

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Roosen

**Wirkung der Antibiotika
Doxycyclin und Cefotaxim auf die MMP-Expression,
sowie Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasion bei
Glioblastomzelllinien**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius- Maximilians- Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Katharina Gerda Dette
aus Gotha

Würzburg, März 2007

Referent: Professor Dr. med K. Roosen

Koreferent: Professor Dr. med W. Roggendorf

Dekan: Professor Dr. med G. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2007

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumoren des ZNS	1
1.2	Gliome	1
1.2.1	Klassifikation	2
1.2.2	Klinik, Therapie, Prognose	2
1.3	Glioblastoma multiforme	3
1.3.1	Ätiologie	4
1.3.2	Histologie	5
1.3.3	Klinik und Diagnostik	6
1.3.4	Therapie und Prognose	7
1.3.5	Alternative Therapieansätze	9
1.3.5.1	EGFR-Inhibition	9
1.3.5.2	Gentherapie (Transfektion)	10
1.3.5.3	Immunologische Therapie	10
1.3.5.4	Inhibition von Matrixmetalloproteinasen	11
1.4	Extrazellulärmatrix	11
1.4.1	Matrixmetalloproteinasen	12
1.4.2	Matrixmetalloproteinasen in Glioblastomen	14
1.4.3	Inhibition von Matrixmetalloproteinasen in der Anti-Tumor-Therapie ..	14
1.5	Zwei Antibiotika und ihre Anwendung	15
1.5.1	Doxycyclin	15
1.5.2	Cefotaxim	17
2	Material.....	19
2.1	Geräte und Laborhilfen	19
2.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.3	Chemikalien	20

2.4	Medikamente	21
2.5	Reagentien für die Zellkultur	22
2.6	Antikörper und Reagentien für Immunhistochemie	22
2.7	Enzyme, Puffer und rekombinierte Moleküle	22
2.8	Nukleinsäuren	23
2.9	Zelllinien und Primärkulturen	23
3	Methoden	24
3.1	Zellbiologische Methoden	24
3.1.1	Allgemeines	24
3.1.2	Zellkulturmedien	25
3.1.3	Monolayer-Zellkultur von Glioblastom-Zelllinien	25
3.1.4	Beimpfung der Zellkulturflaschen mit Antibiotika	26
3.1.5	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	26
3.1.6	Zellzählung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	27
3.1.7	MTT – Proliferationsassay	27
3.1.8	Adhäsionsassay (Amidoblack-Assay)	28
3.1.9	Anlegen von Tumorsphäroiden	28
3.1.10	Picken von Sphäroiden	29
3.1.11	Migrationsassay	29
3.1.12	Invasionsassay	30
3.2	Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1	RNA – Isolierung	31
3.2.2	Photometrische Quantifizierung der aufgereinigten RNA	32
3.2.3	Reverse Transkription (cDNA – Synthese)	32
3.2.4	PCR	33
3.3	Proteinbiologische Methoden	37
3.3.1	Immunhistochemie	37
3.3.2	Apoptosefärbung	39
3.4	Statistische Auswertung.....	40

4	Ergebnisse.....	41
4.1	MTT	41
4.2	Adhäsionsassay (Amidoblack-Assay)	43
4.3	Migrationsassay	45
4.4	Invasionsassay	51
	4.4.1 Invasionsassay der Zelllinien	51
	4.4.2 Invasionsassay der Primärzelllinien	55
4.5	PCR	58
4.6	Immunhistochemie	61
4.7	Apoptosefärbung	67
5	Diskussion	69
5.1	MMPs	69
5.2	Klinische Bedeutung der MMP-Inhibitoren	70
	5.2.1 Klinisch relevante MMP-Inhibitoren IN – VITRO	70
	5.2.2 Klinisch relevante MMP-Inhibitoren IN – VIVO	77
5.3	Bedeutung der MMP- Inhibition im Zellkulturversuch für Tetracyclin- regulierbare Expressionssysteme	79
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Abkürzungsverzeichnis	97
9	Veröffentlichungen	99

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Tumoren des ZNS

Im menschlichen Gehirn kommen sowohl primäre als auch sekundäre Hirntumoren vor. Primäre (hirneigene) Hirntumoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ihren Ursprung im Zentralen Nervensystems (ZNS) haben. Ihre Häufigkeit liegt weltweit bei 5.7/100 000, wobei starke regionale Unterschiede auftreten.

Sekundäre Hirntumoren machen 15% des neuro-onkologischen Krankengutes aus. Die häufigsten Primärtumoren von zerebralen Metastasen sind das Bronchuskarzinom (32%), das Mammakarzinom (21%), das Hypernephrom (12%), das Adenokarzinom (11%) und das Melanom (11%).

Die 1979 von der WHO festgelegte und zuletzt 2000 überarbeitete Klassifikation unterteilt Hirntumoren in 9 Typen: Neuroepitheliale Tumoren, Tumoren der Meningen, Tumoren der Hirnnerven, hämatopoetische Neoplasien, Keimzelltumoren, Missbildungstumoren, Tumoren der Sellaregion, regionalen Tumoren und Metastasen.

1.2 Gliome

Etwa die Hälfte aller primären Hirntumoren sind Gliome. Sie werden zu den neuroepithelialen Tumoren gezählt und vom Stützgewebe des Hirnparenchyms, der Neuroglia, gebildet. Aufgrund ihrer für sie typischen diffusen Ausbreitung und Infiltration des umliegenden Hirngewebes und daraus resultierender unscharfer Tumorgrenzen ist bis heute in den meisten Fällen keine komplette Heilung möglich.

1.2.1 Klassifikation

Die Einteilung der Gliome erfolgt nach der Differenzierung ihrer glialen Ursprungszelle in astrozytäre Tumoren, oligodendrogliale Tumoren, ependymale Tumoren, gemischte Gliome und Tumoren des Plexus choroideus (Kleihues et al., 2000).

Differenziert werden können diese Hirntumoren nach ihrem Ausbreitungsmuster, zum Beispiel in diffus infiltrierende Tumoren und solche mit begrenzter Ausbreitung. Weitere Differenzierungen können aufgrund des histopathologischen Erscheinungsbildes vorgenommen werden, bei den astrozytären Tumoren beispielsweise in fibrilläre, gemistozelluläre, protoplasmatische und gemischte Astrozytome. Die Prognose ist außerdem stark abhängig von patientenabhängigen Daten wie Alter und Allgemeinzustand. Von entscheidender Bedeutung sind die Qualität und Quantität von Malignitätskriterien. Diese sind vor allem Kernpolymorphie, Zelldichte, Anzahl von Mitosen, Vorhandensein von Nekrosen und endotheliale Proliferation (Greenberg, 2001). Durch das Graduierungssystem der WHO wird die biologische Wertigkeit von Gliomen in 4 Grade eingeteilt, wobei Grad I die niedrigste Malignität und die beste Prognose aufweist, Grad IV die höchste Malignität und entsprechend schlechteste Prognose (Kleihues et al., 1993).

1.2.2 Klinik, Therapie, Prognose

Gliompatienten können durch unterschiedlichste Symptomatik auffällig werden. Entscheidend ist vor allem die Lokalisation des Tumors. Während die niedrig malignen pilozytischen Astrozytome besonders im Kleinhirn oder Hirnstamm, aber auch im Verlauf des Nervus opticus vorkommen und dort zu entsprechenden Symptomen, wie Hirnnervenausfällen, Visus- und Gesichtsfeldverlust führen, findet man maligne Gliome (Grad II-IV) mehrheitlich supratentoriell, was durch Kompression der Zentralregion zu einer Hemisymptomatik führen kann. Neben der Lokalisation bestimmt auch die Geschwindigkeit des Wachstums die Klinik. Hirndruckzeichen, wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Bewusstseinsintrübung sind typisch für schnell wachsende Hirntumoren. Langsam wachsende Tumoren dagegen manifestieren sich häufig durch Krampfanfälle (Salzman, 1980a), so auch das pilozytische Astrozytom.

Therapeutisch kann lediglich bei den pilozytischen Astrozytomen von einer vollständigen Resektion durch chirurgische Intervention ausgegangen werden. Alle anderen Gliome wachsen mehr oder weniger stark infiltrativ und müssen dementsprechend weiteren therapeutischen Maßnahmen ausgesetzt werden. Bei den höhergradigen Gliomen ist eine adjuvante Radiatio sinnvoll und führt bei anaplastischen Gliomen und Glioblastomen zu einer signifikanten Lebensverlängerung (Marks, 1991). Desweiteren ist eine Polychemotherapie möglich. Das PCV- Schema oder die Therapie mit BCNU konnte bei Gliomen eine gute Wirkung erzielen; das beste Ansprechen zeigten anaplastische Oligodendrogliome (Jeremic et al., 1999). Die Prognose der verschiedenen Tumoren konnte durch diese Therapieverfahren zwar verbessert werden, dennoch lag die mittlere Überlebenszeit für Astrozytome Grad II bei 5-8 Jahren, die der Astrozytome Grad III bei 2-4 Jahren, die des Glioblastoma multiforme nur bei 10-12 Monaten (Kim et al., 1991).

WHO-Grad	WHO-Bezeichnung	Dignität	Histologie	Auftreten
I	Pilozytisches Astrozytom	gutartig	Rosenthal-Fasern (zugrundegegangene Gliafilamente), kaum Mitosen	v.a. bei Kindern Epilepsien
II	Niedriggradiges Astrozytom	niedrig maligne	vereinzelt Kernatypien und Mitosen	
III	Anaplastisches Astrozytom	hoch maligne	Kernatypien und Mitosen	
IV	Glioblastoma multiforme	hoch maligne	Zellreichtum und -polymorphien bis hin zu Riesenzellen, viele Mitosen, Kernatypien, ausgeprägte Gefäßneubildungen, Nekrosen	v.a. 50. - 60. Lj.

