

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Die Bedeutung
der Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 für
Überleben und Funktion
beim kolorektalen Karzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Tobias Vogler
aus Tettwang

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

PD Dr. Clemens Gießen-Jung

Prof. Dr. Walter Nathrath

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Publikation eines Teilbereichs der in dieser Dissertation präsentierten Arbeit:

Vogler T, Kriegl L, Horst D, Engel J, Sagebiel S, Schäffauer AJ, Kirchner T, Jung A. The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. *Experimental and Molecular Pathology* 2012 Feb;92(1):111-7.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des Darmkrebs	2
1.2 Häufigkeit des KRK	3
1.3 Risikofaktoren und Prävention	4
1.3.1 Risikofaktoren	5
1.3.2 Prävention	5
1.4 Diagnose und Stadieneinteilung des KRK	6
1.5 Therapie	7
1.5.1 Überleben	8
1.6 Molekulare Zusammenhänge des KRK	10
1.6.1 Mutationen	10
1.6.2 Entstehung von Darmkrebs: die Adenom-Karzinom-Sequenz	11
1.6.3 Epigenetische Veränderungen	12
1.6.4 Genetische Vielfalt von Tumoren	13
1.6.5 Krebsstammzellen	14
1.6.6 Tumor-Mikroumgebung	16
1.6.7 Embryologie und das kolorektale Karzinom	18

1.7	ALDH	19
1.7.1	ALDH in der Embryologie	21
1.7.2	Funktionelle Bedeutung von ALDH bei Krebs	21
1.7.3	Krebsstammzellmarker	23
1.8	Überprüfung von ALDH1A1 bezüglich Überleben und funktioneller Eigenschaften	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Patienten und Gewebeproben	26
2.2	Zellkultur	27
2.3	Immunohistochemie	28
2.4	Western Blot	29
2.5	Aldefluor und DEAB	29
2.6	Durchflusszytometrie	30
2.7	Zellproliferation	30
2.8	Migration	31
2.8.1	Wundheilungsassay zur Migration	31
2.8.2	Transwell Migration Assay	32
2.9	Transwell Invasion Assay	33
2.10	Strukturierte Literaturlauswertung	33
2.11	Statistische Analyse	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Patientenkollektiv	35
3.1.1	ALDH1A1 Expression kann spezifisch mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden	35
3.1.2	Auch für FFPE-Material ist der immunhistochemische Nachweis von ALDH1A1-Expression möglich	37

3.1.3	ALDH1A1 wird innerhalb eines kolorektalen Tumors individuell exprimiert	38
3.1.4	Identifikation von ALDH1A1-Expressionsmustern in kolorektalen Tumoren	39
3.1.5	Es besteht eine Korrelation zwischen der Expression von ALDH1A1 und β -Catenin in menschlichen kolorektalen Tumoren.	41
3.1.6	Die ALDH1A1-Expressionsmuster korrelierten mit dem Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom	43
3.2	Funktionelle Untersuchungen	45
3.2.1	Auswahl geeigneter Zelllinien	45
3.2.2	Unterdrückung von ALDH-Aktivität mittels DEAB	46
3.2.3	Teilweise Unterdrückung der ALDH-Aktivität beeinflusst die Proliferation kultivierter Darmkrebs-Zelllinien	48
3.2.4	Die ALDH-Enzymaktivität reduziert die Migration von Darmkrebs-Zelllinien	48
3.2.5	ALDH-Enzymaktivität beeinflusst die Invasion von Darmkrebs-Zelllinien im Transwell Assay	52
4	Diskussion	54
4.1	Erkenntnisse aus den durchgeführten Experimenten	54
4.2	Studienlage bezüglich ALDH1A1 und Überleben	55
4.2.1	Untersuchungen, die das Design meiner Studie zum Patientenüberleben beeinflussten	56
4.2.2	Untersuchungen, die auf meine Studie folgend publiziert wurden	58
4.3	Integration der Ergebnisse in den Forschungsstand	62
4.4	Studienlage bezüglich ALDH und Funktion des kolorektalen Karzinoms	64
4.4.1	Aldefluor und DEAB und die Messung von ALDH1A1	66
4.5	Einordnung der vorgestellten funktionellen Ergebnisse	67
4.5.1	Auswahl der Zelllinien	67

4.5.2	Divergente eigene Ergebnisse	68
4.5.3	Widersprüchliche Ergebnisse anderer Gruppen	69
4.6	Bedeutung der neuen Ergebnisse zu Überleben und Funktion	70
4.7	ALDH – Perspektiven	73
4.7.1	Gen-Netzwerke	74
4.7.2	Tumor Microenvironment Netzwerke	75
4.7.3	Signalwege aus Netzwerk-Sicht	75
4.7.4	Krebs – eine komplexe Antwort	76
A	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	78
	Danksagung	106
	Eidesstattliche Versicherung	107

Abbildungsverzeichnis

1.1	Altersstandardisierte Inzidenz des kolorektalen Karzinoms	2
1.2	Anatomie des Dickdarms	3
1.3	Überlebensraten von KRK in Prozent	4
1.4	Zukünftige Therapie, Beispiel Immunisierung	9
1.5	Die Adenom-Karzinom-Sequenz	11
1.6	Feldkanzerisierung	12
1.7	Aktuelle Forschung zu Mutationen	13
1.8	Stammzellnische	15
1.9	Tumor-Mikroumgebung	17
1.10	Systembiologie am Beispiel eines Gen-Netzwerks	18
1.11	ALDH1 steuert den Retinsäuremetabolismus	22
2.1	Tissue Microarray	26
2.2	Wundheilung	32
2.3	Transwell Inserts	32
3.1	Antikörpertest im Western Blot	36
3.2	ALDH1A1-Nachweis in FFPE-Material	37
3.3	Verteilte ALDH1A1-Verteilung in normaler Mukosa	38
3.4	ALDH1A1 in kolorektalen Tumoren	39

3.5	ALDH1A1-Expressionsmuster in kolorektalen Tumoren	40
3.6	Bildung von ALDH1A1-Gruppen durch Auswertung von ALDH1A1 und β -Catenin	42
3.7	ALDH1A1 Expression korreliert mit Überleben	44
3.8	ALDH1A1-Messung von Zelllinien im Western Blot	45
3.9	ALDH-Nachweis mittels Durchfluszytometrie mit Aldefluor und DEAB	47
3.10	Auswertung von Ibidi für LOVO und COLO-320 problematisch	49
3.11	DEAB verlangsamt Wundheilung	50
3.12	ALDH-Aktivität beeinflusst Migration im Transwell Assay	51
3.13	ALDH-Aktivität beeinflusst Invasion im Transwell Assay	52

Tabellenverzeichnis

1.1	Stadieneinteilung des KRK	7
3.1	Statistik zum Patientenkollektiv	43
3.2	Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen	49
4.1	Studien zum Überleben von KRK-Patienten	59

Zusammenfassung

Krebs ist eine Haupttodesursache in Europa. Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eine der häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Zentrale Probleme bei der Behandlung des KRK mit dramatischen Folgen für das Langzeitüberleben der Patienten sind Resistenzen gegen die Chemotherapie und Metastasierung. Für beide Phänomene werden sogenannte Krebsstammzellen (CSC) verantwortlich gemacht. Als ein Marker für diese Zellen gilt die Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1). Dieses Enzym ist sowohl an den Mechanismen der Chemoresistenz wie auch an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt. Es stellte sich daher die Frage, welche Bedeutung ALDH1A1 im KRK zukommt, insbesondere, ob das Auftreten von ALDH1A1 mit dem Überleben von Patienten korreliert und andererseits, welche funktionelle Bedeutung das Enzym für die Regulation krebsspezifischer Eigenschaften (Hallmarks) hat.

Dazu wurde die Expression von ALDH1A1 in einer hochgradig geschichteten Stichprobe von 186 Fällen primär kolorektaler Tumoren mit den Charakteristika T3 N0 M0 G2 analysiert. Hierfür wurde ein Bewertungssystem entwickelt, das relevante Expressionsmuster des ALDH1A1 unter Berücksichtigung der nukleären Expressionsmuster von β -Catenin definierte. Denn β -Catenin bietet sich als Hilfestellung zur Detektion von CSC an, da es von zentraler Bedeutung für deren Funktion ist und funktionell auch mit ALDH1A1 in Verbindung steht. Dadurch kann die Expression von β -Catenin helfen, relevante Expressionsmuster von ALDH1A1 besser einzuordnen. Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von ALDH1A1 im KRK erfolgte mittels der KRK-Zelllinien HT-29, LOVO und COLO-320. Es wurden dabei die für CSC bedeutsamen

Fähigkeiten (Hallmarks) zur Proliferation, Migration und Invasion von unveränderten und durch 4-Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) partiell ALDH-supprimierten Zellen (DEAB hemmt die Aktivität mehrerer Isoformen des Enzyms) verglichen.

Es gelang, mittels Einteilung nach ALDH1A1-Expressionsmustern unter Zuhilfenahme der nukleären β -Catenin-Expression das Patientenkollektiv in zwei Gruppen zu unterteilen. Das Expressionsmuster der Gruppe zwei korrelierte sehr signifikant mit geringerem Langzeitüberleben ($p = 0.01$) der Patienten mit T3 N0 M0 G2 KRK. Diese Korrelation wurde sowohl univariat wie auch multivariat mittels des Cox-Modells gefunden. Für die zur Funktion untersuchten Zelllinien zeigte sich ein uneinheitlicheres Bild. Während die Ergebnisse für LOVO und COLO-320 zum Teil keine Signifikanz erreichten oder widersprüchlich waren, wurde durch partielle ALDH-Unterdrückung mittels Gabe von DEAB für die HT-29-Zelllinie eine erhebliche und signifikante Reduktion von Proliferation, Migration und Invasivität der Zellen bewirkt.

Im Ergebnis konnte zunächst gezeigt werden, dass Expressionsmuster von ALDH1A1 einen unabhängigen prognostischen Marker für das Überleben von T3 N0 M0 G2 Darmkrebspatienten darstellen. Weiterhin konnte klar die funktionelle Bedeutung von ALDH für Krebsstammzeleigenschaften von Darmkrebszelllinien demonstriert werden.

Kapitel 1

Einleitung

Krebs ist eine Haupttodesursache in Deutschland. Sowohl die Zahl der Erkrankten wie auch die auf eine Krebserkrankung zurückzuführenden Todesfälle sind in den vergangenen Jahren weiter angestiegen. Dieser Anstieg ist in erster Linie auf die demografische Entwicklung mit einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung zurückzuführen (Kaatsch u. a., 2015, S. 20 f.). Unter anderem wird so auch der Darmkrebs zu einem zentralen Gesundheitsproblem in der westlichen Welt mit einer stetig steigenden Zahl Erkrankter. Dass dies aber auch auf anderen Faktoren basiert, ist zu erahnen, wenn man die Statistik aus anderen Teilen der Welt betrachtet. Insbesondere in Afrika und Teilen Indiens und Chinas sind Inzidenz und Prävalenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) deutlich niedriger als in der westlichen Welt (Abbildung 1.1; Rabeneck u. a., 2015, S. 102; Haggard und Boushey, 2009). Dieser Unterschied besteht auch unabhängig von der deutlich unterschiedlichen Altersverteilung. Doch welche Risikofaktoren liegen dem zu Grunde? Und welche Mechanismen und Veränderungen im Darm führen letztendlich zu Krebs? Diese Fragen sollen im Folgenden zunächst näher beleuchtet werden, bevor auf die molekularen Mechanismen und die Pathologie des KRK selbst und mögliche Ansatzpunkte zu deren Erforschung eingegangen wird.

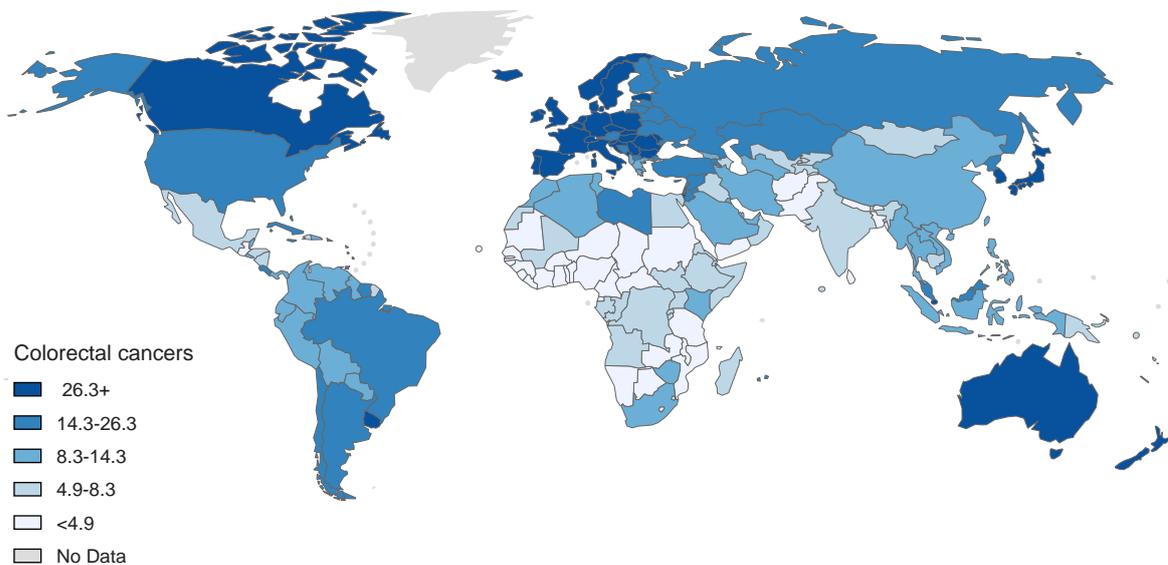


Abbildung 1.1: Altersstandardisierte Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) je 100000 Einwohner. Es ist deutlich zu erkennen, dass Darmkrebs in der westlichen Welt sehr viel häufiger vorkommt als beispielsweise in Afrika oder in Indien (Quelle: Ferlay u. a., 2013; Bray u. a., 2013).

1.1 Anatomie des Darmkrebs

Darmkrebs tritt zumeist in Form von Adenokarzinomen des Kolons (vorwiegend im absteigenden Teil) sowie des Rektums auf (Abbildung 1.2). Bei einem kleinen Teil dieser kolorektalen Karzinome (KRK) handelt es sich um den schleimbildenden (muzinösen) oder den Siegelring-Typ. Im Analbereich treten darüber hinaus selten Plattenepithelkarzinome auf (Bertz u. a., 2010). Eine weitere sehr seltene Formen von Darmkrebs ist das Appendixkarzinom („ICD-10 C18.1: Appendixkarzinom Inzidenz und Mortalität“, 2016).

Das KRK ist ein maligner epithelialer Tumor, der von Zellen des oberflächlichen Drüsenepithels des Kolons sowie des Rektums ausgeht. Dabei bilden sich meist irreguläre tubulöse Strukturen aus, bei schleimbildenden Tumoren zusätzlich mit großen Schleimansammlungen im Interstitium beziehungsweise im Falle der Siegelringkarzinome mit Schleimansammlungen innerhalb der Zellen (Nagtegaal und Hugen, 2015).

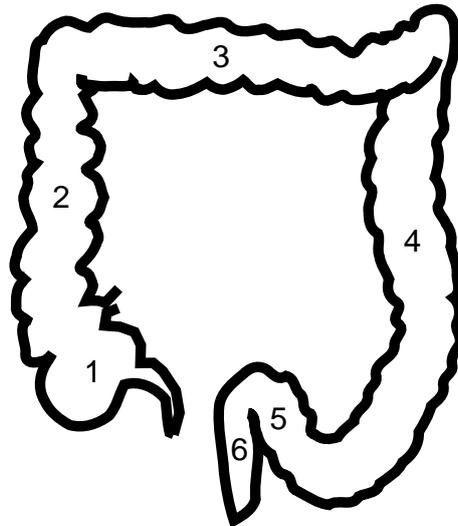


Abbildung 1.2: Anatomie des Dickdarms: (1) Caecum/Blinddarm mit Appendix, (2) Colon ascendens (aufsteigend), (3) Colon transversum/Quercolon, (4) Colon descendens (absteigend), Colon sigmoideum/Sigma (5), Rectum/Mastdarm und Anus (6). In (5) und (6) treten KRK am häufigsten auf.

1.2 Häufigkeit des KRK

International betrachtet ist Darmkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste Todesursache aufgrund von Krebs. Bezüglich der Erkrankten, deren Diagnose bis zu fünf Jahre zurückliegt, stellt das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Krebserkrankung dar (Haggard und Boushey, 2009). Dabei korreliert die Häufigkeit der KRK im altersstandardisierten Vergleich positiv mit dem Pro-Kopf-Einkommen eines Landes. Die Wahrscheinlichkeit für einen erkrankten Menschen, an einem solchen Tumor zu versterben dagegen steigt mit größerer Armut von 30-31 % in den entwickelten Ländern auf 67-68 % in armen Regionen (Rabeneck u. a., 2015, S. 101-104; Parkin u. a., 2005; Abbildung 1.3). In Ländern mit guter Gesundheitsversorgung geht die Mortalität an Darmkrebs in absoluten Zahlen seit den Fünfzigerjahren des letzten Jahrhunderts deutlich zurück (Ait Ouakrim u. a., 2015; Siegel u. a., 2014).

In Deutschland ist wie in vielen anderen westlichen Ländern die Prävalenz des KRK in den vergangenen Jahren stark angestiegen. So hat sich die Zahl der Erkrankten von 1990 bis 2004

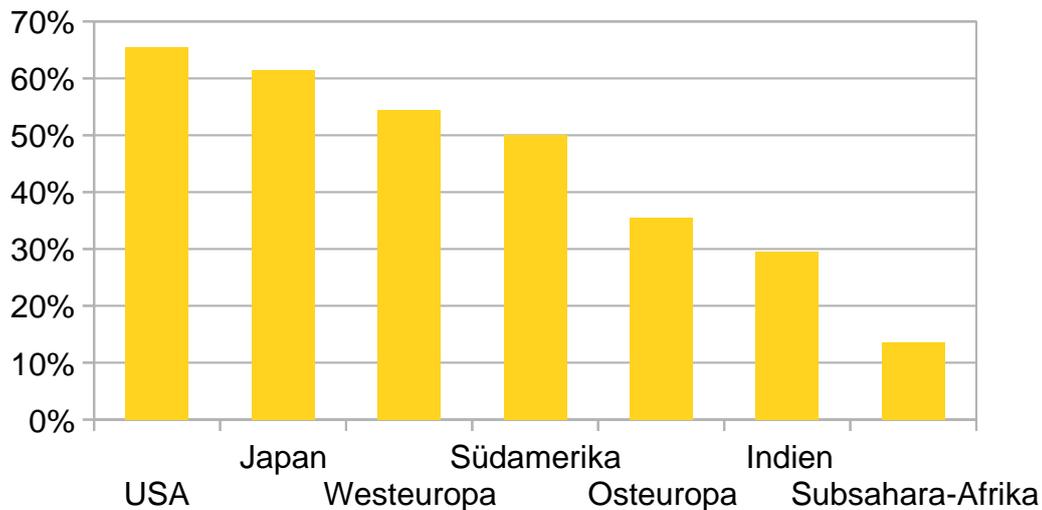


Abbildung 1.3: Überlebensraten von KRK in Prozent. In weniger entwickelten Gesundheitssystemen ist die Chance auf das Überleben eines KRK sehr viel geringer als in den westlichen Industrienationen (Daten aus: Parkin u. a., 2005).

fast verdoppelt (Bertz u. a., 2010), bei absolut betrachtet 33740 (Männer) beziehungsweise 28490 (Frauen) Neuerkrankungen im Jahr 2012 (Kaatsch u. a., 2015). Darmkrebs stellt die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern nach Lungenkrebs dar und die dritthäufigste Todesursache bei Frauen, wo neben dem Brustkrebs mittlerweile aus bekannten Gründen (weibliche Tabak-Emanzipation) Lungenkrebs den Darmkrebs überholt hat (Kaatsch u. a., 2015). Aufgrund der immer größer werdenden Zahl Erkrankter bei weiterhin beachtlicher Sterblichkeit wird das Verständnis des KRK und damit die Ermöglichung einer gezielten und adäquaten Behandlung zur zunehmend drängenderen Herausforderung.

1.3 Risikofaktoren und Prävention

Wie kommt es zu der gegenläufigen Entwicklung steigender Krankheitszahlen bei gleichzeitig sinkender Mortalität? Dies ist einerseits auf heute verstärkt wirksame Risikofaktoren und andererseits auf die verbesserte Prävention und chirurgische Behandlung zurückzuführen.

1.3.1 Risikofaktoren

Die Wahrscheinlichkeit, an Darmkrebs zu erkranken, steigt mit höherem Lebensalter stark an. 93 % der Neuerkrankungen treten im Alter von über 50 Jahren auf. Ein großer Teil der höheren Prävalenz erklärt sich somit aus der älter werdenden Bevölkerung in den westlichen Industrienationen. Neben dem Alter sind auch das Geschlecht - mit einem für Männer etwas erhöhten Risiko - und familiäre Belastung unabhängige Risikofaktoren, wobei 75 % der Fälle von KRK sporadisch auftreten. Die genetischen Veranlagungen für HNPCC (hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom) und FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) tragen nur etwa 5 % beziehungsweise 1 % zur Gesamtzahl der Neuerkrankungen bei. Auch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Collitis Ulcerosa erhöhen das Risiko, am KRK zu erkranken (Kaatsch u. a., 2015; Rabeneck u. a., 2015, S. 105).

Beeinflussbare Risikofaktoren stellen unter anderem der Konsum von (insbesondere verarbeiteten) Fleisch (Bouvard u. a., 2015), Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel dar. Wahrscheinlich erhöhen diese Risikofaktoren das individuelle Risiko allerdings jeweils für sich nur geringfügig (Johnson u. a., 2013).

1.3.2 Prävention

Ein weiterer Anteil der ansteigenden Prävalenz des KRK ist ausgerechnet der verbesserten Sekundärprävention zuzuschreiben. Der Versuch, die Krankheit bereits in einer frühen Phase zu entdecken, hat sich im Falle des KRK als effektiv und effizient erwiesen, für das Überleben der Patienten wie auch finanziell für die Kostenträger. Damit werden allerdings heute in den Ländern mit guter Gesundheitsversorgung auch mehr KRK in häufig früheren Stadien der Erkrankung entdeckt. Da die betroffenen Patienten ihre Erkrankung meist länger überleben (auch wenn sie letztendlich daran versterben sollten), tragen sie so zu einer höheren statistischen Prävalenz bei.

Für das Darmkrebs-Screening wird in Deutschland für nicht bekannt vorbelastete Personen ab dem 55. Lebensjahr eine kostenlose Vorsorgeuntersuchung mittels Koloskopie im zehnjährigen Rhythmus angeboten. Bereits ab dem 50. Lebensjahr kann ein fäkal-okkult-Bluttest durchgeführt werden. Diese Maßnahmen zählen zu den anerkannt wirksamen Möglichkeiten der Früherkennung (Rabeneck u. a., 2015, S. 111 f.).

1.4 Diagnose und Stadieneinteilung des KRK

Das primäre Werkzeug der Prävention des KRK ist zugleich auch der übliche Beginn der Diagnostik. Mittels Koloskopie werden aus verdächtigen Bereichen der Dickdarmschleimhaut Gewebeprobe entnommen oder diese (im Falle von Adenomen) direkt vollständig abgetragen. Das entnommene Gewebe wird sodann histologisch untersucht und bewertet. Ergänzend zur direkten Inaugenscheinnahme und Untersuchung des Primärtumors kann eine bildgebende Untersuchung mittels Computertomografie oder Magnetresonanztomografie zur Suche von Metastasen erfolgen („S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“, 2014). Auch Erkenntnisse aus der Resektion von Tumor und regionären Lymphknoten gehen in die Diagnostik ein. Die Stadieneinteilung erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation. Dieses System der Einteilung existiert für viele Formen solider Tumore und wird aktuell betreut durch die Union internationale contre le cancer (UICC). Es beruht auf der Einteilung eines Tumorleidens aufgrund der Ausdehnung des Primärtumors (T0-T4), dem Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N0 negativ, N1/N2 positiv) sowie von Fernmetastasen (M0 negativ, M1 positiv) (Tabelle 1.1). Die histologische Stadieneinteilung erfolgt mittels des histologisch festgestellten Grades der Entdifferenzierung des Gewebes in die Stadien (Grade) G1 (gut differenziert, ähnlich dem Ursprungsgewebe) bis G4 (undifferenziert, nicht mehr unmittelbar als dem Ursprungsgewebe entstammend erkennbar). Aus den vielen möglichen Kombinationen der TNM-Klassifikation werden zur besseren statistischen Auswertbarkeit Gruppen (Stage) gebildet. Diese reichen von Stage 0 (Carcinoma in situ) bis Stage IV (Fernmetastasen).

Stadium	T	N	M	Dukes
0	Tis	N0	M0	--
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4a	N0	M0	B
IIC	T4b	N0	M0	B
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C
	T1	N2a	M0	C
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C
	T2-T3	N2a	M0	C
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C
	T4a	N2a	M0	C
	T3-T4a	N2b	M0	C
	T4b	N1-N2	M0	C
IVA	jedes T	jedes N	M1a	D
IVB	jedes T	jedes N	M1b	D

Tabelle 1.1: Die Stadien 0 bis IV bilden Gruppen aus TNM-Merkmalen (**T**umor, **N**ode/Lymphknoten, **M**etastasen), um diese beispielsweise zur statistischen Auswertung besser handhaben zu können. Die Dukes-Klassifikation hat mittlerweile vornehmlich historischen Wert, ist aber noch immer in der Literatur anzutreffen (Daten aus: Rose, 2013).

TNM-, Grade- und Stage-Einteilung werden durch die UICC-Klassifikation standardisiert (Sobin u. a., 2009; Rose, 2013).

1.5 Therapie

Auch im Bereich der Behandlung des KRK wurden in den vergangenen Jahrzehnten Fortschritte erzielt. Insbesondere verbesserte Verfahren der chirurgischen Intervention haben zu erheblichen Verbesserungen im Langzeitüberleben gerade in der Frühphase der Erkrankung diagnostizierter Patienten geführt (Soreide u. a., 2011). Und auch weitere eingesetzte Therapien, in erster Linie Chemotherapie und Bestrahlung zeigen zunehmende Erfolge, wobei sie sich bislang auf die letztendliche Überlebensrate nur wenig positiv auswirken (Kaatsch u. a., 2015, S. 39). Als neue

Therapieform kommt auch der Einsatz monoklonaler Antikörper in Betracht, für die jedoch bis auf erste vielversprechende Ausnahmen (Stintzing u. a., 2016) bisher zumeist ebenfalls nur eine geringfügige Verlängerung des Überlebens gezeigt werden konnte und die aufgrund erheblicher Behandlungskosten in der Kritik stehen (Chibaudel u. a., 2015). Welche Form der Therapie im individuellen Fall gewählt wird, beruht derzeit im Wesentlichen auf der aufgrund der Diagnostik beim einzelnen Patienten erfolgten Stadieneinteilung und der Möglichkeiten einer chirurgischen Intervention („S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“, 2014).

1.5.1 Überleben

Die Hoffnung auf eine langfristig kurative Therapie besteht aktuell nur durch chirurgische Tumor-Resektion, eventuell mit begleitender Strahlen- oder Chemotherapie. Dies führt bei im Frühstadium diagnostizierter Erkrankung zu hohen Heilungsraten, was für die USA ein 5-Jahres-Überleben von etwa 90 % beim UICC Stadium I zur Folge hat. Für die Stadien II und III reduziert sich das 5-Jahres-Überleben auf etwa 70 %. Bei Vorliegen von Fernmetastasen, im Stadium IV, dagegen liegt das 5-Jahres-Überleben bei nur etwa 10 % (Howlader u. a., 2015). Hier führen die heute verfügbaren Therapien in der Regel nur zu einer geringfügig verlängerten Überlebenszeit und sind damit als palliativ einzuordnen.

Mögliche erfolgversprechende Therapieformen gegen das KRK könnten in der Zukunft eine gezieltere Antikörpertherapie (Deonarain u. a., 2009) oder die Immuntherapie sein, bei der das Immunsystem selbst mittels Aktivierung verschiedener Komponenten gegen den Krebs zum Einsatz gebracht wird (Pan u. a., 2015; Canter u. a., 2016; Abbildung 1.4). Auch die Ausschaltung von zentralen Schaltstellen der Krebszellen, wahrscheinlich mittels kleiner Moleküle, erscheint erfolgversprechend (H. Seo u. a., 2013; Johansson und Brage, 2014; B.-J. Chen u. a., 2014; Buchert u. a., 2015). Jedoch ist bei solchen Therapieformen jeweils zunächst die Frage zu beantworten, welches die sinnvollsten Ziele eines Angriffs gegen die Krebszellen sind und dabei insbesondere, welche Zellen überhaupt wie getroffen werden. Es ist daher von großer Bedeutung,

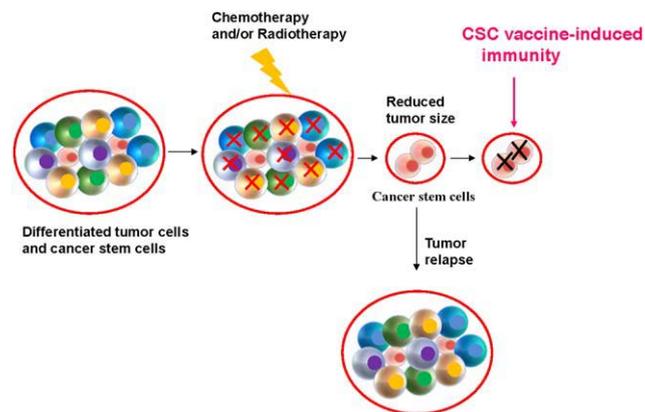


Abbildung 1.4: Beispielsweise mittels zielgerichteter Immunotherapie, hier mittels Immunisierung gegen Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) sollen Krebserkrankungen zukünftig effektiver behandelt werden können (Quelle: Pan u. a., 2015).

unser Wissen über die molekularen Zusammenhänge und mögliche Ansatzpunkte zur Heilung dieser Krankheit weiter zu steigern.

