

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III im Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**In-vitro-Untersuchungen zur Kombinationswirkung von
Erucylphosphohomocholin (ErPC₃) und Strahlentherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Matthias Steiger

aus Deggendorf

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Moshe Schaffer

Prof. Dr. Dr. h.c. Edmund Lengfelder

Betreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Lars Lindner

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2008

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abbildungsverzeichnis	3
3	Tabellenverzeichnis	5
4	Abkürzungsverzeichnis	6
5	Einleitung	7
5.1	Grundlagen der biologischen Strahlenwirkung	7
5.1.1	Der Zellzyklus	7
5.1.2	Wirkung von Strahlung auf die Zelle	8
5.1.3	Reparaturmechanismen	8
5.1.4	Zelltod nach Strahleneinwirkung	9
5.1.5	Radiochemotherapie	11
5.2	Alkylphosphocholine und Tumorthherapie	13
5.2.1	Entwicklung, Struktur und Eigenschaften der Alkylphosphocholine	13
5.2.2	Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine	19
5.2.3	Alkylphosphocholine und Chemotherapie	21
5.2.4	Alkylphosphocholine und Strahlentherapie	22
6	Zielsetzung	23
7	Material und Methoden	24
7.1	Zellbiologische Arbeitstechniken	24
7.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	24
7.1.2	Zellzahlbestimmung	26
7.1.3	Mykoplasmentest	26
7.1.4	Kryokonservierung	27
7.2	Erufosin	28
7.3	WST1-Zellproliferationsassay	29
7.3.1	WST1-Zellproliferationsassay	29
7.3.2	Vorversuch – exponentielles Wachstum	30
7.4	Apoptose-Messungen	31
7.5	Auswertung/Statistik	32
7.5.1	WST-Zellproliferationsassay	32
7.5.2	Apoptose-Messung	32

8	Ergebnisse	34
8.1	WST1-Zellproliferationassay	34
8.1.1	Vorversuch - Bestimmung der optimalen Zellzahl je well.....	34
8.1.2	WST1-Bestrahlungsexperimente.....	36
8.2	Apoptose-Messungen	46
8.2.1	Bilder Apoptoseversuche	47
8.2.2	Mikroskopische Auszählung	49
9	Diskussion	55
9.1	Diskussion der Methoden.....	55
9.1.1	WST1-Zellproliferationsassay	55
9.1.2	Apoptose-Messungen	58
9.2	Diskussion der Ergebnisse	60
9.2.1	Kombinationsbehandlung im WST1-Zellproliferationsassay	60
9.2.2	Kombinationseffekt von Bestrahlung und Alkylphosphocholinen auf die Apoptoseinduktion	64
9.2.3	Vergleich von Erufosin mit anderen in der Radioonkologie eingesetzten Substanzen.....	65
9.2.4	Schlussfolgerung aus den Ergebnissen	66
10	Zusammenfassung und Ausblick	68
11	Literaturverzeichnis.....	70
12	Danksagung	77
13	Lebenslauf	78

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5.1 Strukturformel von Lecithin.....	14
Abbildung 5.2 Strukturformel von Lysolecithin.....	14
Abbildung 5.3 Strukturformel Edelfosin®	15
Abbildung 5.4 Strukturformel HePC	16
Abbildung 5.5 Strukturformel Perifosin®	17
Abbildung 5.6 Strukturformel ErPC	18
Abbildung 5.7 Strukturformel ErPC ₃	19
Abbildung 8.1 KB-Zellen: Wachstum in 96-well-Platte.....	35
Abbildung 8.2 SK-LMS-1-Zellen, isobographische Analyse	37
Abbildung 8.3 A-549: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	38
Abbildung 8.4 MCF-7: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	38
Abbildung 8.5 MDA-MB-453: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	39
Abbildung 8.6 SK-LMS-1: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	40
Abbildung 8.7 NCI-H460: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	40
Abbildung 8.8 DU-145: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	41
Abbildung 8.9 T98G: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	41
Abbildung 8.10 U-373MG: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	41
Abbildung 8.11 RDES: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	43
Abbildung 8.12 KB: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	44
Abbildung 8.13 FADU: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	44
Abbildung 8.14 HCT-15: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	45
Abbildung 8.15 HT-29: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	45
Abbildung 8.16 PC-3: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	45
Abbildung 8.17 A-549: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	50
Abbildung 8.18 A-549: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	50
Abbildung 8.19 MDA-MB-453: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	50
Abbildung 8.20 MDA-MB-453: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	51

Abbildung 8.21 DU-145: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	51
Abbildung 8.22 DU-145: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	52
Abbildung 8.23 RD-ES: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	52
Abbildung 8.24 RD-ES: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	53
Abbildung 8.25 HCT-15: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	53
Abbildung 8.26 HCT-15: Anteil lebender Zellen 48h Nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	54
Abbildung 8.27 FADU: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	54
Abbildung 8.28 FADU: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃	54

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 8.1 Rahmenbedingungen für die Bestrahlungsexperimente in einer 96-well-Platte...	36
Tabelle 8.2 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC ₃ für A549, MCF-7, MDA-MB-453.....	39
Tabelle 8.3 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für A549, MCF-7, MDA-MB-453 .	39
Tabelle 8.4 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC ₃ für DU-145, NCI-H460, SK-LMS1, T98G, U-373MG	42
Tabelle 8.5 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für DU-145, NCI-H460, SK-LMS1, T98G, U-373MG	42
Tabelle 8.6 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC ₃ für RD-ES.....	43
Tabelle 8.7 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für RD-ES.....	43
Tabelle 8.8 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC ₃ für KB, FADU, HCT-15, HT-29, PC-3.....	46
Tabelle 8.9 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für KB, FADU, HCT-15, HT-29, PC-3.....	46
Tabelle 8.10 Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von A-549-Zellen (Bronchial-Ca): Behandlung mit Bestrahlung und ErPC ₃ in unterschiedlichen Dosen, angefärbt mit Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342..	48

4 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emissionswellenlänge
ErPC	Erucylphosphocholin
ErPC ₃	Erucylphosphohomocholin, Erufosin
Ex	Exzitationswellenlänge
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
G-CSF	granulocytes colony stimulating factor
HePC	Hexadecylphosphocholin, Mitefosin [®]
HPLC	high performance liquid chromatography
HPTLC	high performance thin layer chromatography
H33342	Hoechst33342, Bisbenzimid
Il-6	Interleukin 6
MG	Molekulargewicht
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEA	nichtessentielle Aminosäuren
OD	optische Dichte
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
WST1	Tetrazoliumsalz, welches von lebenden Zellen zu einem photometrisch messbaren Metaboliten (Formazan) umgewandelt wird

5 Einleitung

In dieser Arbeit werden erstmals systematisch in-vitro-Experimente zur Kombinationswirkung von Erucylphosphocholin (Erufosin, ErPC₃) und Strahlentherapie vorgestellt. Erufosin ist ein neuartiges Antitumormittel und gehört zur Substanzklasse der Alkylphosphocholine. Als lipophile Moleküle greifen diese nicht wie klassische Chemotherapeutika direkt die DNA an, sondern lagern sich in Zellmembranen ein und stören dabei den Metabolismus der Membranlipide sowie transmembranöse Signalkaskaden. Der genaue Wirkmechanismus für Alkylphosphocholine konnte bis heute noch nicht aufgeklärt werden. Bekannt ist, dass Alkylphosphocholine in Tumorzellen Apoptose auslösen können sowie antiparasitäre Eigenschaften aufweisen. Im Gegensatz zu den klassischen Chemotherapeutika verursachen sie keine Myelosuppression und sind daher ganz besonders für Kombinationstherapien geeignet. In Kombination mit Bestrahlung können Alkylphosphocholine die frühe Apoptoseinduktion verstärken und das klonogene Gesamtüberleben reduzieren. Inwiefern diese Eigenschaften auch für Erufosin zutreffen und ob es Tumorentitäten gibt, die besonders empfindlich auf eine Therapie mit Erufosin plus Bestrahlung reagieren, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.1 Grundlagen der biologischen Strahlenwirkung

5.1.1 Der Zellzyklus

Von den beiden Strahlenbiologen Howard und Pelc (Howard and Pelc 1951; Howard and Pelc 1953) wurde zum ersten mal erkannt, dass alle Zellen im Zuge ihrer Vermehrung einen definierten Zyklus, der bei allen Lebewesen identisch ist, durchlaufen. Die Phasen dieses Zyklus sind folgende: G₀-, G₁-, S-, G₂- und die M- Phase. In der G₁-Phase findet vor allem die Produktion der verschiedenen Enzyme zur Vorbereitung der DNA-Synthese (Verdopplung des Genoms) in der darauf folgenden S-Phase statt. Ist die DNA in dieser Phase repliziert worden, so werden in der G₂-Phase RNA und Enzyme für die bevorstehende Mitose (M-Phase) hergestellt. In der M-Phase teilt sich dann die Zelle. Eukaryonte Zellen müssen jedoch nicht permanent diesen Zyklus durchlaufen und sich teilen, sondern können auch in ein

teilungsinaktives Ruhestadium, die so genannte G_0 -Phase, übergehen, um von dort aus auch wieder in den Proliferationszyklus einzutreten.

5.1.2 Wirkung von Strahlung auf die Zelle

Wenn ionisierende Strahlung auf Zellen trifft, so ist ihre schädigende Wirkung auf die DNA der entscheidende Faktor, der über das Zellüberleben entscheidet. Weiterhin werden auch Proteine und Enzyme geschädigt. Diese liegen jedoch meist in hoher Zahl vor und können unter Voraussetzung eines intakten Genoms und Proteinsyntheseapparates wieder nachgebildet werden. Durch Strahlung entstehen freie Radikale, die mit den Bestandteilen der Zelle reagieren können. Am anfälligsten für solche Defekte ist die Zelle während der M-, G_2 - und frühen S-Phase. An der DNA kann es dabei zu folgenden Schäden kommen (Streffler 1996):

- a) Die Polynukleotidketten der DNA können unterbrochen werden. Geschieht dies nur an einem Strang, so spricht man von einem Einzelstrangbruch, beim Bruch beider Stränge von einem Doppelstrangbruch.
- b) Es kann zur Veränderung oder Elimination von Nukleinsäurebasen, seltener auch zu Veränderungen der Desoxyribose kommen. Dies kann Konformationsänderungen der DNA zur Folge haben.
- c) Es können auch Vernetzungen der DNA innerhalb einer Einzelkette, zwischen zwei Einzelketten oder zwischen DNA und Proteinen stattfinden.

Tritt durch Strahleneinwirkung ein solcher Schaden auf, so registriert ihn die Zelle an so genannten „Checkpoints“ und hält den Zellzyklus an der entsprechenden Stelle an. Dies gibt dem Checkpoint seinen Namen: z.B. G_1 -Phase-Block, G_2 -Phase-Block, S-Phase-Block (Maity, McKenna et al. 1994; Iliakis 1997; Bernhard, McKenna et al. 1999). Nach Anhalten des Zellzyklus versucht die Zelle den entstandenen Schaden zu reparieren. Gelingt dies nicht, leitet sie die Apoptose ein.

5.1.3 Reparaturmechanismen

Im Falle eines Strahlenschadens hat die Zelle eine Reihe effektiver Reparaturmechanismen. Bei Einzelstrangbrüchen oder Veränderungen der DNA-Bestandteile (Basen oder Desoxyribose) erkennt sie die defekte Stelle, diese wird durch Exzision entfernt und die

Lücke anschließend nach Vorlage des Komplementärstranges wieder aufgefüllt (Christmann, Tomicic et al. 2003). Bei Doppelstrangbrüchen, die den größten DNA-Schaden für die Zelle darstellen, gibt es zwei verschiedene Methoden, wie der Schaden behoben werden kann: die Nicht-Homologe Endverknüpfung (NHEJ: Non Homologous End-Joining) (Jeggo 1998) und die Homologe Rekombinationsreparatur (HRR: Homologous Recombination Repair) (Thompson and Schild 2002). Beim NHEJ werden die beiden freien DNA-Enden enzymatisch miteinander verknüpft und dabei die fehlerhaften Nukleotide entfernt. Danach enthält die DNA an der Reparaturstelle eine fehlerhafte Sequenz, da der Bereich um den Doppelstrangbruch nach einem Zufallsprinzip wiederhergestellt wird. Bei der HRR hingegen werden ebenfalls die beiden Enden miteinander verknüpft. Der fehlerhafte Bereich wird durch Ablesen der fehlenden Sequenz von einer homologen Stelle im Genom wieder aufgefüllt (homologes Chromosom oder zweites Chromatid). In diesem Fall wird die DNA fehlerlos wieder hergestellt. Bisherige Untersuchungen ergeben, dass alle Eukaryonten über beide Reparatursysteme verfügen, höhere Eukaryonten aber fast ausschließlich die Nicht-Homologe Endverknüpfung als Reparaturmechanismus für strahleninduzierte Doppelstrangbrüche einsetzen. Inwiefern die HRR bei ihnen eine Rolle spielt, ist noch unklar. Bisher konnte man nur zeigen, dass Mutationen in Proteinen für die HRR eine Strahlensensibilisierung bewirken, was eine wichtige Funktion der HRR auch in höheren Eukaryonten impliziert (Iliakis and Tamulevicius 2003).

5.1.4 Zelltod nach Strahleneinwirkung

Nehmen die durch Strahlung in der Zelle verursachten Schäden trotz der vorhandenen Reparaturmechanismen ein bestimmtes Ausmaß an, so stirbt die Zelle ab. Man unterscheidet den Interphasetod, den reproduktiven Zelltod und die Nekrose. Beim Interphasetod leitet die Zelle noch vor der dem Eintritt in die nächste Mitose die Apoptose ein. Der reproduktive Zelltod hingegen erfolgt erst nach der ersten bis spätestens fünften Mitose nach Strahleneinwirkung. Bei der Nekrose geht die Zelle aufgrund einer sehr starken Schädigung der Zellstrukturen mit einer Entzündungsreaktion zugrunde.

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, bei dem sich eine Zelle unter Aktivierung spezifischer Proteasen, den Caspasen, in kleine apoptotische Vesikel auflöst, die anschließend von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert werden. Eine Caspasenaktivierung kann grundsätzlich auf zwei voneinander unterschiedlichen Wegen eingeleitet werden. Zum einen verfügen Zellen über einen Zelltodrezeptor und können

darüber von außen das Signal zur Apoptoseeinleitung erhalten (extrinsischer Weg, ligandenvermittelte Apoptose: TNF- α am p55-TNF- α -Rezeptor, CD95-L am CD95/Fas/Apo1-Rezeptor und TRAIL am Death Receptor (DR4 oder DR5)). Zum anderen haben Zellen auch die Fähigkeit Schäden in ihrem Inneren zu erkennen (z.B. verursacht durch Chemotherapie, oxidativen Stress oder Strahlung). Wenn keine Reparatur dieses Schadens möglich ist, kann ohne Stimulus von außen der eigene Tod einleitet werden (intrinsischer, mitochondrialer Weg). Beim ligandenvermittelten Zelltod kann zwar gezeigt werden, dass Bestrahlung eine erhöhte Expression von Zelltodrezeptoren und -liganden hervorruft, die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung wird jedoch hauptsächlich über den intrinsischen Weg vermittelt (Lawen 2003). Dieser Mechanismus soll daher genauer erläutert werden.

Ein wichtiges Signalmolekül, das von der Zelle bei DNA-Schäden aktiviert wird, ist P53. Es arretiert den Zellzyklus, wirkt als Transkriptionsfaktor und wirkt bei der DNA-Reparatur mit (Ryan, Phillips et al. 2001). In seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor induziert es Bax, ein proapoptotisch wirksames Signalmolekül der Bcl-2-Familie. Dieses wiederum ist am Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt. Dadurch wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Cytochrom C bewirkt dann eine Aktivierung der Caspasen. Dies sind Effektorenzyme (Proteasen), die sowohl für den intrinsischen als auch extrinsischen Weg der Apoptose die gemeinsame Endstrecke darstellen und den Zelltod vollstrecken. (Lawen 2003; Belka, Jendrossek et al. 2004).

Neben diesem Mechanismus scheinen auch Ceramide eine Rolle bei der strahleninduzierten Apoptose zu spielen. Durch strahlenbedingte Aktivierung der sauren Sphingomyelinase entsteht aus Sphingomyelin nach Hydrolyse Ceramid, welches apoptoseinduzierend wirkt (Kolesnick and Fuks 2003).

Beim Interphasezelltod stehen die gerade beschriebenen früh nach Bestrahlung eintretenden Apoptosemechanismen im Vordergrund. Im Gegensatz dazu ist der reproduktive Zelltod bisher nicht sehr eingehend erforscht. Über die molekularen und zellbiologischen Abläufe ist wenig bekannt. Neben der Apoptose kann es im Zuge des reproduktiven Zelltods zu Nekrosen und so genannter Mikrokernbildung kommen. Bei letzterem handelt es sich um von einer eigenen Membran umgebene zytoplasmatische Chromatinfragmente oder gar ganze Chromosomen, die bei der Mitose nicht in den Tochterkern mit eingeschlossen wurden. Inwieweit dies die Zelle schädigt, ist nicht bekannt (Belka, Abend et al. 2003).

Der Nekrose liegt ursächlich eine starke strukturelle Schädigung oder eine defekter Apoptosemechanismus der Zelle zugrunde. Dadurch ist kein programmierter Zelltod im Sinne einer Apoptose mehr möglich. Es kommt zu einer Zellschwellung und schließlich Ruptur der

Zelle mit Freisetzung lytischer Enzyme, die eine Entzündungsreaktion auslösen (Belka, Abend et al. 2003).

Wichtige Faktoren, die die den Zelltod durch Bestrahlung beeinflussen, sind außerdem die Sauerstoffversorgung und der pH-Wert des Gewebes. Bei Azidose und Hypoxie spricht Tumorgewebe weniger gut auf Bestrahlung an (Baumann and Molls 2003).

In welchem Ausmaß die verschiedenen Formen des Zelltods zum klinischen Erfolg einer Strahlentherapie beitragen, lässt sich nur schwer ermitteln. In vielen Fällen lässt sich eine starke Apoptoseinduktion von Tumorzellen durch Bestrahlung *in vitro* auf eine hohe Strahlensensibilität *in vivo* übertragen (Belka, Abend et al. 2003).

5.1.5 Radiochemotherapie

Die Strahlentherapie hat eine wichtige Bedeutung bei der Behandlung von Tumoren. Ca.75% der Tumorpatienten kommen im Laufe ihrer Erkrankung mit der Strahlentherapie in Kontakt, bei ca. 40% ist die Strahlentherapie der primär therapeutische Ansatz (Lasserre and Blohm 2003). Die Optimierung der Behandlung kann zum einen durch eine Verbesserung der technischen Geräte erfolgen, zum anderen durch den Einsatz von Substanzen, die zusätzlich zur Strahlenwirkung die Tumorzellen schädigen. Durch die Kombination von Strahlen- mit Chemotherapie erhofft man sich im behandelten Zielvolumen mehr Tumorzellen abzutöten als durch die Bestrahlung alleine und damit die lokale Tumorkontrolle zu verbessern. Außerhalb des strahlentherapeutischen Zielvolumens sollen eventuell vorhandene Mikrometastasen vernichtet und dadurch die systemische Tumorkontrolle verbessert werden. Dosislimitierend für den Einsatz von Chemotherapeutika ist deren Toxizität, insbesondere die Myelosuppression sowie die gastrointestinalen Nebenwirkungen. Aus der Kombinationsbehandlung kann ein verbessertes Überleben resultieren, bei einigen Tumorentitäten (Keimzelltumoren, bestimmte Lymphome) besteht sogar die Aussicht auf eine dauerhafte Heilung (Molls 2003).

5.1.5.1 Interaktion Chemotherapeutikum / Strahlentherapie

Mögliche Mechanismen einer Interaktion von Chemotherapie und Strahlentherapie bestehen darin, dass durch die Chemotherapie zusätzlich mehr und auch strahlenresistente Tumorzellen abgetötet werden. Zusätzlich können DNA-Reparaturmechanismen durch das

Chemotherapeutikum gehemmt werden. Darüber hinaus kann die so genannte Repopulierung vermindert werden. Darunter versteht man, dass sich nach Strahleneinwirkung die noch vitalen, klonogenen Zellen des Tumors vermehren, was durch das Chemotherapeutikum zumindest eingedämmt werden kann. Weiterhin werden nach Bestrahlung ruhende Tumorzellen in den Proliferationszyklus rekrutiert und sind damit ein potentiell Ziel für die Chemotherapie. Tumorzellen können durch Einfluss des Chemotherapeutikums aber auch in strahlensensiblen Zellzyklusphasen akkumulieren. Verkleinert sich das Tumolvolumen durch die zusätzliche Chemotherapie, so werden die restlichen Tumoranteile besser perfundiert und mit Sauerstoff versorgt werden. Damit werden die Tumorzellen wiederum anfälliger für den strahleninduzierten Zelltod (Molls 2003).

5.1.5.2 Quantifizierung des Kombinationseffekts

Um die zusätzliche Wirkung eines Chemotherapeutikums zur Strahlentherapie bei in-vitro-Versuchen zu berechnen, gibt es als Rechenmodell die isobographische Analyse. Mit ihrer Hilfe können die Kombinationseffekte als antagonistisch, subadditiv, additiv oder synergistisch beschrieben werden (Berenbaum 1978; Steel and Peckham 1979; Berenbaum 1989).

Daneben existiert noch der Begriff der Radiosensibilisierung. Darunter versteht man im klassischen Sinn, dass eine Substanz die Tumorzellen dahingehend beeinflusst, dass sie sensibler auf Strahlung reagieren, z.B. durch Inhibition eines Reparatursystems. Die eingesetzte Substanz hat dabei selbst keinen toxischen Effekt auf die Zellen oder wird in Konzentrationen, die im nichttoxischen Bereich liegen, eingesetzt (Fu 1985).

Allgemein gilt, dass man aufgrund der in-vitro- und in-vivo-Daten keinen sicheren Rückschluss auf die Wirksamkeit und die Größe des Kombinationseffektes beim späteren Einsatz einer Substanz in der Klinik ziehen kann (Molls 2003). Die Rechenmodelle sind größtenteils nur für in-vitro-Untersuchungen geeignet. Am Patienten sind die Interaktionsmechanismen nur schwierig zu fassen und es lässt sich nicht bestimmen, welcher Anteil des Therapieeffektes alleine auf die Bestrahlung zurückgeht und welcher alleine auf die Chemotherapie. Fu schlug deshalb vor, im Falle einer „sinnvollen“ Kombination eines Zytostatikums mit Strahlentherapie, d.h. eines durch die Kombination bedingten besseren Therapieergebnisses, einfach von einer Wirkungsverstärkung der Strahlentherapie durch die Chemotherapie („Enhancement“) zu sprechen und klinisch nicht zwischen additiven und synergistischen Effekten zu unterscheiden. (Fu 1985).

5.1.5.3 Substanzen im Einsatz mit Strahlentherapie

Es gibt eine ganze Reihe von Chemotherapeutika, die heute in der Klinik zusammen mit Strahlentherapie zur Tumorbehandlung eingesetzt werden. Zu den wichtigsten zählen 5-Fluorouracil, Temozolomid, Cisplatin, Taxane, Topoisomerase-Inhibitoren, Gemcitabin und Mitomycin. Sie wirken über eine direkte Schädigung der DNA, des DNA-Metabolismus oder des Spindelapparates während der Mitose und induzieren so Apoptose in den Tumorzellen. Durch ihren Einsatz lassen sich in Kombination mit Bestrahlung vermehrt Tumorzellen abtöten und es wird ein besseres Therapieergebnis erzielt. Dosislimitierend ist bei diesen Substanzen ihre Toxizität (Myelosuppression, gastrointestinale Nebenwirkungen) (Molls 2003).