Abbildung 1: WHO – Klassifikation von astrozytären Tumoren (nach: Kleihues, P., Cevence, W., Journal of Neuropathology and experimantal Neurology, 03/2002)

1.3 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primäre Hirntumor und ist als Grad IV-Astrozytom der mit der höchsten Malignität. (Greenberg, 2001).

1.3.1 Ätiologie

Glioblastome werden nach ihrer Entstehung in primär und sekundär eingeteilt. Über 80% sind primäre Glioblastome und entstehen *de novo* (Dropcho und Soong, 1996). Sekundäre Glioblastome entwickeln sich aus niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytomen.

Der deutsche Neuropathologe Scherer hat erstmals 1940 die beiden Typen beschrieben (Scherer, 1940). Seither wurde viel darüber spekuliert, ob eine histologische Differenzierung möglich sei (Burger und Kleihues, 1989). Bis dato konnte man keine Unterschiede in der Histologie nachweisen. Dennoch konnten molekulargenetische Differenzierungen erhoben werden. Beim sekundären Glioblastom konnte in über 65% der Fälle eine Mutation des p53-Gens, einem Tumorsuppressorgens, nachgewiesen werden, hingegen in weniger als 10% eine Amplifikation des „epidermal growth factor receptors“ (EGFR) (Kleihues und Ohgaki, 1999; Tohma et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde der Transkriptionsfaktor p53 in weniger als 28% der primären Glioblastome nachgewiesen, EGFR in etwa 40%. In einer unselektierten Serie von Glioblastomen wurde eine EGFR-Amplifikation mit einer Häufigkeit von 30-40% beobachtet (Louis und Gusella, 1995). Glioblastome mit dieser Amplifikation zeigten typischerweise einen gleichzeitigen Allelverlust auf Chromosom 10 (von Deimling et al., 1992), ein Befund, der bei 75% aller Glioblastome zu finden ist. Weiterhin können p16-Deletionen und PTEN- Mutationen zu finden sein.

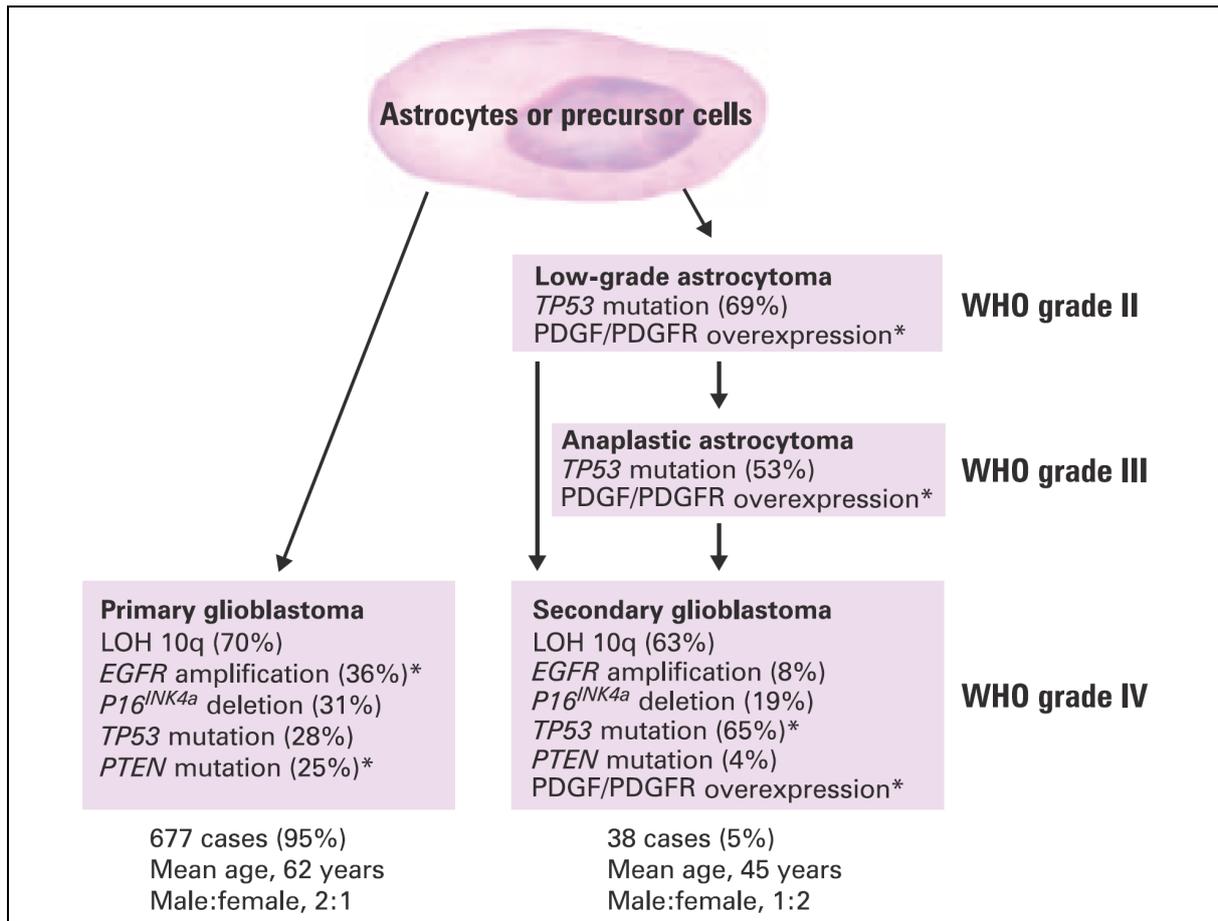


Abbildung 2: Genetische Bahnen in der Evolution von Glioblastomen (aus Kleihues und Ohgaki, 1999)

GBMs mit einer p53-Mutation werden häufiger bei Frauen und jungen Patienten beobachtet (Louis et al., 1993; Rasheed et al., 1994). Primäre Glioblastome treten vermehrt bei älteren Patienten (50.-55. Lebensjahr) auf, wohingegen sekundäre Glioblastome typischerweise um das 40. Lebensjahr entstehen (Dropcho und Soong, 1996). Das Verhältnis Männer/Frauen ist bei primären Glioblastomen größer als bei sekundären (von Deimling et al., 1996).

1.3.2 Histologie

Makroskopisch ist das Glioblastom durch ein buntes Bild, bestehend aus Einblutungen, Zysten und Nekrosen, die mehr als 80% der Tumormasse ausmachen können, gekennzeichnet. Mikroskopisch sind eine hohe Zelldichte mit Zell- und Kernpolymorphien, eine hohe mitotische Aktivität, Endothelzellproliferate sowie eine hohe Gefäßdichte typisch.

Im Randbereich des Tumors fallen hyperzelluläre Zonen um nekrotische Areale auf, so genannte Pseudopallisaden (Rong et al., 2006).

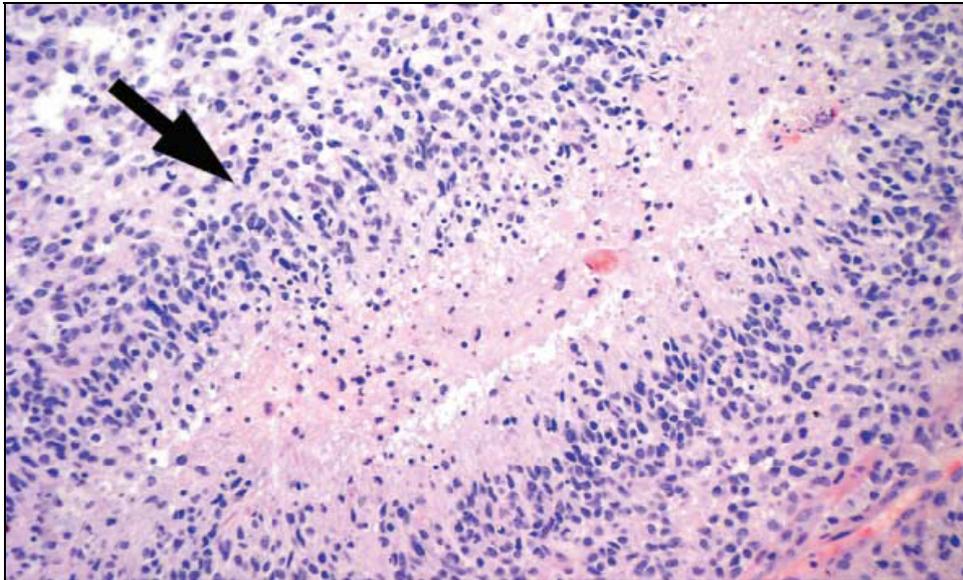


Abbildung 3: Pseudopallisaden um ein nekrotisches Areal bei einem Glioblastom (aus Rong et al., 2006)

1.3.3 Klinik und Diagnostik

Glioblastompatienten weisen mehrheitlich eine sehr kurze Anamnese von weniger als 3 Monaten auf (Salcman, 1980b). Initial stehen aufgrund dieses schnellen Wachstums der Tumormasse Hirndrucksymptome, wie Kopfschmerz, Übelkeit, Erbrechen und Wesensveränderung im Vordergrund. Hinzu kommen je nach Lokalisation des Tumors Herdsymptome, wie Hemiparesen, Sprach- und Gesichtsfeldstörungen.

Die kraniale Computertomographie stellt meist eine zentral hypodense Raumforderung mit ringförmiger Kontrastmittelanreicherung dar. Ein T1-gewichtetes MRT zeigt eine zentrale Hypointensität. Der zentrale hypodense bzw. hypointente Part stellt nekrotisches Areal dar, während der Kontrastmittel anreichernde Ring den zellulären Anteil des Tumors ausmacht. Trotzdem konnten histopathologisch Tumorzellen in einer Entfernung von über 15mm außerhalb des Ringes nachgewiesen werden (Greene et al., 1989). In der T2-gewichteten Magnetresonanzdarstellung werden Tumorinfiltrationszone und perifokales Ödem besser dargestellt.

