leber und den ableitenden Gallenwegen und zu einem kleinen Teil der intestinalen Metaplasie des Magens. Ein kritischer Abgleich mit vorhandener Literatur ist daher nur eingeschränkt möglich.

Um die genannten Einschränkungen zu umgehen, wären auch transgene Studien im Mausmodell sinnvoll. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die bisher etablierten Mausmodelle aber wenig aussagekräftig, was die konkreten Mechanismen der Metaplasie betrifft. Selbst die beiden bislang publizierten Konstrukte von Quante und Wang stützen sich auf eine unspezifische Schädigung des Epithels.

Leider waren zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine Mausmodelle verfügbar, die über eine bloße Ablation des SREBP-Gens hinausgehen. Erschwerend kommt hinzu, dass SREBP im Genom funktionell redundant angelegt ist und damit selbst ein kompletter Knockout eines möglichen Transkripts keine wesentliche Veränderung des Phänotyps ergibt. So wird beispielsweise die Funktion von SREBP-1c durch die Spleißvariante SREBP-1a und eine erhöhte Expression von SREBP-2 kompensiert (Liang et al., 2002). Die derzeit verfügbaren Mausmodelle mit SREBP-1c-Überexpression sind so

konstruiert, dass sie SREBP konstitutiv überexprimieren (Shimano et al., 1996; Shimomura et al., 1998). Dies stellt einen interessanten Ansatz dar, um die Funktionsweise in Leber und Fettgewebe zu erforschen; für gewebsspezifische Studien ist dieser Ansatz nicht sinnvoll. Zudem lässt sich in diesen Konstrukten nicht beeinflussen, wann die SREBP-Expression verändert werden soll. Dies wäre über eine Cre-loxP-Konstruktion möglich. Dabei müsste zum Knockdown das Gen für SREBP-1 an einer Stelle verändert werden, die zum Funktionsverlust aller drei Spleißvarianten führte. Im entgegengesetzten Fall, der gewebes- und lebensalterabhängigen Überexpression, könnte das Konstrukt von Shimomura in den ROSA26-Locus kloniert werden. Zusammen mit einer Cre-Rekombinase unter einem Ösophagus-spezifischen Promotor, beispielsweise p63 oder EBV-L2, könnte dann die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in vivo untersucht werden.

Abschließende Bemerkungen

Die Barrett-Metaplasie und das Barrett-Karzinom sind seit ihrer Erstbeschreibung Gegenstand emotionaler Diskussionen in der Gastroenterologie und Pathologie. Die Schwierigkeiten in der Beschreibung und Erforschung beginnen in einer unsauberen Terminologie und werden durch eine offensichtlich nicht triviale endoskopische und pathologische Einstufung weiter erschwert. Des Weiteren sind Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle über mehrere medizinische Fachdisziplinen verteilt und damit schwer zu koordinieren. Saubere systematische Analysen sind daher rar. Bis vor kurzem gab es zudem keine sicher reproduzierbaren Tiermodelle. Die genetischen Studien gingen lange Zeit von einem mono- oder oligoklonalen Entstehungsprozess mit einer klar definierbaren Abfolge genetischer Veränderungen auf, was erst in jüngster Zeit widerlegt werden konnte.

Mit den jüngsten, im vorliegenden Werk beschriebenen Entwicklungen könnte es gelingen, die Forschung zur Barrett-Metaplasie und zum Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs neu zu strukturieren. Es gibt sowohl auf histopathologischer Ebene wie auch auf zellphysiologischer Ebene neue Ansatzpunkte zur Charakterisierung des metaplastischen Epithels und zu den relevanten Signaltransduktionsmechanismen. In der Modellierung der Krankheitsentstehung muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass es sich bei der Barrett-Metaplasie am ehesten um einen polyklonalen Prozess handelt.

Literaturverzeichnis

- Abdalla, S. I., Lao-Sirieix, P., Novelli, M. R., Lovat, L. B., Sanderson, I. R., & Fitzgerald, R. C. (2004). Gastrin-induced cyclooxygenase-2 expression in Barrett's carcinogenesis, 10(14), 4784–4792. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0015>
- Akare, S., Akare, S., & Martinez, J. D. (2005). Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1735(1), 59–67. <http://doi.org/10.1016/j.bbali.2005.04.006>
- Allison, P. R., & Johnstone, A. S. (1953). The oesophagus lined with gastric mucous membrane., 8(2), 87–101.
- Anderson, L. A., Johnston, B. T., Watson, R. G. P., Murphy, S. J., Ferguson, H. R., Comber, H., et al. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence, 66(9), 4975–4982. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4253>
- Anderson, L. A., Watson, R. G. P., Murphy, S. J., Johnston, B. T., Comber, H., Mc Guigan, J., et al. (2007). Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study, 13(10), 1585–1594.
- Anderson, R. G. (2003). Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology, 13(10), 534–539.
- Andl, C. D., Mizushima, T., Nakagawa, H., Oyama, K., Harada, H., Chruma, K., et al. (2003). Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo, 278(3), 1824–1830. <http://doi.org/10.1074/jbc.M209148200>
- Angelin, B., & Björkhem, I. (1977). Postprandial serum bile acids in healthy man. Evidence for differences in absorptive pattern between individual bile acids, 18(8), 606–609.
- Attwood, S. E., Harrison, L.-A., Preston, S. L., & Jankowski, J. A. (2008). Esophageal adenocarcinoma in “mice and men”: back to basics!, 103(9), 2367–2372. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.02004.x>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., & Struhl, K. (2004). *Current Protocols in Molecular Biology*. Current Protocols.
- Avissar, N. E., Toia, L., Hu, Y., Watson, T. J., Jones, C., Raymond, D. P., et al. (2009). Bile acid alone, or in combination with acid, induces CDX2 expression through activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR), 13(2), 212–222. <http://doi.org/10.1007/s11605-008-0720-7>
- Babar, M., Ennis, D., Abdel-Latif, M. M. M., Byrne, P. J., Ravi, N., & Reynolds, J. V. (2010). Differential molecular changes in patients with asymptomatic long-segment Barrett's esophagus treated by antireflux surgery or medical therapy, 199(2), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2008.11.032>
- Bani-Hani, K. E., & Bani-Hani, B. K. (2008). Columnar-lined esophagus: time to drop the eponym of “Barrett”: Historical review. (Vol. 23, pp. 707–715). <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05386.x>
- Barrett, N. R. (1950). Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. 38(150), 175–182.
- Barrett, N. R. (1957). The lower esophagus lined by columnar epithelium., 41(6), 881–894.
- Bengoechea-Alonso, M. T., & Ericsson, J. (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 215–222. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.004>
- Benninghoff, A., & Drenckhahn, D. (2008). *Anatomie*.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M., Dvorakova, K., & Garewal, H. S. (2005). Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers, 589(1), 47–65. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.001>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-

- yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bist, A., Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 38(12), 10693–10698.
- Bloch, K., Berg, B. N., & Rittenberg, D. (1934). The Biological Conversion of Cholesterol to Cholic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 1–10.
- Blumberg, B., Sabbagh, W., Juguilon, H., Bolado, J., van Meter, C. M., Ong, E. S., & Evans, R. M. (1998). SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes & Development*, 12(20), 3195–3205.
- Bollmann, F. M. (2007). Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 33(8), 704–709. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.08.006>
- Boonstra, J. J., Beer, D. G., van Marion, R., Lin, L., Chaves, P., Ribeiro, C., et al. (2010). Verification and unmasking of widely used human esophageal adenocarcinoma cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(4), 271–274. <http://doi.org/10.1093/jnci/djp499>
- Bouras, T., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2004). Caveolin-1 in breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 3(10), 931–941.
- Brady, L. M., Beno, D. W., & Davis, B. H. (1996). Bile acid stimulation of early growth response gene and mitogen-activated protein kinase is protein kinase C-dependent. *The Biochemical Journal*, 316 (Pt 3), 765–769.
- Burgermeister, E., & Seger, R. (2008). PPARgamma and MEK Interactions in Cancer. *Cancer Research*, 68(10), 3094–3099. <http://doi.org/10.1155/2008/309469>
- Burgermeister, E., Chuderland, D., Hanoch, T., Meyer, M., Liscovitch, M., & Seger, R. (2007a). Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 27(3), 803–817. <http://doi.org/10.1128/MCB.00601-06>
- Burgermeister, E., Schmid, R. M., Xing, X., Röcken, C., Juhasz, M., Chen, J., et al. (2007b). Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression. *Cancer Research*, 67(18), 8519–8526. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1125>
- Burnat, G., Majka, J., & Konturek, P. C. (2010). Bile acids are multifunctional modulators of the Barrett's carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(2), 185–192.
- Burnat, G., Rau, T., Elshimi, E., Hahn, E. G., & Konturek, P. C. (2007). Bile acids induce overexpression of homeobox gene CDX-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human Barrett's esophageal mucosa and adenocarcinoma cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 42(12), 1460–1465. <http://doi.org/10.1080/00365520701452209>
- Byrne, A.-M., Sharma, R., Duggan, G., Kelleher, D., & Long, A. (2012). Deoxycholic acid impairs glycosylation and fucosylation processes in oesophageal epithelial cells. <http://doi.org/10.1093/glycob/cwr190>
- Cameron, A. J., Souto, E. O., & Smyrk, T. C. (2002). Small adenocarcinomas of the esophagogastric junction: association with intestinal metaplasia and dysplasia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(6), 1375–1380. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05669.x>
- Campbell, P. J. (2012). Telomeres and cancer: from crisis to stability to crisis to stability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 148(4), 633–635. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.043>
- Cao, S., Fernandez-Zapico, M. E., Fernandez-Zapico, M. E., Jin, D., Puri, V., Puri, V., et al. (2005). KLF11-mediated repression antagonizes Sp1/sterol-responsive element-binding protein-induced transcriptional activation of caveolin-1 in response to cholesterol signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1901–1910. <http://doi.org/10.1074/jbc.M407941200>
- Capello, A., Moons, L. M. G., van de Winkel, A., Siersema, P. D., van Dekken, H., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2008). Bile acid-stimulated expression of the farnesoid X receptor enhances the immune response in Barrett esophagus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), 1510–1516. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.01908.x>
- Chang, E. Y., Morris, C. D., Seltman, A. K., O'Rourke, R. W., Chan, B. K., Hunter, J. G., & Jobe, B. A. (2007). The Effect of Antireflux Surgery on Esophageal Carcinogenesis in Patients With Barrett Esophagus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 246(1), 11–21. <http://doi.org/10.1097/01.sla.0000261459.10565.e9>