Das gesamte Kapitel „Grundlagen der Strahlenbiologie“ orientiert sich an den Büchern „Radioonkologie Grundlagen“ und „Strahlentherapie: Radiologische Onkologie“ (Scherer and Sack 1996; Bamberg, Molls et al. 2003).

5.2 Alkylphosphocholine und Tumorthherapie

Alkylphosphocholine sind eine Gruppe neuer Antitumormittel, die nicht die DNA, sondern die Zellmembran als Angriffspunkt haben (Eibl and Unger 1990) und als Apoptoseinduktoren (Jendrossek and Handrick 2003) wirken. Diese Effekte scheinen selektiv bei Tumorzellen aufzutreten. Auf die bisher erforschten Wirkungsmechanismen wird später eingegangen. Zunächst soll ein Überblick über die Struktur und Entwicklung der bisher für den klinischen Einsatz in Betracht gezogenen Alkylphosphocholine erfolgen.

5.2.1 Entwicklung, Struktur und Eigenschaften der Alkylphosphocholine

5.2.1.1 Entwicklung

Eine klassische Chemotherapie wirkt vor allem auf rasch proliferierende Zellen und schädigt nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde, sich rasch teilende Zellen im Körper. Dies führt zu den bekannten Nebenwirkungen wie Myelosuppression, gastrointestinaler Toxizität

mit Übelkeit und Erbrechen, Infertilität oder Haarausfall. Die Entwicklung neuer Antitumormittel mit verringerter Nebenwirkungsrate steht daher im Hauptinteresse der onkologischen Forschung. Als neuen Angriffspunkt hat man hier die Zellmembran entdeckt. Biologische Membranen bestehen aus Proteinen, Cholesterin und Phospholipiden (Abbildung 5.1).

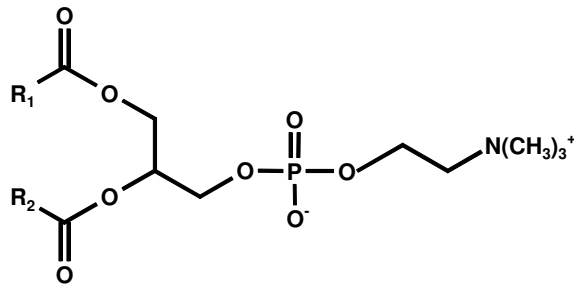


Abbildung 5.1 Strukturformel von Lecithin als Beispiel für ein Phospholipid

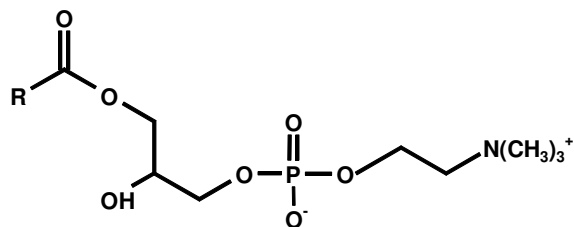


Abbildung 5.2 Strukturformel von Lysolecithin als Beispiel für ein Lysophospholipid. Es fehlt die Fettsäure an Position 2 des Glycerinmoleküls.

Lagern sich in eine Membran Lysophospholipide (Abbildung 5.2) ein, so führt dies ab einem Anteil von ca. 20% dazu, dass die Zellmembran durchlässig wird und ihre Barrierefunktion verliert. Dadurch wird das intrazelluläre Milieu der Zelle zerstört und sie stirbt schließlich ab. Allerdings werden die Lysophospholipide in der Membran von Acyltransferasen durch Übertragung eines Fettsäurerestes auf das C2-Atom des GlycerinGrundgerüsts sehr schnell inaktiviert (Erbar 1995). Um nun Lipide dieser Art gezielt gegen Tumorzellen einzusetzen, sind chemische Variationen nötig, die dazu führen, dass sie sich in zytotoxisch wirksamer Konzentration in der Zellmembran anreichern können ohne sofort abgebaut zu werden. Als erster Schritt können die natürlich vorkommenden Esterlysophospholipide zu Etherlysophospholipiden verändert werden, d.h. die Fettsäure an Position 1 des Glycerins wird durch einen langkettigen Alkohol ersetzt. Die dadurch entstehende Etherbindung bedingt einen langsameren Abbau (van Blitterswijk, Hilkmann et al. 1987). Zusätzlich kann die C2-Position durch eine Methylgruppe vor einer Reacylierung geschützt werden. Wichtigster Vertreter dieser Gruppe ist das Edelfosin[®] (ET-18-OCH₃; 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-phosphocholin, Abbildung 5.3). Wie sich in weiteren Untersuchungen herausstellte, sind für die antitumorale Wirksamkeit die polare Kopfgruppe und die lange Alkylkette die entscheidenden Faktoren. Aufgrund dieser Überlegung entstand die Gruppe der

Alkylphosphocholine. Das Glycerinmolekül ist hierbei entfernt und die Alkylkette direkt mit dem Phosphocholinrest verbunden. Der Wegfall des Glyceringerüsts verlangsamt auch den Metabolismus der Substanzen, ohne die antitumorale Aktivität zu mindern (Eibl and Unger 1990). Die wichtigsten Vertreter aus dieser Gruppe der Alkylphosphocholine sind Miltefosin[®] (HePC, Hexadecylphosphocholin, Abbildung 5.4), Perifosin[®] (D-21266, Abbildung 5.5), Erucylphosphocholin (ErPC, Abbildung 5.6) und Erufosin (ErPC₃, Erucylphosphohomocholin, Abbildung 5.7). Im Folgenden soll nun kurz auf die einzelnen Substanzen eingegangen werden.

5.2.1.2 Edelfosin[®]

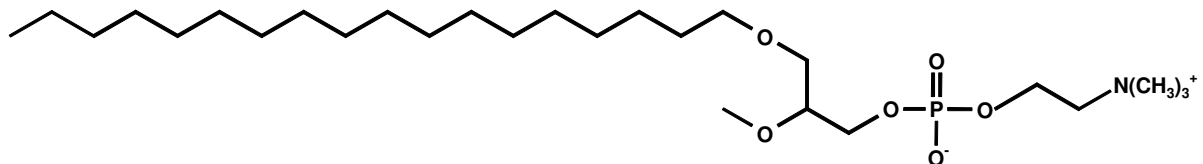


Abbildung 5.3 Strukturformel Edelfosin[®]

Edelfosin[®] (Abbildung 5.3) zeigt eine starke antitumorale Aktivität in vitro (Berdel, Von Hoff et al. 1986; Danhauser, Berdel et al. 1987). In Tierexperimenten ist jedoch keine Akkumulation zu finden, was mit dem sehr schnellen Metabolismus von Edelfosin[®] begründet wird (Magistrelli, Villa et al. 1995). Dosislimitierende Nebenwirkungen in einer Phase I Studie waren Erbrechen und Durchfälle. In höheren Dosisstufen traten auch Toxizitäten der Lunge (Lungenödem) und Leberfunktionsstörungen auf, jedoch keine Myelosuppression. Positive therapeutische Effekte zeigten sich bei einem kleinzelligen Bronchialkarzinom und einer akuten myeloischen Leukämie (Berdel, Fink et al. 1987). Darüber hinaus ergaben sich für Edelfosin[®] vielversprechende Ergebnisse nach dem in-vitro-Purgung von autologem Knochenmark (Vogler and Berdel 1993). Ein routinemäßiger Einsatz von Edelfosin[®] in der Klinik erfolgte bis heute nicht.

5.2.1.3 Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosin[®])

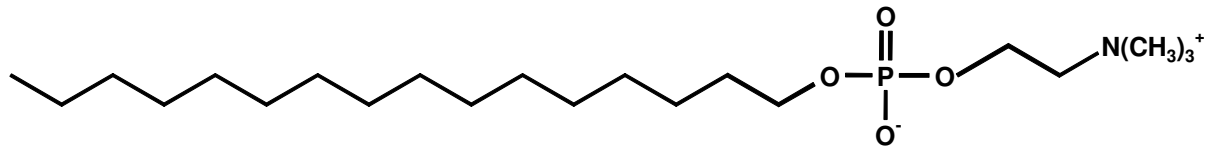


Abbildung 5.4 Strukturformel HePC

Miltefosin[®] (HePC) (Abbildung 5.4) erweist sich sowohl *in vitro* als auch im Tierversuch als gut antitumoral wirksam (Breiser, Kim et al. 1987; Unger, Damenz et al. 1989). Es gibt mehrere Studien mit Miltefosin[®] am Menschen. Wie Edelfosin hat auch Miltefosin[®] eine starke hämolytische Aktivität, deshalb muss die Applikation topisch oder oral erfolgen. Als Nebenwirkungen der oralen Therapie treten gastrointestinale Toxizität (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) und Nierenfunktionsstörungen, aber keine Myelosuppression auf (Verweij, Planting et al. 1992). Studien mit Anwendung von Miltefosin[®] bei Kolonkarzinomen (Becher, Kloke et al. 1993; Planting, Stoter et al. 1993), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Berdel, Becher et al. 1992), Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Verweij, Gandia et al. 1993) und Weichteilsarkomen (Verweij, Krzemieniecki et al. 1993) zeigten nur geringes oder fehlendes Therapieansprechen. Dies führt man darauf zurück, dass aufgrund der dosislimitierenden gastrointestinalen Toxizität keine effektiven Wirkspiegel erreicht werden können. Miltefosin[®] kann auch als liposomale Formulierung intravenös appliziert werden. Dadurch ist zwar das Hämolyseproblem gelöst, allerdings führt liposomales Miltefosin[®] ebenfalls zu gastrointestinaler Toxizität und deshalb wird keine verbesserte antitumorale Aktivität erzielt (Kaufmann-Kolle, Drevs et al. 1994).

Miltefosin[®] stimuliert die Leuko- und Thrombopoese (Pronk, Planting et al. 1994). In einer Studie zeigten über 70% der Patienten in den ersten vier Wochen nach Beginn der oralen Therapie einen signifikanten Anstieg der Leukozyten und Thrombozyten. Weiterführende Laboruntersuchungen deuten auf zwei Effekte hin, die dafür ursächlich sein könnten. Zum einen induziert Miltefosin[®] die Synthese und Sekretion von IL-6, Thrombopoetin und G-CSF in Knochenmarksfibroblasten und Thrombozyten (Berkovic, Bensch et al. 2001), zum anderen lässt sich die Wirkung von G-CSF auf die Granulopoese (Vehmeier, Eibl et al. 1992; Vehmeier, Liersch et al. 1992) sowie von Thrombopoetin auf die Thrombopoese (Berkovic, Bensch et al. 2001) durch die Zugabe von Miltefosin[®] verstärken.

Überzeugende Erfolge in der systemischen Tumortherapie gibt es bisher nicht. Einzig für die topische Behandlung von Hautmetastasen des Mammakarzinoms gibt es so gute Ergebnisse,

dass eine Formulierung von Miltefosin[®] mit Alkylglyceriden unter dem Namen Miltex[®] 1992 die Zulassung für diese Indikation erhielt (Unger, Peukert et al. 1990; Leonard, Hardy et al. 2001). Außerdem existieren Untersuchungen zur topischen Wirksamkeit bei kutanen Lymphomen. In einer kleinen Studie mit 24 Patienten wurde eine Remissionsrate von 56% erreicht. Trotz des guten Ansprechens waren histologisch aber immer noch Lymphominfiltrate nachweisbar (Dummer, Krasovec et al. 1993).

Das primär für die Tumorthherapie entwickelte Miltefosin[®] erweist sich überdies als sehr wirksam gegen die Protozoenerkrankung Leishmaniose (Kuhlencord, Maniera et al. 1992). In einer Phase III Studie mit 299 Patienten ließen sich bei der oralen Therapie Heilungsraten von über 90% erzielen. Vorteile gegenüber anderen Leishmaniosetherapien sind die gute orale Bioverfügbarkeit von Miltefosin[®], so gut wie keine Resistenz der Erreger, die niedrige Toxizität und die moderaten Kosten (Sundar, Jha et al. 2002). 2002 erfolgte die Zulassung für die weltweit erste orale Therapie gegen viszerale Leishmaniose unter dem Handelsnamen Impavido[®]. Darüber hinaus sprechen auch andere Protozoen (*Entamoeba histolytica* (Seifert, Duchene et al. 2001), *Acanthamoeba* species (Walochnik, Duchene et al. 2002) in vitro auf die Behandlung mit HePC an.

5.2.1.4 Perifosin[®] (D-21266)

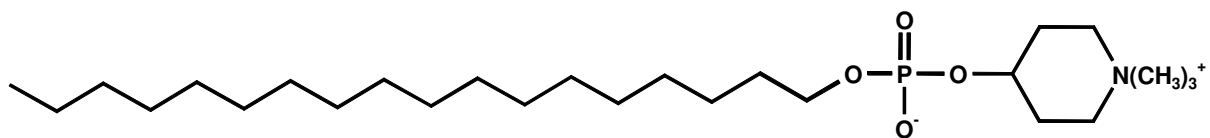


Abbildung 5.5 Strukturformel Perifosin[®]

Bei Perifosin[®] (Abbildung 5.5) ist die Idee durch eine strukturelle Veränderung gegenüber Miltefosin[®] die gastrointestinale Toxizität zu senken. Durch den Einbau einer Ringstruktur am polaren Ende des Moleküls kann durch Metabolisierung kein Phosphocholin mehr entstehen, welches man mit für die gastrointestinalen Nebenwirkungen verantwortlich macht. Perifosin[®] zeigt wiederum gute antitumorale Aktivität in vitro und in vivo (Hilgard, Klenner et al. 1997). Aufgrund der weiterhin hämolytischen Eigenschaften kommt nur eine orale Applikation in Frage. Die klinische Anwendung von Perifosin ist gerade in der Entwicklung. Zwei Phase I Studien zeigten ein nahezu unverändertes Nebenwirkungsprofil zu Miltefosin[®] (Crul, Rosing et al. 2002; Van Ummersen, Binger et al. 2004). Auch hier waren die gastrointestinalen Nebenwirkungen dosislimitierend und es ergab sich keine

Knochenmarkstoxizität. Phase II Studien bei Prostatakarzinomen (Posadas, Gulley et al. 2005), Weichteilsarkomen (Knowling, Blackstein et al. 2006) und Malignen Melanomen (Ernst, Eisenhauer et al. 2005) zeigten keinen therapeutischen Erfolg. Da für verschiedene Alkylphosphocholine und ganz aktuell auch für Perifosin[®] (Vink, Lagerwerf et al. 2006) bekannt ist, dass sie die Strahlenwirkung bei Tumorzellen verstärken, gibt es mit Perifosin[®] eine Phase I Studie, die die Kombination mit Strahlentherapie bei soliden Tumoren untersuchte (Vink, Schellens et al. 2006). Perifosin[®] konnte dabei sicher mit Strahlentherapie kombiniert werden. Dosislimitierend für den Einsatz von Perifosin[®] war die gastrointestinale Toxizität. Eine Phase II Studie ist geplant.

5.2.1.5 Erucylphosphocholin (ErPC)

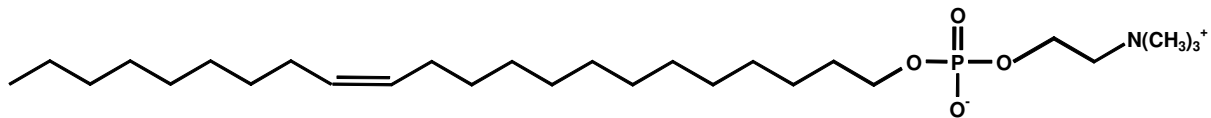


Abbildung 5.6 Strukturformel ErPC

Durch die Einführung einer längeren Alkylkette und einer cis-Doppelbindung in den Alkylphosphocholinen gelingt es die antitumorale Wirkung zu verstärken und die Verträglichkeit wesentlich zu verbessern. Es entsteht das Erucylphosphocholin (ErPC) (Abbildung 5.6). Aufgrund nun fehlender hämolytischer Eigenschaften ist ErPC als erstes Alkylphosphocholin intravenös verabreichbar und man erhofft sich eine deutliche Linderung der gastrointestinalen Toxizität, die bisher dosislimitierend ist (Berger, Sobottka et al. 1998; Jendrossek, Hammersen et al. 2002). In der Zellkultur zeigt sich Erucylphosphocholin als gut wirksam gegen Tumorzellen. Glioblastomzellen sprechen gut auf Erucylphosphocholin an (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1998; Jendrossek, Erdlenbruch et al. 1999; Jendrossek, Hammersen et al. 2002). Auch bei Tierexperimenten wirkt Erucylphosphocholin gut. Hier ist die intravenöse Applikationsform der oralen signifikant überlegen. Daraus lässt sich schließen, dass die verbesserte Wirksamkeit in vivo vor allem auf die verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften zurückzuführen ist (Berger, Yanapirut et al. 1992; Kotting, Berger et al. 1992; Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1998; Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Zum klinischen Einsatz kommt bisher allerdings nicht Erucylphosphocholin, sondern das Erucylphosphohomocholin (ErPC₃).

5.2.1.6 Erucylphosphohomocholin (ErPC₃, Erufosin)

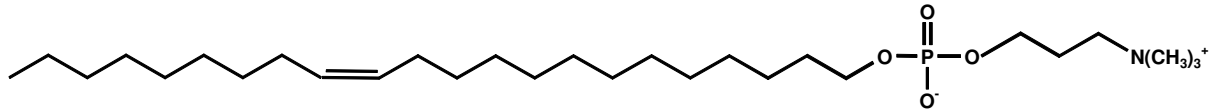


Abbildung 5.7 Strukturformel ErPC₃

Durch Einfügen eines zusätzlichen C-Atoms zwischen der Phosphatgruppe und dem Trimethylammonium-Ende des Erucylphosphocholin erhält man das Erucylphosphohomocholin (Erufosin, ErPC₃) (Abbildung 5.7). Es hat den Vorteil gegenüber Erucylphosphocholin, dass es eine geringere Viskosität besitzt (Jendrossek, Hammersen et al. 2002), was günstiger für die intravenöse Applikation ist. Verschiedene Gehirntumorzelllinien zeigen beim in-vitro-Einsatz von Erufosin ein dem Erucylphosphocholin vergleichbares Ansprechen (Jendrossek, Hammersen et al. 2002). Im Vergleich mit anderen Alkylphosphocholinen sind Erucylphosphocholin und Erufosin am effizientesten in der antitumoralen Aktivität gegen Harnblasenkarzinomzellen (Konstantinov and Berger 1999). Erufosin wird aktuell in einer Phase I Studie als mögliches neues Antitumormittel untersucht (Dr. med. Lars Lindner, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, LMU München). Außerdem laufen tierexperimentelle Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Strahlentherapie und Erufosin (AG Prof. Belka / Prof. Jendrossek, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen). Auch in der hier vorgestellten Dissertation steht Erufosin im Mittelpunkt. Es werden in-vitro-Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Erufosin und Bestrahlung vorgestellt.

5.2.2 Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine

Alkylphosphocholine haben eine hohe Affinität zu Zellmembranen und lagern sich in diese ein. In Tumorzellen können sie Apoptose induzieren (Jendrossek, Muller et al. 2003), die Zellproliferation inhibieren (Grunicke, Maly et al. 1996), den Zellzyklus anhalten (Jendrossek, Erdlenbruch et al. 1999), Zelldifferenzierung induzieren (Jendrossek, Kugler et al. 2001), die Invasion von Tumorzellen verhindern (Schallier, Bruyneel et al. 1991) und die Angiogenese im Tumor blockieren (Houlihan, Lohmeyer et al. 1995). Die einzelnen Wirkungsmechanismen sind bislang nur bruchstückhaft bekannt. Primärer Angriffsort ist die Zellmembran (Eibl and Unger 1990). Alkylphosphocholine beeinflussen die Membranfluidität

(van Blitterswijk, Hilkmann et al. 1987), die Lipidzusammensetzung sowie den Lipidmetabolismus (Herrmann 1985) und können in hohen Konzentrationen die Membran schädigen (Berdel, Fromm et al. 1983). In der Zellmembran unterliegen Lipide einem ständigen Austausch und sind in zahlreiche Signalwege wie die Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Apoptoseinduktion mit eingebunden. Die Beeinflussung dieser Signalwege scheint ein entscheidender Angriffspunkt der Alkylphosphocholine in ihrer antitumoralen Aktivität zu sein. Sie inhibieren die Phospholipase C und deren Synthese (Powis, Seewald et al. 1992; Grunicke, Maly et al. 1996), modulieren die Phospholipase D (akut zeigt Miltefosin[®] eine Stimulation, bei chronischer Exposition eine Inhibition) (Lucas, Hernandez-Alcoceba et al. 2001), inhibieren die Proteinkinase C (Pauig and Daniel 1996; Goekjian and Jirousek 2001) und verringern den zellulären Phosphatidylcholingehalt durch Inhibition der Synthese und Stimulation des Abbaus (Berkovic, Grunwald et al. 1995; Boggs, Rock et al. 1995; Wieder, Haase et al. 1995). Resultat dieser Interaktionen könnte eine verminderte Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zelle oder Zytotoxizität sein. Außerdem werden verschiedene Moleküle in den Signalkaskaden der Zelle beeinflusst. Sowohl die wachstumsstimulierende MAPK/ERK-Kinase (Zhou, Lu et al. 1996) als auch die antiapoptotisch wirkende Proteinkinase-B (PI3K-Akt/PKB) (Kondapaka, Singh et al. 2003; Ruiter, Zerp et al. 2003) werden inhibiert.

Darüber hinaus wirken Alkylphosphocholine als Apoptoseinduktoren (Jendrossek, Erdlenbruch et al. 1999). Prinzipiell sind zwei Wege möglich, wie die Zelle in Apoptose übergehen kann (siehe auch 5.1.4). Erstens ist eine Rezeptorstimulation von außen her möglich (extrinsischer Weg), zweitens kann die Zelle Schäden (z.B. durch Strahlung oder Chemotherapeutika) in ihrem Inneren erkennen und den eigenen Tod einleiten (intrinsischer Weg) (Lawen 2003). Hierzu wurden bis jetzt folgende Forschungsergebnisse erzielt. Bei der Einleitung der Apoptose ist umstritten, ob der extrinsische Weg, d.h. die Apoptoserezeptoren (TNF- α -Rezeptor, CD95/Fas/Apo1-Rezeptor, Death Receptor (DR4 oder DR5)), eine Rolle im Zusammenhang mit Alkylphosphocholinen spielt. Bei Edelfosin findet man in Leukämiezellen eine Beteiligung von CD95 (Gajate and Mollinedo 2001; Matzke, Massing et al. 2001), für Erucylphosphocholin bei Glioblastomzelllinien kann dies nicht festgestellt werden (Jendrossek, Kugler et al. 2001; Kugler, Erdlenbruch et al. 2002). Darüber hinaus ist P53 für die Apoptoseinduktion durch Alkylphosphocholine nicht essentiell (Jendrossek, Kugler et al. 2001). Alle gefundenen Komponenten gehören zum intrinsischen Apoptoseweg, bei dem die Mitochondrien im Mittelpunkt stehen. Es zeigen sich eine Aktivierung der apoptotisch wirkenden SAPK/JNK-Kinase (Ruiter, Zerp et al. 1999), ein Anstieg des

zellulären Ceramidgehaltes (Wieder, Orfanos et al. 1998), ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials mit Freisetzung von Cytochrom C und eine daraus resultierende Aktivierung der Procaspase-9. Diese leitet den Ablauf der Caspasenkaskade ein. Eine entscheidende Rolle beim Apoptoseprozess spielt auch Bcl-2. Dies ist ein antiapoptotisch wirksames Molekül aus der Bcl-2-Familie. Während des durch Alkylphosphocholine eingeleiteten Apoptosevorganges sinkt der Spiegel in der Zelle. Verwendet man Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, so ist die Apoptose deutlich vermindert (Jendrossek and Handrick 2003; Jendrossek, Muller et al. 2003).