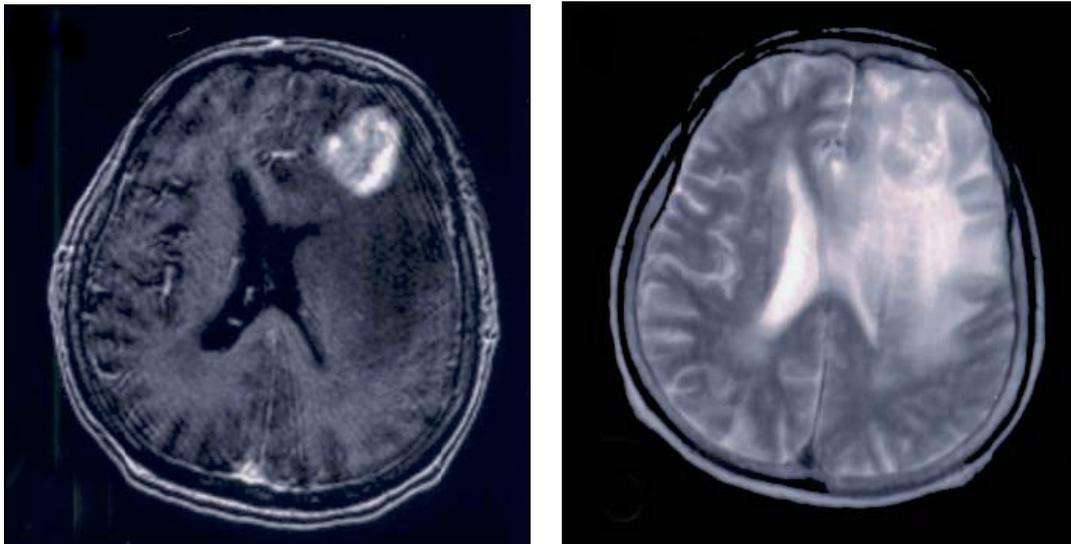


Abbildung 4: T1- (links) und T2- (rechts) gewichtetes MRT mit KM. In T2- Wichtung zusätzlich Darstellung des perifokalen Ödems und der Infiltrationszone.

1.3.4 Therapie und Prognose

Als Primärtherapie wird abhängig von Lokalisation und Ausdehnung des Tumors eine Operation in Form einer subtotalen Exstirpation, einer Teilresektion zur Reduktion der Raumforderung oder lediglich einer Gewebeentnahme zur Diagnosesicherung angestrebt. Eine Totalexstirpation ist aufgrund des infiltrativen Wachstums nicht möglich. Die mittlere Überlebenszeit korreliert mit dem Ausmaß der Resektion (Devaux et al., 1993). Nach alleiniger Operation beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit etwa 8 Monate (Salcman, 1980b).

Durch die postoperative Radiatio konnte ein positiver Effekt auf die Überlebenszeit und die progressionsfreie Zeit erzielt werden. In einer Metaanalyse von Salcman (1980b) konnte eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit von 4 Monaten durch alleinige Operation auf 9,25 Monate mit Radiatio gesteigert werden. Bei entsprechend aggressiven Therapieschemata mit bis zu 90 Gray konnten die mittleren Überlebenszeiten auf bis zu 20 Monate gesteigert werden (Fitzek et al., 1999).

Während der letzten 30 Jahre wurde neben Operation und Radiatio auch die Chemotherapie angewandt, jedoch mit wenig zufrieden stellenden Ergebnissen. So konnte mit den herkömmlichen Chemotherapeutika, wie Carmustin (BCNU), Procarbazin, aber auch mit

anderen, keine eindeutige Verlängerung der Überlebenszeit oder des progressionsfreien Intervalls nachgewiesen werden (Lassen et al., 1999).

In einer Studie der EORTC konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate sowie eine Erhöhung der 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% durch die Gabe von Temozolomid (TMZ) während und nach der Bestrahlung nachgewiesen werden; dies bei guter Verträglichkeit (Stupp et al., 2005). TMZ wirkt durch Hemmung des DNA-Reparaturenzyms MGMT (Methylguanin-DNA-methyltransferase). Durch diese Hemmung können Strukturveränderungen der DNA nicht mehr repariert werden und die Zelle wird apoptotisch.

Die derzeitige Standardtherapie von Glioblastomen setzt sich zusammen aus Operation, Radiatio und Chemotherapie mit Temozolamid.

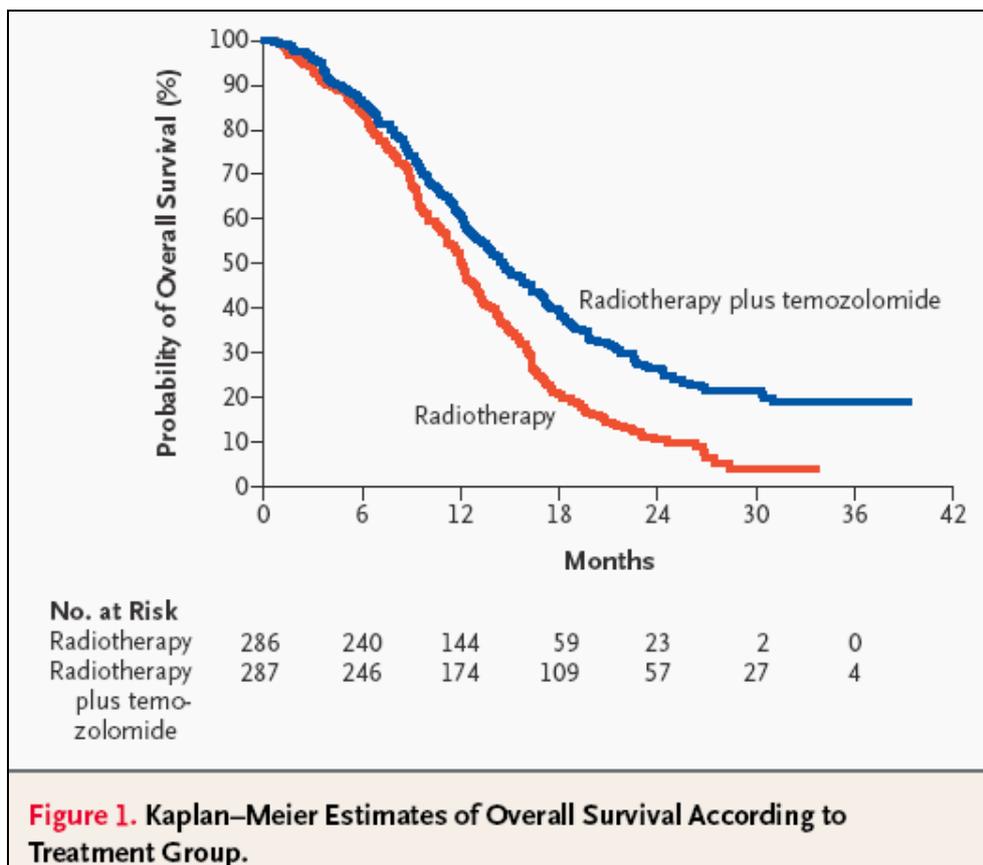


Abbildung 5: Überlebensrate von Glioblastompatienten nach Radiotherapie (2 Gray, 5x/ Woche für 6 Wochen) und nach Radiotherapie + Temozolomid (75mg/m²) (aus Stupp et al., 2005).

1.3.5 Alternative Therapieansätze

Aufgrund der weiterhin nicht zufrieden stellenden Erfolge in der Therapie von Glioblastomen ist man bemüht, neben Operation, Radiatio und Chemotherapie neue Wege zu finden, um das invasive Wachstum zu stoppen und bessere Überlebensraten zu erzielen.

1.3.5.1 EGFR-Inhibition

EGFR („epidermal growth factor receptor“) spielt eine zentrale Rolle in der Progression von vielen soliden Tumoren (Adjei, 2006), so auch von Glioblastomen (Salomon et al, 1995). Etwa 40% aller Glioblastome zeigen eine Überexpression an EGFR. EGFR- bzw. HER1-Überexpression ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose (Earp et al., 2003). Die Dysregulation der Signaltransduktion resultiert in einer Stimulation der Tumorzellproliferation, Migration, Adhäsion und Angiogenese. Verschiedene Formen von EGFR existieren; EGFR vIII ist die am besten studierte Form. Einige therapeutische Strategien wurden entwickelt um die zellulären Effekte, welche durch EGFR herbeigeführt werden, zu blockieren. Dazu zählen EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren, monoklonale Antikörper („Mabs“), Radioimmunkonjugate, Antisense-Ologonukleotide und Ribozyme. Zu den EGFR- TK-Inhibitoren zählen Erlotinib und Gefitinib. In Phase I- und II-Versuchen mit Glioblastompatienten kam es bei 20% der Patienten zu einem Ansprechen auf Erlotinib (Haas-Kogan et al., 2005), während 13% der Patienten unter Gefitinib mindestens für 6 Monate progressionsfrei blieben (Rich et al., 2004). Der monoklonale Antikörper Cetuximab zeigte in präklinischen Versuchen an Glioblastom- Xenograftmodellen eine Abnahme der Proliferationsrate und eine Zunahme der Apoptoserate (Eller et al., 2005). Klinische Erfolge könnten durch die Unpassierbarkeit der Bluthirnschranke limitiert werden. Dieses Problem versucht man zurzeit in klinischen Studien durch direkte intrakranielle Injektion, der so genannten Konvektionstherapie („convection enhanced delivery“, CED), zu umgehen.

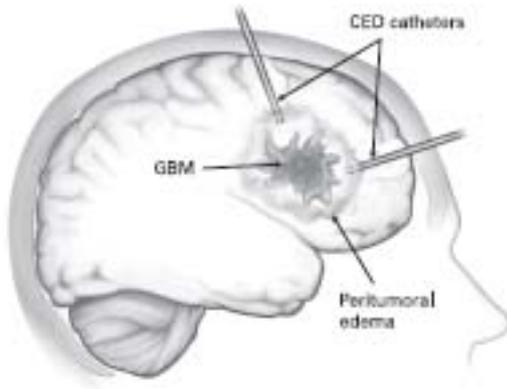


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines GBM mit einem Katheter im peritumoralem Gewebe für Konvektionstherapie (CED) (aus Reardon et al., 2006).

