

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim
Frankfurt am Main

Der Einfluss des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin auf Leukämiezellen In-vitro

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs
Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Leonie Alexandra Bonke
aus Darmstadt

Frankfurt am Main 2010

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. A. Kurth

Korreferent: Prof. Dr. T. Klingebiel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Malignomentstehung	1
1.2 Leukämie	3
1.2.1 Historische Aspekte	3
1.2.2 Entstehung	5
1.2.3 Einteilung	5
1.2.4 Klinik und Befunde	7
1.2.5 Therapie	8
1.3 Hedgehog-Signalweg	11
1.3.1 Geschichte und Funktion der Hedgehog-Genfamilie	11
1.3.2 Biosynthese und Modifizierung des Hedgehog-Proteins	12
1.3.3 Mechanismus der Signalweiterleitung	13
1.4 Apoptose	14
1.5 Cyclopamin	18
1.6 Tomatidin	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Zelllinien/ Zellkultur	25
2.3 Zellzahlbestimmung	26
2.4 Einfrieren von Zellen	27

2.5	Isolierung Mononukleärer Zellen mittels Ficoll Paque PLUS	28
2.6	Bestimmung des Wachstumsverhaltens	29
2.7	Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Assay	30
2.8	Durchflusszytometrie	33
2.8.1	Apoptosemessung mit Annexin V und Propidiumiodid	37
2.8.2	Versuchsdurchführung	38
2.8.3	Auswertung	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Auswertung der Wachstumskurve	41
3.1.1	K 562	41
3.1.2	RS t 4;11	41
3.1.3	Lymphozyten	42
3.1.4	Abbildungen und Tabellen	42
3.2	Auswertung des MTT-Assays	55
3.2.1	K 562	55
3.2.2	RS t 4;11	55
3.2.3	Lymphozyten	56
3.2.4	Abbildungen und Tabellen	56
3.3	Auswertung der FACS-Analyse	67
3.3.1	K 562 bei einer Konzentration von 10 μmol	67
3.3.2	K 562 bei einer Konzentration von 20 μmol	67
3.3.3	Abbildungen und Tabellen	68
4	Diskussion	73
4.1	Diskussion der Methoden	73
4.2	Aussagekraft von In-vitro-Chemosensitivitätsprüfung	74
4.3	Die Wirkung von Cyclopamin auf Leukämiezellen	74
4.3.1	K 562	75
4.3.2	RS t 4;11	75
4.4	Die Wirkung von Cyclopamin auf Lymphozyten gesunder Spender	76
4.5	Apoptoseinduktion durch Cyclopamin über den Hedgehog-Signalweg	77
4.5.1	K 562	77
4.6	Selektive Wirkung auf maligne Zellen	79

4.7 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand	80
5 Zusammenfassung	83
6 Summary	85
Danksagung	99
Ehrenwörtliche Erklärung	101

Abbildungsverzeichnis

1.1	Philadelphiachromosom	4
1.2	Schematische Darstellung der Hämatopoese	6
1.3	Hedgehog-Signalweg	14
1.4	Strukturformel von Cyclopamin	19
1.5	Strukturformel von Tomatidin	20
2.1	Neubauerzählkammer	26
2.2	Zählquadrat	27
2.3	Mäanderförmige Zählung	28
2.4	Überschichtung Blut-Ficoll mit zwei-Phasenbildung	29
2.5	Phasenbildung nach Zentrifugation	30
2.6	Reaktionsschema: Umsetzung von MTT zu Formazan	32
2.7	Schematischer Aufbau eines 4-Kanal Durchflusszytometers	35
3.1	Wachstumskurve K 562 bei 10 μmol Cyclopamin	43
3.2	Wachstumskurve K 562 bei 10 μmol Tomatidin	44
3.3	Wachstumskurve K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	45
3.4	Wachstumskurve K 562 logarithmiert bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	45
3.5	Wachstumskurve RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin	47
3.6	Wachstumskurve RS t 4;11 bei 10 μmol Tomatidin	48
3.7	Wachstumskurve RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	49
3.8	Wachstumskurve RS t 4;11 logarithmiert bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	49
3.9	Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin	51
3.10	Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μmol Tomatidin	52
3.11	Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	53

3.12	Wachstumskurve Lymphozyten logarithmiert bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	53
3.13	Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin . .	57
3.14	Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin . .	58
3.15	Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin . .	59
3.16	Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin .	60
3.17	Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	61
3.18	Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	62
3.19	Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin	63
3.20	Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	64
3.21	Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	65
3.22	Zellvitalität MTT der Zellreihen bei 1, 10 und 20 μmol Cyclopamin	66
3.23	Zellvitalität MTT der Zelllinien bei 1, 10 und 20 μmol Tomatidin	66
3.24	FACS-Analyse K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	69
3.25	FACS-Analyse K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	70
3.26	Gesamtapoptose K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	71
3.27	Gesamtapoptose K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	71
3.28	Verteilung der Mechanismen des Zelltodes bei K 562	72

Tabellenverzeichnis

3.1	Zellzählung K 562 bei 10 μmol Cyclopamin	43
3.2	Zellzählung K 562 bei 10 μmol Tomatidin	44
3.3	Zählungsreihen K 562 bei 10 μmol Cyclopamin	46
3.4	Zählungsreihen K 562 bei 10 μmol Tomatidin	46
3.5	Zellzählung RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin	47
3.6	Zellzählung RS t 4;11 bei 10 μmol Tomatidin	48
3.7	Zählungsreihen RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin	50
3.8	Zählungsreihen RS t 4;11 bei 10 μmol Tomatidin	50
3.9	Zellzählung Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin	51
3.10	Zellzählung Lymphozyten bei 10 μmol Tomatidin	52
3.11	Zählungsreihen Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin	54
3.12	Zählungsreihen Lymphozyten bei 10 μmol Tomatidin	54
3.13	Extinktion MTT-Assay K 562 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin . . .	57
3.14	Extinktion MTT-Assay K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin . . .	58
3.15	Extinktion MTT-Assay K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin . . .	59
3.16	Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin .	60
3.17	Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	61
3.18	Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	62
3.19	Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin	63
3.20	Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	64
3.21	Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	65
3.22	FACS-Analyse K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin	69
3.23	FACS-Analyse K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin	70

Abkürzungsverzeichnis

ABL	humanes Abelson-Protoonkogen
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AZ	Allgemeinzustand
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein
BCR	B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene 2
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
Dhh	Desert-Hedgehog
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
Dsp	„Dispatches“
E	Extinktion
FAB	French-America-British
FADD	Fas-associated death domain

Abkürzungsverzeichnis

FKS	Fötale Kälber Serum
FL	Fluoreszenzkanal
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FSC	Forward-Scatter
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Hh-Signal	Hedgehog-Signal
Hh-Signalweg	Hedgehog-Signalweg
HPE	Holoprosencephalie
Ihh	Indian-Hedgehog
IL-2	Interleukin-2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
KM	Knochenmark
MIC	morphologic, immunologic, cytogenetic
MLL-Gen	mixed lineage leukemia-Gen
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PSC	precartilaginous stem cell

PS	Phosphatidylserin
Ptc	„Patched“
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Schwellendosis
Shh	Sonic Hedgehog
ShhN	Amino-Ende des Sonic-Hedgehog-Proteins
Smo	Smoothened
SSC	Side-Scatter
SSD	sterolsensitive Domäne
T	Transmission
T-Zellen	Thymus-abhängige Zellen
TNF	Tumor necrosis factor
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Wachstumsfaktoren
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Malignomentstehung

Vor mehr als einem Jahrhundert stellte der Pathologe J. Cohnheim Forschungen über Ähnlichkeiten zwischen Tumorzellen und embryonalen Zellen an. Seine Untersuchungen ergaben Gemeinsamkeiten bezüglich des morphologisch einfachen Aufbaus, der Differenzierungsfähigkeit sowie der Kapazität zu expansivem Wachstum. Aus seinen Ergebnissen entwickelte er die These der Entstehung von Tumorzellen aus embryonalen Zellen: In der Entwicklung werden mehr Zellen gebildet, als für die Gewebsausbildung nötig sind. Demnach könnte der hierbei entstandene Zellüberschuss im späteren Leben durch abnormale Aktivierung des Zellwachstums zur Tumorgenese führen. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Tumoren mit einem Ursprung aus undifferenzierten embryonalen Vorläuferzellen bekannt [79].

Heute weiß man, dass das Zellwachstum über spezifische Signaltransduktionswege gesteuert wird. Hierbei erfolgt die Informationsübertragung ins Zellinnere durch die Interaktion von Signalmolekülen und Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine Störung der Regulation dieser Kaskade kann zu unkontrolliertem Wachstum der Zellen führen [15]. Die Entartung kann auf Ebene, der auf Chromosomen liegenden Gene, die solche Signalmoleküle codieren, stattfinden. Es gibt verschiedene Ursachen wie punktuelle oder strukturelle Veränderungen einzelner Chromosomen. Hierzu gehören Deletionen, Inversionen, Duplikationen sowie Translokationen, bei denen ganze Abschnitte ausgetauscht werden. Es ist auffällig, dass neoplastische Erkrankungen des hämatopoetischen Systems vor allem eine genetische Veränderung aufweisen: die reziproke Translokation. Hierbei findet der Austausch zwischen zwei völlig unterschiedlichen Chromosomen statt. Sie ist bei rund 80 % der akuten lymphatischen Leukämien zu finden. Das sogenannte *mixed lineage leukemia-Gen* (MLL-Gen)(11q23) ist eines der beiden beteiligten Gene. Es verleiht den Zellen ihre spezifische Identität und ist an der Regulation des Chromatinzustandes beteiligt. Alle bisher entdeckten Translokationen, die letztlich Ergebnis einer fehlgeleiteten DNA-Reparatur nach DNA-Strangbruch sind und in die das MLL-Gen involviert ist,

führen zur Ausprägung akuter Leukämien [53]. Ein großes Problem der neoplastischen Erkrankungen ist, dass es zwischen Krebszellen und gesunden Körperzellen aus zellphysiologischer Sicht keine grundlegenden Unterschiede gibt. Über genetische Alterationen haben sich Tumorzellen einen Selektionsvorteil gegenüber den physiologischen Zellen verschafft [70]. Im Jahre 2000 definierten Hanahan und Weinberg sechs Charakteristika, die eine Krebszelle ausmachen.

Charakteristika von Tumorzellen

1. autokrine Autonomie/Eigenproduktion von *Wachstumsfaktoren* (WF)
2. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
3. Umgehung der Apoptose durch genetische Veränderungen spez. Signalmoleküle
4. Etablierung einer autarken Blutversorgung¹
5. Telomerase-Expression²
6. Fähigkeit zu systemischer Metastasierung und invasivem Wachstum

Eine unkontrollierte Proliferation entwickelt sich aus einer Kombination mehrerer genetischer Ereignisse, häufig liegen solche Alterationen im Bereich von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Als Onkogene bezeichnet man Gene, deren Produkte meist Komponenten zellulärer Signalkaskaden sind. Sie beeinflussen direkt oder indirekt die Prozesse der Genexpression, Differenzierung oder des Zellwachstums. Tumorsuppressorgene wirken als funktionelle Antagonisten der Onkogene. Sie haben eine Kontrollfunktion im Zellzyklus. Zu ihren Aufgaben gehört die Unterdrückung unphysiologisch erhöhter Zellproliferationszustände, so dass der Funktionsverlust eines solchen Genproduktes, eine ungehemmte Zellvermehrung zur Folge haben könnte. Bei den Onkogenen hingegen ist eine Aktivitätssteigerung des Genproduktes Ursache für die erhöhte Proliferation [9, 18].

¹Expressionsveränderung Angiogenese regulierender Faktoren z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

²Verhinderung der Telomerreduktion nach Zellteilung

1.2 Leukämie

Definition: „Systematisierte diffuse autonome Proliferation einer Leukozytenrasse. Die Expansion eines malignen Zellklons führt zur generalisierten Ausbreitung im blutbildenden *Knochenmark* (KM), eventuell zu Infiltrationen extramedullärer Organe und letztlich zur Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut“ (Gerd Herold, Innere Medizin 2005). Es erfolgt eine Akkumulation leukämischer Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark. Klinisch resultieren daraus die Verdrängung der physiologischen Hämatopoese mit systemischen Effekten wie Anämie, Thrombopenie und Granulozytopenie. Infolge der Panzytopenie kommt es zu Schwäche und rascher Ermüdbarkeit, bakterielle Infekte, Blutungsneigung sowie Organvergrößerung bei Infiltration stellen weitere Symptome dar [36, 65]. Eine Diagnose wird nach morphologischer und immunphänotypischer Analyse des Knochenmarks gestellt.

Die Leukämie lässt sich in 3 Phasen unterteilen:

1. *Aleukämische Phase*
2. *Subleukämische Phase*
3. *Leukämische Phase*

In der aleukämischen Phase vermehren sich die entarteten unreifen Vorstufen nur im Knochenmark. In der subleukämischen Phase findet man im peripheren Blutaussstrich erste unreife Vorstufen, begleitet von einer leichten Anämie. Bei der manifesten Leukämie findet sich eine massiv erhöhte Zahl an unreifen Vorstufen, mit einer ausgeprägten, häufig klinisch symptomatisch werdenden Anämie und Thrombozytopenie [86].

1.2.1 Historische Aspekte

Im Jahre 1845 beschrieb Rudolf Virchow erstmalig die Leukämie. Durch seine autoptischen Erkenntnisse, wobei er bei seinen Patienten eine Blutbildveränderung mit extrem hoher Leukozytenzahl feststellte, prägte er den aus dem griechischen stammenden Namen der Erkrankung „Leukämie“ - zu deutsch „weißes Blut“ [106]. Neumann konnte 1870 das Knochenmark als Ort der Hämatopoese und Leukämogenese ausmachen [68]. Zur Wende des 20. Jahrhunderts ermöglichte Paul Ehrlich durch spezielle Färbeverfahren bei der mikroskopischen Blutbilduntersuchung weitere Klassifikationen der Leukämie,

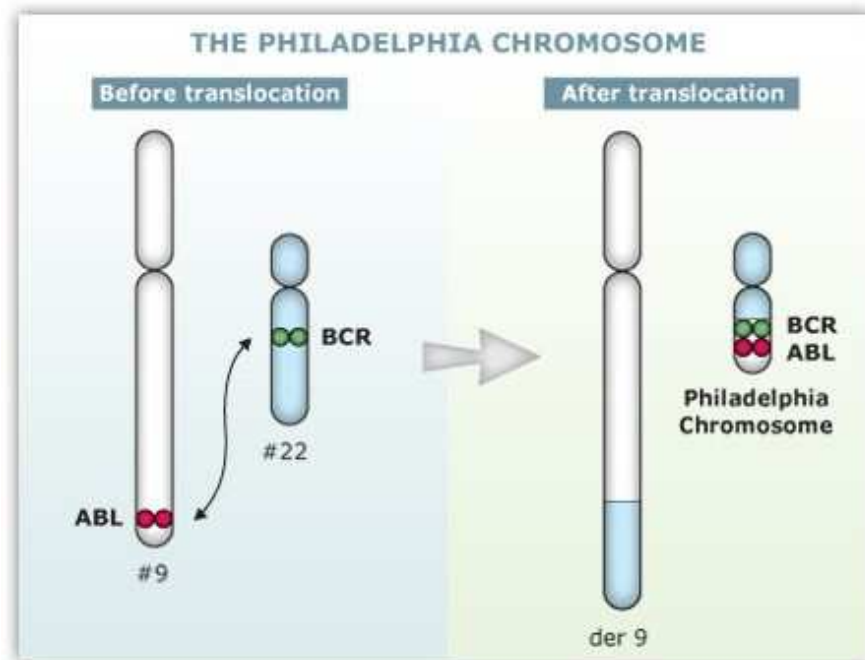


Abb. 1.1: Philadelphiachromosom

die sich allerdings erst Mitte des 20. Jahrhunderts als wichtige therapeutische Konsequenz erwiesen. Ein Meilenstein in der Forschung war die Beschreibung eines spezifischen Chromosomendefektes bei Leukämiepatienten, der den Ausbruch der Leukämie letztlich verursacht. Selbiges bezeichneten die Wissenschaftler Nowell und Hungerford 1960 als „Philadelphia Chromosom“³ (vgl. Abb. 1.1) [69]. Der amerikanischen Krebsgenetikerin Janet Rowley gelang 1973 die weitere Entschlüsselung des Philadelphia Chromosoms: Hierbei handelt es sich um eine reziproke Translokation der langen Arme von Chromosom 9 und 22. Daraus resultierte die heute gängige Bezeichnung: $t(9;22)(q34;11)$ [90]. Mit der Erkenntnis, dass solch mutierte Zellen ein Enzym namens *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene 2* (BCR)-*humanes Abelson-Protoonkogen* (ABL) produzieren, welches proliferierend auf Leukämiezellen wirkt, wurde die Grundlage für die heutige Chemotherapie der CML geschaffen, die genau in diesen Prozess eingreift. Hierbei wird durch Hemmung des BCR-ABL-Proteins das krankhafte Wachstum der Leukämiezellen verhindert [5, 22].

³nach dem Ort der Entdeckung

1.2.2 Entstehung

Ausgehend von einer undifferenzierten pluripotenten Stammzelle werden in mehreren Proliferations- und Differenzierungsschritten bei der normalen Hämatopoese die verschiedenen Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten gebildet (vgl. Abb. 1.2). Nach der Differenzierung in linienspezifische Vorläuferzellen im Knochenmark, entstehen schließlich ausdifferenzierte Effektorzellen des peripheren Blutes. Während dieser Entwicklung verändert sich das Expressionsmuster verschiedener Oberflächenproteine, den sogenannten *Cluster of differentiation* (CD)-Markern. Anhand dessen lassen sich die Zellen bestimmten Reifestadien zuordnen [62, 80, 104]. Aufgrund der Tatsache, dass Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie CD-Marker exprimieren, die auch in normalen Vorläuferzellen vorkommen, geht man davon aus, dass Leukämiezellen ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie „gesunde“ hämatopoetische Zellen [31, 97].

1.2.3 Einteilung

Die Einteilung der Leukämien kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen: Zum Einen nach der Entstehungsgeschwindigkeit⁴, oder anhand des Zelltyps der betroffenen Vorstufen⁵ zum Anderen mittels der Leukozytenzahl des Blutes⁶.

Zu den wichtigsten Krankheitsbildern zählen die *Chronische Leukämie*, die sich als

- *Chronisch myeloische Leukämie* (CML) – Sonderform der Myeloproliferativen Erkrankungen – und
- *Chronisch lymphatische Leukämie* (CLL) – Sonderform der *Non-Hodgkin-Lymphome* (NHL) –

klassifizieren lässt sowie die *Akute Leukämie*, bei der die

- *Akute myeloische Leukämie* (AML) – klassifiziert gemäß *French-America-British* (FAB)⁷ und die
- *Akute lymphatische Leukämie* (ALL) – anhand der *morphologic, immunologic, cytogenetic* (MIC)-Klassifikation⁸

⁴chronische oder akute Leukämie

⁵lymphatische oder myeloische Leukämie

⁶leukämisch, subleukämisch, aleukämisch

⁷M0-M7

⁸pro-B, common-B, prä-B und B-ALL, ähnlich für T-ALL

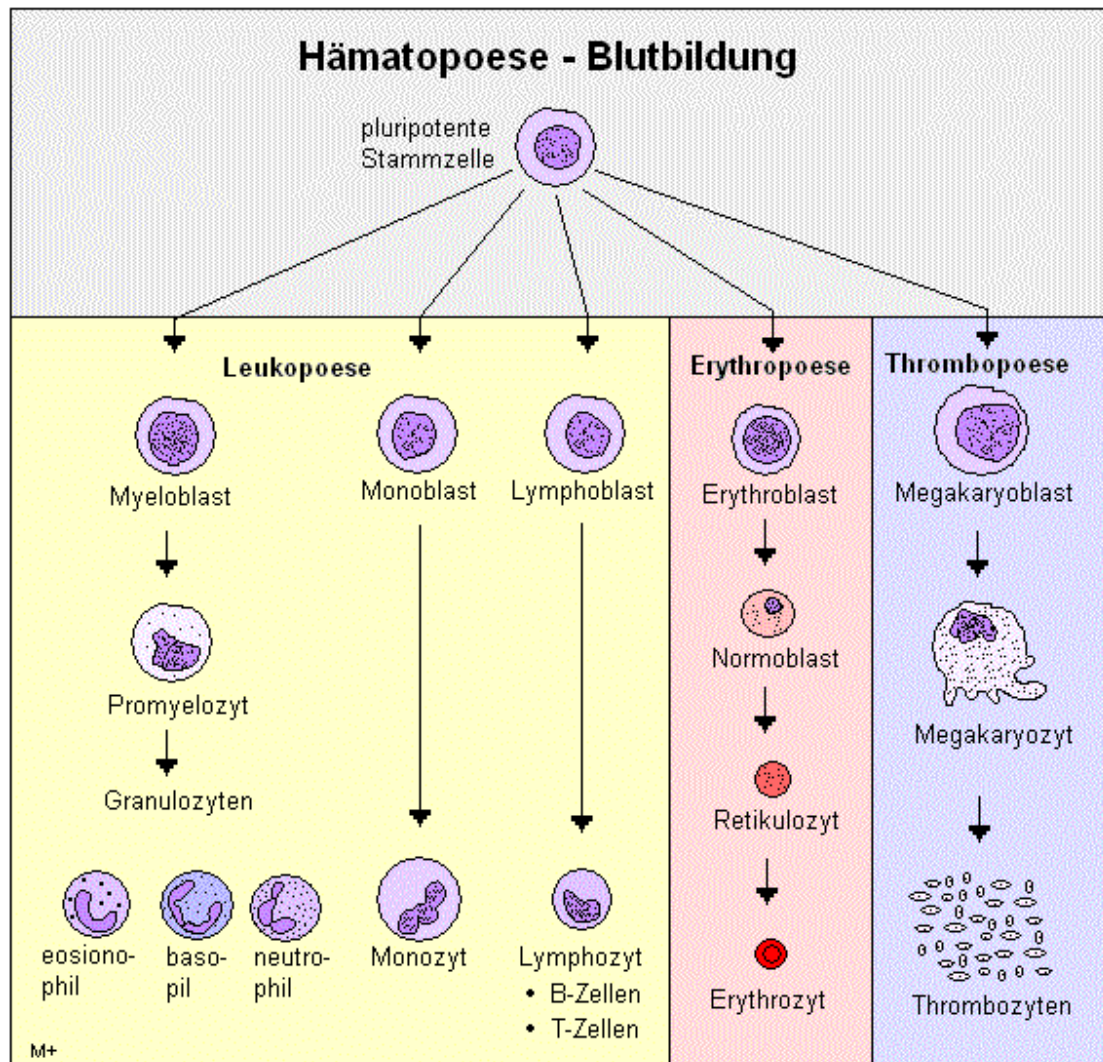


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Hämatopoese

unterschieden werden kann [26]. Die zur Gruppe der ALL gehörende t 4;11 Translokation kommt vor allem bei Kleinkindern und Säuglingen vor. Sie ist in ca. 80 % Ursache von Leukämie-Erkrankungen im Kindesalter und schwer behandelbar. Um eine Verbesserung der möglichen Therapieoptionen zu finden, wurde diese Zelllinie im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung aufgenommen.

1.2.4 Klinik und Befunde

ALL Im Vordergrund der *akuten lymphatischen Leukämie* stehen oftmals die Symptome der Knochenmarkinsuffizienz.

Hierzu zählen folgende Symptome:

- Anämie mit Schwäche und Müdigkeit
- Thrombozytopenie mit Blutungsneigung
- Mangel an funktionalen Granulozyten mit Infektneigung

Meist ist im Blutbild das Hämoglobin bei verminderter Retikulozytenzahl erniedrigt, ebenso die Thrombozyten. Die Leukozytenwerte sind häufig erhöht, können aber je nach Phase⁹ noch innerhalb der Norm liegen. Im Blutaussstrich lassen sich charakteristische uniforme leukämische Blasten nachweisen.

CML Die *chronisch myeloische Leukämie* gehört zur Gruppe der Myeloproliferativen Erkrankungen, die durch unkontrolliertes Wachstum einer oder mehrerer Zellreihen durch einen Defekt auf Stammzebene gekennzeichnet sind. In 90 % der Fälle tritt die CML mit dem Philadelphia-Chromosom gemeinsam auf. Sie ist durch eine exzessive Produktion funktionstüchtiger Granulozyten charakterisiert und zeigt einen phasischen Verlauf:

1. Chronische Initialphase - weitgehend asymptomatisch, Splenomegalie und Leukozytose, evtl. Müdigkeit und Nachtschweiß
2. Akzelerationsphase - B-Symptomatik¹⁰, progrediente Splenomegalie, Leukozytose sowie Anämie und Thrombozytopenie. Im Blutbild nimmt die Blastenzahl zu.
3. Blastenschub/ Endphase - verläuft wie eine akute Leukämie, in der mehr als 30 % Blasten im Blut nachweisbar sind [86].

⁹aleukämisch, subleukämisch

¹⁰Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust

1.2.5 Therapie

Die unter Kapitel 1.2.3 erläuterte Einteilung der Leukämien ist besonders wichtig, da sie für die Wahl der in Frage kommenden Behandlungsverfahren ausschlaggebend ist. Somit ist eine sorgfältige Diagnostik zur Ermittlung der Leukämieart von großer Bedeutung, ebenso die Feststellung der Zugehörigkeit zu Subtypen. Die relevantesten Untersuchungsschritte zum Nachweis einer Leukämie sind neben der körperlichen Untersuchung, die Untersuchung des Blutes sowie des Knochenmarks, anhand dessen man eine genauere Klassifizierung der Leukämie vornehmen kann. Ab einem Blastenanteil von über 25 % spricht man von einer Leukämie. Moderne Laborverfahren ermöglichen heute eine Unterteilung der Leukämieformen¹¹ in weitere Untertypen, die sich hinsichtlich ihrer Bösartigkeit, den Heilungschancen und Behandlungsaussichten erheblich voneinander unterscheiden. Ferner kann man erfahrungsgemäß eine Aussage über das Ansprechverhalten, den Krankheitsverlauf sowie das Rezidivrisiko treffen. Somit ist die genaue Kenntnis des Leukämietyps eine entscheidende Voraussetzung für eine zielgerichtete Behandlung. Das Ziel medizinischer Forschung ist unter anderem die genauere Charakterisierung der Ursachen und Entstehung von Krankheiten, um eine bessere Grundlage für therapeutische Ansätze zu schaffen. Hauptprobleme klassisch therapeutischer Methoden sind die mangelnde Selektivität und die geringe Zielgenauigkeit. Deshalb ist eine genaue Abwägung zwischen Dosis, Wirkung und Schaden durch *unerwünschte Arzneimittelwirkungen* (UAW) besonders wichtig. Ist die Dosis zu gering, wird zwar der Organismus wenig geschädigt, jedoch haben die Krebszellen gute Überlebenschancen. Bei zu hoch gewählter Dosis werden zwar viele Tumorzellen vernichtet, jedoch wird dementsprechend auch gesundes Gewebe in höherem Maße geschädigt. Derzeit gibt es kein Chemotherapeutikum, das selektiv bestimmte Krebszellen angreift, sondern diese lediglich als „schwächsten Gegner“ am wirkungsvollsten bekämpft. Die Identifizierung von Signalwegen, die bei der Tumorgenese eine Rolle spielen, stellt einen entscheidenden Anhaltspunkt bei der Entwicklung selektiver pharmakologischer Inhibitoren dar, die letztlich zu einem zielgerichteten Chemotherapeutikum führen können. Ein Beispiel hierfür ist die Entdeckung des *Sonic Hedgehog* (Shh)-Signalweges und dessen Relevanz für die Entstehung von Medulloblastomen. Labor- und Tierversuche mit dem selektiven Inhibitor Cyclopamin zeigten vielversprechende Ergebnisse und waren ein erster Schritt in Richtung selektiver Tumorthherapie [7].

¹¹AML, ALL, CML und CLL

Prinzipien der Chemotherapie

Die Chemotherapie wird in verschiedene Abschnitte unterteilt:

- *Remissions-/Induktionstherapie:* Ziel ist hierbei die Vollremission, bei der keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden können. Diese wird in ca. 90 % der Fälle unabhängig von der Risikoeinstufung erreicht [34]. Zur Überprüfung des Behandlungserfolges werden in bestimmten Abständen Knochenmarkausstriche analysiert.
- *Konsolidierungstherapie:* Die erreichte Remission soll hierbei stabilisiert werden. Dies erfolgt entweder durch Wiederholung der Induktionstherapie oder durch eine Knochenmarktransplantation.
- *Erhaltungstherapie:* Dieser Abschnitt kann zwei bis drei Jahre dauern. Zielsetzung ist die Hemmung der Proliferation residueller Blasten und die Remissionserhaltung.
- *Rezidivtherapie:* Bedauernswerterweise treten immer noch häufig Rezidive auf. Die Zeitspanne zwischen Remission und Auftreten des Rezidivs spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Rezidivtherapie. Bei Auftreten eines Rezidivs, wird erneut eine Induktionstherapie eingeleitet. Die Erfolgsaussichten gegenüber der Initialtherapie sind jedoch insgesamt deutlich schlechter.
- *ZNS-Bestrahlung:* Bei ca. 5 % aller Patienten tritt eine Beteiligung des ZNS auf, die einer zusätzlichen Therapie bedarf [72]. Die Effektivität der Bestrahlung ist nur bei der ALL gesichert. Hier erfolgt neben der Bestrahlung noch eine intrathekale Zytostatikagabe, um die im ZNS befindlichen Blasten zu vernichten, die über die normale Zytostatikatherapie wegen der Blut-Hirn-Schranke unzureichend erreicht werden. Wegen der hohen Toxizität wird die Bestrahlung nun mehr und mehr durch eine zusätzliche Chemotherapie abgelöst [38].
- *KM-transplantation:* Die Konsolidierungstherapie dauert ca. fünf Monate und erfolgt nach erreichter Remission. Ziel ist Rezidiven vorzubeugen und die Bekämpfung minimaler Resterkrankung [71]. Patienten mit ungünstiger Prognose, beispielsweise bei ungünstigen Subtypen, bekommen im Rahmen der Konsolidierungstherapie eine *Knochenmark* (KM)stransplantation. Die Myeloablative Therapie ist hierfür Voraussetzung, dabei werden durch eine Kombination aus Zytostatika- und Bestrahlungstherapie nahezu alle blutbildenden Zellen vernichtet. Durch Infusion hä-

matopoetischer Stammzellen soll das KM neu besiedelt werden und eine Hämatopoese nach 10-14 Tagen ermöglichen. Die Stammzellen können vom Erkrankten selbst¹²(autologe Transplantation) oder von einem Spender (allogene Transplantation) stammen.