1.6 Molekulare Zusammenhänge des KRK

KRK gehen von den Epithelzellen des Kolons aus. Dabei kommt es über einen längeren Zeitraum hinweg zu einer Anhäufung von Mutationen in Zellen, die in den Krypten der Schleimhaut angesiedelt sind. Es wird vermutet, dass diese Mutationen in Stammzellen stattfinden (Huang u. a., 2009; Abdul Khalek u. a., 2010).

1.6.1 Mutationen

Zu 80-90 % betroffen von Mutation ist das APC-Gen (adenomatous polyposis coli; Bienz und Clevers, 2000), das beispielsweise bei der FAP auch bereits erblich mutiert ist (Kinzler und Vogelstein, 1996). Durch Mutation wird das APC-Gen, ein Tumorsupressor-Gen, deaktiviert. Im Rahmen des WNT-Signalwegs bindet das durch das APC-Gen normalerweise kodierte APC-Protein im Cytosol an β -Catenin, wodurch dieses abgebaut wird. Ist kein APC-Protein vorhanden, gelangt das stabilisierte β -Catenin per Translokation in den Zellkern und häuft sich mit der Zeit dort an. β -Catenin kann auch aufgrund einer Mutation des eigenen Gens (CTNNB1) oder aufgrund der Mutation von in der Funktion dem APC ähnlichen Genen wie AXIN1, AXIN2 oder TCF7L2 sowie NKD1 und andere mehr am Abbau gehindert werden (Markowitz und Bertagnolli, 2009). Im Zellkern bildet β -Catenin gemeinsam mit DNA-Bindungsfaktoren der TCF- (T-Cell Factor) / LEF1- (Lymphoid enhancer binding factor 1) Familie einen zentralen Bestandteil eines aus zahlreichen Proteinen bestehenden Komplexes von Transkriptionsfaktoren. Dieser aktiviert die Transkription von Genen, die in normalen Zellen auch die Erneuerung und Differenzierung von Stammzellen regulieren (Bienz und Clevers, 2000; Markowitz und Bertagnolli, 2009; Jaitner u. a., 2012; Ormanns u. a., 2014). Damit tragen diese Zielgene des β -Catenin, wenn sie auf diese Weise übermäßig exprimiert werden, direkt zu den von Hanahan und Weinberg postulierten Schlüsselmerkmalen von Krebs (Hallmarks of Cancer) (Hanahan und Weinberg, 2011) bei. Zu diesen werden gezählt die Proliferation, Apoptose, Migration, Invasion, epithelial-

mesenchymale Transition (EMT), Transformation, Angiogenese (Brabletz u. a., 2005b) und in letzter Konsequenz Stammzelleigenschaft von Tumorzellen (Vermeulen u. a., 2010).

1.6.2 Entstehung von Darmkrebs: die Adenom-Karzinom-Sequenz

Mutationen des APC-Gens wurden für das KRK schon früh in ein übergreifendes Modell der Tumorentstehung einordnet. Ein solches Modell, die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz, war bereits lange zuvor aufgrund makroskopischer und histologischer Daten entwickelt worden. Diese Sequenz beschreibt somit die Vorstufen, aus denen das KRK entsteht sowie die hierfür erforderlichen Mutationen (Nowell, 1986; Fearon und Vogelstein, 1990; Abbildung 1.5). Die Adenom-Karzinom-Sequenz geht von der Beobachtung aus, dass die meisten KRK aus Adenomen im Kolon entstehen. Diese wiederum entstehen aufgrund von Mutationen in Epithelzellen des Darms. Zu den beschriebenen Mutationen, deren zeitliche Reihenfolge nicht streng festgelegt ist, zählen neben der des APC unter anderem die Mutation von KRAS und TP53 sowie Deletionen auf Chromosom 18 (Kinzler und Vogelstein, 1996). Unter anderem aus der Beschreibung der Adenom-Karzinom-Sequenz wurde die Empfehlung zur Abtragung von Adenomen bei deren Entdeckung in der Koloskopie abgeleitet.

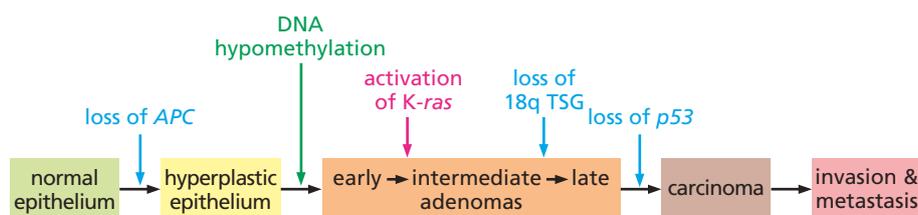


Abbildung 1.5: Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist das mittlerweile klassische Erklärungsmodell für die Entstehung von Darmkrebs. Demnach entstehen KRK aus Adenomen im Kolon, wobei unter anderem Mutationen in APC, KRAS und TP53 stattfinden (Quelle: Robert A. Weinberg und Weinberg, 2013, S. 450).

Eine mögliche Ergänzung oder Alternative zum Frühstadium der Entstehung von Krebs bietet die Hypothese der Feldkanzerisierung (field cancerisation), derzufolge sich den Krebs begünstigende Mutationen bereits in makroskopisch noch normal erscheinendem Gewebe des

Darms ansammeln. Dieses Gewebe ist noch kein Krebsgewebe, aber es besteht hier eine erhöhte Gefahr der Entstehung von Krebs gegenüber unverändertem gesundem Gewebe. Dies würde die frühzeitige Erkennung von derartig verändertem Gewebe beim Patienten erstrebenswert machen (Patel u. a., 2015; Abbildung 1.6).

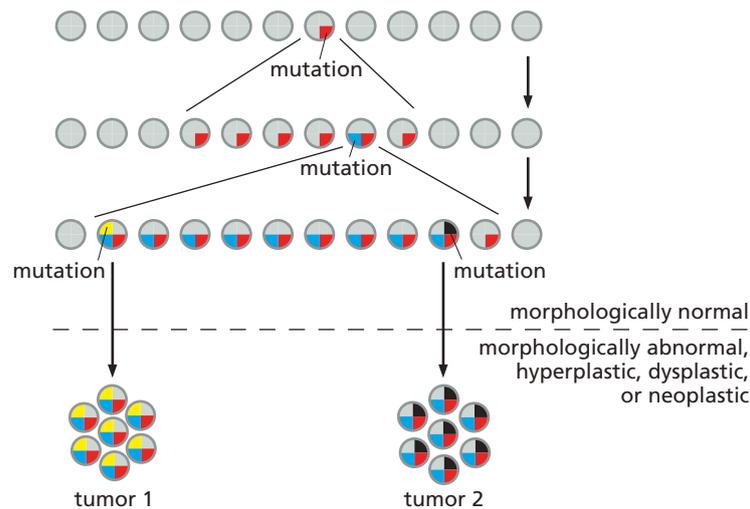


Abbildung 1.6: Gemäß der Hypothese der Feldkanzerisierung breiten sich einzelne Mutationen zunächst in morphologisch normal erscheinendem Gewebe aus, bevor auf dieser Grundlage in Folge weiterer Mutation Tumoren entstehen (Quelle: Robert A. Weinberg und Weinberg, 2013, S. 456).

1.6.3 Epigenetische Veränderungen

Ein weiterer beschriebener Weg der Tumorentstehung im Kolon basiert unter anderem auf epigenetischen Veränderungen im Tumor. Es wurde gezeigt, dass etwa 20 % der KRK wahrscheinlich in dieser Weise entstehen. Grundlage dieses Weges ist die Entstehung eines sessilen serratierten Adenoms (SSA), einer flachen Läsion insbesondere im aufsteigenden Teil des Kolons. Aus einem SSA kann in der Folge ein mikrosatelliten-instabiles KRK entstehen (Leggett und Whitehall, 2010). Ursächlich für diese Form des KRK ist die Mutation des Onkogens BRAF, die zu verstärkter Methylierung (und damit epigenetischer Veränderung) von CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) führt (Rad u. a., 2013). Hierdurch wird der Signalweg der Mitogen-aktivierten Protein

Kinase (MAPK) verstärkt aktiviert, der wiederum zu einer verstärkten Transkription von die Zell-Proliferation betreffenden Genen führt.

1.6.4 Genetische Vielfalt von Tumoren

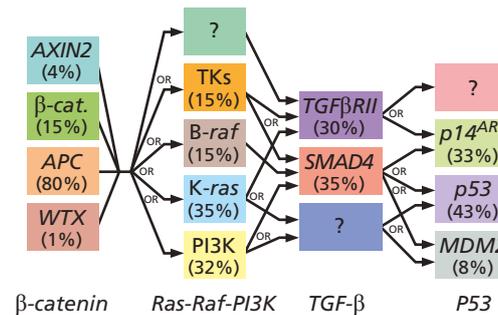


Abbildung 1.7: Der aktuelle Stand der Forschung übertrifft bezüglich der Mutationen, die zu KRK führen können, die Komplexität der Adenom-Karzinom-Sequenz bei weitem (Quelle: Robert A. Weinberg und Weinberg, 2013, S. 451).

Das lineare Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz zur Entwicklung von Tumoren wie auch das beschriebene Modell mit epigenetischen Veränderungen können nicht die in jüngerer Zeit mittels Genomsequenzierung ermittelte genetische Vielfalt von Genomen des KRK erklären. Somit stellen die vorgestellten Genkombinationen wahrscheinlich nur einen Ausschnitt des Gesamtbildes dar und damit nur einen Teilbereich der für die Tumorigenese gangbaren Wege (Beerenwinkel u. a., 2016; H. Seo u. a., 2013; Abbildung 1.7; Abbildung 1.10). Ebenfalls hinweisgebend auf eine größere Komplexität der Zusammenhänge in Tumoren sind die divergenten Ergebnisse einer Vielzahl von Studien zur Bedeutung der Akkumulation von β -Catenin im Zellkern. Gemäß dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt dem β -Catenin im Kern für die Tumorigenese eine zentrale Bedeutung zu. Die demnach zu vermutende Korrelation von immunohistochemisch gemessener β -Catenin-Expression mit dem Tumorverhalten und der Prognose der Patienten zeigte sich allerdings in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich und widersprüchlich. Dabei wurden verschiedentlich positive, negative oder überhaupt nicht signifikant feststellbare Korrelationen ermittelt (Bondi u. a., 2004; Gunther u. a., 1998; Brabletz u. a., 2000; Han u. a., 2006; Lugli

u. a., 2007; Norwood u. a., 2010; Resnick u. a., 2004; J. O. Seo u. a., 2010; Wangefjord u. a., 2013; Kamposioras u. a., 2013; Gao u. a., 2014). Erst durch komplexere Messungen lassen sich die Ergebnisse teilweise stabilisieren, beispielsweise durch Analyse des β -Catenin zusammen mit Zielgenen von β -Catenin wie Laminin-5 γ 2 (Hlubek u. a., 2001), CD44 (Horst u. a., 2009b) oder p16INK4a (Wassermann u. a., 2009) oder zusammen mit putativen Stammzellmarkern wie CD133 (Horst u. a., 2009a), CD166 oder CD44 (Horst u. a., 2009b). Mit dieser kombinierenden Form der Analyse ist die Definition und Auswertung von Expressionsmustern möglich, die zu stabileren und konsistenteren Ergebnissen führen. Damit bietet sie einen alternativen und attraktiven Ansatz zur Ermittlung von Überlebensdaten, der die Heterogenität und Komplexität von Tumoren berücksichtigt.

Insgesamt basiert die Funktion der einzelnen Tumorzellen wie auch des Gesamttumors wahrscheinlich nicht nur auf dem Nebeneinander diskreter Signalwege wie dem hier dargestellten WNT-Signalweg, sondern auf dem Zusammenwirken unterschiedlicher Signalwege („Crosstalk“), die zusammen ein steuerndes Netzwerk bilden (Kato, 2007; Takebe u. a., 2015). Eine zentrale Bedeutung könnte dabei den sogenannten Krebsstammzellen zukommen.

1.6.5 Krebsstammzellen

Das Konzept der Krebsstammzellen (CSC, Cancer stem cells) geht davon aus, dass unter den Zellen eines Tumors eine kleine Zellpopulation existiert, die über Stammzelleigenschaften verfügt (Bonnet und Dick, 1997; Reya u. a., 2001; Ignatova u. a., 2002). Es ist nach wie vor unklar, wie und woraus diese CSC entstehen. Als Vorläuferzellen kommen Stammzellen an der Basis der Darmkrypten in Frage. Diese sorgen normalerweise für die Erneuerung des Epithels (Barker u. a., 2007). Durch beispielsweise Mutation des WNT-Signalwegs werden sie möglicherweise in die Lage versetzt, ihre Stammzellnische zu verlassen (Huang u. a., 2009; Abbildung 1.8). Denkbar ist aber auch die Veränderung normaler Epithelzellen in CSC durch Umgebungseinflüsse (Schwitalla u. a., 2013). CSC haben die für Stammzellen übliche Fähigkeit zur

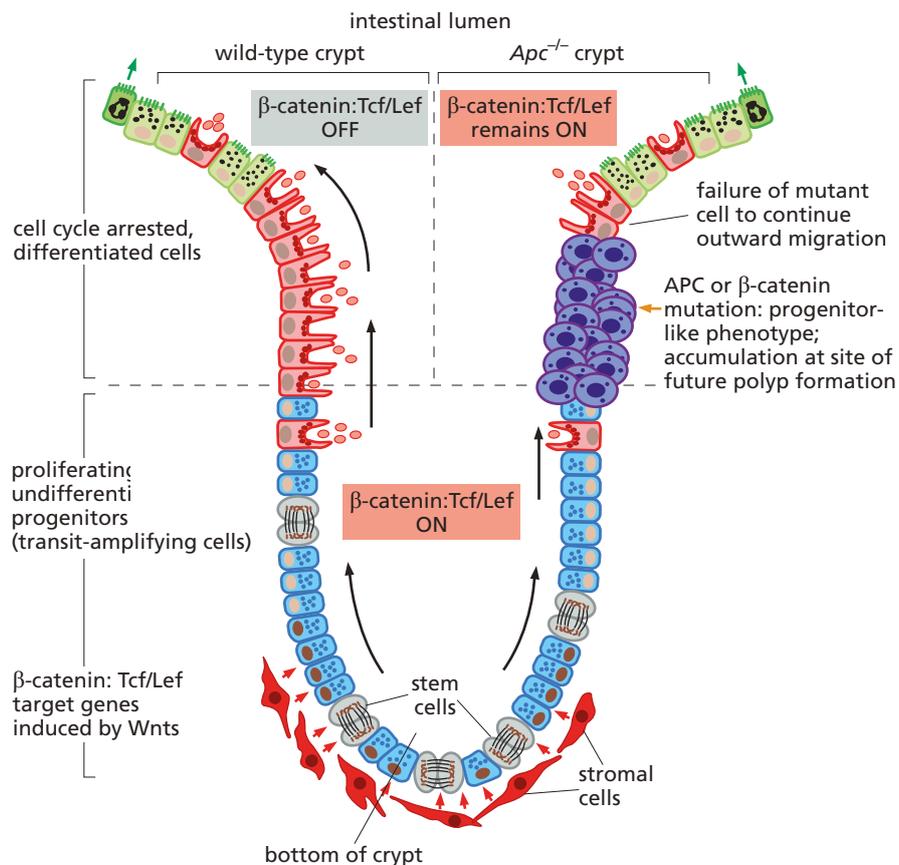


Abbildung 1.8: Stammzellen aus der Kryptenbasis können ihre Nische aufgrund einer APC-Mutation ohne Ausdifferenzierung verlassen und Polypen bilden, die Grundlage von Tumoren sind (Quelle: Robert A. Weinberg und Weinberg, 2013, S. 261).

Selbsterneuerung sowie die Fähigkeit, ihre Tochterzellen in verschiedene Zellarten differenzieren zu lassen (asymmetrische Teilung). Daneben besitzen sie auch tumorspezifische Eigenschaften. So unterliegt ihr Wachstum keiner normalen regulierenden Kontrolle, und es erfolgt keine Apoptose. Damit wird postuliert, dass CSC Tumoren generieren und formen können. Für den Dickdarm wurden hierfür Hinweise gefunden, indem kleine Subpopulationen von Zellen, die aufgrund bestimmter Oberflächenmerkmale isoliert wurden, im Tierversuch wieder neue Tumore auslösen konnten (O'Brien u. a., 2007; Ricci-Vitiani u. a., 2007; Dalerba u. a., 2007). Damit können einzelne CSC einen Tumor erneuern (Vermeulen u. a., 2010), nachdem beispielsweise die Tumorgöße mit Hilfe einer primär erfolgreichen Chemotherapie erheblich reduziert wurde.

Hierzu sind sie insbesondere auch deshalb in der Lage, da sie analog zu normalen Stammzellen in besonderem Maße resistent gegenüber Chemotherapien sind (Dylla u. a., 2008; Ghiaur u. a., 2012). Auch die aus den beschriebenen Eigenschaften hervorgehende Fähigkeit zur Bildung von Metastasen wird für CSC angenommen (Varnat u. a., 2009; Pang u. a., 2010). Dabei gilt im Falle epithelialer Tumoren insbesondere die EMT als bedeutsam, die vermutlich durch WNT gesteuert wird und somit für CSC verfügbar ist (Thiery, 2002; Brabletz u. a., 2005b; Zeindl-Eberhart u. a., 2014).

1.6.6 Tumor-Mikroumgebung

Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass CSC nicht nur aufgrund von Mutation entstehen und funktionieren, sondern ihre Funktion analog zur Stammzellnische nur im komplexen Zusammenspiel mit ihrer Mikroumgebung (Tumor Microenvironment, TME) erfüllen. Eine solche geeignete Mikroumgebung kann demnach wie bereits angedeutet auch die Funktion ehemals ausdifferenzierter Zellen als CSC bewirken (Quintana u. a., 2008; Vermeulen u. a., 2010; Schwitalla u. a., 2013; Canter u. a., 2016). Damit gestaltet sich das Zusammenspiel innerhalb der Bestandteile eines Tumors sehr viel dynamischer als gemäß anderen gängigen Theorien vermutet. Als interessant erweist sich in diesem Zusammenhang auch eine radikale Gegenposition zu den „Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan und Weinberg, die von Sonnenschein und Soto eingenommen wird. In ihrer Tissue Organization Field Theory (TOFT) gehen sie davon aus, dass Krebs in erster Linie aus der Zerstörung der normalen Gewebearchitektur durch Kanzerogene entsteht. Demzufolge sind Mutationen der DNA die Folge und nicht die Ursache von Veränderungen auf Gewebeebene (Soto und Sonnenschein, 2011). Trotz der Haltung der Verfechter der TOFT, dass diese unvereinbar mit den von Hanahan und Weinberg beschriebenen Prinzipien der Entstehung von Krebs aufgrund zellulärer Mutation sei (Sonnenschein und Soto, 2013), kommen beide Sichtweisen in der aktuellen Forschung zunehmend zusammen. So erscheinen beide Prinzipien, die Akkumulation von Mutationen und die Definition von Tumoren auf Grundlage der Funktion

des sie umgebenden Gewebes durchaus vereinbar (Rosenfeld, 2013; Bedessem und Ruphy, 2015). Und gerade die Entstehung von Krebsstammzellen aufgrund von Signalen des sie umgebenden Gewebes vereint konstruktiv Elemente beider Theorien (Schwitalla u. a., 2013; Abbildung 1.9).

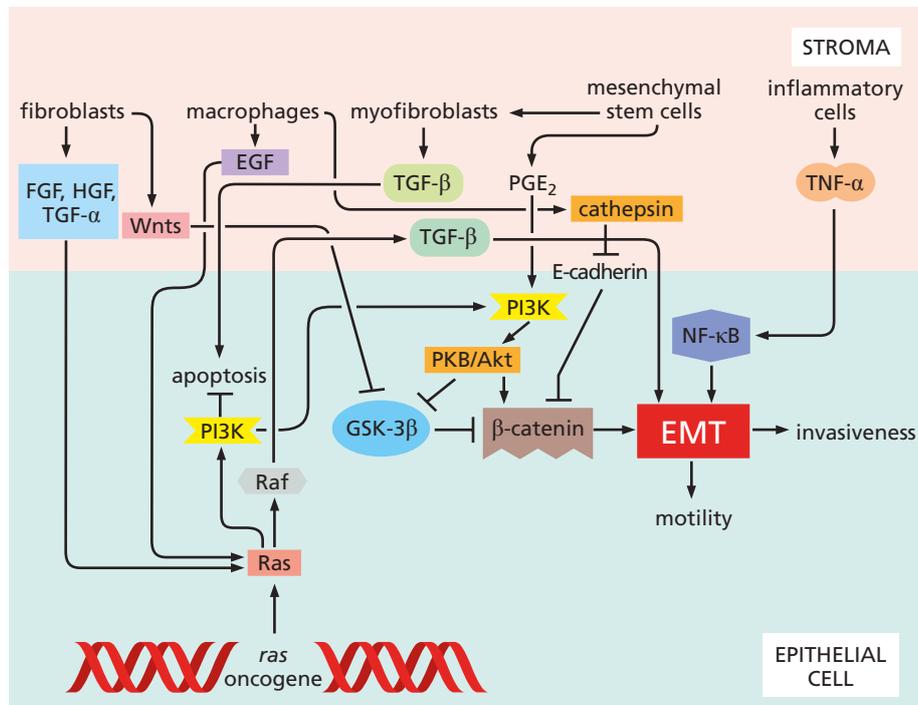


Abbildung 1.9: Die Hypothese von der Bedeutung der Tumor-Mikroumgebung besagt, dass Stroma und intrazelluläre Signalwege gemeinsam zu Stammzeleigenschaften und EMT führen (Quelle: Robert A. Weinberg und Weinberg, 2013, S. 674).

Grund zu der Hoffnung, die sich aus solchen Überlegungen ergebenden komplexen Systeme und Interaktionen beschreiben und gesammeltes Wissen auswerten zu können, bietet die (computergestützte) Systembiologie (Kitano, 2002; Koutsogiannouli u. a., 2013; Beerenwinkel u. a., 2016). Gerade in Bezug auf Netzwerke interagierender Signalwege (H. Seo u. a., 2013; X. Wu u. a., 2014; Dong u. a., 2015; Abbildung 1.10) aber auch in Bezug auf die Beschreibung der Heterogenität von Tumoren, darunter auch des KRK, wurden auf dem Gebiet der Systembiologie bereits beträchtliche Anstrengungen unternommen. Aussichtsreich erscheint insbesondere die Möglichkeit der Integration und Interpretation großer Datenmengen, die bei der Analyse heterogener und komplexer Systeme anfallen. So können molekulare Mechanismen wie auch

berufen sich direkt auf die Embryologie (Soto und Sonnenschein, 2011). Es erscheint also plausibel, dass Krebszellen und dabei insbesondere KRK auf zelluläre Mechanismen zurückgreifen können, die in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen. Somit ist bei den Mechanismen von Krebs eine der Embryologie zumindest vergleichbare Komplexität zu erwarten. Die Bekämpfung von Krebs kann des Weiteren möglicherweise auch ganz direkt von der Embryologie profitieren. So können bestimmte Krebszellen offenbar ihren malignen Phänotyp verlieren, wenn sie in sich entwickelnde Embryos transferiert werden (Sell, 2004; Hendrix u. a., 2007).

Die beiden Felder von Krebsforschung und Embryologie überlappen sich insgesamt deutlich. Nutzbringende Erkenntnisse können aus der gemeinsamen Betrachtung beider Felder entstehen. Auch der Gegenstand dieser Publikation, die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), spielt eine Rolle in beiden Bereichen. Damit ist es nicht verwunderlich, dass der ALDH auch im komplexen Netzwerk von Krebs, wie es derzeit erforscht wird, eine Bedeutung zukommt.

1.7 ALDH

Die Familie der ALDH – Aldehyd-Dehydrogenasen – besteht aus einer Gruppe von Enzymen, die die Oxidation von endogenen und exogenen Aldehyd-Substraten in ihre entsprechenden schwachen Carbonsäuren katalysieren. Hierfür sind sie vom Substrat Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)+ (NAD(P)+) abhängig. Endogene Aldehyde werden im Metabolismus von Aminosäuren, Alkoholen, Fetten und Vitaminen erzeugt, während exogene Aldehyde aus dem Stoffwechsel einer Vielzahl von Umwelteinflüssen und Substanzen wie Zigarettenrauch, Autoabgasen und Zytostatika entstammen (Lindahl, 1992). Indem die ALDH-Enzyme die Zellen vor den zytotoxischen Effekten der Aldehyde schützen, nehmen sie eine Funktion der zellulären Entgiftung wahr.

Insbesondere die Rolle von ALDH beim enzymatischen Abbau von Alkohol durch Oxidation des giftigen Abbauprodukts der Alkohol-Dehydrogenase (ADH), des Acetaldehyd, wurde

vielfach untersucht (Ehrig u. a., 1990). Aber auch bei anderen Stoffwechselfvorgängen spielt ALDH mutmaßlich eine Rolle (Jackson u. a., 2011), beispielhaft herausgegriffen seien hier die Molekularpathologie von Morbus Parkinson (Cai u. a., 2014) und der weibliche Fettstoffwechsel (Petrosino u. a., 2014). In beiden Fällen spielt die Isoform ALDH1A1 eine besondere Rolle.

Aktuell werden 24 mutmaßlich funktionelle Gene für ALDH unterschieden (Vasiliou u. a., 2013). Die im Folgenden näher betrachteten ALDH1 Proteine, zu denen die hochkonservierten Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 und ALDH2 gezählt werden, werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, sowie in allen subzellulären Kompartimenten (Vasiliou u. a., 2013). ALDH1A1-A3 und ALDH2 sind hauptsächlich im Zytosol der Zellen lokalisiert und oxidieren dort Retinal und aliphatische Aldehyde. Das hier untersuchte ALDH1A1 kodiert ein Homotetramer, das in vielen adulten Organen auftritt, darunter Gehirn, Hoden, Niere, Auge, Leber und Lunge (Niederreither u. a., 2002).

In der Literatur erscheint die Benennung der ALDH teilweise unübersichtlich. Dies ist mit der Einführung einer modernen Nomenklatur zur Benennung von ALDH Subtypen zum Ende der 1990er-Jahre zu erklären, deren teilweise Überlappung mit den alten Trivialnamen bis heute zu Mehrdeutigkeiten führt. Das heutige ALDH1A1 ist beispielsweise historisch auch als RALDH1 und ALDH1 bekannt, wobei letzteres heute die Bezeichnung für die Familie der Gene darstellt, die unter anderem die Subfamilien ALDH1A, ALDH1B und ALDH1C beinhaltet. Die ALDH1A-Subfamilie beinhaltet wiederum die bereits erwähnten Retinsäure synthetisierenden Enzyme ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 (Vasiliou u. a., 1999; Vasiliou u. a., 2013).

ALDH1A1 zeigt hohe Affinität zu Retinal, einer Form von Vitamin A. Dieses oxidiert es zu Retinsäure. Retinsäure ist Ligand für Retinsäure-Rezeptoren im Zellkern und reguliert so die Expression von Genen, die in der Embryologie wie auch bei Krebszellen eine Rolle spielen (X. Xu u. a., 2015).

1.7.1 ALDH in der Embryologie

Retinsäure und damit ALDH beeinflusst viele Entwicklungsprozesse, die auch durch proteinbasierte Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen die Neurogenese, Kardiogenese, Bildung der Körperachsen, Entwicklung von Extremitäten, Darmsystem und Auge. Aktuelle Forschung deutet darauf hin, dass es sich hierbei um ein den sonstigen Wachstumsfaktoren übergeordnetes System handeln könnte, welches diese teilweise reprimiert. Damit dürfte die Funktion der ALDH, insbesondere von ALDH1A1-A3, von entscheidender Bedeutung für normales Wachstum, Differenzierung, Entwicklung und Funktion von adulten Organen und Geweben sein (Maden, 2000; Niederreither u. a., 2002; Duyster, 2008; Wright-Jin u. a., 2013). Auch hier ist bei der Berücksichtigung insbesondere älterer Literatur die bereits erwähnte Veränderung der Nomenklatur zu beachten, in der Embryologie insbesondere die Benennungen RALDH1 für ALDH1A1, RALDH2 für ALDH1A2 und RALDH3 für ALDH1A3.

1.7.2 Funktionelle Bedeutung von ALDH bei Krebs

Es erscheint aufgrund der aufgezeigten Parallelen (Abschnitt 1.6.7) nicht verwunderlich, dass die bei der Entwicklung des Menschen in der Embryologie bedeutsame Rolle des ALDH auch bei Krebs, der ebenfalls – in deregulierter Form – Wachstums- und Entwicklungsprozess ist, zum Tragen kommt.