1.3.5.2 Gentherapie (Transfektion)

Die Gentherapie ist ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt zur Behandlung von Tumoren (Parney und Chang, 2003). Es werden zwei unterschiedliche Strategien unterschieden, die direkte und die indirekte Gentherapie. Bei der direkten Gentherapie versucht man durch virale oder nichtvirale Systeme mittels Gentransfer bestimmte Gene zu ersetzen oder zu unterdrücken. Es werden Methoden entwickelt, um Tumorsuppressorgene zu ersetzen oder aber übermäßig aktivierte Onkogene, wie Wachstumsfaktoren, zu unterdrücken. Die indirekte Gentherapie zielt darauf ab, Tumorzellen soweit zu verändern, dass diese in der Lage sind Chemotherapeutika intrazellulär aufzunehmen und zu aktivieren.

1.3.5.3 Immunologische Therapien

Ein anderes Konzept ist das der Immuntherapie im Sinne einer Immunstimulation (Tonn und Westphal, 1997). Durch Stärkung des Immunsystems versucht man eine Immunantwort gegen den Tumor zu erzielen. Angewendet werden hierfür Thymushormone, Leukozytenextrakte, Interferone, Interleukine und TNF alfa. Klinische Versuche zeigten jedoch bisher keinen Effekt auf die Tumorreduktion (Zinkernagel, 1997).

Auch durch andere immunologische Ansätze, wie die Tumorbehandlung mittels selektiver Antikörper (Roth und Weller, 1999) oder mittels aktiver Immunisierung, konnte die Prognose des Glioblastoms noch nicht entscheidend gebessert werden.

1.3.5.4 Inhibition von Matrixmetalloproteinasen

Die Effekte der Inhibition von MMPs werden im Abschnitt 1.4.2 beschrieben.

1.4 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix des ZNS besteht aus löslichen und nichtlöslichen Glykoproteinen und Proteoglykanen und weist eine enorme strukturelle Komplexität auf. Sie ist nicht nur als ein statisches Skelett zu verstehen, sondern ist daneben auch an unzähligen Regulationsvorgängen zur Entwicklung, Differenzierung und Funktion des zerebralen Gewebes beteiligt. Beispiele hierfür sind die Differenzierung und Migration neuronaler und glialer Zellen während der Entwicklung und die Formation und Aussprossung von Axonen (Venstrom et al., 1993).

Innerhalb des ZNS gibt es große Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der EZM. In der weißen Substanz findet man einen sehr hohen Anteil an Myelin, zu dem Gliomzellen eine hohe Affinität aufweisen (Giese et al., 1996). So ist es nicht verwunderlich, dass sich Glioblastome besonders entlang der Bahnsysteme der weißen Substanz ausbreiten (Bernstein et al., 1989).

Ebenso von besonderer Bedeutung für die Invasion sind die Basalmembranen (BM). Die subpialen und vaskulären Basalmembranen enthalten Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Vitronectin. Auch im subependymalen Raum und in den Räumen unter den Epithelzellen des Plexus choroideus findet sich eine ähnliche Zusammensetzung.

Die vaskulären Basalmembranen stellen gemeinsam mit einer Schicht aus astrozytären Fortsätzen und einer Lage aus Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke (Pilkington, 1996).

Glioblastome breiten sich bevorzugt entlang der Basalmembranen aus, ohne sie zu durchbrechen (Bernstein et al., 1995). Daraus lässt sich das Ausbreitungsmuster der Gliome entlang der subependymalen Strukturen ableiten, sowie deren fehlende Intravasation und systemische Metastasierung.

Gliome sind in der Lage durch autokrine Stimulation einige Bausteine der EZM selbst zu exprimieren. So konnte gezeigt werden, dass frühe Passagen von Glioblastomzellen zur

Produktion von Laminin, Kollagen I, III und IV, Tenascin und Vitronectin befähigt sind (Delpech et al, 1993; McKeever et al., 1995).

1.4.1 Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind im Wesentlichen alle Komponenten der Extrazellulärmatrix zu degradieren.

MMPs werden als inaktive Zymogene synthetisiert und durch Abspaltung des N-terminalen Endes aktiviert (Romanic und Madri, 1994). Die Expression der MMPs wird induziert durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Tumorpromoter, physikalischen Stress, onkogene Transformation, sowie Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte. Reguliert wird ihre Aktivität durch endogene Inhibitoren, wie alfa2-Makroglobulin, TIMPS (tissue inhibitors of metalloproteinases), kleine Moleküle mit TIMP-ähnlicher Domäne sowie dem membrangebundenen Inhibitor RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs) (Edwards., 2001; Oh et al., 2001).

Forschungen an Tiermodellen, später am Menschen bestätigten die herausragende Stellung der MMPs in der Pathogenese von Tumoren, und die Korrelation mit erhöhtem Tumorgrad, verstärkter Tumorinvasivität, Metastasierung und verminderter Überlebenszeit (Coussens et al., 1996, Arenas-Huertero et al., 1999). Außerdem regulieren MMPs die Tumorangiogenese und tragen zum „Angiogenetic switch“ während der Neovaskularisation bei.

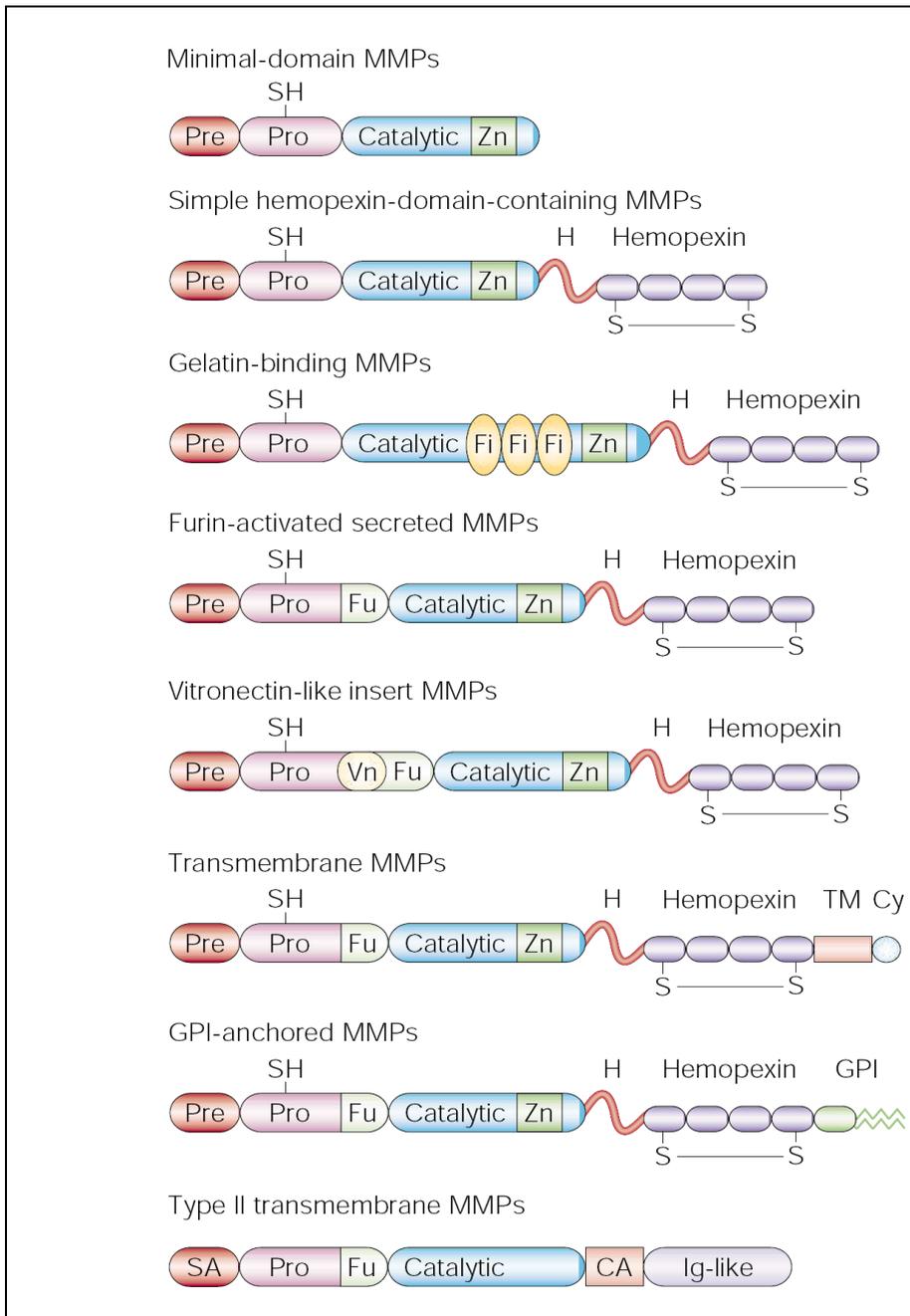


Abbildung 7: Die Proteinstruktur der MMPs: Einteilung in 8 verschiedene Strukturgruppen, 5 davon werden abgesondert, 3 sind Membrantyp-MMPs (aus Egeblad und Werb, 2002).

Historisch teilte man die MMPs in vier Gruppen ein: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine, ausgehend von ihrer Spezifität für die EZM-Komponenten. Die Anzahl der MMP-Substrate ist seither gewachsen, so dass man die MMPs heute nach ihrer Struktur eingeteilt. Es existieren 8 verschiedene Klassen, 5 davon werden sezerniert und 3 sind Membran-Typ-MMPs. Bis jetzt wurden 25 homologe und 3 Pseudo-MMP-Gene im Menschen identifiziert (Rao, 2003).