Insgesamt stellt jede dieser Therapien eine langwierige Behandlung dar. Spätfolgen wie Beeinträchtigung der ZNS-Entwicklung, des Wachstumsverhaltens sowie Unfruchtbarkeit nehmen gerade für Kinder einen enormen Stellenwert ein. Auch ist es nicht selten, dass eine weitere maligne Erkrankung auftritt, insbesondere wenn die Behandlung eine zusätzliche Bestrahlung beinhaltet [52, 64].

Therapie der akuten Leukämie Es gibt drei prinzipielle Ansätze: Hierzu gehören die symptomatische, die zytostatische sowie die KM-transplantation. Bei der *symptomatischen Therapie* stehen die Substitution von Erythrozyten und Thrombozyten (Anämie/ Thrombozytopenie) sowie die Infektionsbehandlung im Vordergrund. In der *zytostatischen Therapie* gibt es zwei Optionen: Zum Einen den kurativen Ansatz, bei dem die entarteten Zellen vernichtet werden sollen zum Anderen den palliativen Ansatz, mit dem Ziel einer Steigerung der Lebensqualität. Welcher Weg gewählt wird, wird in Abhängigkeit von Alter, *Allgemeinzustand* (AZ), Stadium und Patientenwunsch entschieden. Die Durchführung sollte in einem spezialisierten Zentrum nach Auswahl des, für den Patienten besten Studienprotokolls erfolgen. Patienten mit einer MLL-Translokation erhalten eine Hochdosis-Chemotherapie in Kombination mit einer KM-transplantation.

Therapie der CML Bei der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie wird eine allogene Knochenmarktransplantation, möglichst durch einen verwandten Spender angestrebt. Der Patient sollte sich in der chronischen Phase befinden, da hier die Erfolgsaussichten am höchsten sind. Patienten, die für eine Transplantation nicht infrage kommen¹³, werden mit Interferon alpha und Hydroxyharnstoff behandelt. Bei sehr hohen Leukozytenzahlen erfolgt eine Leukophorese sowie Thrombozyten und Erythrozytensubstitution.

Prognose

Chronische Leukämien: Ein Großteil der Patienten sterben innerhalb von fünf Jahren. Die Interferonbehandlung führt in den meisten Fällen nicht zur Heilung, jedoch in ca 60 % zu

¹²Entnahme vor Erkrankung des Knochenmarks

¹³zu alt oder kein Spender

einer Verlängerung der Überlebenszeit. Führt man eine KM-Transplantation durch, ist die 5-Jahres-Überlebensrate vergleichbar mit den Resultaten der Interferonbehandlung. Die Patienten gelten jedoch als geheilt.

Akute Leukämien: Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) schwanken die Heilungschancen je nach Subtyp zwischen 10 % und 60 %. In 80 % der Fälle wird eine Remission erreicht. Die Überlebensrate ist umso besser, je jünger der Patient ist. Das „Outcome“ hat sich in den letzten 20 Jahren stetig verbessert, was an der Entwicklung von exakten Therapieprotokollen liegt. So ist es bezeichnend, dass im Vergleich das „Outcome“ in den Entwicklungsländern um 45 % geringer ausfällt [28, 40]. Leukämien mit Translokationen, wie auch die in dieser Arbeit untersuchte Translokation (t 4 ; 11), haben ein sehr schlechtes „Outcome“. Der Prozentwert für das „Eventfree-survival“ über 5 Jahren liegt bei < 20 % [81]. Bei der AML wird eine Remission in ca 65 % der Fälle erreicht, jedoch kommt es häufiger zu Rezidiven, so dass die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten unter 60 Jahren ohne allogene KM-Transplantation nur etwa 35 % beträgt. Hingegen liegt sie im Falle einer KM-transplantation bei etwa 55 %. Bei Patienten, die älter als 60 Jahre sind, liegt sie bei nur 10 %, so dass man das Alter als einen sehr einflussreichen Prognosefaktor ansehen muss.

1.3 Hedgehog-Signalweg

1.3.1 Geschichte und Funktion der Hedgehog-Genfamilie

Im achten Jahrhundert vor Christus malte Homer einen einäugigen Zyklopen und setzte ihn mit einem grausamen Monster gleich. Möglicherweise wurde Homer durch fehlgebildete Neugeborene beim Verfassen seiner Epen inspiriert. Nach dem heutigen Forschungsstand weiß man, dass Zyklopie durch eine fehlerhafte Entwicklung des Vorderhirns entsteht. Diese Erkrankung kommt in verschiedenen Ausprägungsgraden vor. Eine milde Form, auch *Holoprosencephalie* (HPE) genannt, ist lebensfähig und zeichnet sich phänotypisch durch einen einzelnen Schneidezahn aus. Die extreme Form, die sich durch ein einziges Auge in der Gesichtsmitte auszeichnet, ist nicht lebensfähig. Dem Ganzen können genetische Ursachen zugrunde liegen, jedoch können sie auch durch bestimmte Teratogene (z.B. Alkaloide) hervorgerufen werden. Mitte der 1960er Jahre stellte man fest, dass Lämmer, deren Mütter während der Schwangerschaft *Veratrum californicum* fraßen, missgebildet waren und z.B. nur ein Auge hatten. Dies konnte man darauf zurück-

führen, dass in diesen Pflanzen Alkaloide enthalten sind. Weitere Forschungsergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass HPE durch Alkaloide wie beispielsweise Cyclopamin induziert werden kann. Wie man in den 1990er Jahren herausfand, ist der Wirkmechanismus von bestimmten Alkaloiden nicht nur die Inhibition der Cholesterinbiosynthese, sondern auch die eines bestimmten Proteins, dem Hedgehog-Protein. Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie bezeichnet man häufig als Morphogene. Selbige sind in Wachstums- und Differenzierungsprozesse integriert und fungieren dort als extrazelluläre Signalproteine. Über den Aufbau eines Gradienten im Gewebe werden die Zielgene konzentrationsabhängig aktiviert oder reprimiert [13, 21, 30, 49].

1.3.2 Biosynthese und Modifizierung des Hedgehog-Proteins

Die Hedgehog-Familie der Signalmoleküle in Säugetierzellen lässt sich in *drei Morphogene* unterteilen: Das „*Sonic Hedgehog* (Shh)-Protein“ spielt im frühen Stadium der Rechts-Links-Asymmetrie und später bei der Entwicklung des Neuralrohres, der Somiten, der Gliedmaßen, der Bildung von epithelialen Organen und Haarfollikeln eine Rolle [10, 27]. Das „*Indian-Hedgehog* (Ihh)-Protein“, welches während der enchondralen Ossifikation exprimiert wird, kommt außerdem im Darm, in den Milchdrüsenanlagen sowie in der Lunge vor [46]. Zuletzt das „*Desert-Hedgehog* (Dhh)-Protein“, dessen Expression in peripheren Nerven und in den Hoden nachgewiesen wurde [11].

Der Hedgehogsignalweg ist ein komplexes Geschehen, was sich schon in der Biosynthese des Proteins widerspiegelt. Eine Besonderheit dieses Signalweges ist die Bildung des aktiven Proteins durch autoproteolytische Spaltung. Das Vorläuferprotein wird als 45 kDa großes Molekül exprimiert und weist zwei Strukturbestandteile auf: Ein Signalpeptid mit einer hochkonservierten N-terminalen Domäne und einer weniger konservierten C-terminalen Domäne. Bei der Spaltung entstehen ein 19 kDa schweres N-terminales und ein 25 kDa schweres C-terminales Fragment. Der Vorgang der autokatalytischen Spaltung ist von einer anderen Proteinfamilie, den Inteinen bekannt [16, 32, 77, 78, 89]. Die N-terminale Domäne ist für die Signalgebung zuständig. Die C-terminale hat die Proteaseaktivität inne. Zur Überführung in die aktive Form des Signalpeptides bedarf es einer Reihe chemischer Modifikationen. Hierbei wird zuerst an das C-terminale Ende der N-terminalen Domäne (*Amino-Ende des Sonic-Hedgehog-Proteins* (ShhN)), über eine Veresterung ein Cholesterinrest kovalent gebunden. Im folgenden Schritt wird ein Palmitoylrest an das N-terminale Ende angehängt und ShhN anschließend glykosyliert [14, 74, 89, 100].

Diese Modifizierungen sind für die korrekte räumliche Verteilung des Signals und die Membranssoziation der Hedgehog-Signaldomäne notwendig [14, 77]. Über einen noch nicht geklärten Mechanismus wird das aktive Protein über den Golgiapparat zur Zellmembran transportiert und dort sezerniert. Zur Aufklärung dieses Schrittes laufen derzeit Forschungen an Mäusen und Drosophila-Fliegen [47].

1.3.3 Mechanismus der Signalweiterleitung

Der Rezeptorkomplex zur Erkennung des *Hedgehog-Signal* (Hh-Signal)s besteht aus zwei Proteinen: Zum Einen dem Rezeptor „*Patched*“ (Ptc), welcher strukturell einem Ionenkanal ähnelt, aus 12-Transmembrandomänen besteht und hierbei eine negativ regulierende Funktion einnimmt. Zum Anderen übernimmt es mit dem 7-Transmembranprotein „*Smoothed* (Smo)“, eine positiv regulierende Rolle und gleicht den *Guaninnucleotid-bindendes Protein* (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren. ShhN bindet an seinen Rezeptor Ptc. Wenn ShhN nicht vorhanden ist, übt Ptc eine inhibierende Wirkung auf Smo aus. In Anwesenheit von ShhN führt Ptc vermutlich eine Konformationsänderung durch, die seine inhibierende Wirkung gegenüber Smo aufhebt. In der weiteren Signalkaskade aktiviert Smo einen Multiproteinkomplex im Cytosol. Dieser setzt sich aus den Proteinen „Fused“, „Costal-2“ und dem Vorläuferprotein des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors „Gli“ zusammen [20, 67, 73]. Zur Signalweiterleitung wird aus dem „Gli“-Vorläuferprotein eine aktive Form gebildet, die den zytosolischen Proteinkomplex verlässt, in den Nucleus transloziert, um dort Hedgehog-Zielgene zu aktivieren. In Abwesenheit eines Hedgehogsignals wird konstitutiv eine Repressorform gebildet. Hierbei wird das Vorläuferprotein „Gli“ über die Proteinkinase A phosphoryliert. Die Gli-Isoform wird vom zuvor am Mikrotubuli assoziierten Proteinkomplex proteolytisch gespalten und fungiert dann als Repressor. Dementsprechend ist das gespaltene „Gli“-Protein die Repressorform und in gebundenem Zustand die Aktivator-Form [91] (vgl. Abb. 1.3). Bekannte Zielgene des Hedgehog-Signalweges sind „Gli-1“ und „Ptc“ selbst, hiervon sind wiederum zwei Homologe „Ptc1“ und „Ptc2“ identifiziert worden [33, 45]. Interessanterweise werden bei Eingang eines Signals die Ptc-Transkripte hochreguliert, wodurch sie als eine negative Rückkopplung zur Restriktion des Hh-Signals fungieren. „Ptc“ besitzt eine *sterolsensitive Domäne* (SSD), die bereits bei anderen Enzymen entdeckt wurde. Man nimmt an, dass die teratogene Wirkung der Alkaloide ihren Angriffspunkt nicht in der Cholesterolmodifizierung des Hedgehog-Proteins hat, sondern eine Interaktion zwischen der SSD von „Ptc“ stattfindet, wodurch die Si-

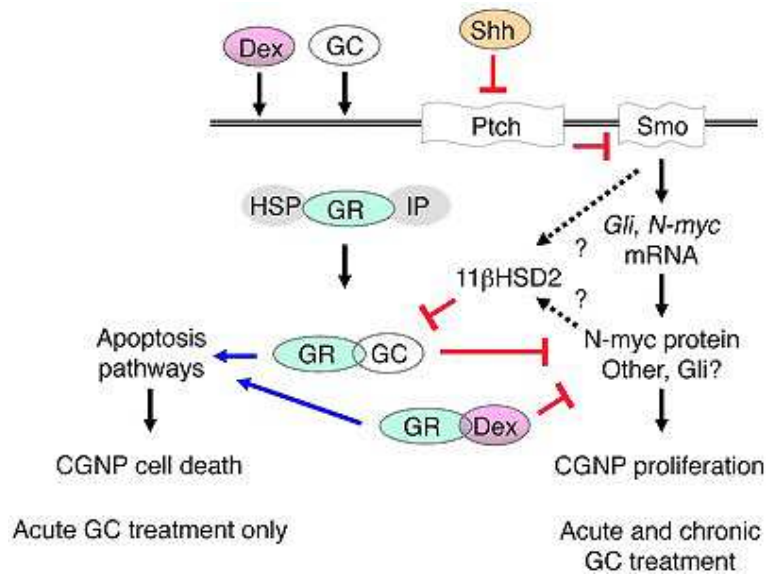


Abb. 1.3: Hedgehog-Signalweg

gnalweiterleitung inhibiert wird [44]. Nachdem man nun weiß, welche Mechanismen bei Eingang eines Hedgehogsignals ablaufen, bleibt eine Frage offen: Wie schafft ein solch lipophiles Protein den weiten Weg über mehrere Zelldurchmesser zu einer anderen Zelle? Diesen Weg gilt es noch vollständig aufzuklären. Bei Untersuchungen an *Drosophila* wurde ein 12-Transmembranöses-Protein „*Dispatches*“ (Dsp) entdeckt, welches eine große Rolle bei der Sekretion von ShhN spielt [17].

1.4 Apoptose

Apoptose ist die griechische Bezeichnung für das Abfallen und Zusammenschrumpfen der Blätter im Herbst (Griechisch: „apo“ = weg und „ptosis“ = Fall) [2]. Es wird als Synonym für den programmierten Zelltod verwendet. Obwohl Carl Vogt schon im Jahre 1842 entdeckte [107], dass Zellen eines „programmierten“ Zelltodes sterben können, wurde erst vor rund 35 Jahren von Wyllie und Kerr der Begriff der Apoptose und die Existenz einer weiteren Form des Zelltodes neben der Nekrose postuliert [50, 111].

Die Apoptose stellt eine zielgerichtete Entfernung von nicht mehr benötigten Zellen dar. Diesem Mechanismus kommt eine große Bedeutung in der Gewebemhomöostase zu. Die Apoptose spielt nicht nur in der Embryogenese, sondern auch im ausgereiftem Or-

ganismus, insbesondere bei der Hämatopoese und im Immunsystem eine zentrale Rolle. Sie dient letztlich der Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen Zellab- und Zellaufbau. Nachdem lange Zeit die einseitige Theorie vertreten wurde, dass die Tumorgenese allein aufgrund gesteigerten Wachstums maligner Zellen basiere, zeigte sich später, dass gerade sich niedrigmaligne verhaltende Krebsarten¹⁴ eher durch ein „Zuwenig“ an Apoptose als durch ein „Zuviel“ an Wachstum charakterisieren lassen. Die Aufdeckung der zentralen Rolle der Apoptose in der Entstehung von Krankheiten, insbesondere der Malignomentstehung, zog Ende der 90er Jahre eine Welle von Forschungsanstrengungen auf diesem Gebiet nach sich, die bis heute anhält.

Zwischen den beiden Formen des Zelltodes¹⁵ besteht ein grundsätzlicher Unterschied. Die Apoptose ist ein genetisch festgelegter, physiologischer, geordneter, aktiver Prozeß, bei dem Caspasen eine zentrale Rolle spielen. Es läuft eine Signalkaskade ab, die eine gewisse Intaktheit der Zelle voraussetzt. Hierbei signalisiert die Zelle selbst aktiv Makrophagen den apoptotischen Vorgang und sorgt damit gezielt für ihre reizlose „Entsorgung“. Die Nekrose hingegen stellt keinen aktiven Prozess dar und ist immer von einer starken Entzündungsreaktion begleitet. Lichtmikroskopisch kann man schon anhand der Morphologie beide Formen des Zelltodes voneinander unterscheiden. Apoptotische Zellen sind durch Schrumpfung der Zelle bei gleichzeitiger Kondensation des Chromatins¹⁶ charakterisiert. Es kommt zur Bildung von „blebbings“¹⁷, der Kern löst sich auf, die DNA wird von Endonukleasen in Fragmente von ca 200 Basenpaaren gespalten. Desweiteren wird die Symmetrie der Zellmembran aufgehoben, so dass normalerweise innenliegende Strukturen an die Außenseite der Plasmamembran gelangen. Zudem bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen. Eine nekrotische Zelle hingegen schwillt stark an, wodurch die Zellmembran zerstört wird.

Merkmale apoptotischer Zellen sind,

- Fehlen einer Gewebsreaktion,
- Zellschrumpfung,
- Chromatinkondensation,
- oligonucleosomale DNA-Fragmentierung,

¹⁴NHL-Lymphome: CLL

¹⁵Nekrose und Apoptose

¹⁶Kernpyknose

¹⁷„Abschnürring kleiner Bläschen“

- Blebbing,
- Aufhebung der Membransymmetrie und
- Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.

Die Apoptose unterteilt man in Initiationsphase und Effektorphase/ Caspase-Kaskade. Es sind derzeit zwei apoptotische Signaltransduktionshauptwege bekannt. Der extrinsische Weg (rezeptorvermittelte Apoptose) und der intrinsische Weg (mitochondrial vermittelte Apoptose). Sie haben beide eine gemeinsame Endstrecke, die über die Bildung von Todessubstraten, durch speziell dafür vorgesehene Enzyme (Caspasen) und Faktoren, zur Apoptose führen.

Gemeinsame Endstrecke/Caspase-Kaskade

Caspasen liegen als sogenannte Zymogene ¹⁸ vor, das heißt, sie besitzen wenig bis keine Aktivität und werden durch Spaltung zu Caspasen aktiviert. Als Cysteinproteasen, spalten sie sequenzspezifisch nach Aspartat. In der Effektorphase/ Caspase-Kaskade, werden sogenannte Effektor-Caspasen aktiviert, was schließlich zum Tod der Zelle führt. Man unterteilt sie hier nach Aufgabe und Position in Initiator- und Executor-Caspasen. Zu den Executor-Caspasen zählen die Caspase-3, -6 und -7. Nach vorhergehender Aktivierung durch übergeordnete Caspasen und Umsetzung der sogenannten Todessubstrate, leiten sie die Endstrecke der Apoptosekaskade ein. Die Substrate haben eine essentielle Aufgabe in der Zelle. Zu ihnen gehören unter anderem Reparaturenzyme und Strukturproteine, so dass deren Umsetzung zwangsläufig den Tod der Zelle nach sich zieht. Zu den Initiator-Caspasen gehört beispielsweise die Caspase-8, die beim rezeptorvermittelten Apoptoseweg, die gemeinsame Endstrecke einleitet. Schlussendlich werden über Caspasen sekundäre Zielproteine wie DNAsen aktiviert, die Actin und die Zellmembran abbauen. Woraufhin sich die Zelle in Vesikeln abschnürt und so durch Phagozyten schließlich vollständig vernichtet wird [96].

Extrinsischer Weg/ Rezeptorvermittelte Apoptose

Durch Ligandenbindung an die *Tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptorfamilie wird der extrinsische Weg eingeleitet. Über weitere Zwischenschritte wird letztlich die Caspase-8 aktiviert, die im Nachfolgenden die Caspase-Kaskade in Gang setzt. Einer der am besten untersuchten, der TNF-Familie angehörenden Rezeptoren, ist der CD-95-Rezeptor

¹⁸Procaspasen

(Fas). Die TNF-Rezeptoren haben auf viele Wachstums- und Differenzierungsvorgänge aktivierenden oder inhibierenden Einfluss und werden auf einer Vielzahl menschlicher Zellen und Tumorzellen exprimiert [75, 83]. Zur Aktivierung dieses Rezeptors wird dessen Ligand „CD-95L“ oder ein ihn aktivierender Antikörper benötigt. Diese Liganden kommen auf der Oberfläche derselben, anderer Zellen oder auf Apoptose induzierenden Zellen, wie z.B. den T-Lymphozyten vor. Der „CD-95L“ spielt eine große Rolle bei der Apoptoseinduktion im Rahmen der Deletion von reifen *Thymus-abhängige Zellen* (T-Zellen) und bei der Vernichtung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen und *Natürliche Killerzellen* (NK-Zellen) [3, 29]. Zur Signalweiterleitung muss eine Trimerisierung des Rezeptors, sowie eine entsprechende Dreifachbesetzung mit Liganden erfolgen. Nach der Aktivierung entsteht intrazellulär ein Proteinkomplex „*Death inducing signaling complex* (DISC)“¹⁹, bestehend aus vielen Molekülen mit sogenannten „Todesdomänen“ „*Fas-associated death domain* (FADD)“, wodurch die Rekrutierung eines Schlüsselenzyms, der Procaspase-8, an den Proteinkomplex erfolgt. Die oben erwähnte Caspase-8 gehört zu den Initiator-Caspasen und leitet den rezeptorvermittelten Apoptoseweg ein, nachdem sie am „DISC“ aktiviert wurde [75].

Intrinsischer Weg/ Mitochondrial vermittelte Apoptose

Neben der Aktivierung des direkten Weges über die Executorcaspasen, kann die aktive Caspase-8 auch den intrinsischen Weg der Apoptose durch die Spaltung von Bcl-2, einem zur Bcl-2-Familie gehörendem Protein, einleiten. Hierbei entsteht ein C-terminales Proteinfsegment, welches über Translokation ins Zytoplasma gelangt und dort die Mechanismen der mitochondrial vermittelten Apoptose einleitet. Hierfür ist die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials entscheidend. Es gibt zwei Wege, die Depolarisation auszulösen. Zum Einen direkt durch toxische Sauerstoffverbindungen, bei denen übergeordnete Regulatoren keine Rolle spielen. Zum Anderen durch Bindeglieder zu anderen Signalwegen, wie die zur Bcl-2-Familie gehörigen Proteine Bip/ Bak oder *Bcl-2 assoziiertes X-Protein* (Bax) [39, 63, 102]. Hierbei gibt es pro- und antiapoptotische Proteine, die modulierend auf den Prozess der Apoptose einwirken. Überexpression/ Minderexpression kann somit eine Apoptoseresistenz verursachen. Damit nehmen die Proteine der Bcl-2-Familie eine Schlüsselrolle ein, die mit für die Entwicklung der Chemoresistenz verantwortlich sein könnte [85]. Der Zusammenbruch des Membranpotentials führt zu einer Änderung der Permeabilität, wodurch Signalmoleküle wie zum Beispiel Cytochrom c und

¹⁹Death inducing signaling complex

AIF²⁰, aus dem Intermembranspalt des Mitochondriums ins Zytosol diffundieren. Dort führt es, nach einigen Interaktionen mit weiteren Signalmolekülen, zur Aktivierung der Caspase-9, die dann wiederum die Executor-Caspasen aktiviert und somit die Endstrecke einleitet [103].

1.5 Cyclopamin

Cyclopamin gehört in die Gruppe der Alkaloide und kommt in der Natur in der *Veratrum californicum*, einem Liliengewächs vor. Als Hauptalkaloid des weißen Nieswurz²¹ wurde Cyclopamin als verursachendes Agens für schwere, zyklopenhafte Missbildungen bei Schafherden in Nordamerika identifiziert [48]. An der Universität von Texas fiel dieser Stoff in Laborversuchen durch seine wachstumsinhibierende Wirkung bei verschiedenen Krebszellen auf. Man fand heraus, dass Cyclopamin das „*Sonic Hedgehog* (Shh)-Gen“ blockiert, welches für die Teilung von Zellen mitverantwortlich ist und eine Schlüsselrolle bei der Embryonalentwicklung einnimmt. Infolge der Blockade dieses nachgeschalteten Signalweges wird die unkontrollierte Teilung von Tumorzellen gehemmt. Später konnte man diese These auch bei lebenden Organismen bestätigen. Bei Versuchen an genetisch veränderten Mäusen, die bei UV-Bestrahlung Hautkrebs entwickelten, beobachtete man durch Behandlung mit Cyclopamin einen Rückgang von 90 % bei kleinen und 50 % bei großen Basaliomen [4, 57, 98]. Cyclopamin ist ein organisches Molekül mit amphiphatischem Charakter. Aufgrund seiner Größe von 411 Da kann es frei durch die extrazelluläre Matrix diffundieren. Seine Eigenschaften befähigen es, sich leicht in die Lipidstruktur der Plasmamembran einzugliedern und dort eine inhibierende Wirkung auf das zur Hedgehog-Signalweg-Kaskade gehörende Protein „Smo“ auszuüben [43].

Wirkung

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Cyclopamin zu einer Blockade des Shh-Signalweg führt. Die direkte Interaktion mit Smo führt zu einer Konformationsänderung und damit zur Inaktivierung des ganzen Proteins [19]. Die Substanz greift beim Protein des sogenannten Smo-Gens ein. Beispielsweise konnte bei Hautzellen demonstriert werden, dass, wenn „Smo“ und das zugehörige Regulator-Gen „Ptc“ mutiert sind, eine Entartung zu Krebszellen beobachtet wird. Ptc ist wichtig für die Wirkung

²⁰ Apoptosis inducing factor

²¹ *Veratrum californicum*

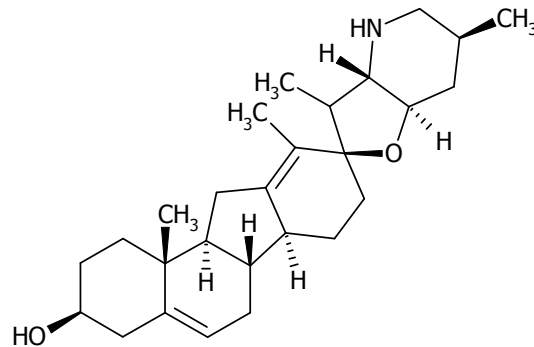


Abb. 1.4: Strukturformel von Cyclopamin

des Hedgehog-Proteins, das, wie bereits unter Punkt 1.5 erwähnt, eine zentrale Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. Während Smo als Schalter für die Embryonalentwicklung fungiert, hat „Ptc“ die Funktion einer „Bremse“ oder eines Tumorsuppressors. Das Hedgehog-Protein leitet die Zellteilung ein, indem es das Ptc-Protein bindet und damit die Bremswirkung aufhebt, was wiederum dem Smo-Eiweiß das „Einschalten“ des Teilungsmechanismus erlaubt.

Es ist bereits bekannt, dass trächtige Tiere, die Cyclopamin-haltige Pflanzen fressen, charakteristisch missgebildeten Nachwuchs zur Welt bringen. Sehr ähnliche Missbildungen beobachteten man auch bei „Knockout“-Mäusen, denen das Hedgehog-Gen fehlte. Daraus schloß man zuerst, dass das Hedgehog-Protein das Ziel von Cyclopamin sein könnte. Spätere Studien mit Knockout-Mäusen ohne das „Ptc“-Gen und mit transgenen Mäusen, die „Smo“ überexprimierten, deuteten jedoch daraufhin, dass das „Smo“-Protein das eigentliche Ziel des Wirkstoffes ist.

Man hofft nun, mit Cyclopamin einen ersten Vertreter von selektiven Zytostatika gefunden zu haben, die spezifisch an definierten Stellen der Teilungs-Signalkette intervenieren und damit mehr als bloße „Zellgifte“ sind. Durch diese Erkenntnis lassen sich möglicherweise effektivere und weniger toxische Chemotherapien entwickeln [98].

1.6 Tomatidin

Tomatidin gehört in die Gruppe der Steroidalkaloide. Es ist ein lipophiles Molekül mit einem Molekulargewicht von 415,64. Eine Wirkung über den *Hedgehog-Signalweg* (Hh-Signalweg) ist nicht bekannt [84]. Aufgrund der Tatsache, dass Tomatidin ebenso wie Cy-

clopamin zu den Alkaloiden gehört und der Wirkmechanismus nicht mit der Hedgehog-Signalkaskade zusammenhängt, wurde es in dieser Arbeit als Negativkontrolle ausgewählt.