Regulation

Regulierend behält ALDH wahrscheinlich in Krebszellen die aus der Embryologie bekannten durch die Retinsäure vermittelten Funktionen bei. Aufgrund der Aktivierung einer Reihe von zellulären genetischen Programmen von Zelldifferenzierung, Apoptose und Regulierung von Zellwachstum wirkt Retinsäure Mechanismen von Krebs wie dem unbegrenzten Replikationspotential und der Apoptosevermeidung (Hallmarks) direkt entgegen (Lotan, 1980; Clifford u. a., 1996; Toma u. a.,

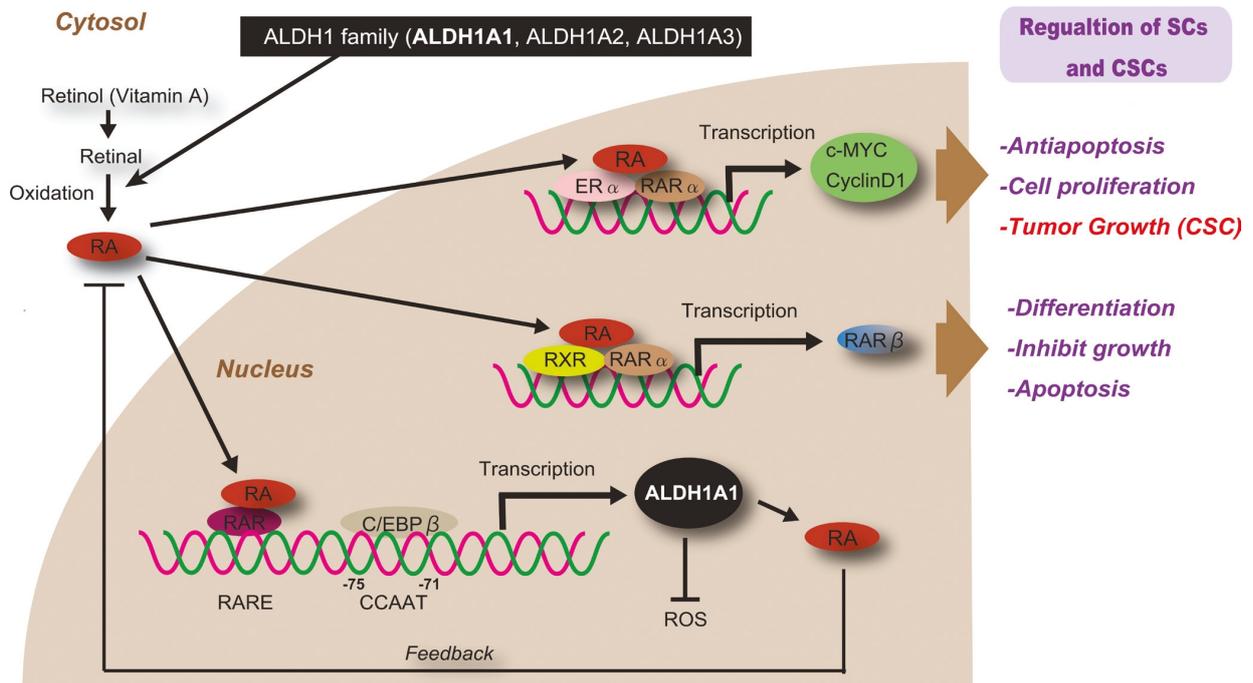


Abbildung 1.11: ALDH1 wirkt über die Steuerung des Metabolismus von Retinsäure (RA) regulierend auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Stammzellen und CSC ein (Quelle: Tomita u. a., 2016).

1997; Abbildung 1.11). Die Therapie einer speziellen Form der Leukämie, der Promyelozytenleukämie, konnte so durch die Gabe einer Form der Retinsäure revolutioniert werden, mit nunmehr fast hundertprozentiger Heilungsrate (Tallman u. a., 1997; Lo-Coco u. a., 2013). Auch die Biologie von CSC des Mammakarzinoms wird durch ALDH reguliert, indem es den Metabolismus der Retinoide, insbesondere der Retinsäure beeinflusst. Retinsäure kann durch Bindung an nukleäre Rezeptoren der CSC zielgerichtete Genexpression aktivieren, die Verlust von Stammzellmarkern, Differenzierung und Zellzyklusarrest bewirkt. Retinoide beeinflussen auch den Notch-Signalweg, wodurch dieser Effekt verstärkt wird. Zusammen werden so Tumorwachstum und Ausbreitung im Falle des Mammakarzinoms deutlich reduziert (Ginestier u. a., 2009; Rodriguez-Torres und Allan, 2016). Auch für das KRK gibt es zunehmend Hinweise auf eine regulierende Funktion von ALDH (Singh u. a., 2015).

Chemoresistenz

Ganz unmittelbar betreiben die ALDH-Enzyme die Oxidation von Aldehyden, die im Körper karzinogenes und anderweitig toxisches Potential besitzen (Lindahl, 1992). Auf ähnliche Weise tragen sie auch zu Resistenzen gegen Chemotherapie bei. Insbesondere für die Therapie mit dem verbreiteten Chemotherapeutikum Cyclophosphamid wurde gezeigt, dass ALDH dessen Effektivität deutlich reduziert (Hilton, 1984; Friedman u. a., 1992), wobei die Isoformen ALDH1A1 und ALDH3A1 eine wichtige Rolle spielen (Sladek, 1999). Dies wurde speziell für ALDH1A1 auch für das KRK bestätigt. Dabei wird wie allgemein in der aktuellen Forschung davon ausgegangen, dass vor allem die CSC resistent gegenüber Chemotherapie sind (Dylla u. a., 2008; Abschnitt 1.6.5).

1.7.3 Krebsstammzellmarker

Die Vermutung liegt nahe, dass Mitglieder der ALDH-Familie als Marker für CSC dienen können, da sie deren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vermitteln. Insbesondere ALDH1 wurde hier intensiv analysiert und in verschiedenen Geweben als Marker für CSC verifiziert. ALDH1-Expression wurde zuerst in kleinen Subpopulationen neuronaler (Corti u. a., 2006) und hämatopoetischer (Christ u. a., 2007) Tumorzellen gefunden, die als CSC-angereichert gedeutet wurden. Auch in CSC der KRK wurde die Expression von ALDH1 in kleinen Subpopulationen gefunden. Hier genügte die Einpflanzung von 25 ALDH1-positiven Tumorzellen in immunokompromitierte Mäuse, um Tumorstadium zu erzeugen (Huang u. a., 2009). Dies ist sehr effizient gegenüber beispielsweise 3000 für den Oberflächenmarker CD133-positiven KRK-Zellen, die unter vergleichbaren Bedingungen zur Erzeugung von Tumoren benötigt wurden (Ricci-Vitiani u. a., 2007).

1.8 Überprüfung von ALDH1A1 bezüglich Überleben und funktioneller Eigenschaften

In den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass es zunehmend mehr am KHK erkrankte Menschen gibt, und dass die Heilungschancen in großen Teilen der Welt noch immer schlecht sind. Darüber hinaus wurde verdeutlicht, dass auf der molekularbiologischen Ebene aktuell viele Mechanismen und Zusammenhänge nur wenig verstanden sind, insbesondere das vernetzte Zusammenspiel biologischer Elemente betreffend, das die Krebserkrankung ausmacht. Hoffnung auf die Entschlüsselung eines großen Gesamtbilds bieten mutmaßlich langfristig die netzwerkbasierenden Ansätze der Systembiologie. Ein deutlich vernetzter Spieler im System des Darmkrebs ist ALDH. Die vorliegende Arbeit hat es sich zur Aufgabe gemacht, Hinweise dafür zu finden, ob dieses Enzym prinzipiell eine Rolle im Gesamtsystem des KHK spielt, und ob das Auftreten von ALDH mit dem Überleben von Patienten zusammenhängt. Als aussichtsreicher Vertreter der Familie der ALDH wurde ALDH1A1 zur näheren Untersuchung ausgewählt. Diese Isoform zeigte sich gemäß der in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Literatur als gleichermaßen bedeutsam für die Resistenz von CSC gegen Chemotherapeutika, für den Retinsäure-Metabolismus einschließlich der damit zusammenhängenden Genregulationen sowie als Krebsstammzellmarker. Damit erschien es wahrscheinlich, dass ALDH1A1 auch Karzinogenese und Metastasierung beeinflusst. Dies sollte zunächst retrospektiv mittels eines Kollektivs von Darmkrebspatienten untersucht werden. Dabei wurde überraschenderweise die erwartete Korrelation zwischen der Expression von ALDH1A1 und dem Überleben der Patienten im KHK in einer ähnlich angelegten Studie kurz vor der Durchführung meiner Überlebensstudie nicht gefunden (Lugli u. a., 2010). Über diese Studie hinausgehend existierten zu diesem Zeitpunkt keinerlei publizierte Ergebnisse zur Korrelation von ALDH1A1 mit Patientenüberleben oder zu dessen funktioneller Bedeutung.

Aufgrund der vorhandenen Daten sowie der hier bereits ausgeführten Überlegungen zur Bedeutung der ALDH erschien es mir wahrscheinlich, dass ein solcher Zusammenhang besteht. Ich stellte daher die Hypothese auf, dass eine Korrelation des Auftretens von ALDH1A1 mit dem Überleben vorhanden ist, und dass dies durch sorgfältige Auswahl des Ansatzes zur Evaluation der Expressionsmuster von ALDH, kombiniert mit geeigneten Maßnahmen zur Fokussierung des Ergebnisses, auch gezeigt werden kann. Ebenfalls hervorgehend aus den Vorüberlegungen zur Bedeutung von ALDH1A1 in unterschiedlichen zellulären Bereichen ergab sich die weitere Hypothese, dass ALDH1A1 eine funktionelle Bedeutung im CRC zukommt.

Somit wurde zunächst ein Patientenkollektiv in einer Überlebensstudie retrospektiv untersucht. Die Untersuchungsergebnisse wurden 2012 veröffentlicht (Vogler u. a., 2012), sie werden im Folgenden inhaltlich wiedergegeben. Ergänzend zu dieser retrospektiven Untersuchung wurden funktionelle Tests mit ALDH1A1 anhand von Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden ebenfalls im weiteren Verlauf dieser Arbeit vorgestellt.

Kapitel 2

Material und Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt sowie deren Einsatzgebiete und die jeweilige Form der Anwendung dargestellt und detailliert beschrieben. Soweit Material und Methoden des Patientenkollektivs betroffen sind, handelt es sich dabei zu großen Teilen um eine inhaltliche Wiedergabe meiner entsprechenden Publikation (Vogler u. a., 2012).

2.1 Patienten und Gewebeproben

Für diese Arbeit wurden retrospektiv von 186 Patienten mit einem kolorektalen Tumor bereits vorhandene in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben analysiert. Die Standardmethode der FFPE dient der Haltbarmachung von Gewebe und der Ermöglichung weiterer histologischer Untersuchung. Hierbei wird zu-

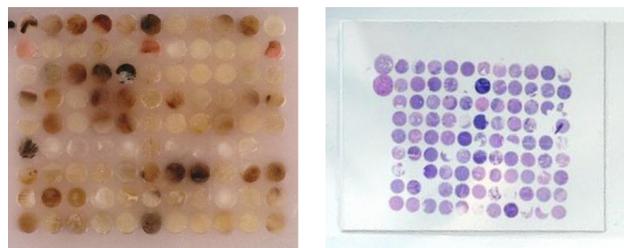


Abbildung 2.1: Tissue Microarrays (TMA): Paraffinblock mit eingebetteten Proben (links), Schnitt auf Objektträger (rechts) (Quelle: Johns Hopkins Tissue MicroArray Core Facility).

erst das Gewebe durch Formaldehyd fixiert, wobei das Formaldehyd die Proteine im Gewebe denaturiert und somit Lebensvorgänge in den Zellen wie beispielsweise die postmortale Autolyse verhindert. Hierauf folgend werden die Proben in Paraffin eingebettet, um sie in für die Mikroskopie ausreichend dünne Schnitte schneiden zu können. Alle Patienten, von denen Gewebeproben analysiert wurden, erhielten einen chirurgischen Eingriff in kurativer Absicht an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) im Zeitraum zwischen 1994 und 2004. Die als Paraffin-Blöcke vorliegenden Gewebeproben wurden aus den Archiven des Instituts für Pathologie der LMU entnommen. Tissue Microarrays (TMA) wurden daraus mittels eines Beecher MTA-1 Instruments (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA) unter Einsatz einer 1,0 mm Stanze hergestellt. TMA eignen sich insbesondere zur parallelisierten Verarbeitung vieler Gewebeproben, da durch dieses Verfahren in einen Paraffinblock zahlreiche Gewebeproben in Form von dünnen Säulen gemeinsam eingebettet werden können (Abbildung 2.1). Vom Tumorzentrum München wurden die Daten zum weiteren Verlauf der Krankengeschichte der Patienten akquiriert. In die Untersuchung einbezogen wurden nur moderat differenzierte kolorektale Adenokarzinome (G2 gemäß World Health Organization, WHO) im Tumorstadium 3 (T3), ohne Lymphknoten (N0) oder Fernmetastasen (M0) zum Zeitpunkt der Diagnose (siehe hierzu auch Abschnitt 1.4). Im Verlauf der Beobachtungszeit starben 29 Patienten (15,6 %) aufgrund des diagnostizierten kolorektalen Tumors (Tabelle 3.1). Die Auswertung der angefärbten Schnitte erfolgte in zufälliger Reihenfolge und bezüglich des klinischen Verlaufs verblindet. Die Untersuchung befand sich im Einklang mit den Richtlinien des zuständigen lokalen Ethikkomitees.

2.2 Zellkultur

Die humanen kolorektalen Tumorzelllinien HT-29, CACO-2, DLD-1, RKO, HCT-116, LOVO, SW-480, COLO-320 und LS-174T wurden über DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) oder ATCC (American Type Culture

Collection, Vertrieb LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bezogen. Die korrekte Identität der Zelllinien wurde mittels DNA-Typisierung sichergestellt. Die Tumorzelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 1:1 (DMEM/Ham F-12; Biochrom AG, Katalognummer: FG4815) kultiviert, lediglich für die Zelllinie COLO-320 wurde gemäß Standard Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640 Medium; Biochrom AG, Katalognummer: FG1215) eingesetzt. Beide Zellkulturmedien wurden mit je 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS; Biochrom (Merck), Berlin/Darmstadt, Deutschland) ergänzt. Es wurden keine Antibiotika eingesetzt. Die Kulturmedien wurden im Abstand von drei bis fünf Tagen erneuert. Die Tumorzelllinien wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % mit Hilfe von Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom AG, Katalognummer: L2148) übertragen.

2.3 Immunohistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde an 5 µm Schnitten von FFPE Proben kolorektaler Adenokarzinome routinemäßig durchgeführt (siehe hierzu Horst u. a., 2008; Wassermann u. a., 2009). Für Vergleichsstudien der Expressionsmuster von ALDH1A1 und β -Catenin wurden aufeinanderfolgende Schnitte verwendet. Als primäre Antikörper wurden monoklonale Mausantikörper spezifisch für ALDH1A1 (clone 44, 1:400; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) sowie β -Catenin (clone 14, ready to use; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) eingesetzt. In der Färbung wurde für ALDH1A1 nur die Immunreaktion des Zytoplasmas bewertet, für β -Catenin wurden nukleäre, zytoplasmatische und Membranfärbung getrennt betrachtet. Die Färbung wurde automatisiert durchgeführt mit Hilfe eines Ventana BenchMark XT Färbeautomaten (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Hierbei wurden XT UltraView diaminobenzidine Kits (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) eingesetzt. Abschließend wurden alle Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Um unspezifische Bin-

dungen zu registrieren, wurden isotypische Kontrollantikörper eingesetzt, die die Arbeitsschritte parallel durchliefen.

2.4 Western Blot

Es wurden Proteinlysate von fast konfluenten (gerade noch nicht vollständig zusammengewachsenen) Zelllinien der Typen COLO-320 und DLD-1 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate von Hep G2 (Santa Cruz Biotechnology, St. Cruz, CA, USA) eingesetzt. In jeder Bahn des verwendeten 10 % (w/v) SDS denaturierenden nicht kontinuierlichen Polyacrylamidgels wurden Volumina des Proteinlysats eingesetzt, die 45 µg Protein enthielten. Als Primärantikörper wurden monoklonale Mausantikörper mit Spezifität für ALDH1A1 (clone 44, 1:1000, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) und β-Actin (clone AC-15, 1:1000; Sigma St. Louis, MO, USA) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Hasenantikörper mit anti-Maus IgG (H+L) eingesetzt (clone 31452, 1:10,000; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Zur Darstellung wurden enhanced chemoluminescence kits (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore, Billerica, MA, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

2.5 Aldefluor und DEAB

Die ALDH-Aktivität der eingesetzten Zelllinien wurde mit Hilfe des Aldefluor-Assays (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland) in standardisierter Weise (Storms u. a., 1999; J. S. Moreb u. a., 2007) ermittelt. Hiermit konnte zugleich die Wirksamkeit des Inhibitors 4-Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) zur Unterdrückung der ALDH-Aktivität bei den eingesetzten Zelllinien demonstriert werden. Es wurde gemäß Protokoll des Herstellers vorgegangen, wobei die eingesetzte Zellzahl pro Test für die verwendeten CSC Zelllinien im Vorversuch auf 2×10^5 optimiert wurde. Dabei

erfolgte jeweils eine Messung mit einer Probe der vorbereiteten Zellen ohne Zusatz von DEAB und eine zweite Messung mit einer Probe der vorbereiteten Zellen unter Zugabe von DEAB. Da DEAB in Ethanol gelöst wird, wurde den Zellen, die nicht mit DEAB behandelt wurden, in der Kultur die entsprechende Menge an Ethanol ohne DEAB zugegeben.

2.6 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen erfolgten mit Hilfe eines Accuri C6 Durchflusszytometers (BD, Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA) gemäß des Hersteller-Protokolls. Zur Auswertung wurde die zum eingesetzten Gerät gehörende CFlow Plus Software in der Version 1.0.227.3 verwendet.

2.7 Zellproliferation

Die Geschwindigkeit der Vermehrung von Zellen aus den verwendeten Zelllinien wurde durch Zählung 24 Stunden nach Beginn des Experiments ermittelt. Dies wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zum Ausschluss von toten Zellen und Zellresten wurden die Zellen in Kultur zuvor mittels Propidiumiodid, 1 µg/ml (PI; Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Um eventuelle Ungenauigkeiten des Zählverfahrens (in erster Linie die nicht völlig konstante Durchflussquote des verwendeten Durchflusszytometers) zu kompensieren, wurde den Proben vor der Durchflusszytometrie jeweils zu gleichen Anteilen gefärbte Zellen der selben Zelllinie zugefügt. Diese Färbung erfolgte mittels Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE; Merck, Darmstadt, Deutschland), das im verwendeten Durchflusszytometer gemeinsam mit PI gemessen werden konnte. Die ermittelte Zahl der ungefärbten Zellen wurde jeweils um den Faktor der Zählergebnisse der in der gleichen Probe gemessenen CFSE-gefärbten Zellen korrigiert. Diese Ermittlung der Vermehrungsgeschwindigkeit wurde jeweils in Triplikaten vorgenommen.

2.8 Migration

Zur Analyse der Migration wurden die beiden Verfahren des Wundheilungsassay mit Hilfe von IBIDI-Kammern sowie des Transwell Assay eingesetzt.

2.8.1 Wundheilungsassay zur Migration

Die Migration wurde zunächst mittels Wundheilungs-Assays getestet. Dabei wurden mit Hilfe einer Barriere zwei zueinander in definiertem Abstand befindliche Zell-Monolayer in der Zellkultur erzeugt. Zu diesem Zweck wurden Kultur-Inserts (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) gemäß standardisierter Prozedur (Liang u. a., 2007; Horst u. a., 2009b) verwendet, beide Kammern wurden mit je 70 μl Kulturmedium mit 5×10^5 Zellen/ml befüllt. Nach Anhaften der Zellen wurden nach 24 Stunden die Inserts entfernt und die Platten mit Zellkulturmedium (Abschnitt 2.2) aufgefüllt. Die Verkleinerung der verbleibenden Lücken wurde mittels Fotodokumentation festgehalten. Die quantitative Auswertung dieser Wundflächen wurde mit Hilfe der Bildbearbeitungs-Software Photoshop CS6 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) durchgeführt. Hierbei wurden mittels des Zauberstab-Werkzeugs (Toleranz: 6) die Wundflächen ausgewählt und die Wundränder nachfolgend durch Kantenglättung (Einstellung 64) begradigt, was auch verbliebene kleine im ersten Arbeitsschritt nicht mit ausgewählte Bereiche innerhalb der Wundfläche erfasste (Abbildung 2.2). Die resultierende Fläche wurde mittels der Pixelberechnung des Histogrammwerkzeugs ermittelt (hierbei ist darauf zu achten, dass das Histogramm jeweils auf dem aktuellen Bild basieren muss, wozu es gegebenenfalls vor dem Auslesen im Programm zu aktualisieren ist). Es wurde jeweils die bereits wieder zugewachsene Fläche bewertet, die sich aus der Differenz der Wundfläche zu Beginn des Experiments und der wie beschrieben ermittelten aktuellen Wundfläche ergibt. Für die LOVO-Zelllinie wurde aufgrund zahlreicher im Wundbereich befindlicher und das Ergebnis damit verfälschender Einzelzellen als

zweites Verfahren ebenfalls die Ermittlung der durchschnittlichen Abstände der wie beschrieben festgelegten Wundränder durchgeführt. Im Versuch wurden jeweils Triplikate ausgewertet.

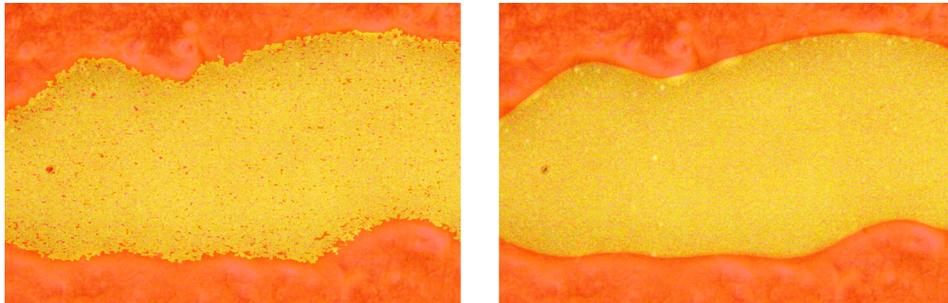


Abbildung 2.2: Überprüfung der Migration mittels Wundheilungs-Assays, die abfotografierten Zellverbände (links) werden mit der Bildbearbeitungs-Software Photoshop standardisiert vermessen (rechts).

2.8.2 Transwell Migration Assay

Als zweites Werkzeug zur Einschätzung der Migration *in vitro* wurde wie vorbeschrieben (Fang u. a., 2007; Hulkower und Herber, 2011) ein Transwell Assay eingesetzt (ThinCert™, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 250 μ l Medium ohne FBS in den Transwell Inserts (Abbildung 2.3) platziert. In die Gefäße, in welche die Transwell Inserts eingesetzt wurden, wurde jeweils 500 μ l Medium mit FBS als Chemoattraktant gefüllt. Nach Ablauf der in Vorversuchen auf 96 Stunden festgelegten Migrationszeit wurden die Zellen jeweils zehn Minuten lang mit Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die gefärbten

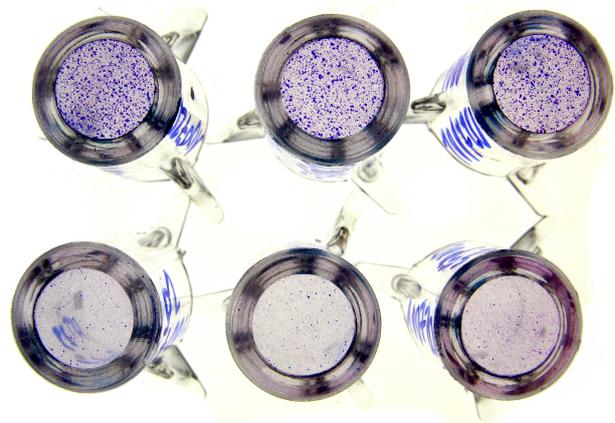


Abbildung 2.3: Transwell Inserts sind kleine Gefäße, die mit Zellen in Kultur befüllt wurden und die in eine 24-Well-Platte eingesetzt wurden. Zur Auswertung des Versuchs wurden die Inserts wieder herausgenommen und die an der Außenseite befindlichen Zellen beurteilt.

Transwell Inserts wurden auf einem Lichttisch fotografiert (Abbildung 3.12). Die Auswertung erfolgte in Triplikaten, wobei mit der Software Photoshop CS6 mittels des Zauberstab-Werkzeugs jeweils pixelgenau die Menge der migrierten Zellen pro definierter Fläche vermessen wurde. Hierzu wurde zunächst für jede Probe ein Kreis mit definiertem Radius (in diesem Fall 440 Pixel) freigestellt. Sodann wurde mittels des Zauberstab-Werkzeugs bei einer Toleranzeinstellung von 32 die nicht-weiße Fläche selektiert und wie oben beschrieben mit Hilfe des Histogramm-Werkzeugs die Zahl der Pixel ausgezählt.

2.9 Transwell Invasion Assay

Die Invasivität der Zelllinien wurde ebenfalls im Transwell Assay untersucht. Hierzu wurde wie vorbeschrieben eine dünne Matrigel-Schicht (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) auf die verwendeten Inserts aufgetragen (Fang u. a., 2007; Hulkower und Herber, 2011). Der weitere Versuchsablauf war identisch zur Transwell Migration (Abschnitt 2.8.2). Die Zeit bis zur Auswertung wurde auf Grundlage der Auswertung von Vorversuchen auf sieben Tage festgelegt. Aufgrund einer in den Vorversuchen festgestellten gewissen Variabilität der Dicke der erzeugten Matrigel-Schicht zum Rand der Inserts hin wurde die zur Vermessung der Zellen festgelegte kreisförmige Fläche in der Bildbearbeitung mit etwas Abstand zum Rand der Gefäße und damit kleiner als die verfügbare Gesamtfläche gewählt (in diesem Fall 128 Pixel). Die Beurteilung fand ebenfalls an Hand von Triplikaten und ansonsten wie für den Migration Assay beschrieben statt.

2.10 Strukturierte Literaturlauswertung

Die Literaturrecherche zum in dieser Arbeit zentralen Thema ALDH beim KRK erfolgte über die textbasierte Meta-Datenbank PubMed (<http://pubmed.org>). Zunächst wurde mittels der

folgenden Zeichenkette, die für das Feld von ALDH und KRK zentral bedeutsame Suchworte kombiniert, eine reguläre Suche durchgeführt:

```
(ALDH[All Fields] OR "aldehyde dehydrogenase"[All Fields] OR  
"ALDH1"[All Fields] OR ALDH1A1[All Fields] OR RALDH[All  
Fields]) AND (CRC[All Fields] OR ("colon"[All Fields]) OR  
colorectal[All Fields] OR rectum OR (("beta"[All Fields] AND  
"catenin"[All Fields]) OR "beta catenin"[All Fields]) OR  
wnt[All Fields])
```

Diese Suche führte zum Stichtag 30.04.2016 zu 322 Treffern. Die gefundenen Dokumente wurden auf ihre Relevanz für die behandelten Themengebiete untersucht, relevante Dokumente wurden in die Datenauswertung der Arbeit einbezogen. Weiterhin wurden Quellenangaben dieser Dokumente auf nicht direkt aufgefundene relevante Quellen durchsucht und diese ebenfalls mit einbezogen. Flankierende Bereiche der Literatur wurden jeweils in einer angepassten Suche ebenfalls über PubMed recherchiert, so beispielsweise die Bedeutung von ALDH in Bereichen jenseits des KRK und der aktuelle Stand der Systembiologie.

2.11 Statistische Analyse

Die Überlebensraten wurden mittels Kaplan-Meier-Schätzer abgeschätzt. Die Signifikanz wurde durch Berechnung des Log-Rank Tests ermittelt. Kreuztabellierungen wurden mittels χ^2 -Test errechnet. Die multivariate Analyse wurde basierend auf dem Cox Regressionsmodell durchgeführt. Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde auf $\alpha = 5\%$ in zweiseitiger Weise festgesetzt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels der freien Software R (version 2.11.1, <http://www.r-project.org>) durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Um die Bedeutung von ALDH1A1 als Marker für das Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom zu untersuchen, wurde ein geeignetes Patientenkollektiv entsprechend histologisch untersucht und ausgewertet.