1.4.2 Matrixmetalloproteinasen in Glioblastomen

Auch in Gliomen wurden die Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Expression von MMPs und Tumorzellinvasivität bestätigt. MMPs erhöhen die Gliomzellinvasion durch die Degradierung von Proteinen der Extrazellulärmatrix, durch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und durch Lösung von Wachstumsfaktoren aus der EZM (Mc Cawley und Matrisian, 2001). Außerdem können MMPs andere Wachstumsfaktoren spalten, wie beispielsweise TGF alfa.

Bislang wurden die Gelatinasen MMP2 und MMP9, verschiedene MT-MMPs, Matrilysin, MMP12, sowie TIMP1 in Glioblastomen nachgewiesen (Vince et al., 1999; Lampert et al., 1998). Die stärkste Expression zeigten dabei die Gelatinasen. Es wurde nachgewiesen, dass die Expression von aktivem MMP9 assoziiert ist mit dem primären Glioblastom-Subtyp und es wird angenommen, dass EGFRvIII die Aktivierung von MMP9 steuern kann, vermutlich durch Aktivierung von MAPK/ERK (Choe, 2002).

1.4.3 Inhibition von Matrixmetalloproteinasen in der Anti-Tumor-Therapie

Verschiedene MMP-Inhibitoren wurden in den letzten Jahren in vielen verschiedenen Tumorarten in präklinischen und klinischen Studien untersucht. Diese Substanzen greifen an unterschiedlichen Punkten der MMP-Synthese an (Hidalgo und Eckhardt, 2001). So blocken TK-Inhibitoren überwiegend die Transkription, während MMP-antisense, RNA-Ribozyme und Tetracycline die Translation hemmen. Peptidomimetische und nonpeptidische Inhibitoren, Bisphosphonate und Tetracyclinderivate sollen vor allem in der Lage sein die Aktivierung der MMPs von der proMMP-Form zu inhibieren .

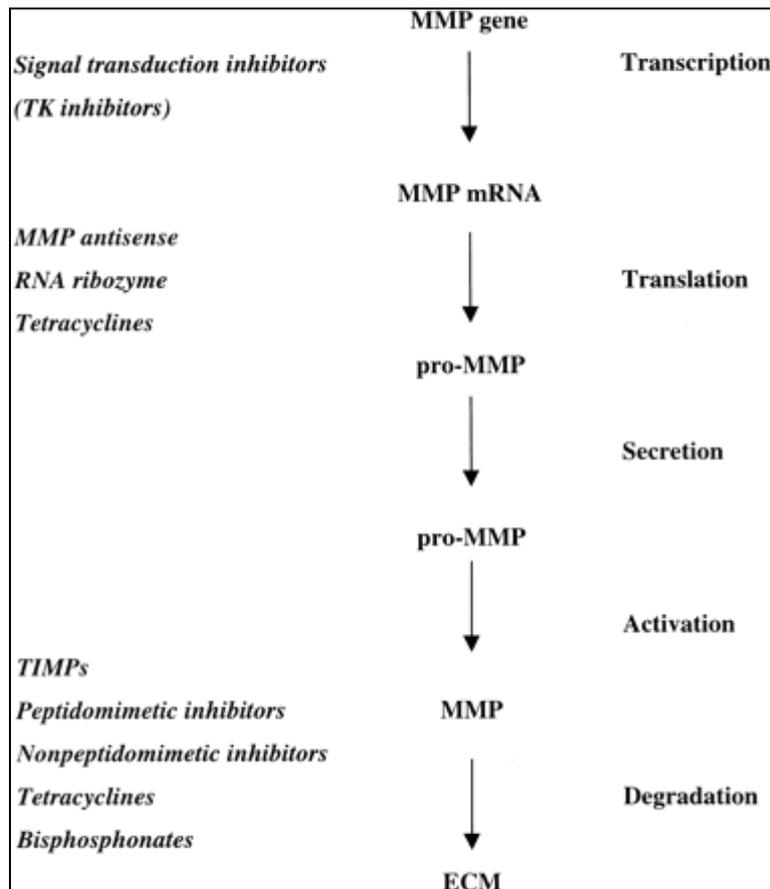


Abbildung 8: Inhibition der MMPs auf verschiedenen Ebenen der MMP-Synthese (aus Hidalgo und Eckhardt, 2001)

1.5 Zwei Antibiotika und ihre Anwendung

1.5.1 Doxycyclin

Doxycyclin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline. Diese werden aus Streptomyces-Arten gewonnen. Die ersten Tetracycline erschienen bereits 1949 (Oxytetracyclin), Doxycyclin steht seit 1967 zur Verfügung. Der bakteriostatische Wirkungsmechanismus besteht in einer Beeinträchtigung der Proteinsynthese, indem in Bakterien die Bindung der t-RNA an den mRNA-Ribosomen-Komplex verhindert wird durch Blockade der 30S-ribosomalen Untereinheit, die in höheren Eukaryoten fehlt. Tetracycline neigen zu Komplexbildung, sie reichern sich daher in Calcium-reichen Geweben, wie Knochen an. Doxycyclin weist aufgrund der hydrophoberen Eigenschaften eine bessere

enterale Resorption, eine höhere Eiweißbindung, eine bessere Diffusion ins Gewebe und eine längere Wirkdauer als die Vorgängersubstanzen auf. Es ist für die orale und intravenöse Anwendung gleichermaßen geeignet. Die intramuskuläre Gabe ist wegen drohender Gewebsschädigung kontraindiziert. Im Liquor cerebrospinalis liegen geringere Konzentrationen als im Plasma vor, bei genügender Zufuhr werden jedoch ausreichende Konzentrationen erreicht.

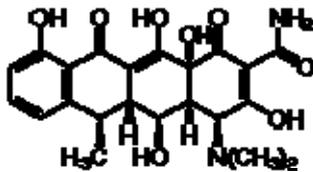


Abbildung 9: Strukturformel von Doxycyclin

Das Wirkspektrum der Tetracycline umfasst viele grampositive und gramnegative Erreger. Indikationen von Doxycyclin sind unter anderem die Pneumonie, die unspezifische Urethritis, urogenitale Infektionen, Lues, Borreliose, Akne und Chloroquin-resistente Malaria.

Nebenwirkungen sind Reizungen der Schleimhäute, des Magen-Darm-Traktes und eine Beeinträchtigung der Darmflora. Photosensibilisierung der Haut und Schädigung der Nägel (Onycholysen), wie auch Einlagerungen in Skelett und Zähnen (irreversibel), können auftreten. Doxycyclin ist hepatotoxisch. Außerdem kann es nach zu schneller intravenöser Applikation zu Herzrhythmusstörungen und kraniieller Drucksteigerung kommen. Kontraindikationen sind Schwangerschaft, Stillzeit, Kinder und Patienten mit Myasthenia gravis.

Seit einiger Zeit sind Tetracycline nicht nur aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung anerkannt, sondern auch wegen ihrer zytotoxischen und antiinvasiven Eigenschaften in der Tumorforschung geschätzt. Tetracycline agieren hierbei auf 2 verschiedene Weisen. Zum einen erhöhen sie die apoptotische Aktivität der Tumorzellen, hervorgerufen durch Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese (Kroon et al., 1984, van den Bogert, 1986). Außerdem wird durch Tetracycline eine Akkumulation der Tumorzellen in der G₀/G₁-Phase vermutet.

Zum anderen wirken sie durch Hemmung der Matrixmetalloproteinasen. Dabei sind drei Mechanismen von entscheidender Bedeutung. Erstens die direkte Inhibition von aktiven MMPs, zweitens die Hemmung der oxidativen Aktivierung der proMMPs, und drittens die

Unterbrechung der Aktivierung durch exzessive Proteolyse der proMMPs in enzymatisch inaktive Fragmente (Golub et al, 1998).

Tet-ON- und Tet-OFF -Systeme

Das Tet-ON-System (Gossen et al., 1995) und das Tet-OFF-System (Gossen und Bujard, 1992) sind die wahrscheinlich gebräuchlichsten Systeme zur Kontrolle der Genexpression in Säugetierzellen. Beide Systeme sind einfach, effizient und erlauben eine gute Kontrolle der transgenen Expression in einer Reihe von experimentellen Systemen.

Beim Tet-OFF-System resultiert die Zugabe von Tetracyclin in einer verminderten Transkription durch Abkopplung des Tetracyclin-responsive-Transkriptionsaktivators (tTA) vom Promotor. Beim Tet-ON-System aktiviert der reverse Tetracyclin-response-Aktivator die Transkription durch Bindung an den Promotor in Anwesenheit von Tetracyclin.

1.5.2 Cefotaxim

Cefotaxim ist ein beta-Lactam-Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine. Cephalosporine konnten aus dem Pilz *Cephalosporium acreminium* gewonnen werden. Das Grundgerüst, die 7-Aminocephalosporansäure, dient als Ausgangssubstanz für halbsynthetische Cephalosporine.

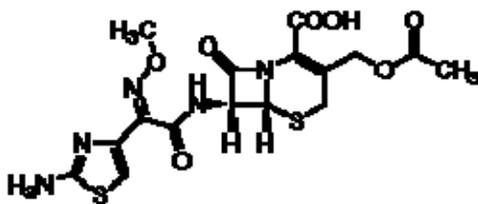


Abbildung 10: Strukturformel von Cefotaxim

Der Wirkungsmechanismus, der dem der Penicilline gleicht, besteht in einer Beeinträchtigung der Transpeptidaseaktivität beim Aufbau der Bakterienzellwand. Es ist daher in ausreichenden Konzentrationen bakterizid. Ihr Wirkspektrum liegt vor allem im grampositiven Bereich, einige der Cephalosporine wirken jedoch auch gegen gramnegative Keime. Cephalosporine

sind recht säurestabil, jedoch aufgrund ihrer ungenügenden Resorption teilweise nur parenteral verfügbar.