- Chang, S. (2005). Modeling aging and cancer in the telomerase knockout mouse., 576(1-2), 39–53. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.020>
- Chang, T.-Y., Chang, C. C. Y., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification, 22, 129–157. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656>
- Chen, H. L., Fan, L. F., Gao, J., Ouyang, J. P., & Zhang, Y. X. (2011). Differential expression and function of the caveolin-1 gene in non-small cell lung carcinoma., 25(2), 359–366. <http://doi.org/10.3892/or.2010.1095>
- Chiang, J. Y. L. (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology*, 40(3), 539–551. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.11.006>
- Cipriani, S., Mencarelli, A., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., et al. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS One*, 6(10), e25637. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025637>
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease., 84(4), 1341–1379. <http://doi.org/10.1152/physrev.00046.2003>
- Cook, M. B., Wild, C. P., Everett, S. M., Hardie, L. J., Bani-Hani, K. E., Martin, I. G., & Forman, D. (2007). Risk of mortality and cancer incidence in Barrett's esophagus., 16(10), 2090–2096. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0432>
- Cronin, J., Williams, L., McAdam, E., Eltahir, Z., Griffiths, A. P., Baxter, J., & Jenkins, G. J. S. (2010). The role of secondary bile acids in neoplastic development in the oesophagus, 38(2), 337–342. <http://doi.org/10.1042/BST0380337>
- Csendes, A., Burgos, A. M., Smok, G., Burdiles, P., Braghetto, I., & Díaz, J. C. (2009). Latest results (12-21 years) of a prospective randomized study comparing Billroth II and Roux-en-Y anastomosis after a partial gastrectomy plus vagotomy in patients with duodenal ulcers, 249(2), 189–194. <http://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181921aa1>
- Daniel, E. E., Jury, J., & Wang, Y. F. (2001). nNOS in canine lower esophageal sphincter: colocalized with Cav-1 and Ca²⁺-handling proteins?, 281(4), G1101–14.
- de Gottardi, A., Dumonceau, J.-M., Bruttin, F., Vonlaufen, A., Morard, I., Spahr, L., et al. (2006). Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulsterone in vitro., 5, 48. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-5-48>
- Demars, C. J., Buttar, N. S., Anderson, M. A., Papenfuss, S. M., & Wang, K. K. (2007, May 29). FXR and carcinogenesis in Barrett's esophagus. Anaheim, CA.
- DeMeester, S. R., & DeMeester, T. R. (2000). Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Annals of Surgery*, 231(3), 303–321.
- Demmer, I. (2010, February 15). Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Transkriptionsfaktors. (G. von Herder, Ed.). Dante-Gymnasium München, München.
- Dent, J., El-Serag, H. B., Wallander, M.-A., & Johansson, S. (2005). Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review., 54(5), 710–717. <http://doi.org/10.1136/gut.2004.051821>
- Depinho, R. A., & Polyak, K. (2004). Cancer chromosomes in crisis., 36(9), 932–934. <http://doi.org/10.1038/ng0904-932>
- Deregowski, V., Delhalle, S., Benoit, V., Bours, V., & Merville, M.-P. (2002). Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells, 64(5-6), 873–881.
- Desmaze, C., Soria, J.-C., Freulet-Marrière, M.-A., Mathieu, N., & Sabatier, L. (2003). Telomere-driven genomic instability in cancer cells., 194(2), 173–182. [http://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00704-8](http://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00704-8)
- Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. (2011). ICD-10 GM (pp. 1–829).
- Di Vizio, D., Morello, M., Sotgia, F., Pestell, R. G., Freeman, M. R., & Lisanti, M. P. (2009). An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation., 8(15), 2420–2424.
- Direkze, N. C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulsom, R., Oukrif, D., et al. (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts, 64(23), 8492–8495. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR040001>

- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice., 293(5539), 2449–2452. <http://doi.org/10.1126/science.1062688>
- Dulak, A. M., Stojanov, P., Peng, S., Lawrence, M. S., Fox, C., Stewart, C., et al. (2013). Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nature Genetics*, 45(5), 478–486. <http://doi.org/10.1038/ng.2591>
- Dunn, L. J., Robertson, A. G. N., Immanuel, A., & Griffin, S. M. (2010). Barrett's adenocarcinoma 52 years after subtotal esophagectomy for pediatric peptic stricture, 89(2), 604–606. <http://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.06.078>
- Dvorak, K., Guy, N. C., Holubec, B., Bernstein, H., Payne, C. M., Bernstein, C., et al. (2007a, May 25). A new non-surgical model of esophagitis and Barrett's esophagus.
- Dvorak, K., Payne, C. M., Chavarria, M., Ramsey, L., Dvorakova, B., Bernstein, H., et al. (2007b). Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus, 56(6), 763–771. <http://doi.org/10.1136/gut.2006.103697>
- Engelman, J. A., Zhang, X. L., & Lisanti, M. P. (1998). Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers, 436(3), 403–410.
- Fan, X., & Snyder, N. (2009). Prevalence of Barrett's esophagus in patients with or without GERD symptoms: role of race, age, and gender, 54(3), 572–577. <http://doi.org/10.1007/s10620-008-0395-7>
- Feldman, R. A., & Martinez, J. D. (2009). Growth suppression by ursodeoxycholic acid involves caveolin-1 enhanced degradation of EGFR. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(8), 1387–1394. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.05.003>
- Feramisco, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2004). Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis, 279(9), 8487–8496. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312623200>
- Feramisco, J. D., Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Reitz, J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2005). Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change, 102(9), 3242–3247. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500206102>
- Ferguson, H. R., Wild, C. P., Anderson, L. A., Murphy, S. J., Johnston, B. T., Murray, L. J., et al. (2008). Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Reflux Esophagitis, Barrett's Esophagus, and Esophageal Adenocarcinoma, 17(3), 727–731. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2570>
- Fielding, C. J., Bist, A., & Fielding, P. E. (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers, 94(8), 3753–3758.
- Fischbach, W., Malfertheiner, P., Hoffmann, J. C., Bolten, W., Bornschein, J., Götze, O., et al. (2009, December). S3-guideline “helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease” of the German society for digestive and metabolic diseases (DGVS) in cooperation with the German society for hygiene and microbiology, society for pediatric gastroenterology and nutrition e. V., German society for rheumatology, AWMF-registration-no. 021 / 001. <http://doi.org/10.1055/s-0028-1109855>
- Freedman, N. D., Murray, L. J., Kamangar, F., Abnet, C. C., Cook, M. B., Nyrén, O., et al. (2011). Alcohol intake and risk of oesophageal adenocarcinoma: a pooled analysis from the BEACON Consortium., 60(8), 1029–1037. <http://doi.org/10.1136/gut.2010.233866>
- Freeman, M. R., Yang, W., & Di Vizio, D. (2012). Caveolin-1 and prostate cancer progression., 729, 95–110. http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1222-9_7
- Gerg, M., Kopitz, C., Schaten, S., Tschukes, A., Kahlert, C., Stangl, M., et al. (2008). Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases, 6(3), 341–351. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2032>
- Gill, S., Chow, R., & Brown, A. J. (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.04.002>