3.1.1 ALDH1A1 Expression kann spezifisch mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden

Zunächst wurde auf der Grundlage der veröffentlichten Literatur ein geeigneter für ALDH1A1 spezifischer Antikörper gesucht. Aufgrund seiner Verwendung in mehreren für die gegebene Problemstellung wesentlichen Veröffentlichungen (Huang u. a., 2009; S. Deng u. a., 2010) wurde der ALDH1A1-Antikörper Clone 44 (BD Biosciences) ausgewählt. Hierbei ist zu beachten, dass der Antikörper seitens BD als spezifisch für ALDH1 angegeben wird, nicht für ALDH1A1 („Purified Mouse Anti-ALDH“, o.D.). Damit ist allerdings, wie aus dem Zusammenhang, genauer der Erwähnung von ALDH1, ALDH2, ALDH4 und ALDH10 in der Beschreibung des Antikörpers, zu entnehmen ist, die alte Benennung nach Trivialnamen gemeint. Diese entspricht dem ALDH1A1

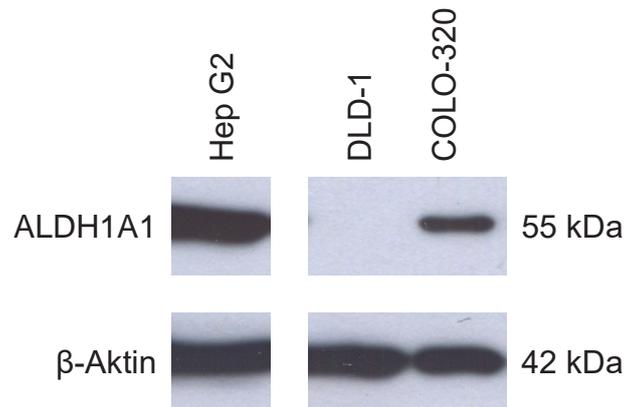


Abbildung 3.1: Die Spezifität des ALDH1A1-Antikörpers wurde im Western Blot überprüft. Die COLO-320 Zelllinie erweist sich dabei als ALDH1A1-positiv, DLD-1 als ALDH1A1-negativ.

der aktuellen Nomenklatur (Abschnitt 1.7). Mittels Western Blot wurde getestet, ob der gewählte Antikörper tatsächlich spezifisch an ALDH1A1 bindet. Zum Test wurden Zelllinien mit Expression von ALDH1A1 (COLO-320) sowie Zelllinien, die kein ALDH1A1 exprimieren (DLD-1) (S. Deng u. a., 2010) und kommerziell vertriebene Positivkontrollen (Hep G2) ausgewählt. Für COLO-320 und DLD-1 wurden aus kultivierten Zelllinien Proteinlysate hergestellt, für Hep G2 wurde ein kommerziell erhältliches Proteinlysate verwendet. Im Western Blot waren wie erwartet eine einzelne positive Bande für COLO-320 und Hep G2 sowie keine Bande für DLD-1 sichtbar, wobei die Banden bei einem Molekulargewicht von 55 kDa lagen, dem Molekulargewicht des Proteins ALDH1A1 (Abbildung 3.1). Für alle eingesetzten Proteinlysate trat in der gleichzeitigen Testung auf β -Aktin jeweils eine eindeutige Bande in der zu erwartenden Höhe auf, womit die Korrektheit auch des negativen Ergebnisses sichergestellt war. Es konnte somit gezeigt werden, dass der ALDH1A1-Antikörper Clone 44 im Western Blot spezifisch und ohne Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen an ALDH1A1 bindet.

3.1.2 Auch für FFPE-Material ist der immunhistochemische Nachweis von ALDH1A1-Expression möglich

Um die Anwendbarkeit des Antikörpers für die Immunhistochemie zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt getestet, ob damit ebenfalls bei FFPE-Material eine spezifische Bindung an ALDH1A1 erfolgt. Hierzu wurden Zellen der bereits im ersten Schritt verwendeten Zelllinien COLO-320 und DLD-1 mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden verschiedene Antikörper-Konzentrationen getestet, wodurch die optimale Konzentration ermittelt werden konnte (Abbildung 3.2). Unter diesen Bedingungen färbt der eingesetzte ALDH1A1-Antikörper spezifisch COLO-320 Zellen, nicht jedoch DLD-1. Zusammenfassend konnte somit eine Methode etabliert werden, spezifisch ALDH1A1 in FFPE-Zelllinien anzufärben. Damit war die immunhistochemische Färbung menschlicher Gewebe mit der spezifischen Detektion der Expression von ALDH1A1 ermöglicht.

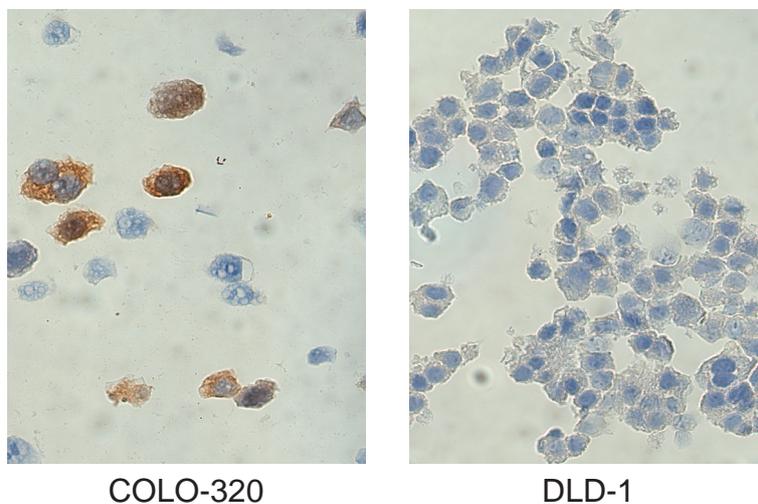


Abbildung 3.2: FFPE-Zellen der ALDH1A1-positiv getesteten COLO-320-Zelllinie zeigten sich unter den festgelegten Bedingungen gefärbt, FFPE-Zellen der ALDH1A1-negativ getesteten DLD-1-Zelllinie dagegen nicht. Somit gelang der immunhistochemische Nachweis von ALDH1A1-Expression auch in FFPE-Material.

3.1.3 ALDH1A1 wird innerhalb eines kolorektalen Tumors individuell exprimiert

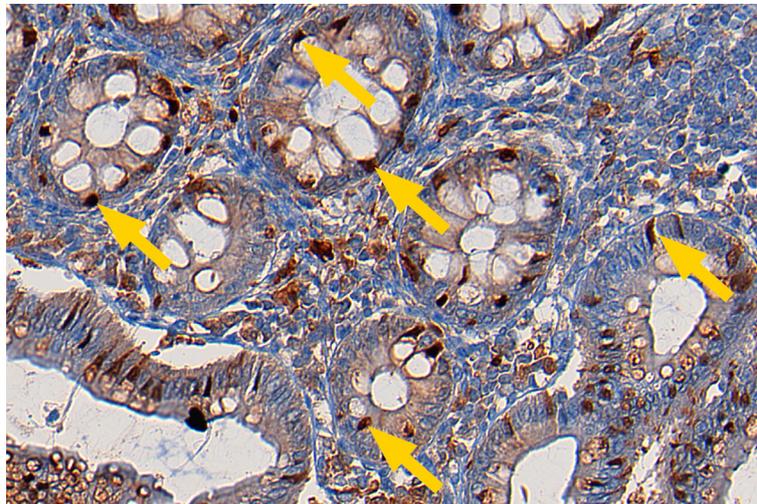


Abbildung 3.3: ALDH1A1 Expressionsmuster in normaler humaner kolorektaler Mukosa, die ALDH1A1-positiven Zellen sind verteilt und vereinzelt (Pfeile).

Anschließend wurde ermittelt, ob die Expression von ALDH1A1 im Gewebe kolorektaler Tumoren einem Muster folgt. Hierfür wurden elf zufällig ausgewählte Präparate kolorektaler Tumoren immunohistochemisch mit dem ALDH1A1-Antikörper gefärbt. In der Übersicht zeigte sich normales Gewebe dabei konsistent gleichmäßig schwach bis gar nicht gefärbt, mit in gleichmäßiger Verteilung eingelagerten einzelnen stark gefärbten Zellen (Abbildung 3.3). Die Expression von ALDH1A1 im Tumorgewebe erwies sich als entweder homogen (Abbildung 3.4A,B) oder großflächig wenig heterogen (Abbildung 3.4C,D). In einigen wenigen Fällen konnte zudem eine aus unbekanntem Gründen sehr intensive gleichmäßige Färbung über das gesamte Tumorgewebe hinweg festgestellt werden (Abbildung 3.4B). Aufgrund der gegebenen Homogenität der Proben erwies sich für die weitere Untersuchung die Wahl eines Verfahrens mit wesentlich reduzierter beurteilbarer Tumorfläche als möglich. Um dabei die korrekte Identifikation auch der großflächig leicht heterogenen Proben sicherzustellen, wurden für das daraufhin gewählte Verfahren der TMA jeweils sechs Stenzen aus jedem untersuchten Tumor beurteilt.

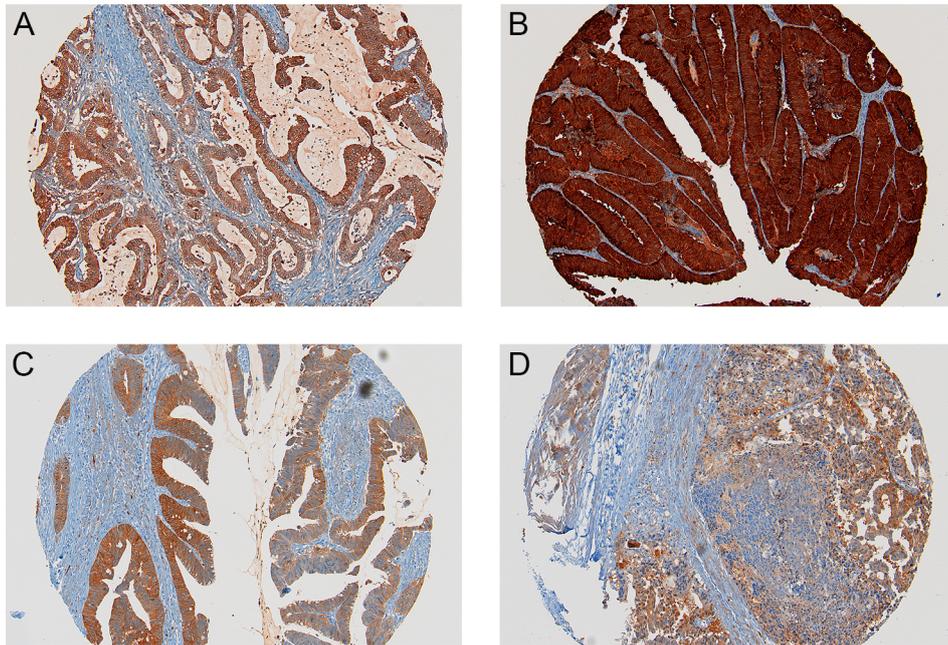


Abbildung 3.4: ALDH1A1-Expressionsmuster in humanen kolorektalen Tumoren. (A, B) zeigen ein homogenes Expressionsmuster, (C, D) ein geordnet heterogenes Expressionsmuster. Alle Aufnahmen zeigen TMA, 100x Vergrößerung.

3.1.4 Identifikation von ALDH1A1-Expressionsmustern in kolorektalen Tumoren

Wie bereits eingangs diskutiert, erschien es für die Bedingungen des KRK angemessen, die Einordnung von Tumoren gemäß Expressionsmustern vorzunehmen (Abschnitt 1.6.4). Um eine eindeutige Unterscheidung verschiedener Untergruppen von kolorektalen Tumoren vornehmen zu können, wurde daher nachfolgend untersucht, ob die Expression von ALDH1A1 in gesundem Gewebe sowie im Tumor unterschiedlichen Mustern folgt. Normales kolorektales Gewebe zeigte unter stärkerer Vergrößerung bei allgemein gleichmäßiger schwacher oder nicht vorhandener Färbung regelmäßig verteilt einzelne stärker gefärbte Zellen (Abbildung 3.3A,B). Bei den Proben des Tumorgewebes konnten vier Typen unterschieden werden. Einerseits wurden homogen überhaupt nicht vorhandene Expression (Abbildung 3.5A) und gleichmäßig über den ganzen Tumor vorhandene Expression (Abbildung 3.5D) identifiziert. Andererseits fanden sich ein der

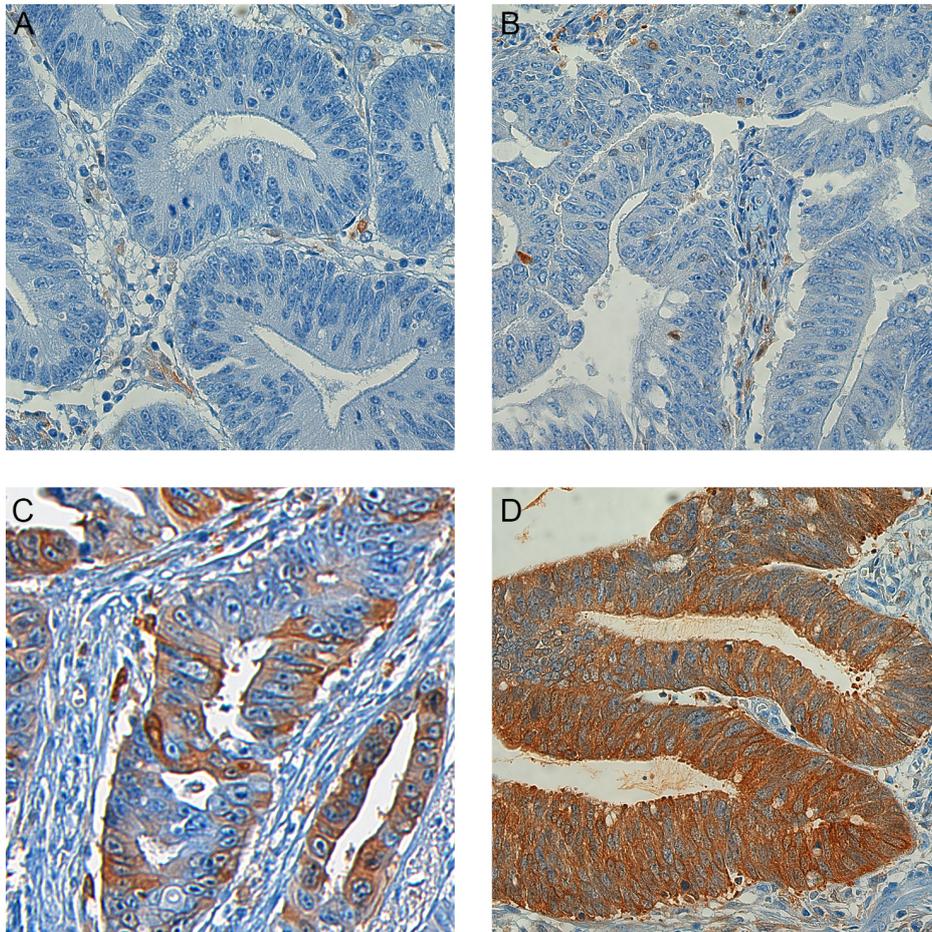


Abbildung 3.5: Detailaufnahmen von ALDH1A1-Expressionsmustern in menschlichen kolorektalen Tumoren. Hierbei wurde entweder (A) keine ALDH1A1-Färbung, (B) verteilte und seltene Färbung, vergleichbar mit normaler kolorektaler Mukosa, (C) irreguläre, abweichende Färbungsmuster oder (D) gleichmäßige Verteilung von ALDH1A1 unterschiedlicher Intensität gefunden. Alle Aufnahmen zeigen TMA, 400x Vergrößerung.

bereits beschriebenen normalen kolorektalen Mukosa ähnliches Muster (Abbildung 3.5B) und heterogene Muster mit jeweils mehreren beieinander liegenden gefärbten Zellen (Abbildung 3.5C). Diese Muster wurden übereinstimmend in den Einzel-Schnitten wie auch in den TMA-Schnitten identifiziert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von ALDH1A1 in kolorektalen Tumoren tatsächlich nach klaren Typen von Mustern eingeteilt werden kann.

3.1.5 Es besteht eine Korrelation zwischen der Expression von ALDH1A1 und β -Catenin in menschlichen kolorektalen Tumoren.

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits in früheren Arbeiten gezeigt hatte, kann die Einführung von β -Catenin in die Analyse als zusätzlicher Marker dazu beitragen, die Expressionsprofile untersuchter Gene zu schärfen und besser zu verstehen, da nukleäres β -Catenin das Kompartiment der Tumor-Stammzellen markiert. Dadurch konnten die Färbemuster von CD44, CD133 und CD166 sinnvoll interpretiert werden (Horst u. a., 2008; Horst u. a., 2009a; Horst u. a., 2009b). Um dies auch für ALDH1A1 zu erreichen, untersuchte ich für nebeneinanderliegende Schnitte der elf zuvor ausgewählten Präparate jeweils die Expression von ALDH1A1 und β -Catenin. Dabei waren nun zwei Gruppen von Expression unterscheidbar. Eine Gruppe, im Folgenden als ALDH1A1 Gruppe eins bezeichnet, glich in der ALDH1A1 Expression der normalen Mucosa (Abbildung 3.6A) oder zeigte klare Bereiche gleichmäßiger Expression (Abbildung 3.6C) und gleichzeitig keine nukleäre Expression von β -Catenin (Abbildung 3.6B, D). Im Gegensatz hierzu zeigten die Tumore der ALDH1A1 Gruppe zwei unterschiedliche Expressionsmuster mit Inseln unscharf abgegrenzter nebeneinanderliegender ALDH1A1 exprimierender Zellen bei gleichzeitiger Expression von nukleärem β -Catenin. Die Definition und Einteilung dieser Gruppen mit Hilfe des nukleären β -Catenin erwies sich als konsistent über die untersuchten Präparate. Die Intensität der Färbung war damit nicht Teil des Scores. Tumoren, die sowohl Färbungsmuster der Gruppe eins wie auch der Gruppe zwei aufwiesen, wurden der Gruppe zwei zugeordnet, da auch sie entsprechend anteilig eine nukleäre Expression von β -Catenin aufwiesen. Gleichzeitig zeigten diese Fälle, dass zwischen beiden Gruppen ein Kontinuum, aber weniger eine klare Abgrenzung herrscht.

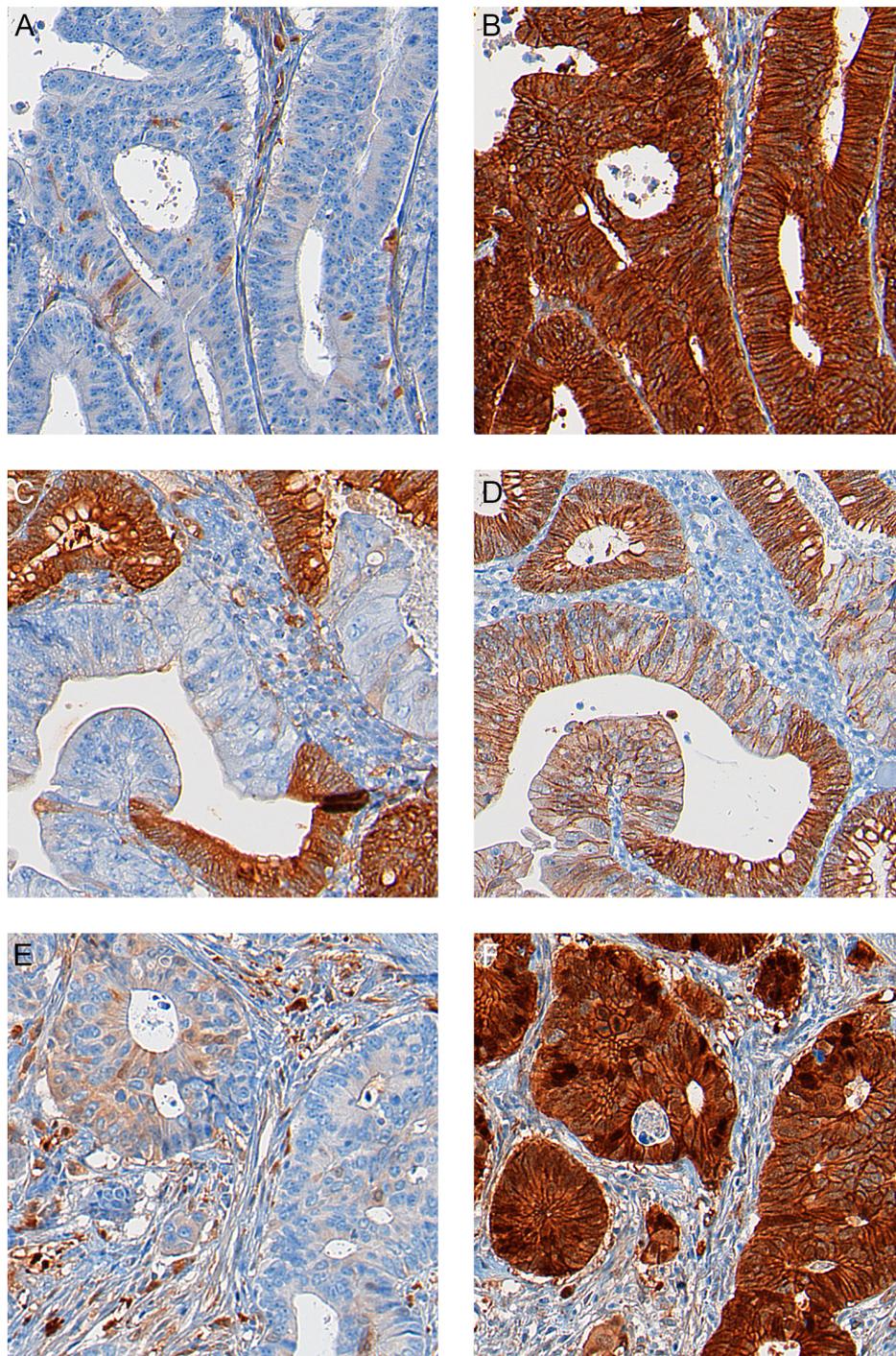


Abbildung 3.6: Die kombinierte Auswertung der Expressionsmuster von ALDH1A1 und β -Catenin führte zur Einteilung in zwei Gruppen. Einerseits (A) Fälle von vereinzeltem und verteiltem Auftreten von ALDH1A1 vergleichbar normaler Mukosa oder (C) mit homogener ALDH1A1-Färbung. Für diese Muster wurde (B, D) keine korrespondierende nukleäre Färbung mit β -Catenin beobachtet, sie wurden zusammen als ALDH1A1 Gruppe eins ausgewertet. Andererseits (E) Fälle, bei denen abweichende Muster der Expression von ALDH1A1 auftraten, bei denen auch (F) die nukleäre Expression von β -Catenin beobachtet wurde. Diese Fälle wurden als ALDH1A1 Gruppe zwei gewertet. Alle Aufnahmen zeigen TMA, 400x Vergrößerung.

3.1.6 Die ALDH1A1-Expressionsmuster korrelierten mit dem Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Unter Anwendung der für die beiden Gruppen der Färbungsmuster etablierten Kriterien konnten von den 186 Patienten des Kollektivs 60 Patienten (32 %) der ALDH1A1 Gruppe eins zugeordnet werden. Die übrigen 126 Patienten (68 %) wurden Gruppe zwei zugeordnet. Eine mögliche Korrelation der Expressionsmuster von ALDH1A1 mit dem Überleben der Patienten wurde mittels Kaplan-Meier-Schätzer überprüft, wobei die Signifikanz mit Hilfe des Log-Rank Tests getestet wurde. Dabei erwies sich die Zugehörigkeit der Patienten zur ALDH1A1 Gruppe zwei gegenüber Gruppe eins als signifikant negativer bezüglich des Gesamtüberlebens ($p = 0.01$; Tabelle 3.1; Abbildung 3.7).

Variable		Kollektivdaten				χ^2 -Test	Überlebens Analyse multivariat
		total N=186	ALDH1A1 Gruppe eins	ALDH1A1 Gruppe zwei	Überleben	p-Wert	relatives Risiko (95% CI)
ALDH1A1	Gruppe eins	60			57 (95 %)	0,01	1
	Gruppe zwei	126			100 (79 %)		4,25 (1,28-14,05)
Geschlecht	Männlich	96	32	64	82 (85 %)	0,87	1,01 (0,49-2,10)
	Weiblich	90	28	62	75 (83 %)		1
Alter (Jahre)	≤74	87	31	56	73 (84 %)	0,44	1,28 (0,62-2,65)
	>74	99	29	70	84 (85 %)		1

Tabelle 3.1: Immunohistochemische und klinikopathologische Daten der Patienten sowie univariate (χ^2) und multivariate (Cox Regression) Statistik zum Patienten-Überleben (CI: Konfidenzintervall).

Im multivariaten Cox-Regressionsmodell erwies sich die Ausprägung des ALDH1A1-Expressionsmusters als ein unabhängiges relatives Risiko von 4,25 (95 % Konfidenzintervall: 1,28-14,05; $p = 0,018$). Das Gesamtsystem korrelierte in diesem Kollektiv erwartungsgemäß weder im χ^2 -Modell noch

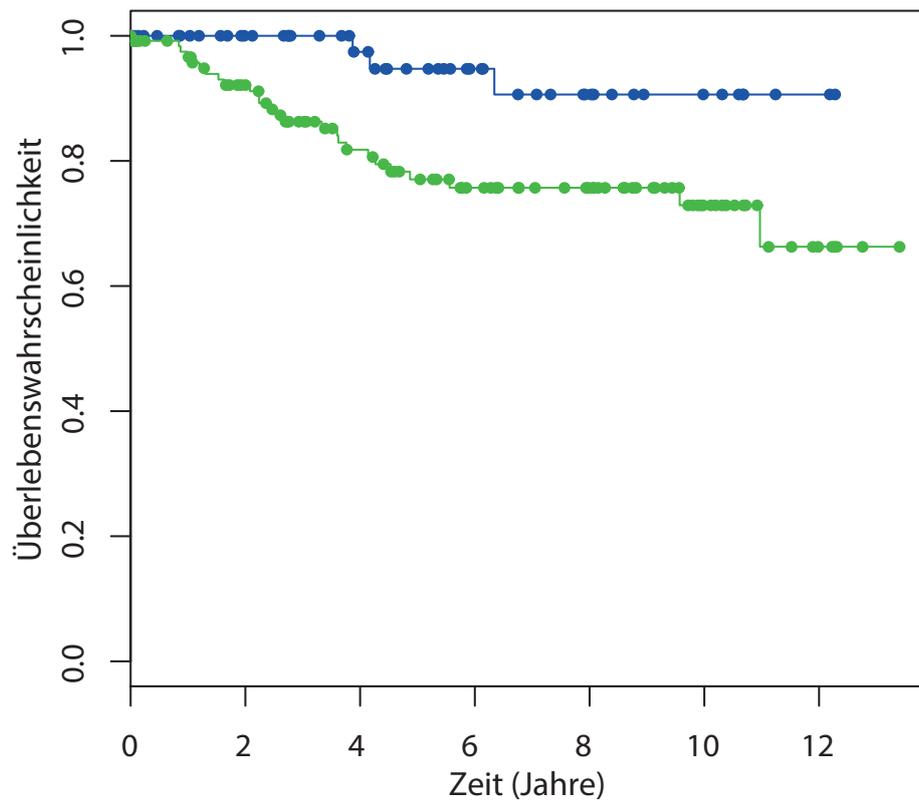


Abbildung 3.7: Die Expression von ALDH1A1 korrelierte für Patienten mit kolorektalem Tumor mit dem Überleben. Die Korrelation der beiden Untergruppen ALDH1A1 Gruppe eins (obere, blaue Linie) und ALDH1A1 Gruppe zwei mit dem Überleben wurde mittels Kaplan-Meier-Schätzer untersucht. Es wurde eine sehr signifikante Korrelation ($p = 0.01$) zwischen ALDH1A1 Gruppe eins und längerem Überleben ermittelt.

in der multivariaten Cox-Analyse signifikant mit Alter (χ^2 : $p = 0,44$; Cox: $p = 0,510$) oder Geschlecht (χ^2 : $p = 0,87$; Cox: $p = 0,980$). Damit erwies sich das ALDH1A1-Expressionsmuster im uni- wie multivariaten statistischen Test als signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert.

3.2 Funktionelle Untersuchungen

Da sich ALDH1A1 in der Untersuchung des Patientenkollektivs als offensichtlich mit dem Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom assoziiert erwiesen hatte, wurde anhand geeigneter Zelllinien in einem nächsten Schritt ein möglicher funktioneller Zusammenhang untersucht.

3.2.1 Auswahl geeigneter Zelllinien

Mittels Western Blot wurden in Ergänzung der im Rahmen der Antikörper-Testung vorgenommenen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.1) eine Reihe von Darmkrebs-Zelllinien auf die Expression von ALDH1A1 getestet. Hierfür wurde der bereits etablierte für ALDH1A1 spezifische Antikörper Clone 44 verwendet. Es wurden die Zelllinien HT-29, CACO-2, DLD-1, RKO, HCT-116, LOVO, SW-480, COLO-320 und LS-174T in den Test eingeschlossen. Dabei zeigte sich jeweils ausschließlich eine einzelne positive Bande bei dem für ALDH1A1 zu erwartenden Molekulargewicht von 55 kDa für die Zelllinien HT-29, CACO-2, COLO-320 und LS-174T (Abbildung 3.8). Diese Zelllinien exprimieren demzufolge ALDH1A1 in einer Quantität oberhalb der Schwelle der Sensitivität des eingesetzten Verfahrens. Dies traf nicht zu für die Zelllinien DLD-1, RKO, HCT-116, LOVO, SW-480 (Abbildung 3.8), hier zeigte sich keine Bande, sie erwiesen sich damit als negativ für das Vorhandensein von ALDH1A1.

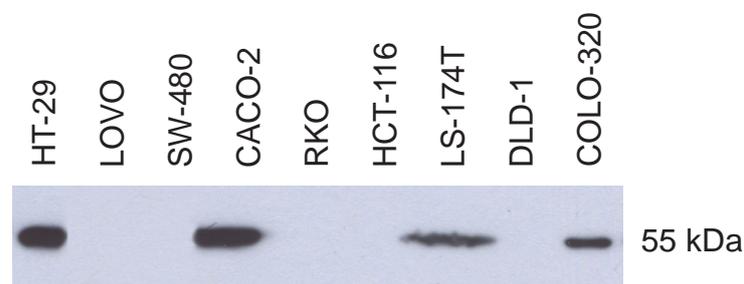


Abbildung 3.8: Die ALDH1A1-Aktivität zahlreicher Zelllinien wurde mittels Western Blot untersucht. Beim für ALDH1A1 erwarteten Molekulargewicht von 55kDa zeigten sich Banden für die Zelllinien HT-29, CACO-2, LS-174T und COLO-320.