Weitere experimentell gefundene Effekte durch Alkylphosphocholine sind eine Makrophagenaktivierung (Andreesen, Osterholz et al. 1984) und die bereits oben angeführte Stimulation von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Vehmeier, Eibl et al. 1992; Vehmeier, Liersch et al. 1992; Berkovic, Bensch et al. 2001).

Außerdem ist Erucylphosphocholin in Tierexperimenten wie auch andere Alkylphosphocholine in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es erreicht eine hohe Konzentration in Gehirntumoren und bewirkt eine signifikante Tumorregression (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Viele andere Chemotherapeutika sind dazu nicht in der Lage. Damit kommen die Alkylphosphocholine als mögliche Therapieoption für intrazerebrale Tumoren, insbesondere das Glioblastom, in Frage. Dabei handelt es sich um den häufigsten malignen Gehirntumor, der bis jetzt bei Ausschöpfung aller Therapieoptionen (OP, Bestrahlung, Chemotherapie mit Temozolomid) mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 14 Monaten immer noch eine sehr schlechte Prognose hat (Weller 2005).

5.2.3 Alkylphosphocholine und Chemotherapie

Untersuchungen zeigen, dass Alkylphosphocholine so gut wie keine Kreuzresistenz mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika haben (Himmelmann, Danhauser-Riedl et al. 1990). Bei diesen wird Apoptose zwar auch über den intrinsischen Weg vermittelt, aber überwiegend durch Aktivierung von P53 und dem proapoptotisch wirksamen Bax-Molekül aus der Bcl-2-Familie (Hannun 1997). Es gibt eine Reihe von Experimenten zur Kombinationswirkung. Edelfosin hat einen additiven Effekt mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika in einer Ovarialkarzinomzelllinie (Noseda, Berens et al. 1988). Bei K-262-Zellen (Leukämiezellen) steigert Miltefosin[®] die Toxizität von Gemcitabin und gleichzeitig nimmt dessen Toxizität auf das Knochenmark ab. Erufosin ist dem Miltefosin[®] in der gleichen Versuchsreihe sogar noch überlegen (Georgieva, Konstantinov et al. 2002). In-vitro-Experimente mit Cisplatin hingegen

zeigen keine Toxizitätssteigerung (Timmer-Bosscha, de Vries et al. 1998). Bei Tierexperimenten steigert Miltefosin[®] die antitumorale Aktivität von Cyclophosphamid bei benzenpyreninduzierten Sarkomen (Stekar, Hilgard et al. 1995).

5.2.4 Alkylphosphocholine und Strahlentherapie

Es gibt eine ganze Reihe experimenteller Untersuchungen, bei denen Alkylphosphocholine in Kombination mit Bestrahlung eingesetzt wurden. An dieser Stelle sei auf die Diskussion verwiesen, in der eine ausführliche Darstellung zu finden ist (Kapitel 9.2.1).

6 Zielsetzung

In dieser Arbeit werden erstmals systematisch in-vitro-Versuche zur Kombinationswirkung des neuartigen Alkylphosphocholins Erufosin (Erucylphosphohomocholin, ErPC₃) mit Bestrahlung bei humanen Tumorzelllinien vorgestellt. Alkylphospholipid-Analoga zeigen Kombinationseffekte im Zusammenhang mit Strahlentherapie, die sich für die Antitumorthherapie nutzen lassen (Vink, van Blitterswijk et al. 2007). Erufosin wird aktuell in einer Phase I Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren oder Hämoblastosen als neues Antitumormittel geprüft (Dr. med. Lars Lindner, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, LMU München).

Ziel dieser Arbeit ist anhand von in-vitro-Experimenten die Überprüfung der Hypothese, dass sich Erufosin sinnvoll mit Strahlentherapie einsetzen lässt. Zusätzlich sollen für diese Therapie besonders sensible Tumorentitäten identifiziert werden und damit eine Rationale für die geplanten klinischen Phase II Studien geliefert werden.

In einem breit angelegten Screening mit 14 verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde untersucht, wie sich Erufosin zusammen mit Bestrahlung auf das Gesamtüberleben auswirkt und wie sensibel die einzelnen Tumorentitäten reagieren. Repräsentative Zelllinien wurden mit Blick auf die frühe Apoptose- / Nekroseinduktion nach der Kombinationsbehandlung untersucht, um Hinweise auf die Mechanismen der toxischen Wirkung zu erhalten.

7 Material und Methoden

7.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

7.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Material

Isopropanol 70%	Apotheke Klinikum Innenstadt, München
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
PBS-Puffer	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Mc Coy's 5A Medium	Biochrom AG, Berlin
DMEM Medium	Biochrom AG, Berlin
DMEM/HAM's F12 Medium	Biochrom AG, Berlin
Natrium-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin
Nichtessentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom AG, Berlin
Rinderinsulin	Biochrom AG, Berlin

Sämtliche Kunststoffartikel für die Zellkultur (Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen, 24- und 96-well-Platten, etc.) wurden entweder von der NUNC GmbH, Wiesbaden, Becton Dickinson GmbH (Falcon), Heidelberg, oder der Firma Eppendorf, Hamburg, bezogen.

Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Laminar-Flow-Werkbank	Glaire BSB 4, ICN Flow, Eggstein
Bunsenbrenner	Technomara AG, Zürich
Standardlichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Inverslichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar

Zelllinien

RD-ES	Humanes Ewing-Sarkom (Kultivierung in RPMI 1640, 15% FCS, 1% Pen/Strep; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, Braunschweig)
SK-LMS-1	Humanes Leiomyosarkom, (Kultivierung in MEM, 10% FCS, 1% NEA, 1% Pen/Strep, 1% Na-Pyr; American Type Culture Collection ATCC, USA)
A-549	Humanes Bronchialkarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
NCI-H460	Humanes Bronchialkarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
MCF-7	Humanes Mammakarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1%, Na-Pyr, 1% NEA, 10µg/ml Rinderinsulin; DSMZ, Braunschweig)
MDA-MB-453	Humanes Mammakarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; DSMZ, Braunschweig)
PC-3	Humanes Prostatakarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
DU-145	Humanes Prostatakarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
U-373MG	Humanes Glioblastom (Kultivierung in DMEM/HAM's F12, 20% FCS, 1% Pen/Strep; DKFZ, Tumorzell-datenbank, Heidelberg)
T98G	Humanes Glioblastom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
HCT-15	Humanes Kolonkarzinom (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
HT-29	Humanes Kolonkarzinom (Kultivierung in McCoy's 5A, 10% FCS, 1% Pen/Strep; DSMZ, Braunschweig)
FADU	Humanes Hypopharynxkarzinom (Kultivierung in MEM, 10% FCS, 1% Na-Pyr 1% NEA, 1% Pen/Strep; ATCC, USA)
KB	Humanes Cervixkarzinom (Kultivierung in DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep; DSMZ, Braunschweig)

Die Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen (enthielten 8ml Kulturmedium) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS-Pufferlösung gewaschen, danach für 4 Minuten mit 2ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert, dann die abgelösten Zellen in ein 15ml-Röhrchen gegeben und bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in frischem, auf 37°C erwärmtem Kulturmedium resuspendiert, so dass sich eine Verdünnung der Zellen von 1:3 bis 1:10 ergab (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie).

7.1.2 Zellzahlbestimmung

Material

Hämocytometer (Neubauer Zählkammer)

Schütt Labortechnik, Göttingen

Mit Hilfe der Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen in den Suspensionen für die Versuche bestimmt. Man zählte die Zellen, die sich in 0,1mm³ = 0,1µl befanden und rechnete in Zellen/ml um. Aus diesem Wert konnten dann weitere Berechnungen für den Versuch erfolgen. Einige Zelllinien neigten zur Verklumpung. In diesen Fällen wurden die Zellen mit dem Vortex-Mischer resuspendiert und gegebenenfalls noch durch eine gewöhnliche 10ml Spritze mit Nadel (z.B. 0,9 x 40mm) passagiert.

7.1.3 Mykoplasmentest

Zelllinie

VERO-B4

Affenfibroblasten (Kultivierung in RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep; DSMZ, Braunschweig)

Material

Bisbenzimid Hoechst 33258

Sigma, Deisenhofen

Objektträger steril mit 8 wells

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Methanol

Sigma, Deisenhofen

Im Gegensatz zu einer Bakterien- oder Pilzinfektion ist eine Mykoplasmeninfektion nicht offensichtlich im Lichtmikroskop zu erkennen. Trotzdem kann sie den Zellmetabolismus und das Zellwachstum erheblich beeinflussen (McGarrity, Vanaman et al. 1984; Wasserman 1993). Um eine Infektion auszuschließen wurde mit allen Zelllinien vor den eigentlichen Versuchen ein Mykoplasmentest durchgeführt. Dazu wurden in einem Objektträger mit 8 Wells Affenfibroblasten ausgesät. Nachdem diese am nächsten Tag angewachsen waren, wurde in je ein Well Kulturmediumüberstand der zu kontrollierenden Zelllinie zugegeben, außerdem je eine Positiv- und Negativkontrolle. Am dritten Tag wurden die Zellen gewaschen, mit Methanol fixiert und mit Bisbenzimid (H 33258), einem DNA-Farbstoff, angefärbt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Dort zeigen sich bei einer Mykoplasmeninfektion gelblich-grün gefärbte Punkte am Rande des Zytoplasmas (Nicklas and Mauter 1988).

7.1.4 Kryokonservierung

Material

Kryoröhrchen	NUNC GmbH, Wiesbaden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth GmbH, Karlsruhe
Einfriermedium	FCS mit 10% DMSO

Geräte

Tiefkühlschrank -80°C	Hera freeze, Heraeus, Hanau
Stickstofftank	GT40, Air Liquide GmbH, Düsseldorf
Nalgene Cryo 1C Freezing Container	NUNC GmbH, Wiesbaden

7.1.4.1 Einfrieren

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, gezählt und danach bei 1500U/min abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit Einfriermedium resuspendiert, so dass sich eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml ergab. Die Suspension wurde auf die Kryoröhrchen (je 1,5ml) verteilt und im Freezing Container in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Der Freezing Container war mit Isopropanol gefüllt. Dies hatte den Effekt, dass die Zellen langsam (etwa 1°C/min) auf minus

80°C abgekühlt wurden. Das membrangängige DMSO bewirkte, dass sich keine Einfrierkristalle innerhalb und außerhalb der Zelle bildeten, die die Zelle mechanisch schädigen würden. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt. Dort können sie unbegrenzt gelagert werden (Lindl 2000).

7.1.4.2 Auftauen

Das Kryoröhrchen mit der gewünschten Zelllinie wurde dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad rasch auf 37°C erwärmt und der Inhalt in ein Reagenzröhrchen mit frischem Nährmedium pipettiert. Nach 2 Minuten Zentrifugieren mit 1500U/min wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 8ml Medium resuspendiert, und in eine 25cm² Kulturflasche gegeben. Diese wurde für mindestens 12h ruhen gelassen, um ein optimales Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Beim gesamten Auftauvorgang sollte sehr zügig vorgegangen werden, da DMSO außerhalb des Einfrierprozesses toxisch auf die Zellen wirkt (Lindl 2000).

7.2 Erufosin

Bei Erufosin (ErPC₃, Erucylphosphohomocholin) handelt es sich um den Phosphorsäurehomocholinester von Erucylalkohol. Für die Synthese von Erufosin wird Erucasäure benötigt. Diese wird aus Rapsöl gewonnen, zum Erucylalkohol reduziert und in weiteren Schritten (Phosphorylierung, Umsetzung mit Propanolamin, Permethylierung) zu Erufosin umgewandelt (Reinheit >99%; bestimmt durch HPLC und HPTLC; MG 503,74). Die Synthese wurde von Prof. Dr. H. Eibl, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, durchgeführt. Erufosin wurde anschließend als weißes Pulver in 2% Ethanol und Aqua dest. in 20mM-Konzentration bei Raumtemperatur gelöst und sterilfiltriert. Es entstand eine klare Lösung, die aufgrund der großen Stabilität von Erufosin hitzesterilisiert werden konnte.

7.3 WST1-Zellproliferationsassay

Material

WST1 Cell Proliferation Reagent	Roche Dianostics GmbH, Mannheim
96-well-Platten	Falcon, Becton Dicinson GmbH, Heidelberg

Geräte

ELISA-Reader MRX	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Gammacell 40, Low dose Rate Laboratory Irradiator (Cäsium 137-Quelle, weiche γ -Strahlung)	Atomic Energy of Canada Ltd., Industrial Products, Ottawa, Canada

7.3.1 WST1-Zellproliferationsassay

Um die Kombinationswirkung einer Substanz zusammen mit Bestrahlung auf Zellen zu untersuchen gilt als Goldstandard der Koloniebildungstest. Mit diesem Test lässt sich sehr sensitiv zeigen, ob durch die Behandlung die Proliferationsfähigkeit der Zellen irreversibel geschädigt wurde. Dabei wird in einer geeigneten Kulturplatte (z.B. 4-well-Platte) eine geringe Anzahl von Zellen ausgesät. Diese Zellen werden mit der zu testenden Substanz und Bestrahlung behandelt. Anschließend werden die Zellen über 10-14 Tage inkubiert, so dass theoretisch jede Zelle bei ihrer Teilungsrate in der Lage wäre eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden. Durch Vergleich der entstandenen Kolonien zwischen Kontrolle und behandelten Zellen kann festgestellt werden, ob die Substanz in Kombination mit Bestrahlung keinen, einen subadditiven, additiven oder synergistischen Effekt auf die Abtötung der Zellen hat. Nachteile dieser Methode sind ein hoher Zeit- und Materialaufwand, wenn man in einem breit angelegten Screening eine neue Substanz mit mehreren Zelllinien testen möchte (Steel 2002).

Mit weniger Aufwand ist die Beurteilung von Strahlentherapieeffekten mit dem hier durchgeführten WST1-Zellproliferationsassay möglich. WST1 ist ein Tetrazoliumsals, das von der Zelle mit Hilfe vom NADH und NADPH reduziert wird. Dabei entsteht ein

wasserlösliches Formazansalz, welches photometrisch mit dem ELISA-Reader gemessen werden kann (Mosmann 1983; Berridge 1996). Die optische Dichte ist dabei direkt proportional zu den überlebenden Zellen je well. Somit kann man Rückschlüsse auf Kombinationseffekte ziehen. Dieses Verfahren kommt umso näher an den Goldstandard Kolonietest heran, je öfter sich die Zellen teilen können (Carmichael, DeGraff et al. 1987; Wasserman and Twentyman 1988). Limitierender Faktor hierbei ist die sehr geringe Nährstoffverfügbarkeit in einem well einer 96-well-Platte.

Zunächst wurden die Zellen gewaschen, abtrypsiniert, abzentrifugiert, resuspendiert, gezählt und dann in einer 96-well Platte in 100µl Kulturmedium ausgesät. Hierbei war darauf zu achten, dass die Zellzahl je well so gewählt wurde, dass die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum exponentiell wachsen konnten. Dies wurde in einem Vorversuch ermittelt (siehe 7.3.2). Nachdem die Zellen über Nacht inkubiert worden waren, wurden am Morgen des darauf folgenden Tages Erufosinverdünnungen mit Kulturmedium hergestellt (1 bis 75 µM) und zugegeben (eine Spalte, d.h. 6 Werte pro Konzentration). Nach 3-5 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Bestrahlung durchgeführt (weiche γ -Strahlung; Dosen: 0, 1, 2, 3, 4, 6 Gy; je Dosis eine Platte). Nach 5-8 Tagen (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelle, optimale Bedingungen im Vorversuch ermittelt, siehe 7.3.2) erfolgte die Zugabe von 10µl WST1-Reagenz je well und nach 4h Inkubation die Auswertung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 630nm).

7.3.2 Vorversuch – exponentielles Wachstum

Für die korrekte Interpretation des WST1-Proliferationsassays ist es eine Voraussetzung, dass die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum exponentiell wachsen können. Das Ergebnis wird verfälscht sobald das Wachstum durch Nährstoffmangel oder Zellkonfluenz gemindert ist (Slavotinek, McMillan et al. 1994). Dazu wurden die Zellen in einer 96-well Platte in aufsteigender Konzentration mit 200µl Kulturmedium pipettiert (6 Werte je Zellkonzentration; verwendete Zellkonzentrationen: 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 Zellen/well). Die Platte wurde im Brutschrank inkubiert und täglich inspiziert. Sobald das Medium in den beiden höchsten Konzentrationen gelb verfärbt oder die Zellen konfluent waren, erfolgte die Auswertung (analog 7.3.1).

7.4 Apoptose-Messungen

Material

Propidiumiodid (PI)	Sigma, Deisenhofen
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma, Deisenhofen
24-well-Platten	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Geräte

Fluoreszenzinversmikroskop mit Kamera	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 mit Axiovision Kamera, Zeiss, Jena
Zählgerät für Differentialblutbild	Brand GmbH, Wertheim
Gammacell 40, Low dose Rate Laboratory Irradiator (Cäsium 137-Quelle, weiche γ -Strahlung)	Atomic Energy of Canada Ltd., Industrial Products, Ottawa, Canada

Bei diesem Experiment war das Ziel herauszufinden welche Form des Zelltods in der frühen Phase nach Kombinationsbehandlung mit Erufosin und Bestrahlung auftritt (Apoptose oder Nekrose) und ob sich hier zusätzlich Effekte durch Zugabe von Erufosin zeigen. Dazu wurden die Zellen behandelt und anschließend mit Propidiumiodid (PI) und Bisbenzimid (Hoechst33342) gefärbt (beides DNA-Farbstoffe) (Forrester, Vidair et al. 1999). PI kann nur in Zellen eindringen, die tot sind und deren Zellmembran geschädigt ist. Es ergibt sich dann durch DNA-Interkalation eine rote Farbe. H33342 gelangt auch in lebendige Zellen mit intakter Zellmembran und färbt die DNA blau an. Eine intakte Zelle zeigt also einen homogen blauen Kern. Geht eine Zelle in Apoptose, so kann man in der frühen Phase einen Kern, der aus vielen blauen, kleinen Vesikeln besteht erkennen (Fragmentierung des Kerns und Kondensation des Chromatins). Schreitet die Apoptose weiter fort, wird die Zellmembran durchlässig und PI kann eindringen und die DNA anfärben, d.h. es finden sich blaue und rote Vesikel. Ganz am Ende des Apoptosevorganges finden sich nur noch rote Vesikel. Wird eine Zelle hingegen nekrotisch, so kann PI sofort eindringen und der Zellkern erscheint homogen rot (keine Fragmentierung, keine Kondensation, Zellen größer).

Am ersten Tag wurden die Zellen in 24-well-Platten ausgesät (10.000 bis 20.000Z in 0,5ml Medium, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit). Am Tag zwei wurden morgens

Erufosinverdünnungen mit Kulturmedium hergestellt und zugegeben. Nach 3-5h erfolgte die Bestrahlung (weiche γ -Strahlung; Dosen: 0, 5, 10 Gy; je Dosis eine Platte). Am Tag 4 erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurden die Zellen mit PI (Stocklösung: 5mg/ml) und H33342 (Stocklösung: 1,5mM) gefärbt. Die Farbstoffe wurden so pipettiert, dass H33342 1:1000 im well und PI 1:2000 im well verdünnt vorlagen. Nach 10 min Inkubation konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. PI hat eine Anregungs- (Exzitations-) wellenlänge (Ex) = 530nm und eine Emissionswellenlänge (Em) = 620nm, H33342 eine Ex = 360nm und eine Em = 460nm (Vollenweider and Groscurth 1992). Mit dem DAPI-Filter (Ex = 365nm, Em = 420nm) konnten sowohl die mit PI als auch die mit H33342 gefärbten Zellen identifiziert werden. Mit dem Texas-Red-Filter (Ex = 530-585nm, Em = 615nm) konnten selektiv die mit PI angefärbten Zellen dargestellt werden. Die lebendigen / apoptotischen / nekrotischen Zellen wurden bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Zur Dokumentation wurden zusätzlich von den Zellen Fotos gemacht.

7.5 Auswertung/Statistik

7.5.1 WST-Zellproliferationsassay

In jedem einzelnen Experiment wurde für eine Bedingung jeweils eine Spalte (sechs wells) verwendet und daraus ein Mittelwert gebildet. Alle Versuche wurden insgesamt dreimal voneinander unabhängig durchgeführt. Aus den Mittelwerten dieser drei Experimente wurden dann die LD50 für Bestrahlung und die LD50 für Erufosin mit Hilfe des Rechenprogramms Origin berechnet und eine zusammenfassende Übersichtsgraphik erstellt.

Um Aussagen über den Kombinationseffekt zu treffen wurde eine isobographische Analyse eingesetzt (Berenbaum 1978; Steel and Peckham 1979; Berenbaum 1989).

7.5.2 Apoptose-Messung

Hier wurden 2 wells je Bedingung angesetzt und in jedem well 2 Gesichtsfelder ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet (ein Gesichtsfeld heißt, dass 100 Zellen mit einem Zählgerät für ein Differentialblutbild ausgezählt wurden, bei denen man den Anteil der lebendigen / apoptotischen / nekrotischen Zellen in Prozent angibt). Jeder Versuch wurde

dreimal voneinander unabhängig durchgeführt und dann eine zusammenfassende graphische Auswertung erstellt.

Eine sinnvolle isobolographische Analyse zu den Kombinationseffekten ist bei den Apoptosemessungen aufgrund einer kleineren Anzahl von Messwerten leider nicht möglich. Zur ungefähren Abschätzung eines synergistischen, additiven oder subadditiven Effekts können allerdings die Effekte der Einzelbehandlungen addiert und mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen werden. Ist dieser Wert identisch, deutet dies auf einen additiven Effekt hin, ist er höher auf einen synergistischen und ist er kleiner auf einen subadditiven.

8 Ergebnisse

8.1 WST1-Zellproliferationassay

Für die klinische Entwicklung von Erufosin in der Tumorthherapie ist aufgrund des günstigen Nebenwirkungsprofils (fehlende Myelosuppression) eine mögliche Kombination mit Strahlentherapie von besonderer Bedeutung. Erhöht sich durch Erufosin die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Bestrahlung, addieren sich die beiden Therapiemodalitäten oder inhibiert Erufosin sogar den Strahleneffekt auf Tumorzellen? Um darüber eine Aussage treffen zu können, wurden 14 humane Zelllinien von Tumorentitäten, die für eine Strahlentherapie potentiell in Frage kommen, mit dem WST1-Zellproliferationsassay untersucht. Dabei wuchsen die Zellen in einer 96-well-Platte, wurden nach kurzer Präinkubation mit Erufosin und Bestrahlung behandelt und die Vitalität der Zellen nach 5-8d mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes WST1 gemessen. Dieses wurde von den nach Bestrahlung noch lebenden Zellen zu einem photometrisch messbaren Metaboliten umgesetzt.