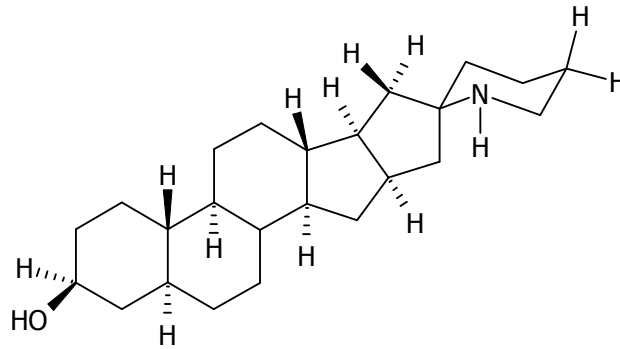


Abb. 1.5: Strukturformel von Tomatidin

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Grundproblem der Verwendung von Chemotherapeutika bei malignen Erkrankungen ist die selektive Beeinflussung der neoplastisch entgleisten Zellen. Bei entarteten Zellen handelt es sich um körpereigene Zellen, die sich nur wenig von ihrer Ursprungszelle unterscheiden. Dadurch ist eine selektive Beeinflussung im Vergleich zum Einsatz von Chemotherapeutika bei Bakterien, die körperfremde Organismen sind, deutlich schwieriger. [35] Obwohl es beträchtliche Fortschritte in der Behandlung der malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems gibt, sind die unerwünschten Arzneimittelwirkungen weiterhin sehr hoch. Zudem behindern die primäre und sekundäre Resistenz der Neoplasie nach wie vor eine endgültigen Heilung. Ziel der Forschung ist daher immer noch eine Therapie, die nur entartete, nicht aber gesunde Zellen angreift, zu entwickeln und somit sowohl die Nebenwirkungen zu reduzieren, als auch die Chancen auf endgültige Heilung zu erhöhen [108]. In der Literatur werden erfolgreiche Versuche mit Cyclopamin an verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs, Prostatakrebs und Colon-CA untersucht und als eine ansprechende, genauer zu untersuchende Therapieoption dargestellt [24, 82, 93, 95]. Es wurde bereits gezeigt, dass der Hh-Signalweg bei der Entstehung der CML eine Rolle spielt [95]. Die Wirkung von Cyclopamin auf gesunde Zellen ist nur unzureichend erforscht. In dieser Arbeit soll die Wirkung des über den Hh-Signalweg angreifenden

Alkaloids „Cyclopamin“ sowie eines weiteren, nicht über den Hh-Signalweg wirkenden Alkaloids „Tomatidin“, auf Leukämiezellen verschiedener Leukämiearten untersucht werden. Im Einzelnen soll die Arbeit Antworten auf folgende Fragen liefern:

1. Welche Wirkung hat Cyclopamin auf Leukämiezellen In-vitro?
2. Wie wirkt sich Cyclopamin auf gesunde Zellen In-vitro aus?
3. Induziert Cyclopamin die Apoptose leukämischer Zellen In-vitro über den Hh-Signalweg ?
4. Hat Cyclopamin eine selektive Wirkung auf maligne Zellen In-vitro?

2 Material und Methoden

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden im Zelllabor der orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim sowie im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien der Kinderklinik des Universitätsklinikums Frankfurt mit Hilfe der hier aufgeführten Geräte durchgeführt.

2.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien

Ciprofloxacin	Bayer, Deutschland
<i>Fötales Kälber Serum (FKS)</i>	Gibco, USA
Ethanol	Merck, Deutschland
<i>Dimethyl Sulfoxide (DMSO)</i>	
Glutamin	Gibco, USA
<i>Interleukin-2 (IL-2)</i>	Chiron, München
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)</i>	Gibco, USA
<i>Phytohämagglutinin (PHA)</i>	
<i>Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)</i>	PAA, USA
RPMI 1640	Gibco, USA

Kits

MTT-Cell Proliferation Kit	Roche, Mannheim
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Freiburg

Annexin V-FITC Apoptosis Detection-Kit-I Bioscience Pharmingen, San Diego

Zytostatika

Cyclopamine

Toronto Research Chemicals Inc,
Toronto

Tomatidin

Toronto Research Chemicals Inc,
Toronto

Antikörper

FACS Antikörper Annexin V

FACS Antikörper Propidiumjodid

Zelllinien

K 562 (CML) ATCC-No.: CCL-243

RS t 4;11(ALL) ATCC-No.: CRL-1873

native Lymphozyten

Arbeitsmaterialien

Brutschrank CO2-Inkubator Hera Cell

Heraeus, Deutschland

Digitalkamera EOS 300 D

Canon, USA

FACS-Gerät FC 500

Beckman Coulter, Krefeld

Kühltruhe

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge, Megafuge 1.0R

Kendro Laboratory Products

Mikroskop DMIL

Leica, Deutschland

Minishaker MS2

IKA, Staufen Deutschland

Neubauer Zählkammer

LO Labor Optik, Deutschland

Photometer, ELISA Processor II

Behring Diagnostics GmbH

Pipetten	Greiner, Deutschland
Pipetten-Pipettusakku	Hirschmann Laborgeräte
Rüttler, Titramax 100	Heidolf, Deutschland
Tiefkältelagergerät HFC 86-460	Heraeus, Deutschland
Wasserbad WB 10	Memmert, Deutschland
Waage BP 221S	Satorius

Software

Ghostwriter

JabRef 2.0.1

LATEX

YAP 2.4

GraphPadPrism 4-00

2.2 Zelllinien/ Zellkultur

Zur Untersuchung des Einflusses des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin auf Leukämiezellen wurden die Zelllinien K 562 (CML), RSt 4;11 (ALL) verwendet sowie Lymphozyten gesunder Probanden. Die Zellen wurden vom pädiatrischen Stammzelllabor der Johann Wolfgang Goethe Universitätsklinik in Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte im nachfolgend aufgeführten Medium bei 37 °C unter einer Atmosphäre mit 5 % *Kohlendioxid* (CO₂):

K 562: RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Glutamin + 0,1 % Ciprofloxacin

RSt 4;11: RPMI 1640 + 20 % FKS + 1 % Glutamin + 0,1 % Ciprofloxacin

Lymphozyten: RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Glutamin + 0,5 % Ciprofloxacin

Für die Zelllinie wurde die Zellkulturen mit einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml angelegt, das Medium wurde 1 Mal pro Woche erneuert und die Kultur nach 72 h¹ auf

¹Zellzahl ca. $1,5 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$

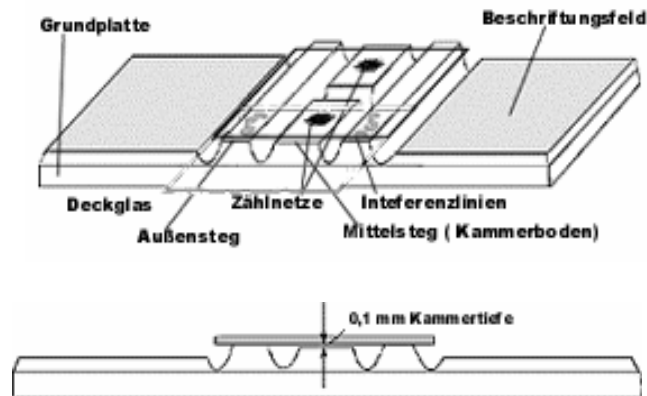


Abb. 2.1: Neubauerzählkammer

die Ausgangszellzahl von 10^6 Zellen/ml gesplittet. Die Lymphozytenzahl wurde auf 10^6 Zellen/ml eingestellt und mit PHA ($10 \mu\text{mol}$) sowie mit rekombinantem humanen IL-2 (100 U/ml) stimuliert [94].

2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zelldichte (Zellzahl/ml) werden $20 \mu\text{l}$ aus der zuvor 10 Sekunden auf dem Minishaker durchmischten und dreimalig resuspendierten Zellsuspension entnommen und in die Neubauerzählkammer gegeben, vgl. Abb. 2.1. Anschließend werden die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zählung der 16 Kleinquadrate, die zusammen ein Grossquadrat ergeben, vgl. Abb. 2.2, erfolgt mäanderförmig, so dass Zellen, die den Rand des Quadrates berühren, nur auf zwei der vier Ränder mitgezählt werden dürfen, vgl. Abb. 2.3. Die Berechnung der Zelldichte ergibt sich aus der Zellzahl (z), den ausgezählten Quadraten (n) sowie dem Kammerfaktor ($K_f = 10^4$), der das Volumen des Grossquadrates berücksichtigt.

$$\text{Zelldichte} = \frac{z \cdot K_f}{n}$$

Beispiel: Bei einer Gesamtzellzahl von 791 (z) in 4 (n) Großquadraten, ergibt sich folgende Berechnung:

$$\text{Zelldichte} = \frac{791 \cdot 10000}{4} = 1977500 \text{ Zellen/ml}$$

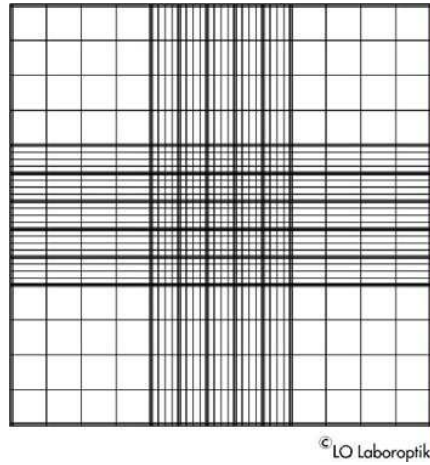


Abb. 2.2: Zählquadrat

2.4 Einfrieren von Zellen

Um auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellreihen² zurückgreifen zu können, wurden Zellen aus bestehenden Kulturen separiert und bei -80°C für maximal 3 Monate eingefroren. Die Zellen wurden mittels Neubauerzählkammer ausgezählt, die $5 - 7 \cdot 10^6$ Zellen entsprechende Menge aus der Kultur entnommen und bei $500 \text{ U}/\text{min}$ 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Das sich absetzende Medium wurde abpipettiert und dem Zellpellet wurden 2 ml folgenden Einfriermediums zugegeben und resuspendiert:

K 562: RPMI 1640 + 20 % FKS + 10 % DMSO

RS t 4;11: RPMI 1640 + 20 % FKS + 10 % DMSO.

Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Cryo-Röhrchen gegeben. Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, erfolgte eine langsame Temperaturreduktion. Zuerst kamen die vorbereiteten Zellen für 4 h bei 4°C in den Kühlschrank, nach weiteren 4 h bei -20°C in der Gefriertruhe, wurden sie zur Langzeiteinfrierung in die -80°C Gefriertruhe überführt.

²K 562, RS t 4;11, native Lymphozyten gesunder Spender

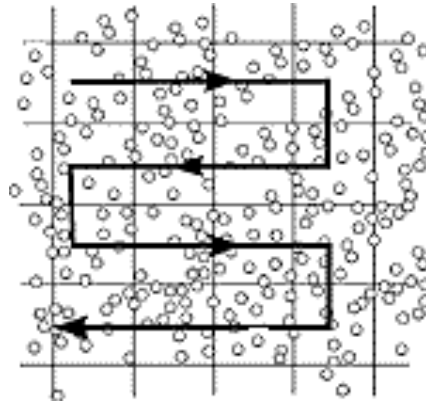


Abb. 2.3: Mäanderförmige Zählung

2.5 Isolierung Mononukleärer Zellen mittels Ficoll Paque PLUS

Die Isolierung von Lymphozyten erfolgte aus heparinisiertem Blut gesunder Probanden. Die hier verwandte Methode basiert auf der Bildung zweier flüssiger Phasen³, die sich aufgrund unterschiedlicher Dichten bilden. Das verwendete Trennmedium „Ficoll-Paque PLUS“ besitzt eine Dichte von $1,077 \pm 10^{-3} \text{ g/cm}^3$. Unter einer sterilen Werkbank wurde eine Verdünnung des Blutes mit PBS im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung von drei Teilen Ficoll-Paque PLUS mit vier Teilen Blut in einem Zentrifugenröhrchen, was zur Bildung der beschriebenen zwei Phasen führte, vgl. Abb. 2.4.

Die nachfolgende Zentrifugation bei 1800 U/min über 40 Minuten bei 19 °C ohne Bremse erzielte die Auftrennung abhängig von ihrer spezifischen Dichte in vier Phasen, vgl. Abb. 2.5. Während sich die Lymphozyten als weißer Ring an der oberen Grenzfläche des Ficoll-Paque PLUS Gradienten anreicherten, fand man ein Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten sowie ein thrombozytenhaltiges PBS/Plasma-Gemisch im Überstand. Die Lymphozyten wurden mit einer sterilen Pasteur Pipette vorsichtig abgesaugt und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS. Hierbei gab man 6 ml PBS hinzu, resuspendierte die Flüssigkeit vorsichtig, stellte die Röhrchen für 10 Minuten bei 1200 U/min und 19 °C mit Bremse in die Zentrifuge und saugte den Überstand ab. Nach Beendigung des zweiten Waschlurch-

³Blut mit Zellen und Trennmedium

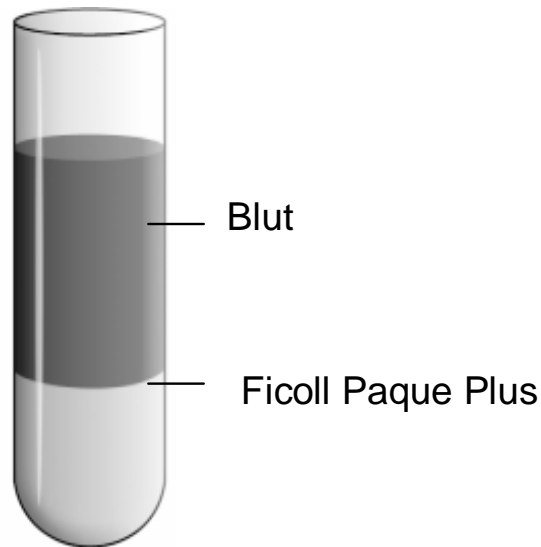


Abb. 2.4: Überschichtung Blut-Ficoll mit zwei-Phasenbildung

ganges wurden die Lymphozyten gezählt und im Kulturmedium⁴ aufgenommen [1].

2.6 Bestimmung des Wachstumsverhaltens

Um das Wachstumsverhalten von Leukämiezellen unter Einfluss des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin beurteilen zu können und dessen inhibitorischen Effekt auf die Signalkaskade zu quantifizieren, wurde eine Wachstumskurve mit den einzelnen Zellreihen angefertigt. Als Negativkontrollsubstanz wurde Tomatidin gewählt. Dies ist ein dem Cyclopamin strukturähnliches Alkaloid, welches keinen Effekt auf den Hedgehog-Signalweg hat. Ethanol wurde in der jeweiligen Kontrollgruppe von Cyclopamin und Tomatidin verwendet. Um den Effekt von Cyclopamin auf gesunde Zellen zu untersuchen, wurden Lymphozyten aus Blut gesunder Probanden mittels Ficoll-Zellisolierung isoliert und ihr Wachstumsverhalten unter den oben genannten Substanzen untersucht.

Es wurden für die einzelnen Zellreihen K 562, RS t 4;11 und Lymphozyten gesunder Probanden jeweils vier Ansätze mit 10^6 Zellen vorbereitet und jedes mit $10 \mu\text{mol}$ Tomatidin, Cyclopamin und Ethanol in der Kontrolle versehen. Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurde die Zellsuspension nach unter Punkt 2.3 beschriebener Methode ausge-

⁴RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % Glutamin, 0,1 % Ciprofloxacin

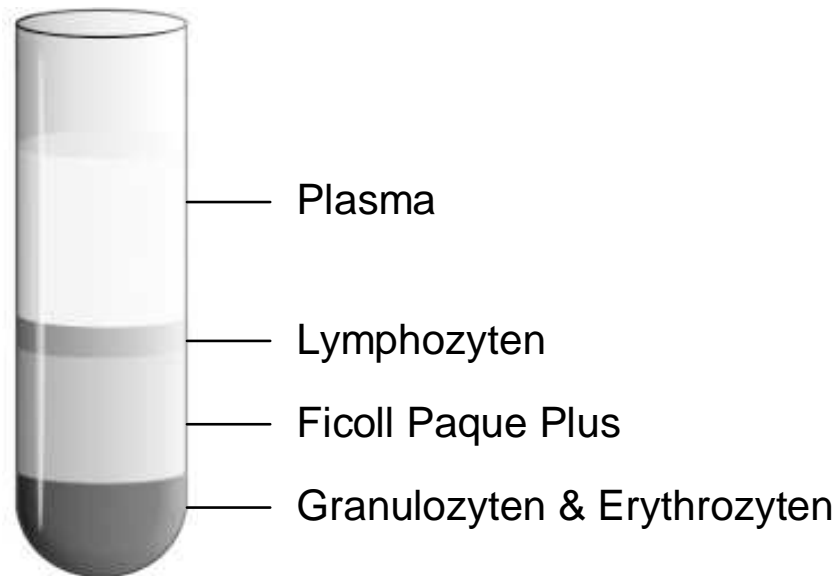


Abb. 2.5: Phasenbildung nach Zentrifugation

zählt und anschließend die Menge berechnet, die entnommen werden muss, um 10^6 /ml Zellen zu erhalten. Diese Menge wurde jeweils auf acht Ansätze (Cyclopamin Probe, Tomatidin Probe, Cyclopamin Kontrolle, Tomatidin Kontrolle) in 10 ml Kulturgefäße verteilt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit $10 \mu\text{l}$ Cyclopamin bzw. $9,04 \mu\text{l}$ Tomatidin versetzt und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Für die Kontrollen wurde die entsprechende Ethanolmenge verwendet. Die Auszählung der Zellen erfolgte nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 Stunden mittels Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop. Nach 72 h wurden sie auf die Ausgangszellzahl von 10^6 gesplittet, und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt.

2.7 Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Assay

Tests, die die Lebensfähigkeit, Überlebensrate und metabolische Aktivität überprüfen, sind von tragender Wichtigkeit bei der Bestimmung der Zytotoxizitäten von Testsubstanzen. Vor rund 20 Jahren wurde von Mosmann und seinem Forschungsteam ein Test eingeführt, mit dem die Umsetzung des löslichen Tetrazoliumsalzes⁵ in das unlösliche Formazan-Präzipitat quantifiziert werden konnte: der sogenannte MTT-Assay. Aufgrund

⁵3-(4,5-Dimethyl-2-Tetrazolyl)-2,5-Diphenyl-2H Tetrazolium-Bromid (MTT)

ihrer positiven Eigenschaften etablierte sich diese Methode als Drug-Zytotoxizitätstestung für In-vitro-Versuche: Der MTT-Test ermöglicht die Quantifizierung vitaler Zellen sowie die Einschätzung von Viabilität und Wachstum einer Zellkultur. Der Grad des MTT-Umsatzes ist ein Maß für die Vitalität der Zellen. Er ist apparativ einfach, wenig zeitaufwendig zudem korreliert die *Extinktion* (E) streng mit der Zahl vitaler Zellen in der zu messenden Probe. Desweiteren kann eine große Anzahl von Proben gemessen werden, die gemäß Hersteller mittels Photometrie ausgewertet werden. Dass diese Methode ohne Verwendung radioaktiver Substanzen auskommt, ist ein zusätzlicher, nicht zu vernachlässigender positiver Aspekt. Das Photometer selektiert aus einer Lichtquelle⁶, der ein Monochromator⁷ nachgeschaltet ist, verschiedene Wellenlängen. Das daraus resultierende monochromatische Licht wird durch die zu messende Küvette geleitet. Das Licht, das in Abhängigkeit der Teilchenkonzentration der Probe abgeschwächt wird, wird am Detektor registriert. Die *Extinktion* (E) ist ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung in einem Medium bei gegebener Wellenlänge. Es gilt $\text{Extinktion} = -\log \text{Transmission}$. Wenn die *Transmission* (T)⁸ 100% beträgt, dann ist die *Extinktion* (E) = 0. Mithilfe dieses Tests bestimmt man die Aktivität der Dehydrogenasen in Mitochondrien, unabhängig davon, ob diese gerade DNS synthetisieren oder nicht. Nach Zugabe des wasserlöslichen MTT⁹ wird dies in die Zellen aufgenommen und durch die mitochondriale Dehydrogenase metabolisiert. Es entsteht dabei aus dieser schwach gelben Lösung durch oxidative Aufspaltung des Tetrazoliumringes das in Alkohol lösliche, lilafarbige Formazan. Da diese kristalline Form die Zellmembran nicht passieren kann, kommt es zu einer Akkumulation des Formazans im Zytosol. Es wurden für die jeweiligen Zellreihen je drei 96er Lochplatten mit den Konzentrationen 1, 10 und 20 μmol angelegt und für 3 Tage inkubiert. Nach 72 Stunden und Durchführung des MTT-Assays erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer.

Die anschließende Solubilisation durch das hinzugegebene Detergenz DMSO¹⁰, lysiert die Zellen und das Formazan wird freigesetzt. Die *Optische Dichte* (OD) der alkoholischen Formazanlösung kann nun photometrisch bestimmt werden. Dabei ist die umgesetzte Menge Formazan direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen und somit zur *Extinktion* (E). Deshalb kann man direkte Rückschlüsse auf die Wirkstärke der zu untersuchenden

⁶ polychromatisches Licht

⁷ Prisma

⁸ Lichtdurchlässigkeit

⁹ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

¹⁰ Lösungsvermittler



Abb. 2.6: Reaktionsschema: Umsetzung von MTT zu Formazan

Substanz ziehen. Wenn die umgesetzte Menge „MTT“ der Kontrolle als 100 % gesetzt wird, erlaubt es, den Grad der Zytotoxizität als Prozent der *Extinktion* (E) anzugeben. Es sollten maximal $4 \cdot 10^4$ Zellen/Well zur Messung gelangen, um die Empfindlichkeit des Tests (Linearität der Reaktion) zu wahren [56]. Zu Beginn wurden 200 ml Stammlösung angesetzt (CML: RPMI + 10 % FKS + 0,5 % Ciprofloxacin; ALL: RPMI + 20 % FKS + 0,5 % Ciprofloxacin). Aus dieser Stammlösung wurden 12 Tubes mit Cyclopamin Probe, Tomatidin Probe, Cyclopamin Probe, Tomatidin Kontrolle mit den Konzentrationen 1, 10 und 20 μmol wie folgt angesetzt:

Tomatidin Probe

- 20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 18,08 μl Tomatidine
- 10 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 9,04 μl Tomatidine
- 1 μmol Lsg: 50 ml Stammlösung + 9,04 μl Tomatidine

Tomatidin Kontrolle

- 20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 18,08 μl Ethanol
- 10 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 9,04 μl Ethanol
- 1 μmol Lsg: 50 ml Stammlösung + 9,04 μl Ethanol

Cyclopamin Probe

- 20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 10 μl Cyclopamine
- 10 μmol Lsg: 1 ml Stammlösung + 1 ml 20 μmolare Cyclopaminlösung
- 1 μmol Lsg: 9 ml Stammlösung + 1 ml 10 μmolare Cyclopaminlösung

Cyclopamin Kontrolle

- 20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 10 μl Ethanol

10 μmol Lsg: 1 ml Stammlösung + 1 ml 20 μmolare Ethanollösung

1 μmol Lsg: 9 ml Stammlösung + 1 ml 10 μmolare Ethanollösung

Die Zellsuspension wurde bei 800 U/min und 18 °C abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit 1 ml Stammlösung resuspendiert und 3 min auf dem Minishaker durchmischt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop mithilfe einer Neubauerzählkammer nach oben aufgeführtem Prinzip. Die nachfolgende Gleichung diente der Berechnung der jeweiligen Menge, die 10^4 Zellen enthält:

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{\text{Gewünschte Zellzahl}}{x \mu\text{l}}$$

Anschließend wurde die entsprechende Menge Zellsuspension jeweils in 12 Tubes pipettiert, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Von den vorbereiteten Lösungen wurde je 1 ml in die entsprechenden Tubes mit Zellen pipettiert, resuspendiert und 1 min auf dem Minishaker durchmischt.

Für jede Zellreihe wurden drei 96er Lochplatten für die Konzentrationen 1, 10 und 20 μmol angelegt, nach dem oben aufgeführten Schema mit 1 ml der jeweiligen Lösungen beimpft und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte im Dunkeln die Zugabe von 10 μl MTT-Labeling, nach weiteren 4 h Inkubation im Brutschrank wurden 100 μl Solubilization Lösung hinzugefügt und über Nacht erneut in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 550-600 nm [88].

2.8 Durchflusszytometrie

Früher war eine Differenzierung hämatopoetischer Zellen nur anhand mikroskopisch ersichtlicher Unterschiede morphologischer Eigenschaften möglich. Nachdem man eine Methode entwickelt hatte, um als Antigene bezeichnete Oberflächenproteine zu erkennen, machte man sich dies zur Charakterisierung von Zellen zunutze, indem man diese Antigene mittels farbstoffmarkierter Antikörper detektierte. Die Fluoreszenzmikroskopie löste nun die morphologische Beurteilung der Zellen im Mikroskop ab. An der Universität Münster entwickelte „von Göhde“ 1968 die Schlüsseltechnologie der heute verwendeten fluoreszenzbasierenden Durchflusszytometrie, auch als FACS-Analyse bezeichnet [51]. Der Begriff FACS bedeutet „fluoreszenz activated cell sorting“. Im Jahre 1972 entwickelte die

Arbeitsgruppe von Leonard A. Herzenberg das erste fluoreszenzgesteuerte Durchflusszytometer [12]. 1974 kam das erste kommerzielle Einkanal-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson auf den Markt. In der weiteren Entwicklung folgten Ende der 1970er Jahre Durchflusszytometer mit zwei Kanälen und Ende der 1980er Jahre mit dem „*fluorescence activated cell sorting* (FACS)–Scan“ der Firma Becton Dickinson und dem „EPICS Profile“ der Firma Coulter die ersten Mehrkanal-Durchflusszytometer. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die einfache schnelle Durchführung der Messung und objektiven Beurteilung großer Zellzahlen mittels Laser. Gleichzeitig erfolgt in einem Durchgang die Charakterisierung sowohl von morphologischen als auch antigenen Eigenschaften. Hierbei wird die Morphologie durch die Streuung des Lasers bestimmt. Ein Streuwinkel zwischen 0° und 10° bezeichnet man als *Forward-Scatter* (FSC), dieser korreliert mit der Zellgröße. Die Laserablenkung im 90° -Winkel charakterisiert die Granularität und wird als *Side-Scatter* (SSC) bezeichnet. Durch die Erfassung der Fluoreszenzen werden die antigenen Eigenschaften beurteilt - die sogenannte „Immunphänotypisierung“. Die durch Fluoreszenzfarbstoffe markierten Antikörper werden mithilfe eines 488 nm Argon-Lasers erfasst. Je nach Gerät können unterschiedlich viele Fluoreszenzen in einer Probe gemessen werden. Aufgrund dieser Tatsache, setzten sich die Mehrkanal-Durchflusszytometer schnell in der breiten kommerziellen Nutzung durch (vgl. Abbildung 2.7). Das Messprinzip ist bis heute dasselbe geblieben. Mittlerweile sind Durchflusszytometer aus Forschung und Routinediagnostik nicht mehr wegzudenken. Sie kommen zur automatischen Erstellung von Blutbildern, zur Immunphänotypisierung, Apoptosemessung und wie der Name schon impliziert, auch zum „Sortieren“ von Zellen zum Einsatz. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde das FACS-Gerät „FC 500“ von Beckman Coulter, welches über zwei Scatter-Kanäle (SSC, FSC) und fünf Fluoreszenzkanäle FL1-5 verfügt, eingesetzt. Die Messung mit dem FC 500 erlaubt eine siebenparametrische Charakterisierung der Zellen: Die Zellgröße, die Granularität sowie drei Fluoreszenzwellenlängen (FL1-FL5).

Zur Ermittlung des, der Zytotoxizität zugrunde liegenden Mechanismus wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit dem Durchflusszytometer „Cytomics FC 500“ von Beckman Coulter. Hierbei wurde PI und Annexin V zur Bestimmung des Anteils lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen in der Zellkultur nach Behandlung mit Cyclopamin und Tomatidin eingesetzt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen werden im Kapitel 3.3 erläutert und graphisch dargestellt.

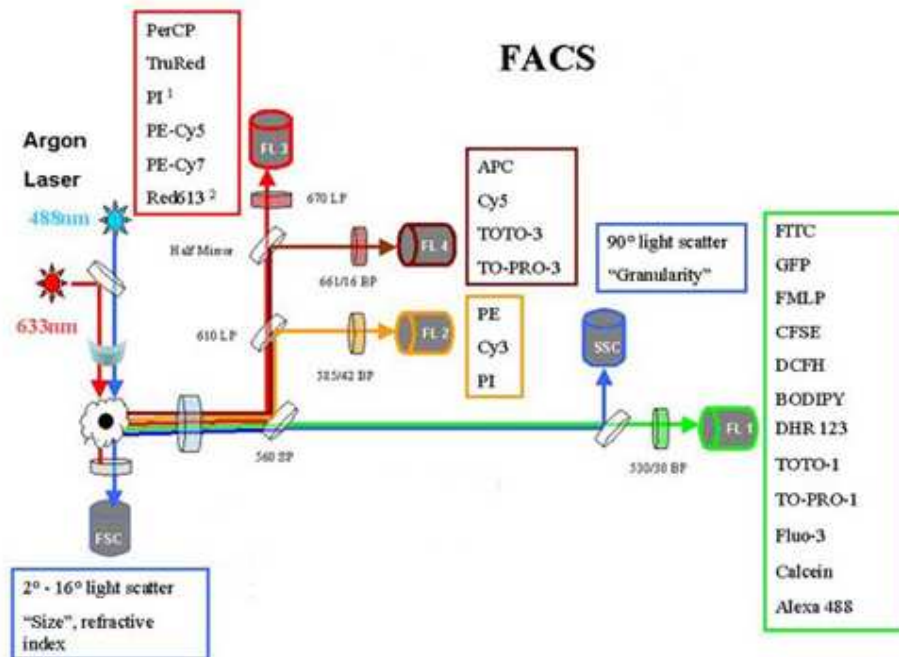


Abb. 2.7: Schematischer Aufbau eines 4-Kanal Durchflusszytometers

Es wurden Zellkulturen der Zellreihe K 562 nach der Behandlung mit Cyclopamin, Tomatidin sowie jeweils deren Kontrollen (Ethanol) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 20 μmol) untersucht. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte die Messung mit PI und Annexin-V im Durchflusszytometer.

Die zytotoxische Wirkung wurde mit folgender Gleichung ermittelt:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = 1 - \frac{\text{Experimenteller Wert}}{\text{Kontrollwert}} \cdot 100$$

Das FACS-Gerät ist funktionell betrachtet aus vier Teilen aufgebaut:

- Der Ansaugvorrichtung,
- der Messzelle mit Laserlichtquelle,
- dem optischen System
- und einem PC zum Auswerten.