Als Nebenwirkungen dominieren allergische Reaktionen, die vor allem die Haut betreffen. Außerdem werden gelegentlich Leuko- und Thrombozytopenien beobachtet. In 5-10% der Fälle finden Kreuzreaktionen mit Penicillinen statt. Lokale Reaktionen, wie gastrointestinale Störungen nach oraler Applikation und Gewebeschäden nach intramuskulärer Injektion sind möglich. Bei intravenöser Zufuhr können Thrombophlebitiden auftreten. Bei zu hoher Dosierung werden Nierenschäden in Form von Tubulusnekrosen beobachtet.

Cephalosporine werden nach ihrem Wirkprofil in Generationen eingeteilt. Zur Zeit werden 5 Generationen unterschieden, wobei Cefotaxim zur Generation 3a zählt. Diese Generation zeichnet sich durch eine eingeschränkte Wirksamkeit im grampositiven Bereich, aber gute Wirksamkeit im gramnegativen Bereich aus. Zur Indikation von Cefotaxim zählt die Behandlung der Sepsis, Pneumonie, Phlegmone, des Abszesses, der Meningitis, Ventrikulitis und der Neuroborreliose.

Bisher sind nur wenige Versuche mit Cephalosporinen unternommen worden, die ihre Wirksamkeit auf die Inhibition von MMPs untersuchten. Dennoch, schon 1994 wurde von einer italienischen Arbeitsgruppe postuliert, dass Cefotan, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine, in der Lage sei, uterine Matrixmetalloproteinase durch einen nicht-antibakteriellen Mechanismus zu hemmen (Scarpellini et al., 1994). In einer Arbeit von Kannan et al. wurde eine inhibitorische Aktivität von EK 2900, einem weiteren Cephalosporinderivat, auf Stromelysin 2 und 3, sowie Membrantyp-1-MMP nachgewiesen (Kannan et al., 1999). Außerdem wurde eine Inhibition von MMPs in reaktivem periprothetischen Gewebe bei Hüftprothesen durch Cephalothin entdeckt, (Santavirta et al., 1996). Cephalosporine sollen desweiteren in der MMP-Inhibition bei abdominalen Aortenaneurysmen eine Rolle spielen (Thompson et al., 1996).

Der Stellenwert der Cephalosporine in der Antitumorthherapie ist bislang weitgehend unerforscht. Cefazolin, ein oral verfügbares Cephalosporin der 1. Generation, soll einen hemmenden Effekt auf die Absiedlung von Tumorzellen nach transurethraler Resektion von Urothelzellkarzinomen haben, somit die Wiederauftrittsrate verringern (Kamat et al., 2004).

Welche Rolle aber Cephalosporine in der Therapie von Glioblastomen haben wurde bis dato nicht untersucht.

2 Material

2.1 Geräte und Laborhilfen

- Abzug Din 12924	Köttermann
- Biofuge Pico	Heraus Instruments, Hanau
- Brutschrank (IR Autoflow CO2 Water- Jacket Incubator)	Nuaire, Plymouth, USA
- ELISA-Reader Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
- Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Tiefe:0,2mm)	Superior, Deutschland
- Gelelektrophorese-Apparatur Mini-V8 10 Vertical	Gibco-BRL-Life Technologies, Eggenstein
- Gelelektrophoresekammern, Horizon11 14 und Horizon 58	Gibco-BRL-Life Technologies, Eggenstein
- Gene Amplifier PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
- Glasflaschen	Schott, Mainz
- Heizblock, Grant Boekel	
- Magnetrührer MR 3001 k	Heidolph, Schwabach
- Magnetrührstäbchen, div. Größen	Heinse und Ziller, Würzburg
- Megafuge 1.0 R	Heraus Sepatech, Hanau
- Messzylinder, div. Volumina	Schott, Mainz
- Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
- Mikroskop, Wilovert	Hund, Wetzlar
- Mikrowellenherd R-2V26	Sharp, Hamburg
- Multipette plus	Eppendorf Hamburg
- PH- Meter 525	WTW Weilheim
- Pipetten, Glas, 5,10,20 ml	Hartenstein, Würzburg
- Pipetboy acu (Stripettor)	Integra Biosciences
- Sterilbank (Biolog. Safety Cabinet)	Nuaire, Plymouth, USA
- Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
- Titertek Multiscan Plus	Flow Laboratories Int., Schweiz
- UV-Illuminator	Konrad Benda, Wiesloch

- Videodokumentationssystem Intas, Göttingen
- Vortex- Genie 2 Scientific Industries, Bohemia, USA
- Wärmeplatte Medex, Kiel
- Waage, Sartorius BP 300 S Sartorius, Göttingen
- Waage, Scaltec Hartenstein, Würzburg
- Wasserbad Hartenstein, Würzburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

- Cryoröhrchen Nalgene, Brüssel
- Diafilme, Elite Chrome 160 T Kodak,
- Einmalspritzen B. Braun, Melsungen
- Eppendorf Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg
- Lab Tek Chamber Slide Nalge Nunc , Napperville, USA
- Objektträger Menzel-Glaser, Braunschweig
- Pasteurpipette Samco, San Fernando, USA
- Petrischalen Becton Dickinson, Oxuard, USA
- Pipettenspitzen, Kunststoff, 10, 100, 1000 µl Greiner, Würzburg
- Pipettenspitzen mit Filter Safe Seal Tips Biozym, Hess. Oldendorf
- Reaktionsgefäße für PCR (0,2 ml) Biozym, Hess. Oldendorf
- Rundbodenröhrchen, ISO 9001 TPP, Schweiz
- Tubes, Kunststoff, 15, 50 ml Becton Dickinson, Oxuard, USA
- Zellkulturflaschen (25cm²) mit 2 µm-Filterkappe Costar, Bodenheim
- Zellkulturflaschen (75cm²) mit 2 µm-Filterkappe Costar, Bodenheim
- Zellkultur- 4- well-Platten Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zellkultur-96-well-Platten Costar, Bodenheim

2.3 Chemikalien

- Aceton J.T.Baker, Deventer, Darmstadt
- Agar Noble Nordwald, Hamburg
- Agarose, Qualex Gold AGS, Heidelberg

- Amidoblack	
- Aquatex	Merck, Darmstadt
- Collagen S from Calf Skin	Roche, Mannheim
- Collagen Typ 1 from Calf Skin	Sigma
- Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Dako, Hamburg
- Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
- Essigsäure	Merck, Darmstadt
- Ethanol absolut (EtOH)	J.T.Baker, Deventer, NL
- Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Deisenhofen
- Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂), 25% in H ₂ O	Merck, Darmstadt
- Hämalaunlösung nach MAYER	Merck, Darmstadt
- Isopropanol	Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
- β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
- Methanol (MethOH)	J.T.Baker, Deventer, NL
- Methyl-Thiazoyl-Tetrazolium (MTT)	
- Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
- Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
- Natronlauge	Merck, Darmstadt
- Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, St. Louis, USA
- Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrome AG, Berlin
- Salzsäure (HCl)	Merck., Darmstadt
- Triton X 100	Boehringer, Mannheim
- Trypanblau (0,4%)	Sigma, St. Louis, USA
- Ultrapure Water	Biochrome AG, Berlin
- Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4 Medikamente

- Doxyhexal SF Injektionslösung (Wirkstoff: Doxycyclinhyclat)	Hexal, Holzkirchen
--	--------------------

- Cefotaxim Fresenius 2,0g zur Infusion (Wirkstoff: Cefotaxim-Natrium) Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.

2.5 Reagentien für die Zellkultur

- 100x BME nicht essentielle Aminosäuren Cytogen, Berlin
- Dulbecco`s modified Serum (DMEM) mit 1g/l Glucose Cytogen, Berlin
- Fetales Kälberserum (FCS) Bio Whittaker über Boehringer Ingelheim
- L-Glutamin (200mM in 0,85% NaCl) Cytogen, Berlin
- Penicillin (10000 U)/ Streptomycin (10 mg/ml) Cytogen, Berlin
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Biochrome, Berlin
- Trypsin-EDTA (0,05M/ 0,02%) Cytogen, Berlin
- Ultra Pure Water (Seromed) Biochrom, Berlin
- 100x Vitamine Gibco-Life Technologies, Eggenheim

2.6 Antikörper und Reagentien für Immunhistochemie

- POD, Apoptose-Kit (Tunel-Technology) Roche, Mannheim
- Histostain-Kit Zymed, San Francisco, USA
- MMP-2-Primärantikörper R&D Systems
- MMP-9-Primärantikörper R&D Systems
- TIMP-1-Primärantikörper R&D Systems

2.7 Enzyme, Puffer und rekombinierte Moleküle

- DNase I Enzym Promega, Heidelberg
- MnCl₂ (0,09 M) Promega, Heidelberg
- 10x PCR-Puffer Invitrogen, De Schelp, NL
- 5x Reaction-Buffer Fermantas,

- RevertAid TM H Minus M-MuLV RT (200 u/μl)	Fermentas,
- Ribonuklease Inhibitor (20 u/μl)	Fermentas,
- Smartladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
- SV DNase Stopping Solution	Promega, Heidelberg
- SV RNA Dilution Buffer	Promega, Heidelberg
- SV RNA Lysis Buffer	Promega, Heidelberg
- SV RNA Washing Solution	Promega, Heidelberg
- 5x Taq M	Invitrogen, De Schelp, NL
- Yellow Core Buffer	Promega, Heidelberg

2.8 Nukleinsäuren

- 10 mM dNTP's	Invitrogen, De Schelp, NL
- 10 mM dNTP Mix	Fermentas,
- Oligo (dT) ₁₈ Primer (0,5 μg/μl)	Fermentas,
- Primer für RT-PCR	MWG-Biotech AG,
- Taq DNA Polymerase	Invitrogen, De Schelp, NL

2.9 Zelllinien und Primärkulturen

C6, Glioblastomzelllinie der Ratte	
U251, humane Glioblastomzelllinie	Gade Institute der Universität Bergen, Norwegen
U373, humane Glioblastomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
GamG, humane Glioblastomzelllinie	Gade Institute der Universität Bergen, Norwegen
2406, humane Primärkultur	Universität Würzburg
2418, humane Primärkultur	Universität Würzburg
2421, humane Primärkultur	Universität Würzburg
2464, humane Primärkultur	Universität Würzburg

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeines

Voraussetzung für das Arbeiten mit Zellkulturen sind sterile Bedingungen.