8.1.1 Vorversuch - Bestimmung der optimalen Zellzahl je well

Wichtige Voraussetzung für die oben angeführten Bestrahlungsexperimente in einer 96-well-Platte war, dass sich die Zellen nach der Behandlung möglichst oft teilen konnten, denn Strahlenschäden können sich entweder sofort manifestieren (Interphasetod oder Nekrose) oder aber erst nach mehreren Zellteilungen zum Zelltod führen (reproduktiver Zelltod). Demnach wurden Bedingungen gesucht, die eine möglichst lange Inkubationszeit der Zellen in der 96-well-Platte ermöglichten. Um das Ergebnis nicht zu verfälschen, war hierbei entscheidend, dass die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum exponentiell wachsen konnten und nur durch die Behandlung abstarben und nicht durch Nährstoffmangel oder Kontaktinhibition im well. Um die optimalen Bedingungen herauszufinden wurde zu jeder Zelllinie wie in Punkt 7.3.2 beschrieben ein Vorversuch durchgeführt. In Abbildung 8.1 ist beispielhaft das Ergebnis für die Cervixkarzinomzelllinie KB dargestellt. Bis 750 Zellen/well zeigte sich bei Auftragung der optischen Dichte gegen die ausgesäte Zellzahl annähernd eine Gerade, d.h. die Zellen hatten in diesem Konzentrationsbereich über den gesamten Inkubationszeitraum genug Nährstoffe, um exponentiell wachsen zu können. Bei höheren Zellzahlen war dies nicht mehr

Ergebnisse

der Fall, was an der abfallenden Kurve zu erkennen ist. Bei Betrachtung der Platte mit bloßem Auge konnte in den wells mit mehr als 750 ausgesäten Zellen zusätzlich eine Gelbfärbung des Mediums beobachtet werden.

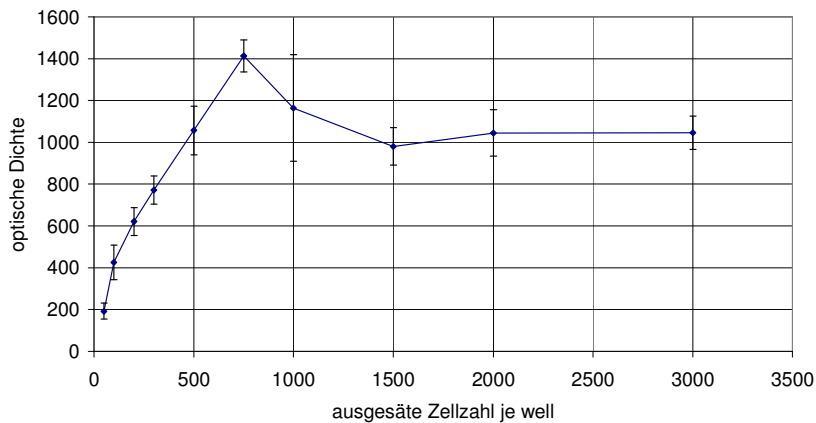


Abbildung 8.1 KB-Zellen: Wachstum in 96-well-Platte, Inkubationsdauer 5d; bis 750Z/well exponentielles Wachstum

Mit Hilfe dieser Auswertung konnten die Rahmenbedingungen für die Bestrahlungsexperimente festgelegt werden. Im vorliegenden Fall wurde für die KB-Zellen bei 200 Zellen / well 5 Tage als Inkubationszeit gewählt. Für diese Zellzahl war nach 5d sowohl ein beschleunigtes als auch vermindertes Zellwachstum mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Für Zellzahlen <100/well wurde die Schwankungsbreite der Einzelwerte zu hoch (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde durch den Vorversuch nochmals für jede Zelllinie gezeigt, dass ein linearer Zusammenhang (direkte Proportionalität) zwischen Zellzahl und optischer Dichte im Bereich der verwendeten Zellkonzentrationen bestand.

Für die anderen Zelllinien ergaben sich in analogen Experimenten folgende Rahmenbedingungen:

Zelllinie	Tumorart	Zellzahl / well	Inkubationsdauer [Tage]
A-549	Bronchial-Ca	200	5
DU-145	Prostata-Ca	200	7
FADU	Pharynx-Ca	500	7
HCT-15	Colon-Ca	200	7
HT-29	Colon-Ca	500	8

KB	Cervix-Ca	200	5
MCF-7	Mamma-Ca	500	8
MDA-MB-453	Mamma-Ca	500	7
NCI-H460	Bronchial-Ca	200	5
PC-3	Prostata-Ca	200	7
RD-ES	Ewingsarkom	750	8
SK-LMS-1	Leiomyosarkom	200	6
T98G	Glioblastom	300	7
U-373MG	Glioblastom	200	7

Tabelle 8.1 Rahmenbedingungen für die Bestrahlungsexperimente in einer 96-well-Platte. Von der angegebenen Inkubationsdauer entfiel je 1 Tag auf das Anwachsen der Zellen, dann erfolgte die Behandlung und schließlich die restliche Inkubationszeit bis zur Auswertung.

8.1.2 WST1-Bestrahlungsexperimente

Bei allen Zelllinien wurde der Kombinationseffekt von Bestrahlung und Erufosin untersucht (zum genauen Versuchsablauf siehe 7.3.1). Aus drei Einzelerperimenten einer Zelllinie à 6 wells wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet und in einer Graphik zusammengefasst (Abbildung 8.3 bis Abbildung 8.16).

Die Zellen wurden entsprechend ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit Bestrahlung plus Erufosin in vier Gruppen eingeteilt und die Ergebnisse für jede Gruppe dargestellt. Die Einteilung erfolgte willkürlich innerhalb der jeweiligen Dosisintervalle.

- a) Gruppe 1: strahlenunempfindlich ($LD_{50} > 4Gy$) / ErPC₃-unempfindlich ($LD_{50} > 15\mu M$)
- b) Gruppe 2: strahlenunempfindlich ($LD_{50} > 4Gy$) / ErPC₃-empfindlich ($LD_{50} < 15\mu M$)
- c) Gruppe 3: strahlenempfindlich ($LD_{50} < 4Gy$) / ErPC₃-unempfindlich ($LD_{50} > 15\mu M$)
- d) Gruppe 4: strahlenempfindlich ($LD_{50} < 4Gy$) / ErPC₃-empfindlich ($LD_{50} < 15\mu M$)

Die LD₅₀-Werte für Bestrahlung und Erufosin wurden mit Hilfe des Rechenprogramms Origin ermittelt. Die Werte für die jeweilige Einzelbehandlung wurden mit dem passenden mathematischen Modell gefittet (Erufosin: sigmoidaler Fit nach Boltzmann, Bestrahlung: Exponentialfunktion 1.Grades) und mit Hilfe der Kurvengleichung der LD₅₀-Wert berechnet (Tabelle 8.2, Tabelle 8.4, Tabelle 8.6, Tabelle 8.8).

Aus der bloßen Betrachtung des Kurvenverlaufs in den Abbildung 8.3 bis Abbildung 8.16 ließen sich Rückschlüsse auf die Kombinationswirkung ziehen. Divergierten die Kurven, sprach dies für einen Synergismus von Bestrahlung und Erufosin. Bei parallelem Verlauf konnte von einem additiven Effekt ausgegangen werden, während eine Konvergenz der Kurven auf einen subadditiven Effekt hinwies. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle in den Versuchen getesteten Erufosinkonzentrationen in den Diagrammen dargestellt. Im Bereich einer niedrigen Strahlendosis (1Gy, 2Gy) fand sich bei allen Zelllinien eine annähernde Parallelverschiebung der Kurven, was auf einen additiven Effekt hindeutete. Im höheren Strahlendosisbereich konvergierten die Kurven immer mehr auf einen Endpunkt hin („alles tot“). Durch den konvergenten Verlauf war in diesem Bereich ein subadditiver Effekt anzunehmen. Um Aussagen über die Kombinationswirkung zu objektivieren, wurde mit jedem Datenpunkt eine isobolographische Analyse durchgeführt. Ein Beispiel für das Ergebnis einer solchen Analyse ist in Abbildung 8.2 aufgeführt:

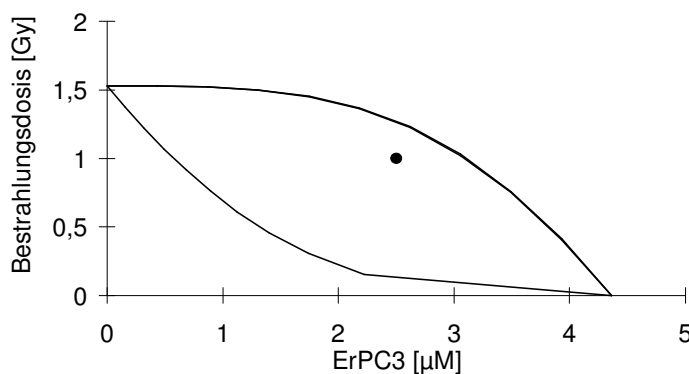


Abbildung 8.2 SK-LMS-1-Zellen, additiver Kombinationseffekt bei 1Gy Bestrahlung und 2,5µM ErPC₃, 200Z/well, 6d Inkubation in 96-well-Platte

Befand sich der zu untersuchende Datenpunkt oberhalb des envelope, so lag ein subadditiver Effekt vor, lag er innerhalb ein additiver und bei Lage unterhalb war es ein synergistischer Effekt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 8.3, Tabelle 8.5, Tabelle 8.7 und Tabelle 8.9.

8.1.2.1 Gruppe 1: strahlenunempfindlich / erufosinunempfindlich

In diese Gruppe fielen die folgenden drei Zelllinien: A-549 (Bronchial-Ca, Abbildung 8.3), MCF-7 (Mamma-Ca, Abbildung 8.4), MDA-MB-453 (Mamma-Ca, Abbildung 8.5). Alle drei Zelllinien zeigten sich sowohl gegenüber Bestrahlung als auch gegenüber Erufosin als die drei Unempfindlichsten der Versuchsreihe (Tabelle 8.2). Die isobolographische Analyse für die einzelnen Datenpunkte ergibt für die A-549-Zellen im niedrigen Erufosindosisbereich

synergistische (1Gy, 1 μ M), im mittleren Dosisbereich additive und bei hohen Dosen subadditive Effekte. Die MCF7-Zellen zeigten bei niedrigen Erufosinkonzentrationen additive Effekte, ansonsten subadditive. Bei den MDA-MB-453-Zellen ergab sich ein durchweg subadditiver Effekt (Tabelle 8.3). Die MDA-MB-453-Zellen hatten eine weitere interessante Eigenschaft. Bevor die Erufosinkonzentration den toxischen Bereich erreichte ($\geq 15\mu$ M), stimulierte Erufosin das Zellwachstum. Einen zusätzlichen stimulierenden Effekt hatte die niedrigste Strahlendosis (1Gy) (Abbildung 8.5).

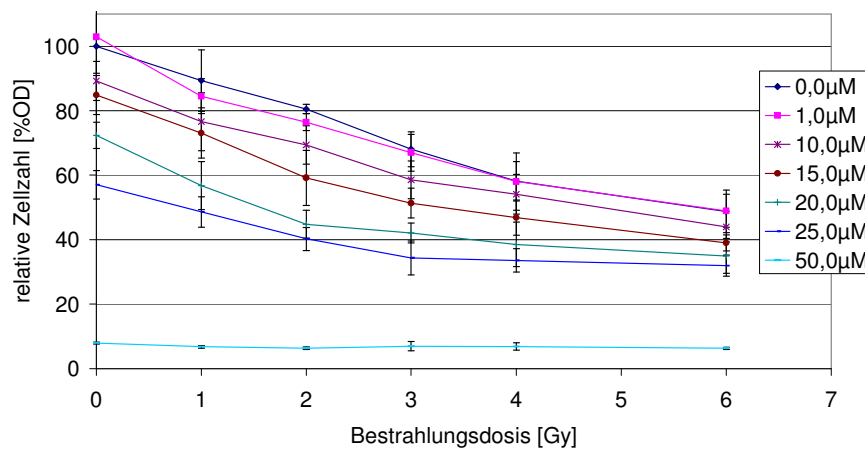


Abbildung 8.3 A-549:
relative Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 200Z/well, 5d
Inkubation in 96-well-
Platte

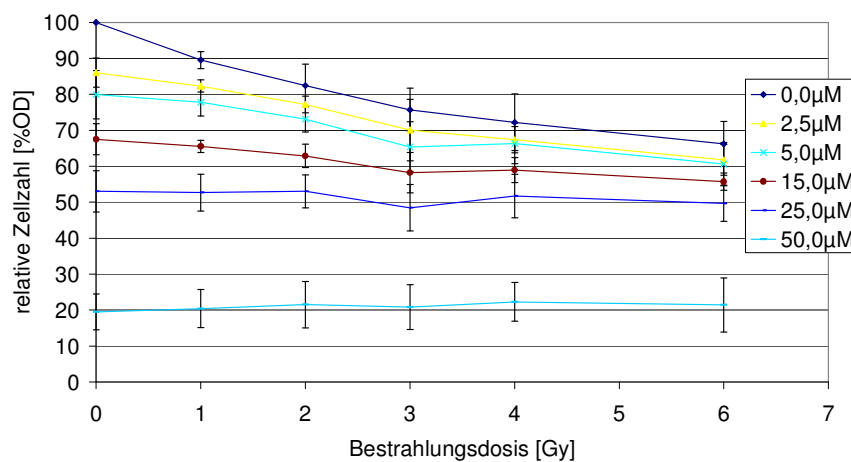


Abbildung 8.4
MCF-7: relative
Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 500Z/well, 8d
Inkubation in 96-well-
Platte

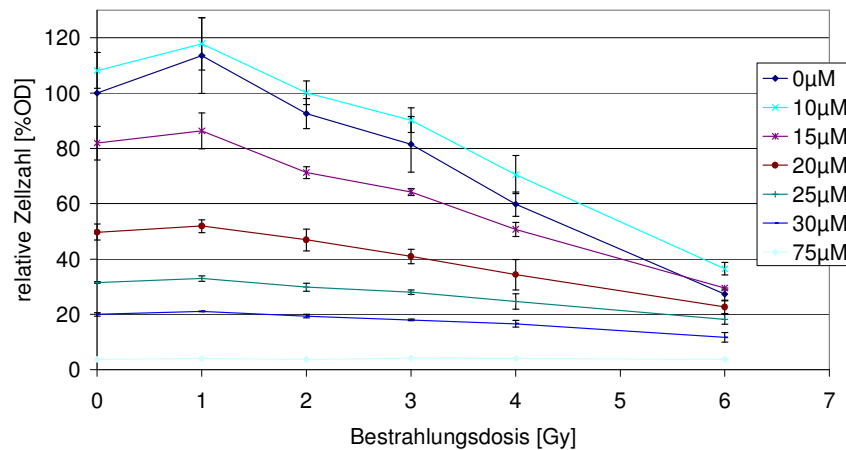


Abbildung 8.5 MDA-MB-453: relative Zellzahl bei Behandlung mit ErPC₃, 500Z/well, 7d Inkubation in 96-well-Platte

Gruppe 1: strahlenunempfindlich (LD50 > 4Gy) / ErPC₃-unempfindlich (LD50>15µM)			
Zelllinie	Tumorart	LD50 ErPC₃ [µM]	LD50 Bestrahlung [Gy]
A-549	Bronchial-Ca	27,60	5,59
MCF-7	Mamma-Ca	25,17	>6Gy
MDA-MB-453	Mamma-Ca	15,88	4,80

Tabelle 8.2 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC₃ für A549, MCF-7, MDA-MB-453

Zelllinie	Bestrahlungsdosis [Gy]	Kombinationseffekt mit ErPC₃ [µM]		
		synergistisch	additiv	subadditiv
A-549	1	1	2,5-20	≥25
	2	1	2,5-20	≥25
	3	1	2,5-20	≥25
	4	1	2,5-15	≥20
	6	-	-	≥1
MCF-7	1-4	-	1-5	≥10
	6	-	1-2,5	≥5
MDA-MB-453	1-6	-	-	≥1

Tabelle 8.3 Ergebnisse der isobographischen Analyse für A549, MCF-7, MDA-MB-453

8.1.2.2 Gruppe 2: strahlenunempfindlich / erufosinempfindlich

In dieser Gruppe fanden sich folgende Zelllinien: SK-LMS-1 (Leiomyosarkom, Abbildung 8.6), NCI-H460 (Bronchial-Ca, Abbildung 8.7), DU-145 (Prostata-Ca, Abbildung 8.8), T98G (Glioblastom, Abbildung 8.9) und U-373MG (Glioblastom, Abbildung 8.10). Diese Zellen waren relativ unempfindlich gegenüber Strahlung, aber sehr erufosinsensibel (Tabelle 8.4). Die SK-LMS-1-, NCI-H460- und DU-145-Zellen zeigten in der Kombination mit Bestrahlung im niedrigen Erufosindosisbereich einen additiven Effekt, im höheren Bereich einen subadditiven. Bei den T98G- und U-373MG-Zellen ergab sich ein durchwegs subadditiver Effekt (Tabelle 8.5).

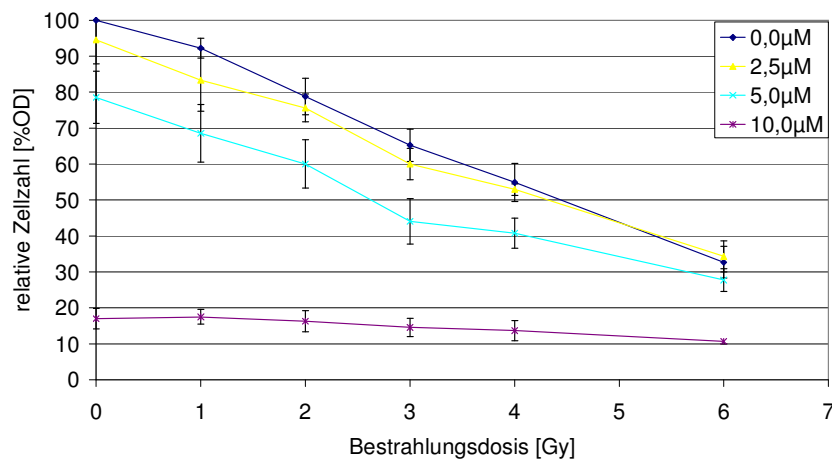


Abbildung 8.6
SK-LMS-1: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃, 200Z/well, 6d Inkubation in 96-well-Platte

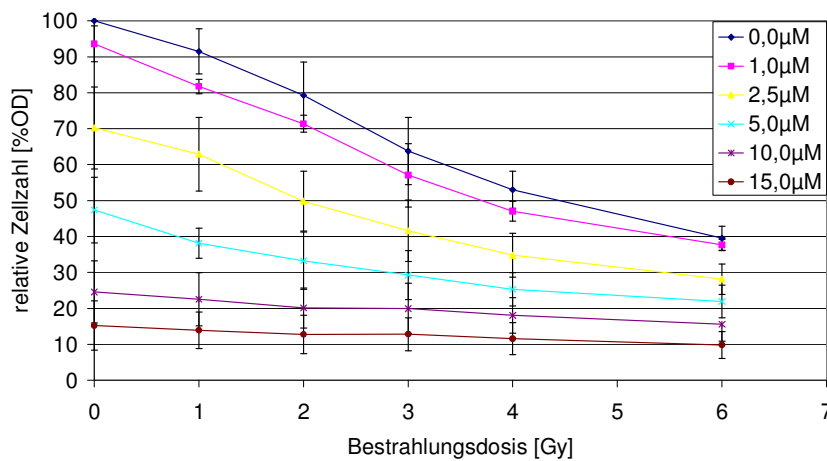


Abbildung 8.7 NCI-H460: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃, 200Z/well, 5d Inkubation in 96-well-Platte

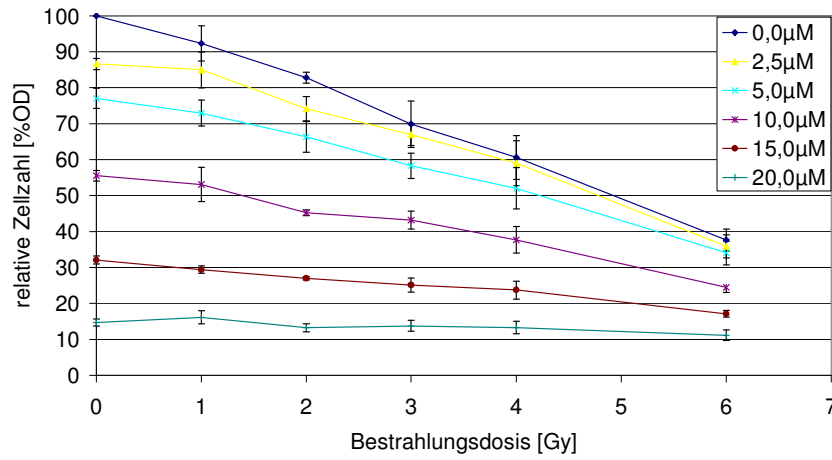


Abbildung 8.8
DU-145: relative
Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 200Z/well, 7d
Inkubation in 96-well-
Platte

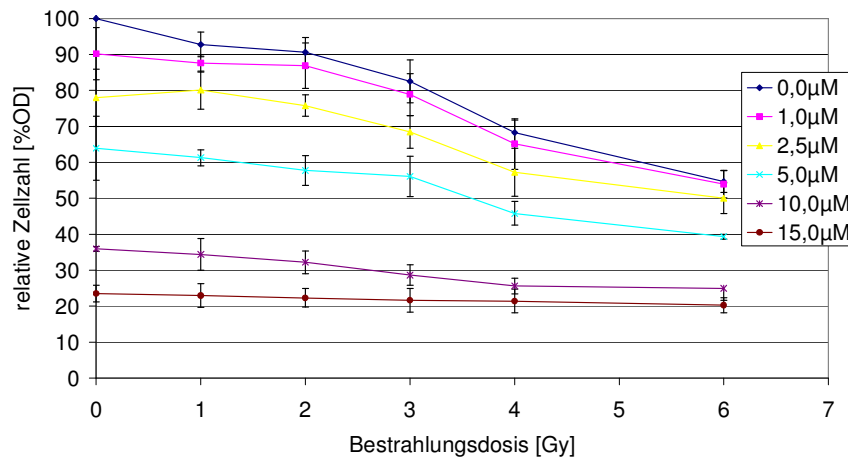


Abbildung 8.9 T98G:
relative Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 300Z/well, 7d
Inkubation in 96-well-
Platte

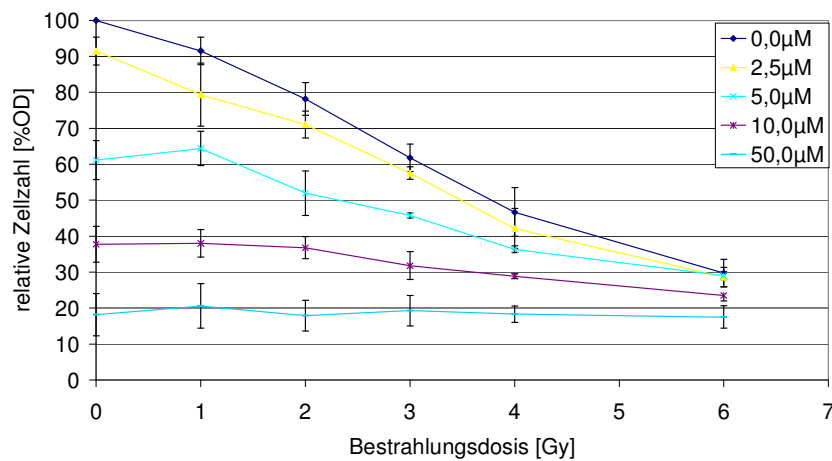


Abbildung 8.10
U-373MG: relative
Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 200Z/well, 7d
Inkubation in 96-well-
Platte

Gruppe 2: strahlenunempfindlich (LD50>4Gy) / ErPC₃-empfindlich (LD50<15µM)			
Zelllinie	Tumorart	LD50 ErPC₃ [µM]	LD50 Bestrahlung [Gy]
DU-145	Prostata-Ca	9,46	4,94
NCI-H460	Bronchial-Ca	5,02	4,60
SK-LMS1	Leiomyosarkom	7,09	4,45
T98G	Glioblastom	7,19	6,74
U-373MG	Glioblastom	8,38	4,05

Tabelle 8.4 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC₃ für DU-145, NCI-H460, SK-LMS1, T98G, U-373MG

Zelllinie	Bestrahlungsdosis [Gy]	Kombinationseffekt mit ErPC₃ [µM]	
		additiv	subadditiv
SK-LMS1	1-4	1-2,5	≥5
	6	-	≥1
NCI-H460	1-4	1-5	≥10
	6	-	≥1
DU-145	1-3	1-2,5	≥5
	4-6	1	≥2,5
T98G	1-6	-	≥1
U-373MG	1-6	-	≥1

Tabelle 8.5 Ergebnisse der isobographischen Analyse für DU-145, NCI-H460, SK-LMS1, T98G, U-373MG

8.1.2.3 Gruppe 3: strahlenempfindlich / erufosinunempfindlich

Den Bedingungen Strahlenempfindlichkeit und Toleranz gegenüber höheren Erufosindosen entsprachen die RD-ES-Zellen (Ewing-Sarkom, Abbildung 8.11, Tabelle 8.6). In der

Ergebnisse

isobolographischen Analyse ergab sich für niedrige Erufosindosen ein additiver Effekt, bei höheren ein subadditiver (Tabelle 8.7).