Die Verwendung eines FACS setzt das Vorliegen der zu messenden Zellen in einer Suspension voraus. Dies ist notwendig, damit das Gerät die Zellen in einem feinen Strahl isotoner Flüssigkeit („Sheath fluid“) zentrieren und zur Messung vorbereiten kann. Bei der Messung trifft das Laserlicht auf die, mit hoher Geschwindigkeit durch eine Küvette gepulsten Einzelzellen. Dadurch wird die Messung von mehreren tausend Zellen pro Sekunde ermöglicht.

Moderne Geräte erlauben zwei grundsätzlich unterschiedliche Typen von Messungen: Zum Einen werden die *Streulichtmessungen*, die auch als „Scatter“-Profile bezeichnet werden, angewendet. Steht hierbei der Detektor senkrecht zum Laserlicht, wird die Streuung um 90° zur Seite erfasst. Diese charakterisiert die Granularität und wird als SSC bezeichnet. Liegt der Detektor dem Laserlicht gegenüber, erfasst er die Streuung in Längsrichtung. Ein Streuwinkel zwischen 0° und 10° bezeichnet man als *Forward-Scatter* (FSC), dieser entspricht der Zellgröße. Zum Anderen kommen die *Fluoreszenzmessungen* zur Anwendung, bei denen durch einen luftgekühlten Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm ¹¹ verschiedene fluoreszierende Markierungsstoffe angeregt und nach elektronischer Verstärkung mittels spezifischer Detektoren registriert werden können. Da das Emissionsspektrum der Farbstoffe variabel ist, kann es auf verschiedenen Wellenlängen erfolgen, es muss jedoch aus physikalischen Gründen stets langwelliger sein als die Exzitationsfrequenz¹². Als Beispiel sei das in dieser Arbeit verwendete *Propidiumiodid* (PI) genannt, das als Totfarbstoff eine Einschätzung der Vitalität der Zellen in der zu messenden Probe erlaubt (vgl. Abbildung 2.7).

Das FC 500 verfügt über fünf Fluoreszenzkanäle (FL1-FL5), die mittels eingebauten Filtern die Fluoreszenz messen. Zur nachträglichen Fluoreszenzmarkierung gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder werden Farbstoffe verwendet, die unter bestimmten Umständen in die Zellen eindringen und dort intrazelluläre Strukturen wie z.B. DNA färben. Hierzu zählt *Propidiumiodid* (PI), das auf Kanal 3 detektiert wird. Oder man wendet farbstoffkonjugierte Marker, die gegen Oberflächenantigene gerichtet sind an. Dazu gehört beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete, auf Kanal 1 liegende, an *Fluoresceinisothiocyanat* (FITC) gebundenes *Annexin V*. Bei der Wahl der Farbstoffe ist zu beachten, dass diese bei 488 nm anregbar sein müssen.

¹¹entspricht dem blauen Bereich

¹²Exzitation = Anregung

Annexin V

Annexin V ist ein 36 kDa großes, nicht-glykolisiertes Phosphoprotein. Erstmals wurde es 1984 von Bohn entdeckt, aus der menschlichen Placenta isoliert und „Placental protein 4“ genannt [42]. 1985 gewann eine Arbeitsgruppe von Reutelingsperger selbiges aus der Nabelschnur und nannte es aufgrund seiner gerinnungshemmenden Eigenschaft „vascular anticoagulant alpha“, erst später wurde es in die Substanz-Familie der Annexine eingeordnet [87]. Heute steht es für In-vitro Versuche als rekombinantes Annexin V zu Verfügung. Da es die Eigenschaft besitzt, eine kalziumabhängige starke Bindung mit Phospholipiden einzugehen, eignet es sich zur Untersuchung von Vorgängen an der Zellmembran während der Apoptose. In der frühapoptotischen Phase wird *Phosphatidylserin* (PS) von der Innenseite der Membran nach außen verlagert. Gekoppelt an FITC einen Fluoreszenzmarker und seiner sehr hohen Affinität zu PS, wird es zur Identifizierung apoptotischer Zellen eingesetzt [55, 105].

Propidiumiodid

PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur bei defekter Zellmembran die Fähigkeit besitzt in die Zelle einzudringen. Aufgrund dieser Eigenschaft, kann man so den Anteil toter Zellen in einer Suspensionslösung identifizieren.

2.8.1 Apoptosemessung mit Annexin V und Propidiumiodid

Diese Messmethode ermöglicht die Darstellung unterschiedlicher Wege/ Stadien des Zelltodes sowie die Abgrenzung vitaler Zellen durch unterschiedliche Anfärbbarkeit/ Markierung mit Annexin V und PI. Die Lipiddoppelmembran besteht aus zwei Reihen amphiphiler Phosphoglyceride, die mit ihren lipophilen Anteilen aufeinander zu gerichtet, mit den hydrophilen Anteilen dem wässrigen Milieu¹³ zugewandt sind. Bei gesunden Zellen unterliegt die Lipiddoppelmembran der Zellen einer strengen Asymmetrie. Während der Apoptose ist diese Asymmetrie nachhaltig gestört, wodurch Phosphatreste auch auf der Außenseite zu finden sind. In Anwesenheit von zytosolischer Kalziumkonzentration, bindet Annexin V an PS und löst im FACS mit seiner Fluoreszenzgruppe ein Signal aus, welches als Nachweis für den Apoptosevorgang dient. In der frühen Apoptose ist die Zellmembran noch intakt, so dass DNA-Farbstoffe wie PI nicht in die Zelle eindringen können. Diese Gegebenheit macht man sich zunutze, indem man zuerst eine Färbung mit Annexin V, dann eine Gegenfärbung mit PI durchführt, so dass man eine Unterscheidung

¹³Interstitium, Zytosol

von vitalen, früh-/ spätapoptotischen und nicht über Apoptose zugrunde gegangenen Zellen erhält.

Eine *vitale Zelle* färbt sich weder mit PI noch mit Annexin V. Hier sind die Phosphatreste in der Zellmembran nach innen gerichtet verankert. Bei der Auswertung der Fluoreszenzkanalmessung liegen dann alle Signale im linken unteren Quadranten (N3). *Frühapoptotische Zelle*, bei der die Membran zwar noch intakt, aber eine im Vergleich zu vitalen Zellen gestörte Asymmetrie¹⁴ vorliegt, können so mit dem Antikörper Annexin V detektiert werden. Die Färbung ist demnach Annexin V-positiv aber PI-negativ. Die Signale liegen im rechten unteren Quadranten (N4). Bei einer Zelle, die im *weiterfortgeschrittenen Apoptosestadium* ist, wird neben der gestörten Asymmetrie, die Membran wasserdurchlässig und der DNA-interkalierende Farbstoff PI gelangt ins Zellinnere. Das Signal liegt hierbei auf Fluoreszenzkanal 3 und 4. Dadurch wird sie zum Annexin V-positiven zusätzlich PI-positiv. Hier liegen alle Signale im rechten oberen Quadranten (N2). *Tote Zellen*¹⁵ färben sich ausschließlich PI positiv und sind im linken oberen Quadranten abgebildet (N1).

2.8.2 Versuchsdurchführung

schematische Übersicht des Versuchsaufbaues

1. Kultivierung der Zellen für den Versuchansatz
2. Inkubation des Zellansatzes (10^6 Zellen/ml) mit Cyclopamin und Tomatidin sowie der jeweiligen Kontrolle mit Ethanol
3. Inkubationszeit von 72 Stunden
4. Vorbereitung zur durchflusszytometrischen Messung mit Annexin V-FITC und PI
5. Messung im FACS-Analysegerät

Es wurden 200 ml Stammlösung vorbereitet (CML: RPMI + 10 % FKS + 0,5 % Ciprofloxacin; ALL: RPMI + 20 % FKS + 0,5 % Ciprofloxacin) und daraus 8 Tubes Cyclopamin Probe, Tomatidin Probe, Cyclopamin Kontrolle sowie Tomatidin Kontrolle in den Konzentrationen von 10 und 20 μmol wie folgt angesetzt:

¹⁴Phosphatreste sind auch auf der Außenseite der Zellmembran zu finden

¹⁵nicht über den programmierten Zelltod zugrundegegangene Zellen

Tomatidin Probe

Lösung für 20 μmol : 5 ml Stammlösung + 18,08 μl Tomatidin

Lösung für 10 μmol : 5 ml Stammlösung + 9,04 μl Tomatidin

Tomatidin Kontrolle

20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 18,08 μl Ethanol

10 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 9,04 μl Ethanol

Cyclopamin Probe

20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 10 μl Cyclopamine

10 μmol Lsg: 1 ml Stammlösung + 1 ml 20 μmolare Cyclopaminlösung

Cyclopamin Kontrolle

20 μmol Lsg: 5 ml Stammlösung + 10 μl Ethanol

10 μmol Lsg: 1 ml Stammlösung + 1 ml 20 μmolare Ethanollösung

Die Zellsuspension wurde bei 800 U/min und 18 °C abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit 1 ml Stammlösung resuspendiert und 3 Minuten auf dem Minishaker durchmischt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop mittels Neubauerzählkammer nach unter 2.3 aufgeführtem Prinzip. Die Menge, in der 10^6 Zellen vorhanden sind, wurde mithilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl}}{1000 \mu\text{l}} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{x \mu\text{l}}$$

Die berechnete Menge Zellsuspension wurde jeweils in 8 Tubes pipettiert, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Von den vorbereiteten Lösungen wurde je 1 ml in die entsprechenden Tubes mit Zellen pipettiert, resuspendiert, 1 min auf dem Minishaker durchmischt und in die Wells der 10 und 20 μmol Lochplatten gegeben. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte die Vorbereitung zur FACS-Analyse. Nach Absaugung des Überstandes, resuspendierte man das Zellepet mit Binding Puffer. Die Menge des Puffers wurde so gewählt, dass sich anschließend eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml in der Suspension befand. Danach wurden von den Proben Cyclopamin, Tomatidin und den zugehörigen Kontrollen jeweils 100 μl Zellsuspension sowie jeweils 5 μl Annexin V und PI in ein Analyseröhrchen gegeben und durchmischt. Die 15 minütige Inkubationsphase wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Im Anschluss wurde jedes Röhrchen mit 400 μl Binding Puffer aufgefüllt. Um für die Messung eine gleichmäßige Zellverteilung zu erreichen, wurden die Röhrchen vor der sich anschließenden Messung

im Durchflusszytometer vorsichtig geschüttelt.

2.8.3 Auswertung

Die Auswertung der Analyse erfolgte mit der CSP-Software für das Durchflusszytometer Coulter FC 500. Zur Statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPadPrism 4-00 für Windows verwendet. Die, die Messung darstellenden Grafiken werden im Folgenden erläutert: Im *Diagramm 1* werden auf der Y-Achse *Forward-Scatter* (FSC) zur Erfassung der Größe und auf der X-Achse *Side-Scatter* (SSC) zur Erfassung der Granularität gegeneinander aufgetragen. Um keine verzerrten Ergebnisse durch Zelldebridement oder nicht gewünschte Zellpopulationen¹⁶ zu erhalten, wird ein Lifegate gesetzt. Als Gate wird ein bestimmter Bereich in der graphischen Auswertung der Messungen bezeichnet, in dem alle dort gemessenen Zellen eine bestimmte gemeinsame Eigenschaft haben. Zur Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen dient das *Diagramm 2*. Hier werden *Side-Scatter* (SSC) und *Propidiumiodid* (PI)¹⁷ dargestellt. Avitale Zellen nehmen PI auf, vitale Zellen hingegen nicht. Das *Diagramm 3* dient der Unterscheidung lebender (N3), früh- (N4), spätapoptotischer (N2) sowie nekrotischer¹⁸ (N1) Zellen. Die X-Achse der Grafiken zeigt die Anzahl der gemessenen Annexin V-positiven Zellen¹⁹ an, die Y-Achse stellt die Anzahl der gemessenen PI-positiven Zellen²⁰ dar. Lebende Zellen färben sich weder mit Annexin V noch mit PI²¹. Frühapoptotische Zellen sind Annexin V positiv, aber PI negativ, spätapoptotische Zellen sind sowohl Annexin V positiv, als auch PI positiv²². Tote Zellen, die nicht über den programmierten Zelltod zugrunde gegangen sind, färben sich PI positiv.

¹⁶bei Zelllinien von untergeordneter Relevanz

¹⁷ein DNA-Farbstoff

¹⁸nicht über Apoptose zugrundegegangene Zellen

¹⁹logarithmisch dargestellt

²⁰logarithmisch dargestellt

²¹doppelt-negativ

²²doppelt-positiv

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

Zur Beurteilung und Quantifizierung der inhibitorischen Effekte des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin auf das Wachstumsverhalten von Leukämiezellen wurde eine Wachstumskurve mit den einzelnen Zellreihen K 562, RS t 4;11 und Lymphozyten gesunder Probanden mit einer Cyclopaminkonzentrationen von $10 \mu\text{mol}$ nach dem unter 2.6 beschriebenen Prinzip angefertigt.

3.1.1 K 562

Bei der Zellreihe K 562 ist im Ansatz 1 (Cyclopamin Probe) zuerst ein Rückgang der Zellzahl unter den Ausgangswert, im weiteren Verlauf eine Inhibition des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ansatz 2 Ethanol) von 67,49% zu erkennen (vgl. Tab. 3.1 sowie Abb. 3.1 auf Seite 43). Der Ansatz 3 mit Tomatidin hingegen zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Ethanol (Ansatz 4) eine Inhibition von 39,97% (vgl. Tab. 3.2 und Abb. 3.2). Auf den Abbildungen 3.3 und 3.4 sind beide Substanzen im Vergleich dargestellt.

3.1.2 RS t 4;11

Auch bei den Zellen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (RS t 4;11) ist im Ansatz 1 (Cyclopamin Probe) eine deutliche Zellzahlreduktion bei einer Wachstumsinhibition von 77,14% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ansatz 2 Ethanol), mit einer anfänglichen Reduktion der Zellzahl zu beobachten (vgl. Tab. 3.5 sowie Abb. 3.5 auf Seite 47). Im Ansatz 3 (Tomatidin) beträgt die Wachstumsinhibition verglichen mit der Kontrollgruppe (Ansatz 4) 21,22%. Damit ist diese deutlich niedriger, als bei den, mit Cyclopamin behandelten Zellen aus Ansatz 1 (vgl. Tab. 3.6 sowie Abb. 3.6). In den Abbildungen 3.7 und 3.8 sind Cyclopamin und Tomatidin im Vergleich dargestellt.

3.1.3 Lymphozyten

Die Versuchsreihe der Lymphozyten zeigt, verglichen mit der Kontrollgruppe (Ansatz 2 mit Ethanol) nach der Behandlung mit Cyclopamin (Ansatz 1), eine Wachstumsinhibition von 17,83% (vgl. Tab. 3.9 sowie die dazugehörige Abb. 3.9 auf Seite 51). Versetzt man die Lymphozyten mit Tomatidin, lässt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Wachstumsinhibition von 27,32% feststellen. (vgl. Tab. 3.10 und Abb. 3.10 auf Seite 52). Beide Substanzen werden in den Abbildungen 3.11 und 3.12 auf Seite 53 im Vergleich dargestellt.

3.1.4 Abbildungen und Tabellen

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	688.333	688.333	
	48	834.167	834.167	
	72	994.167	994.167	MW
	96	1.120.833	1.120.833	
	120	1.067.500	1.067.500	
	144	1.289.167	1.289.167	
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	954.583	954.583	
	48	1.255.833	1.255.833	
	72	1.583.333	1.583.333	Splitt
	96	1.334.167	2.107.983	1,58
	120	1.729.167	2.732.083	1,58
	144	2.510.000	3.965.800	1,58
Inhibition = 67,49 %				

Tab. 3.1: Zellzählung K 562 bei 10 μmol Cyclopamin

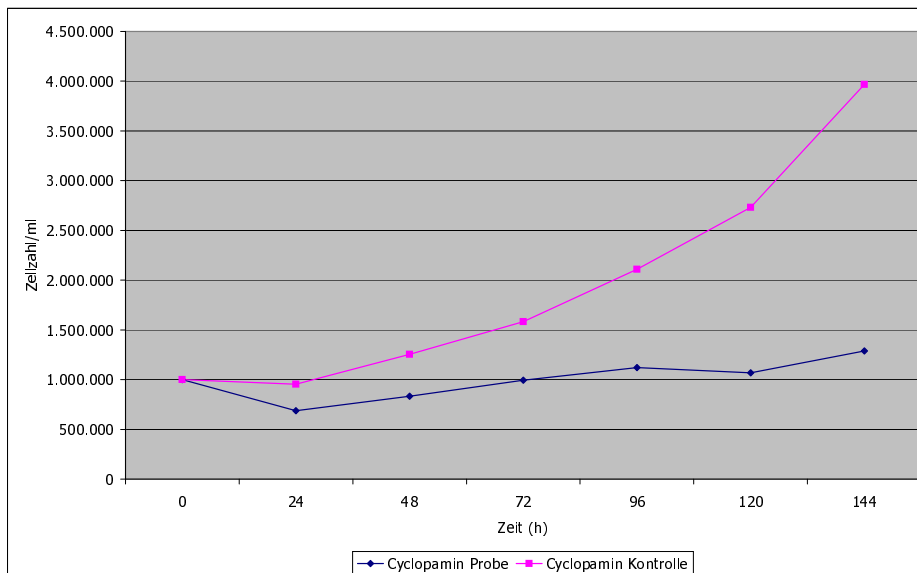


Abb. 3.1: Wachstumskurve K 562 bei 10 μmol Cyclopamin

3 Ergebnisse

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	934.167	934.167	
	48	1.214.167	1.214.167	
	72	1.493.333	1.493.333	Splitt
	96	1.120.833	1.670.042	1,49
	120	1.367.500	2.037.575	1,49
	144	1.597.500	2.380.275	1,49
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	954.583	954.583	
	48	1.255.833	1.255.833	
	72	1.583.333	1.583.333	Splitt
	96	1.334.167	2.107.983	1,58
	120	1.729.167	2.732.083	1,58
	144	2.510.000	3.965.800	1,58
Inhibition = 39,98 %				

Tab. 3.2: Zellzählung K 562 bei 10 μ mol Tomatidin

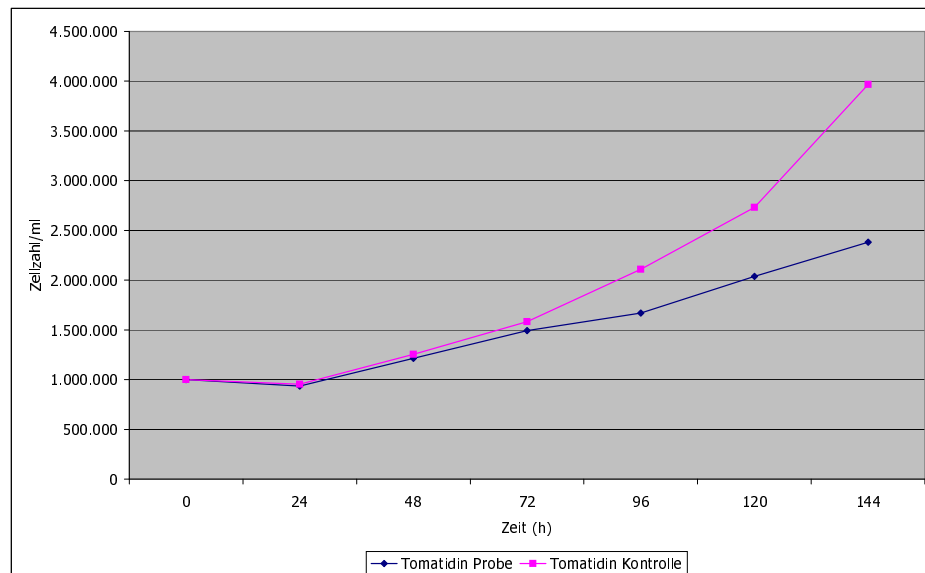


Abb. 3.2: Wachstumskurve K 562 bei 10 μ mol Tomatidin

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

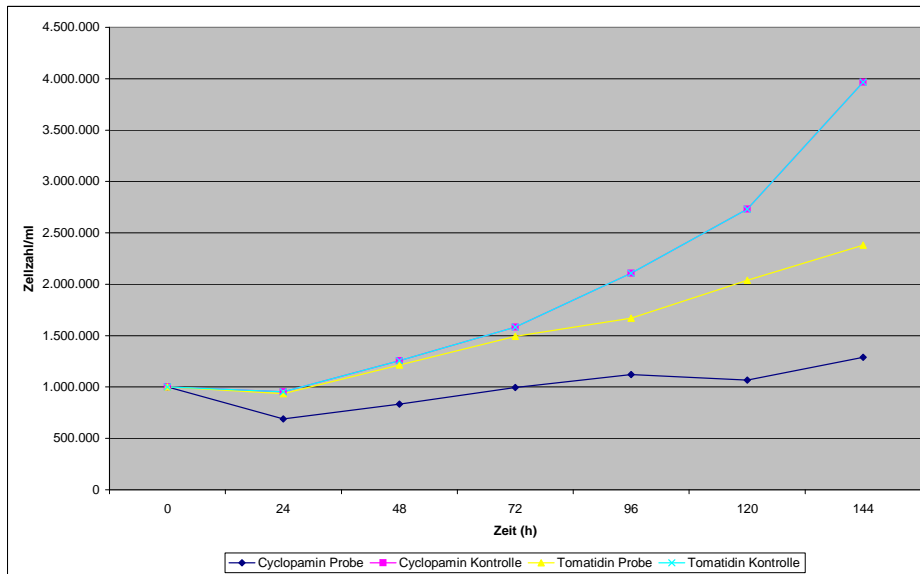


Abb. 3.3: Wachstumskurve K 562 bei 10 µmol Cyclopamin und Tomatidin

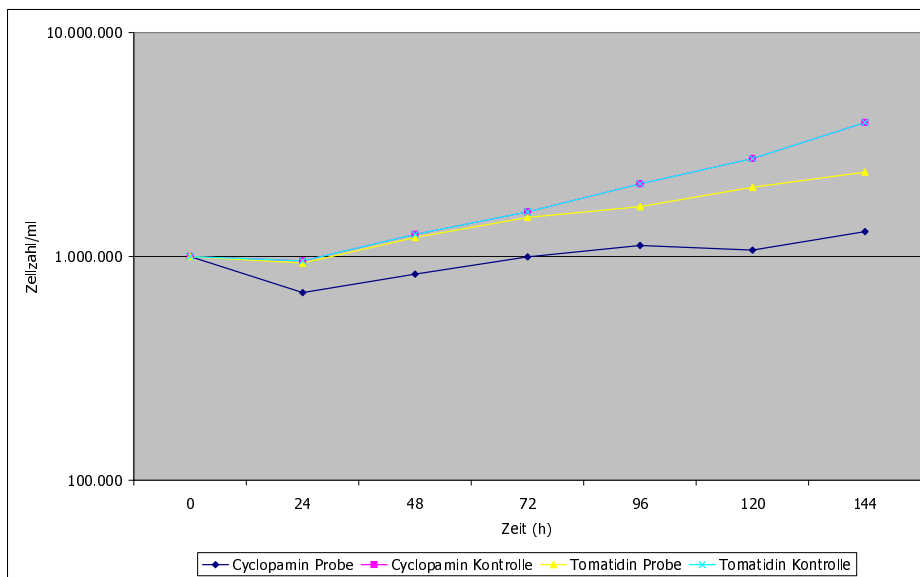


Abb. 3.4: Wachstumskurve K 562 logarithmiert bei 10 µmol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	670.000	685.000	710.000	688.333
	48	845.000	802.500	755.000	488.333
	72	1.060.000	1.012.500	910.000	994.167
	96	1.237.500	1.015.000	1.110.000	1.120.833
	120	1.077.500	1.040.000	1.085.000	1.067.500
	144	1.270.000	1.352.500	1.245.000	1.289.167
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	950.000	865.000	1.050.000	955.000
	48	1.292.500	1.280.000	1.195.000	1.255.833
	72	1.567.500	1.715.000	1.467.500	1.583.333
	96	1.457.500	1.197.500	1.347.500	1.334.167
	120	1.777.500	1.665.000	1.745.000	1.729.167
	144	1.665.000	1.625.000	1.502.500	1.597.500

Tab. 3.3: Zählungsreihen K 562 bei 10 μ mol Cyclopamin

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	950.000	865.000	1.050.000	955.000
	48	1.292.500	1.280.000	1.195.000	1.255.833
	72	1.567.500	1.715.000	1.467.500	1.583.333
	96	1.457.500	1.197.500	1.347.500	1.334.167
	120	1.777.500	1.665.000	1.745.000	1.729.167
	144	1.665.000	1.625.000	1.502.500	1.597.500
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	957.500	922.500	922.500	934.167
	48	1.145.000	1.277.500	1.220.000	1.214.167
	72	1.465.000	1.605.000	1.410.000	1.493.333
	96	1.102.500	1.335.000	1.360.000	1.265.833
	120	1.415.000	1.462.500	1.225.000	1.367.500
	144	2.565.000	2.520.000	2.445.000	2.510.000

Tab. 3.4: Zählungsreihen K 562 bei 10 μ mol Tomatidin

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	905.833	905.833	
	48	873.167	873.167	
	72	1.291.667	1.291.667	MW
	96	1.035.833	1.035.833	
	120	1.232.500	1.232.500	
	144	1.428.333	1.428.333	
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.136.667	1.136.667	
	48	1.502.500	1.502.500	
	72	2.489.167	2.489.167	Splitt
	96	1.445.000	3.598.050	2,49
	120	1.780.000	4.432.200	2,49
	144	2.510.000	6.249.900	2,49
Inhibition = 77,15 %				

Tab. 3.5: Zellzählung RS t 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin

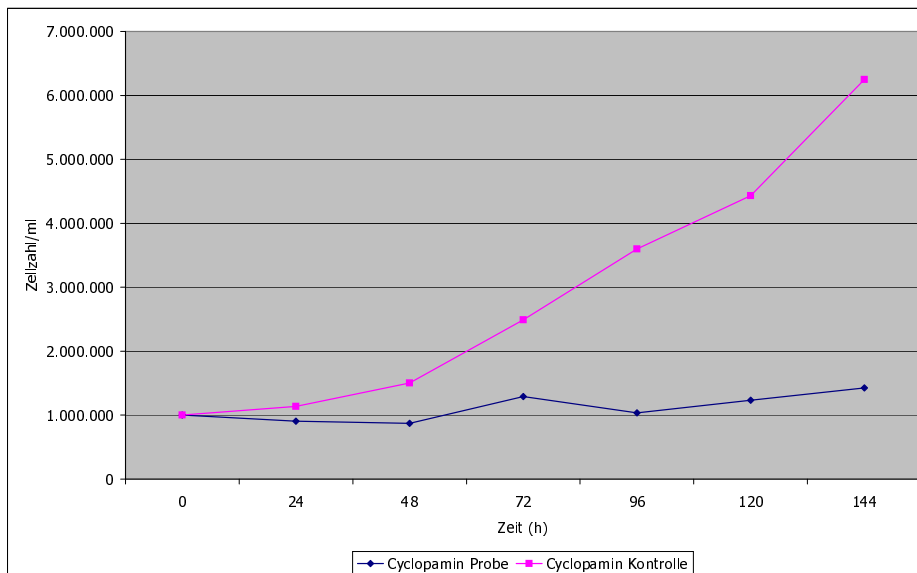


Abb. 3.5: Wachstumskurve RS t 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin

3 Ergebnisse

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.275.000	1.275.000	
	48	1.548.333	1.548.333	
	72	2.426.667	2.426.667	Splitt
	96	1.334.167	3.242.025	2,43
	120	1.443.333	3.507.300	2,43
	144	1.983.333	4.819.500	2,43
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.158.333	1.158.333	
	48	1.567.500	1.567.500	
	72	2.404.167	2.404.167	Splitt
	96	1.500.000	3.600.000	2,4
	120	1.947.500	4.674.000	2,4
	144	2.549.167	6.118.000	2,4
Inhibition = 21,22 %				

Tab. 3.6: Zellzählung RS t 4;11 bei 10 μ mol Tomatidin

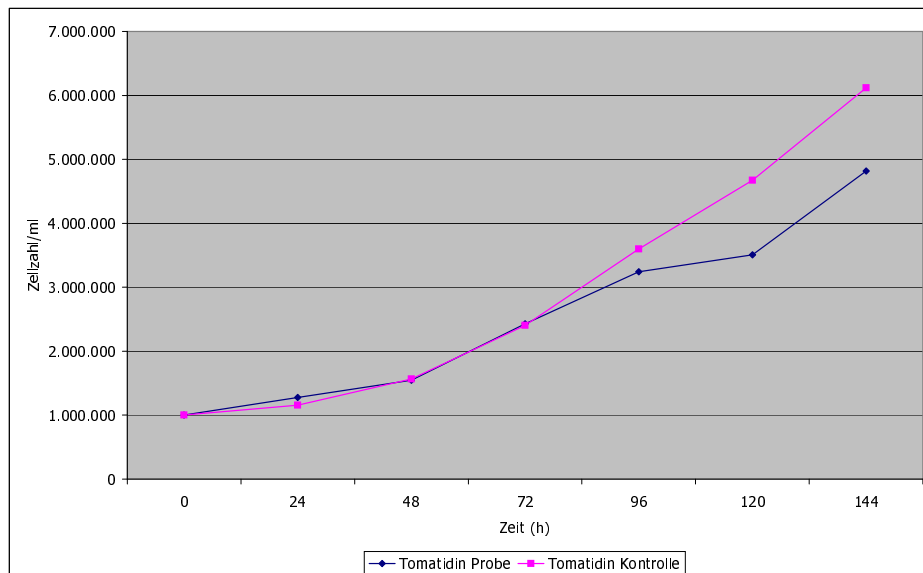


Abb. 3.6: Wachstumskurve RS t 4;11 bei 10 μ mol Tomatidin

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

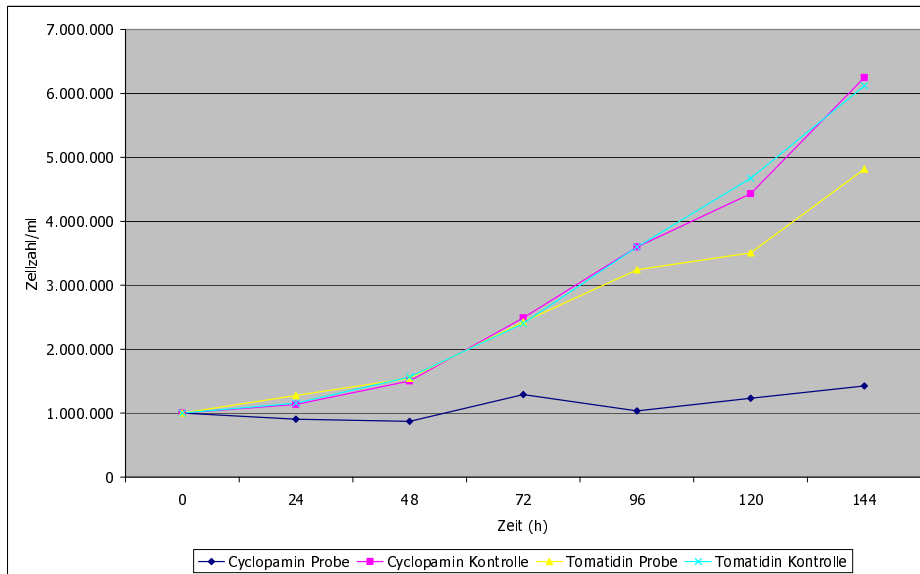


Abb. 3.7: Wachstumskurve RSt 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