- Giorgio, C., Hassan Mohamed, I., Flammini, L., Barocelli, E., Incerti, M., Lodola, A., & Tognolini, M. (2011). Lithocholic acid is an Eph-ephrin ligand interfering with Eph-kinase activation., 6(3), e18128. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018128>
- Goldstein, J. L., Debose-Boyd, R. A., & Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols, 124(1), 35–46. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
- Gong, Y., Lee, J. N., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & Ye, J. (2006). Juxtamembranous aspartic acid in Insig-1 and Insig-2 is required for cholesterol homeostasis, 103(16), 6154–6159. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601923103>
- Gotley, D. C., Morgan, A. P., & Cooper, M. J. (1988). Bile acid concentrations in the refluxate of patients with reflux oesophagitis, 75(6), 587–590.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1), 59–74.
- Haigh, C. R., Attwood, S. E., Thompson, D. G., Jankowski, J. A., Kirton, C. M., Pritchard, D. M., et al. (2003). Gastrin induces proliferation in Barrett's metaplasia through activation of the CCK2 receptor, 124(3), 615–625. <http://doi.org/10.1053/gast.2003.50091>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer., 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harada, H., Nakagawa, H., Oyama, K., Takaoka, M., Andl, C. D., Jacobmeier, B., et al. (2003). Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation, 1(10), 729–738.
- Haveri, H., Westerholm-Ormio, M., Lindfors, K., Mäki, M., Savilahti, E., Andersson, L. C., & Heikinheimo, M. (2008). Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa, 8, 9. <http://doi.org/10.1186/1471-230X-8-9>
- Hayashi, K., Matsuda, S., Machida, K., Yamamoto, T., Fukuda, Y., Nimura, Y., et al. (2001). Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhou breast cancers., 61(6), 2361–2364.
- Hiwasa, T., Sawada, T., & Sakiyama, S. (1990). Cysteine proteinase inhibitors and ras gene products share the same biological activities including transforming activity toward NIH3T3 mouse fibroblasts and the differentiation-inducing activity toward PC12 rat pheochromocytoma cells., 11(1), 75–80.
- Hong, J., Behar, J., Wands, J., Resnick, M., Wang, L. J., Delellis, R. A., et al. (2009). Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of esophageal adenocarcinoma. <http://doi.org/10.1136/gut.2009.188375>
- Honkakoski, P., Sueyoshi, T., & Negishi, M. (2003). Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR., 35(3), 172–182.
- Houghton, J., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A. B., Carlson, J., Li, H., et al. (2004). Gastric Cancer Originating from Bone Marrow-Derived Cells, 306(5701), 1568–1571. <http://doi.org/10.1126/science.1099513>
- Hu, J., Hwang, S. S., Liesa, M., Gan, B., Sahin, E., Jaskelioff, M., et al. (2012). Antitelomerase Therapy Provokes ALT and Mitochondrial Adaptive Mechanisms in Cancer., 148(4), 651–663. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.028>
- Hu, Y., Jones, C., Gellersen, O., Williams, V. A., Watson, T. J., & Peters, J. H. (2007a). Pathogenesis of Barrett esophagus: deoxycholic acid up-regulates goblet-specific gene MUC2 in concert with CDX2 in human esophageal cells, 142(6), 540–4; discussion 544–5. <http://doi.org/10.1001/archsurg.142.6.540>
- Hu, Y., Lam, K. Y., Law, S., Wong, J., & Srivastava, G. (2001). Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC., 7(11), 3519–3525.
- Hu, Y., Williams, V. A., Gellersen, O., Jones, C., Watson, T. J., & Peters, J. H. (2007b). The Pathogenesis of Barrett's Esophagus: Secondary Bile Acids Upregulate Intestinal Differentiation Factor

CDX2 Expression in Esophageal Cells, 11(7), 827–834. <http://doi.org/10.1007/s11605-007-0174-3>

- Hung, K.-F., Lin, S.-C., Liu, C.-J., Chang, C.-S., Chang, K.-W., & Kao, S.-Y. (2003). The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32(8), 461–467.
- Hvid-Jensen, F., Pedersen, L., Drewes, A. M., Sørensen, H. T., & Funch-Jensen, P. (2011). Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus., 365(15), 1375–1383. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1103042>
- Jaiswal, K., Lopez-Guzman, C., Souza, R. F., Souza, R. F., Spechler, S. J., Sarosi, G. A., & Sarosi, G. A. (2006). Bile salt exposure increases proliferation through p38 and ERK MAPK pathways in a non-neoplastic Barrett's cell line. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(2), G335–42. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00167.2005>
- Jaiswal, K., Tello, V., Lopez-Guzman, C., Nwariaku, F., Anthony, T., & Sarosi, G. A. (2004). Bile salt exposure causes phosphatidyl-inositol-3-kinase-mediated proliferation in a Barrett's adenocarcinoma cell line. *Surgery*, 136(2), 160–168. <http://doi.org/10.1016/j.surg.2004.04.008>
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha., 383(6602), 728–731. <http://doi.org/10.1038/383728a0>
- Jean-Louis, S., Akare, S., Akare, S., Ali, M. A., Mash, E. A., Meuillet, E., & Martinez, J. D. (2006). Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14948–14960. <http://doi.org/10.1074/jbc.M506710200>
- Jin, G., Ramanathan, V., Quante, M., Baik, G. H., Yang, X., Wang, S. S. W., et al. (2009). Inactivating cholecystokinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice., 119(9), 2691–2701. <http://doi.org/10.1172/JCI38918>
- Jolly, A. J., Wild, C. P., & Hardie, L. J. (2004). Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines., 19(4), 319–324.
- Jolly, A. J., Wild, C. P., & Hardie, L. J. (2009). Sodium deoxycholate causes nitric oxide mediated DNA damage in oesophageal cells, 1–7. <http://doi.org/10.1080/10715760802684211>
- Kalabis, J., Wong, G. S., Vega, M. E., Natsuzaka, M., Robertson, E. S., Herlyn, M., et al. (2012). Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture, 7(2), 235–246. <http://doi.org/10.1038/nprot.2011.437>
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression., 5(10), 749–759. <http://doi.org/10.1038/nri1703>
- Katsogiannou, M., Boustany, El, C., Gackiere, F., Delcourt, P., Athias, A., Mariot, P., et al. (2009). Caveolae contribute to the apoptosis resistance induced by the alpha(1A)-adrenoceptor in androgen-independent prostate cancer cells., 4(9), e7068. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007068>
- Kauer, W. K. H., Peters, J. H., Demeester, T. R., Ireland, A. P., Bremner, C. G., & Hagen, J. A. (1995). Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized., 222(4), 525–31; discussion 531–3.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., et al. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids., 278(11), 9435–9440. <http://doi.org/10.1074/jbc.M209706200>
- Kazumori, H., Ishihara, S., & Kinoshita, Y. (2009). Roles of caudal-related homeobox gene Cdx1 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development. <http://doi.org/10.1136/gut.2008.152975>
- Kazumori, H., Ishihara, S., Rumi, M. A. K., Kadowaki, Y., & Kinoshita, Y. (2005). Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium., 55(1), 16–25. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.066209>
- Kazumori, H., Ishihara, S., Takahashi, Y., Amano, Y., & Kinoshita, Y. (2011). Roles of Kruppel-like factor