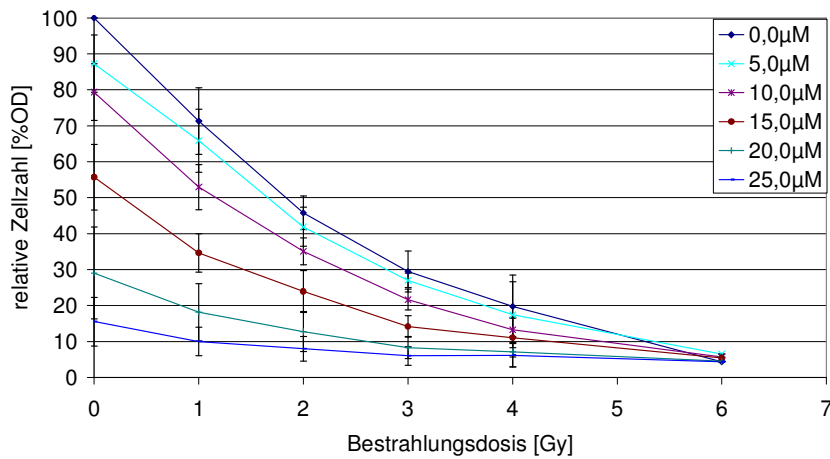


Abbildung 8.11
RDES: relative
Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 750Z/well, 8d
Inkubation in 96-well-
Platte

Gruppe 3: strahlenempfindlich (LD50<4Gy) / ErPC₃-unempfindlich (LD50>15µM)			
Zelllinie	Tumorart	LD50 ErPC₃ [µM]	LD50 Bestrahlung [Gy]
RD-ES	Ewing-Sarkom	15,85	1,75

Tabelle 8.6 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC₃ für RD-ES

Zelllinie	Bestrahlungsdosis [Gy]	Kombinationseffekt mit ErPC₃ [µM]	
		additiv	subadditiv
RD-ES	1	1-15	≥20
	2-4	1-10	≥15
	6	1-2,5	≥5

Tabelle 8.7 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für RD-ES

8.1.2.4 Gruppe 4: strahlenempfindlich / erufosinempfindlich

Am empfindlichsten gegenüber beiden Behandlungsentitäten (Tabelle 8.8) erwiesen sich die Zelllinien KB (Cervix-Ca, Abbildung 8.12), FADU (Pharynx-Ca, Abbildung 8.13), HCT-15 (Colon-Ca, Abbildung 8.14), HT-29 (Colon-Ca, Abbildung 8.15) und PC-3 (Prostata-Ca, Abbildung 8.16). Die KB- und FADU-Zellen zeigten bei niedrigen Erufosinkonzentrationen eine additive Kombinationswirkung mit Bestrahlung, bei höheren eine subadditive Wirkung. Die Behandlung der HCT-15, HT-29 und PC3-Zellen ergab im gesamten Konzentrationsbereich einen subadditiven Effekt (Tabelle 8.9).

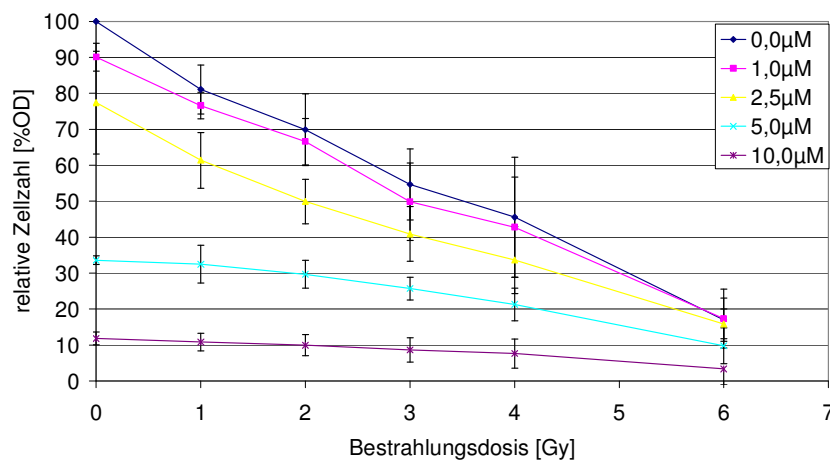


Abbildung 8.12 KB:
relative Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 200Z/well, 5d
Inkubation in 96-well-
Platte

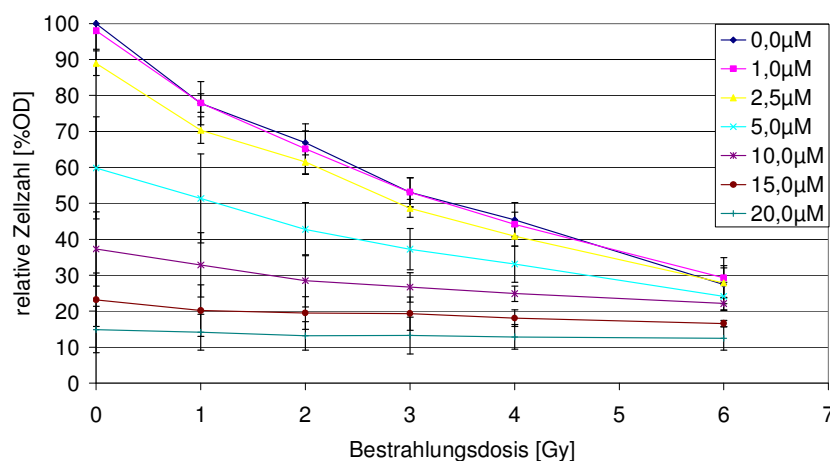


Abbildung 8.13
FADU: relative
Zellzahl bei
Behandlung mit
Bestrahlung und
ErPC₃, 500Z/well, 7d
Inkubation in 96-well-
Platte

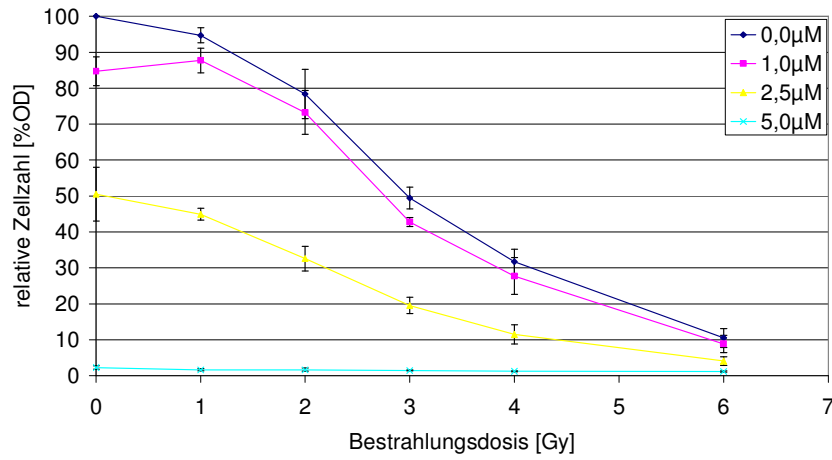


Abbildung 8.14 HCT-15: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃, 200Z/well, 7d Inkubation in 96-well-Platte

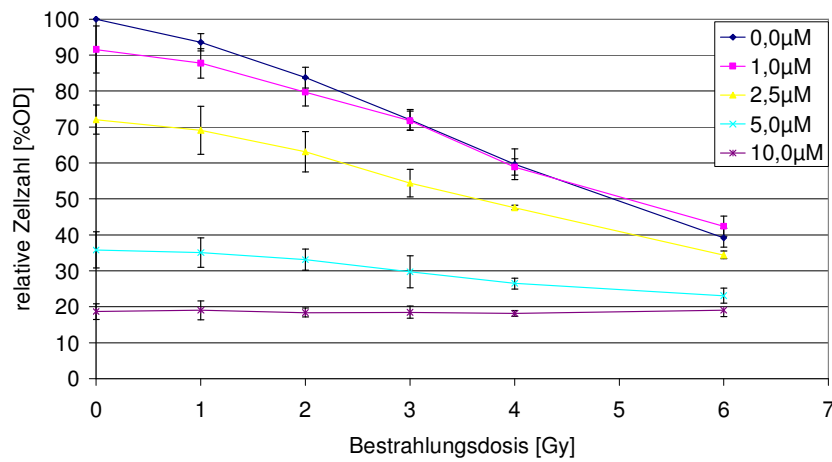


Abbildung 8.15 HT-29: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃, 500Z/well, 8d Inkubation in 96-well-Platte

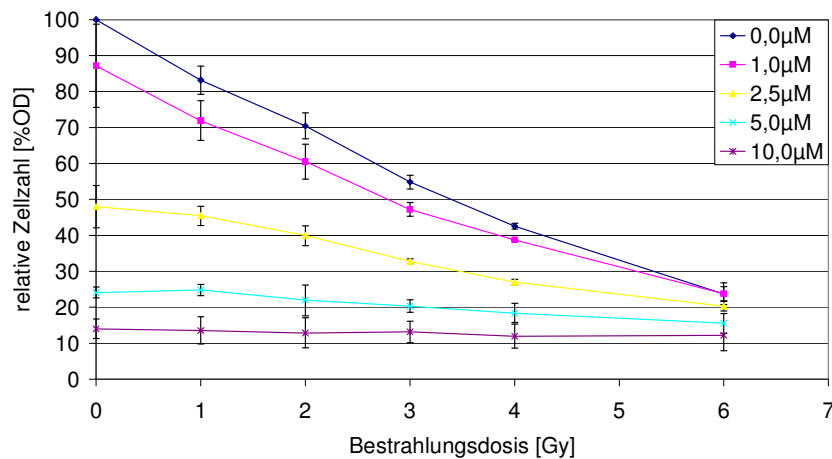


Abbildung 8.16 PC-3: relative Zellzahl bei Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃, 200Z/well, 7d Inkubation in 96-well-Platte

Gruppe 4: strahlenempfindlich (LD50<4Gy) / ErPC₃-empfindlich (LD50<15μM)			
Zelllinie	Tumorart	LD50 ErPC₃ [μM]	LD50 Bestrahlung [Gy]
KB	Cervix-Ca	4,08	3,44
FADU	Pharynx-Ca	7,55	3,33
HCT-15	Colon-Ca	2,47	3,27
HT-29	Colon-Ca	4,17	3,27
PC-3	Prostata-Ca	2,66	3,44

Tabelle 8.8 Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung / ErPC₃ für KB, FADU, HCT-15, HT-29, PC-3

Zelllinie	Bestrahlungsdosis [Gy]	Kombinationseffekt mit ErPC₃ [μM]	
		additiv	subadditiv
KB	1-3	1	≥2,5
	4-6	-	≥1
FADU	1-2	1-5	≥10
	3	1-2,5	≥5
	4	1	≥2,5
	6	-	≥1
HT-29	1-6	-	≥1
HCT-15	1-6	-	≥1
PC-3	1-6	-	≥1

Tabelle 8.9 Ergebnisse der isobolographischen Analyse für KB, FADU, HCT-15, HT-29, PC-3

8.2 Apoptose-Messungen

Ziel bei diesen Versuchen war es herauszufinden, ob Erufosin als Apoptoseinduktor wirkt und inwiefern Erufosin die Zellen gegenüber einer bestrahlungsinduzierten Apoptose sensibilisiert.

Die Zelllinien wurden dabei so ausgewählt, dass jede der unter 8.1.2 beschriebenen Gruppen und jede Tumorentität einmal vertreten war:

Gruppe1: A-549 (Bronchial-Ca), MDA-MB-453 (Mamma-Ca)

Gruppe2: DU-145 (Prostata-Ca)

Gruppe3: RD-ES (Ewing-Sarkom)

Gruppe4: FADU (Pharynx-Ca), HCT-15 (Colon-Ca)

Zunächst wurden die Zellen ausgesät, nach 24h mit Erufosin und Bestrahlung behandelt und nach weiteren 48h mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Einzelheiten zum Versuchsablauf siehe 7.4). Es wurden zunächst von jeder Behandlungskombination Bestrahlung / Erufosin Fotos gemacht (siehe 8.2.1). Danach wurden die Zellen gezählt (lebende / apoptotische / nekrotische). Jeder Versuch wurde zweimal wiederholt und der Mittelwert gebildet. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8.17 bis Abbildung 8.28 dargestellt.

8.2.1 Bilder Apoptoseversuche

Im Folgenden (Tabelle 8.10) sind beispielhaft für alle Apoptoseversuche Aufnahmen von A-549-Zellen (Bronchial-Ca) dargestellt (48h nach Behandlung mit Erufosin und Bestrahlung). Bei den anderen untersuchten Zelllinien ergab sich ein analoges Bild. Es ist zu erkennen, dass Bestrahlung alleine eine starke Proliferationsinhibition (zeigte sich an der geringeren Zelldichte) verursachte, jedoch in den hier betrachteten ersten 48h nach Behandlung fast keine Apoptose induzierte. Anders verhielt es sich bei alleiniger Behandlung mit Erufosin. Diese verursachte bereits in niedriger Konzentration (20 μ M) neben einer Proliferationsinhibition auch Apoptosen. Bei 40 μ M stieg deren Anzahl, daneben fanden sich auch vereinzelt Nekrosen. Bei 80 μ M fanden sich fast keine lebendigen Zellen mehr, es zeigte sich ein buntes Bild von Apoptosen und Nekrosen. Kam zur Erufosinbehandlung noch Bestrahlung hinzu, lässt sich auf den Fotos erkennen, dass die Proliferationsinhibition, Apoptose- und Nekroseinduktion etwas zunahm. Zur genauen Quantifizierung des Effekts bei den einzelnen Zelllinien siehe Kapitel 8.2.2.

	0Gy	5Gy	10Gy
0 μ M ErPC ₃			
20 μ M ErPC ₃			
40 μ M ErPC ₃			
80 μ M ErPC ₃			

Tabelle 8.10 Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von A-549-Zellen (Bronchial-Ca): Behandlung mit Bestrahlung und ErPC₃ in unterschiedlichen Dosen, angefärbt mit Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342. Lebendige Zellen zeigten eine homogen blaue Zellkernfärbung durch H33342. Gingen die Zellen in Apoptose, so sah man den fragmentierten Kern in Form von kleinen, blauen Vesikeln (Kernfragmente und kondensiertes Chromatin). Schritt die Apoptose weiter fort, wurde die Zellmembran durchlässig für PI und die vorher blauen Kernvesikel färbten sich rot. Wurde eine Zelle hingegen nekrotisch, so konnte durch die defekte Zellmembran sofort PI eindringen und der Zellkern färbte sich homogen rot (keine Fragmentierung, keine Kondensation, Zellen größer).

8.2.2 Mikroskopische Auszählung

Nachfolgend finden sich in Abbildung 8.17 bis Abbildung 8.28 die quantitativen Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. Eine sinnvolle isobolographische Analyse zu den Kombinationseffekten war bei den Apoptosemessungen aufgrund einer kleineren Anzahl von Messwerten leider nicht möglich. Man konnte jedoch die Kombinationswirkung von Bestrahlung und Erufosin in etwa abschätzen, indem man die Apoptoseraten der Einzelbehandlungen addierte und mit dem gemessenen Werte für die Kombinationsbehandlung verglich. War dieser gleich, deutete dies auf einen additiven Effekt hin, war er höher auf einen synergistischen und war er kleiner auf einen subadditiven.

Bei allen Zelllinien zeigten sowohl die niedrigste eingesetzte Erufosindosis als auch Bestrahlungsdosis mikroskopisch eine Proliferationsinhibition. Dies war jedoch noch nicht zwangsläufig von einer starken Apoptoseinduktion begleitet. Diese trat meist erst bei höheren Therapiedosen auf.

8.2.2.1 Gruppe 1: strahlenunempfindlich / erufosinunempfindlich

Bei der Zelllinie A-549 (Bronchial-Ca, Abbildung 8.17, Abbildung 8.18) zeigte die alleinige Bestrahlung mit 5 und 10Gy nach 48h nur eine sehr geringe Apoptoseinduktion, im Fluoreszenzmikroskop jedoch eine Proliferationsinhibition (Tabelle 8.10). Erufosin alleine hingegen verursachte bei 20 μ M eine Proliferationsinhibition (Tabelle 8.10) und wenige Apoptosen. Ab 40 μ M war die Apoptoserate deutlich erhöht und die Zahl lebender Zellen nahm stark ab. Bei der Kombination ließ sich durch zusätzliche Bestrahlung der erufosinbehandelten Zellen keine überproportionale Steigerung der Apoptoserate erzielen (20 μ M, 40 μ M). Bei 80 μ M sank die Zahl der sichtbaren Apoptosen mit steigender Strahlendosis, denn hier gingen viele Zellen aufgrund der übermäßig starken Schädigung durch beide Therapiemodalitäten nicht in Apoptose, sondern in Nekrose über. Dies ließ sich im Fluoreszenzmikroskop gut darstellen.

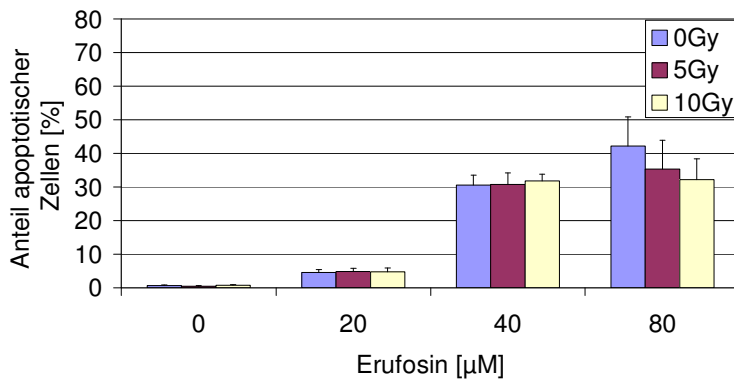


Abbildung 8.17. A-549: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

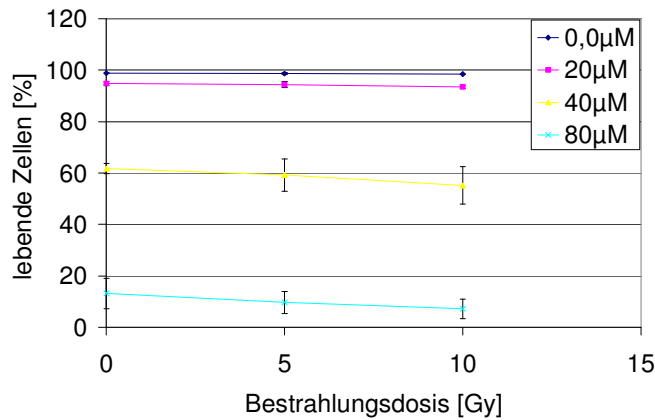


Abbildung 8.18: A-549: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

Bei den MDA-MB-453-Zellen (Mamma-Ca, Abbildung 8.19, Abbildung 8.20) ließen sich durch Strahlentherapie nur geringe Apoptoseraten erzielen, Erufosin alleine wirkte auch hier erst ab höheren Dosen (30 μM) als deutlicher Apoptoseinduktor. Bei einer Kombination beider Therapien zeigte sich bei 30 μM und 60 μM bei 5Gy ein leicht synergistischer Effekt, sonst war er subadditiv. Bei 60 μM und 10Gy stieg die Zahl der Apoptosen nicht mehr an, sondern es nahmen die Nekrosen zu.

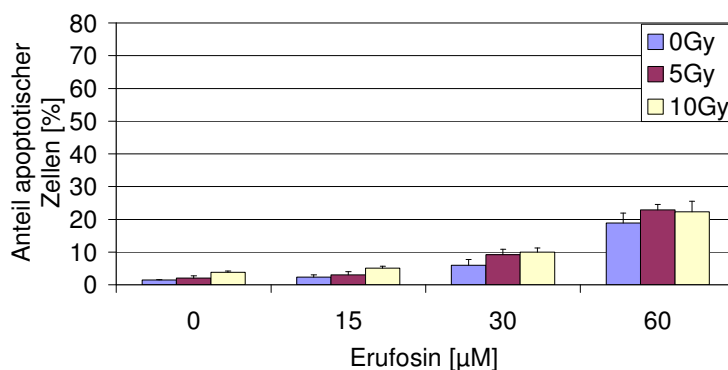


Abbildung 8.19 MDA-MB-453: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

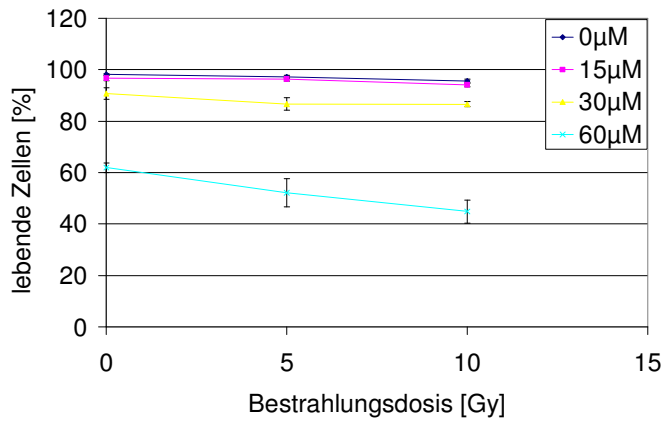


Abbildung 8.20 MDA-MB-453: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

8.2.2.2 Gruppe 2: strahlenunempfindlich / erufosinempfindlich

Die DU-145-Zellen (Prostata-Ca, Abbildung 8.21, Abbildung 8.22) zeigten mit ansteigender Strahlendosis bereits eine erhebliche Zahl Apoptosen. Erufosin wirkte ebenfalls als klarer Apoptoseinduktor. Es zeigte sich in Zusammenwirken mit Bestrahlung jedoch nur ein subadditiver Effekt und bei allen Kombinationen von 10Gy und Erufosin eine durch Zunahme von Nekrosen bedingte Abnahme der Apoptosenanzahl.