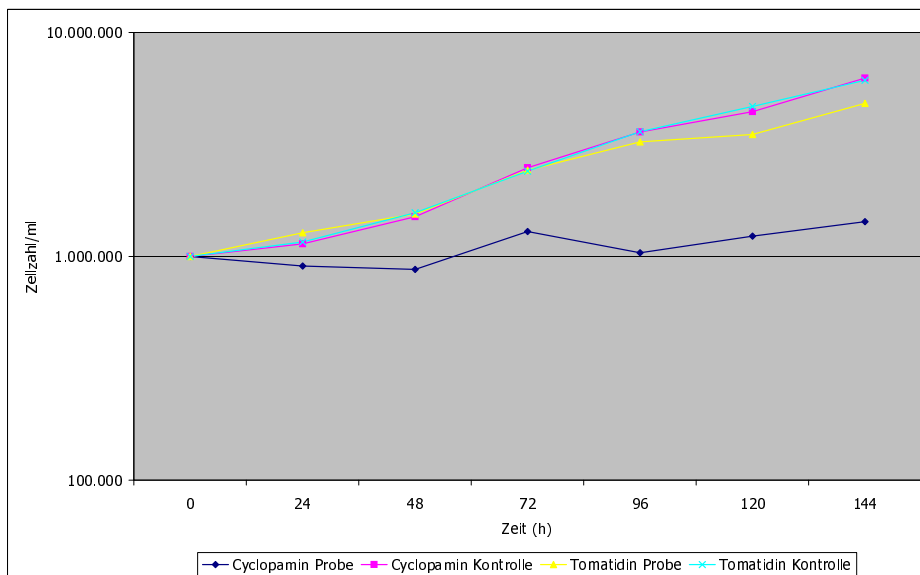


Abb. 3.8: Wachstumskurve RSt 4;11 logarithmiert bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	890.000	857.500	970.000	905.833
	48	947.500	837.500	830.000	871.667
	72	1.230.000	1.365.000	1.280.000	1.291.667
	96	1.040.000	1.052.500	1.015.000	1.035.833
	120	1.232.500	1.267.500	1.197.500	1.232.500
	144	1.375.000	1.440.000	1.470.000	1.428.333
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.092.500	1.067.500	1.025.000	1.061.667
	48	1.515.000	1.542.500	1.450.000	1.502.500
	72	2.567.500	2.470.000	2.430.000	2.489.167
	96	1.485.000	1.432.500	1.417.500	1.445.000
	120	1.855.000	1.740.000	1.745.000	1.780.000
	144	2.565.000	2.520.000	2.445.000	2.510.000

Tab. 3.7: Zählungsreihen RS t 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.330.000	1.200.000	1.295.000	1.275.000
	48	1.435.000	1.622.500	1.587.500	1.548.333
	72	2.432.500	2.377.500	2.470.000	2.426.667
	96	1.227.500	1.480.000	1.295.000	1.334.167
	120	1.497.500	1.327.500	1.505.000	1.443.333
	144	1.995.000	1.942.500	2.012.500	1.983.333
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.167.500	1.092.500	1.215.000	1.158.333
	48	1.625.000	1.487.500	1.590.000	1.567.500
	72	2.547.500	2.352.500	2.312.500	2.404.167
	96	1.480.000	1.525.000	1.495.000	1.500.000
	120	1.987.500	1.885.000	1.970.000	1.947.500
	144	2.622.500	2.495.000	2.530.000	2.549.167

Tab. 3.8: Zählungsreihen RS t 4;11 bei 10 μ mol Tomatidin

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.414.167	1.414.167	
	48	2.193.333	2.289.167	
	72	2.289.167	2.289.167	Splitt
	96	1.330.833	3.167.383	2,38
	120	2.026.667	4.823.467	2,38
	144	2.151.667	5.120.967	2,38
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.423.333	1.423.333	
	48	2.158.333	2.158.333	
	72	2.532.500	2.532.500	Splitt
	96	1.612.500	4.079.625	2,53
	120	2.190.000	5.540.700	2,53
	144	2.463.333	6.232.233	2,53
Inhibition = 17,83 %				

Tab. 3.9: Zellzählung Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin

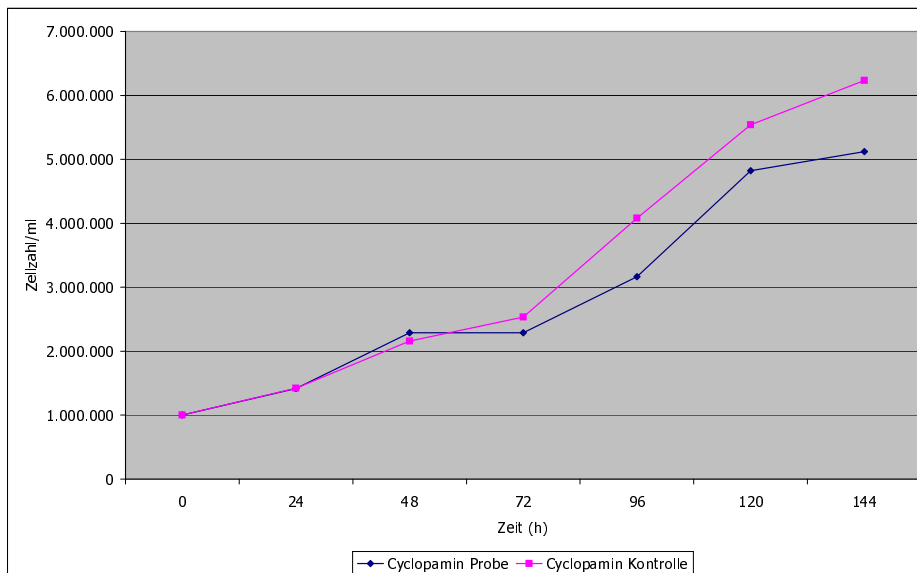


Abb. 3.9: Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μmol Cyclopamin

3 Ergebnisse

	Zeit (h)	Zellzahl/ml	Zellzahl/ml · VF	VF
Probe	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.373.333	1.373.333	
	48	2.020.000	2.020.000	
	72	2.354.167	2.354.167	Splitt
	96	1.659.167	4.031.775	2,43
	120	1.737.500	4.222.125	2,43
	144	1.881.667	4.572.450	2,43
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	
	24	1.450.833	1.450.833	
	48	2.150.000	2.150.000	
	72	2.508.333	2.508.333	Splitt
	96	1.288.333	3.233.717	2,51
	120	2.231.667	5.601.483	2,51
	144	2.506.667	6.291.733	2,51
Inhibition = 27,33 %				

Tab. 3.10: Zellzählung Lymphozyten bei 10 μ mol Tomatidin

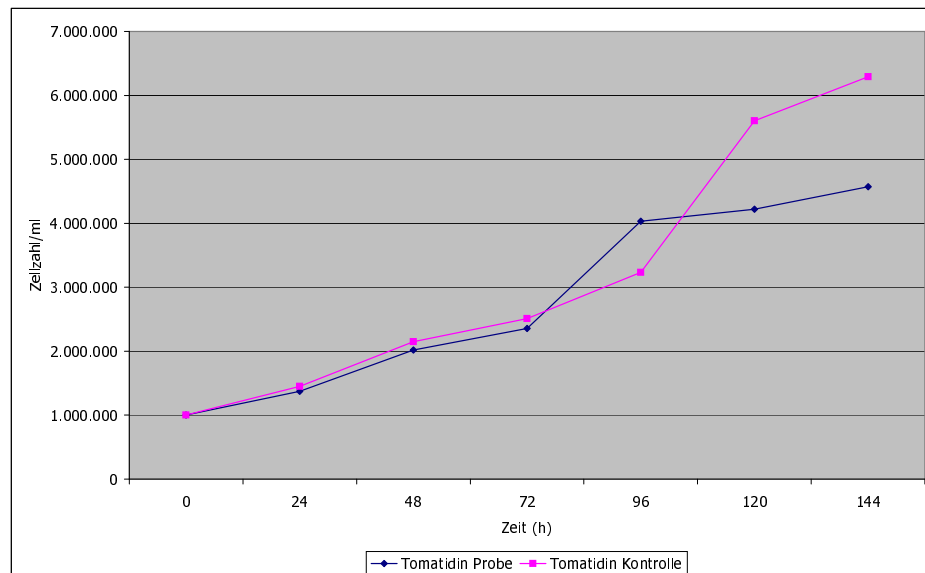


Abb. 3.10: Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μ mol Tomatidin

3.1 Auswertung der Wachstumskurve

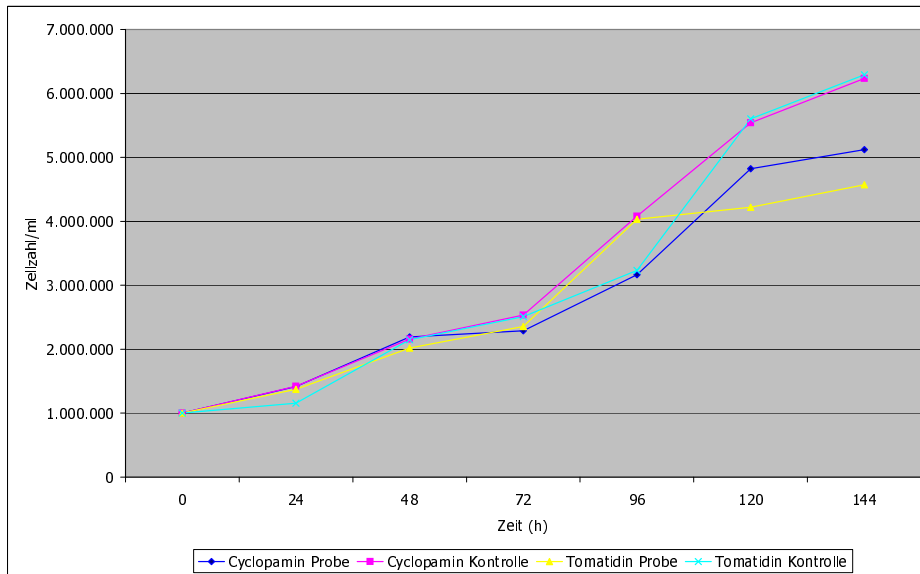


Abb. 3.11: Wachstumskurve Lymphozyten bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

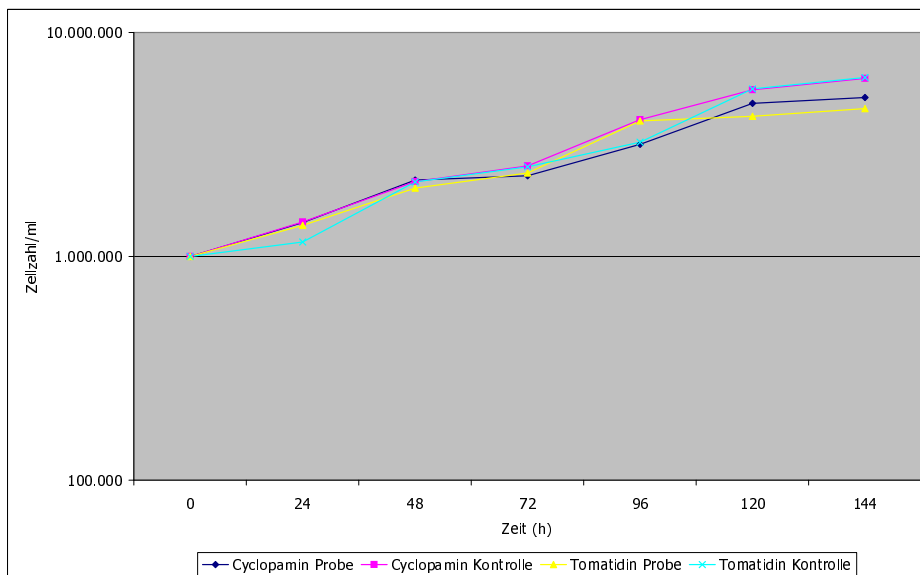


Abb. 3.12: Wachstumskurve Lymphozyten logarithmiert bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.272.500	1.497.500	1.472.500	1.414.167
	48	2.082.500	2.235.000	2.262.500	2.193.333
	72	2.240.000	2.355.000	2.387.500	2.327.500
	96	1.277.500	1.442.500	1.272.500	1.330.833
	120	1.922.500	2.205.000	1.952.500	2.026.667
	144	2.082.500	2.177.500	2.195.000	2.151.667
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.492.500	1.335.000	1.442.500	1.423.333
	48	2.057.500	2.190.000	2.227.500	2.158.333
	72	2.360.000	2.542.500	2.635.000	2.512.500
	96	1.525.000	1.635.000	1.677.500	1.612.500
	120	2.200.000	2.115.000	2.255.000	2.190.000
	144	2.495.000	2.390.000	2.505.000	2.463.333

Tab. 3.11: Zählungsreihen Lymphozyten bei 10 μ mol Cyclopamin

		Zählung			Durchschnitt
	Zeit (h)	1	2	3	
Probe	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.317.500	1.440.000	1.362.500	1.373.333
	48	1.967.500	2.035.000	2.057.500	2.020.000
	72	2.200.000	2.495.000	2.367.500	2.354.167
	96	1.270.000	1.242.500	1.352.500	1.288.333
	120	1.532.500	2.055.000	1.625.000	1.737.500
	144	1.882.500	1.752.500	2.010.000	1.881.667
Kontrolle	0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
	24	1.382.500	1.500.000	1.470.000	1.450.833
	48	2.197.500	2.117.500	2.135.000	2.150.000
	72	2.450.000	2.517.500	2.557.500	2.508.333
	96	1.715.000	1.520.000	1.742.500	1.659.167
	120	2.227.500	2.280.000	2.187.500	2.231.667
	144	2.502.500	2.435.000	2.582.500	2.506.667

Tab. 3.12: Zählungsreihen Lymphozyten bei 10 μ mol Tomatidin

3.2 Auswertung des MTT-Assays

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Zellzählungen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die Menge der aktiven mitochondrialen Dehydrogenase ist ein Indikator für die Stoffwechselaktivität und damit für die Vitalität der Zellen. Beim MTT-Test erfolgt die enzymatische Umsetzung des hydrophilen MTTs zum lipophilen Formazan metabolisch aktiver Zellen mittels Spaltung des Tetrazoliumringes durch die mitochondriale Dehydrogenase. Anhand der Messung der optischen Dichte lassen sich die vitalen, stoffwechselaktiven Zellen quantifizieren und Rückschlüsse auf die Proliferationsrate und Zellzahl ziehen.

Es wurden für die Zellreihen K 562, RSt 4;11 und Lymphozyten gesunder Probanden die Messungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 20 μmol), nach der unter 2.7 beschriebenen Methode durchgeführt.

3.2.1 K 562

Die Zelllinie K 562, die mit der Konzentration von 1 μmol versetzt wurde, zeigt bei Cyclopamin eine Wachstumssteigerung von 0,89 %, bei Tomatidin eine Inhibition von 10,68 % (vgl. Tab. 3.13 und Abb. 3.13 auf Seite 57). Die Konzentration von 10 μmol bewirkte beim Ansatz mit Cyclopamin eine Inhibition von 35,65 %, bei Tomatidin von 37,42 %. (vgl. 3.14 sowie Abb. 3.14 auf Seite 58). Bei 20 μmol hemmte Cyclopamin das Wachstum um 93,12 %, Tomatidin um 46,78 % (vgl. Tabelle 3.15 sowie Abb. 3.15 auf Seite 59).

3.2.2 RSt 4;11

Die Zelllinie RSt 4;11 aus der Gruppe der akuten lymphatischen Leukämien ließ unter 1 μmol Cyclopamin eine Wachstumsinhibition von 10,88 % beobachten, Tomatidin bewirkte eine Steigerung des Zellwachstums um 5,15 % (vgl. Tabelle 3.16 sowie Abb. 3.16). Die Messung des Ansatzes mit 10 μmol ergab bei der Probe mit Cyclopamin eine Inhibition von 60,62 %, die mit Tomatidin versetzte Probe verzeichnete eine Wachstumshemmung von 24,41 % (vgl. 3.17 sowie Abb. 3.17). Die Konzentration von 20 μmol bewirkte im Ansatz mit Cyclopamin eine Hemmung von 76,16 % und bei Tomatidin von 30,61 % (vgl. Tab. und Abb. 3.18).

3.2.3 Lymphozyten

Die zur Beurteilung der Wirkung von Cyclopamin auf gesunde Zellen eingesetzten Lymphozyten zeigten bei der Konzentration von $1\ \mu\text{mol}$ in beiden Fällen eine Wachstumssteigerung - bei Cyclopamin von 3,28 %, bei Tomatidin von 12,11 %. (Vgl. 3.19 sowie Abb. 3.19). Der Ansatz mit $10\ \mu\text{mol}$ hemmte in vergleichbarer Stärke das Wachstum der Zellen. Bei Cyclopamin um 14,19 %, bei Tomatidin um 12,08 % (vgl. Tab. 3.20 und Abb. 3.20). Eine Konzentration von $20\ \mu\text{mol}$ hatte bei den Lymphozyten im Cyclopaminansatz eine wachstumshemmende Wirkung von 44,57 %, im Ansatz mit Tomatidin ließ sich eine Hemmung von 8,98 % feststellen (vgl. Tab. und Abb. 3.21).

In den beiden folgenden Abbildungen ist die Zellvitalität der einzelnen Zellreihen bei den drei untersuchten Konzentrationen von Cyclopamin (vgl. Abb. 3.22) und Tomatidin (Abb. 3.23) im Vergleich dargestellt.

3.2.4 Abbildungen und Tabellen

	Well	Cyclopamin			Tomatidin		
		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,451	0,443	0,441	0,499	0,498	0,504
	2	0,601	0,605	0,609	0,547	0,576	0,543
	3	0,703	0,690	0,697	0,570	0,576	0,571
	4	0,621	0,621	0,627	0,561	0,559	0,546
	5	0,668	0,671	0,676	0,486	0,487	0,492
	∅	0,608			0,534		
Kontrolle	1	0,606	0,609	0,614	0,549	0,549	0,551
	2	0,622	0,608	0,601	0,625	0,625	0,629
	3	0,704	0,635	0,633	0,610	0,616	0,619
	4	0,598	0,566	0,566	0,612	0,613	0,613
	5	0,566	0,558	0,561	0,585	0,587	0,590
	∅	0,603			0,598		
Inhibition		-0,89%			10,68%		

Tab. 3.13: Extinktion MTT-Assay K 562 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin

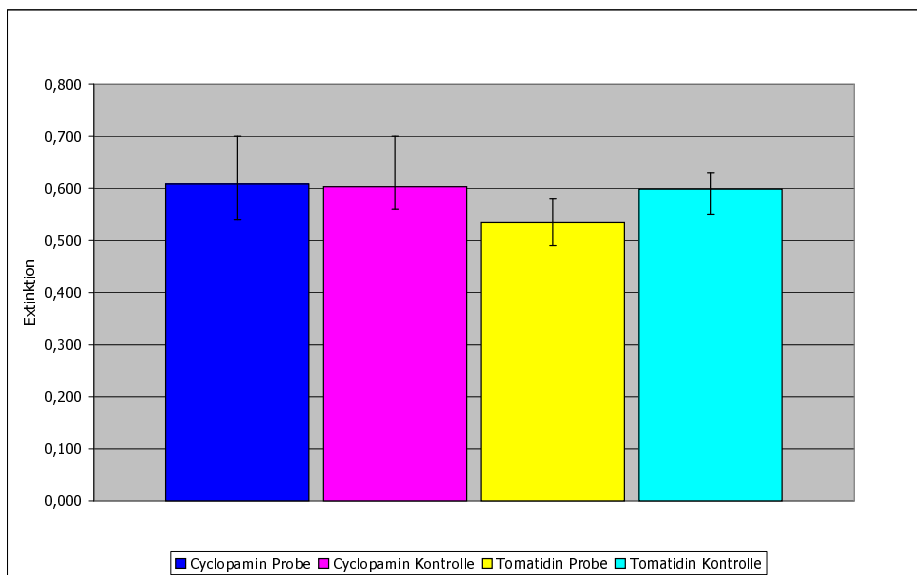


Abb. 3.13: Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

		Cyclopamin			Tomatidin		
	Well	1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,401	0,402	0,405	0,362	0,361	0,364
	2	0,412	0,411	0,414	0,399	0,399	0,402
	3	0,407	0,407	0,409	0,398	0,400	0,401
	4	0,401	0,401	0,403	0,405	0,408	0,41
	5	0,368	0,368	0,370	0,392	0,390	0,391
	∅		0,399			0,392	
Kontrolle	1	0,593	0,592	0,595	0,565	0,564	0,566
	2	0,640	0,642	0,649	0,641	0,642	0,645
	3	0,637	0,635	0,639	0,641	0,642	0,64
	4	0,621	0,608	0,596	0,610	0,611	0,612
	5	0,615	0,614	0,616	0,672	0,673	0,675
	∅		0,619			0,627	
Inhibition		35,65 %			37,42 %		

Tab. 3.14: Extinktion MTT-Assay K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin

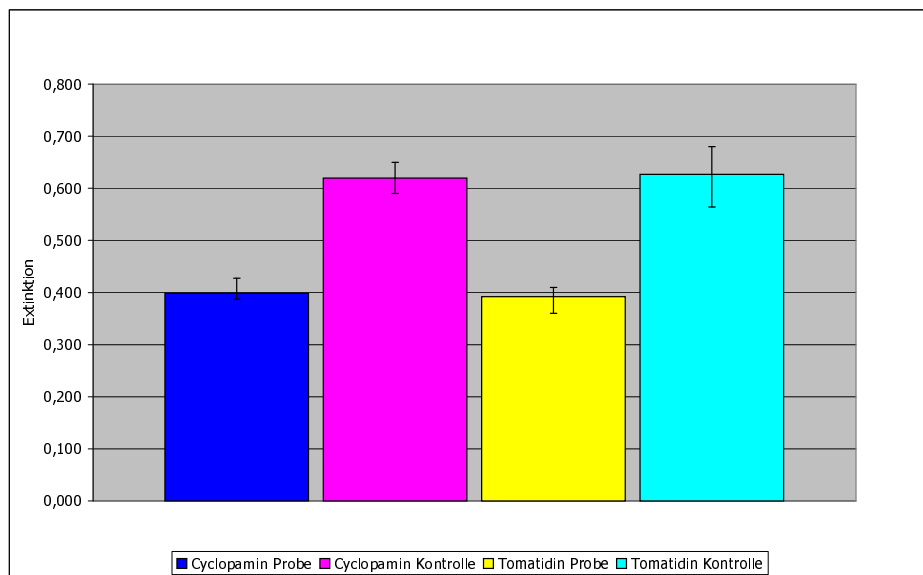


Abb. 3.14: Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 10 μmol Cyclopamin und Tomatidin

	Well	Cyclopamin			Tomatidin		
		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,031	0,032	0,032	0,239	0,240	0,241
	2	0,053	0,053	0,053	0,380	0,381	0,381
	3	0,053	0,053	0,053	0,383	0,376	0,379
	4	0,056	0,056	0,056	0,358	0,358	0,358
	5	0,039	0,039	0,040	0,363	0,364	0,366
	∅	0,047			0,343		
Kontrolle	1	0,714	0,715	0,719	0,573	0,577	0,576
	2	0,700	0,685	0,686	0,663	0,666	0,669
	3	0,617	0,613	0,612	0,657	0,656	0,66
	4	0,695	0,691	0,689	0,718	0,720	0,722
	5	0,672	0,676	0,676	0,600	0,602	0,602
	∅	0,677			0,644		
Inhibition		93,12 %			46,78 %		

Tab. 3.15: Extinktion MTT-Assay K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin

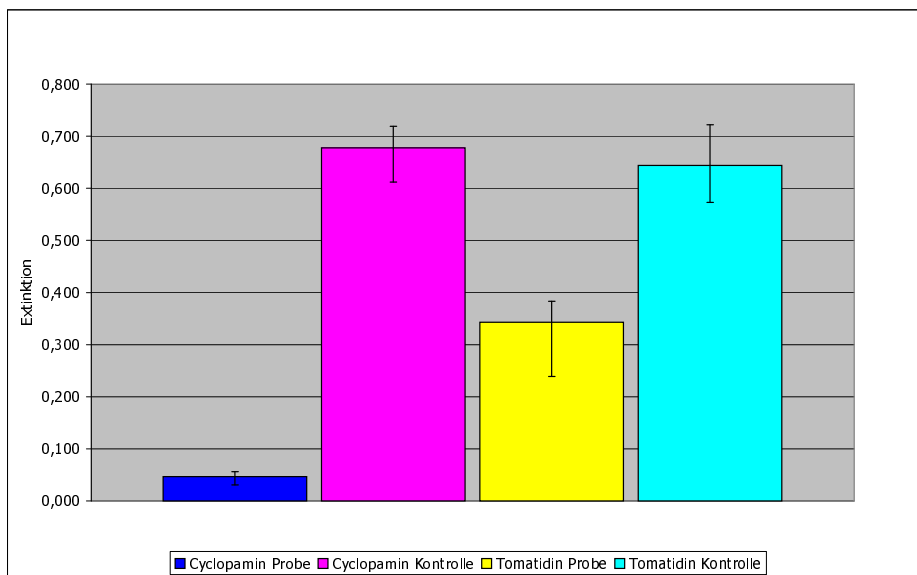


Abb. 3.15: Zellvitalität MTT-Assay K 562 bei 20 μmol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

		Cyclopamin			Tomatidin		
	Well	1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,192	0,193	0,194	0,204	0,204	0,205
	2	0,219	0,220	0,222	0,213	0,215	0,216
	3	0,204	0,203	0,205	0,229	0,229	0,228
	4	0,195	0,195	0,195	0,229	0,230	0,23
	5	0,191	0,192	0,193	0,218	0,218	0,219
	∅		0,201			0,219	
Kontrolle	1	0,225	0,228	0,221	0,201	0,205	0,203
	2	0,172	0,174	0,174	0,207	0,207	0,208
	3	0,243	0,244	0,245	0,213	0,214	0,215
	4	0,243	0,245	0,245	0,208	0,208	0,208
	5	0,240	0,241	0,241	0,209	0,210	0,21
	∅		0,225			0,208	
Inhibition		10,88 %			-5,15 %		

Tab. 3.16: Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 1 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

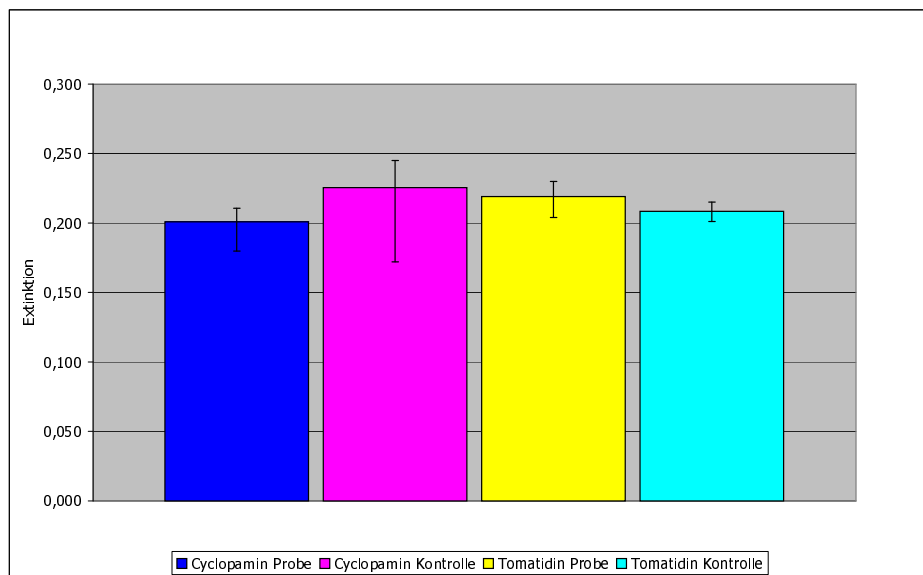


Abb. 3.16: Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 1 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

	Well	Cyclopamin			Tomatidin		
		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,077	0,077	0,077	0,164	0,164	0,164
	2	0,088	0,087	0,088	0,171	0,171	0,171
	3	0,083	0,083	0,084	0,169	0,170	0,169
	4	0,082	0,083	0,082	0,171	0,172	0,172
	5	0,085	0,085	0,085	0,172	0,172	0,171
	∅	0,083			0,170		
Kontrolle	1	0,172	0,172	0,173	0,218	0,218	0,219
	2	0,190	0,189	0,191	0,221	0,222	0,222
	3	0,219	0,219	0,221	0,223	0,223	0,224
	4	0,216	0,217	0,217	0,233	0,234	0,234
	5	0,255	0,255	0,258	0,224	0,224	0,225
	∅	0,211			0,224		
Inhibition		60,62 %			24,41 %		