Als Zelllinien werden Glioblastomzelllinien bezeichnet, die von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wurden oder kommerziell erhältlich sind, weltweit in mehreren Laboren benutzt werden, und deren Eigenschaften durch langandauernde Kulturhaltung sehr genau charakterisiert sind.

Im Gegensatz dazu versteht man unter Primärmaterial Glioblastome, die nach Entnahme im OP der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg eine Aufarbeitung im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgie erfahren, oder bereits asservierte Tumorproben der Hirntumorbank des tumorbiologischen Labors.

Nach operativer Entnahme werden Teile des Tumors direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie entweder als Nativproben in die Tumorbank aufgenommen werden oder in Zellkulturmedien zur Aufarbeitung in das Tumorbiologische Labor gesandt werden. Hier wird die Tumorprobe zunächst mit Hilfe eines Skalpells mechanisch zerkleinert, das gewonnene Tumormaterial bei 800 rpm für 10 min ohne Bremse zentrifugiert und daraufhin mit entsprechendem Medium in Kulturflaschen gesetzt, wo sich die Tumorzellen am Flaschenboden anhaften.

Voraussetzung für die Asservierung und die Bearbeitung des Tumorgewebes im Labor sind stets die Einverständniserklärung des Patienten und die grundsätzliche Zustimmung der Ethikkommission der Universität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumoren aus Primärmaterial bis zur neunten Passage in Kultur gehalten, in regelmäßigen Abständen wurde die Zellkultur auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

3.1.2 Zellkulturmedien

Für Zelllinien: 500 ml DMEM mit 1 g/l Glukose
 60 ml FCS, hitzeinaktiviert
 10 ml NEA
 10 ml Glutamin
 2 ml Penicillin (=32 U/ml)/ Streptomycin (=32 mg/ml)

Für Primärkulturen: 500 ml DMEM mit 1 g/l Glukose
 120 ml FCS, hitzeinaktiviert
 6 ml Vitamine
 6 ml NEA
 2 ml Glutamin

Serumfreies Medium: 500 ml DMEM mit 1 g/l Glukose
 2 ml bzw. 10 ml Glutamin

Alle Medien und entsprechende Zusätze wurden bei einer Temperatur von 37°C verwendet. Medienzusätze wurden nach Aliquotieren bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen konnten sie für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert und in dem entsprechenden Zeitrahmen verbraucht werden.

3.1.3 Monolayer-Zellkultur von Glioblastom-Zelllinien

Nach Auftauen aus flüssigem Stickstoff wurden die Glioblastomzellen als Monolayer (Einzelschicht) in Zellkulturflaschen mittlerer Größe (75 cm²) mit 20 ml entsprechendem Medium kultiviert. Hierbei wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Es handelt sich dabei um Standardbedingungen bei der Kultur von Gliomzellen, die auch für alle weiteren genannten Inkubationen gelten. Bei Konfluenz, dem vollständigen Bedecken des Flaschenbodens mit Zellen, je nach Zellproliferationsrate alle 2-6 Tage, wurde das Medium abpipettiert und verworfen, und die Flasche zur Beseitigung von Medienrückständen mit 6 ml PBS gespült. Nach Zugabe von 1,5 ml warmen Trypsin und Inkubation der Zellkulturflasche im Brutschrank für 5-10 min konnten sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Plastikboden lösen. Die Zellsuspension wurde im folgenden Schritt in

8,5 ml vorgewärmten Medium aufgenommen und von der entstandenen Suspension konnte beliebig und je nach Zelldichte und Wachstumsrate die Hälfte bis ein Zwanzigstel in die Flasche zurückgegeben und mit Medium aufgefüllt werden. Die restliche Zellsuspension kann auf andere Flaschen verteilt, eingefroren oder verworfen werden.

3.1.4 Beimpfung der Zellkulturflaschen mit Antibiotika

Mit jedem Umsetzen der Zellen sowie nach jedem Mediumwechsel wurden je ein Drittel der Zellen mit Doxycyclin, ein anderes Drittel mit Cefotaxim beimpft. Außerdem wurden bei allen Versuchen, bei denen Medium beigefügt wurde sowohl unbehandeltes, sowie mit den entsprechenden Konzentrationen an Antibiotika behandelte Medium eingesetzt. Die Konzentrationen der Antibiotika im Medium entsprachen dabei der mittleren Serumkonzentration nach oraler Aufnahme im Menschen. Für Doxycyclin wurde die Konzentration von 1,5 µg/ml gewählt, für Cefotaxim eine Konzentration von 2 µg/ml. Die Konzentrationen wurden auch während der gesamten Versuchsansätze beibehalten.

3.1.5 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Einfriermedium: 50 ml DMEM Vollmedium mit 20% FCS
 40 ml FCS
 → lagern bei 4°C
 bei Gebrauch 9 ml mit 1 ml DMSO ansetzen
 (= 10% DMSO und 50% FCS)

Beim Auftauen von Zelllinien wurden die in flüssigen Stickstoff gelagerten Cryoröhrchen im 37°C temperierten Wasserbad erwärmt, bis ein kleiner Eiskristall blieb. Danach wurde der Inhalt in auf Eis gestellte und mit 8ml kalten Medium vorgefüllte 15 ml Tubes gegeben um das sonst toxische DMSO zu eliminieren, und bei 4°C und 800 rpm 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 2 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt, diese wiederum mit Medium auf 20ml aufgefüllt.

Das Einfrieren von Zellen geschah entweder aufgrund des Vorhandenseins überschüssiger Zellsuspension oder aufgrund späterer Verwendungsvorhaben. Hierfür wurden die Zellen

trypsiniert, in 4 ml kalten Medium aufgenommen und bei 4°C, 800 rpm für 9 min ohne Bremse zentrifugiert. Währenddessen wurden Cryoröhrchen beschriftet und das Einfriermedium mit DMSO auf Eis angesetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und verworfen, das Zellpellet schließlich mit 1 bis 3 ml Einfriermedium aufsuspendiert und in Cryoröhrchen zu je 1 ml pipettiert. Die Cryoröhrchen wurden bei –80°C einen Tag zwischengelagert und für eine mehrjährige Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.1.6 Zellzählung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Trypsinierte Zellen wurden in Medium resuspendiert und in ein 15 ml Tube überführt. In einem weiteren Tube wurden 20 µl dieser Zellsuspension mit 80 µl (Verdünnung 1:5) bzw. 180 µl Trypanblau (Verdünnung 1:10) gut gemischt und davon 20 µl unter das Deckgläschen der vorher präparierten Zählkammer pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen in allen 16 großen Quadranten ausgezählt und nach folgender Formel die Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen [n]} \times \text{Verdünnungsfaktor [x]} \times 1000}{\text{Kammerfaktor 3,2}}$$

3.1.7 MTT – Proliferationsassay

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, das in den Mitochondrien lebender Zellen zu purpurfarbenen Formazankristallen verstoffwechselt wird. Löst man diese Kristalle auf, kann über die Absorption der hierbei entstehenden farbigen Lösung bei 570 nm die Menge der lebenden Zellen bestimmt werden.

Nach Zellzählung wurden auf einer 96-Well-Platte 4000 Zellen pro Well in 100 µl Zellkulturmedium ausgesät, für jeden Ansatz 12 Wells in einer Reihe. Das Medium war auch in diesem Fall entweder unbehandelt oder mit den entsprechenden Konzentrationen der Substanzen Doxycyclin oder Cefotaxim beimpft. 48 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel. Nach insgesamt 96 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 10 µl MTT-Labeling-Reagenz pro Well zugegeben und nach weiteren 24 Stunden Inkubation die gebildeten Kristalle mit 100 µl MTT-Solubilisation-Puffer (Ansatz: 50 ml 20%iges SDS,

49 ml H₂O, 1 ml 1 molare HCL) gelöst. Weitere 24 Stunden später wurde die Absorption bei 570 nm am ELISA- Reader gemessen. Aus den 12 Werten einer Reihe, d.h. pro Ansatz, wurde der Mittelwert errechnet.

3.1.8 Adhäsionsassay (Amidoblack-Assay)

Beim Amidoblack-Assay wird mit Hilfe des Proteinfarbstoffes Amidoblack 10B das Adhäsionsverhalten bzw. die relative Anzahl der Zellen in einer 96-Well-Platte bestimmt, die nach Fixations- und Elutionsvorgängen am Boden der Wells haften bleiben.

Die Wells wurden vor Beginn mit 0,5 µl/Well Kollagen Typ I, gelöst in 50 µl PBS, gecoatet und für 1,5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Dem Trypsinieren der Zellen und deren Aufnahme in Medium folgte das Zentrifugieren bei 800 rpm für 8 min. Das Zellpellet wurde mit 10 ml serumfreien Medium gewaschen und zentrifugiert bei 800 rpm für 5 min. Danach wurde das Pellet erneut mit 10 ml serumfreien Medium resuspendiert und nach Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurden auf einer 96-Well-Platte 30000 Zellen pro Well in 200 µl serumfreien Medium ausgesät, pro Ansatz 12 Wells. Nach 30min Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit je 100 µl Glutaraldehyd (1%ig in PBS) für 15 min fixiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 100 µl Amidoschwarzlösung (0,1%ig in 0,1 M Na-acetat-Puffer/1,515 M Essigsäure, pH 3,5) für 30 min gefärbt. Dem Absaugen des Überstandes folgte die Entfärbung durch Beseitigung des ungebundenen Farbstoffes mit 150 µl saurem Wasser (Aqua dest. pH 3,5-5, einige Tröpfchen HCl). Nach erneutem Absaugen wurde der gebundene Farbstoff mit 150 µl NaOH (50 mM NaOH in Aqua dest.) eluiert. Die Messung erfolgte am ELISA-Reader bei 2 Wellenlängen, dem Absorptionsmaximum und dem Absorptionsminimum der alkalischen Amidoschwarzlösung, 620 nm und 405 nm. Aus den zwölf Werten einer Reihe wurde für jeden Ansatz der Mittelwert bestimmt.