- 4 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development., 60(5), 608–617. <http://doi.org/10.1136/gut.2010.221648>
- Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H. J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., & Häussinger, D. (2010). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain., 58(15), 1794–1805. <http://doi.org/10.1002/glia.21049>
- Kliewer, S. A., Goodwin, B., & Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism., 23(5), 687–702.
- Kliewer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A., et al. (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway., 92(1), 73–82.
- Kochman, M. L., DelValle, J., Dickinson, C. J., & Boland, C. R. (1992). Post-translational processing of gastrin in neoplastic human colonic tissues, 189(2), 1165–1169.
- Krasowski, M. D., Ni, A., Hagey, L. R., & Ekins, S. (2011). Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR, 334(1-2), 39–48. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.016>
- Lanuti, M., Liu, G., Goodwin, J. M., Zhai, R., Fuchs, B. C., Asomaning, K., et al. (2008). A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome., 14(10), 3216–3222. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4932>
- Leedham, S. J., Preston, S. L., McDonald, S. A. C., Elia, G., Bhandari, P., Poller, D., et al. (2008). Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus, 57(8), 1041–1048. <http://doi.org/10.1136/gut.2007.143339>
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., & Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile Acid receptors in metabolic regulation, 89(1), 147–191. <http://doi.org/10.1152/physrev.00010.2008>
- Li, T., Sotgia, F., Vuolo, M. A., Li, M., Yang, W. C., Pestell, R. G., et al. (2006). Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status., 168(6), 1998–2013.
- Li, X., Galipeau, P. C., Paulson, T. G., Sanchez, C. A., Arnaudo, J., Liu, K., et al. (2014). Temporal and spatial evolution of somatic chromosomal alterations: a case-cohort study of Barrett's esophagus. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 7(1), 114–127. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0289>
- Li, X., Galipeau, P. C., Sanchez, C. A., Blount, P. L., Maley, C. C., Arnaudo, J., et al. (2008). Single nucleotide polymorphism-based genome-wide chromosome copy change, loss of heterozygosity, and aneuploidy in Barrett's esophagus neoplastic progression. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 1(6), 413–423. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0121>
- Li, Y., & Martin, R. C. G. (2007). Reflux injury of esophageal mucosa: experimental studies in animal models of esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma., 20(5), 372–378. <http://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2007.00713.x>
- Liang, G., Yang, J., Horton, J. D., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c., 277(11), 9520–9528. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111421200>
- Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H., & Chiang, C. (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development, 20(1), 58–61. <http://doi.org/10.1038/1717>
- Liu, P., Li, W. P., Machleidt, T., & Anderson, R. G. (1999). Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nature Cell Biology*, 1(6), 369–375. <http://doi.org/10.1038/14067>
- Lordick, F., Ott, K., Krause, B.-J., Weber, W. A., Becker, K., Stein, H. J., et al. (2007). PET to assess early metabolic response and to guide treatment of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: the MUNICON phase II trial, 8(9), 797–805. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70244-9](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70244-9)
- Lorenzen, S., Panzram, B., Keller, G., Lordick, F., Herrmann, K., Becker, K., et al. (2010). Association

of the VEGF 936C>T Polymorphism with FDG Uptake, Clinical, Histopathological, and Metabolic Response in Patients with Adenocarcinomas of the Esophagogastric Junction. <http://doi.org/10.1007/s11307-010-0330-0>

- Lortat-Jacob, J. L. (1951). [7 Cases of ulcer of the esophagus]., 77(25-26), 829–837.
- Lortat-Jacob, J. L. (1957). L'endo-brachy-oesophage, 11, 1247–55.
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., et al. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids, 284(5418), 1362–1365.
- Malerød, L., Juvet, K., GjØen, T., & Berg, T. (2002). The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells., 307(2), 173–180. <http://doi.org/10.1007/s00441-001-0476-9>
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade., 83(6), 835–839.
- Martinek, J., Benes, M., Brandtl, P., Hucl, T., Vasicek, M., Voska, L., et al. (2008). Low incidence of adenocarcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia in patients with Barrett's esophagus: a prospective cohort study. *Endoscopy*, 40(09), 711–716. <http://doi.org/10.1055/s-2008-1077502>
- Morales, C. P., Souza, R. F., & Spechler, S. J. (2002). Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus., 360(9345), 1587–1589. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11569-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11569-8)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction., 155, 335–350.
- Novotna, K., Trkova, M., Pazdro, A., Smejkal, M., Soukupova, A., Kodetova, D., et al. (2006). TP53 gene mutations are rare in nondysplastic Barrett's esophagus, 51(1), 110–113. <http://doi.org/10.1007/s10620-006-3093-3>
- Palanca-Wessels, M. C. A., Barrett, M. T., Galipeau, P. C., Rohrer, K. L., Reid, B. J., & Rabinovitch, P. S. (1998). Genetic analysis of long-term Barrett's esophagus epithelial cultures exhibiting cytogenetic and ploidy abnormalities., 114(2), 295–304.
- Park, D. S., Woodman, S. E., Schubert, W., Cohen, A. W., Frank, P. G., Chandra, M., et al. (2002). Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype., 160(6), 2207–2217. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61168-6](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61168-6)
- Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., et al. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor., 284(5418), 1365–1368.
- Patani, N., Martin, L.-A., Reis-Filho, J. S., & Dowsett, M. (2012). The role of caveolin-1 in human breast cancer., 131(1), 1–15. <http://doi.org/10.1007/s10549-011-1751-4>
- Patra, S. K., & Bettuzzi, S. (2007). Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review)., 17(6), 1279–1290.
- Paulson, T. G., Xu, L., Sanchez, C. A., Blount, P. L., Ayub, K., Odze, R. D., & Reid, B. J. (2006). Neosquamous epithelium does not typically arise from Barrett's epithelium, 12(6), 1701–1706. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1810>
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., & Blaser, M. J. (2004). Bacterial biota in the human distal esophagus, 101(12), 4250–4255. <http://doi.org/10.1073/pnas.0306398101>
- Pei, Z., Yang, L., Peek, R. M., Jr Levine, S. M., Pride, D. T., & Blaser, M. J. (2005). Bacterial biota in reflux esophagitis and Barrett's esophagus, 11(46), 7277–7283.
- Pera, M. (2003). Trends in incidence and prevalence of specialized intestinal metaplasia, barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction, 27(9), 999–1008; discussion 1006–8. <http://doi.org/10.1007/s00268-003-7052-2>
- Pilger, D. A., Lopez, P. L., Segal, F., & Leistner-Segal, S. (2007). Molecular analysis of the p53 gene in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus: characterization