Aus den getesteten Zelllinien wurden möglichst heterogene Vertreter zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Diese Auswahl erfolgte in der Absicht, ein breites Spektrum von Darmkrebs-Zelllinien abzudecken und so eine möglichst große Bandbreite der Zustände in tatsächlichen Tumoren abzubilden. Unter den ALDH1A1 positiven Zelllinien wurden somit HT-29 und COLO-320 ausgewählt, unter den ALDH1A1 negativen Zelllinien wurde LOVO gewählt. Dabei verhielten sich HT-29 und LOVO in ausgeprägter Weise adhärent und epithelial wohingegen die Zellen von COLO-320 in Einschicht-Kultur nicht adhärent waren und eher mesenchymale Eigenschaften zeigten und nur lose Zellverbände bildeten (unveröffentlichte Daten; Hahn u. a., 2013). Es verwundert somit nicht, dass die gewählten Zelllinien sich gemäß Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ebenfalls auf genetischer und epigenetischer Ebene deutlich unterscheiden ((Knutsen u. a., 2010; Ahmed u. a., 2013); siehe hierzu auch Abschnitt 4.5.1).

3.2.2 Unterdrückung von ALDH-Aktivität mittels DEAB

Als bewährter Inhibitor für ALDH1A1 wurde DEAB gewählt, das als spezifisch für die Isoform ALDH1A1 galt (Russo, 1997; aktuelle Daten widersprechen dieser Annahme, siehe Abschnitt 4.4.1). Um die tatsächliche funktionelle Unterdrückung der ALDH1A1-Enzym-Aktivität in mit DEAB behandelten kolorektalen Tumorzelllinien zu bestätigen, wurde ein Aldefluor Assay herangezogen. Dieser Assay galt als eine Möglichkeit, um spezifisch und quantitativ die Expression von ALDH1A1 in Zellverbänden zu messen (Storms u. a., 1999; J. S. Moreb u. a., 2007). Das Aldefluor-Reagenz ist dabei als Substrat von ALDH1A1 beschrieben. Es wurde in jüngeren Studien wiederholt erfolgreich zur Erkennung von Krebsstammzellen eingesetzt (Ginestier u. a., 2007; Huang u. a., 2009; Jiang u. a., 2009). Für die im Western Blot als ALDH1A1-positiv bestätigte Zelllinie CACO-2 wurde mittels des Aldefluor-Assays die vermutete ALDH1A1-Enzymaktivität gemessen. Diese Messung wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei Zellen mit Aktivität des Enzyms nach Behandlung mit dem Aldefluor-Reagenz mit größerer Intensität fluoreszieren als Zellen ohne entsprechende Aktivität. Für nicht mit DEAB behandelte Zellen

bestätigte sich die Enzymaktivität dieser Zelllinie als teilweise positiv, die Zellen, denen zuvor in der Zellkultur DEAB zugesetzt wurde, zeigten sich entsprechend negativ (Abbildung 3.9). Aktuelle Studien zu Aldefluor und DEAB legen nun allerdings nahe, dass diese beiden Substanzen weit weniger spezifisch sind als bisher vermutet, und dass DEAB die Enzymaktivität nicht nur von ALDH1A1 sondern von zahlreichen Isoformen des ALDH hemmt (Abschnitt 4.4.1). Damit gelten sämtliche Messergebnisse des Teils dieser Arbeit, der sich mit der Funktion von ALDH in Zelllinien beschäftigt, mutmaßlich nicht spezifisch für ALDH1A1 sondern allgemein für eine Gruppe von ALDH-Enzymen.

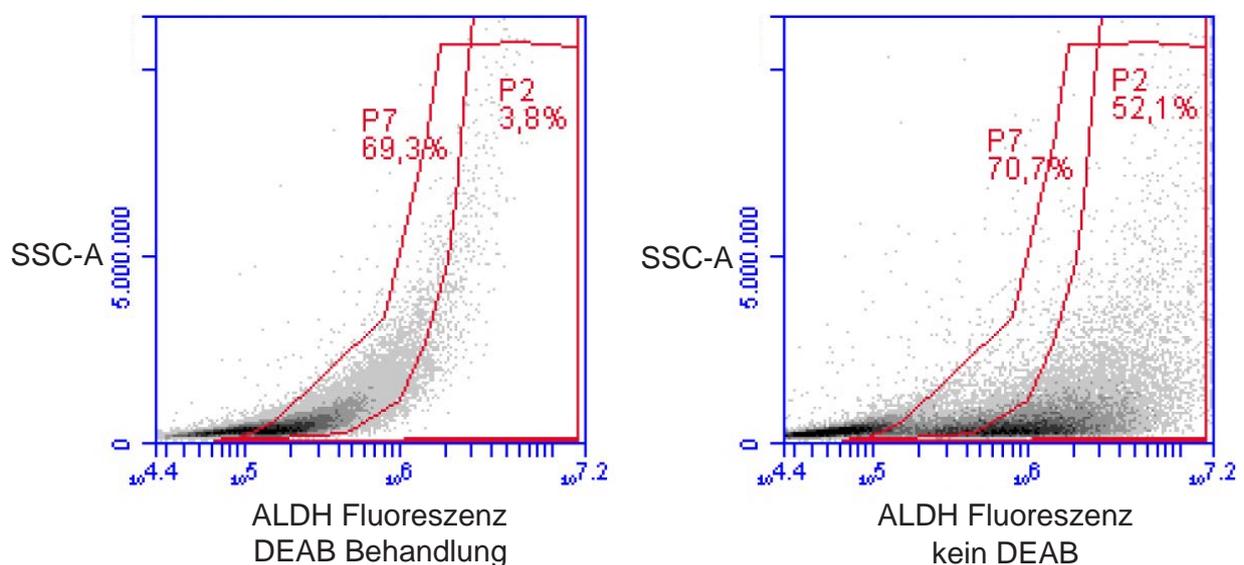


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrie mit Aldefluor-Assay und Zellen der CACO-2 Zelllinie. Ohne DEAB zeigten sich 52,1 % ALDH-fluorisierende Zellen gegenüber 3,8 % mit DEAB (SSC-A: Side-Scatter-Area Intensitätswert, relative Zellkomplexität).

Interessanterweise wurde mittels des Aldefluor-Assays nur für eine Teilmenge der Zellen ohne DEAB Behandlung eine Aktivität von ALDH nachgewiesen. Eindeutig konnte mit Hilfe des Aldefluor-Assays gezeigt werden, dass durch die Behandlung einer Kultur von Zelllinien mit DEAB tatsächlich deren ALDH-Aktivität (soweit durch das Aldefluor-Reagenz nachweisbar, siehe Abschnitt 4.4.1) partiell unterdrückt wurde.

3.2.3 Teilweise Unterdrückung der ALDH-Aktivität beeinflusst die Proliferation kultivierter Darmkrebs-Zelllinien

Um die Proliferation der Zelllinien mit normaler und mit reduzierter Aktivität von ALDH zu vergleichen, wurden diese jeweils über 72 Stunden kultiviert und dann gezählt. Die Zellen wurden hierbei in geringer Dichte ausgesät und im nicht konfluenten Zustand geerntet. Es ist zur Vermeidung von Verfälschungen des Ergebnisses bedeutsam, die Konfluenz zu vermeiden, da Zellen mit unmittelbarem Kontakt zueinander teilweise Zellteilung und Wachstum einstellen oder zumindest verändern. Zum Ausschluss toter Zellen wurde PI verwendet. Die Zählung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Um hierbei Ungenauigkeiten zu begrenzen, wurden beiden Gruppen gleiche Volumina einer Suspension von CFSE-gefärbten Zellen der jeweils gleichen Zelllinie zugesetzt (Abschnitt 2.7). Für HT-29 zeigte sich hierbei eine um 38 % reduzierte Proliferation der DEAB-behandelten Zellen ($p = 0,01$). Für COLO-320 war die Proliferation um 48 % ($p = 0,00001$), für LOVO um 6 % ($p = 0,006$) reduziert. Aufgrund des vergleichsweise sehr geringen Unterschieds der Proliferation für die LOVO-Zelllinie wurde das Experiment für diese Zelllinie wiederholt, wobei sich erstaunlicherweise bei diesem zweiten unabhängigen Versuch eine um 60 % gesteigerte Proliferation der DEAB-behandelten Zellen bei erneuter Erreichung der Signifikanz ($p = 0,03$) zeigte (Tabelle 3.2).

3.2.4 Die ALDH-Enzymaktivität reduziert die Migration von Darmkrebs-Zelllinien

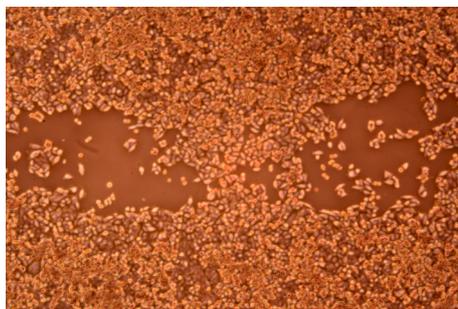
Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Aktivität von ALDH auf die Fähigkeit von kultivierten Darmkrebs-Zelllinien zur Migration untersucht.

Versuch		Veränderung durch Behandlung mit DEAB			
		Proliferation	Wundheilung	Migration	Invasion
HT-29	%	-38 %	-30 %	-97 % / -98 %	-53 %
	p	0,008	0,01	0,0002 / 0,0009	0,03
LOVO	%	-6 % / +60 %		-21 %	-
	p	0,006 / 0,03	n.s.	< 0,01	-
COLO-320	%	-48 %			-
	p	0,00001	n.s.	n.s.	-

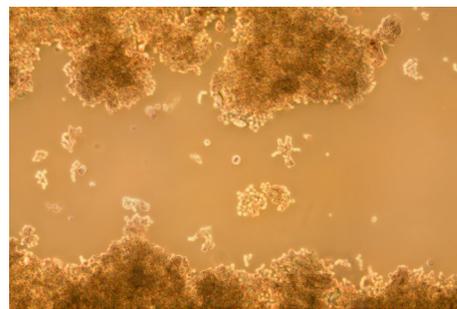
Tabelle 3.2: Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zeigen mehrheitlich eine Reduktion von Tumoreigenschaften der untersuchten Zelllinien bei Reduktion der ALDH-Enzymaktivität durch Behandlung mit DEAB (n.s.: nicht signifikant).

Migration – Wundheilungsassay

Hierzu wurden zunächst Wundheilungsuntersuchungen in der Zellkultur vorgenommen. Diese wurden gemäß standardisierter Prozedur (Liang u. a., 2007; Horst u. a., 2009b) durchgeführt. Zur Auswertung wurden der jeweils noch nicht wieder von Zellen besiedelte Bereich der initialen Wunde zu festgelegten Zeitpunkten quantifiziert und die Differenz zum Ausgangszustand gebildet.



LOVO



COLO-320

Abbildung 3.10: Die Auswertung des Ibidi-Wundheilungsassays für die Zelllinien LOVO und COLO-320 war aufgrund des jeweils sehr heterogenen Wachstumsprozesses an den Wundrändern nur unzureichend möglich. Es wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt.

Die Zellen der Zelllinien LOVO und COLO-320 zeigten an den Fronten der Wundheilung jeweils ein ausgesprochen heterogenes Wachstumsmuster (Abbildung 3.10). Somit erschien die nicht bewachsene Fläche je nach Bildausschnitt und Versuch recht zufällig, auch eine

durchschnittliche Entfernung der Wundränder zueinander ließ sich nicht zuverlässig bestimmen. Es erscheint daher fraglich, ob das Verfahren der Wundheilung unter diesen Umständen für die Zelllinien LOVO und COLO-320 sinnvoll einsetzbar ist. Es wurden folglich auch für beide Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Wundheilungsgeschwindigkeit gefunden. Dieser Befund bedeutet diesbezüglich aufgrund der geschilderten Unsicherheiten keine Aussage über einen möglicherweise nicht vorhandenen Effekt von DEAB.

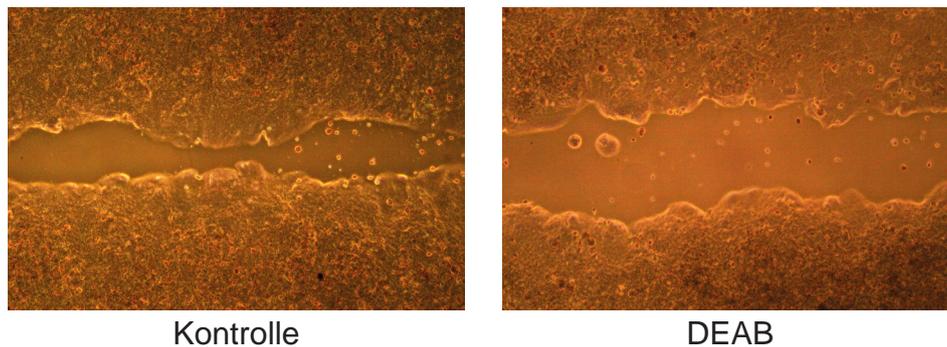


Abbildung 3.11: Für die Zelllinie HT-29 wurde die Fähigkeit von mittels DEAB ALDH-supprimierten Zellen zur Wundheilung (rechte Seite) mit unveränderten Zelllinien (linke Seite) verglichen. Der Wundheilungsassay zeigt dabei eine deutliche Verlangsamung der Wundheilung der mit DEAB behandelten Zellen (Tabelle 3.2).

Im Gegensatz dazu konnte für die Zelllinie HT-29 klar eine Verlangsamung der Wundheilung bei den mit DEAB behandelten Zellen demonstriert werden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den bereits geschlossenen Wundflächen nach 72 Stunden Beobachtungszeit (-30 % bei DEAB-Behandlung; $p = 0,01$; Abbildung 3.11; Tabelle 3.2). Aus diesem Versuch geht damit klar hervor, dass die teilweise Unterbindung der Enzymaktivität von ALDH die Geschwindigkeit der Wundheilung bestimmter Zelllinien verringern kann. Dies wird allgemein als gleichbedeutend mit einer reduzierten Fähigkeit dieser Zellen zur Migration gewertet (Ashby und Zijlstra, 2012).

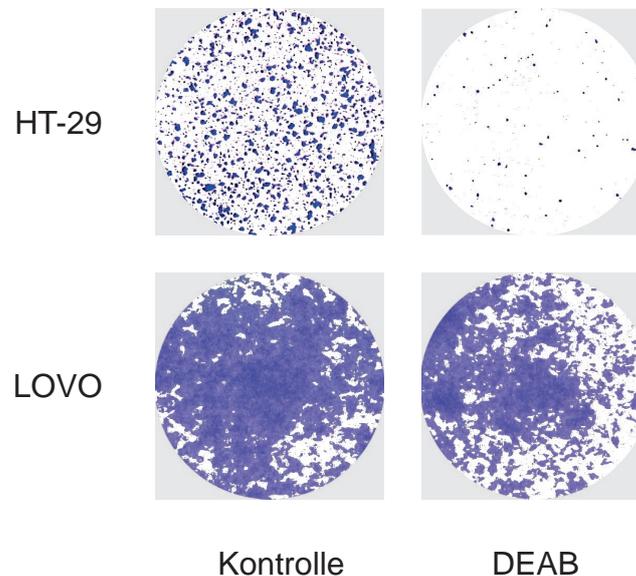


Abbildung 3.12: Für die Zelllinien HT-29 und LOVO zeigte sich eine signifikante Verlangsamung der Migration DEAB-behandelter Zellen im Transwell Assay (Tabelle 3.2).

Migration – Transwell Assay

Aufgrund der ungenügenden Auswertbarkeit der Wundheilungsversuche für die untersuchten Zelllinien COLO-320 und LOVO wurde die Fähigkeit zur Migration in der Folge für alle drei Zelllinien mittels des alternativ hierfür einsetzbaren Transwell Migrations-Assays erneut und eingehender untersucht. Die dabei erfolgende Migration der Zellen durch perforierte Einsätze (sogenannte Boyden-Kammern) hindurch ist eine allgemein angewandte Methode zur Beobachtung des Migrationspotentials von Tumorzellen (Fang u. a., 2007; Hulkower und Herber, 2011). Eine Verlangsamung der Migration mit DEAB behandelte Zellen wurde für LOVO-Zellen (-21 %; $p < 0,01$) wie auch für HT-29 Zellen (-97 %; $p = 0,0002$; Abbildung 3.12; Tabelle 3.2) gefunden. Die eindrucksvolle Verlangsamung für HT-29 zeigte sich konsistent wiederholbar mit 37- bis 57-fachem Unterschied. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für die COLO-320 Zelllinie bei anders als im Wundheilungsassay einwandfreier Durchführbarkeit des Versuchs kein signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$). Es konnte damit eindeutig gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Migration

einiger der untersuchten Krebs-Zelllinien mit epithelialen Eigenschaften durch Reduktion der ALDH-Enzymaktivität erheblich reduziert wird. Auf die COLO-320-Zelllinie scheint die Funktion dieses Enzyms dagegen bezüglich der Migration keine klaren Auswirkungen zu haben.

3.2.5 ALDH-Enzymaktivität beeinflusst die Invasion von Darmkrebs-Zelllinien im Transwell Assay

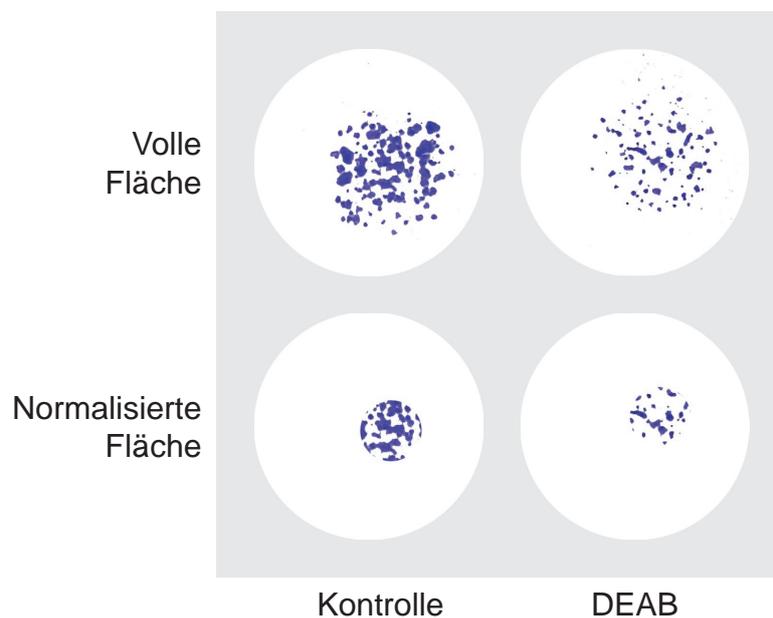


Abbildung 3.13: Für die Zelllinie HT-29 konnte eine signifikante Verlangsamung der Invasion DEAB-behandelter Zellen im Transwell Assay beobachtet werden (Tabelle 3.2).

Da deutliche Effekte der partiellen Unterdrückung von ALDH insbesondere für die Zelllinie HT-29 nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden für diese Zelllinie die Auswirkung der Reduktion von ALDH-Enzymaktivität auf die Invasivität von Zellen untersucht. Dieser Versuch wurde erneut mittels des Transwell Assays durchgeführt, ein gängiger Standard auch für Invasions-Experimente mit Zelllinien (Fang u. a., 2007; Hulkower und Herber, 2011). Die Analyse des Experiments nach sieben Tagen zeigte auch hier ein signifikantes Ergebnis. Es findet eine deutlich verlangsamte Invasion der mit DEAB behandelten Zellen statt (-53 %;

$p = 0,03$; Abbildung 3.13; Tabelle 3.2). Um entstehende Unregelmäßigkeiten in der Beschichtung der Transwells mit Matrigel (insbesondere an den Gefäßrändern) auszugleichen, wurde eine standardisierte Fläche im Zentrum der Transwells ausgewertet.

Kapitel 4

Diskussion

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit retrospektiv die Beziehung zwischen der Expression von ALDH1A1, einem potentiellen Marker für CSC, und dem Überleben von Patienten untersucht. Dies erfolgte anhand eines Patientenkollektivs, das 186 KRK-Patienten mit moderat differenziertem kolorektalem Adenokarzinom ohne Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen (T3 N0 M0 G2) einschloss. Auf funktioneller Ebene wurde daraufhin der Zusammenhang zwischen der Aktivität von ALDH und der Proliferation, Migration und Invasion von Darmkrebs-Zelllinien in der Zellkultur untersucht.

4.1 Erkenntnisse aus den durchgeführten Experimenten

In einem ersten Schritt wurden die tatsächliche Spezifität des gewählten ALDH1A1-spezifischen Antikörpers überprüft und die optimalen Bedingungen für das Anfärben von Präparaten experimentell ermittelt. Hierzu wurden FFPE-behandelte Zelllinien kolorektaler Tumoren eingesetzt. Unter Hinzunahme der subzellulären Lokalisation von β -Catenin wurden sodann zwei Gruppen von ALDH1A1-Expressionsmustern definiert. Die Lokalisation des β -Catenin bot dabei neben der ALDH1A1-Expression selbst einen zweiten Parameter zur Definition der Muster. Die Auswertung

dieser beiden Gruppen von ALDH1A1-Expressionsmustern zeigte eine statistisch sehr signifikante Korrelation zwischen Patientenüberleben und ALDH1A1-Expression, bei der entweder (ALDH1A1 Gruppe eins) das Expressionsmuster von ALDH1A1 dem des normalen kolorektalen Gewebes ähnelte beziehungsweise die Expression gleichmäßig über alle Zellen verteilt vorlag oder (ALDH1A1 Gruppe zwei) ein unregelmäßiges, heterogenes Expressionsmuster beobachtet wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen einer Ausschaltung von ALDH-Enzymen untersucht. Dafür wurde mittels des inhibierenden Wirkstoffes DEAB die Enzymaktivität des ALDH in drei Darmkrebs-Zelllinien reduziert. Die Zelllinien wurden nach ihren Eigenschaften ausgewählt, HT-29 aufgrund ALDH1A1-Positivität bei gleichzeitig epithelialem Verhalten, COLO-320 aufgrund ALDH1A1-Positivität bei eher mesenchyalem Verhalten sowie LOVO aufgrund der gemessenen ALDH1A1-Negativität. Für diese drei Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ALDH einen Einfluss auf Kennzeichen von Krebs (Hallmarks, nach Hanahan und Weinberg) hat. Bei insgesamt nicht einheitlichen Ergebnissen zeigte sich tendenziell eine Verminderung von Proliferation, Migration und Invasion bei partieller Unterdrückung der Enzymaktivität von ALDH, was mit der Konzeption von Krebsstammzellen einhergeht (Bonnet und Dick, 1997; Reya u. a., 2001; Hanahan und Weinberg, 2011).

4.2 Studienlage bezüglich ALDH1A1 und Überleben

Aus den bei Veröffentlichung meiner Studie zur Korrelation zwischen ALDH1A1-Mustern und Patientenüberleben bereits verfügbaren Publikationen anderer Arbeitsgruppen zu diesem Themengebiet ergaben sich verschiedene Fragen. Diese, wie auch die Weiterentwicklung des Forschungsgebiets bis zum heutigen Tage, werden in der Folge vorgestellt sowie die von mir ermittelten Ergebnisse in das heutige Gesamtbild eingeordnet.

4.2.1 Untersuchungen, die das Design meiner Studie zum Patientenüberleben beeinflussten

Lugli u. a. (2010) hatten 1420 Patienten mit KRK aller Tumorgrade retrospektiv untersucht und dabei bei 1287 für ALDH1A1 ausgewerteten Fällen keine signifikante Korrelation zwischen dem Überleben der Patienten und der Expression von ALDH1A1 gefunden. Die Ergebnisse von Lugli und Kollegen bezüglich ALDH1A1 führten dazu, dass ich eine differenziertere Herangehensweise an die Detektion von ALDH1A1 im Gewebe wählte. So selektierte ich einerseits ein homogeneres Kollektiv (T3 N0 M0 G2) von KRK und bezog andererseits die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin in die Bewertung der Expressionsmuster mit ein. Im Gegensatz zu Lugli und Kollegen ergab sich auf Grundlage dieses erweiterten Studiendesigns eine klare Korrelation zwischen Überleben und Verteilung von ALDH1A1 im Tumor. Diese Diskrepanz könnte auf das im Gegensatz zu den von Lugli und Kollegen eingeschlossenen zahlreichen Typen und Stadien von Darmkrebs homogene und mit 186 Fällen deutlich kleinere Kollektiv zurückzuführen sein oder darauf, dass der Effekt überhaupt erst in höheren Stadien oder nur in T3-Tumoren zu sehen ist. Auch in der Wahl des verwendeten ALDH1A1-Antikörpers könnten Unterschiede zwischen den Ergebnissen begründet liegen. So wird in der Studie von Lugli und Kollegen angegeben, dass ein Antikörper „anti-human ALDH1 isoform α 1 (polyclonal; 1:500; AbCam, Cambridge, UK)“ für die Immunhistochemie eingesetzt worden ist. Polyklonale Antikörper neigen systembedingt dazu, auch nicht gewünschte Proteine zu markieren und führen zu schlechter reproduzierbaren Versuchsbedingungen (Lipman u. a., 2005). So stehen auch zumindest drei der aktuell bei AbCam verkäuflichen polyklonalen ALDH1A1-Antikörper nach Herstellerangaben im Verdacht, auch an andere Isoformen oder sonstige Proteine zu binden („ab9883“, o.D.; „ab24343“, o.D.; „ab23375“, o.D.). Für meine Arbeit dagegen wurde ein spezifisch bindender monoklonaler Antikörper eingesetzt („Purified Mouse Anti-ALDH“, o.D.).

Der wichtigste Unterschied aber dürfte sein, dass ich einen gerichteten Ansatz für die Definition der Expressionsmuster von ALDH1A1 verwendet habe, wohingegen die Studie von Lugli und Kollegen nur die gesamte Quantität des ALDH1A1 betrachtet. Wobei auch hier in der Publikation von Lugli und Kollegen Unklarheiten bezüglich der Bewertung bestehen. So wird einerseits angegeben, „987 [samples] (76.7 %) had 0 % immunoreactive tumour cells“, andererseits aber die “Overexpression of ALDH1 expression, defined on the basis of ROC analysis as >25 % of positive cells [...] in the remaining 300 cases (23.3 %)“ beschrieben, womit unter den 1287 Proben keine einzige mit einer ALDH1-Expression zwischen 0 % und 25 % zu finden gewesen wäre. Dies erscheint zumindest unwahrscheinlich.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, in der geplanten eigenen Untersuchung eine praktisch anwendbare Unterteilung von Patienten in prognoserelevante Gruppen vornehmen zu können, wurde hierfür mit Expressionsmustern von ALDH1A1 gearbeitet. Die Expression von β -Catenin im Kern als Hilfestellung zur Differenzierung relevanter Muster wurde aus mehreren Gründen gewählt. (1) stellt β -Catenin einen sehr wichtigen Baustein im Prozess der kolorektalen Karzinogenese dar (Kinzler und Vogelstein, 1996). (2) kann nukleäres β -Catenin Stammzeleigenschaften kolorektaler CSC bewirken (Brabletz u. a., 2005b; Vermeulen u. a., 2010). (3) induziert es im Kern als Transkriptionsfaktor Zielgene, die ihrerseits die Eckpfeiler (Hallmarks) des Krebs hervorbringen (Brabletz u. a., 2005b; Brabletz u. a., 2005a; Hanahan und Weinberg, 2011). (4) wurde gezeigt, dass es mit niedriger Überlebensrate bei Krebspatienten korreliert (Lugli u. a., 2007). Somit wurde die Gruppe eins der Untersuchung auf der Grundlage der Relation der (Nicht-)Expression von β -Catenin und ALDH1A1 definiert. Diese Gruppe vereinte Expressionsmuster, die bei einer einfachen klassischen Bewertungsanalyse auf Basis von IHC in unterschiedliche Gruppen eingeordnet worden wären. Der verteilte Expressionstyp (Abbildung 3.6A) hätte in diesem Fall niedrige Werte erhalten, homogene kräftige ALDH1A1 Verteilungsmuster (Abbildung 3.4B; Abbildung 3.6C) dagegen wären einem höheren Wert zugeordnet worden.

Die von mir durchgeführte Studie zur Korrelation von ALDH1A1 und Patientenüberleben unter Einsatz von Expressionsmustern war die erste Untersuchung, die tatsächlich einen Zusammenhang zwischen Expression von ALDH1A1 und Überleben von Patienten zeigte. Hierauf folgend wurden zahlreiche weitere Studien zur Korrelation von ALDH1A1 und Patientenüberleben initiiert und publiziert, die hier kurz vorgestellt und in ihrer Bedeutung analysiert werden sollen.