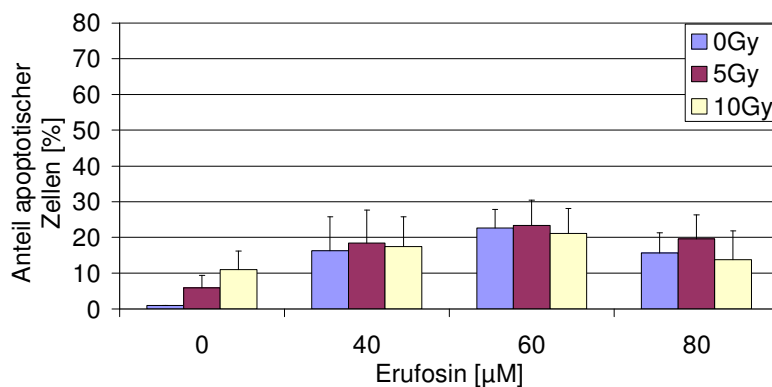


Abbildung 8.21 DU-145: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

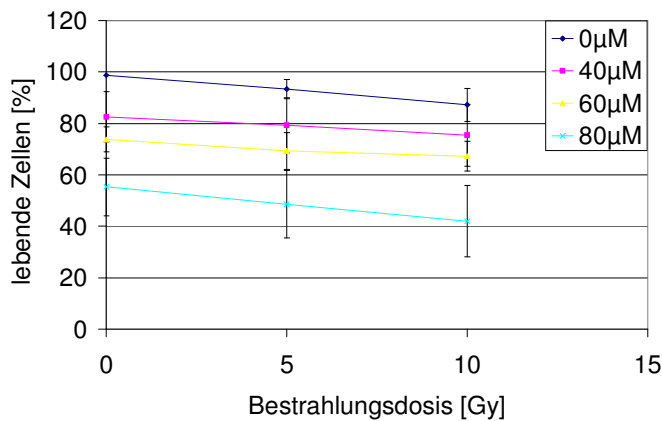


Abbildung 8.22 DU-145: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

8.2.2.3 Gruppe 3: strahlenempfindlich / erufosinunempfindlich

Die RD-ES-Zellen (Ewing-Sarkom, Abbildung 8.23, Abbildung 8.24) waren sehr strahlensensibel und es gab viele Apoptosen bereits bei alleiniger Bestrahlung. Erufosin wirkte hier schon in kleineren Dosen (ab 5µM). In der Kombination zeigte sich durchwegs ein subadditiver Effekt, bei 10µM+10Gy, 20µM+5Gy und 20µM+10Gy nahm die Zahl der Apoptosen ab, da die Kombination zu toxisch war, mikroskopisch erkannte man hier viele Nekrosen.

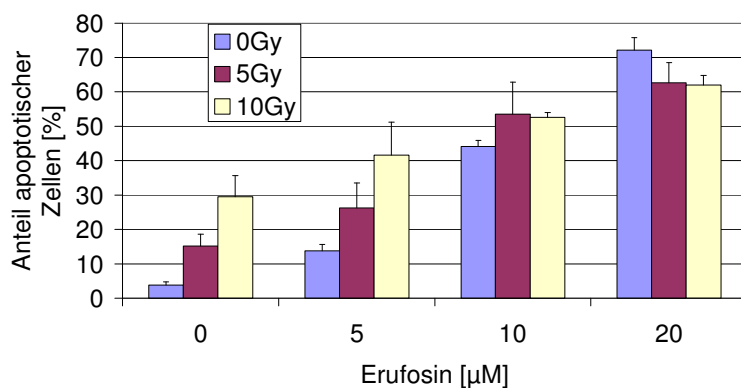


Abbildung 8.23 RD-ES: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

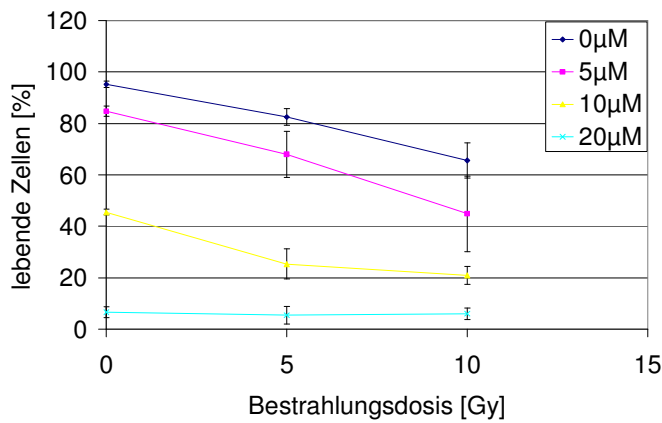


Abbildung 8.24 RD-ES: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

8.2.2.4 Gruppe 4: strahlenempfindlich / erufosinempfindlich

Die HCT-15-Zellen (Abbildung 8.25, Abbildung 8.26) zeigten trotz hoher Empfindlichkeit im Proliferationsassay eine eher spärliche Apoptoseinduktion durch Bestrahlung. Die Erufosinsensibilität war hoch, es gab bereits bei niedrigen Konzentrationen viele Apoptosen. Bei 2,5 μM und 5 μM bei 5 Gy gab es einen additiven Effekt, bei höheren Dosen einen subadditiven.

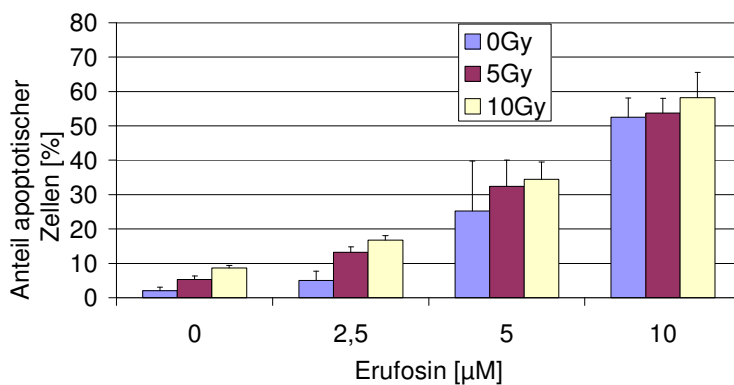


Abbildung 8.25 HCT-15: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

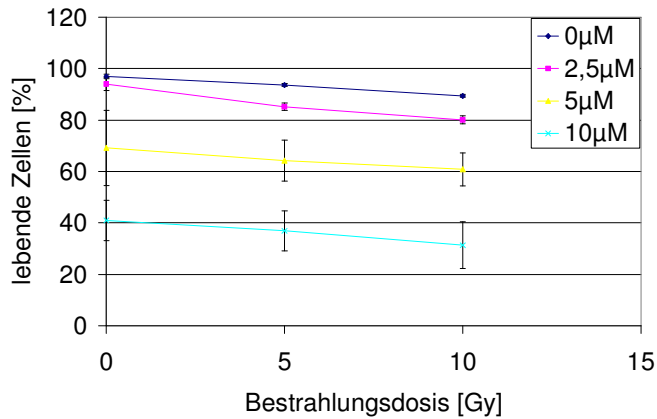


Abbildung 8.26 HCT-15: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

Analog zu den HCT-15-Zellen zeigten auch die FADU-Zellen (Pharynx-Ca, Abbildung 8.27, Abbildung 8.28) nur wenige durch alleinige Bestrahlung ausgelöste Apoptosen. Die durch Erufosin hervorgerufene Apoptoseinduktion hingegen war hoch. Einen additiven Effekt gab es bei 7,5 μM und 15 μM bei 5 Gy, ansonsten subadditive Effekte. Bei 15 μM+10 Gy, 30 μM+5 Gy und 30 μM+10 Gy nahm die Apoptoserate auch hier ab, bedingt durch die hohe Toxizität der Einzeltherapien gingen viele Zellen sofort in Nekrose.

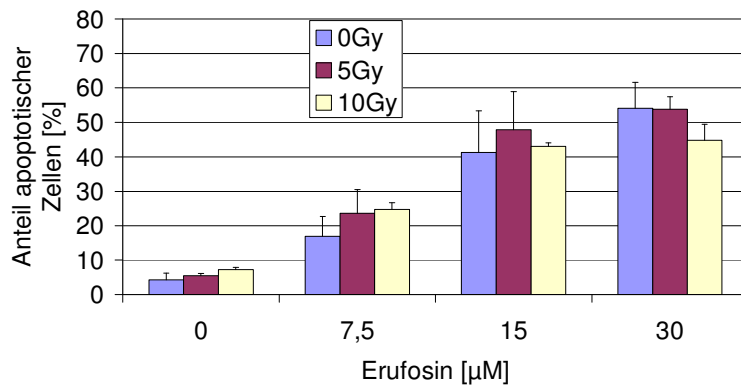


Abbildung 8.27 FADU: Anteil apoptotischer Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

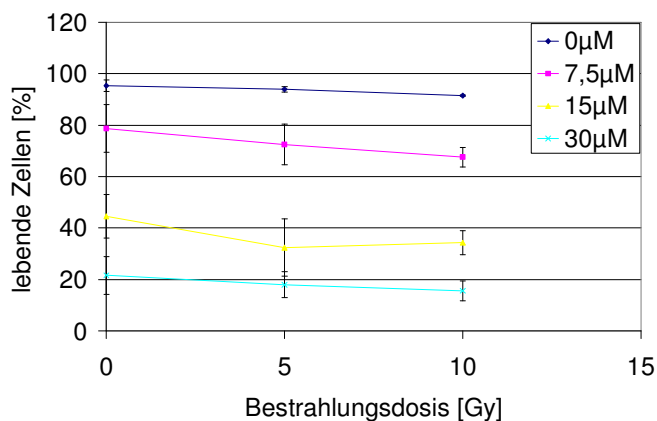


Abbildung 8.28 FADU: Anteil lebender Zellen 48h nach Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin

9 Diskussion

Für die Substanzgruppe der Alkylphosphocholine ist bekannt, dass einzelne Vertreter in Kombination mit Bestrahlung das klonogene Überleben vermindern und die frühe strahleninduzierte Apoptose verstärken können. In dieser Arbeit wurde ein neues Alkylphosphocholin, das Erufosin (Erucylphosphohomocholin, ErPC₃), welches sich gerade in ersten klinischen Tests befindet und als erstes Alkylphosphocholin die intravenöse Applikation erlaubt, im Hinblick auf diese Eigenschaften untersucht. In Zellkulturexperimenten wurden 14 Zelllinien von humanen Tumoren, die für Strahlentherapie in Frage kommen, auf die Kombinationswirkung von Bestrahlung und Erufosin getestet. Bei der Messung des Gesamtüberlebens zeigte sich bei allen Zelllinien, dass Erufosin die Strahlenwirkung verstärkte. Zusätzlich wurden 6 repräsentative Zelllinien im Hinblick auf die frühe strahleninduzierte Apoptose untersucht. Auch hier zeigte sich durch den Einsatz von Erufosin eine Zunahme der Apoptoserate.

9.1 Diskussion der Methoden

9.1.1 WST1-Zellproliferationsassay

Der Goldstandard zur Bestimmung der in-vitro-Kombinationswirkung von Bestrahlung und einer medikamentösen Therapie auf Tumorzellen ist der Koloniebildungstest. Dabei werden die Zellen stark verdünnt ausgesät und mit beiden Therapiemodalitäten behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen werden die aus den einzelnen Tumorzellen entstandenen Kolonien, die mehr als 50 Zellen enthalten, gezählt. Damit erhält man einen Maßstab für die Effizienz der Therapie. Wenn eine Zelle irreversibel geschädigt ist, so kann sie entweder sofort in Apoptose oder Nekrose gehen oder sich höchstens wenige Male teilen ehe sie abstirbt. Bei allen Kolonien mit mehr als 50 Zellen hat sich die Zelle sechsmal oder öfter geteilt. Sie hat also keinen irreversiblen Schaden davongetragen und kann somit theoretisch ein Tumorrezidiv auslösen. Dieses Testverfahren ist allerdings sehr material- und zeitaufwendig und nicht gut geeignet für Screeninguntersuchungen mit vielen verschiedenen Bedingungen an einer größeren Zahl von Zelllinien (Steel 2002).

Daneben gibt es verschiedene nichtklonogene Verfahren in der onkologischen Forschung (Mitchell 1988). Eine schnellere, weniger aufwendige Methode, die dem Koloniebildungstest sehr nahe kommt, stellte erstmals Mosmann im Rahmen von Zytotoxizitätsexperimenten vor. Er säte die Zellen in einer 96-well-Platte aus, behandelte sie mit einer zytotoxisch wirksamen Substanz und gab nach einer mehrtägigen Inkubationszeit ein Tetrazoliumsalz hinzu. Dieses wurde von den noch lebendigen Zellen enzymatisch in einen photometrisch messbaren Metaboliten (Formazansalz) umgewandelt, der im ELISA-Reader gemessen werden konnte. Der gemessene Wert ist dabei proportional zur Zellzahl (Mosmann 1983; Berridge 1996). Auch in den hier durchgeführten Experimenten wurde dieses Prinzip angewandt. Carmichael zeigte, dass das Verfahren auch für die Messung der Radiosensitivität von Zellen sowie für die Evaluation radiosensibilisierender oder radioprotektiver Substanzen geeignet ist. Unter Beachtung bestimmter Rahmenbedingungen sind die Ergebnisse mit denen des Koloniebildungstests vergleichbar (Carmichael, DeGraff et al. 1987; Wasserman and Twentyman 1988). Man sollte sich allerdings immer vor Augen halten, dass mit den beiden Testverfahren prinzipiell unterschiedliche Effekte gemessen werden (Steel 2002). Im photometrischen Assay wird versucht das klonogene Überleben annähernd zu messen, man erfasst nach der Inkubationszeit von einigen Tagen alle lebendigen Zellen, gleichgültig, ob es sich um Zellen einer Kolonie oder vereinzelte Zellen, die nicht mehr teilungsfähig sind oder sich in einem noch andauernden Reparaturprozess befinden, handelt. Es wird somit nicht zwischen noch koloniebildenden, teilungsfähigen und nicht mehr teilungsfähigen Zellen differenziert. Deshalb können die Effekte, die man durch eine Behandlung hervorruft, unterschätzt werden (Sobotka and Berger 1992). Im Koloniebildungstest zählt man selektiv die klonogenen Zellen, d.h. hier werden nur Zellen registriert, die im Inkubationszeitraum nach der Behandlung in der Lage waren Kolonien zu bilden. Andere Zellen, bei denen ein länger dauernder Reparaturprozess stattfindet oder die sich in einer nichtproliferativen Ruhephase befinden, werden hier nicht erfasst, können aber potentiell auch ein Rezidiv auslösen.

Bei seinen Experimenten erhielt Carmichael eine sehr gute Übereinstimmung beider Testverfahren, wenn die Bedingungen für die Tumorzellen im well so gewählt wurden, dass sie sich mindestens sechsmal teilen konnten und sich damit sowohl Kolonien bilden konnten als auch für die geschädigten Zellen genug Zeit war den Zelltodprozess zu durchlaufen. Bei weniger Teilungen war das Proliferationsassay weniger sensitiv als der Koloniebildungstest, die gemessenen Überlebensraten waren im Vergleich höher (Carmichael, DeGraff et al. 1987; Wasserman and Twentyman 1988). Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde

versucht, die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase so lange wie möglich in der 96-well-Platte zu inkubieren, um möglichst viele Zellteilungen zu erreichen. Die Anzahl der Teilungen wurde anhand der Koloniegröße näherungsweise bestimmt. Nach der Inkubationszeit für die jeweilige Zelllinie wurden die Kolonien im unbehandelten Kontrollwell mikroskopisch untersucht. Sie hatten immer mindestens eine Größe von 50 Zellen erreicht, also in etwa 5-6 Zellteilungen durchlaufen.

Wie gerade angesprochen, war es sehr wichtig, die Inkubationsdauer nach der Behandlung so lange wie möglich zu gestalten. Dabei war zu beachten, dass die Zellen während dieses Zeitraumes nur durch die Bestrahlung oder Erufosin abstarben und nicht durch andere Faktoren, wie z.B. Nährstoffmangel oder Kontaktinhibition (Carmichael, DeGraff et al. 1987). Ausreichend Nährstoffe waren auch dafür nötig, dass das WST1-Reagenz gleichmäßig von allen Zellen verstoffwechselt wurde und es keine Zellen mit reduziertem Metabolismus gab, die deshalb unzureichend erfasst wurden (Mosmann 1983). Um all dies zu gewährleisten wurde mit jeder Zelle ein Vorversuch durchgeführt, bei dem die passende Zellzahl je well und die Inkubationsdauer festgelegt wurden, so dass im Bereich der verwendeten Zellkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum ein exponentielles Wachstum möglich war und ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und optischer Dichte bestand. Dabei wurde die Zellzahl je well nicht niedriger als 200 gewählt, sonst waren die Abweichungen der Einzelwerte voneinander zu groß. Alternativ wäre auch denkbar gewesen das Medium im well zu wechseln und dadurch die Versuchsdauer zu verlängern. Allerdings erscheint dies in der Praxis eher problematisch, da beim Absaugen des alten Mediums eventuell Zellen mit verloren gehen, insbesondere bei nur schwach adhärenen Zelllinien. Darüber hinaus hat man natürlich auch ein erhöhtes Kontaminationsrisiko (Carmichael, DeGraff et al. 1987).

Vor allem bei niedrigen Therapiedosen (niedrige Erufosinkonzentration, Strahlendosis 0 bis 3Gy) zeigte das WST1-Assay eine gute Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei höheren Dosen mit stärkerer Zytotoxizität waren jedoch zu viele Zellen abgestorben oder brauchten so lange für die Reparatur, dass ihr Wachstum in der kurzen Dauer des Experiments nicht mehr erfasst wurde. Dies war auch bei ähnlich gestalteten experimentellen Untersuchungen der Fall (Slavotinek, McMillan et al. 1994). Für den Hochdosisbereich ist der Koloniebildungstest besser geeignet.

Außerdem wurde analog zu anderen Arbeiten (Price and McMillan 1990) darauf geachtet, dass sich die Zellen vor der Behandlung im exponentiellen Wachstum befanden und keinerlei

anderen Stressfaktoren ausgesetzt waren. Zu diesem Zweck wurde die Behandlung mit Bestrahlung und Erufosin erst 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen begonnen.

Daneben war der Wert für die optische Dichte, den man am ELISA-Reader erhielt, abhängig von der zugegebenen WST1-Menge und der Inkubationszeit der Zellen mit WST1-Reagenz. Deshalb wurden diese beiden Parameter immer konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse zu gewährleisten (Price and McMillan 1990).

Eine weitere Fehlerquelle könnte sein, dass Erufosin den Metabolismus der Zelllinien dahingehend verändert, dass die WST1-Verstoffwechslung beeinflusst wird und sich falsche Werte für die optische Dichte ergeben (Sobottka and Berger 1992). Dies kann auch bei den hier durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich, da bei der Auswertung der Versuche die gemessene optische Dichte immer mit dem mikroskopischen Bild des Wells verglichen wurde und sich jeweils eine gute Übereinstimmung ergab.

Neben diesen Problemen und Fehlerquellen, die man bei der Durchführung des WST1-Proliferationsassays sorgfältig beachten sollte, ergeben sich natürlich auch eine Reihe von Vorteilen. Das gesamte Verfahren ist durch den Einsatz des ELISA-Readers halbautomatisiert und ein zeitaufwendiges, subjektiv beeinflusstes Zählen von Kolonien per Hand fällt weg. Außerdem sind die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar, man benötigt nur wenige Zellen und es können auch nicht oder schlecht adhärente Zelllinien untersucht werden (Price and McMillan 1990). Dies ist beim Koloniebildungstest problematisch, da sich erst gar keine adhären Kolonien bilden oder diese während des Anfärbens von der Färbelösung fortgespült werden.

Zusammenfassend ist das WST1-Zellproliferationsassay unter genauer Beachtung der experimentellen Rahmenbedingungen ein guter und rasch durchführbarer Screeningtest für die Untersuchung einer neuen Substanz in Kombination mit Bestrahlung bei mehreren Tumorzelllinien und unter verschiedenen Bedingungen.

9.1.2 Apoptose-Messungen

Um den Einfluss von Bestrahlung und Erufosin auf die frühe Apoptoseinduktion zu messen, wurden die Zellen 48h nach Behandlung mit den DNA-Farbstoffen Hoechst33342 und Propidiumiodid angefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop ließen sich dann lebende, apoptotische und nekrotische Zellen voneinander unterscheiden. Zur Quantifizierung wurden die Zellen ausgezählt (Forrester, Vidair et al. 1999; Rubel, Handrick et al. 2006).

Diese Methode ist allerdings nicht frei von Problemen. Die beiden Farbstoffe wirken durch ihre Bindung an die DNA schädigend auf die Zelle und induzieren selbst Apoptose. Deshalb darf man die gefärbten Zellen nicht für längere Zeit mit den Farbstoffen im Brutschrank inkubieren, sondern man sollte zügig mit der Auswertung beginnen, sonst wird das Ergebnis verfälscht. Außerdem muss man die gefärbten Zellen vor Licht schützen, andernfalls bleichen die Fluoreszenzfarbstoffe aus und das Mikroskopbild wird sehr unscharf und verwaschen. Bei der Durchführung tauchte eine weitere Schwierigkeit auf. Die noch lebenden Zellen waren adhären am Boden der wells, die apoptotischen bzw. nekrotischen lösten sich allerdings ab und hatten die Tendenz sich in der Mitte des wells anzusammeln. Um durch diese inhomogene Verteilung das Ergebnis nicht zu verfälschen, wurde vor der Auswertung der gesamte Inhalt des wells mit Hilfe einer Pipette aufgezogen und resuspendiert. Nach 10 Minuten hatten sich die Zellen gleichmäßig verteilt wieder am Boden abgesetzt und konnten photographiert und gezählt werden. Beim Vergleich der Mittelwerte der drei Versuche, die für jede Bedingung durchgeführt wurden, ergab sich jedoch trotz sorgfältiger Versuchsdurchführung zum Teil eine hohe Standardabweichung. Dieses Problem trat auch bei anderen Forschungsgruppen auf (Rubel, Handrick et al. 2006).

Vorteile bei der Färbung mit H33342 und Propidiumiodid und der Auszählung am Mikroskop waren, dass das Verfahren einfach zu etablieren, schnell durchführbar und kostengünstig ist. Man erhält rasch einen Überblick über den Anteil der Zellen, die absterben und welchen Weg sie dafür wählen (Apoptose oder Nekrose). Möchte man allerdings ohne große statistische Abweichungen eine sehr genaue Messung der Apoptoseinduktion durchführen, könnte man alternativ die Zellen auf die gleiche Weise anfärben und mit Hilfe der Durchflusszytometrie messen (Belloc, Dumain et al. 1994).

Zusammenfassend ist die Anfärbung und Auszählung am Mikroskop eine schnelle und einfache Methode, um einen Überblick über Kombinationseffekte von Bestrahlung und Erufosin im Hinblick auf die Apoptoseinduktion zu gewinnen und Aussagen über den Weg des Zelltodes, den die Zelle einschlägt, zu treffen. Möchte man eine sehr genaue Analyse oder schwache Kombinationseffekte darstellen, so ist dieses Verfahren allerdings nicht optimal geeignet.