by sequencing, 52(9), 2183–2185. <http://doi.org/10.1007/s10620-006-9526-1>

- Poole, D. P., Godfrey, C., Cattaruzza, F., Cottrell, G. S., Kirkland, J. G., Pelayo, J. C., et al. (2010). Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system, 22(7), 814–25, e227–8. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01487.x>
- Prade, E. (2011, November 24). Signaling mechanisms of bile acids in esophageal cancer. Technische Universität München.
- Prade, E., Schmid, R. M., Tobiasch, M., Tänzer, M., Lian, F., Xing, X., et al. (2011). Bile Acids Down-regulate Caveolin-1 in Esophageal Epithelial Cells through Sterol Responsive Element Binding Protein, 1–20.
- Prade, E., Tobiasch, M., Hitkova, I., Schäffer, I., Lian, F., Xing, X., et al. (2012). Bile acids down-regulate caveolin-1 in esophageal epithelial cells through sterol responsive element-binding protein., 26(5), 819–832. <http://doi.org/10.1210/me.2011-1140>
- QIAGEN GmbH. (2010a). QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (pp. 1–72).
- QIAGEN GmbH. (2010b). RNeasy Mini Handbook (4 ed.) (pp. 1–80). Qiagen.
- Qiao, D., Stratagouleas, E. D., & Martinez, J. D. (2001). Activation and role of mitogen-activated protein kinases in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Carcinogenesis*, 22(1), 35–41.
- Quante, M., & Wang, T. C. (2008). Inflammation and stem cells in gastrointestinal carcinogenesis., 23, 350–359. <http://doi.org/10.1152/physiol.00031.2008>
- Quante, M., Bhagat, G., Abrams, J. A., Marache, F., Good, P., Lee, M. D., et al. (2012). Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*, 21(1), 36–51. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.004>
- Quest, A. F. G., Gutierrez-Pajares, J. L., & Torres, V. A. (2008). Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer., 12(4), 1130–1150. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00331.x>
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig, 104(16), 6511–6518. <http://doi.org/10.1073/pnas.0700899104>
- Radhakrishnan, A., Sun, L.-P., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain, 15(2), 259–268. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.019>
- Raggi, M., Langer, R., Feith, M., Friess, H., Schauer, M., & Theisen, J. (2010). Successful evaluation of a new animal model using mice for esophageal adenocarcinoma., 395(4), 347–350. <http://doi.org/10.1007/s00423-010-0607-4>
- Razani, B. (2001). Caveolin-1-deficient Mice Are Lean, Resistant to Diet-induced Obesity, and Show Hypertriglyceridemia with Adipocyte Abnormalities, 277(10), 8635–8647. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110970200>
- Razani, B., Woodman, S. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology., 54(3), 431–467.
- Reinehr, R., Becker, S., Wettstein, M., & Häussinger, D. (2004). Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis., 127(5), 1540–1557.
- Riddell, R. H., & Odze, R. D. (2009). Definition of Barrett's esophagus: time for a rethink--is intestinal metaplasia dead?, 104(10), 2588–2594. <http://doi.org/10.1038/ajg.2009.390>
- Rockett, J. C., Larkin, K., Darnton, S. J., Morris, A. G., & Matthews, H. R. (1997). Five newly established oesophageal carcinoma cell lines: phenotypic and immunological characterization, 75(2), 258–263.
- Roman, S., Pétré, A., Thépot, A., Hautefeuille, A., Scoazec, J.-Y., Mion, F., & Hainaut, P. (2007). Downregulation of p63 upon exposure to bile salts and acid in normal and cancer esophageal cells in culture, 293(1), G45–53. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00583.2006>
- Ross-Innes, C. S., Becq, J., Warren, A., Cheetham, R. K., Northen, H., O'Donovan, M., et al. (2015). Whole-genome sequencing provides new insights into the clonal architecture of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Nature Genetics*. <http://doi.org/10.1038/ng.3357>

- Rosztóczy, A., Izbéki, F., Németh, I. B., Dulic, S., Vadász, K., Róka, R., et al. (2012). Detailed esophageal function and morphological analysis shows high prevalence of gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus in patients with cervical inlet patch., 25(6), 498–504. <http://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2011.01281.x>
- Rygiel, A. M., Milano, F., Kate, ten, F. J., Schaap, A., Wang, K. K., Peppelenbosch, M. P., et al. (2008). Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus, 17(6), 1380–1385. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2734>
- Sager, R., Sheng, S., Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Zou, Z., Stenman, G., et al. (1994). RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm., 59, 537–546.
- Salatino, M., Beguelin, W., Peters, M. G., Carnevale, R., Proietti, C. J., Galigniana, M. D., et al. (2006). Progesterone-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation., 25(59), 7723–7739. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209757>
- Schauer, M., Janssen, K.-P., Rimkus, C., Raggi, M., Feith, M., Friess, H., & Theisen, J. (2009). Microarray-Based Response Prediction in Esophageal Adenocarcinoma. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1673>
- Schwitala, S., Schmid, R. M., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S. I., et al. (2013). Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties, 152(1-2), 25–38. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.012>
- Sharma, P., Dent, J., Armstrong, D., Bergman, J. J. G. H. M., Gossner, L., Hoshihara, Y., et al. (2006). The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria., 131(5), 1392–1399. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.032>
- Sherwood, S. W., Kung, A. L., Roitelman, J., Simoni, R. D., & Schimke, R. T. (1993). In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetyl-leucylleucyl-norleucinal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3353–3357.
- Shimano, H., Horton, J. D., Hammer, R. E., Shimomura, I., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *Journal of Clinical Investigation*, 98(7), 1575–1584. <http://doi.org/10.1172/JCI118951>
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy, 12(20), 3182–3194. <http://doi.org/10.1101/gad.12.20.3182>
- Shin, J., Kim, J., Ryu, B., Ryu, B., Chi, S.-G., Chi, S.-G., et al. (2006). Caveolin-1 is associated with VCAM-1 dependent adhesion of gastric cancer cells to endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 17(5-6), 211–220. <http://doi.org/10.1159/000094126>
- Siewert, J. R., Rothmund, M., & Schumpelick, V. (2010). Ösophaguskarzinom. In *Praxis der Viszeralchirurgie – Onkologische Chirurgie* (7 ed., p. 960). Springer.
- Singh, P. K., Xu, Z., Dai, B., Rajaraman, S., Rubin, N., & Dhruva, B. (1994). Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidated gastrins, 266(3 Pt 1), G459–68.
- Slack, J. M., & Tosh, D. (2001). Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types., 11(5), 581–586.
- Soccio, R. E., & Breslow, J. L. (2004). Intracellular cholesterol transport, 24(7), 1150–1160. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000131264.66417.d5>
- Sommerfeld, A., Reinehr, R., & Häussinger, D. (2009). Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis., 284(33), 22173–22183. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.005355>
- Song, S., Guha, S., Liu, K., Buttar, N. S., & Bresalier, R. S. (2007). COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signalling pathways in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma, 56(11), 1512–1521. <http://doi.org/10.1136/>