4.2.2 Untersuchungen, die auf meine Studie folgend publiziert wurden

Die aktuelle Forschung bietet bezüglich des Einsatzes von ALDH1A1 als Prognoseparameter ein recht heterogenes Bild. In der jüngsten Vergangenheit wurden einige Review-Artikel zur Frage der klinischen Bedeutung von ALDH1A1 als Stammzellmarker veröffentlicht. Diese sind von sehr wechselhafter Qualität. So sind die Ein- und Ausschlusskriterien teils unvollständig und nicht transparent gemacht (Weglassen ungenannter Studien, da der Volltext nicht akquiriert habe werden können (J. Chen u. a., 2015); Nicht dokumentiertes Verfahren mit sehr wenigen einbezogenen Ergebnissen (Tomita u. a., 2016)). Auch wurden Daten mitunter offenbar nicht verstanden. Ein prominentes Beispiel dabei bildet einer der Review-Artikel (J. Chen u. a., 2015), der eine Publikation einschließt (S. Deng u. a., 2010) und deren 148 KRK-Fälle einschließlich 5-Jahres-Überleben zitiert, ohne dass diese Daten aus der zitierten Veröffentlichung hervorgehen würden. Ein dritter Review-Artikel ist nur schlecht überprüfbar, da die entscheidenden Primärquellen soweit bekannt nur auf chinesisches vorliegen (Y. Zhou u. a., 2015). Aufgrund dieser offensichtlichen Mängel ist die Frage nur von geringer Relevanz, warum eines der Reviews (J. Chen u. a., 2015) eine Korrelation zwischen hoher ALDH1-Expression (es ist nicht ersichtlich, ob die Isoform ALDH1A1 gemeint ist) und schlechtem Patientenüberleben detektiert hat, die anderen beiden Reviews dagegen nicht (Y. Zhou u. a., 2015; Tomita u. a., 2016).

Betrachtet man die Studien, die eigene Daten erheben, so bleibt das Bild uneinheitlich. Unter den 14 Studien, die meine eigene Literaturrecherche ergab (Tabelle 4.1; Abschnitt 2.10), geben sieben explizit eine Korrelation von hoher ALDH1A1-Expression und niedrigem Überleben an.

Publikation	Test	Lokalisation	#	Ergebnis, Bedeutung ALDH1A1 niedrig
Li, 2016	Cutoff	Kolorektum	108	N0, M0, Differenzierung
Yoon, 2015	Cutoff	Rektum	145	Längeres RFS, Ü n.s.
Xu, 2014	R _{A/C}	Kolorektum	406	Ü+, M0
Fitzgerald, 2014	Cutoff	Kolorektum	21	Ü+
Kim, 2014	Cutoff	Kolorektum	231	Ü+, N0, Korrelation ALDH1/β-Catenin
Goossens, 2014	Cutoff	Kolorektum	309	Ü+
Zhou, 2014	Cutoff	Kolorektum	60	Ü+
Deng, 2014	Cutoff	Rektum	64	RFS+
Avoranta, 2013	Cutoff	Rektum	64 +209	Ü+, RFS+, Korrelation ALDH1/β-Catenin
Kahlert, 2012	Cutoff	Kolorektum	997	Ü n.s., Colon nukleär Ü+
Hessman, 2012	Cutoff	Kolorektum	48	M1, Ü n.s.
Langan, 2012	Cutoff	Kolorektum	30	niedrigere Tumorgruppe (Stage)
Vogler, 2012	Muster	Kolorektum	186	Ü+
Lugli, 2010	Cutoff	Kolorektum	1287	Ü n.s., niedrigere Gruppe

Tabelle 4.1: Studien zum Überleben von KRK-Patienten auf Basis der immunhistochemisch nachgewiesenen Expression von ALDH1A1. Es konnte nicht in jedem Fall abschließend sichergestellt werden, dass tatsächlich die Isoform ALDH1A1 untersucht wurde (siehe Abschnitt 1.7). Es handelt sich in der Regel um die Expression des ALDH1A1 im Cytoplasma. Legende: #: Anzahl untersuchter Patienten; Cutoff: Gruppeneinteilung ALDH1A1-positiv / negativ mittels Cutoff-Wert; R_{A/C}: Einteilung in Gruppen aufgrund des Verhältnisses ALDH1A1 in gesundem / Tumor-Gewebe; Muster: Einteilung in Gruppen aufgrund des ALDH1A1-Musters (siehe Abschnitt 3.1.5); RFS: recurrence-free survival (Überleben ohne erneutes Auftreten der Krankheit); Ü: Überleben; +: besser; -: schlechter; n.s.: nicht signifikant

Für vier Studien geben die Autoren an, keine entsprechende signifikante Korrelation gefunden zu haben, bei den übrigen drei Studien wird zu diesem Punkt keine Aussage gemacht. Es kann also vermutet werden, dass auch diese Studien keine signifikante Korrelation gefunden haben. Dies gibt Anlass zu der Überlegung, dass eine Korrelation zwischen ALDH1A1 und dem Überleben von Patienten sehr wohl bestehen könnte, jedoch nur unter bestimmten Bedingungen. Denkbar sind neben bekannten Einflussfaktoren wie Zusammensetzung des Patientenkollektivs oder Methode der Bewertung von Expression (wie im Fall meiner Studie) auch bisher noch unbekannte molekularbiologische Zusammenhänge. Ein weiterer Grund für variierende Ergebnisse bei ALDH1A1 könnte trivialerweise die bereits diskutierte uneindeutige Benennung des ALDH1

oder ALDH1A1 (Abschnitt 1.7) in vielen Publikationen sein, wodurch möglicherweise nicht in allen Studien tatsächlich dasselbe Protein betrachtet wurde.

Es ist weiterhin auffällig, dass sich die in unterschiedlichen Studien gefundenen Muster der Färbung von ALDA1A1 im Tumorgewebe erheblich unterscheiden. Obwohl ALDH1A1 in vivo bei immunokompromitierten Mäusen als ein immunhistochemischer Marker von selten auftretenden CSC beschrieben wurde (Huang u. a., 2009), konnte in einigen anderen Studien kein solches Muster verteilter einzelner Färbung von Zellen identifiziert werden (Brabletz u. a., 2005a; O'Brien u. a., 2007; Ricci-Vitiani u. a., 2007). Stattdessen werden wie auch für andere Marker von CSC Muster gefunden, bei denen angefärbte Zellen zahlreich und gleichförmig auftreten. Diese Beobachtung wurde auch beispielsweise für CD44 (Horst u. a., 2009b; Wielenga u. a., 1999), CD133 (Horst u. a., 2008; Horst u. a., 2009a; Horst u. a., 2009b), oder CD166 (Horst u. a., 2009b) gemacht. Eine Expression der potentiellen Marker wurde dabei tatsächlich häufig auch in differenzierten Tumorzellen gefunden (Horst u. a., 2008; Horst u. a., 2009a; Horst u. a., 2009b; Wielenga u. a., 1999). Dieses Phänomen könnte auf einfache immunhistochemische Artefakte zurückzuführen sein, beispielsweise den Verlust von Epitopen auf Antigenen. Aber dass das gleichzeitig bei so vielen Antigen-Antikörper-Kombinationen der Fall ist, erscheint nicht wahrscheinlich. Durch den Einsatz beispielsweise der in-situ-Hybridisierung zur Detektion von mRNA könnte dies abschließend überprüft werden. Ein weiterer möglicher Grund für divergente Verteilungen der Expression von Marker-Proteinen für Stammzeleigenschaften von CSC könnte die fragliche Stabilität der Expression der Marker selbst sein. Insbesondere ist unklar, wie diese durch die Prozeduren vor und während der Fixierung beeinflusst werden. Die Zeit der warmen Ischämie während der Operation sowie die kalte Ischämiezeit zwischen der Tumorentfernung und der Fixierung könnten hier relevant sein und zu Veränderungen führen (Spruessel u. a., 2004; Yamagishi u. a., 2014; Unger u. a., 2016). Jedoch deutet der Vergleich der ALDH1A1-Expression in Biopsien und zugehörigen Operationspräparaten (Avoranta u. a., 2013) darauf hin, dass diese Effekte auf die Expression von ALDH1A1 möglicherweise keine radikalen Auswirkungen haben.

Auch die Expression von β -Catenin scheint als Marker von Stammzeleigenschaften diesbezüglich zu einem gewissen Grad stabil zu sein, da seine Expression diejenige abbildet, die für CSC im Tumor beschrieben wurde (Brabletz u. a., 2005a; Brabletz u. a., 2005b; Hlubek u. a., 2001; Horst u. a., 2009a; Vermeulen u. a., 2010; Wassermann u. a., 2009). Diese Überlegungen wurden bei der Konzeption meiner Studie mit der Auswahl von β -Catenin als unterstützendem Marker berücksichtigt. In den nachfolgenden Studien wurden sie allerdings weitgehend nicht aufgegriffen, so dass auch hierin ein Grund für die sehr verschiedenen Studienergebnisse bestehen könnte. Schließlich kann es auch sein, dass ALDH1A1 eine andere Zellpopulation als CSC mit anfärbt, z.B. neben den CSC weiter differenzierte Formen (Tumorzellplastizität). Somit könnte es schwierig sein, ohne die β -Catenin-Vorgabe die entscheidenden Zellen korrekt zu identifizieren. Durch die resultierende Form der Expressionsmuster könnte ein Zusammenhang zwischen CSC und Überleben unschärfer werden.

Interessant ist, dass sich also für die Forschung an ALDH1A1 mittlerweile ein ähnlich uneinheitliches Bild auftut wie für β -Catenin (Abschnitt 1.6.2). Trotz intensiver Forschung auf beiden Gebieten widersprechen sich jeweils zahlreiche Studienergebnisse zu Prognoseparametern diametral. Offensichtlich sind die Fragen, die zur Konzeption meiner Studie auf der Grundlage der Studie von Lugli u. a. (2010) führten, weiterhin aktuell. Es erscheint nach wie vor höchst unsicher, ob eine rein quantitative Beurteilung von ALDH1A1-Expression wesentliche Informationen erbringen kann. Gleichzeitig zeigten komplexere Methoden der Korrelation von ALDH1A1 und Überleben klare Ergebnisse. Beispiele hierfür bieten die Studie von Xu und Kollegen sowie meine eigene Veröffentlichung (S. L. Xu u. a., 2014; Vogler u. a., 2012; siehe auch nächster Abschnitt). Mögliche Gründe dafür, warum komplexere Forschungsansätze zu klareren Ergebnissen führen können, sowie weitere Implikationen aus der aktuellen Forschungslage, werden im Folgenden näher erörtert.

4.3 Integration der Ergebnisse in den Forschungsstand

Ein direkter Zusammenhang zwischen ALDH1A1-Expression und Patientenüberleben ist gemäß aktueller Studienlage zweifelhaft. Neben den bereits diskutierten technischen Fragen, die sich zu verfügbaren Studien stellen, könnten auch funktionelle Zusammenhänge Ursache hierfür sein. So ist es denkbar, dass das Vorhandensein von ALDH1A1 in vielen Tumorzellen auf unterschiedliche Funktionen des ALDH1A1 in den verschiedenen Zellen zurückgeht (Abschnitt 1.7). Damit ist ALDH1A1 möglicherweise nur in einer Teilmenge der ALDH1A1-positiv gefärbten Zellen für Stammzeleigenschaften und Patientenüberleben von Bedeutung. Diese Vermutung wird durch die Entdeckung der Tumorzellplastizität sowie durch die Entdeckung der Abhängigkeit der Untergruppe der CSC von ihrer Umgebung gestützt (Quintana u. a., 2008; Vermeulen u. a., 2010; Schwitalla u. a., 2013; Brabletz u. a., 2005b). So könnte die Expression von ALDH1A1 unterschiedliche Effekte auf die Zelle je nach aktuellem Funktionszustand des Gesamtnetzwerks aus Krebszellen und Stroma bewirken (H. Seo u. a., 2013; Abschnitt 1.6.6). In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass sich ALDH unter anderem auch als bedeutsam für Proliferation und Differenzierung von Zellen (Clifford u. a., 1996; Toma u. a., 1997; Maden, 2000; X. Xu u. a., 2015; Abschnitt 1.7.2) erwiesen hat, und somit in Zellen einen zentralen Regulationsmechanismus der Plastizität darstellen könnte. Auch wurde eine nukleäre Expression von ALDH1A1 in einer kleinen Untergruppe eines untersuchten Patientenkollektivs gefunden, die mit signifikant schlechterem Überleben korreliert war (Kahlert u. a., 2012), was möglicherweise ein weiteres Indiz für noch unbekannte Funktionsmechanismen des ALDH1A1 sein könnte.

Meine Studie berücksichtigt diese Aspekte zu einem gewissen Grad durch das Einbeziehen von β -Catenin in die Definition der relevanten Expressionsmuster anstelle einer rein quantitativen Auswertung der ALDH1A1-Aktivität im Tumor. Nukleäres β -Catenin könnte hinweisgebend auf den für die CSC-Funktion bedeutsamen Teil der ALDH1A1-Enzyme sein. Damit kann die Expression von β -Catenin, wie von mir gezeigt, ein hilfreicher Marker für die Bestimmung

relevanter Expressionsmuster von ALDH1A1 bei der Erforschung von CSC in KRK sein. Darauf deuten auch mehrere Publikationen hin, die eine direkte Regulation des ALDH1A1 durch β -Catenin in verschiedenen Tumoren gefunden haben (Condello u. a., 2015; Cojoc u. a., 2015). Auch Korrelationen zwischen den Expressionsmustern der beiden Moleküle wurden bereits mehrfach gefunden (Avoranta u. a., 2013; Kim u. a., 2014; S. L. Xu u. a., 2014; Takahashi u. a., 2014).

Vielversprechend erscheint auch der Ansatz von Xu und Kollegen (S. L. Xu u. a., 2014), die Einordnung von Tumorgewebe anhand des Quotienten der ALDH1A1-Expressionen von gesundem Gewebe und dem darin eingebetteten Tumorgewebe vorzunehmen. In elementarerer Form, mittels Messung von Substraten für ALDH allgemein, wurde dieses Verfahren interessanterweise mit ähnlichen Ergebnissen bereits 27 Jahre zuvor durch Marselos und Michalopoulos (1987) vorweggenommen. Wie auch durch die von mir angewandte Methode kann durch dieses Verfahren eventuell zumindest teilweise das Auftreten nicht CSC-spezifischer ALDH1A1-Expression im Tumor für die Vorhersage des Patientenüberlebens bei der Berechnung neutralisiert werden.

Zusammenfassend erscheint es wie beschrieben aufgrund der sehr heterogenen Ergebnisse der verschiedenen Studien wie auch aufgrund grundsätzlicher Überlegungen zur Funktion von ALDH1A1 im Tumor aktuell unwahrscheinlich, dass für das KRK ein allgemeiner direkter und einfacher Zusammenhang zwischen Quantität der ALDH1A1-Expression und Patientenüberleben besteht. Jedoch ist eine komplexere Korrelationen zwischen ALDH1A1-Expression und Überleben, wie von mir erstmalig gezeigt, durchaus wahrscheinlich. Nun gilt es, auf diesem Weg weiter zu gehen, mit neuen, größeren Studien, die funktionelle Zusammenhänge zur Grundlage der Definition ihrer Datenauswertung machen. So ist zu hoffen, dass eine für Patienten individuelle Prognostik und Behandlung zukünftig auf diesem Wege gefördert werden kann.

4.4 Studienlage bezüglich ALDH und Funktion des kolorektalen Karzinoms

Aus den vorangegangenen Ausführungen zur Verteilung von ALDH1A1 im Tumor ist bereits die Wichtigkeit einer Klärung der Funktion von ALDH1A1 im KRK hervorgegangen. Noch viel bedeutsamer ist das Verständnis der Funktion dieses regulatorischen Enzyms jedoch im Zusammenhang mit der Aufklärung der generellen Funktion von Krebszellen, die der Behandlung und Heilung von Darmkrebs unmittelbar dienlich sein kann.

Demgegenüber ist die Studienlage im Bereich der Erforschung der funktionellen Eigenschaften der Expression von ALDH im KRK und ganz allgemein bei Krebs bisher recht dürftig. Vor den von mir durchgeführten Untersuchungen wurde zur direkten funktionellen Wirkung einer Veränderung der ALDH1A1-Expression in Zellen nach meiner Kenntnis erst ein einziges Mal publiziert. Dabei handelte es sich um die Untersuchung der Zelllinien A549 und H522, die von Lungenkrebs-Patienten stammen. Proliferation und Migration der durch Knock-Down oder Gabe von DEAB vermindert ALDH1A1 (neben anderen Isoenzymen, siehe Abschnitt 4.4.1) exprimierenden Zellen waren in dieser Untersuchung ebenfalls gehemmt (Jan S. Moreb u. a., 2008). Für das KRK wurden bis heute keine Daten zur funktionellen Untersuchung von ALDH publiziert. Lediglich für das Cervix-Karzinom wurde vor kurzem eine Studie veröffentlicht, die besagt, dass Knock-Down von ALDH1A1 in HeLa-Zellen deren Fähigkeit zur Migration verlangsamt, sich jedoch nicht auf Proliferation, Apoptose und Zellzyklus auswirkt (Yao u. a., 2015). Für ALDH2 und ALDH1A2 wurde gezeigt, dass Überexpression in K562 Leukämie-Zelllinien und H1299 Lungenkrebs-Zelllinien zu stärkerer Proliferation führt (J. S. Moreb u. a., 2012).

Im Gegensatz zu diesen wenigen Studien, die eine direkte Wirkung von ALDH auf die Funktion von Zellen untersuchen, findet sich eine vergleichsweise große Anzahl an Studien, die einen einfachen Zusammenhang zwischen ALDH-Expression und Zellfunktion feststellen. Zumeist wurden hierfür Zellen aus Zelllinien oder primäre Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

(häufig unter Verwendung des Aldefluor-Assays) in eine ALDH-aktive und eine ALDH-inaktive Gruppe aufgeteilt, deren Eigenschaften in der Folge verglichen wurden. Exemplarisch sollen hier einige Ergebnisse genannt werden. So wurde für die Lunge gezeigt, dass die Zellen der ALDH-positiven Gruppe stärker tumorauslösend sind und sich schneller vermehren als die Zellen der ALDH-negativen Gruppe (Sullivan u. a., 2010). Beim Brustkrebs zeigten sich höher ALDH-angereicherte Zellen invasiver mit größerer Neigung zur Metastasenbildung (Crocker u. a., 2009; Charafe-Jauffret u. a., 2010). Für das Cervixkarzinom wurden hohe ALDH-Expression und schnellere Proliferation, Migration und Invasion korreliert (Rao u. a., 2012). Auch bei Blasenkrebs (Falso u. a., 2012), Krebs des Nasopharynx (A. Wu u. a., 2013), dem Endometriumkarzinom (Rahadiani u. a., 2011) und dem Cholangiokarzinom (M. H. Chen u. a., 2016) wurden ähnliche Zusammenhänge gezeigt.

Das KRK betreffend stellen drei Studien fest, dass ALDH-positive Zellen schneller wachsen (Fitzgerald u. a., 2014) bzw. stärker tumorgenerierend sind (Huang u. a., 2009; Chu u. a., 2009) als ALDH-negative Zellen. In zwei weiteren Studien wird gezeigt, dass Zellen, die Sphäroide bilden, mehr ALDH enthalten als solche, die im Monolayer wachsen. Dabei wurden unter Verwendung der Zelllinie HT-29 stärkere Tumorigenität und verstärkte Migration (X. Fan u. a., 2011) festgestellt, für Zellen der Zelllinie DLD-1 wurden erhöhte Chemoresistenz, Migration, Invasion und Fähigkeit der Tumorbildung (Leng u. a., 2013) gefunden. Im Widerspruch hierzu wurde vor kurzem eine weitere Studie mit HT-29-Zellen publiziert, die eine Verringerung von ALDH in den Sphäroiden gefunden hat, bei ebenfalls besserem Tumorwachstum in vivo seitens der Sphäroid-Zellen (Khorrani u. a., 2015).

Diese Studien erlauben auch schon ungeachtet ihrer zueinander widersprüchlichen Ergebnisse keine Aussage zur Funktion von ALDH im Tumor. Es wurden jeweils Korrelationen gefunden, die für sich genommen keine Schlüsse auf eine Ursache-Wirkungs-Beziehung zulassen. Lediglich dass tatsächlich in einer größeren Zahl an Studien signifikante Zusammenhänge gefunden wurden, könnte einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung darstellen. Aufgrund des wahrscheinlichen

Publikationsbias ist aber auch diese Aussage nur Spekulation. Möglicherweise einen weiteren Hinweis bietet die Beobachtung, dass ALDH durch CSC in unterschiedlicher Weise reguliert wird (X. Xu u. a., 2015). Tatsächlich wurden Daten zur Funktion von ALDH und der Gruppe der ALDH1 im KRK aber bisher nicht publiziert. Lediglich die Rolle von ALDH als Marker für CSC wird (mit Ausnahme weniger Widersprüchlichkeiten) durch die bisher vorliegenden Studien zum Thema untermauert. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die meisten Studien nur ALDH-reiche und ALDH-arme Zellen unterscheiden, ohne Aussage über die Isoform des ALDH. Dies liegt in der Verwendung des Aldefluor-Assays begründet.

4.4.1 Aldefluor und DEAB und die Messung von ALDH1A1

Die Mehrzahl der genannten Studien, die den Zusammenhang zwischen ALDH und funktionellen Eigenschaften von KRK untersuchen, setzen zur Quantifizierung des ALDH-Gehalts und zur Sortierung der Zellen den Aldefluor-Assay und damit den ALDH-Inhibitor DEAB ein (Abschnitt 2.5; Beispiele für das KRK: Huang u. a., 2009; Chu u. a., 2009; X. Fan u. a., 2011; Khorrami u. a., 2015). DEAB wurde bis vor wenigen Jahren als vermeintlich selektiver Inhibitor für ALDH1A1 betrachtet (Russo, 1997; Storms u. a., 1999). Diese Annahme wurde in jüngster Zeit zunächst in Zweifel gezogen (Koppaka u. a., 2012) und in der Folge als fehlerhaft überführt (J. S. Moreb u. a., 2012; Morgan u. a., 2015). Damit ist auch der gesamte Aldefluor-Assay zum Nachweis von ALDH nicht mehr als spezifisch für ALDH1A1 anzusehen, da die Quantität der ALDH1A1-positiven Zellen durch Vergleich der quantitativen Differenz von mit dem Aldefluor-Reagenz leuchtenden Zellen ohne und mit Zugabe von DEAB ermittelt werden soll. Des Weiteren wurde bereits zuvor gezeigt, dass die Aldefluor-Substanz selbst als Reagenz nicht spezifisch für ALDH1A1 ist und somit bei der Durchflusszytometrie mit Aldefluor auch nicht spezifisch für diese Isoform sortiert wird (Levi u. a., 2009; Marcato u. a., 2011). Die meisten aktuellen funktionellen Untersuchungen zum Einfluss und zur Bedeutung von ALDH1A1 auf die Zellfunktion erlauben daher tatsächlich nur eine Aussage über den gemeinsamen Einfluss einer ganzen Reihe von Enzymen der ALDH-Familie.

Dabei handelt es sich für Aldefluor um mindestens ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1 (Marcato u. a., 2011), durch DEAB werden ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH1B1, ALDH5A1 in unterschiedlichem Maße blockiert, für ALDH3A1 dagegen ist DEAB ein gutes Substrat (Morgan u. a., 2015). Bei Anwendung des Aldefluor-Assays mit DEAB als Kontrolle bleibt also mindestens die Schnittmenge beider Gruppen als gemeinsam detektierte Enzyme, also ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH2, ALDH5A1. Es kann damit behauptet werden, dass im Wesentlichen, aber nicht ausschließlich, von entsprechenden Studien die ALDH1A Unterfamilie vermessen wird.

4.5 Einordnung der vorgestellten funktionellen Ergebnisse

Die von mir durchgeführten Untersuchungen fanden zu einer Zeit vor den beschriebenen neuen Erkenntnissen über den ALDH-Inhibitor DEAB statt. Da sie sich daher wie viele andere Studien ebenfalls auf die Verwendung von DEAB zur Unterdrückung der ALDH-Aktivität stützten, beziehen sich die ermittelten Ergebnisse nicht wie ursprünglich angenommen auf eine einzige Isoform sondern tatsächlich auf eine größere Untergruppe von ALDH-Enzymen. Dabei handelt es sich wie beschrieben im Wesentlichen (aber nicht ausschließlich) um die Unterfamilie ALDH1A, deren Vertreter weitgehend durch die Substanz blockiert werden.

Damit konnten mit den von mir anhand der drei Zelllinien HT-29, COLO-320 und LOVO durchgeführten funktionellen Versuchen erstmals Hinweise auf die Beeinflussung von Tumoreigenschaften im KRK durch ALDH-Enzyme gefunden werden. In vitro bestätigen diese Ergebnisse auch für das KRK die funktionelle Bedeutung von ALDH.

4.5.1 Auswahl der Zelllinien

Die Auswahl der eingesetzten Zelllinien erfolgte in der Absicht, eine möglichst breite Bandbreite der Zustände in tatsächlichen Tumoren abzubilden (3.2.1). Bei HT-29 und LOVO handelt es

sich um Zelllinien mit eher epithelialen Eigenschaften, COLO-320 besitzt eher mesenchymale Eigenschaften (Hahn u. a., 2013). Gemäß meinen Vorversuchen sind HT-29 und COLO-320 positiv für ALDH1A1, für LOVO war im Western Blot kein ALDH1A1 nachweisbar (Abschnitt 3.2.1). Genetisch und epigenetisch zeigt LOVO Mikrosatelliteninstabilität, den TP53 Wildtyp und eine KRAS-Mutation, wohingegen HT-29 und COLO-320 vom chromosomal instabilen Typ sind, HT-29 mit BRAF-Mutation und methylierten CpG-Inseln und COLO-320 mit sehr ausgeprägten chromosomalen Veränderungen (Knutsen u. a., 2010; Ahmed u. a., 2013). Diese Auswahl macht es wahrscheinlich, dass in den drei Zelllinien jeweils deutlich unterschiedliche Signalwege und allgemein Netzwerke vom physiologischen Normalzustand abweichend funktionieren und dass damit die Expression von ALDH kontextabhängig unterschiedliche Bedeutung haben kann.

4.5.2 Divergente eigene Ergebnisse

Dementsprechend verwundert es nicht – sondern entspricht vielmehr einem erwartbaren Ergebnis – dass die aus meinen Untersuchungen resultierenden Ergebnisse deutlich heterogen sind. In der Messung der Proliferation zeigte sich signifikant langsames Wachstum der ALDH-supprimierten Zellverbände für HT-29 (-38 %) und COLO-320 (-48 %). Für LOVO dagegen ergab zwar eine erste Versuchsdurchführung eine schwache aber sehr signifikante Wachstumsverlangsamung durch Behandlung mit DEAB (-6 %), eine zweite unabhängige Durchführung des Versuchs unter soweit kontrolliert gleichen Versuchsbedingungen zeigte allerdings eine ebenfalls signifikante deutlich beschleunigte Wachstumsrate (+60 %) der unbehandelten Zellen gegenüber den ALDH-supprimierten Vergleichszellen. Die Migrationsgeschwindigkeit zeigte sich dagegen für LOVO wie auch für COLO-320 nicht signifikant verändert, während für HT-29 eine erheblich langsamere Migration (-97 %) wie auch Invasion (-53 %) der durch ALDH-Inhibition beeinflussten Zellen zu beobachten war (siehe auch Tabelle 3.2).

Diese Ergebnisse bestätigen einerseits nachdrücklich die Vermutung, dass die Unterdrückung von ALDH-Aktivität auf verschiedene Zelltypen unterschiedliche Auswirkungen hat, was auf

dem Hintergrund der jeweils unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Veränderungen direkt beteiligter Signalwege verständlich wird. So wurden teils gegensätzliche Ergebnisse bei der parallelen Untersuchung mehrerer Zelllinien mit dem Fokus auf ALDH auch von anderen Arbeitsgruppe publiziert (F. Fan u. a., 2015; X. Fan u. a., 2011; Gupta, 2011). Auf der anderen Seite deutet unter anderem die Abweichung des Ergebnisses bei Wiederholung des Versuchs zur Proliferation der LOVO-Zelllinie darauf hin, dass auch von mir nicht kontrollierte Einflussfaktoren auf die Zellkultur eine Rolle spielen könnten. Hierbei sind viele Einflussgrößen vorstellbar, darunter die Zahl der Passagen vor Versuchsbeginn (mögliche Veränderung von Zellen in Kultur, F. Fan u. a., 2015), unterschiedliche physikalische Einflüsse auf die Zellen (Bewegungen, Temperaturschwankungen), veränderliche Inhaltsstoffe der verwendeten Kulturmedien (insbesondere des FBS: Even u. a., 2006) und vieles mehr.

Dass auch die für ALDH1A1 negativ getestete Zelllinie LOVO sensibel auf die teilweise Unterdrückung von ALDH durch DEAB reagierte, könnte darauf hinweisen, dass zur funktionellen Bedeutung von ALDH tatsächlich andere Isoformen beitragen als nur ALDH1A1 allein. Ebenfalls möglich ist, dass die für die Krebsstammzellfunktion im Gewebe erforderliche Zahl ALDH1A1-positiver Zellen sehr niedrig ist und somit der vorhandene Gehalt an ALDH1A1 in dieser Zelllinie unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegt (Harlow und Lane, 1988). Dies wurde auch bereits in Abschnitt 4.3 diskutiert, als einer der möglichen Gründe für die Ergebnislosigkeit vieler Überlebensstudien, die sich auf die Messung der Quantität des ALDH1A1 beschränkten.

4.5.3 Widersprüchliche Ergebnisse anderer Gruppen

Die von mir ermittelten divergenten Ergebnisse für die Funktion von ALDH in unterschiedlichen Zelllinien dürften bezüglich ihrer scheinbaren Widersprüche den Ergebnissen anderer Gruppen auf diesem Gebiet ähnlich sein (siehe auch die Beispiele im vorhergehenden Abschnitt). Dies würde erklären, warum bisher nur auffallend wenige (und für das KRK überhaupt keine) Studien bekannt sind, die Untersuchungen der Funktion von ALDH vornehmen. Negative und widersprüchliche

Ergebnisse werden vermutlich schlicht nicht veröffentlicht, da die Publikation negativer Ergebnisse häufig nicht attraktiv erscheint.