9.2 Diskussion der Ergebnisse

9.2.1 Kombinationsbehandlung im WST1-Zellproliferationsassay

9.2.1.1 Toxizität von Erufosin

Bei allen untersuchten Zelllinien zeigte sich Erufosin als wirksam gegen die Tumorzellen. Zu den empfindlicheren Tumorarten ($LD_{50} < 15 \mu M$) zählten KB (Cervix-Ca), FADU (Pharynx-Ca), HCT-15, HT-29 (beide Colon-Ca), PC-3, DU-145 (beide Prostata-Ca), SK-LMS-1 (Leiomyosarkom), NCI-H460 (Bronchial-Ca), T98G und U-373MG (beide Glioblastom). Unempfindlich ($LD_{50} > 15 \mu M$) waren RDES (Ewing-Sarkom), A549 (Bronchial-Ca), MDA-MB-453, MCF-7 (beide Mamma-Ca). In der Literatur gibt es eine ganze Reihe von in-vitro-Toxizitätsexperimenten mit Alkylphosphocholinen (siehe Einleitung unter Edelfosin[®], Perifosin[®], Erucylphosphocholin), in denen sich diese als sehr wirksam gegen Tumorzellen erwiesen, allerdings existieren speziell für Erufosin bisher nur wenige Daten. Ein direkter Vergleich mit den hier erzielten Ergebnissen ist zudem problematisch, da immer ein unterschiedlicher experimenteller Aufbau verwendet wurde, bei dem das Überleben der Zellen zu einem anderen Zeitpunkt nach Erufosinzugabe gemessen wurde. Um definitive Aussagen über die Wirksamkeit von Erufosin im Vergleich mit anderen Alkylphosphocholinen treffen zu können, müssten diese im gleichen System gemessen werden.

Jendrossek et al. untersuchten Gehirntumorzelllinien mit Erufosin und verwendeten dabei ebenfalls den WST1-Test, die Toxizitätsmessung erfolgt aber schon nach 72h (im Gegensatz dazu waren es bei den hier durchgeführten Proliferationsmessungen 5-8 Tage Inkubationszeit, abhängig von der Zelllinie). Die LD_{50} -Werte lagen zwischen $29 \mu M$ und $78 \mu M$ (Jendrossek, Hammersen et al. 2002). Damit waren sie deutlich höher als die hier ermittelten. Konstantinov et al. setzten Erufosin gegen Harnblasenkarzinomzelllinien ein und demonstrierten mit Hilfe des MTT-Tests, welcher auch auf der Umsetzung eines Tetrazoliumsalses basiert und vergleichbar mit dem WST1-Test ist, ebenfalls eine gute antitumorale Wirksamkeit (LD_{50} , gemessen nach 72h: $4-5 \mu M$) (Konstantinov and Berger 1999). Rübél et al. verwendeten Erufosin im Koloniebildungstest bei Glioblastomzellen in Kombination mit Bestrahlung. Hier begann der toxische Bereich ab einer Konzentration von $12,5 \mu M$ (Rübél, Handrick et al. 2006).

Ein weiterer interessanter Aspekt zeigt sich bei den MDA-MB-453-Zellen (Mamma-Ca). Sowohl bei einer niedrigeren Strahlendosis (1Gy) als auch einer Erufosinkonzentration $<10\mu\text{M}$ zeigte sich eine Steigerung der Absorption, die Hinweis auf ein erhöhtes Wachstum sein könnte. Eine ähnliche Erscheinung wurde bereits bei Miltefosin[®] beschrieben. Dieses stimulierte in niedrigen Dosen (1-5 $\mu\text{g/ml}$) das Wachstum von Mammakarzinomzellen, bevor es toxisch auf die Zellen wirkte (Bruyneel, Storme et al. 1993). Sobottka et al. verwendeten ebenfalls Mammakarziomzelllinien und Miltefosin[®] und stießen ebenfalls auf dieses Phänomen (Sobottka and Berger 1992). Bei bestimmten Tumorzelllinien, insbesondere Mammakarzinomen, scheinen Alkylphosphocholine also in Abhängigkeit von der Dosis zumindest in vitro einen zweigeteilten Effekt zu haben, für den es bis jetzt keine Erklärung gibt.

9.2.1.2 Toxizität von Bestrahlung

Als strahlenunempfindlicher ($\text{LD}_{50}>4\text{Gy}$) zeigten sich bei den hier durchgeführten Experimenten A-549, NCI-H460 (beide Bronchial-Ca), MCF-7, MDA-MB-453 (beide Mamma-Ca), DU-145 (Prostata-Ca), SK-LMS1 (Leiomyosarkom), T98G, U-373MG (beide Glioblastom), wohingegen RD-ES (Ewing-Sarkom), PC-3 (Prostata-Ca), HCT-15, HT-29 (beide Colon-Ca), KB (Cervix-Ca) und FADU (Pharynx-Ca) eher strahlensensibel waren ($\text{LD}_{50}<4\text{Gy}$).

9.2.1.3 Kombinationseffekt von Erufosin und Bestrahlung im WST1-Zellproliferationsassay

Für alle Zelllinien zeigte sich durch die Kombination von Erufosin und Bestrahlung ein verbesserter Effekt als gegenüber Strahlung alleine. Die Quantifizierung mit der isobographischen Analyse ergab synergistische bis subadditive Effekt für A-549 (Bronchial-Ca), additive bis subadditive bei MCF-7 (Mamma-Ca), SK-LMS-1 (Leiomyosarkom), NCI-H460 (Bronchial-Ca), DU-145 (Prostata-Ca), RDES (Ewing-Sarkom), KB (Cervix-Ca), FADU (Pharynx-Ca) und subadditive für MDA-MB-453 (Mamma-Ca), T98G, U-373MG (beide Glioblastom), HT-29, HCT-15 (beide Colon-Ca) und PC-3 (Prostata-Ca).

Entsprechend ihrer Empfindlichkeit wurden die Zellen willkürlich in vier Gruppen eingeteilt: erufosinempfindlich ($\text{LD}_{50}<15\mu\text{M}$) / strahlenempfindlich ($\text{LD}_{50}<4\text{Gy}$), erufosinempfindlich ($\text{LD}_{50}<15\mu\text{M}$) / strahlenunempfindlich ($\text{LD}_{50}>4\text{Gy}$), erufosinunempfindlich ($\text{LD}_{50}>15\mu\text{M}$) /

strahlenempfindlich ($LD_{50} < 4\text{Gy}$), erufosinunempfindlich ($LD_{50} > 15\mu\text{M}$) / strahlenunempfindlich ($LD_{50} > 4\text{Gy}$). An dieser Konstellation lässt sich erkennen, dass man aufgrund der Strahlen- oder Erufosinsensibilität einer Zelle keinen Rückschluss auf die Empfindlichkeit gegenüber der anderen Therapiemodalität ziehen kann.

In der Literatur gibt es eine Reihe anderer Untersuchungen zum Einsatz von Bestrahlung zusammen mit Alkylphosphocholinen, die in Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen ebenfalls zeigen, dass Alkylphosphocholine den Strahleneffekt verstärken (Vink, van Blitterswijk et al. 2007). Bei einer Zervixkarzinomzelllinie (KB) zeigen sich synergistische Effekte mit Miltefosin[®] und Edelfosin[®], bei einer Plattenepithelkarzinomzelllinie (HTB43) ergeben sich für beide Substanzen additive Effekte (Berkovic, Grundel et al. 1997). Darüber hinaus zeigen Miltefosin[®] (additiv), Perifosin[®] (additiv) und Edelfosin[®] (synergistisch) eine Verstärkung der strahleninduzierten Apoptose in Leukämiezelllinien (Ruiter, Zerp et al. 1999). Außerdem gelingt es durch den Einsatz von Miltefosin[®] radioresistente Mammakarzinomzellen, die das Ras-Onkogen besitzen, strahlensensibel zu machen (Bruyneel, Storme et al. 1993). Neueste Untersuchungen in Glioblastomzellen (A-172, U-87MG, T98G) zeigen, dass Erucylphosphocholin und Erufosin eine Verstärkung der strahleninduzierten Apoptose bewirken, zum Teil ist dieser Effekt sogar synergistisch. Bei den T98G-Zellen vermindert die Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung und Erucylphosphocholin / Erufosin das klonogene Überleben (Rubel, Handrick et al. 2006). Außerdem veröffentlichten Vink et al. kürzlich eine in-vitro- und in-vivo-Untersuchung mit Perifosin[®]. Darin werden Untersuchungsergebnisse zur Epithelzellkarzinomzelllinie KB vorgestellt. Perifosin[®] reduziert in Kombination mit Bestrahlung in vitro das klonogene Überleben und verstärkt die strahleninduzierte Apoptose. In dem experimentellen in-vivo-Xenograftmodell kann durch die Kombinationsbehandlung eine starke, zum Teil komplette Tumorregression erreicht werden (Vink, Lagerwerf et al. 2006). Außerdem gibt es mit Perifosin[®] eine Phase I Studie in Kombination mit Strahlentherapie. Hierbei kann Perifosin[®] sicher mit Strahlentherapie kombiniert werden. Wie bereits in anderen klinischen Studien ist der dosislimitierende Faktor für Perifosin[®] die gastrointestinale Toxizität (Vink, Schellens et al. 2006).

Bei den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen waren die Kombinationseffekte bei den Zelllinien additiv bis subadditiv. Bis jetzt gibt es nur eine Untersuchung für Erufosin mit Bestrahlung an einer Glioblastomzelllinie, bei der der Kombinationseffekt additiv war (Rubel, Handrick et al. 2006). Unterschiede zu den bisher untersuchten Alkylphosphocholinen könnten durch die verwendeten Zellen oder das hier

verwendeten Testsystem verursacht werden. Beim WST1-Zellproliferationsassay wurden alle lebenden Zellen im well gezählt und nicht wie beim Koloniebildungstest nur die zur Koloniebildung fähigen. Daraus kann fälschlicherweise ein erhöhtes Überleben resultieren und der Kombinationseffekt als zu niedrig eingeschätzt werden (Sobottka and Berger 1992).

Die molekularen Grundlagen der Interaktion Strahlung / Alkylphosphocholine sind bis heute nicht genau bekannt. Für beide Therapien wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind Apoptose über den intrinsischen, mitochondrialen Weg zu induzieren. Es scheinen sich die Wirkungen der durch Alkylphosphocholine und der durch Strahlung ausgelösten Signalwege gegenseitig zu verstärken. Beide Therapien haben unterschiedliche Signalwege zur Auslösung des Apoptosesignalwegs, aber den mitochondrialen Weg als gemeinsame Endstrecke (Jendrossek and Handrick 2003). Anhand der unterschiedlichen Empfindlichkeit bei den hier verwendeten Zelllinien gegenüber Erufosin oder Bestrahlung bestätigte sich, dass die beiden Apoptosewege nicht identisch waren. Eine strahlensensible Zelllinie konnte auch erufosinsensibel sein, war es aber nicht zwangsläufig (und umgekehrt). Bei gleichen Apoptosemechanismen würde man eine gleichförmige Sensibilität oder Resistenz gegenüber beiden Therapiemodalitäten annehmen.

Auf molekularer Ebene verursacht Strahlung durch DNA-Schäden eine Aktivierung von P53 und des proapoptisch wirksamen Bax-Moleküls mit nachfolgendem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der Caspasenkaskade (Belka, Jendrossek et al. 2004). Alkylphosphocholine könnten in diesen Apoptoseprozess über mehrere Mechanismen eingreifen. Sie aktivieren wie auch andere zelluläre Stressfaktoren (z.B. Strahlung) die proapoptische SAPK/JNK-Kinase (Ruiter, Zerp et al. 1999). Außerdem sind sie Inhibitoren der Proteinkinase C (Pauig and Daniel 1996; Goekjian and Jirousek 2001). Es ist bekannt, dass das Blockieren der Proteinkinase C die Radiosensibilität steigert und ihre Aktivierung resistenter gegenüber Strahlung macht (Hallahan, Virudachalam et al. 1992; Grant, Traylor et al. 1994). Darüber hinaus scheint Ceramid beim Strahlentod eine wichtige Rolle zu spielen (Kolesnick and Fuks 2003). Auch hier gibt es eine Verbindung zu den Alkylphosphocholinen, die ebenfalls den intrazellulären Ceramidspiegel erhöhen (Wieder, Orfanos et al. 1998). Daneben könnten auch die übrigen in der Einleitung angeführten Mechanismen (siehe 5.2.2) von Bedeutung sein.

Zusammenfassend zeigte sich im WST1-Assay eine Verstärkung der Strahlenwirkung durch Erufosin bei den untersuchten Tumorzellen. Nichttoxische Konzentrationen beeinflussten die Strahlenwirkung auf die Zellen nicht, im niedrigen toxischen Bereich erhielt man im Wesentlichen additive Effekte und im hochtoxischen Bereich subadditive.

9.2.2 Kombinationseffekt von Bestrahlung und Alkylphosphocholinen auf die Apoptoseinduktion

9.2.2.1 Erufosin als Apoptoseinduktor

Ob Erufosin als Apoptoseinduktor wirkt, wurde bei den Zelllinien A-549 (Bronchial-Ca), MDA-MB-453 (Mamma-Ca), DU-145 (Prostata-Ca), RD-ES (Ewing-Sarkom), FADU (Pharynx-Ca), HCT-15 (Colon-Ca) untersucht. Bei allen Zellen zeigte sich mit ansteigender Erufosinkonzentration zunächst eine Proliferationsinhibition (zu sehen an der Abnahme der Zelldichte), dann eine Apoptoseinduktion und bei sehr hohen Konzentrationen schließlich auch das Auftreten von Nekrosen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, denn für die Gruppe der Alkylphosphocholine ist bekannt, dass sie in Tumorzellen Apoptose auslösen können und sie in der Proliferationsfähigkeit einschränken (Jendrossek and Handrick 2003).

9.2.2.2 Apoptose durch Erufosin und Bestrahlung

Bei allen sechs untersuchten Zelllinien ließ sich die strahleninduzierte Apoptose durch die Zugabe von Erufosin verstärken. Einen je nach Konzentration leicht synergistisch bis subadditiven Effekt zeigten MDA-MB-453 (Mamma-Ca), einen additiv bis subadditiven A-549 (Bronchial-Ca), HCT-15 (Colon-Ca) und FADU (Pharynx-Ca), einen subadditiven DU-145 (Prostata-Ca) und RD-ES (Ewing-Sarkom).

In der Literatur gibt es einige Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Alkylphosphocholinen und Bestrahlung im Hinblick auf die Apoptoseinduktion. So kann Perifosin[®] in vitro die strahleninduzierte Apoptose in KB-Zellen (Cervix-Ca) synergistisch verstärken (Vink, Lagerwerf et al. 2006). In Leukämiezelllinien erweisen sich Miltefosin[®] und Perifosin[®] additiv wirksam, Edelfosin[®] zeigt einen synergistischen Effekt (Ruiter, Zerp et al. 1999). Rübél et al. untersuchten Glioblastomzelllinien mit Erucylphosphocholin und Erufosin und fanden in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Konzentration synergistische bis subadditive Effekte (Rübél, Handrick et al. 2006). Prinzipiell stimmen die Resultate bei den hier durchgeführten Experimenten mit den Ergebnissen aus der Literatur überein. Die strahleninduzierte Apoptoseinduktion wird durch Erufosin verstärkt. Ein leicht synergistischer Effekt ist allerdings nur beim Mammakarzinom MDA-MB-453 aufgetreten, sonst war er additiv bis subadditiv. Ein eventueller Fehler bei der Beschreibung der Effekte

könnte im experimentellen Verfahren liegen. Die Anfärbung und Auszählung am Mikroskop ist mit hohen Standardabweichungen behaftet, so dass es schwierig ist die Kombinationseffekte exakt zu quantifizieren. Alternativ könnte hier die Durchflusszytometrie verwendet werden. Außerdem waren natürlich die verwendeten Zellen andere. Darüber hinaus ist wichtig zu bedenken, dass bei den sechs hier untersuchten Zelllinien nur zu einem Zeitpunkt gemessen wurde (48h nach der Behandlung). Es ist durchaus denkbar, dass zu anderen Zeitpunkten ein synergistischer Effekt aufgetreten wäre.

Außerdem gab es bei einigen Zelllinien eine Diskrepanz zwischen WST1-Assay und Apoptosemessung bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung oder Erufosin. HCT-15- und FADU-Zellen zeigten sich im Apoptoseassay weniger strahlensensibel als erwartet, RDES-Zellen waren erufosinsensibler und DU-145-Zellen waren strahlenresistenter und Erufosin wirkte bei ihnen bereits bei niedrigen Dosen. Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung könnte die unterschiedliche Behandlungsmodalität in den beiden Experimenten sein. Im einen Fall wurde die Zytotoxizität und Proliferationsinhibition nach 5-8d gemessen, im anderen Fall die frühe Apoptoseinduktion nach 48h. Die Apoptosemessung scheint also nicht indikativ für den Effekt der Behandlung auf das Gesamtüberleben im WST1-Assay zu sein, es müssen wohl noch andere Effekte eine Rolle spielen.

Obwohl eine exakte Quantifizierung des Kombinationseffektes bei der hier eingesetzten Methode etwas problematisch war, erhielt man doch sehr schnell einen Überblick über das Absterbeverhalten der Zellen. Durch den Einsatz von Erufosin nahm die frühe strahleninduzierte Apoptose bei den untersuchten Zelllinien zu.

9.2.3 Vergleich von Erufosin mit anderen in der Radioonkologie eingesetzten Substanzen

Die häufigsten Chemotherapeutika, die in der Klinik in Kombination mit Bestrahlung eingesetzt werden, sind Cisplatin, 5-Fluorouracil, Taxane, Temozolomid, Gemcitabin und Mitomycin. Ihnen gemeinsam ist, dass sie alle eine dosislimitierende Toxizität, insbesondere Myelosuppression und gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, aufweisen. Erufosin hingegen wird in der aktuellen Phase I Studie (Dr. med. Lindner, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, LMU München) bis jetzt sehr gut von allen Patienten nahezu nebenwirkungsfrei vertragen. Bei den anderen bereits in klinischen Studien getesteten Alkylphosphocholinen (Miltefosin[®], Edelfosin[®], Perifosin[®]) war bisher bei nur oraler Verabreichungsmöglichkeit die gastrointestinale

Toxizität dosislimitierend, eine Myelosuppression trat nicht auf. Erufosin wird als erstes Alkylphosphocholin intravenös verabreicht, so dass noch nicht endgültig klar ist, welche Symptome dosislimitierend sein werden. Besonders interessant scheint der Vergleich von Erufosin mit Temozolomid. Temozolomid wird zur Therapie des Glioblastoma multiforme eingesetzt, in Kombination mit Bestrahlung und Operation konnte die mittlere Überlebenszeit auf 14 Monate verbessert werden (Weller 2005). Erufosin kann wie die übrigen Alkylphosphocholine in Gegensatz zu den meisten anderen Chemotherapeutika auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999) und kommt deshalb als mögliche neue oder zusätzliche Therapieoption in Kombination mit Strahlentherapie beim Glioblastom in Frage. Temozolomid zeigte bei präklinischen in-vitro-Untersuchungen additive Effekte in einem Proliferationsassay, welches den WST1-Assay sehr ähnlich ist (Wedge, Porteous et al. 1997). Van Rijn et al. konnten additive und synergistische Effekte mit Hilfe des Koloniebildungstests nachweisen (van Rijn, Heimans et al. 2000). Beim Einsatz von Temozolomid in der Klinik konnte dann zusammen mit Bestrahlung und Operation das mittlere Überleben beim Glioblastom von 12 auf 14 Monate verlängert werden (Weller 2005).

9.2.4 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen

Wie in der Einleitung bereits angesprochen ist es für den Erfolg des Einsatzes von Radiochemotherapie in der Onkologie entscheidend, dass durch die zusätzliche Anwendung des Chemotherapeutikums mehr Tumorzellen abgetötet werden als durch die alleinige Bestrahlung. Alkylphosphocholine im Allgemeinen und speziell das hier untersuchte Erufosin haben in vitro die Eigenschaft in Kombination mit Bestrahlung mehr Tumorzellen abzutöten und die frühe Apoptoseinduktion zu erhöhen. Aufgrund der viel versprechenden pharmakokinetischen (erstmalig intravenöse Applizierbarkeit, da keine Hämolyse) und pharmakodynamischen (keine dosislimitierende gastrointestinale Toxizität wie die anderen Alkylphosphocholine, keine Myelosuppression wie andere Chemotherapeutika) Eigenschaften von Erufosin sollte eine mögliche Kombinationstherapie am Patienten auf jeden Fall weiter untersucht werden. Als besonders empfindlich für alleinige Erufosinbehandlung waren SK-LMS1 (Leiomyosarkom), DU-145 (Prostata-Ca), NCI-H460 (Bronchial-Ca), T98G, U-373MG (beide Glioblastom), KB (Zervix-Ca), FADU (Pharynx-Ca), HCT-15, HT-29 (beide Kolon-Ca) und PC-3 (Prostata-Ca). Gegenüber der Kombinationstherapie ergaben sich bei folgenden Zelllinien additive Effekte: A-549

Diskussion

(Bronchial-Ca), MCF-7 (Mamma-Ca), SK-LMS1 (Leiomyosarkom), NCI-H460 (Bronchial-Ca), DU-145 (Prostata-Ca), RD-ES (Ewing-Sarkom), KB (Zervix-Ca), FADU (Pharynx-Ca).

10 Zusammenfassung und Ausblick

Erufosin (Erucylphosphocholin, ErPC₃) ist ein neuer Wirkstoff aus der Substanzklasse der Alkylphosphocholine, deren Angriffspunkt nicht die DNA, sondern die Zellmembran ist. Die Alkylphosphocholine lagern sich dort ein, beeinflussen die Lipidzusammensetzung, den Lipidmetabolismus und agieren durch Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen unter anderem als Apoptoseinduktoren. Seit Januar 2004 wird mit Erufosin eine Phase I Studie durchgeführt (Dr. med. Lars Lindner, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, LMU München, unpubliziert). Nach Abschluss der Studie wird sich für die folgenden Phase II Studien die Frage nach möglichen Kombinationsmöglichkeiten mit klassischer Chemotherapie oder auch Strahlentherapie stellen. Aufgrund der fehlenden myelosuppressiven Aktivität und der bislang guten Verträglichkeit (fehlende gastrointestinale Toxizität) eignet sich Erufosin insbesondere als Kombinationspartner für weitere toxische Therapieprinzipien wie z.B. Strahlentherapie. Für verschiedene andere, zum Teil bereits klinisch eingesetzte Alkylphosphocholine (Miltefosin[®], Perifosin[®]) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie die strahleninduzierte Apoptose verstärken und das klonogene Gesamtüberleben reduzieren, beides zum Teil sogar synergistisch. Eine Phase I Studie zum Einsatz von Strahlentherapie und Perifosin[®] wurde in den Niederlanden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Verträglichkeit der Kombinationsbehandlung (Vink, Schellens et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde anhand von Zellkulturexperimenten an 14 humanen Zelllinien von für Strahlentherapie in Frage kommenden Tumorentitäten die Kombinationswirkung von Erufosin und Strahlentherapie untersucht. Um die Bestimmung des klonogenen Überlebens zu simulieren wurde das WST1-Zellproliferationsassay verwendet. Die Tumorzellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät, mit Erufosin und Bestrahlung behandelt und die Zellzahl nach 5-8 Tagen Inkubation mit WST1-Reagenz gemessen. Dabei handelt es sich um eine Substanz, die von lebenden Zellen verstoffwechselt wird und der Metabolit photometrisch mit dem ELISA-Reader bestimmt werden kann. Zusätzlich wurde bei 6 Zelllinien die Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die frühe Apoptoseinduktion untersucht. Hierzu wurden die Zellen ausgesät, behandelt und nach 48h mit Propidiumiodid und Hoechst 33342 angefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der apoptotischen Zellen am Fluoreszenzmikroskop. Zur Quantifizierung der Kombinationseffekte wurde die isobolographische Analyse eingesetzt.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten in unterschiedlicher Empfindlichkeit ein Ansprechen auf Bestrahlung und Erufosin. Die Strahlenwirkung konnte durch Zugabe von Erufosin verstärkt werden, so dass das mehr Tumorzellen abstarben bzw. die frühe Apoptoseinduktion zunahm. In der isobolographischen Analyse ergaben sich subadditive bis additive Effekte. Besonders empfindlich für die Kombinationsbehandlung zeigten sich mit additiven Effekten A-549 (Bronchial-Ca), MCF-7 (Mamma-Ca), SK-LMS1 (Leiomyosarkom), NCI-H460 (Bronchial-Ca), DU-145 (Prostata-Ca), RD-ES (Ewing-Sarkom), KB (Zervix-Ca), FADU (Pharynx-Ca). Angesichts der Verstärkung des Strahleneffekts im Bezug auf Gesamtüberleben, der frühen Apoptoseinduktion bei Tumorzellen und dem bisher viel versprechenden Einsatz in der Klinik sollte die Kombination aus Erufosin und Strahlentherapie experimentell und klinisch weiter evaluiert werden.