Tab. 3.17: Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

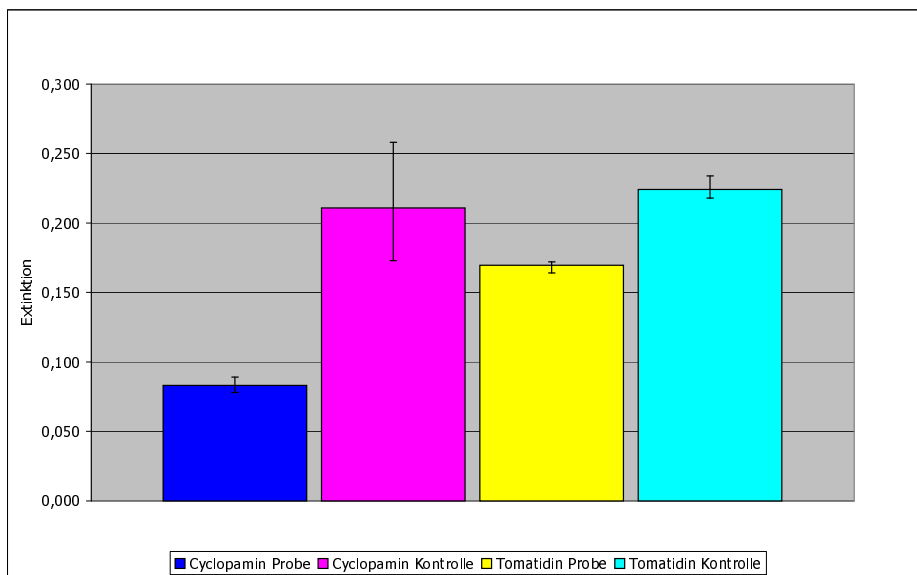


Abb. 3.17: Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

		Cyclopamin			Tomatidin		
	Well	1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,063	0,074	0,075	0,204	0,204	0,204
	2	0,062	0,071	0,074	0,156	0,157	0,157
	3	0,044	0,052	0,053	0,160	0,160	0,161
	4	0,047	0,056	0,055	0,153	0,153	0,153
	5	0,018	0,025	0,026	0,154	0,153	0,153
	∅		0,053			0,165	
Kontrolle	1	0,216	0,217	0,217	0,231	0,232	0,232
	2	0,225	0,225	0,227	0,237	0,237	0,237
	3	0,226	0,225	0,226	0,241	0,241	0,242
	4	0,216	0,217	0,217	0,242	0,242	0,242
	5	0,227	0,227	0,227	0,240	0,240	0,241
	∅		0,222			0,238	
Inhibition		76,16 %			30,61 %		

Tab. 3.18: Extinktion MTT-Assay RS t 4;11 bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

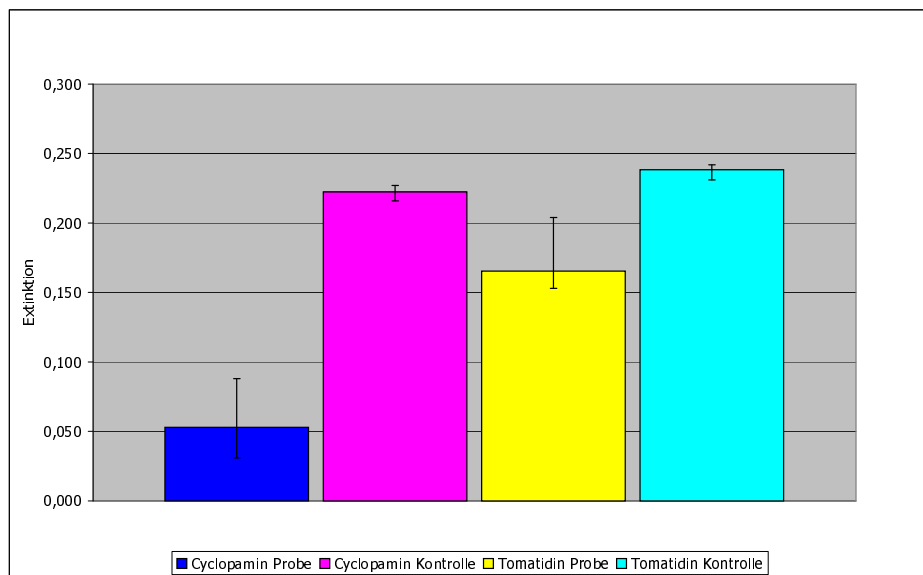


Abb. 3.18: Zellvitalität MTT-Assay RS t 4;11 bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

		Cyclopamin			Tomatidin		
Well		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,418	0,430	0,415	0,438	0,436	0,424
	2	0,424	0,409	0,420	0,440	0,439	0,458
	3	0,435	0,434	0,439	0,455	0,454	0,451
	4	0,414	0,409	0,412	0,418	0,415	0,418
	5	0,401	0,405	0,408	0,476	0,467	0,459
	∅		0,418			0,443	
Kontrolle	1	0,403	0,406	0,400	0,385	0,384	0,381
	2	0,404	0,405	0,397	0,399	0,402	0,399
	3	0,433	0,414	0,406	0,386	0,377	0,376
	4	0,386	0,386	0,385	0,402	0,397	0,397
	5	0,412	0,424	0,413	0,415	0,414	0,416
	∅		0,405			0,395	
Inhibition		-3,28 %			-12,11 %		

Tab. 3.19: Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin

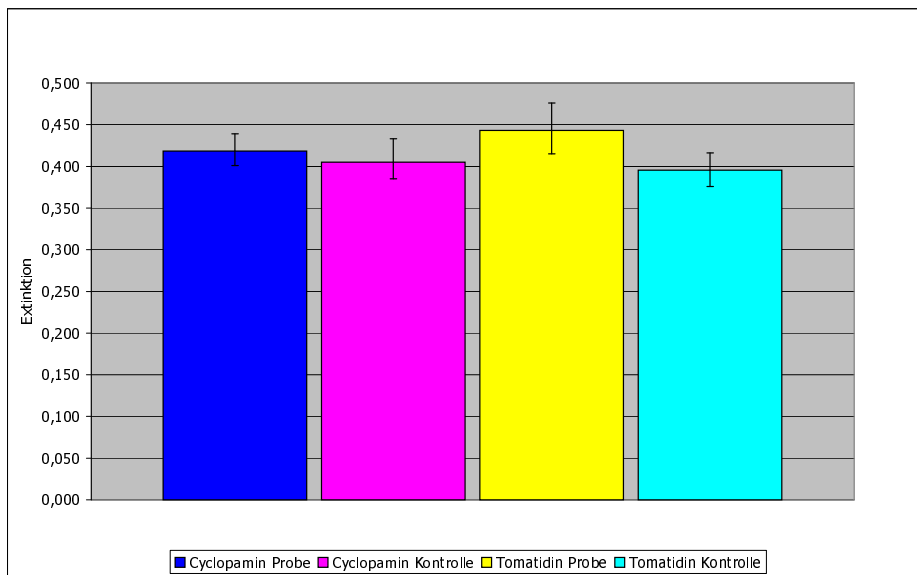


Abb. 3.19: Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 1 μmol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

	Well	Cyclopamin			Tomatidin		
		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,334	0,334	0,338	0,304	0,304	0,295
	2	0,345	0,348	0,351	0,312	0,323	0,326
	3	0,344	0,350	0,351	0,350	0,345	0,321
	4	0,339	0,339	0,347	0,323	0,318	0,314
	5	0,354	0,354	0,359	0,287	0,287	0,294
	∅		0,346			0,314	
Kontrolle	1	0,371	0,361	0,374	0,343	0,341	0,345
	2	0,429	0,424	0,430	0,378	0,373	0,391
	3	0,410	0,409	0,406	0,361	0,357	0,364
	4	0,406	0,416	0,422	0,334	0,331	0,339
	5	0,396	0,391	0,400	0,360	0,364	0,368
	∅		0,403			0,357	
Inhibition		14,19 %			12,08 %		

Tab. 3.20: Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

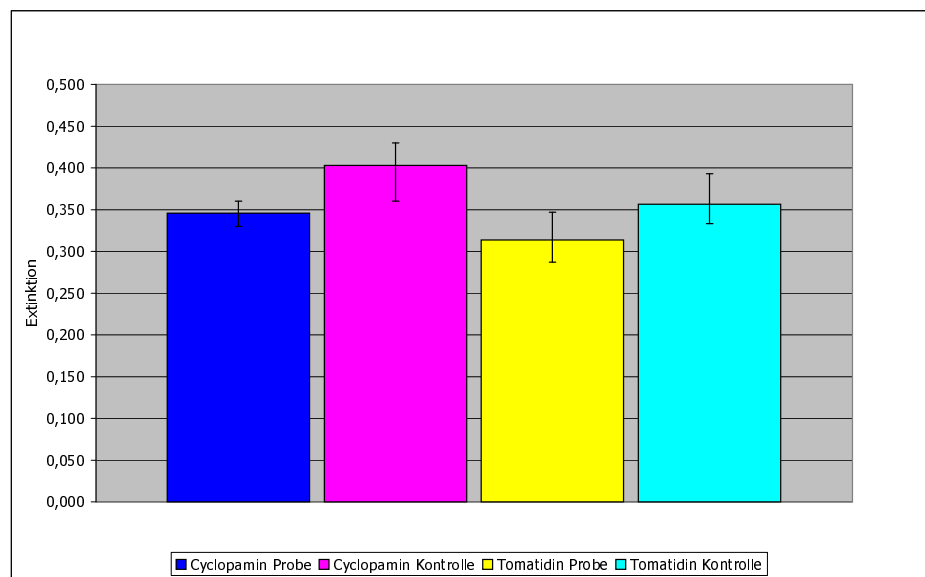


Abb. 3.20: Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

	Well	Cyclopamin			Tomatidin		
		1	2	3	1	2	3
Probe	1	0,267	0,267	0,269	0,354	0,355	0,355
	2	0,214	0,215	0,216	0,339	0,339	0,342
	3	0,193	0,192	0,193	0,345	0,347	0,34
	4	0,218	0,219	0,219	0,338	0,337	0,343
	5	0,202	0,202	0,206	0,422	0,416	0,414
	∅		0,219			0,359	
Kontrolle	1	0,401	0,403	0,407	0,351	0,350	0,351
	2	0,448	0,449	0,439	0,199	0,198	0,199
	3	0,367	0,367	0,367	0,408	0,399	0,398
	4	0,349	0,349	0,351	0,321	0,334	0,338
	5	0,416	0,416	0,410	0,386	0,388	0,322
	∅		0,396			0,329	
Inhibition		44,57 %			-8,98 %		

Tab. 3.21: Extinktion MTT-Assay Lymphozyten bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

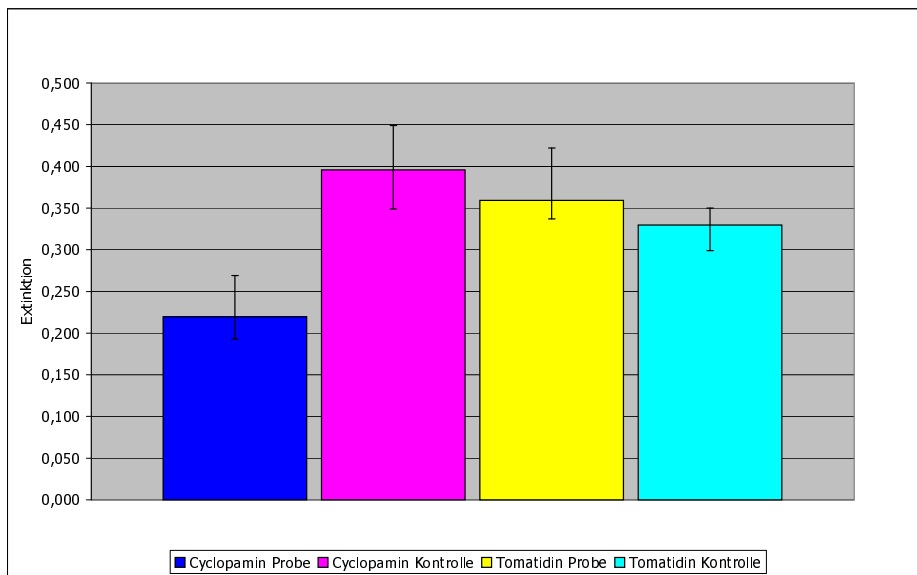


Abb. 3.21: Zellvitalität MTT-Assay Lymphozyten bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

3 Ergebnisse

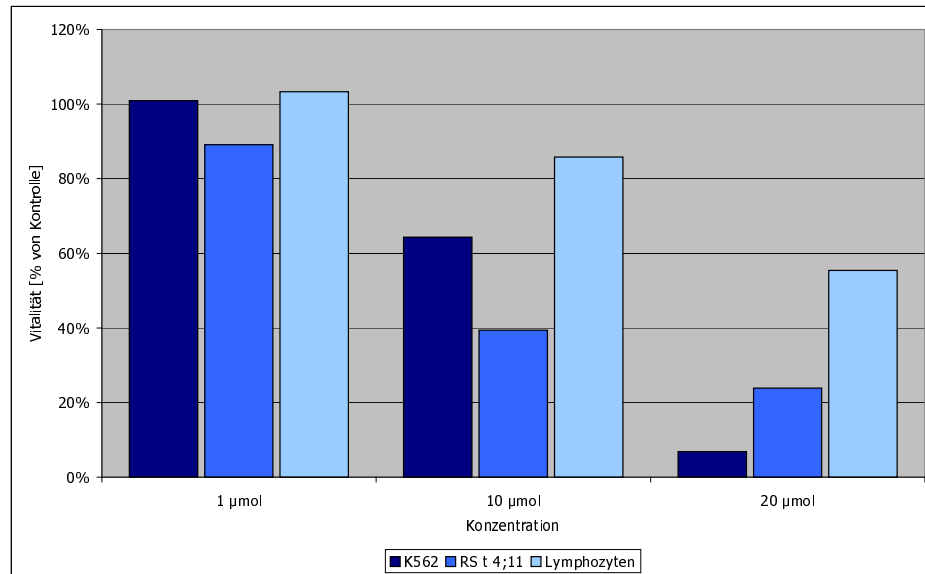


Abb. 3.22: Zellvitalität MTT der Zellreihen bei 1, 10 und 20 µmol Cyclopamin

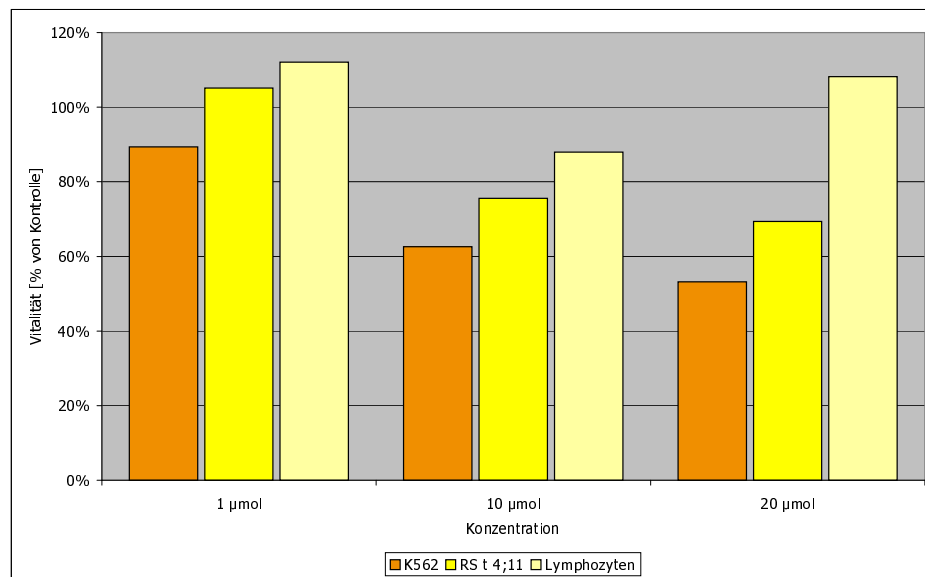


Abb. 3.23: Zellvitalität MTT der Zelllinien bei 1, 10 und 20 µmol Tomatidin

3.3 Auswertung der FACS-Analyse

Die FACS Analyse dient der Ermittlung des der Zytotoxizität zugrunde liegendem Mechanismus. Die Messungen der Zellreihen wurde nach dem unter 2.8 beschriebenen Verfahren mit dem Durchflusszytometer „Cytomics FC 500“ von Beckman Coulter durchgeführt. Zur Bestimmung des Anteils lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden Annexin V und PI eingesetzt. Im Folgenden werden die durchflusszytometrischen Untersuchungen erläutert und graphisch dargestellt. Die graphischen Darstellungen zeigen die Messergebnisse nach Behandlung der Zellen mit Cyclopamin, Tomatidin sowie jeweils deren Kontrollen (Ethanol) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 20 μmol).

3.3.1 K 562 bei einer Konzentration von 10 μmol

Cyclopamin Probe Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden stellten sich 0,8 % der Zellen ausschließlich PI-positiv dar, 8,6 % waren doppelt positiv. Die Zahl der als PI negativ und Annexin V negativ gemessenen Zellen betrug 84 %, während 6,6 % der Zellen ausschließlich Annexin-positiv waren (vgl. Tab. 3.22 und Abb. 3.24a).

Cyclopamin Kontrolle In der Kontrolle stellten sich nach dieser Inkubationszeit 0,5 % der Zellen ausschließlich PI-positiv dar, während 3,9 % doppelt-positiv waren. Als doppelt-negativ wurden 93,3 % der Zellen gemessen und 2,2 % der Zellen waren nur Annexin-positiv (vgl. Tab. 3.22 und Abb. 3.24b).

Tomatidin Probe In der Probe wurden 1,8 % ausschließlich PI-positive Zellen gemessen, 6,1 % waren doppelt-positiv. 89,3 % der Zellen stellten sich doppelt negativ dar und 2,8 % ausschließlich Annexin-positiv (vgl. Tab. 3.22, und Abb. 3.24c).

Tomatidin Kontrolle Im Vergleich dazu wurden in der Kontrolle nach 24 Stunden 1,1 % der Zellen ausschließlich PI-positiv gemessen, 7,7 % waren doppelt-positiv. Weitere 87,4 % der Zellen stellten sich doppelt-negativ dar und 3,8 % waren ausschließlich Annexin-positiv (vgl. Tab. 3.22 und Abb. 3.24d).

3.3.2 K 562 bei einer Konzentration von 20 μmol

Cyclopamin Probe Nach 72-stündiger Inkubation stellten sich in der Probe 4,7 % der Zellen ausschließlich PI-positiv dar. 31,9 % der Zellen waren PI-positiv und gleichzeitig

Annexin-positiv, also doppelt-positiv. 57,9 % der Zellen waren doppelt-negativ. 5,5 % der Zellen wurden ausschließlich Annexin-positiv gemessen (vgl. Tab. 3.23 und Abb. 3.25a).

Cyclopamin Kontrolle In der Kontrolle, die nach 72 Stunden gemessen wurde, waren 0,5 % der Zellen ausschließlich PI-positiv und 3,3 % doppelt-positiv. 94,2 % der Zellen wurden als doppelt-negativ gemessen und 2 % stellten sich ausschließlich Annexin-positiv dar (vgl. Tab. 3.23 und Abb. 3.25b).

Tomatidin Probe In der Probe wurden 2,4 % ausschließlich PI-positive Zellen gemessen, 8,9 % waren doppelt-positiv. 83,2 % der Zellen stellten sich doppelt-negativ dar und 5,5 % waren ausschließlich Annexin-positiv (vgl. Tab. 3.23 und Abb. 3.25c).

Tomatidin Kontrolle Im Vergleich dazu wurden in der Kontrolle nach 72 Stunden 2,5 % der Zellen ausschließlich PI-positiv gemessen, 9 % waren doppelt-positiv. Weitere 86,5 % der Zellen stellten sich doppelt-negativ dar und 2 % waren Annexin-positiv, jedoch PI-negativ (vgl. Tab. 3.23 und Abb. 3.25d).

Die beiden folgenden Abbildungen dienen dem Vergleich der beiden Konzentrationen (10 μmol und 20 μmol). In Abb. 3.26 kommt die Gesamtapoptose nach Behandlung mit Cyclopamin/ Tomatidin und den jeweiligen Kontrollgruppen mit einer Konzentration von 10 μmol zur Darstellung. Abb. 3.27 zeigt die Gesamtapoptose bei einer Konzentration von 20 μmol . In der Übersichtsgrafik 3.28 kommt die Verteilung der Mechanismen des Zelltodes bei Cyclopamin und Tomatidin in den Konzentrationen von 10 und 20 μmol zur Darstellung. Das Diagramm 3.28 dient der Unterscheidung lebender (N3), früh- (N4), spätapoptotischer (N2) sowie nicht apoptotischer Zellen (N1). Die X-Achse der Graphiken gibt die Anzahl der gemessenen Annexin-positiven Zellen logarithmisch an, die Y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen PI-positiven Zellen logarithmisch an. Vitale Zellen färben sich weder mit Annexin V noch mit PI¹. Frühapoptotische Zellen sind Annexin V-positiv, aber PI-negativ, spätapoptotische Zellen sind sowohl Annexin-positiv, als auch PI-positiv². Zellen die nicht über den programmierten Zelltod zugrunde gegangen sind, färben sich nur PI-positiv.

3.3.3 Abbildungen und Tabellen

¹doppelt-negativ

²doppelt-positiv

	Cyclopamin		Tomatidin	
	Probe	Kontrolle	Probe	Kontrolle
N1	0,8 %	0,5 %	1,8 %	1,7 %
N2	8,6 %	3,9 %	6,1 %	7,8 %
N3	84,0 %	93,3 %	89,3 %	87,9 %
N4	6,6 %	2,2 %	2,8 %	2,6 %

Tab. 3.22: FACS-Analyse K 562 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

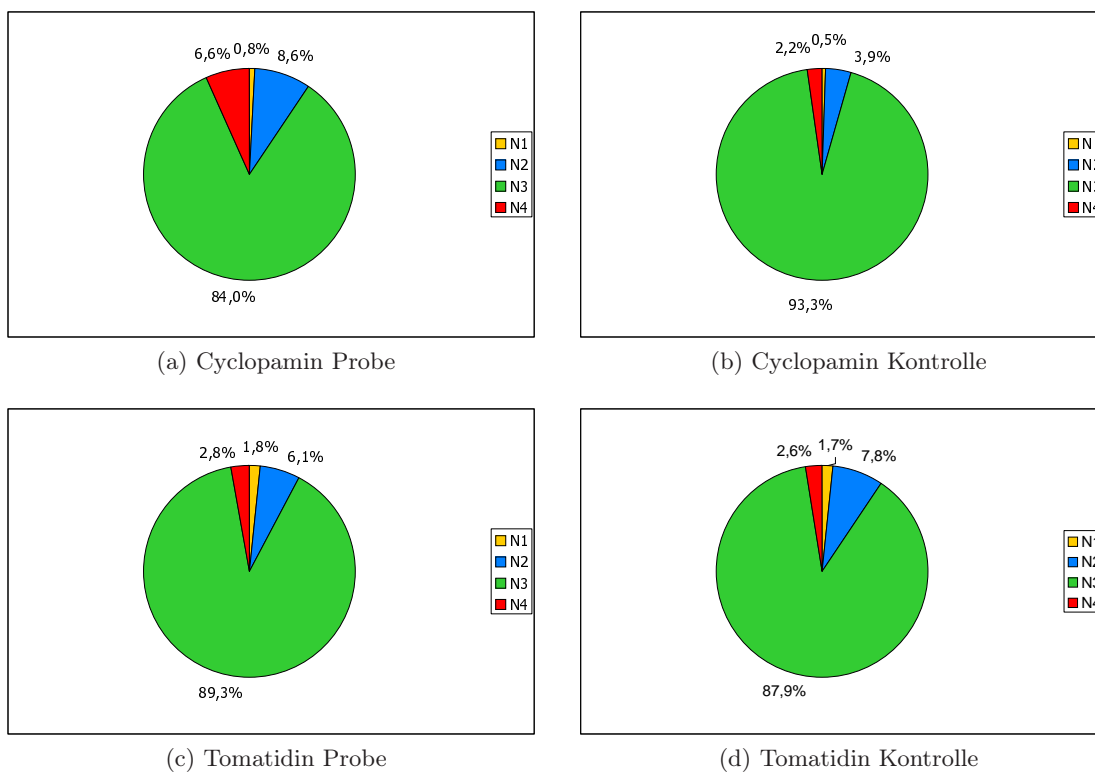


Abb. 3.24: FACS-Analyse K 562 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

	Cyclopamin		Tomatidin	
	Probe	Kontrolle	Probe	Kontrolle
N1	4,7 %	0,5 %	2,4 %	2,5 %
N2	31,9 %	3,3 %	8,9 %	9,0 %
N3	57,9 %	94,2 %	83,2 %	86,5 %
N4	5,5 %	2,0 %	5,5 %	2,0 %

Tab. 3.23: FACS-Analyse K 562 bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

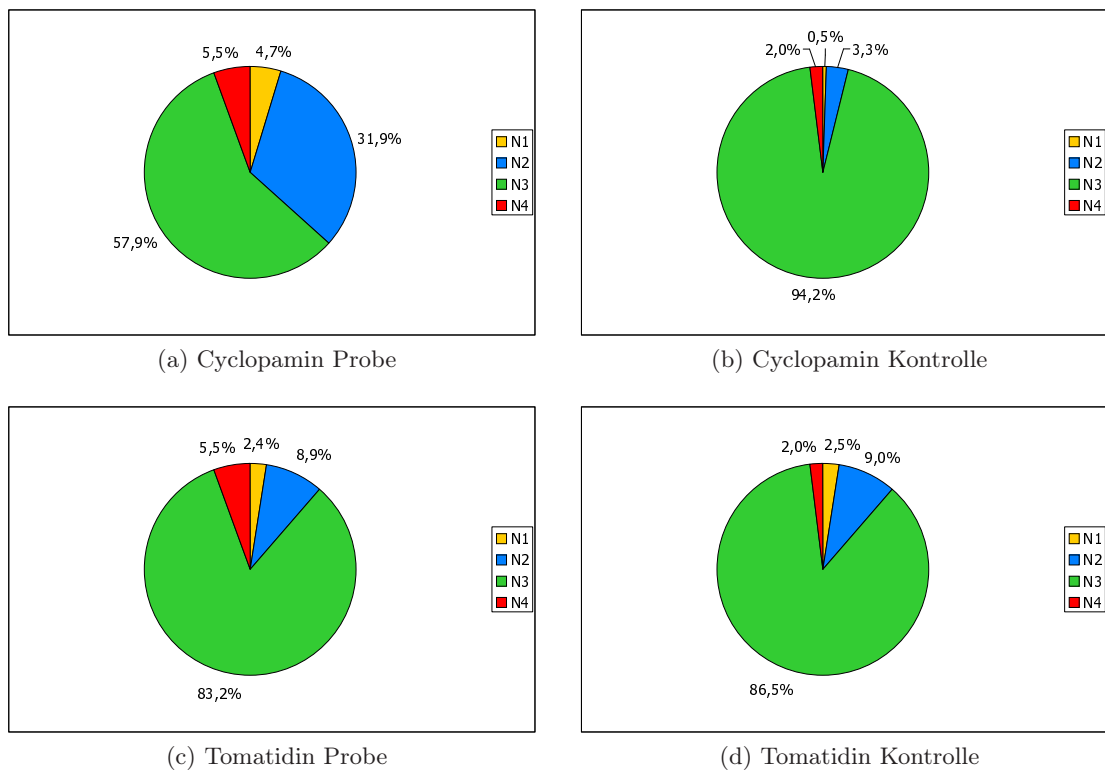


Abb. 3.25: FACS-Analyse K 562 bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

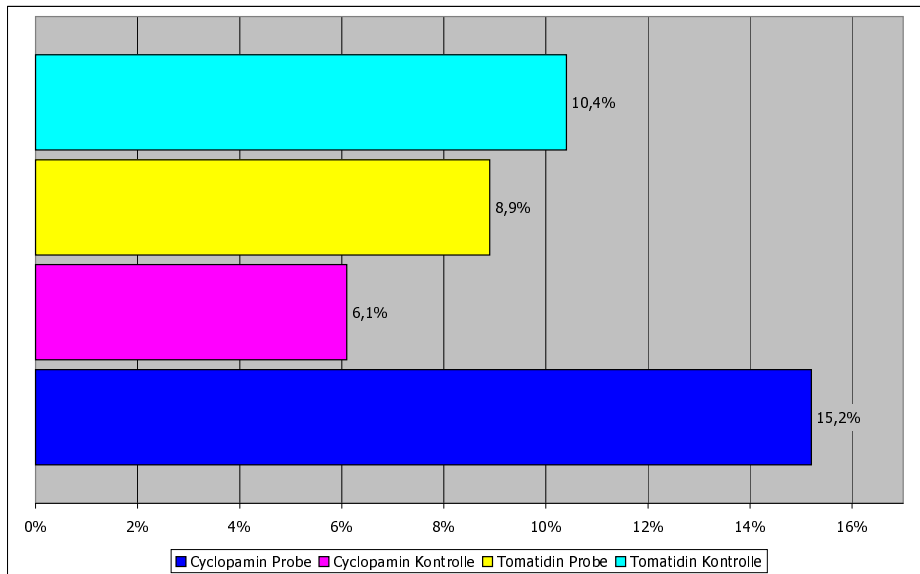


Abb. 3.26: Gesamtapoptose K 562 bei 10 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