gut.2007.121244

- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain., 21(1), 70–71. <http://doi.org/10.1038/5007>
- Spisni, E., Tomasi, V., Cestaro, A., & Tosatto, S. C. E. (2005). Structural insights into the function of human caveolin 1., 338(3), 1383–1390. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.099>
- Stein, H. J., & Siewert, J. R. (1993). Barrett's esophagus: pathogenesis, epidemiology, functional abnormalities, malignant degeneration, and surgical management., 8(3), 276–288.
- Stoner, G. D., Kaighn, M. E., Reddel, R. R., Resau, J. H., Bowman, D., Naito, Z., et al. (1991). Establishment and characterization of SV40 T-antigen immortalized human esophageal epithelial cells. *Cancer Research*, 51(1), 365–371.
- Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro, 280(28), 26483–26490. <http://doi.org/10.1074/jbc.M504041200>
- Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins, 104(16), 6519–6526. <http://doi.org/10.1073/pnas.0700907104>
- Tencer, L., Burgermeister, E., Ebert, M. P. A., & Liscovitch, M. (2008). Rosiglitazone induces caveolin-1 by PPARgamma-dependent and PPRE-independent mechanisms: the role of EGF receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance., 28(2A), 895–906.
- Terris, B., Blaveri, E., Crnogorac-Jurcevic, T., Jones, M., Missiaglia, E., Ruzniewski, P., et al. (2002). Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas., 160(5), 1745–1754. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61121-2](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61121-2)
- Thermo Scientific. (2011). Thermo Scientific Verso cDNA Kit, 1–3.
- THIEME, S. (2010). *Kurzlehrbuch Chirurgie*.
- Thompson, T. C., Tahir, S. A., Li, L., Watanabe, M., Naruishi, K., Yang, G., et al. (2010). The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications., 13(1), 6–11. <http://doi.org/10.1038/pcan.2009.29>
- Thorburn, C., Friedman, G., & Dickinson, C. J. (1998). Gastrin and colorectal cancer: a prospective study.
- Thrift, A. P., Pandeya, N., Smith, K. J., Green, A. C., Hayward, N. K., Webb, P. M., & Whiteman, D. C. (2011). *Helicobacter pylori* infection and the risks of Barrett's oesophagus: A population-based case-control study. <http://doi.org/10.1002/ijc.26242>
- Tosh, D., & Slack, J. M. W. (2002). HOW CELLS CHANGE THEIR PHENOTYPE. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(3), 187–194. <http://doi.org/10.1038/nrm761>
- Tumorregister München. (n.d.). Ösophaguskarzinom (C15) Basisstatistik. Retrieved November 24, 2011, from http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base_C15__G.pdf
- Tumorregister München. (n.d.). Ösophaguskarzinom (C15) Überleben. Retrieved November 24, 2011, from http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C15__G.pdf
- Vahabzadeh, B., Seetharam, A. B., Cook, M. B., Wani, S., Rastogi, A., Bansal, A., et al. (2012). Validation of the Prague C & M criteria for the endoscopic grading of Barrett's esophagus by gastroenterology trainees: a multicenter study., 75(2), 236–241. <http://doi.org/10.1016/j.gie.2011.09.017>
- van Baal, J. W. P. M., Rygiel, A. M., Milano, F., Anderson, M. P., Bergman, J. J. G. H. M., Spek, C. A., et al. (2008). Gene expression profile comparison of Barrett's esophagus epithelial cell cultures and biopsies, 21(7), 628–633. <http://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2008.00810.x>
- van de Winkel, A., Menke, V., Capello, A., Moons, L. M. G., Pot, R. G. J., van Dekken, H., et al. (2011). Expression, localization and polymorphisms of the nuclear receptor PXR in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma., 11, 108. <http://doi.org/10.1186/1471-230X-11-108>
- van Nieuwenhove, Y., Destordeur, H., & Willems, G. (2001). Spatial distribution and cell kinetics of the glands in the human esophageal mucosa., 39(3), 163–168.