Viele der tatsächlich veröffentlichten Studien im Bereich der Untersuchung von ALDH präsentieren zudem direkt zueinander widersprüchliche Ergebnisse. Einige dieser Widersprüche, die das KRK betreffen, sollen hier kurz aufgezeigt werden. So kommen (1) wie bereits erwähnt zwei Arbeitsgruppen bei vergleichbarem Versuchsaufbau zu dem gegensätzlichen Schluss, dass in HT-29-Kulturen in Form von Sphäroiden gegenüber der Kultur im Monolayer deutlich höhere (X. Fan u. a., 2011) beziehungsweise deutlich niedrigere (Khorrami u. a., 2015) Aktivität von ALDH messbar ist. Bezüglich des Verhältnisses von ALDH-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem umgebenden gesunden Gewebe (2) findet eine Arbeitsgruppe eine gesteigerte (S. L. Xu u. a., 2014), eine andere dagegen eine reduzierte (Kropotova u. a., 2014) Expression im Tumorgewebe. (3) wird die Überexpression von β -Catenin im Zellkern (das bekanntlich in einen engen funktionellen Zusammenhang zu ALDH gebracht wird) widersprüchlich als für das Patientenüberleben positiv oder negativ gewertet (1.6.2). (4) zeigen sich auch in den Studien zur ALDH-Expression bei Patientenkollektiven sehr heterogene und gegensätzliche Ergebnisse (Abschnitt 4.2.2).

4.6 Bedeutung der neuen Ergebnisse zu Überleben und Funktion

Im vorangegangenen Abschnitt wurde dargelegt, wie sehr die Forschungsergebnisse unterschiedlicher Gruppen heterogen und zueinander widersprüchlich sind. Bisher war es in der Gesamtschau nicht gelungen, für das KRK die Bedeutung von ALDH oder β -Catenin für das Überleben von Patienten zu demonstrieren. Im Falle von ALDH gilt dies auch nach wie vor für die Bedeutung des Enzyms für die Funktion von Tumoren, insbesondere in CSC. Mit der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass ALDH1A1 unter Berücksichtigung einer durch die nukleäre

Expression von β -Catenin vorgegebenen Musterbildung signifikant mit kürzerem Patientenüberleben korreliert und dass ALDH tatsächlich eine funktionelle Bedeutung in KRK-Zelllinien hat. Die von mir gezeigten Ergebnisse ordnen sich damit gut in das Gesamtbild der bis heute verfügbaren Publikationen ein. Insbesondere auch die Heterogenität der von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Ergebnisse bildet sich gut ab. So war im Falle des Patientenkollektivs eine komplexere Form der Einordnung von Befunden erforderlich, als die üblicherweise angewandte, um zu belastbaren Ergebnissen zu gelangen. Und aus den funktionellen Untersuchungen an Zelllinien resultierten teilweise direkt gegensätzliche Ergebnisse zwischen den durchgeführten Versuchen.

Daraus, dass in meinen Untersuchungen eine direkte funktionelle Bedeutung der Enzymaktivität von ALDH für einige Eckpfeiler von Krebs („Hallmarks of Cancer“) gezeigt wurde, ergibt sich, dass die weitere Klärung und Einordnung der Funktion von ALDH im Tumor für das Verständnis des KRK und damit die Möglichkeiten der Entwicklung neuer Diagnostik und Therapien von Bedeutung ist. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist daher sehr erstrebenswert. Es ist vorstellbar, dass mittels spezifischer Unterdrückung der Aktivität einzelner Isoenzyme gleichmäßigere und eindeutiger Ergebnisse für die funktionelle Bedeutung von ALDH erzielt werden können. Diesbezüglich wurden insbesondere für ALDH1A1 in jüngster Zeit Fortschritte erzielt, indem nun einige als spezifisch für ALDH1A1 betrachtete Inhibitoren zur Verfügung stehen (Morgan und Hurley, 2015; Yang u. a., 2015; Condello u. a., 2015). Aber auch andere Isoformen des ALDH, die im KRK vorkommen, sollten detaillierter betrachtet und auf mögliche Funktion und Bedeutung überprüft werden (Y. Chen u. a., 2011; Chiang u. a., 2012). Auch könnte die Verwendung primärer Tumorzellen ein genaueres und korrekteres Bild der Funktion von ALDH-Enzymen ergeben (F. Fan u. a., 2015). Dabei sollten die unterschiedlichen Typen von Karzinomen betreffend genetischer und epigenetischer Veränderungen möglichst getrennt voneinander betrachtet werden, da ALDH Teil jeweils unterschiedlich funktionierender dysregulierter Signalwege sein könnte (Kropotova u. a., 2014).

Dass bisher trotz der bereits seit einigen Jahren offensichtlichen Forschungsfrage keine Publikationen zur funktionellen Bedeutung von ALDH beim KRK vorliegen, deutet allerdings wie bereits angesprochen darauf hin, dass ALDH eine sehr kontextabhängige Funktion erfüllt. Indizien hierfür zeigen sich neben den erwähnten zahlreichen Widersprüchen zwischen Publikationen auch direkt in den Ergebnissen mehrerer Studien. Darin deutet sich an, welche Parameter neben der prinzipiell in verschiedenen Zelltypen unterschiedlichen Funktion des ALDH relevant sein könnten. So haben bereits Koivisto und Salaspuro (1998) gezeigt, dass die Gabe von Acetaldehyd, einem Substrat von ALDH, die Proliferation der KRK-Zelllinie CACO-2 im zeitlichen Verlauf zuerst reduziert und dann erhöht. Fan und Kollegen zeigen, dass sich Darmkrebszellen in Kultur bezüglich ALDH mit der Zeit verändern (F. Fan u. a., 2015). Und mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Konzentration von unter anderem ALDH1A1 im entstehenden KRK während unterschiedlicher Phasen verschieden hoch ist (Salim u. a., 2016; Kropotova u. a., 2014). Neben diesen Veränderungen der ALDH-Aktivität auf der zeitlichen Achse scheinen auch Unterschiede bezüglich ALDH in der Konfiguration der Zellen untereinander zu bestehen, insbesondere zwischen Zellen in Sphäroiden und Zellen im Monolayer (Condello u. a., 2015; Rajcevic u. a., 2014; Cesarz und Tamama, 2016).

Auch bei der Betrachtung der funktionellen Bedeutung von ALDH und insbesondere ALDH1A1 wird dessen zunächst widersprüchlich erscheinende Funktion augenfällig. Die Studienlage deutet nun bereits seit einiger Zeit auf einen hohen Anteil von ALDH und ALDH1A1 in Stammzellen hin (Dylla u. a., 2008; Huang u. a., 2009; Chu u. a., 2009; Alison u. a., 2010; X. Xu u. a., 2015; Tomita u. a., 2016). Konsistent damit reduziert ALDH1A1 die Belastung einer Zelle mit reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), indem es Aldehyde abbaut, die diese generieren (Singh u. a., 2013; Tomita u. a., 2016). Damit werden Zellschädigung und Apoptose verhindert, aber auch die EMT, da diese durch ein hohes Niveau an ROS in der Zelle befördert wird (Plaks u. a., 2015). Andererseits fördert ALDH1A1 aber auch die Differenzierung von Zellen mittels Retinsäure (Lotan, 1980; Tomita u. a., 2016). So ergibt sich also die funktionell uneindeutige

Situation, dass zwar ein niedriges Level von ROS funktionell bedeutsam für Stammzellen ist und somit auch für CSC, um diese vor Schäden zu schützen, eine Ausdifferenzierung aber den Eigenschaften von Stammzellen direkt entgegensteht. Es wäre diesbezüglich beispielsweise möglich, dass in CSC der Retinsäuremetabolismus herunterreguliert ist durch Ausschaltung der ALDH, die deren Vorläufersubstanz Retinal erzeugt (Koivisto und Salaspuro, 1997; Kropotova u. a., 2014). In der Gesamtschau zeigt jedenfalls auch die direkte funktionelle Betrachtung des ALDH, dass die Regulation von ALDH keinem einfach gerichteten Signalweg folgen dürfte sondern der Integration in einem komplexen regulatorischen Netzwerk entspringt.

In Anbetracht der dargelegten vielschichtigen Komplexität erscheint es offensichtlich, dass zukünftige molekularbiologische Forschung auf dem Gebiet der Funktion von ALDH (wie vermutlich auch anderer Bereiche) neue, weitreichendere Methoden finden müssen, um erzielte Ergebnisse verstehen und einordnen und um letztendlich einen Gesamtüberblick über die Funktion von ALDH erhalten zu können.

4.7 ALDH – Perspektiven

Sowohl meine Ergebnisse mit den geschilderten Komplexitäten und Diskrepanzen als auch die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten gegensätzlichen Ergebnisse verschiedener Studien auf dem Gebiet und auch die vielfältige Funktion des ALDH selbst lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass die Bedeutung des ALDH im KRK nur im Gesamtbild eines komplex miteinander verknüpften Netzwerks molekularbiologischer Mechanismen verständlich werden kann.

Es ist ganz allgemein zu vermuten, dass wir zunehmend einsehen müssen, dass es schlicht keinen Grund gibt, weshalb sich die Natur an unserem Wunsch nach einfachen gerichteten Zusammenhängen in dem Sinne, dass in binärer Weise aus Aktion A Aktion B folgt und aus Aktion B Aktion C folgt und so weiter (wie beispielsweise in der ursprünglichen Adenom-Karzinom Sequenz und in vielen anderen Signalwegen vorgeschlagen), orientieren sollte. Vielmehr ist absolut nicht

auszuschließen, dass sich die Zusammenhänge in natürlichen Systemen weit jenseits unserer Intuition bewegen (Mertins, 2014). Dies dürfte sowohl in der komplex vernetzten Struktur biologischer Organismen wie auch in der wohl erforderlichen Einbeziehung der Parameter Raum und Zeit in molekularbiologische Modelle (beispielhaft diskutiert wurden hier die Unterschiede zwischen Sphäroiden und Monolayer sowie das unterschiedliche Verhalten von Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten) begründet liegen. Derartige Komplexität betrifft alle Ebenen molekularbiologischer Vorgänge, wobei im Folgenden kurz die Ebenen der Signalwege, der intrazellulären Kommunikation sowie der interzellulären Kommunikation und der Tumor-Mikroumgebung betrachtet werden.

4.7.1 Gen-Netzwerke

Eine übersichtliche Herangehensweise an die Zusammenhänge innerhalb einer Zelle bieten statistische Methoden zur Kartierung von Gen-Netzwerken mit Hilfe von Gen-Set-Datenbanken (Sonachalam u. a., 2012; Dai u. a., 2015; Abbildung 1.10). Diese können aufschlussreiche Informationen beispielsweise zu der Frage liefern, was die gezielte therapeutische Ausschaltung von Genen für die Funktion der Bestandteile des Netzwerks bedeutet. Hiermit kann unter anderem vorausgesagt werden, wie Funktionen von blockierten Teilnetzwerken dynamisch durch andere Teile ersetzt werden, so dass entsprechende gezielte Therapieversuche mitunter wirkungslos bleiben (H. Seo u. a., 2013; Takebe u. a., 2015). Im Falle des ALDH könnte dies erklären, warum nur bestimmte mutierte Zelltypen (Zelllinien) bezüglich ihrer Tumoreigenschaften signifikant auf eine Veränderung der ALDH-Aktivität reagieren. Allerdings berücksichtigen diese statistischen Modelle nicht Plastizität in Zeit und Raum innerhalb von Zellen und können alleine nicht erklären, warum genetisch (weitgehend) gleich erscheinende Zellen des gleichen Zelltyps zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlicher Weise funktionieren. Ebenfalls wird die Umgebung der einzelnen Krebszellen, der nach aktuellem Forschungsstand eine zentrale Bedeutung für die Abläufe von Krebs zukommt (TME, Abschnitt 1.6.6), dabei nicht betrachtet.

4.7.2 Tumor Microenvironment Netzwerke

Die Forschung zu Netzwerken und deren Dynamik im TME versucht, das Gesamtbild eines Tumors zu modulieren. Im TME spielt insbesondere die gegenseitige Beeinflussung der Zellen eine zentrale Rolle für Steuerung und Funktion, beispielsweise durch positive Feedbackschleifen zwischen Zellen, oder mittels des Community-Effekts, der besagt, dass manche Ereignisse im TME erst ab einer bestimmten Größe einer Zellpopulation getriggert werden (Bolouri, 2015). Auch ALDH spielt im TME eine Rolle, indem es den Retinsäure-Metabolismus kontrolliert. Geforscht wird aktuell an der Frage, ob dies möglicherweise auch durch ALDH-Funktion nicht mutierter Zellen des TME zur Tumorfunktion beitragen kann (Guo u. a., 2012). Die anhand derartiger Fragestellungen erkennbare Komplexität des Netzwerks – auch im Bereich von ALDH – lässt deutlich werden, dass eine umfassende Modellierung des TME-Systems mit Hilfe der Systembiologie zwar eine große Herausforderung, aber auch zum tieferen Verständnis von Krebs langfristig hilfreich und erforderlich sein wird.

4.7.3 Signalwege aus Netzwerk-Sicht

Ist die vollständige Modellierung der Vorgänge in einer Zelle oder gar im TME aus heutiger Sicht noch eine unbeantwortete Herausforderung, so ist es bereits möglich, auf der Ebene von Signalwegen die Bedeutung von zeitlichen und räumlichen Abfolgen mathematisch zu berechnen, unter der Annahme, dass alle Komponenten bekannt, der Crosstalk ausreichend geklärt und Feedback-Mechanismen ausreichend aufgeschlüsselt sind. An den Beispielen der Signalwege von WNT (MacLean u. a., 2015) und MAPK (Perez Millan und Turjanski, 2015) wurde unlängst gezeigt, dass es damit in den jeweiligen molekularbiologischen Netzwerken innerhalb eines klassischen Signalwegs unterschiedliche stabile Zustände geben kann. Diese Eigenschaft von Netzwerken könnte bereits für sich genommen sehr elegant auch alle in den vorhergehenden Abschnitten aufgezeigten Widersprüche und Inkonsistenzen erklären und auflösen. Zellen in

unterschiedlichen Zuständen der internen Signal-Netzwerke können demnach gegebenenfalls auch stabil gegensätzliche Messergebnisse hervorbringen, ohne dass dafür eine genetische (oder epigenetische) Veränderung erforderlich ist (jedoch durchaus zusätzlich möglich). Da ALDH funktionell in direktem Zusammenhang zu β -Catenin steht, ist anzunehmen, dass es ebenfalls an einem von MacLean und Kollegen (MacLean u. a., 2015) beschriebenen System mit mehreren stabilen Zuständen partizipieren würde. Damit wären beispielsweise gegensätzliche Auswirkungen auf die Proliferation einer Zelllinie in verschiedenen Durchführungen des selben Versuchs oder der gegensätzlich gemessene ALDH-Gehalt in Sphäroiden von HT-29-Zellen (Abschnitt 4.5.2) auf das bisher unvorhersehbare Einpendeln der jeweiligen Zellen auf unterschiedliche stabile Netzwerkzustände zurückzuführen.

4.7.4 Krebs – eine komplexe Antwort

Gemeinsames Ziel der geschilderten Ansätze ist ein Gesamtverständnis der Abläufe innerhalb von Signalwegen, zwischen Signalwegen („Crosstalk“), in ganzen Zellen und innerhalb von Zellverbänden. Gelingt es, dies zu modulieren, werden Ergebnisse wie die von mir in Zelllinien für ALDH gezeigten oder die komplexen Zusammenhänge zwischen ALDH und Überleben sowie zwischen ALDH und β -Catenin möglicherweise verständlich werden. Viele veröffentlichte – und wahrscheinlich auch sehr viele bisher aufgrund widersprüchlich wirkender Daten nicht veröffentlichte – Studien werden zur Feinjustierung der entwickelten Modelle eingesetzt werden können. Gerade die jüngsten Anstrengungen, möglichst alle Daten aus wissenschaftlicher Forschung auch zu publizieren und nicht nur diejenigen, die geradlinige Geschichten vom erfolgreichen Nachweis erzählen („We did this experiment a dozen times, got this answer once, and that’s the one we decided to publish.“, aus Couzin-Frankel, 2013; Ruben, 2012), könnten entscheidend zur Verbesserung der Datenlage beitragen. In diesem Sinne wurden in der vorliegenden Publikation auch diejenigen Ergebnisse veröffentlicht, die nicht zu einer klaren, übersichtlichen und einfach

gerichteten Botschaft passend sind. Möglicherweise können auch diese eines Tages nützlich sein, zur Klärung der funktionellen Bedeutung von ALDH im KRK.

Großes Ziel und ultimativer Erfolg der neuen Modelle zur Funktion von Krebs wird die gezielte und personalisierte Behandlung dieser für die Menschheit dramatischen Krankheit sein. Wird es möglich, die Wirkung von Behandlung bereits zu Beginn zu simulieren, insbesondere das gleichzeitige Ansetzen an verschiedenen Angriffspunkten, so wird aus dieser Planung heraus eine optimale und von vornherein erfolgversprechende Behandlung möglich. Für dieses Ziel bedarf es nun weiterer Entwicklung der Systembiologie sowie noch viele Ergebnisse aus direkten Untersuchungen der Funktion der Bestandteile von Krebszellen und Stroma wie die hier für ALDH gezeigten.

Anhang A

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALDH1A1	Aldehyd-Dehydrogenase 1A1
APC	Adenomatous polyposis coli
ATCC	American Type Culture Collection
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CD133	Cluster of differentiation 44 prominin 1
CD166	Cluster of differentiation 166
CD44	Cluster of differentiation 44
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CI	Konfidenzintervall
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CS6	Creative Suite 6, Adobe
CSC	Cancer stem cell

DEAB	4-Diethylaminobenzaldehyd, Inhibitor für ALDH
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilo dalton
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LEF1	Lymphoid enhancer binding factor 1
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAPK	Mitogen-activated protein kinases, MAP-Kinase-Weg
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
NAD(P)+	Nicotinamidadeninukleotid(phosphat)+
PI	Propidiumiodid
RA	Retinsäure
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RFS	Recurrence-free survival, rezidivfreies Überleben
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SSA	Sessiles serratiertes Adenom
TCF	T-Cell Factor
TMA	Tissue Microarray
TME	Tumor Micro Environment, Tumormikroumgebung
TNM	Tumor, Node (Lymphknotenmetastasen), Metastasen, TNM-Klassifikation
TOFT	Tissue Organization Field Theory
TP53	Tumor protein p53
UICC	Union internationale contre le cancer
USA	United States of America
Ü	Überleben
WHO	World Health Organization
WNT	Wingless intergated, zentrales Protein des WNT-Signalwegs
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Literatur

- Abdul Khalek, F. J., Gallicano, G. I., & Mishra, L. (2010 November). Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res*, (Suppl 1), 16–23.
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., . . . Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2, e71. doi:10.1038/oncsis.2013.35
- Ait Ouakrim, D., Pizot, C., Boniol, M., Malvezzi, M., Boniol, M., Negri, E., . . . Autier, P. (2015). Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*, 351, h4970. doi:10.1136/bmj.h4970
- Alison, M. R., Guppy, N. J., Lim, S. M., & Nicholson, L. J. (2010 Dezember). Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J. Pathol.* 222(4), 335–344. doi:10.1002/path.2772
- Ashby, W. J. & Zijlstra, A. (2012 November). Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integr Biol (Camb)*, 4(11), 1338–1350.
- Avoranta, S. T., Korkeila, E. A., Ristamaki, R. H., Syrjanen, K. J., Carpen, O. M., Pyrhonen, S. O., & Sundstrom, J. T. (2013 Juni). ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer. *Hum Pathol*, 44(6), 966–974. doi:10.1016/j.humpath.2012.10.003

- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007 Oktober). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(7165), 1003–1007. doi:10.1038/nature06196
- Bedessem, B. & Ruphy, S. (2015 September). SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis are made (artificially) incompatible. *Acta Biotheor*, *63*(3), 257–267. doi:10.1007/s10441-015-9252-1
- Beerenwinkel, N., Greenman, C. D., & Lagergren, J. (2016 Februar). Computational Cancer Biology: An Evolutionary Perspective. *PLoS Comput Biol*, *12*(2), e1004717. doi:10.1371/journal.pcbi.1004717
- Bertz, J., Kraywinkel, K., Dahm, S., Haberland, J., Kurth, B. M., Wolf, U., ... Ziese, T. (2010 Februar). *Beiträge zur gesundheitsberichterstattung des bundes - verbreitung von krebserkrankungen in deutschland: entwicklung der prävalenzen zwischen 1990 und ... für deutschland*). Robert Koch-Institut. Zugriff unter <http://amazon.de/o/ASIN/3896062085/>
- Bienz, M. & Clevers, H. (2000 Oktober). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, *103*(2), 311–320. doi:10.1016/S0092-8674(00)00122-7
- Blanco-Calvo, M., Concha, A., Figueroa, A., Garrido, F., & Valladares-Ayerbes, M. (2015). Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci*, *16*(6), 13610–13632. doi:10.3390/ijms160613610
- Bolouri, H. (2015 Februar). Network dynamics in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*, *30*, 52–59. doi:10.1016/j.semcancer.2014.02.007
- Bondi, J., Bukholm, G., Nesland, J. M., & Bukholm, I. R. (2004 Januar). Expression of non-membranous beta-catenin and gamma-catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. *APMIS*, *112*(1), 49–56. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120109.x

- Bonnet, D. & Dick, J. E. (1997 Juli). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7), 730–737.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., ... Straif, K. (2015 Dezember). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*, 16(16), 1599–1600. doi:10.1016/S1470-2045(15)00444-1
- Brabletz, T., Herrmann, K., Jung, A., Faller, G., & Kirchner, T. (2000 März). Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol*, 156(3), 865–870. doi:S0002-9440(10)64955-3[pii]
- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., & Kirchner, T. (2005a). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs (Print)*, 179(1-2), 56–65. doi:10.1159/000084509
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2005b September). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5(9), 744–749.
- Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E., & Ferlay, J. (2013 März). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5), 1133–1145.
- Buchert, M., Burns, C. J., & Ernst, M. (2015 Mai). Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges. *Oncogene*, 35(8), 939–951. doi:10.1038/onc.2015.150
- Cai, H., Liu, G., Sun, L., & Ding, J. (2014). Aldehyde Dehydrogenase 1 making molecular inroads into the differential vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neuron subtypes in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*, 3, 27. doi:10.1186/2047-9158-3-27

- Canter, R. J., Grossenbacher, S. K., Ames, E., & Murphy, W. J. (2016 April). Immune targeting of cancer stem cells in gastrointestinal oncology. *J Gastrointest Oncol*, 7(Suppl 1), S1–S10. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.066
- Cesarz, Z. & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2016, 9176357.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., . . . Wicha, M. S. (2010 Januar). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*, 16(1), 45–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1630
- Chen, B.-J., Wu, Y.-L., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014 September). Small molecules targeting c-myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.* 10(10), 1084–1096. doi:10.7150/ijbs.10190
- Chen, J., Xia, Q., Jiang, B., Chang, W., Yuan, W., Ma, Z., . . . Shu, X. (2015). Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 10(12), e0145164. doi:10.1371/journal.pone.0145164
- Chen, M. H., Weng, J. J., Cheng, C. T., Wu, R. C., Huang, S. C., Wu, C. E., . . . Yeh, C. N. (2016 April). ALDH1A3, the major aldehyde dehydrogenase isoform in human cholangiocarcinoma cells, affects prognosis and gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma patients. *Clin Cancer Res*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1800
- Chen, Y., Orlicky, D. J., Matsumoto, A., Singh, S., Thompson, D. C., & Vasiliou, V. (2011 Februar). Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 405(2), 173–179. doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.002
- Chiang, C. P., Jao, S. W., Lee, S. P., Chen, P. C., Chung, C. C., Lee, S. L., . . . Yin, S. J. (2012 Februar). Expression pattern, ethanol-metabolizing activities, and cellular localization of alcohol and aldehyde dehydrogenases in human large bowel: association of the functional

- polymorphisms of ADH and ALDH genes with hemorrhoids and colorectal cancer. *Alcohol*, 46(1), 37–49.
- Chibaudel, B., Tournigand, C., Bonnetain, F., Richa, H., Benetkiewicz, M., Andre, T., & de Gramont, A. (2015 Mai). Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer: an updated review. *Ther Adv Med Oncol*, 7(3), 153–169. doi:10.1177/1758834015572343
- Christ, O., Lucke, K., Imren, S., Leung, K., Hamilton, M., Eaves, A., ... Eaves, C. (2007 September). Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica*, 92(9), 1165–1172.
- Chu, P., Clanton, D. J., Snipas, T. S., Lee, J., Mitchell, E., Nguyen, M.-L., ... Peach, R. J. (2009). Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer*, 124(6), 1312–1321. doi:10.1002/ijc.24061
- Clifford, J., Chiba, H., Sobieszczuk, D., Metzger, D., & Chambon, P. (1996 August). RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J*, 15(16), 4142–4155.
- Lo-Coco, F., Avisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S. M., Iacobelli, S., ... Platzbecker, U. (2013 Juli). Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 369(2), 111–121. doi:10.1056/NEJMoa1300874
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., ... Dubrovskaja, A. (2015 April). Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res*, 75(7), 1482–1494. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1924
- Condello, S., Morgan, C. A., Nagdas, S., Cao, L., Turek, J., Hurley, T. D., & Matei, D. (2015 April). β -Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene*, 34(18), 2297–2308.

- Corti, S., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Donadoni, C., Salani, S., Del Bo, R., . . . Comi, G. P. (2006 April). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*, *24*(4), 975–985.
- Couzin-Frankel, J. (2013 Oktober). The power of negative thinking. *Science*, *342*(6154), 68–69.
- Crocker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009 August). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*, *13*(8B), 2236–2252. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x
- Dai, Y., Jiang, J. B., Wang, Y. L., Jin, Z. T., & Hu, S. Y. (2015 Oktober). Functional and protein-protein interaction network analysis of colorectal cancer induced by ulcerative colitis. *Mol Med Rep*, *12*(4), 4947–4958.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., . . . Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(24), 10158–10163. doi:10.1073/pnas.0703478104
- Deng, S., Yang, X., Lassus, H., Liang, S., Kaur, S., Ye, Q., . . . Zhang, L. (2010). Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*, *5*(4), e10277. doi:10.1371/journal.pone.0010277
- Deng, Y., Zhou, J., Fang, L., Cai, Y., Ke, J., Xie, X., . . . Wang, J. (2014 Januar). ALDH1 is an independent prognostic factor for patients with stages II-III rectal cancer after receiving radiochemotherapy. *Br J Cancer*, *110*(2), 430–434. doi:10.1038/bjc.2013.767
- Deonarain, M. P., Kousparou, C. A., & Epenetos, A. A. (2009). Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MABs*, *1*(1), 12–25. doi:10.4161/mabs.1.1.7347
- Dong, X., Yambartsev, A., Ramsey, S. A., Thomas, L. D., Shulzhenko, N., & Morgun, A. (2015). Reverse enGENEering of Regulatory Networks from Big Data: A Roadmap for Biologists. *Bioinform Biol Insights*, *9*, 61–74.