11 Literaturverzeichnis

- Andreesen, R., J. Osterholz, et al. (1984). "Tumor cytotoxicity of human macrophages after incubation with synthetic analogues of 2-lysophosphatidylcholine." J Natl Cancer Inst **72**(1): 53-9.
- Bamberg, M., M. Molls, et al. (2003). Radioonkologie Grundlagen. München, Zuckerschwerdt.
- Baumann, M. and M. Molls (2003). Die "4Rs" der Strahlentherapie und prädiktive Tests. Radioonkologie Grundlagen. M. Bamberg, M. Molls and H. Sack. München, Zuckerschwerdt Verlag: 220-228.
- Becher, R., O. Kloke, et al. (1993). "Phase 2 trial of orally administered miltefosine in advanced colorectal cancer." Onkologie **16**: 11-5.
- Belka, C., M. Abend, et al. (2003). Mechanismen und Formen des Zelltodes. Radioonkologie Grundlagen. M. Bamberg, M. Molls and H. Sack. München, Zuckerschwerdt: 208-19.
- Belka, C., V. Jendrossek, et al. (2004). "Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(2): 542-54.
- Belloc, F., P. Dumain, et al. (1994). "A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells." Cytometry **17**(1): 59-65.
- Berdel, W. E., R. Becher, et al. (1992). "Daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with advanced non small cell lung cancer. A Phase 2 Study." Onkologie **15**: 238-42.
- Berdel, W. E., U. Fink, et al. (1987). "Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃." Lipids **22**(11): 967-9.
- Berdel, W. E., M. Fromm, et al. (1983). "Cytotoxicity of thioether-lysophospholipids in leukemias and tumors of human origin." Cancer Res **43**(11): 5538-43.
- Berdel, W. E., D. D. Von Hoff, et al. (1986). "Ether lipid derivatives: antineoplastic activity in vitro and the structure-activity relationship." Lipids **21**(4): 301-4.
- Berenbaum, M. C. (1978). "A method for testing for synergy with any number of agents." J Infect Dis **137**(2): 122-30.
- Berenbaum, M. C. (1989). "What is synergy?" Pharmacol Rev **41**(2): 93-141.
- Berger, M. R., S. Sobottka, et al. (1998). "Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines." Drugs Today **34**: 73-81.
- Berger, M. R., P. Yanapirut, et al. (1992). "Antitumor activity of alkylphosphocholines and analogues in methylnitrosourea-induced rat mammary carcinomas." Prog Exp Tumor Res **34**: 98-115.
- Berkovic, D., M. Bensch, et al. (2001). "Effects of hexadecylphosphocholine on thrombocytopoiesis." Eur J Cancer **37**(4): 503-11.
- Berkovic, D., O. Grundel, et al. (1997). "Synergistic cytotoxic effects of ether phospholipid analogues and ionizing radiation in human carcinoma cells." Radiother Oncol **43**(3): 293-301.
- Berkovic, D., U. Grunwald, et al. (1995). "Effects of hexadecylphosphocholine on membrane phospholipid metabolism in human tumour cells." Eur J Cancer **31A**(12): 2080-5.
- Bernhard, E. J., W. G. McKenna, et al. (1999). "Radiosensitivity and the cell cycle." Cancer J Sci Am **5**(4): 194-204.
- Berridge, M. V. (1996). "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts." Biochemica **4**: 14-9.

- Boggs, K. P., C. O. Rock, et al. (1995). "Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step." J Biol Chem **270**(13): 7757-64.
- Breiser, A., D. J. Kim, et al. (1987). "Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice." Lipids **22**(11): 925-6.
- Bruyneel, E. A., G. A. Storme, et al. (1993). "Evidence for abrogation of oncogene-induced radioresistance of mammary cancer cells by hexadecylphosphocholine in vitro." Eur J Cancer **29A**(14): 1958-63.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, et al. (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity." Cancer Res **47**(4): 943-6.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology **193**(1-2): 3-34.
- Crul, M., H. Rosing, et al. (2002). "Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours." Eur J Cancer **38**(12): 1615-21.
- Danhauser, S., W. E. Berdel, et al. (1987). "Structure-cytotoxicity studies on alkyl lysophospholipids and some analogs in leukemic blasts of human origin in vitro." Lipids **22**(11): 911-5.
- Dummer, R., M. Krasovec, et al. (1993). "Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study." J Am Acad Dermatol **29**(6): 963-70.
- Eibl, H. and C. Unger (1990). "Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug." Cancer Treat Rev **17**(2-3): 233-42.
- Erbar, P. (1995). Onkologie. Stuttgart, Schattauer.
- Erdlenbruch, B., V. Jendrossek, et al. (1999). "Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration." Cancer Chemother Pharmacol **44**(6): 484-90.
- Erdlenbruch, B., V. Jendrossek, et al. (1998). "Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo." Anticancer Res **18**(4A): 2551-7.
- Ernst, D. S., E. Eisenhauer, et al. (2005). "Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma." Invest New Drugs **23**(6): 569-75.
- Forrester, H. B., C. A. Vidair, et al. (1999). "Using computerized video time lapse for quantifying cell death of X-irradiated rat embryo cells transfected with c-myc or c-Ha-ras." Cancer Res **59**(4): 931-9.
- Fu, K. K. (1985). "Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy." Cancer **55**(9 Suppl): 2123-30.
- Gajate, C. and F. Mollinedo (2001). "The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells." Blood **98**(13): 3860-3.
- Georgieva, M. C., S. M. Konstantinov, et al. (2002). "Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells." Cancer Lett **182**(2): 163-74.
- Goekjian, P. G. and M. R. Jirousek (2001). "Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs." Expert Opin Investig Drugs **10**(12): 2117-40.
- Grant, S., R. Traylor, et al. (1994). "The macrocyclic lactone protein kinase C activator, bryostatin 1, either alone, or in conjunction with recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, protects Balb/c and C3H/HeN mice from the lethal in vivo effects of ionizing radiation." Blood **83**(3): 663-7.

- Grunicke, H. H., K. Maly, et al. (1996). "Cellular signalling as a target in cancer chemotherapy. Phospholipid analogues as inhibitors of mitogenic signal transduction." Adv Enzyme Regul **36**: 385-407.
- Hallahan, D. E., S. Virudachalam, et al. (1992). "Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation." Radiat Res **129**(3): 345-50.
- Hannun, Y. A. (1997). "Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy." Blood **89**(6): 1845-53.
- Herrmann, D. B. (1985). "Changes in cellular lipid synthesis of normal and neoplastic cells during cytolysis induced by alkyl lysophospholipid analogues." J Natl Cancer Inst **75**(3): 423-30.
- Hilgard, P., T. Klenner, et al. (1997). "D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumor activity." Eur J Cancer **33**(3): 442-6.
- Himmelman, A. W., S. Danhauser-Riedl, et al. (1990). "Cross-resistance pattern of cell lines selected for resistance towards different cytotoxic drugs to membrane-toxic phospholipids in vitro." Cancer Chemother Pharmacol **26**(6): 437-43.
- Houlihan, W. J., M. Lohmeyer, et al. (1995). "Phospholipid antitumor agents." Med Res Rev **15**(3): 157-223.
- Howard, A. and S. R. Pelc (1951). "Synthesis of nucleoprotein in bean root cells." Nature **167**(4250): 599-600.
- Howard, A. and S. R. Pelc (1953). "Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage." Heredity **6**: 261-73.
- Iliakis, G. (1997). "Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells." Semin Oncol **24**(6): 602-15.
- Iliakis, G. and P. Tamulevicius (2003). DNA-Reparatur und Checkpoint-Aktivierung. Radioonkologie Grundlagen. M. Bamberg, M. Molls and H. Sack. München, Zuckerschwerdt Verlag: 191-207.
- Jeggo, P. A. (1998). "DNA breakage and repair." Adv Genet **38**: 185-218.
- Jendrossek, V., B. Erdlenbruch, et al. (1999). "Erucylphosphocholine, a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines in vitro." Int J Oncol **14**(1): 15-22.
- Jendrossek, V., K. Hammersen, et al. (2002). "Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro." Cancer Chemother Pharmacol **50**(1): 71-9.
- Jendrossek, V. and R. Handrick (2003). "Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers." Curr Med Chem Anticancer Agents **3**(5): 343-53.
- Jendrossek, V., W. Kugler, et al. (2001). "Induction of differentiation and tetraploidy by long-term treatment of C6 rat glioma cells with erucylphosphocholine." Int J Oncol **19**(4): 673-80.
- Jendrossek, V., W. Kugler, et al. (2001). "Erucylphosphocholine-induced apoptosis in chemoresistant glioblastoma cell lines: involvement of caspase activation and mitochondrial alterations." Anticancer Res **21**(5): 3389-96.
- Jendrossek, V., I. Muller, et al. (2003). "Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis." Oncogene **22**(17): 2621-31.
- Kaufmann-Kolle, P., J. Drevs, et al. (1994). "Pharmacokinetic behavior and antineoplastic activity of liposomal hexadecylphosphocholine." Cancer Chemother Pharmacol **34**(5): 393-8.
- Knowling, M., M. Blackstein, et al. (2006). "A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial." Invest New Drugs.

- Kolesnick, R. and Z. Fuks (2003). "Radiation and ceramide-induced apoptosis." *Oncogene* **22**(37): 5897-906.
- Kondapaka, S. B., S. S. Singh, et al. (2003). "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation." *Mol Cancer Ther* **2**(11): 1093-103.
- Konstantinov, S. M. and M. R. Berger (1999). "Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines." *Cancer Lett* **144**(2): 153-60.
- Kotting, J., M. R. Berger, et al. (1992). "Alkylphosphocholines: influence of structural variation on biodistribution at antineoplastically active concentrations." *Cancer Chemother Pharmacol* **30**(2): 105-12.
- Kugler, W., B. Erdlenbruch, et al. (2002). "Erucylphosphocholine-induced apoptosis in glioma cells: involvement of death receptor signalling and caspase activation." *J Neurochem* **82**(5): 1160-70.
- Kuhlencord, A., T. Maniera, et al. (1992). "Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice." *Antimicrob Agents Chemother* **36**(8): 1630-4.
- Lasserre, A. and L. Blohm (2003). *Kurzlehrbuch Radiologie*. München, Jena, Urban und Fischer.
- Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." *Bioessays* **25**(9): 888-96.
- Leonard, R., J. Hardy, et al. (2001). "Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer." *J Clin Oncol* **19**(21): 4150-9.
- Lindl, T. (2000). Langzeitlagerung- und Kryokonservierung von Zellen. *Zell- und Gewebekultur*. T. Lindl. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 110-3.
- Lucas, L., R. Hernandez-Alcoceba, et al. (2001). "Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity." *Oncogene* **20**(9): 1110-7.
- Magistrelli, A., P. Villa, et al. (1995). "Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver." *Drug Metab Dispos* **23**(1): 113-8.
- Maity, A., W. G. McKenna, et al. (1994). "The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review." *Radiother Oncol* **31**(1): 1-13.
- Matzke, A., U. Massing, et al. (2001). "Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95." *Eur J Cell Biol* **80**(1): 1-10.
- McGarrity, G. J., V. Vanaman, et al. (1984). "Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review." *In Vitro* **20**(1): 1-18.
- Mitchell, J. B. (1988). "Potential applicability of nonclonogenic measurements to clinical oncology." *Radiat Res* **114**(3): 401-14.
- Molls, M. (2003). Verstärkung der Strahlenwirkung: Zytostatika und Sensitizer, biologische Substanzen und Gentherapie. *Radioonkologie Grundlagen*. M. Bamberg, M. Molls and H. Sack. München, Zuckerschwerdt: 274-92.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Nicklas, W. and P. Mauter (1988). "[Experiences with the demonstration of Mycoplasma in cell cultures]." *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **267**(4): 510-8.
- Nosedá, A., M. E. Berens, et al. (1988). "In vitro antiproliferative activity of combinations of ether lipid analogues and DNA-interactive agents against human tumor cells." *Cancer Res* **48**(7): 1788-91.
- Pauig, S. B. and L. W. Daniel (1996). "Protein kinase C inhibition by ET-18-OCH₃ and related analogs. A target for cancer chemotherapy." *Adv Exp Med Biol* **416**: 173-80.
- Planting, A. S., G. Stoter, et al. (1993). "Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer." *Eur J Cancer* **29A**(4): 518-9.

- Posadas, E. M., J. Gulley, et al. (2005). "A Phase II Study of Perifosine in Androgen Independent Prostate Cancer." Cancer Biol Ther **4**(10): 1133-7.
- Powis, G., M. J. Seewald, et al. (1992). "Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues." Cancer Res **52**(10): 2835-40.
- Price, P. and T. J. McMillan (1990). "Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation." Cancer Res **50**(5): 1392-6.
- Pronk, L. C., A. S. Planting, et al. (1994). "Increases in leucocyte and platelet counts induced by the alkyl phospholipid hexadecylphosphocholine." Eur J Cancer **30A**(7): 1019-22.
- Rubel, A., R. Handrick, et al. (2006). "The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro." Radiation Oncology **1**:6.
- Ruiter, G. A., S. F. Zerp, et al. (1999). "Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis." Cancer Res **59**(10): 2457-63.
- Ruiter, G. A., S. F. Zerp, et al. (2003). "Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway." Anticancer Drugs **14**(2): 167-73.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips, et al. (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 332-7.
- Schallier, D. C., E. A. Bruyneel, et al. (1991). "Antiinvasive activity of hexadecylphosphocholine in vitro." Anticancer Res **11**(3): 1285-92.
- Scherer, E. and H. Sack (1996). Strahlentherapie: Radiologische Onkologie. Berlin Heidelberg, Springer.
- Seifert, K., M. Duchene, et al. (2001). "Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*." Antimicrob Agents Chemother **45**(5): 1505-10.
- Slavotinek, A., T. J. McMillan, et al. (1994). "Measurement of radiation survival using the MTT assay." Eur J Cancer **30A**(9): 1376-82.
- Sobottka, S. B. and M. R. Berger (1992). "Assessment of antineoplastic agents by MTT assay: partial underestimation of antiproliferative properties." Cancer Chemother Pharmacol **30**(5): 385-93.
- Steel, G. G. (2002). Cell survival as determinant of tumor response. Basic Clinical Radiobiology. G. G. Steel. London, Arnold: 52-7.
- Steel, G. G. and M. J. Peckham (1979). "Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity." Int J Radiat Oncol Biol Phys **5**(1): 85-91.
- Stekar, J., P. Hilgard, et al. (1995). "Opposite effect of miltefosine on the antineoplastic activity and haematological toxicity of cyclophosphamide." Eur J Cancer **31A**(3): 372-4.
- Streffler, C. (1996). Biologische Grundlagen der Strahlentherapie. Strahlentherapie: Radiologische Onkologie. E. Scherer and H. Sack. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. **4**: 109-53.
- Sundar, S., T. K. Jha, et al. (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **347**(22): 1739-46.
- Thompson, L. H. and D. Schild (2002). "Recombinational DNA repair and human disease." Mutat Res **509**(1-2): 49-78.
- Timmer-Bosscha, H., E. G. de Vries, et al. (1998). "Differential effects of all-trans-retinoic acid, docosahexaenoic acid, and hexadecylphosphocholine on cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in a cisplatin-sensitive and resistant human embryonal carcinoma cell line." Cancer Chemother Pharmacol **41**(6): 469-76.
- Unger, C., W. Damenz, et al. (1989). "Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo." Acta Oncol **28**(2): 213-7.

- Unger, C., M. Peukert, et al. (1990). "Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients." Cancer Treat Rev **17**(2-3): 243-6.
- van Blitterswijk, W. J., H. Hilkmann, et al. (1987). "Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion." Lipids **22**(11): 820-3.
- van Rijn, J., J. J. Heimans, et al. (2000). "Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays." Int J Radiat Oncol Biol Phys **47**(3): 779-84.
- Van Ummersen, L., K. Binger, et al. (2004). "A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer." Clin Cancer Res **10**(22): 7450-6.
- Vehmeier, K., H. Eibl, et al. (1992). "Hexadecylphosphocholine stimulates the colony-stimulating factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells." Exp Hematol **20**(1): 1-5.
- Vehmeier, K., T. Liersch, et al. (1992). "Hexadecylphosphocholine amplifies the effect of granulocyte colony-stimulating factor on differentiating hematopoietic progenitor cells." Prog Exp Tumor Res **34**: 69-76.
- Verweij, J., D. Gandia, et al. (1993). "Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer." Eur J Cancer **29A**(5): 778-9.
- Verweij, J., K. Krzemieniecki, et al. (1993). "Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult--an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study." Eur J Cancer **29A**(2): 208-9.
- Verweij, J., A. Planting, et al. (1992). "A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours." J Cancer Res Clin Oncol **118**(8): 606-8.
- Vink, S. R., S. Lagerwerf, et al. (2006). "Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts." Clin Cancer Res **12**(5): 1615-22.
- Vink, S. R., J. H. Schellens, et al. (2006). "Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours." Radiother Oncol **80**(2): 207-13.
- Vink, S. R., W. J. van Blitterswijk, et al. (2007). "Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy." Cancer Treat Rev **33**(2): 191-202.
- Vogler, W. R. and W. E. Berdel (1993). "Autologous bone marrow transplantation with alkyl-lysophospholipid-purged marrow." J Hematother **2**(1): 93-102.
- Vollenweider, I. and P. Groscurth (1992). "Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer (LAK) cells." J Immunol Methods **149**(1): 133-5.
- Walochnik, J., M. Duchene, et al. (2002). "Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 695-701.
- Wasserman, M. (1993). "Mycoplasma contamination in cell culture." Am Biotechnol Lab **11**(1): 10-2.
- Wasserman, T. H. and P. Twentyman (1988). "Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **15**(3): 699-702.
- Wedge, S. R., J. K. Porteous, et al. (1997). "In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation." Anticancer Drugs **8**(1): 92-7.
- Weller, M. (2005). "[Standards and new developments in the chemotherapy of glioblastomas]." Dtsch Med Wochenschr **130**(40): 2270-4.

- Wieder, T., A. Haase, et al. (1995). "The effect of two synthetic phospholipids on cell proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells." Lipids **30**(5): 389-93.
- Wieder, T., C. E. Orfanos, et al. (1998). "Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine." J Biol Chem **273**(18): 11025-31.
- Zhou, X., X. Lu, et al. (1996). "1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells." J Clin Invest **98**(4): 937-44.

12 Danksagung

Meinem Betreuer Dr. Lars Lindner gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die seelische Unterstützung während der Anfertigung meiner Arbeit.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III in Großhadern, danke ich dafür, dass er mir ermöglicht hat als Doktorand an der Universität München tätig zu werden.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der AG Liposomen, insbesondere Dr. Martin Hossann und Nicole Teichert, die mir bei Problemen immer sehr hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen, herzlich danken. Erinnern möchte ich hier auch an Herrn Detlev Kiel, der mir während meiner ersten Wochen im Labor mit viel Engagement eine große Hilfe war.

Doreen Hammer und Christoph v. Hesler aus der klinischen Kooperationsgruppe Hyperthermie der GSF sowie deren Leiter Prof. Dr. Rolf Issels gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit bei der Bestrahlung der Zellen und der Zellkultur.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. Schaffer und Frau Dr. Ulrike Kulka aus der Klinik für Strahlentherapie in Großhadern, die mich besonders am Anfang meiner Arbeit bei der Etablierung des WST1-Tests mit wertvollen Ratschlägen unterstützten und mir eine Möglichkeit zur Bestrahlung der Zellen stellten.

Eine große Hilfe war auch die Kooperation mit der Klinik für Radioonkologie am Universitätsklinikum Tübingen. Prof. Dr. Claus Belka, Prof. Dr. Verena Jendrossek, Amelie Rübél und Maximilian Nyazi unterstützten mich bei Einarbeitung in die Apoptoseversuche und halfen mir bei der Auswertung der Daten, insbesondere der isobographischen Analyse.

Daneben möchte ich Dr. Manfred Ogris aus dem Institut für pharmazeutische Biologie der Universität München für die Möglichkeit danken, meine Versuche am Fluoreszenzmikroskop auszuwerten.

Außerdem möchte ich noch Prof. Hansjörg Eibl vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen für die Synthese und Bereitstellung des Erufosins danken.

Zuletzt möchte ich auch meiner Familie für ihre Unterstützung während der Doktorarbeit und des gesamten Studiums danken.

13 Lebenslauf

Ich, Matthias Steiger, wurde am 25.01.1982 in Deggendorf geboren. Von 1988 bis 1992 besuchte ich die Grundschule St. Michael in Schwabmünchen und von 1992 bis 2001 das Leonhard-Wagner-Gymnasium in Schwabmünchen, an dem ich im Juni 2001 die Abiturprüfung ablegte.

Mein Medizinstudium begann ich im Oktober 2001 an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im September 2003 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung.

Nach einem vierwöchigen Laborpraktikum in der AG Liposomen bei Dr. Lars Lindner (Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, München) im Juni 2004 entschloss ich mich in dieser Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen.

Die Famulaturen im Laufe meines Medizinstudiums waren in den Fachgebieten Innere Medizin (St. Hedwig Krankenhaus, Berlin und Victoria Hospital, Mahe, Seychellen) und Pathologie (Pathologisches Institut, Universität München) sowie in einer Hausarztpraxis. Außerdem absolvierte ich im Oktober 2004 den ersten Teil des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step1).

Mein Praktisches Jahr verbrachte ich am Klinikum Großhadern in München in der Neurologischen Klinik, in der Medizinischen Klinik I und in der Chirurgischen Klinik sowie an der Yale University School of Medicine, Department of Internal Medicine, Yale New Haven Hospital, New Haven, USA.

Im November 2007 schloss ich das Medizinstudium mit dem zweiten Staatsexamen ab.

Im Rahmen der Kooperation mit der AG Prof. Belka / Prof. Jendrossek (Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen) entstand folgende Publikation:

Rubel, A., Handrick, R., Lindner, L. H., Steiger, M., Eibl, H., Budach, W., Belka, C., Jendrossek, V. "The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro." Radiation Oncology, Volume 1:6, 2006