- Vaninetti, N. M., Geldenhuys, L., Porter, G. A., Risch, H. A., Hainaut, P., Guernsey, D. L., & Casson, A. G. (2008). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma., *47*(4), 275–285. <http://doi.org/10.1002/mc.20382>
- Vepa, S., Scribner, W. M., & Natarajan, V. (1997). Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin., *22*(1-2), 25–35.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., et al. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development., *319*(9), 525–532. <http://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Wang, D. H., Clemons, N. J., Miyashita, T., Dupuy, A. J., Zhang, W., Szczepny, A., et al. (2010a). Aberrant epithelial-mesenchymal Hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia, *138*(5), 1810–1822. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.048>
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C., & Forman, B. M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR., *3*(5), 543–553.
- Wang, J. S., Abrams, J. A., Varro, A., Lightdale, C. J., Lertkowitz, N., Slack, K. N., et al. (2010b). Elevated serum gastrin is associated with a history of advanced neoplasia in Barrett's esophagus, *105*(5), 1039–1045. <http://doi.org/10.1038/ajg.2009.629>
- Wang, X., Ouyang, H., Yamamoto, Y., Kumar, P. A., Wei, T. S., Dagher, R., et al. (2011). Residual Embryonic Cells as Precursors of a Barrett's-like Metaplasia., *145*(7), 1023–1035. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.026>
- Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., & Goldstein, J. L. (1994). SREBP-1, A MEMBRANE-BOUND TRANSCRIPTION FACTOR RELEASED BY STEROL-REGULATED PROTEOLYSIS, *77*, 53–62.
- Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., & Goldstein, J. L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, *77*(1), 53–62.
- Watanabe, Masami, Yang, G., Cao, G., Tahir, S. A., Naruishi, K., Tabata, K.-I., et al. (2009). Functional analysis of secreted caveolin-1 in mouse models of prostate cancer progression., *7*(9), 1446–1455. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0071>
- Watanabe, Mitsuhiro, Houten, S. M., Matakai, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation., *439*(7075), 484–489. <http://doi.org/10.1038/nature04330>
- Weinstein, W. M., & Ippoliti, A. F. (1996). The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets, goblets., *44*(1), 91–95.
- Wertheim, B. C., Martínez, M. E., Ashbeck, E. L., Roe, D. J., Jacobs, E. T., Alberts, D. S., & Thompson, P. A. (2009). Physical activity as a determinant of fecal bile acid levels, *18*(5), 1591–1598. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-1187>
- Wijnhoven, B. P., Tilanus, M. G., Morris, A. G., Darnton, S. J., Tilanus, H. W., & Dinjens, W. N. M. (2000). Human oesophageal adenocarcinoma cell lines JROECL 47 and JROECL 50 are admixtures of the human colon carcinoma cell line HCT 116, *82*(9), 1510–1512. <http://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1170>
- Williams, T. M., & Lisanti, M. P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis., *288*(3), C494–506. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00458.2004>
- Witkiewicz, A. K., Nguyen, K. H., Dasgupta, A., Kennedy, E. P., Yeo, C. J., Lisanti, M. P., & Brody, J. R. (2008). Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome., *7*(19), 3021–3025.
- Wong, N. A. C. S., Wilding, J., Bartlett, S., Liu, Y., Warren, B. F., Piris, J., et al. (2005). CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia., *102*(21), 7565–7570. <http://doi.org/10.1073/pnas.0502031102>
- Yamada, T., Osawa, S., Hamaya, Y., Furuta, T., Hishida, A., Kajimura, M., & Ikuma, M. (2010). Guggulsterone suppresses bile acid-induced and constitutive caudal-related homeobox 2

expression in gut-derived adenocarcinoma cells., 30(6), 1953–1960.

- Yang, L., Lu, X., Nossa, C. W., Francois, F., Peek, R. M., & Pei, Z. (2009). Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome, 137(2), 588–597. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.046>
- Yokomori, H., Oda, M., Ogi, M., Sakai, K., & Ishii, H. (2002). Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis., 22(2), 150–158.
- Zagari, R. M., Fuccio, L., Wallander, M.-A., Johansson, S., Fiocca, R., Casanova, S., et al. (2008). Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett's oesophagus in the general population: the Loiano-Monghidoro study, 57(10), 1354–1359. <http://doi.org/10.1136/gut.2007.145177>

Anhang

Sequenz des Caveolin-1-Promotors

Sequenz des Caveolin-1-Promotors

1 aaataattct acaattataa acatttttgt gtattttgca aaatatggct aacctgttgg
61 ctaaaattcc attgttccag aaaatatcgg taataaaatt atagaaaagt taaagatctt
121 catttcttat ttcgaagcgt ttgggagaca tttcagaaac ggatgggaaa tgtaaattc
181 tgcatgcctg cttaagttc catccacacc gactagatgt aaacgagtg caccaaaagt
241 acaccacagg cacccacaca gattccttc ataagggatc cacaaagttt agatgtaa
301 gtacctaaag ttctagccg tcttcatcc ctccctctgt gaaacagga acacatgtg
361 ttaaaggcag agatggaact tgggcatggg aggggggtgg gaggtgggaa gggacggctt
421 aggacagggc aggattgtgg attgttctg cgccttggg tcgccatact gggcatctct
481 gcaggcgcgt cggctccctc caccctgct gagatgatgc actgcgaaa cattcgctct
541 ccccgggacg cctctcggg gttcagagca gggaaaattg ttgcctcagg taaataatc
601 tgccaagca cccagcgcg ggacaacgtt ctactcgct ctctgctgc tgcgcgctcc
661 cgcctctg ctgccagaac cttgggatg tgcctagacc cggcgagca cacgtccggg
721 ccaaccgca gcagaacaaa cctttggcgg gcgccagga ggctccctcc cagccaccg
781 ccccctcag gcctttttt tccccata caatacaaga tctcctcc tcagttcct
841 taaagcacag cccagggaaa cctcctaca gtttcatcc accacgggcc agcatgtctg
901 ggggcaaata ctagactcg gaggtaggca tccgtgggg ggcgccggct cgggcgtg
961 gggg

Danksagungen

Dank gebührt Herrn Univ.-Prof. Matthias Ebert, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und die Durchführung der Versuche und die Abfassung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Frau Dr. rer. nat. Elke Burgermeister ist für die ausführlichen theoretischen Diskussionen und wertvolle Beiträge zur Versuchsdurchführung sowie für die hervorragende Betreuung im Labor zu danken.

Die technischen Assistentinnen der AG Prof. Ebert, Frau Michaela Hiber und Frau Isabell Schäfer, standen stets mit Tips und wertvollen Hinweisen zur Seite.

Besonderer Dank gebührt Elke Prade, die im Rahmen ihrer Masterarbeit relevante Aspekte des hier beleuchteten Themengebietes weiterführend analysiert und insbesondere die intrazelluläre Signaltransduktion genauer untersucht hat.

Besonderem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Roland Schmid und Herrn PD Dr. med. Michael Quante, die die Fertigstellung dieser Arbeit unter ihrer fachlichen Aufsicht ermöglicht haben.