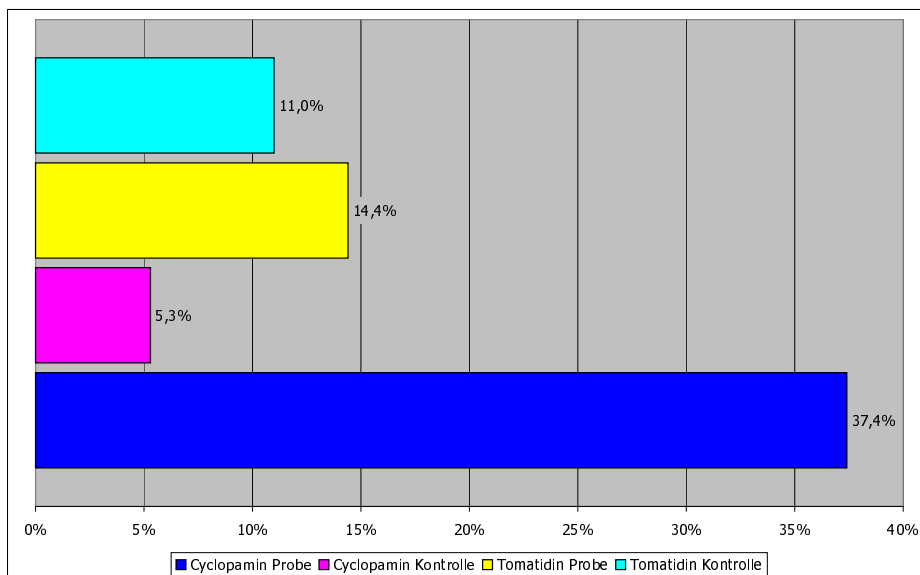


Abb. 3.27: Gesamtapoptose K 562 bei 20 μ mol Cyclopamin und Tomatidin

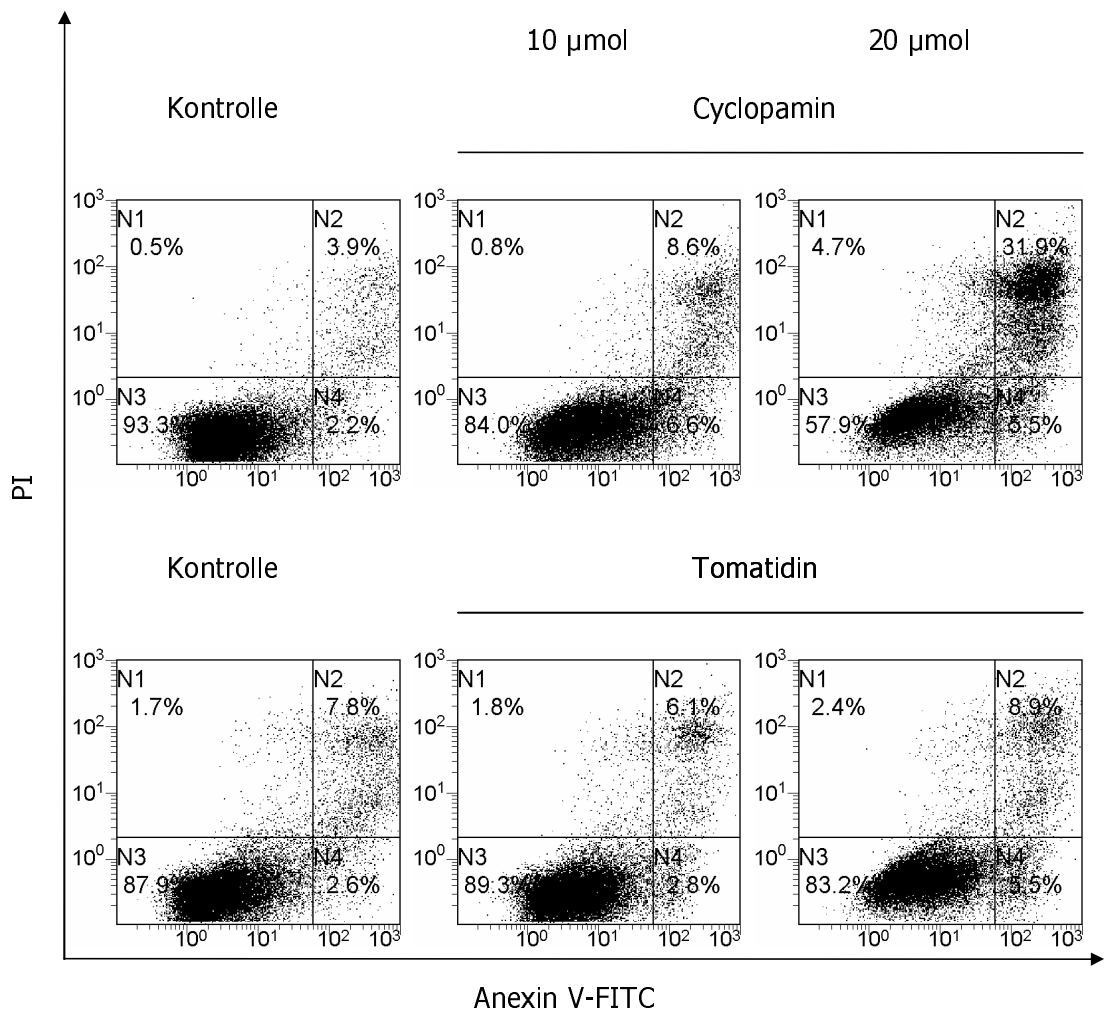


Abb. 3.28: Verteilung der Mechanismen des Zelltodes bei K 562

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Substanzen auf Zellen gab es in den letzten fünfzig Jahren verschiedenste Ansätze. Diese reichten von subjektiver Beurteilung des Wachstums von Monolayern [76], über Farbwechsel des Mediums durch Substratumsatz lebender Zellen [41], bis zum Einsatz radioaktiv-markierte Substanzen, wie DNA/RNA-Bausteinen [101]. Damit sind nur einige Beispiele angeführt. Mosmann et al. gelang es im Rahmen seiner Untersuchungen an Säugerzellen, in den 80er Jahren einen Test zu entwickeln, der sehr schnell durchführbar, effizient, exakt und zudem objektivierbar war - der MTT-Assay [66]. Diese, für die Forschung positiven Eigenschaften spiegeln sich auch in der Tatsache wider, dass der damals entwickelte MTT-Assay noch heute bei zahlreichen Untersuchungen durchgeführt wird. Auch im Rahmen dieser Arbeit fand der MTT-Assay Anwendung. Es sollte primär die Zytotoxizität von Cyclopamin auf verschiedene Zelllinien mit Hilfe des MTT-Assays untersucht werden. Da viele Forschungsgruppen diesen Test verwenden, ist neben den positiven oben aufgeführten Grundeigenschaften, die gute Vergleichbarkeit der Ergebnissen mit anderen Studien, ein nicht zu vernachlässigender positiver Aspekt. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war, herauszufinden über welchen Mechanismus der Zelltod eingeleitet wird. Da der MTT-Assay ausschließlich der Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen dient und keine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich ist, musste eine weitere Methode hinzugezogen werden. Der im Rahmen der Untersuchungen eingesetzte durchflusszytometrische Assay bietet die Möglichkeit der Differenzierung zwischen nekrotischen, früh- und spätapoptotischen sowie lebenden Zellen. Neben der zusätzlichen Information über den Mechanismus des Zelltodes, die diese Untersuchung liefert, konnte auch gleichzeitig überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Untersuchungsmethoden besteht.

4.2 Aussagekraft von In-vitro-Chemosensitivitätsprüfung

Zwischen einer Chemosensitivitätsprüfung In-vitro und In-vivo gibt es zahlreiche, für die Aussagekraft relevante Unterschiede: Eine In-vitro Untersuchung ist als experimentelles Modell anzusehen und somit nicht gleichzusetzen mit der Situation im Organismus [25]. Bedingt durch die Applikationsweise ist die Exposition von Tumorzellen gegenüber aktiven Substanzen In-vitro anders als In-vivo. Weitere Faktoren, die dies beeinflussen, sind u.a. die Bindung an Plasmaproteine und die Plasmahalbwertszeit. Auch können lokale Einflüsse wie z.B. die Vaskularisierung In-vitro nicht simuliert werden und stellen damit einen wesentlichen Unterschied dar [25]. Ebenso verläuft die Metabolisierung im Organismus anders, als die Degradationsprozesse in einer Zellkultur [110]. Häufig sind Zelllinien Abkömmlinge behandelter Tumoren, die deswegen meist eine Therapieresistenz aufweisen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Tumoren meist eine gewisse Heterogenität aufweisen und Zelllinien lediglich Subklone des Tumorgewebes darstellen. Zellkulturen weisen eine andere Kinetik auf als In-vivo [37]. Es ist demnach nicht gerechtfertigt von In-vitro erzielten Ergebnissen, auf die Wirksamkeit der Substanz in der klinischen Anwendung zu schließen. Dennoch stellt die In-vitro Chemosensitivitätsprüfung eine sinnvolle Methode dar: Ein wesentlicher Vorteil einer Zelllinie ist, jederzeit auf genügend Material mit identischen Eigenschaften zurückgreifen und dadurch eine große Anzahl identischer Testansätze durchführen zu können. Screeningtests und detaillierte Studien können so kostengünstig und zügig durchgeführt werden.

Die Chemosensitivitätsprüfung stellt eine wertvolle Methode dar, um die Wirksamkeit einer Substanz bei gegebenen Tumoren zu untersuchen und ermöglicht eine Selektion wirksamer Substanzen. Auf diese Weise können Anhaltspunkte für sinnvolle Konzentrationen und Dosisintervalle gewonnen werden. Darauf aufbauend kann später eine Erprobung dieser Substanzen in präklinischen und klinischen Studien erfolgen.

4.3 Die Wirkung von Cyclopamin auf Leukämiezellen

Das Anlegen einer Wachstumskurve diente der Untersuchung des Wachstumsverhaltens leukämisch veränderter Zellen nach Behandlung mit dem Hh-Signalweg-Inhibitor Cyclopamin. Der hier verwendete MTT-Test, der die Quantifizierung vitaler Zellen ermöglicht, wurde zur Überprüfung der Ergebnisse der Zellzählungen sowie zur Quantifizierung und Einschätzung der Lebensfähigkeit und des Wachstums der zu untersuchenden Zellkultu-

ren verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der zwei untersuchten leukämischen Zelllinien K 562 und RS t 4;11 diskutiert.

4.3.1 K 562

Bei der Zellreihe K 562 vom CML-Typ zeigte die Wachstumskurve bei der mit Cyclopamin inkubierten Probe zu Beginn eine Zellzahlreduktion und später ein signifikant vermindertes Wachstum. Hingegen stellte sich bei den Kontrollgruppen, die mit der entsprechenden Menge Ethanol versetzt wurden, ein klassisches Wachstumsverhalten, mit entsprechendem logarithmischem Kurvenverlauf ein. Bei den mit Tomatidin behandelten Zellen war in den ersten 72 Stunden kein signifikanter Effekt ersichtlich. Nach 72 Stunden zeigte sich eine geringe Wachstumsinhibition, die deutlich unter der des Cyclopamins lag.

Mit den Ergebnissen des MTT-Assays konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit einer Cyclopaminkonzentration von $20 \mu\text{mol}$ zu einer drastischen Reduktion der Anzahl vitaler Zellen und damit zur Wachstumsinhibition von 93,12% führte. Die Verminderung des Wachstums durch Tomatidin fiel deutlich geringer aus und betrug nur 46,78%. Bei der Konzentration von $10 \mu\text{mol}$ erzielten Cyclopamin und Tomatidin einen ähnlichen Effekt, der bei Tomatidin geringfügig stärker war als bei Cyclopamin - 37,40% gegenüber 35,62%. Der MTT-Assay, der mit $1 \mu\text{mol}$ durchgeführt wurde, führte mit Cyclopamin zu einer geringen Wachstumssteigerung um 4,69%, verglichen mit seiner Kontrollgruppe. Tomatidin hatte hierbei einen geringfügig wachstumshemmenden Effekt von 10,69%.

4.3.2 RS t 4;11

Auch bei der zum ALL-Typ gehörenden Zelllinie RS t 4;11, zeigten die unbehandelten Proben ein logarithmisches Wachstumsverhalten. Tomatidin beeinflusste das Wachstum in geringem Maße nach 72 Stunden. Cyclopamin bewirkte auch hier zu Anfang einen Rückgang der Zellzahl und somit eine signifikante Hemmung des Wachstums.

Der MTT-Assay zeigte auf Cyclopamin ein wesentlich besseres Ansprechen als auf Tomatidin. Die Verwendung der Cyclopaminkonzentration von $20 \mu\text{mol}$ erzielte einen deutlichen Effekt hinsichtlich der Reduktion vitaler Zellen um 78,15%. Die hemmende Wirkung von Tomatidin betrug hierbei lediglich 30,18%. Auch bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol}$ ließ sich bei den mit Cyclopamin inkubierten Zellen eine Inhibition von 59,60% feststellen, Tomatidin hemmte das Wachstum hierbei um 24,49%. Bei der ge-

ringsten Konzentration von $1\ \mu\text{mol}$ lässt sich bei der Behandlung der Zellen mit Tomatidin eine Wachstumszunahme von 10,01 % beobachten. Im Gegensatz dazu behält Cyclopamin seine wachstumshemmende Wirkung bei und reduzierte die Zellzahl um 11,97 % im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Beide Zelllinien zeigten nach Behandlung mit Cyclopamin ein signifikant verringertes Wachstum, jedoch nur einen geringen wachstumshemmenden Effekt nach Inkubation mit Tomatidin. Die Ergebnisse des MTT-Tests bezüglich der Wachstumsinhibition von Cyclopamin bestätigten die Resultate der Wachstumskurven. Cyclopamin zeigte eine hemmende Wirkung auf das Wachstum beider Zelllinien. Zudem war die Wachstumshemmung bei beiden Zelllinien konzentrationsabhängig. Die höchste verwendete Konzentration von $20\ \mu\text{mol}$ hatte bei beiden Zelllinien den stärksten Effekt. Bei der Zelllinie K 562 war die proliferationsinhibitorische Wirkung, verglichen mit der Zelllinie RS t 4;11, bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{mol}$ deutlich geringer. Die Konzentration von $1\ \mu\text{mol}$ zeigte bei beiden Zelllinien nur einen geringen Effekt. Daraus könnte man schließen, dass eine *Schwellendosis* (SD) notwendig ist, um eine zytotoxische Wirkung zu erzielen, die je nach Zelllinie, in ihrer Konzentration variieren kann. Insgesamt gesehen zeigte die Zelllinie RS t 4;11 aus der Gruppe der akuten lymphatischen Leukämie ein besseres Ansprechen, als die Zelllinie K 562 aus der Reihe der chronischen myeloischen Leukämie.

4.4 Die Wirkung von Cyclopamin auf Lymphozyten gesunder Spender

Die Ergebnisse der Wachstumskurve zeigten, dass Lymphozyten gesunder Spender insgesamt kaum auf die Behandlung mit Cyclopamin und Tomatidin reagieren. Das Wachstumsverhalten der Lymphozyten blieb bei den mit Cyclopamin und Tomatidin inkubierten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen annähernd unverändert. Nach 96 Stunden wich das Wachstumsverhalten, bezogen auf die Kontrollgruppe, im Sinne einer Reduktion leicht ab. Tomatidin hatte einen etwas stärkeren Effekt im Sinne einer Inhibition auf das Wachstum, verglichen mit der, mit Cyclopamin behandelten Probe.

Auch bei den Untersuchungen mittels MTT-Assays wurde festgestellt, dass die Lymphozyten gesunder Spender von dem, bei leukämischen Zellen gezeigten zytotoxischem Effekt weitgehend unbeeinflusst bleiben. Unter Inkubation mit Cyclopamin bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{mol}$, zeigte sich keine signifikante Veränderung der Vitalität (Zellzahl-

rückgang um 3,03 %). Tomatidin führte zu einem geringfügig proliferierenden Effekt von 11,59 %. Bei der Behandlung mit 10 μmol übten beide Substanzen einen ähnlich schwach proliferationshemmenden Effekt aus. Tomatidin reduzierte das Wachstum um 11,41 %, Cyclopamin um 13,78 %. Erst bei der höchsten Konzentration von 20 μmol entfaltete Cyclopamin auch auf Lymphozyten einen, auf das Wachstum bezogenen inhibitorischen Effekt. Dieser fiel mit 46,59 % jedoch wesentlich geringer aus, als der zytotoxische Effekt in gleicher Konzentration bei beiden leukämisch veränderten Zelllinien. Die Wirkung von Tomatidin war bei dieser Konzentration mit 10,51 % deutlich geringer.

4.5 Apoptoseinduktion durch Cyclopamin über den Hedgehog-Signalweg

Zur Feststellung des, der Zytotoxizität zugrunde liegenden Mechanismus wurde die FACS-Analyse mit Annexin V und PI durchgeführt. Mit Hilfe dieser Untersuchung kann man eine der zentralen Fragen: „Führt Cyclopamin über den Hh-Signalweg zur Apoptoseinduktion?“, beantworten. Anschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Messungen bei der Zelllinie K 562 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 μmol und 20 μmol).

4.5.1 K 562

Nachdem anhand des MTT-Assays, der in den Wachstumskurven ermittelte proliferationshemmende Einfluss bestätigt sowie ein konzentrationsabhängiger zytotoxischer und damit proliferationshemmender Effekt von Cyclopamin auf Leukämiezellen ermittelt wurde, sollte mittels FACS-Analyse heraus gefunden werden, ob die Induktion von Apoptose der, der Zytotoxizität zugrundeliegende Mechanismus ist. Die Zelllinie K 562 aus der Gruppe der chronisch myeloischen Leukämien wurde ausgewählt, da in früheren Publikationen gezeigt werden konnte, dass der Hh-Signalweg an der Entstehung der CML beteiligt ist [95]. Es wurde mit zwei Konzentrationen (10 μmol und 20 μmol) gearbeitet, um herauszufinden, ob die im MTT-Assay ermittelte Korrelation zwischen Konzentration und Stärke des proliferationshemmenden Effektes, auch über den Weg der Apoptose abläuft. Hierbei wurde als Apoptose-Marker Annexin gewählt. Zur Identifikation avitaler Zellen verwendete man den Marker PI (Propidiumiodid).

Cyclopamin 20 μmol

In der FACS-Analyse mit einer Cyclopaminkonzentration von 20 μmol zeigten sich nach 72-stündiger Inkubation 33 % der Zellen doppelt-positiv sowie 7,3 % einfach-positiv für Annexin. Damit waren 40,6 % der avitalen Zellen über den Weg der Apoptose zugrunde gegangen. Der Prozentsatz der vitalen Zellen betrug 56, 3,4 % der Zellen starben nicht über Apoptoseinduktion. In der unbehandelten Kontrolle waren 94,2 % der Zellen vital. Von den avitalen Zellen sind 5,3 % durch Apoptose, 0,5 % über einen anderen Weg zugrunde gegangen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war bei einer Konzentration von 20 μmol mit 40,6 % der Anteil der apoptotischen Zellen um ein 8-faches höher. Die Anzahl der über einen anderen Mechanismus abgetöteten Zellen unterscheidet sich nur minimal, hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass der zytotoxische Mechanismus über Apoptose abläuft.

Tomatidin 20 μmol

Bei der Verwendung von Tomatidin in einer Konzentration von 20 μmol waren 82,4 % der Zellen vital. Somit bestätigte sich hier der, in den vorherigen Untersuchungen ermittelte, deutlich geringere zytotoxische Effekt im Vergleich zum Cyclopamin, bei dem nur noch 56 % den vitalen Zellen zugeordnet werden konnten. Annexin-positiv waren 7,1 % der Zellen, der doppelt-positive Prozentsatz betrug 9 %. Somit sind 16,1 % durch Apoptoseinduktion zugrunde gegangen. Verglichen mit der Wirkung von Cyclopamin bei gleicher Konzentration, stellte sich der Effekt von Tomatidin um ein vielfaches geringer dar.

Cyclopamin 10 μmol

Nach 72-stündiger Inkubation der Zelllinie K 562 mit 10 μmol Cyclopamin zeigten sich, 6,90 % der Zellen Annexin-positiv, 8,40 % waren sowohl Annexin als auch Propidiumiodid-positiv. Der Anteil der vitalen Zellen betrug 84 %, 0,7 % gingen nicht über Apoptose zugrunde. Bei der Kontrollgruppe machte die Zahl der vitalen Zellen 92,6 % aus, 3,8 % waren doppelt-positiv, 3,3 % Annexin-positiv, die Zahl der nicht über Apoptose zugrunde gegangenen Zellen war in der Kontrollgruppe mit 0,3 % sehr gering. Der Zelltod wurde in der Zellkultur mit Cyclopamin in 15,3 %, in der Kontrollgruppe in 7,1 % über Apoptose eingeleitet.

Tomatidin 10 μmol

Mit einer Gesamtzahl der über Apoptose getöteten Zellen von 10,1%, wovon 6,3% doppelt-positiv, 3,8% Annexin-positiv waren, zeigte Tomatidin sowohl verglichen mit Cyclopamin in gleicher Konzentration als auch mit der Tomatidinkonzentration von 20 μmol , einen deutlich geringeren Effekt. 88,7% der Zellen waren vital. Es konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden - weder in Bezug auf die apoptotischen Zellen noch auf die Gesamtzytotoxizität. In der Kontrollgruppe waren 87,4% der Zellen vital, 11,5% gingen über den apoptotischen Weg zugrunde.

Cyclopamin versus Tomatidin

Abschließend betrachtet konnte anhand der FACS-Analyse gezeigt werden, dass Cyclopamin den, im MTT-Test festgestellten zytotoxischen Effekt ausübt und dieser im Vergleich zu Tomatidin stärker ist. Die Zunahme der Annexin-positiven und damit apoptotischen Zellen in der Probe weist darauf hin, dass Cyclopamin in der Konzentration von 10 und 20 μmol über den Mechanismus der Apoptose zytotoxisch auf die Zelllinie K 562 wirkte. Dies bestätigt die Annahme, dass der, der Zytotoxizität von Cyclopamin zugrunde liegende Mechanismus über Apoptoseinduktion abläuft. Tomatidin weist in der FACS-Analyse hingegen sogar einen geringen wachstumssteigernden Effekt in der niedrigen Konzentration von 10 μmol auf. Die Konzentrationssteigerung bei Cyclopamin von 10 auf 20 μmol hatte einen deutlichen Effekt auf den prozentualen Anteil vitaler Zellen. Dieser verminderte sich um 28% - von 84% auf 56%. Daraus lässt sich auf eine konzentrationsabhängige Zunahme des proliferationshemmenden Effektes von Cyclopamin schließen. Dies wiederum deckt sich mit den Ergebnissen des MTT-Assays. Die geringfügig wachstumssteigernde Wirkung von Tomatidin bei 10 μmol kehrte sich bei hoher Konzentration (20 μmol) in einen leicht proliferationshemmenden Effekt um. Dieser war jedoch deutlich geringer, als die Wirkung von Cyclopamin bei gleicher Konzentration.

4.6 Selektive Wirkung auf maligne Zellen

Sowohl die Ergebnisse der Wachstumskurve als auch die des MTT-Assays zeigen, dass sich die Wirkung von Cyclopamin auf gesunde und leukämisch entartete Zellen unterscheidet. Den proliferationshemmenden Effekt, den Cyclopamin auf Leukämiezellen ausübt, kann man bei gesunden Lymphozyten nicht nachweisen. Erst bei hohen Konzentrationen lässt sich ein hemmender Einfluss erkennen. Man könnte daraus schließen, dass Cyclopamin

eine selektive Wirkung auf maligne entartete Zellen hat. Diese Hypothese müsste in weiteren Versuchen noch überprüft werden.

4.7 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand

Das Grundproblem der Zielgenauigkeit aktueller Therapien spiegelt sich in der Vielzahl von Studien, auf der Suche nach einer besseren Therapieoption mit weniger Nebenwirkungen, wider. Nebenwirkungen resultieren unter anderem aus der mangelnden selektiven Wirkung gegen Tumorzellen, die man beispielsweise mit einem Chemotherapeutikum ansteuern möchte. Letztlich war dieses Problem Ausgangspunkt für die Idee dieser Arbeit.

Der Hh-Signalweg spielt eine große Rolle in der embryonalen Entwicklung und bei der postembryonalen Regulation der Stammzellzahl in regenerativen Geweben, insbesondere greift er in die Funktion der Selbsterneuerung ein [92, 99]. Über die Signalkaskade des Hh-Signalweges werden Entwicklungsprozesse kontrolliert, u.a. der Prozess des Zellwachstums. Er spielt entgegen früherer Annahmen auch noch beim Erwachsenen eine Rolle bei der Differenzierung des Gewebes. Bei einigen Tumoren ist der Hh-Signalweg konstitutiv aktiv [24, 82]. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclopamin über die Unterbrechung der Signaltransduktion des „Shh“ den Hh-Signalweg blockiert und somit als Hh-Signalwegs-Inhibitor eingeordnet werden kann [43].

In den letzten Jahren erwies sich Cyclopamin in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Krebsarten als proliferationshemmend bzw. tumorregressiv. So konnte gezeigt werden, dass durch Cyclopamin bei Colon-CA Apoptose in den Tumorzellen induziert wird. Dies konnte in Studien mit Knorpelvorläuferzellen¹ sowie mit Lebersternzellen bestätigt werden. Als weitere Eigenschaft von Steroidalkaloiden wie Cyclopamin wurde ein günstiger Effekt bei multiresistenten Tumoren als Chemosensitizer beschrieben. Es bewirkte dort eine Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, welche zuvor keine oder nur eine ungenügende Wirkung entfalten konnten [54, 59, 82]. Man fand heraus, dass die Entstehung des Prostata-Carcinoms in Zusammenhang mit dem Shh-Gli-Signalweg steht. Zudem führt eine zellautonome Signalwegsaktivierung zu einer Potenzierung der Tumorpheriferation und „Gli-1“ spielt, bezogen auf Entwicklung und Wachstum, eine wichtige Rolle in menschlichen Zellen. Cyclopamin führte hier als

¹*precartilagenous stem cells* (PSCs)

Hh-Signalweg-Inhibitor zu einer Wachstumshemmung bei drei verschiedenen Prostata-Carcinom-Zelllinien [93]. Auch auf Leberzellcarcinome konnte ein proliferationshemmender Effekt durch Glykoalkaloide festgestellt werden [60,61]. Zu gynäkologischen Tumoren, die über Inhibition des Hh-Signalweges in ihrem Wachstum beeinflusst werden können, gehören Mammacarcinome. Auch hier werden über die Repression von „Gli-1“, mithilfe eines Hh-Signalweg-Inhibitors, die Tumorzellen in ihrer Proliferation und Entwicklung gebremst [58]. Ebenso konnte beim Ovarial-CA eine konstitutive Expressierung von Ptch-1 nachgewiesen werden, durch dessen Inhibition das Wachstum der Tumorzellen reduziert wurde [8]. Untersuchungen an Osteosarkomzellen beschreiben, dass neben einer wachstumshemmenden Wirkung auch eine, den Zelltod einleitende Wirkung erzielt wird [109]. Ein weiteres Beispiel ist das Medulloblastom, einer der bekanntesten, häufig bei Kindern vorkommender, maligner Gerhintumor, das mit einer Proliferationshemmung und einer Änderung der Genexpression mit Tumorzellregress In-vitro, auf Blockade des Hh-Signalweges reagierte. Die Daten zeigen, dass die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges ein möglicher neuer Ansatzpunkt in der Therapie von Tumorerkrankungen unterschiedlichen Ursprungs sein könnte [6]. Es gibt zahlreiche Daten, die auf einen Zusammenhang zwischen dem Hh-Signalweg und der CML-Progression hinweisen. Eine Beteiligung an der Kontrolle der Differenzierung des hämatopoetischen Systems konnte ebenfalls festgestellt werden, da man auch die erythroide Differenzierung mit Cyclopamin inhibieren kann [23, 95].

Der in dieser Arbeit geringe zytotoxische Effekt von Tomatidin lässt sich nicht über die Blockade des Hh-Signalweges erklären, sondern durch die allgemeinen zytotoxischen Eigenschaften von Steroidalkaloiden. Aus früheren Studien ist ein proliferationssteigernder Effekt von Steroidalkaloiden in geringer Konzentration bekannt [60].

5 Zusammenfassung

Ziele In dieser Arbeit sollte die Wirkung von Cyclopamin auf das Wachstumsverhalten von Leukämiezellen untersucht werden. Dabei galt es zu klären, ob eine Hemmung des Wachstumsverhaltens über eine, durch Cyclopamin induzierte Inhibition des sogenannten Hedgehog-Signalweges erfolgt. Weiterhin war die Wirkung von Cyclopamin auf Lymphozyten gesunder Spender zu prüfen, um eine mögliche Selektivität auf maligne Zellen aufzuzeigen.

Methoden Der Einfluss von Cyclopamin auf die Apoptose wurde an kultivierten Leukämiezellen untersucht. Die Beurteilung des Wachstumsverhaltens, unter dem Einfluss des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin, erfolgte anhand von Wachstumskurven mit zwei leukämisch veränderten Zelllinien K 562 und RS t 4;11. Zur Bestimmung der Zytotoxizität bei diesen Zellen diente der MTT-Assay mit den Cyclopaminkonzentrationen von 1, 10 und 20 μmol . Mittels Durchflusszytometrie wurde bei der Zelllinie K 562 der, der Zytotoxizität zugrunde liegende Mechanismus ermittelt. Dabei wurde der Anteil apoptotisch zugrunde gegangener Leukämiezellen nach der Behandlung mit unterschiedlichen Cyclopamin Dosierungen bestimmt. Durch Anlegen einer Wachstumskurve und des MTT-Assays wurde der Einfluss von Cyclopamin auf die Überlebensrate von Lymphozyten gesunder Spender ermittelt.