- Duester, G. (2008 September). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*, 134(6), 921–931. doi:10.1016/j.cell.2008.09.002
- Dylla, S. J., Beviglia, L., Park, I. K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., . . . Gurney, A. L. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, 3(6), e2428. doi:10.1371/journal.pone.0002428
- Ehrig, T., Bosron, W. F., & Li, T. K. (1990). Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol*. 25(2-3), 105–116.
- Emmert-Streib, F., de Matos Simoes, R., Glazko, G., McDade, S., Haibe-Kains, B., Holzinger, A., . . . Campbell, F. (2014). Functional and genetic analysis of the colon cancer network. *BMC Bioinformatics*, 15 Suppl 6, S6.
- Even, M. S., Sandusky, C. B., & Barnard, N. D. (2006 März). Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol*, 24(3), 105–108. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.001
- Falso, M. J., Buchholz, B. A., & White, R. W. (2012 März). Stem-like cells in bladder cancer cell lines with differential sensitivity to cisplatin. *Anticancer Res*, 32(3), 733–738.
- Fan, F., Bellister, S., Lu, J., Ye, X., Boulbes, D. R., Tozzi, F., . . . Ellis, L. M. (2015 Februar). The requirement for freshly isolated human colorectal cancer (CRC) cells in isolating CRC stem cells. *Br J Cancer*, 112(3), 539–546. doi:10.1038/bjc.2014.620
- Fan, X., Ouyang, N., Teng, H., & Yao, H. (2011). Isolation and characterization of spheroid cells from the ht29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis*, 26(10), 1279–85. doi:10.1007/s00384-011-1248-y
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., . . . Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by akt promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*, 282(15), 11221–11229. doi:10.1074/jbc.M611871200
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990 Juni). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., . . . Bray, F. (2013). Globocan 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: iarc cancerbase no. 11 [internet]. Zugriff 8. April 2016, unter <http://globocan.iarc.fr>
- Fitzgerald, T. L., Rangan, S., Dobbs, L., Starr, S., & Sigounas, G. (2014 November). The impact of Aldehyde dehydrogenase 1 expression on prognosis for metastatic colon cancer. *J Surg Res*, *192*(1), 82–89. doi:10.1016/j.jss.2014.05.054
- Friedman, H. S., Colvin, O. M., Kaufmann, S. H., Ludeman, S. M., Bullock, N., Bigner, D. D., & Griffith, O. W. (1992 Oktober). Cyclophosphamide resistance in medulloblastoma. *Cancer Res*, *52*(19), 5373–5378.
- Gao, Z. H., Lu, C., Wang, M. X., Han, Y., & Guo, L. J. (2014 November). Differential β -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett*, *8*(5), 2069–2076. doi:10.3892/ol.2014.2433
- Ghiaur, G., Gerber, J., & Jones, R. J. (2012 Januar). Concise review: Cancer stem cells and minimal residual disease. *Stem Cells*, *30*(1), 89–93. doi:10.1002/stem.769
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., . . . Dontu, G. (2007 November). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, *1*(5), 555–567.
- Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., Bertucci, F., . . . Charafe-Jauffret, E. (2009 Oktober). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle*, *8*(20), 3297–3302.
- Goossens-Beumer, I. J., Zeestraten, E. C., Benard, A., Christen, T., Reimers, M. S., Keijzer, R., . . . Kuppen, P. J. (2014 Juni). Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*, *110*(12), 2935–2944. doi:10.1038/bjc.2014.226
- Gunther, K., Brabletz, T., Kraus, C., Dworak, O., Reymond, M. A., Jung, A., . . . Ballhausen, W. G. (1998 Oktober). Predictive value of nuclear beta-catenin expression for the

- occurrence of distant metastases in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 41(10), 1256–1261. doi:10.1007/BF02258226
- Guo, Y., Pino-Lagos, K., Ahonen, C. A., Bennett, K. A., Wang, J., Napoli, J. L., . . . Noelle, R. J. (2012 Oktober). A retinoic acid-rich tumor microenvironment provides clonal survival cues for tumor-specific CD8(+) T cells. *Cancer Res*, 72(20), 5230–5239.
- Gupta, A. (2011). *Study of the role of retinoic acid signaling in colon cancer*. Zugriff 12. September 2015, unter https://web.archive.org/web/*/http://udspace.udel.edu/handle/19716/10091
- Haggar, F. A. & Boushey, R. P. (2009 November). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, 22(4), 191–197.
- Hahn, S., Jackstadt, R., Siemens, H., Hunten, S., & Hermeking, H. (2013 November). SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, 32(23), 3079–3095. doi:10.1038/emboj.2013.236
- Han, S. A., Chun, H., Park, C. M., Kang, S. J., Kim, S. H., Sohn, D., . . . Lee, W. Y. (2006 Dezember). Prognostic significance of beta-catenin in colorectal cancer with liver metastasis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 18(10), 761–767.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. [R. A.]. (2011 März). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harlow, E. & Lane, D. P. (1988 Dezember). *Antibodies: a laboratory manual* (1. Aufl.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Zugriff unter <http://amazon.com/o/ASIN/0879693142/>
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Kasemeier-Kulesa, J., Kulesa, P. M., & Postovit, L. M. (2007 April). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer*, 7(4), 246–255. doi:10.1038/nrc2108
- Hessman, C. J., Bubbers, E. J., Billingsley, K. G., Herzig, D. O., & Wong, M. H. (2012 Mai). Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with

- advanced-stage colorectal cancer. *Am J Surg*, 203(5), 649–653. doi:10.1016/j.amjsurg.2012.01.003
- Hilton, J. (1984 November). Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Res*, 44(11), 5156–5160.
- Hlubek, F., Jung, A., Kotzor, N., Kirchner, T., & Brabletz, T. (2001 November). Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res*, 61(22), 8089–8093.
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Jung, A., & Kirchner, T. (2009a). Cd133 and nuclear β -catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 45(11), 2034–2040. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.004
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., & Jung, A. (2008). Cd133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 99(8), 1285–1289. doi:10.1038/sj.bjc.6604664
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., & Jung, A. (2009b Oktober). Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest*, 27(8), 844–850. doi:10.1080/07357900902744502
- Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S., . . . Cronin, K. (2015). SEER cancer statistics review 1975-2012. Zugriff 3. April 2016, unter http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/
- Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., . . . Boman, B. M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (sc) and tracks sc overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 69(8), 3382–3389. doi:10.1158/0008-5472.can-08-4418
- Hulkower, K. I. & Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124.

- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., & Steindler, D. A. (2002 September). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, *39*(3), 193–206. doi:10.1002/glia.10094
- Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D. C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2011 Mai). Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum. Genomics*, *5*(4), 283–303. doi:10.1186/1479-7364-5-4-283
- Jaitner, S., Reiche, J. A., Schaffauer, A. J., Hiendlmeyer, E., Herbst, H., Brabletz, T., ... Jung, A. (2012 September). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of β -catenin in human colorectal tumors. *Cell Cycle*, *11*(17), 3331–3338. doi:10.4161/cc.21790
- Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., ... Katz, R. L. (2009 März). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, *7*(3), 330–338. doi:10.1158/1541-7786.mcr-08-0393
- Johansson, C. H. & Brage, S. E. (2014 Mai). BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *142*(2), 176–182. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.011
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013 Juni). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*, *24*(6), 1207–1222. doi:10.1007/s10552-013-0201-5
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., ... Wolf, U. (2015 Dezember). *Beiträge zur gesundheitsberichterstattung des bundes - krebs in deutschland 2011/2012 (gesundheitsberichterstattung für deutschland)* (10. Aufl.). Robert Koch-Institut. doi:10.17886/rkipubl-2015-004
- Kahlert, C., Gaitzsch, E., Steinert, G., Mogler, C., Herpel, E., Hoffmeister, M., ... Weitz, J. (2012 Dezember). Expression analysis of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) in colon and rectal cancer in association with prognosis and response to chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, *19*(13), 4193–4201. doi:10.1245/s10434-012-2518-9

- Kamposioras, K., Konstantara, A., Kotoula, V., Lakis, S., Kouvatseas, G., Akriviadis, E., ... Fountzilas, G. (2013 Oktober). The prognostic significance of WNT pathway in surgically-treated colorectal cancer: β -catenin expression predicts for disease-free survival. *Anticancer Res*, 33(10), 4573–4584.
- Katoh, M. (2007 Januar). Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev*, 3(1), 30–38.
- Khorrani, S., Zavaran Hosseini, A., Mowla, S. J., & Malekzadeh, R. (2015 Oktober). Verification of ALDH Activity as a Biomarker in Colon Cancer Stem Cells-Derived HT-29 Cell Line. *Iran J Cancer Prev*, 8(5), e3446. doi:10.17795/ijcp-3446
- Kim, Y. H., Kim, G., Kwon, C. I., Kim, J. W., Park, P. W., & Hahm, K. B. (2014 März). TWIST1 and SNAI1 as markers of poor prognosis in human colorectal cancer are associated with the expression of ALDH1 and TGF- β 1. *Oncol Rep*, 31(3), 1380–1388. doi:10.3892/or.2014.2970
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1996 Oktober). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. doi:10.1016/S0092-8674(00)81333-1
- Kitano, H. (2002 November). Computational systems biology. *Nature*, 420(6912), 206–210.
- Knutsen, T., Padilla-Nash, H. M., Wangsa, D., Barenboim-Stapleton, L., Camps, J., McNeil, N., ... Ried, T. (2010 März). Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 49(3), 204–223.
- Koivisto, T. & Salaspuro, M. (1997 Dezember). Effects of acetaldehyde on brush border enzyme activities in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(9), 1599–1605.
- Koivisto, T. & Salaspuro, M. (1998 November). Acetaldehyde alters proliferation, differentiation and adhesion properties of human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*, 19(11), 2031–2036.

- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., ... Vasiliou, V. (2012 Juli). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*, 64(3), 520–539. doi:10.1124/pr.111.005538
- Koutsogiannouli, E., Papavassiliou, A. G., & Papanikolaou, N. A. (2013 April). Complexity in cancer biology: is systems biology the answer? *Cancer Med*, 2(2), 164–177. doi:10.1002/cam4.62
- Kropotova, E. S., Zinovieva, O. L., Zyryanova, A. F., Dybovaya, V. I., Prasolov, V. S., Beresten, S. F., ... Mashkova, T. D. (2014 Juli). Altered expression of multiple genes involved in retinoic acid biosynthesis in human colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 20(3), 707–717. doi:10.1007/s12253-014-9751-4
- Langan, R. C., Mullinax, J. E., Ray, S., Raiji, M. T., Schaub, N., Xin, H. W., ... Avital, I. (2012). A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. *J Cancer*, 3, 231–240. doi:10.7150/jca.4542
- Leggett, B. & Whitehall, V. (2010 Juni). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 138(6), 2088–2100. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.066
- Leng, Z., Tao, K., Xia, Q., Tan, J., Yue, Z., Chen, J., ... Zheng, H. (2013). Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PLoS One*, 8(2), e56082. doi:10.1371/journal.pone.0056082
- Levi, B. P., Yilmaz, O. H., Duester, G., & Morrison, S. J. (2009 Februar). Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood*, 113(8), 1670–1680.
- Li, H., Jiang, Y., Pei, F., Li, L., Yan, B., Geng, X., & Liu, B. (2016 Januar). Aldehyde Dehydrogenase 1 and Nodal as Significant Prognostic Markers in Colorectal Cancer. *Pathol Oncol Res*, 22(1), 121–127. doi:10.1007/s12253-015-9984-x

- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2(2), 329–333.
- Lindahl, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 27(4-5), 283–335. doi:doi:10.3109/10409239209082565
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 46(3), 258–268.
- Lotan, R. (1980). Effects of vitamin a and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 605(1), 33–91.
- Lugli, A., Iezzi, G., Hostettler, I., Muraro, M. G., Mele, V., Tornillo, L., . . . Zlobec, I. (2010). Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers cd133, cd166, cd44s, epcam, and aldh1 in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 103(3), 382–390. doi:10.1038/sj.bjc.6605762
- Lugli, A., Zlobec, I., Minoo, P., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., & Jass, J. R. (2007 März). Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology*, 50(4), 453–464.
- MacLean, A. L., Rosen, Z., Byrne, H. M., & Harrington, H. A. (2015 März). Parameter-free methods distinguish Wnt pathway models and guide design of experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9), 2652–2657. doi:10.1073/pnas.1416655112
- Maden, M. (2000 Februar). The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc*, 59(1), 65–73. doi:10.1017/S0029665100000082
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. (2011 Mai). Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, 10(9), 1378–1384. doi:10.4161/cc.10.9.15486

- Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. (2009 Dezember). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361(25), 2449–2460.
- Marselos, M. & Michalopoulos, G. (1987 Januar). Changes in the pattern of aldehyde dehydrogenase activity in primary and metastatic adenocarcinomas of the human colon. *Cancer Lett*, 34(1), 27–37.
- Mertins, S. D. (2014 April). Cancer stem cells: a systems biology view of their role in prognosis and therapy. *Anticancer Drugs*, 25(4), 353–367.
- Moreb, J. S. [J. S.], Ucar, D., Han, S., Amory, J. K., Goldstein, A. S., Ostmark, B., & Chang, L. J. (2012 Januar). The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*, 195(1), 52–60.
- Moreb, J. S. [J. S.], Zucali, J. R., Ostmark, B., & Benson, N. A. (2007 Juli). Heterogeneity of aldehyde dehydrogenase expression in lung cancer cell lines is revealed by Aldefluor flow cytometry-based assay. *Cytometry B Clin Cytom*, 72(4), 281–289.
- Moreb, J. S. [Jan S.], Baker, H. V., Chang, L.-J., Amaya, M., Lopez, M. C., Ostmark, B., & Chou, W. (2008). Aldh isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer*, 7(1), 87. doi:10.1186/1476-4598-7-87
- Morgan, C. A. & Hurley, T. D. (2015 Februar). Characterization of two distinct structural classes of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 inhibitors. *J Med Chem*, 58(4), 1964–1975. doi:10.1021/jm501900s
- Morgan, C. A., Parajuli, B., Buchman, C. D., Dria, K., & Hurley, T. D. (2015 Juni). N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. *Chem Biol Interact*, 234, 18–28. doi:10.1016/j.cbi.2014.12.008

- Moustakas, A. & Heldin, C. H. (2007 Oktober). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci*, 98(10), 1512–1520. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00550.x
- Nagtegaal, I. D. & Hugen, N. (2015). The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 11(5), 259–266. doi:10.1007/s11888-015-0280-7
- Niederreither, K., Fraulob, V., Garnier, J. M., Chambon, P., & Dolle, P. (2002 Januar). Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev*, 110(1-2), 165–171. doi:10.1016/S0925-4773(01)00561-5
- Norwood, M. G., Bailey, N., Nanji, M., Gillies, R. S., Nicholson, A., Ubhi, S., . . . Jankowski, J. A. (2010 Juli). Cytoplasmic beta-catenin accumulation is a good prognostic marker in upper and lower gastrointestinal adenocarcinomas. *Histopathology*, 57(1), 101–111. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03587.x
- Nowell, P. C. (1986 Mai). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, 46(5), 2203–2207.
- Nusse, R. (2005 Januar). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, 15(1), 28–32.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007 Januar). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106–110. doi:10.1038/nature05372
- ab23375. (o.D.). Zugriff 26. Mai 2013, unter <https://web.archive.org/web/20130525155815/http://www.abcam.com/ALDH1A1-antibody-Neuronal-Marker-ab23375.html>
- ab24343. (o.D.). Zugriff 26. Mai 2013, unter <https://web.archive.org/web/20130526021623/http://www.abcam.com/ALDH1A1-antibody-Neuronal-Marker-ab24343.html>
- ab9883. (o.D.). Zugriff 26. Mai 2013, unter <https://web.archive.org/web/20130526003729/http://www.abcam.com/ALDH1A1-antibody-ab9883.html>

- Purified mouse anti-aldh*. (o.D.). BD Transduction Laboratories. BD Pharmingen, San Diego, CA, USA. Zugriff 13. April 2016, unter <https://web.archive.org/web/20160413093514/http://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/apoptosis/purified-antibodies/purified-mouse-anti-aldh-44aldh/p/611195>
- S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (2014 August). Zugriff 4. März 2016, unter https://web.archive.org/web/20160304061051/http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLl_S3_KRK_2014-08.pdf
- ICD-10 C18.1: Appendixkarzinom Inzidenz und Mortalität. (2016). Zugriff 29. April 2016, unter https://web.archive.org/save/_embed/http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC181_G-ICD-10-C18.1-Appendixkarzinom-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf
- Ormanns, S., Neumann, J., Horst, D., Kirchner, T., & Jung, A. (2014 Mai). WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling. *Oncotarget*, 5(10), 2999–3011.
- Pan, Q., Li, Q., Liu, S., Ning, N., Zhang, X., Xu, Y., ... Wicha, M. S. (2015 Juli). Concise Review: Targeting Cancer Stem Cells Using Immunologic Approaches. *Stem Cells*, 33(7), 2085–2092. doi:10.1002/stem.2039
- Pang, R., Law, W. L., Chu, A. C., Poon, J. T., Lam, C. S., Chow, A. K., ... Wong, B. C. (2010 Juni). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 6(6), 603–615. doi:10.1016/j.stem.2010.04.001
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74–108.
- Patel, A., Tripathi, G., Gopalakrishnan, K., Williams, N., & Arasaradnam, R. P. (2015 April). Field cancerisation in colorectal cancer: a new frontier or pastures past? *World J Gastroenterol*, 21(13), 3763–3772. doi:10.3748/wjg.v21.i13.3763

- Perez Millan, M. & Turjanski, A. G. (2015 April). MAPK's networks and their capacity for multistationarity due to toric steady states. *Math Biosci*, 262, 125–137. doi:10.1016/j.mbs.2014.12.010
- Petrosino, J. M., Disilvestro, D., & Ziouzenkova, O. (2014). Aldehyde dehydrogenase 1A1: friend or foe to female metabolism? *Nutrients*, 6(3), 950–973. doi:10.3390/nu6030950
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015 März). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225–238. doi:10.1016/j.stem.2015.02.015
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., & Morrison, S. J. (2008 Dezember). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456(7222), 593–598.
- Rabeneck, L., Horton, S., Zauber, A. G., & Earle, C. (2015). Colorectal cancer. In *Cancer: disease control priorities, third edition (volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction und Development / The World Bank. doi:10.1596/978-1-4648-0349-9_ch6
- Rad, R., Cadinanos, J., Rad, L., Varela, I., Strong, A., Kriegl, L., . . . Bradley, A. (2013 Juli). A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*, 24(1), 15–29. doi:10.1016/j.ccr.2013.05.014
- Rahadiani, N., Ikeda, J., Mamat, S., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Umehara, R., . . . Morii, E. (2011 April). Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. *Cancer Sci*, 102(4), 903–908. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01864.x
- Rajcevic, U., Knol, J. C., Piersma, S., Bougnaud, S., Fack, F., Sundlisaeter, E., . . . Jimenez, C. R. (2014). Colorectal cancer derived organotypic spheroids maintain essential tissue characteristics but adapt their metabolism in culture. *Proteome Sci*, 12, 39. doi:10.1186/1477-5956-12-39

- Rao, Q. X., Yao, T. T., Zhang, B. Z., Lin, R. C., Chen, Z. L., Zhou, H., ... Lin, Z. Q. (2012). Expression and functional role of ALDH1 in cervical carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, *13*(4), 1325–1331.
- Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001 August). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, *293*(5532), 1089–1093. doi:10.1126/science.1063443
- Resnick, M. B., Routhier, J., Konkin, T., Sabo, E., & Pricolo, V. E. (2004 Mai). Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res*, *10*(9), 3069–3075. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0462
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001 November). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105–111.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007 Januar). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111–115. doi:10.1038/nature05384
- Rodriguez-Torres, M. & Allan, A. L. (2016 Januar). Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. *Clin Exp Metastasis*, *33*(1), 97–113. doi:10.1007/s10585-015-9755-9
- Rose, L. J. (2013). Colon cancer staging. Zugriff 8. April 2016, unter <https://web.archive.org/web/20151007104701/http://emedicine.medscape.com/article/2006674-overview>
- Rosenfeld, S. (2013). Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Inform*, *12*, 221–229.
- Ruben, A. (2012). *I've got your impact factor right here*. doi:10.1126/science.caredit.a1200021
- Russo, J. E. (1997). Inhibition of mouse and human class 1 aldehyde dehydrogenase by 4-(N,N-dialkylamino)benzaldehyde compounds. *Adv Exp Med Biol*, *414*, 217–224.

- Salim, E. I., Hegazi, M. M., Kang, J. S., & Helmy, H. M. (2016). Expression Patterns of Cancer Stem Cell Markers During Specific Celecoxib Therapy in Multistep Rat Colon Carcinogenesis Bioassays. *Asian Pac J Cancer Prev*, *17*(3), 1023–1035.
- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S. I., Ziegler, P. K., ... Greten, F. R. (2013 Januar). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, *152*(1-2), 25–38. doi:10.1016/j.cell.2012.12.012
- Sell, S. (2004 Juli). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, *51*(1), 1–28.
- Seo, H., Kim, W., Lee, J., & Youn, B. (2013 Dezember). Network-based approaches for anticancer therapy (Review). *Int J Oncol*, *43*(6), 1737–1744. doi:10.3892/ijco.2013.2114
- Seo, J. O., Han, S. I., & Lim, S. C. (2010 Juli). Role of CDK8 and beta-catenin in colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep*, *24*(1), 285–291.
- Siegel, R., Desantis, C., & Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, *64*(2), 104–117. doi:10.3322/caac.21220.
- Singh, S., Arcaroli, J., Thompson, D. C., Messersmith, W., & Vasiliou, V. (2015). Acetaldehyde and retinaldehyde-metabolizing enzymes in colon and pancreatic cancers. *Adv Exp Med Biol*, *815*, 281–294. doi:10.1007/978-3-319-09614-8_16
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., ... Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med*, *56*, 89–101. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010
- Sladek, N. E. (1999 August). Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr Pharm Des*, *5*(8), 607–625.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (Hrsg.). (2009 Dezember). *Tnm classification of malignant tumours* (7. Aufl.). Wiley-Blackwell. Zugriff unter <http://amazon.com/o/ASIN/1444332414/>

- Sonachalam, M., Shen, J., Huang, H., & Wu, X. (2012). Systems biology approach to identify gene network signatures for colorectal cancer. *Front Genet*, 3, 80. doi:10.3389/fgene.2012.00080
- Sonnenschein, C. & Soto, A. M. (2013 September). The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J. Biosci.* 38(3), 651–663.
- Soreide, K., Berg, M., Skudal, B. S., & Nedreboe, B. S. (2011 November). Advances in the understanding and treatment of colorectal cancer. *Discov Med*, 12(66), 393–404.
- Soto, A. M. & Sonnenschein, C. (2011 Mai). The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays*, 33(5), 332–340. doi:10.1002/bies.201100025
- Spruessel, A., Steimann, G., Jung, M., Lee, S. A., Carr, T., Fentz, A. K., . . . David, K. A. (2004 Juni). Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*, 36(6), 1030–1037.
- Stintzing, S., Modest, D. P., Rossius, L., Lerch, M. M., von Weikersthal, L. F., Decker, T., . . . Heinemann, V. (2016 Oktober). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17(10), 1426–1434. doi:10.1016/s1470-2045(16)30269-8
- Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M., & Smith, C. (1999 August). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9118–9123.
- Sullivan, J. P., Spinola, M., Dodge, M., Raso, M. G., Behrens, C., Gao, B., . . . Minna, J. D. (2010 Dezember). Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res*, 70(23), 9937–9948. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0881

- Takahashi, H., Ohkuma, T., Tsuruta, T., & Saegusa, M. (2014 Dezember). A combination of nuclear β -catenin and atypical scores as useful diagnostic markers for borderline malignancy of gastric tumours. *Histopathology*, *65*(6), 828–838.
- Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., ... Ivy, S. P. (2015 August). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*, *12*(8), 445–464. doi:10.1038/nrclinonc.2015.61
- Tallman, M. S., Andersen, J. W., Schiffer, C. A., Appelbaum, F. R., Feusner, J. H., Ogden, A., ... Wiernik, P. H. (1997 Oktober). All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, *337*(15), 1021–1028.
- Thiery, J. P. (2002 Juni). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(6), 442–454.
- Toma, S., Isnardi, L., Raffo, P., Dastoli, G., De Francisci, E., Riccardi, L., ... Bollag, W. (1997 März). Effects of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid on breast-cancer cell lines: growth inhibition and apoptosis induction. *Int J Cancer*, *70*(5), 619–627.
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016 Januar). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.6920
- Unger, F. T., Lange, N., Kruger, J., Compton, C., Moore, H., Agrawal, L., ... David, K. A. (2016). Nanoproteomic analysis of ischemia-dependent changes in signaling protein phosphorylation in colorectal normal and cancer tissue. *J Transl Med*, *14*(1), 6. doi:10.1186/s12967-015-0752-1
- Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P., & Ruiz i Altaba, A. (2009 September). Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*, *1*(6-7), 338–351.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., & Nebert, D. W. (1999 August). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature

- based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, 9(4), 421–434.
- Vasiliou, V., Thompson, D. C., Smith, C., Fujita, M., & Chen, Y. (2013 Februar). Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 2–10.
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., ... Medema, J. P. (2010 Mai). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 12(5), 468–476.
- Vogler, T., Kriegl, L., Horst, D., Engel, J., Sagebiel, S., Schaffauer, A. J., ... Jung, A. (2012 Februar). The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. *Exp Mol Pathol*, 92(1), 111–117. doi:10.1016/j.yexmp.2011.10.010
- Wangefjord, S., Brandstedt, J., Lindquist, K. E., Nodin, B., Jirstrom, K., & Eberhard, J. (2013). Associations of beta-catenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. *Diagn Pathol*, 8, 10. doi:10.1186/1746-1596-8-10
- Wassermann, S., Scheel, S. K., Hiendlmeyer, E., Palmqvist, R., Horst, D., Hlubek, F., ... Jung, A. (2009 Januar). p16^{INK4a} is a β -catenin target gene and indicates low survival in human colorectal tumors. *Gastroenterology*, 136(1), 196–205. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.019
- Weinberg, R. A. [Robert A.] & Weinberg, R. A. [Robert A.]. (2013 Mai). *The biology of cancer, 2nd edition* (2nd). Garland Science. Zugriff unter <http://amazon.com/o/ASIN/0815342209/>
- Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., ... Pals, S. T. (1999 Februar). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol*, 154(2), 515–523. doi:10.1016/S0002-9440(10)65297-2

- Wright-Jin, E. C., Grider, J. R., Duester, G., & Heuckeroth, R. O. (2013 September). Retinaldehyde dehydrogenase enzymes regulate colon enteric nervous system structure and function. *Dev Biol*, *381*(1), 28–37. doi:10.1016/j.ydbio.2013.06.021
- Wu, A., Luo, W., Zhang, Q., Yang, Z., Zhang, G., Li, S., & Yao, K. (2013 April). Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*, *330*(2), 181–189. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.046
- Wu, X., Hasan, M. A., & Chen, J. Y. (2014 Dezember). Pathway and network analysis in proteomics. *J Theor Biol*, *362*, 44–52. doi:10.1016/j.jtbi.2014.05.031
- Xu, S. L., Zeng, D. Z., Dong, W. G., Ding, Y. Q., Rao, J., Duan, J. J., ... Bian, X. W. (2014). Distinct patterns of ALDH1A1 expression predict metastasis and poor outcome of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, *7*(6), 2976–2986.
- Xu, X., Chai, S., Wang, P., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Y., & Wang, K. (2015 Dezember). Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett*, *369*(1), 50–57. doi:10.1016/j.canlet.2015.08.018
- Yamagishi, A., Matsumoto, S., Watanabe, A., Mizuguchi, Y., Hara, K., Kan, H., ... Uchida, E. (2014 April). Gene profiling and bioinformatics analyses reveal time course differential gene expression in surgically resected colorectal tissues. *Oncol Rep*, *31*(4), 1531–1538. doi:10.3892/or.2014.3053
- Yang, S. M., Yasgar, A., Miller, B., Lal-Nag, M., Brimacombe, K., Hu, X., ... Maloney, D. J. (2015 August). Discovery of NCT-501, a Potent and Selective Theophylline-Based Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1). *J Med Chem*, *58*(15), 5967–5978. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00577
- Yao, T., Lu, R., Li, Y., Peng, Y., Ding, M., Xie, X., & Lin, Z. (2015 September). ALDH1 might influence the metastatic capability of HeLa cells. *Tumour Biol*, *36*(9), 7045–7051. doi:10.1007/s13277-015-3398-y

-
- Yoon, G., Kim, S. M., Kim, H. J., & Seo, A. N. (2015 Oktober). Clinical influence of cancer stem cells on residual disease after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Tumour Biol.* doi:10.1007/s13277-015-4201-9
- Zeindl-Eberhart, E., Brandl, L., Liebmann, S., Ormanns, S., Scheel, S. K., Brabletz, T., ... Jung, A. (2014). Epithelial-mesenchymal transition induces endoplasmic-reticulum-stress response in human colorectal tumor cells. *PLoS One*, *9*(1), e87386. doi:10.1371/journal.pone.0087386
- Zhou, F., Mu, Y. D., Liang, J., Liu, Z. X., Chen, H. S., & Zhang, J. F. (2014 Februar). Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma. *Oncol Lett*, *7*(2), 507–512. doi:10.3892/ol.2013.1723
- Zhou, Y., Wang, Y., Ju, X., Lan, J., Zou, H., Li, S., ... Li, F. (2015). Clinicopathological significance of ALDH1A1 in lung, colorectal, and breast cancers: a meta-analysis. *Biomark Med*, *9*(8), 777–790. doi:10.2217/BMM.15.49

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andreas Jung, der mich immer unterstützte, mir die nötige Freiheit gab, um selbständig zu lernen und zu wachsen, und der mir den Enthusiasmus für die Forschungsarbeit vermittelte, ohne den eine solche Arbeit nicht gelingen kann.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Jung bedanken für die gute Zusammenarbeit, Bereitschaft für Hilfe und Erklärungen, wo diese von Nöten waren und die positive und freundschaftliche Atmosphäre, von der die ganze Gruppe profitierte. Insbesondere während der Arbeit im Labor waren Sabine Sagebiel, Alexandra Schindler, Martina Brand, Dr. Silvio Scheel, Jana Reiche, Dr. Stefanie Jaitner und Dr. Achim Schäffauer mir große Hilfe und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner als Direktor des Pathologischen Instituts der LMU danke ich für die Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie für die guten Bedingungen für Lehre und Forschung an seinem Institut. Hierfür gilt mein Dank auch allen Kollegen am Pathologischen Institut der LMU sowie insbesondere der Immunhistochemie in Großhadern für die ALDH1A1-Färbungen des humanen Kollektivs.

Ich möchte mich auch bedanken bei den Kollegen und Betreuern des FöFoLe (Förderprogramm für Forschung und Lehre) der LMU, die einen regen wissenschaftlichen Austausch ermöglichten und durch die ich viel über Methoden und Geist der Wissenschaft erfahren habe.

Bei meiner Familie möchte ich mich sehr herzlich bedanken, bei meiner Frau Diana, den Kindern, und bei meiner Mutter, für jahrelange Geduld, wenn ich wieder einmal „fast fertig“ war, viele hilfreiche Diskussionen und die nötige Zeit, um diese Arbeit doch noch zu vollenden.

Eidesstattliche Versicherung

Vogler, Tobias

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Bedeutung der Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 für Überleben und Funktion beim kolorektalen Karzinom“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Radolfzell, 01.11.2018

Ort, Datum

(Tobias Vogler)