Ergebnisse Die Ergebnisse dieser Untersuchung belegen, dass auch an Leukämiezellen dosisabhängig eine Inhibition des Hh-Signalweges erreicht werden kann. Die angefertigten Wachstumskurven weisen bei einer Cyclopaminkonzentration von 10 μmol bei der Zelllinie K 562 eine Inhibition von 67,5 %, bei der Zelllinie RS t 4;11 eine Inhibition von 77,1 % auf. Das Lymphozytenwachstum wurde um 17,8 % gehemmt. Beim MTT-Assay ließ sich bei beiden Zelllinien mit steigender Cyclopaminkonzentration (1, 10, 20 μmol) eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität feststellen - K 562 1 μmol 0,9 %, 10 μmol 35,7 %, 20 μmol 93,1 %; RS t 4;11 10,9 %, 60,6 % und 76,2 %. Bei den Lymphozyten konnte bei 1 und 10 μmol im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Erhöhung der Zytotoxizität nachgewiesen

werden (3,3 % und 14,2 %); erst bei einer Konzentration von 20 μmol war ein statistisch signifikanter inhibitorischer Effekt erkennbar, der jedoch im Vergleich zu den leukämisch veränderten Zellen mit nur 44,6 % deutlich geringer ausfiel. In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich bei der Zelllinie K 562 eine konzentrationsabhängige Zunahme der Apoptoserate von 15,3 % (10 μmol) auf 37,4 % (20 μmol). Damit ist die Proliferationsinhibition durch eine Hemmung des Hedgehog-Signalweges für eine weitere neoplastische Erkrankung bestätigt.

Schlussfolgerungen In dieser Arbeit konnte ein apoptosestimulierender Effekt von Cyclopamin an zwei verschiedenen leukämisch veränderten Zelllinien In-vitro gezeigt werden. Dies deutet auf neue therapeutische Ansätze von leukämischen Erkrankungen hin. Zudem konnte festgestellt werden, dass Cyclopamin bei Lymphozyten gesunder Spender den Hedgehog-Signalweg weitgehend unbeeinflusst lässt und erst bei hohen Konzentrationen ein schwacher zytotoxischer Effekt nachweisbar ist. Hieraus lässt sich möglicherweise eine „gute Verträglichkeit“ von Cyclopamin beim therapeutischen Einsatz ableiten.

Weitere Untersuchungen zur detaillierten Aufdeckung des exakten Inhibitionsmechanismus an einer größeren Anzahl von Leukämiezelllinien, insbesondere an primären Leukämiezelllinien, sollten mit der aufgezeigten Methodik erfolgen.

6 Summary

Objectives In the present study the effects of Cyclopamin on the proliferation behavior of leucaemic cells was investigated. Especially it was questioned whether the Cyclopamin induced inhibition of proliferation is caused by an inhibition of the so called hedgehog signaling pathway. Additionally the effects of Cyclopamin on lymphocytes from healthy donors have been tested for a specific selectivity to malign cells.

Methods The effect of Cyclopamin on the apoptosis was investigated on cultivated leucaemic cells. The assessment of their growth behaviour under treatment with the hedgehog-signaling-pathway-inhibitor Cyclopamin growth curves have been established using the leucaemic cell lines K 562 and RS t 4;11. To evaluate cytotoxicity of Cyclopamin at concentrations of 1, 10, 20 μmol , the MTT-Assay was performed. The underlying cytotoxic mechanism have been investigated with the cell line K 562 by using a flow cytometer determining the rate of apoptotic leukemic cells. The influence of Cyclopamin on the survival rate of lymphocytes from healthy donors was determined by their growth curves and MTT-Assay.

Results The results of this investigation show that an inhibition of the hedgehog-pathway may be dose dependently achieved in leucaemic cells, too. Following the elaborated growth curves, a concentration of 10 μmol Cyclopamin lead to a growth inhibition of 67,5% resp. 77,1% in cell line K 562 resp. RS t 4;11. Lymphocyte growth was inhibited by 17,8%. Following the MTT-test, in both cell lines cytotoxicity increased with rising Cyclopamin concentrations (K 562: 1 μmol 0,9%, 10 μmol 35,7%, 20 μmol 93,1%; RS t 4;11: 1 μmol 10,9%, 10 μmol 60,6%, 20 μmol 76,2%). Compared to a control group, at 1 and 10 μmol a relevant increase of cytotoxicity (3,3% and 14,2%) could not be found. Only at 20 μmol a statistically significant inhibitory effect could be demonstrated, however, which was clearly less (44,6%) when compared with leucaemic cells. Using the flow cytometric method, cell line K 562 showed an dose-dependant increase of the apoptose rate from

15,3% (10 μ mol) to 37,4% (20 μ mol). Therewith a proliferation inhibition by inhibiting the hedgehog signaling-pathway has been shown for another neoplastic disease.

Conclusions In the present In-vitro investigation an apoptoses stimulating effect by Cyclopamin could be shown for two different leukemic cell lines. This may point to new therapeutic approaches in the therapy of leukemic diseases. Additionally, it could be established that the hedgehogsignaling-pathway in lymphocytes from healthy donors is widely not influenced by Cyclopamin. Only at high concentrations, a weak cytotoxic effect was found. This may point to a „good tolerability“ of Cyclopamin when used therapeutically.

Further investigations using the applied methods should be performed at a larger number of leukemic cell lines, including primary leukemic cell lines in order to elucidate the underlying inhibitory mechanisms more in detail.

Literaturverzeichnis

- [1] AMERSHAMBIOSCIENCES (Hrsg.): *Ficoll Paque Plus*. amershambiosciences
- [2] ARENDS, M.: *A is For ... Apoptosis*. Science & Medicine, 1994
- [3] ASHKENAZI, A. ; DIXIT, V.M.: Death receptors: signaling and modulation. In: *Science* 281(5381) (1998), S. 1305–1308
- [4] ATHAR, M. ; LI, C. ; XIE, J.: Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. In: *Cancer* 6 (2004), S. 7545–7552
- [5] BARTRAM, C.R. ; DE KLEIN, A. ; HAGEMEIJER, A. ; VAN AGTHOVEN, T. ; GEURTS VAN KESSEL, A. ; BOOTSMA, D. ; GROSVELD, G. ; FERGUSON-SMITH, M.A. ; DAVIES, T. ; STONE, M.: Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. In: *Nature* 306 (1983), S. 277–280
- [6] BERMAN, D.M. ; KARHADKAR, S.S. ; HALLAHAN, A.R. ; PRITCHARD, J.I. ; EBERHART, C.G. ; WATKINS, D.N. ; CHEN, J.K. ; COOPER, M.K. ; TAIPALE, J. ; OLSON, J.M. ; BEACHY, P.A.: Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. In: *Science* 297(5586) (2002), S. 1559–61
- [7] BERMAN, D.M. ; KARHADKAR, S.S. ; MAITRA, A. ; MONTES DE OCA, R. ; K. BRIGGS, M.R. G. ; PARKER, A.R. ; SHIMADA, Y. ; ESHLEMAN, J.R. ; WATKINS, D.N. ; BEACHY, P.A.: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. In: *Nature* 23 (2003), S. 846–51
- [8] BHATTACHARYA, R. ; KWON, J. ; ALI, B. ; WANG, E. ; V., S. P. ; SHRIDHAR ; MUKHERJEE, P.: Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. In: *Clinical Cancer Research* 14(23) (2008), S. 7650–7666
- [9] BISHOP: Molecular themes in oncogenesis. In: *Cell* 64(2) (1991), S. 235–248

- [10] BITGOOD, M. ; MAMAHON, A.: Sonic Hedgehog as a mediator of long-range signaling. In: *Developmental Biological* 172 (1995), S. 126–38
- [11] BITGOOD, M. ; SHEN, L.: Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. In: *Current Biology* 6 (1996), S. 298–304
- [12] BONNER, W.A. ; HULETT, H.R. ; SWEET, R.G. ; HERZENBERG, L.A.: Fluorescence activated cell sorting. In: *The Review of scientific instruments* 43(3) (1972), S. 404–409
- [13] BRISCOE, J. ; CHEN, Y.: A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. In: *Molecular Cell* 7 (2001), S. 1279–91
- [14] BRISCOE, J. ; PIERANI, A.: A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. In: *Cell* 101 (2000), S. 435–45
- [15] BRUNE, H.: *Identifizierung und Charakterisierung neuer Zielgene des Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionswegs in cerebellären Körnerzellprogenitoren der Maus und in humanen Medulloblastomen*, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Diss., 2004
- [16] BUMCROT, D.A. ; TAKADA, R. ; MCMAHON, A.P.: Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. In: *Molecular and cellular Biology* 15 (1995), S. 2294–303
- [17] BURKE, R. ; NELLEN, D.: Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. In: *Cell* 99 (1999), S. 813–15
- [18] CANTLEY, L.C. ; AUGER, K.R. ; CARPENTER, C. ; DUCKWORTH, B. ; GRAZIANI, A. ; KAPELLER, R. ; SOLTOFF, S.: Oncogenes and signal transduction. In: *Cell* 64(2) (1991), S. 281–302
- [19] CHEN, J. K. ; TAIPALE, J. ; COOPER, M.K. ; BEACHY, P.A.: Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. In: *Genes & development* 16 (2002), Nr. 21, 2743–48. doi:10.1101/gad.1025302

-
- [20] CHEN, Y. ; STRUHL, G.: In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. In: *Development* 125 (1998), S. 4943–8
- [21] COOPER, M.K. ; PORTER, J.A. ; K.E., K.E. Y. ; BEACHY, P.A.: Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. In: *Sciences* 280 (1998), S. 1603–07
- [22] DE KLEIN, A. ; VAN KESSEL, A.G. ; GROSVELD, G. ; BARTRAM, C.R. ; HAGEMEIJER, A.: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. In: *Nature* 300 (1982), S. 756–7
- [23] DETMER, K. ; WALKER, A.N. ; JENKINS, T.M. ; STEELE, T.A. ; DANNAWI, H.: Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. In: *Blood cells, molecules & diseases* 26 (2000), S. 360–372
- [24] DI MAGLIANO, M.P. ; HEBROK, M.: Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. In: *Nature Reviews* (2003), S. 903–911
- [25] DIETEL, M. ; ARPS, H. ; BALS, U. ; NIENDORF, A. ; HENKE, P. ; GARBRECHT, M. ; PLATZ, D. ; WEH, H.J. ; THOMA, G. ; KLAPDOR, R.: Individualization of chemotherapy through in vitro predictive determination of the cytostatic sensitivity of malignant tumors. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift* 114(43) (1989), S. 1645–1652
- [26] DR. NEBE: *Akute Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphome*. Juli 2000
- [27] ECHELARD, Y. ; EPSTEIN, D.J. ; ST-JACQUES, B. ; SHEN, L. ; MOHLER, J. ; MCMAHON, J.A. ; MCMAHON, A.P.: Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. In: *Cell* 75 (1993), S. 1417–1430
- [28] GATTA, G. ; CAPOCACCIA, R. ; STILLER, C. ; KAATSCH, P. ; BERRINO, F. ; TEREZIANI, M.: Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. In: *journal of clinical oncology* 23(16) (2005), S. 3742–3751
- [29] GLOIRE, G. ; CHARLIER, E. ; PIETTE, J.: Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. In: *Biochemical Pharmacology* 76(11) (2008), S. 1451–1458

- [30] GOETZ, J. ; SUBER, L.: Sonic Hedgehog as a mediator of long-range signaling. In: *Bioassays* 24 (2002), S. 157–165
- [31] GREAVES, M.F.: Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. In: *Science* 234(4777) (1986), S. 697–704
- [32] HALL, T. ; PORTER, J.: Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. In: *Cell* 91 (1997), S. 85–97
- [33] HAMMERSCHMIDT, M. ; BROOK, A.: The world according to hedgehog. In: *Trends in genetic* 13 (1997), S. 14–21
- [34] HANN, I. ; VORA, A. ; HARRISON, G. ; HARRISON, C. ; EDEN, O. ; HILL, F. ; GIBSON, B. ; RICHARDS, S.: Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. In: *British Journal of Haematology* 113(1) (2001), S. 103–114
- [35] HEILMEYER, L.: Zur Chemotherapie neoplastischer Erkrankungen. In: *Naturwissenschaften* 37 (1950), S. 58–65
- [36] HEROLD ; HEROLD (Hrsg.): *Innere Medizin*. Dr. med Gerd Herold, 2008
- [37] HILL, B.T.: Neuroblastoma - an overview of laboratory studies aimed at inducing tumor regression by initiation of differentiation or administration of antitumor drugs. In: *pediatric hematology and oncology* 3(1) (1986), S. 73–88
- [38] HILL, F.G. ; RICHARDS, S. ; GIBSON, B. ; HANN, I. ; LILLEYMAN, J. ; KINSEY, S. ; MITCHELL, C. ; HARRISON, C.J. ; EDEN, O.B.: Successful treatment without cranial radiotherapy of children receiving intensified chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia: results of the risk-stratified randomized central nervous system treatment trial MRC UKALL XI. In: *British Journal of haematology* 124(1) (2004), S. 33–46
- [39] HORTELANO, S. ; LÓPEZ-COLLAZO, E. ; BOSCA, L.: Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. In: *British Journal of Pharmacology* 126(5) (1999), S. 1139–1146

-
- [40] HOWARD, S.C. ; PEDROSA, M. ; LINS, M. ; PEDROSA, A. ; PUI, C.H. ; RIBEIRO, R.C. ; PEDROSA, F.: Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. In: *The journal of American Medical Association* 291(20) (2004), S. 2471–2475
- [41] IGLEWSKI, B.H. ; SADOFF, J.C.: Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. In: *Methods in Enzymology* 60 (1979), S. 780–793
- [42] INABA, N. ; SATO, M. ; IJICHI, M.: The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae. In: *Tumour biology* 5(2) (1984), S. 75–85
- [43] INCARDONA, J. ; GAFFIELD, W.: The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. In: *Development* 125 (1998), S. 3553–3562
- [44] INCARDONA, J. ; ROELINK, H.: The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (2000), S. 1709–1719
- [45] INGHAM, P.W. ; MCMAHON, A.P.: Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. In: *Genes and Development* 15 (2001), S. 3059–3087
- [46] IWASAKI, M. ; LE, A.: Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. In: *Mechanism of development* 69 (1997), S. 197–202
- [47] KAWAKAMI, T. ; KAWCAK, T.: Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. In: *Development* 129 (2002), S. 5753–5765
- [48] KEELER, R.F.: Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand) X. Cyclopia in rabbits produced by cyclopamine. In: *Teratology* 3(2) (1970), S. 175–180
- [49] KEELER, R.F. ; BINNS, W.: Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopian effects of steroidal alkaloids from the plant

- and structurally related compounds from other sources. In: *Teratology* 1 (1968), S. 5–10
- [50] KERR, J.F. ; WYLLIE, A.H. ; CURRIE, A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British Journal of Cancer* 26 (1972), S. 239–257
- [51] KHMEL, C.: *Ein weltweiter Meilenstein in der Zellanalyse - 40 Jahre Durchflusszytometrie (Patent DE1815352)*. http://www.presseportal.de/pm/44047/1424772/partec_gmbh, Juni 2009
- [52] KIMBALL DALTON, V.M. ; GELBER, R.D. ; LI, F. ; DONNELLY, M.J. ; TARBELL, N.J. ; SALLAN, S.E.: Second malignancies in patients treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *journal of clinical oncology* 16(8) (1998), S. 2848–2853
- [53] KLINGEBIEL, T. ; MARSCHALEK, R.: Akute Hochrisiko-Leukämie bei Kindern / Universitätsklinik Frankfurt am Main. 2004. – Forschungsbericht
- [54] KOBUNE, M. ; TAKIMOTO, R. ; MURASE, K. ; IYAMA, S. ; SATO, T. ; KIKUCHI, S. ; KAWANO, Y. ; MIYANISHI, K. ; SATO, Y. ; NIITSU, Y. ; KATO, J.: Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34 leukemic cells. In: *Cancer Science* 23 (2009), S. epub
- [55] KOOPMAN, G. ; REUTELINGSPERGER, C.P. ; KUIJTEN, G.A. ; KEEHNEN, R.M. ; PALS, S.T. ; VAN OERS, M.H.: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. In: *Blood* 84(5) (1994), S. 1415–1420
- [56] KRATZEL, C.: *Untersuchungen zur Effektivität der Prodrugs Ganciclovir, Aciclovir und Valaciclovir nach Applikation des DCES-HSV-tk Suizidgentherapiesystems zur Behandlung des CC531-Lebermetastasenmodells der Ratte*, Frei Universität Berlin, Diss., 2003
- [57] KRAUSCH, H.-D.: *Kaiserkron und Päonien rot*. Dölling und Galitz Verlag, 2003
- [58] KUBO, M. ; NAKAMURA, M. ; TASAKI, A. ; YAMANAKA, N. ; NAKASHIMA, H. ; NOMURA, M. ; KUROKI, S. ; KATANO, M.: Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. In: *Cancer Research* 64 (2004), S. 6071–6074

-
- [59] LAVIE, Y. ; HAREL-ORBITAL, T. ; GAFFIELD, W. ; LISCOVITCH, M.: Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells. In: *Anticancer Research* 21(2A) (2001), S. 1189–1194
- [60] LEE, K.R. ; KOZUKUE, N. ; HAN, J.S. ; PARK, J.H. ; CHANG, E.Y. ; BAEK, E.J. ; CHANG, J.S. ; FRIEDMAN, M.: Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (2004), S. 2832–2839
- [61] LIU, J. ; XU, X.F. ; YANG, W.J. ; GUO, C.Y.: The effects of Hedgehog-Gli1 signaling pathway on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. In: *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. Chinese journal of hepatology* 17(1) (2009), S. 33–37
- [62] LOKEN, M.R. ; SHAH, V.O. ; DATTILIO, K.L. ; CIVIN, C.I.: Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. In: *Blood* 70(5) (1987), S. 1316–1324
- [63] MARZO, I. ; SUSIN, S.A. ; PETIT, P.X. ; RAVAGNAN, L. ; BRENNER, C. ; LAR-
OCHETTE, N. ; ZAMZAMI, N. ; KROEMER, G.: Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. In: *FEBS letters* 427(2) (1998), S. 198–202
- [64] MEESKE, K.A. ; SIEGEL, S.E. ; GLOBE, D.R. ; MACK, W.J. ; BERNSTEIN, L.: Prevalence and correlates of fatigue in long-term survivors of childhood leukemia. In: *journal of clinical oncology* 23(24) (2005), S. 5501–5510
- [65] MEYERS, C.A. ; ALBITAR, M. ; ESTEY, E.: Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. In: *Cancer* 104(4) (2005), S. 788–793
- [66] MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applica-
tion to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of immunological methods* 65(1-2) (1983), S. 55–63
- [67] MURONE, M. ; ROSENTHAL, A.: Sonic hedgehog signaling by the patched-
smoothed receptor complex. In: *Current Biology* 9 (1999), S. 76–84
- [68] NEUMANN, E.: Ein Fall von Leukämie mit Erkrankungen des Knochenmarkes. In: *Archives Heilkunde* 11 (1870), S. 1–13

- [69] NOWELL, P. ; HUNGERFORD, D.A.: A minute chromosome in human granulocytic Leukemia. In: *Science* 132 (1960), S. 1497
- [70] NOWELL, P.C.: The clonal evolution of tumor cell populations. In: *Science* 194(4260) (1976), S. 23–28
- [71] ORTEGA, J.J. ; RIBERA, J.M. ; ORIOL, A. ; BASTIDA, P. ; GONZÁLEZ, M.E. ; CALVO, C. ; EGURBIDE, I. ; HERNÁNDEZ RIVAS, J.M.: Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. In: *Haematologica* 86(6) (2001), S. 586–595
- [72] PAOLUCCI, G. ; VECCHI, V. ; FAVRE, C. ; MINIERO, R. ; MADON, E. ; PESSON, A. ; RONDELLI, R. ; L. LO NIGRO, G. De Rossiand ; PORTA, F. ; SANTORO, N. ; INDOLFI, P. ; BASSO, G. ; CONTER, V. ; ARICÒ, M.: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. In: *Haematologica* 86(5) (2001), S. 478–484
- [73] PARK, H.L. ; BAI, C. ; PLATT, K.A. ; MATISE, M.P. ; BEEGHLY, A. ; HUI, C.C. ; NAKASHIMA, M. ; JOYNER, A.L.: Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. In: *Development* 127 (2000), S. 1593–605
- [74] PEPINSKY, R.B. ; ZENG, C. ; WEN, D. ; RAYHORN, P. ; BAKER, D.P. ; WILLIAMS, K.P. ; BIXLER, S.A. ; AMBROSE, C.M.: Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. In: *Journal of biological chemistry* 273 (1998), S. 14037–45
- [75] PETER, M.E. ; KRAMMER, P.H.: Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. In: *Current Opinion in Immunology* 10 (1998), S. 545–51
- [76] POLLACK, M. ; ANDERSON, S.E.: Toxicity of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A for human macrophages. In: *Infection and immunity* 19(3) (1978), S. 1092–1096
- [77] PORTER, J.A. ; VON KESSLER, D.P. ; EKKER, S.C. ; YOUNG, K.E. ; LEE, J.J. ; MOSES, K. ; BEACHY, P.A.: The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. In: *Nature* 374 (1995), S. 363–366

-
- [78] PORTER, J.A. ; YOUNG, K.E. ; BEACHY, P.A.: Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. In: *Sciences* 274 (1996), S. 255–259
- [79] PRESS, John Hopkins U. (Hrsg.): *Genesis of cancer: A study in the history of ideas*. L.J. Rathe, 1978
- [80] PUI, C.H. ; BEHM, F.G. ; CRIST, W.M.: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 82(2) (1993), S. 343–362
- [81] PUI, C.H. ; GAYNON, P.S. ; BOYETT, J.M. ; CHESSELLS, J.M. ; BARUCHEL, A. ; KAMPS, W. ; SILVERMAN, L.B. ; BIONDI, A. ; HARMS, D.O. ; VILMER, E. ; SCHRAPPE, M. ; CAMITTA, B.: Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. In: *Lancet* 359(9321) (2002), S. 1909–1915
- [82] QUALTROUGH, D. ; BUDA, A. ; GAFFIELD, W. ; WILLIAMS, A.C. ; PARASKEVA, C.: Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. In: *International journal of cancer* 110 (2004), S. 831–837
- [83] RAMASWAMY, M. ; CLEL, S.Y. ; CRUZ, A.C. ; SIEGEL, R.M.: Many Checkpoints on the Road to Cell Death: Regulation of Fas-FasL Interactions and Fas Signaling in Peripheral Immune Responses. In: *Results and problems in cell differentiation* 9 (2009)
- [84] RÜCHARDT, C.: *Die Entdeckung und die Struktur von Steroiden*. Freiburg, 2007
- [85] REED, J.C.: Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. In: *Current opinion in Oncology* 7(6) (1995), S. 541–6
- [86] RENZ-POLSTER, Braun Krautzig ; POPP, Kerstin (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier Urban und Fischer, 2004. – 298–315 S.
- [87] REUTELINGSPERGER, C.P. ; HORNSTRA, G. ; HEMKER, H.C.: Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. In: *European journal of biochemistry* 151(3) (1985), S. 625–629
- [88] ROCHE (Hrsg.): *Cellproliferation Kit I (MTT)*. Roche

- [89] ROELINK, H. ; PORTER, J.A. ; CHIANG, C. ; TANABE, Y. ; CHANG, D.T. ; BEACHY, P.A. ; JESSELL, T.M.: Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. In: *Cell* 81 (1995), S. 445–455
- [90] ROWLEY, J.D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. In: *Nature* 243 (1973), S. 290–293
- [91] RUIZ I ALTABA, A.: Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. In: *Development* 126 (1999), S. 3205–3216
- [92] SACEDÓN, R. ; DíEZ, B. ; NUÑEZ, V. ; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. ; GUTIERREZ-FRÍAS, C. ; CEJALVO, T. ; OUTRAM, S.V. ; CROMPTON, T. ; ZAPATA, A.G. ; VICENTE, A. ; VARAS, A.: Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. In: *Journal of Immunology* 174(3) (2005), S. 1456–1461
- [93] SANCHEZ, P. ; HERNÁNDEZ, A.M. ; STECCA, B. ; KAHLER, A.J. ; DEGUEME, A.M. ; BARRETT, A. ; BEYNA, M. ; DATTA, M.W. ; DATTA, S. ; RUIZ I ALTA-BA, A.: Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), S. 12561–12566
- [94] SCIENCE, Roche A.: *Phytohämagglutinin-M (PHA-M)*. Roche Applied Science, 2004
- [95] SENGUPTA, A. ; BANERJEE, D. ; CHANDRA, S. ; BANERJI, S.K. ; GHOSH, R. ; ROY, R.: Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. In: *Leukemia* 21 (2007), S. 949–955
- [96] SLEE, E.A. ; ADRAIN, C. ; MARTIN, S.J.: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. In: *Journal of biological Chemistry* 276(10) (2001), S. 7320–7326

-
- [97] SMITH, L.J. ; CURTIS, J.E. ; MESSNER, H.A. ; SENN, J.S. ; FURTHMAYR, H. ; McCULLOCH, E.A.: Lineage infidelity in acute leukemia. In: *Blood* 61(6) (1983), S. 1138–1145
- [98] STANDHARTINGER, S.: *Pflanzen-Alkaloid zerstört Gehirntumorzellen Cyclopamin gegen aggressive Krebsform bei Kindern wirksam.* 08 2002. – url-<http://www.presstext.de/pte.mc?pte=020830007> Stand 8.9.2007
- [99] TAIPALE, J. ; BEACHY, P.A.: The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. In: *Nature* 411(6835) (2001), S. 349–354
- [100] TAYLOR, F. ; WEN, D. ; GARBER, E. ; CARMILLO, A.N. ; BAKER, D.P. ; ARDUINI, R.M. ; WILLIAMS, K.: Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 4359–4371
- [101] THOMPSON, W.L. ; WANNEMACHER, R.W.: Detection and quantitation of T-2 mycotoxin with a simplified protein synthesis inhibition assay. In: *Applied and environmental microbiology* 48(6) (1984), S. 1176–1180
- [102] TROST, L.C. ; LEMASTERS, J.J.: The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye’s syndrome and toxic liver injury. In: *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 278(3) (1996), S. 1000–1005
- [103] TSUJIMOTO: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosome or mitochondria? In: *Genes to cells* 3(11) (1998), S. 697–707
- [104] UCKUN, F.M. ; MURAGUCHI, A. ; LEDBETTER, J.A. ; KISHIMOTO, T. ; O’BRIEN, R.T. ; ROLOFF, J.S. ; GAJL-PECZALSKA, K. ; PROVVISOR, A. ; KOLLER, B.: Biphenotypic leukemic lymphocyte precursors in CD2+CD19+ acute lymphoblastic leukemia and their putative normal counterparts in human fetal hematopoietic tissues. In: *Blood* 73(4) (1989), S. 1000–1015
- [105] VAN ENGELAND, M. ; RAMAEKERS, F.C. ; SCHUTTE, B. ; REUTELINGSPERGER, C.P.: A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. In: *Cytometry* 24(2) (1996), S. 131–139
- [106] VIRCHOW: Weisses Blut. In: *Frorieps Notizen* 36 (1845), S. 151–156

- [107] VOGT, C.: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). In: *Solothurn* (1842)
- [108] WARZECHA, J. ; BONKE, L. ; KOEHL, U. ; MUNKELT, D. ; GÖTTIG, S. ; PERCIC, D. ; ARABMOTLAGH, M. ; KURTH, A.: The hedgehog Inhibitor cyclopamine induces apoptosis in leukemic cells in vitro. In: *Leukemia & lymphoma* 49 (2008), S. 2383–2386
- [109] WARZECHA, J. ; GÖTTIG, S. ; CHOW, K.U. ; BRÜNING, C. ; PERCIC, D. ; BOEHRER, S. ; BRUDE, E. ; KURTH, A.: Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine. In: *Journal of Chemotherapy* 19 (2007), S. 554–561
- [110] WEISENTHAL, L.M.: In vitro assays in preclinical antineoplastic drug screening. In: *Seminars in Oncology* 8(4) (1981), S. 362–376
- [111] WYLLIE, A.H. ; KERR, J.F. ; CURRIE, A.R.: Cell death: the significance of apoptosis. In: *International review of cytology* 68 (1980), S. 251–306

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Orthopädie Friedrichsheim, der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Leitung von Professor Dr. A. Kurth angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. A. Kurth für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, diese Dissertation im Zelllabor der orthopädischen Abteilung in Friedrichsheim durchführen zu dürfen.

Herrn Dr. J. Warzecha für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die zahlreichen Tipps und Anregungen rund um diese Arbeit.

Frau Dr. U. Köhl für die zur Verfügung gestellten Durchflusszytomter im Stammzelllabor sowie ihre stetige freundliche Hilfe bei fachlichen Fragen.

Frau Dr. D. Munkelt für die Einführung in die Durchflusszytometrie und die darüber zur Verfügung gestellten Unterlagen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, mir bei der Dissertation und während meines gesamten Studiums immer emotionalen Halt und Unterstützung jeglicher Art gegeben haben.

Sehr dankbar bin ich auch meinen beiden Brüdern und meinem Freund Uli, die mich auf dem ganzen Weg begleitet, immer ermutigt und bei allen Problemen unterstützt haben. Ohne Euch hätte ich die Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Arbeit nicht gemeistert!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Einfluss des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin auf Leukämiezellen In-vitro“

im Labor der orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. A. Kurth, mit Unterstützung durch Dr. J. Warzecha ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Warzecha, J. ; Bonke, L. ; Koehl, U. ; Munkelt, D. ; Göttig, S. ; Percic, D. ; Arabmotlagh, M. ; Kurth, A.:

„The hedgehog Inhibitor cyclopamine induces apoptosis in leukemic cells in vitro.“

Leukemia & Lymphoma 49 (2008), S. 2383 – 2386

Darmstadt, den 18. Februar 2010

Leonie Alexandra Bonke