3.1.9 Anlegen von Tumorsphäroiden

Um Sphäroide, sprich dreidimensionale kugelförmige Zellaggregate zu erhalten, und um die Ausbildung eines adhärenen Zellrasens am Boden der Kulturflasche zu verhindern, wurden die Flaschen getreu der Methode nach Yuhas (Yuhas et al., 1977) mit 1%igem Agar beschichtet. Zum Coaten wurde 1 g Agar Noble in 20 ml Ultra Pure Water in der Mikrowelle gelöst und in die noch heiße Flüssigkeit 80 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Von diesem

Gemisch wurden unter sterilen Bedingungen je 4-5 ml blasenfrei in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) pipettiert. Zum Erkalten und Aushärten wurden die unverschraubten Flaschen 10min in der Sterilbank belassen, bevor sie nach Verschließen 1 Monat im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten.

Zum Anlegen der Sphäroidkultur wurde eine konfluente Zellkulturflasche wie bereits beschrieben trypsiniert und mit 8,5 ml Medium aufgefüllt. Die auf diese Weise gewonnenen 10ml Zellsuspension wurden in 2 mit 1%igem Agar beschichtete kleine Kulturflaschen aufgeteilt. Die Sphäroidflaschen wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank für 2-5 Tage inkubiert. Erreichten die Sphäroide einen Durchmesser von 100-150 µm bei Primärzellen und 200-250 µm bei Zelllinien konnten sie für weitere Versuche verwendet werden.

Bei der Auswahl der Sphäroide war darauf zu achten, teilweise nekrotische Exemplare zu vermeiden, die im Phasenkontrastmikroskop im Inneren einen dunkleren Kern aufweisen und nicht wie lebende Späroide komplett durchscheinend hell sind.

3.1.10 Picken von Sphäroiden

Um sowohl für den Migrationsassay wie auch für den Invasionsassay einzelne Sphäroide zu gewinnen, wurde der Inhalt je einer mit Agar beschichteten Sphäroidflasche nach Erreichen des gewünschten Durchmessers der Sphäroide in eine kleine Petrischale gegossen. Unter sterilen Bedingungen wurden gleichgroße Sphäroide mit einer Kolbenhub-Pasteur-Pipette unter Mikroskopsicht (4-fach-Vergrößerung) gepickt und in eine neue mit 5 ml Medium gefüllte kleine Petrischale überführt.

3.1.11 Migrationsassay

Für den Migrationsassay wurden drei der vorher ausgewählten und gepickten Sphäroide einzeln in mit 250 µl Medium gefüllte Wells einer 96-Well-Platte gesetzt und zentriert. Das Medium war entweder frei von Antibiotika oder enthielt dieses in den vorher angegebenen Konzentrationen. Mit dem Videodokumentationssystem wurde die Fläche des Sphäroids am Tag 0, sowie zusätzlich das Areal der von ihm ausgewanderten Zellen nach 24 und 48 Stunden bildlich festgehalten. Mit Hilfe des Computerprogramms „Vermessung von Zellkulturen Version 1.0 (Bernhard Bögel und O. Hoffmann, 1996) wurde die Auswertung der Bilder vorgenommen. Nach Einlesen der aufgezeichneten Messskala wurden die bei

entsprechendem Objektiv (10-fach-Vergrößerung) aufgenommenen Fotos einzeln ausgewertet, indem die Sphäroide mit einer Ellipse umrandet wurden und das Areal der migrierten Zellen markiert wurde. Das Computerprogramm rechnete danach den Median der von den ausgewanderten Zellen zurückgelegten Strecke aus. Der Quotient der Werte nach 48 Stunden und der am Tag 0 gibt somit die Steigerung des Migrationsareals an. Aus den drei Werten pro Ansatz wurde der Mittelwert bestimmt.

3.1.12 Invasionsassay

Zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit und -eigenschaften wurden Glioblastomzell-sphäroide in ein Kollagengel gesetzt, in dem die Möglichkeit der dreidimensionalen Ausbreitung von Tumorausläufern besteht. Nachdem Sphäroide wie oben beschrieben gewählt wurden, folgte in einem 15 ml Tube der Ansatz des Kollagengels. Zu 2 ml flüssigen aus Kälberhaut gewonnenem Kollagen (3 mg/ml, pH 3.0) wurden 2 ml Ultra pure Water sowie 0,5 ml 10x DMEM zugegeben. Unter leichtem Schütteln wurden etwa 0,1 M NaOH tropfenweise zupipettiert, bis ein zartrosa Farbumschlag erkennbar wurde. Von der fertigen Mischung wurden 0,5 ml pro Well in eine 4-Well-Platte gegeben und die vorvereinzelten Sphäroide mittels Pasteurpipette in die Mitte der Wells zentriert. Pro Zelllinie wurden vier Sphäroide ohne, und je vier mit Doxycyclin und Cefotaxim auf diese Weise angelegt. Im Brutschrank bei 37°C ohne CO₂ wurde das Gel für 30-45 min gehärtet, danach folgte die Zugabe von 0,5 ml Medium, teils ohne, teils mit den oben beschriebenen Konzentrationen der Antibiotika Doxycyclin und Cefotaxim. Am Tag 0, sowie nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurde mit Hilfe der Messskala im Objektiv des Mikroskops der senkrechte und waagerechte Durchmesser der Sphäroide gemessen und aus dem Mittelwert der beiden Zahlenangaben geteilt durch zwei der Radius errechnet. Nun konnte mit der Formel zur Errechnung des Kreisvolumens:

$$V = \frac{4 \times P \times r^3}{3}$$

das Volumenwachstum der Sphäroide bestimmt werden. Aus je vier Sphäroiden der gleichen Zelllinie unter gleichen Bedingungen wurde der Mittelwert berechnet. Außerdem wurden die Sphäroide jeden 2. Tag, somit am Tag 0, 2 und 4 fotografiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung aus Zellen wurde das SV Total RNA Isolation System von Promega verwendet. Trypsinierte Zellen wurden mit 8,5 ml Normalmedium aufgenommen, in ein 50 ml Tube überführt und bei Raumtemperatur, 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 25 ml eiskaltem PBS gewaschen und die Suspension erneut bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Letztgenanntes Waschen und Zentrifugieren wurde noch einmal wiederholt. Nach vorsichtigem Abschütten des Überstandes wurden dem Pellet 175 µl SV RNA Lysis Buffer beigefügt und die Lösung mit der Pipette resuspendiert. Um die Lösung homogen zu machen und möglichst viel RNA zu gewinnen wurde auf eine 2 ml Spritze erst eine grobe, später eine feinere Kanüle adaptiert und wiederholt resuspendiert. Zu dem Zelllysate wurden 350 µl SV RNA Dilution Buffer gegeben, gut gemischt und die Suspension in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf-Cap überführt, dieses schließlich bei 70°C für 3 min inkubiert. Danach wurden die Caps bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue RNase-freies 1,5 ml Caps pipettiert, 200 µl 96%iges Ethanol beigemischt, die Mixtur in eine Säule gegeben (im Kit beigefügt) und bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 600 µl SV Waschlösung in die Säule pipettiert und bei 14000 rpm für 1 min erneut zentrifugiert. Währenddessen wurde der DNase-Mix, zusammengesetzt aus pro Isolation 40 µl Yellow Core Buffer, 5 µl 0,09M MnCl₂ und 5 µl DNase I Enzym, hergestellt. Von dem gut gemischten (nicht vortexen!) DNase-Mix wurden je 50 µl in die Mitte einer Säule gesetzt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Der Zugabe von 200 µl Stopplösung, Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 min und Verwerfen des Durchflusses folgte die Zugabe von 600 µl Waschlösung in die Säule, Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 min und Abkippen des Durchflusses. Nach wiederholter Zugabe von 250 µl Waschlösung und Zentrifugieren bei 14000 rpm für 2 min wurde die Säule in eine neues dem Kit beigefügte 1,5 ml Cap überführt. In die Säule wurden 100 µl Nuclease-freies Wasser gegeben, welches die RNA aus dem Filter der Säule zu lösen vermag, und bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, das Cap mit der gelösten RNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.2 Photometrische Quantifizierung der aufgereinigten RNA

Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration wurde an einem Zweistrahlgerät mit einer Quecksilberniederdrucklampe als Lichtquelle durchgeführt. Das Extinktionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Nach Lambert-Beer ist hierbei die Extinktion als Produkt aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ($[e] = \text{ml/g cm}$) der Konzentrationen der Lösung ($[c] = \text{g/100 ml}$) und der Schichtdicke ($[d] = \text{cm}$) definiert. Die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von RNA und Proteinen finden in der Reinheitskontrolle der RNA ihre Anwendung. Bei einer reinen Probe sollte der Quotient $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt er über 2,0 kann eine Verunreinigung vorliegen, bei Werten unter 1,8 liegt eine Verunreinigung mit Proteinen vor.

Zunächst wurde mit einem Leerwert (Füllung der Quecksilberküvette mit 100 μl H_2O) die Referenz auf 0 eingestellt. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Proben mit einer Verdünnung von 1:99 (1 μl frisch isolierte RNA und 99 μl DEPC-Wasser) gemessen. Das Gerät rechnete automatisch die Konzentration der RNA in der Ausgangslösung aus. Zwischen jedem Messgang wurde die Küvette mit Ethanol und DEPC-Wasser gereinigt.

3.2.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Durch Reverse Transkriptasen ist es möglich mRNA in komplementäre cDNA umzuschreiben. Hierbei wird ein Enzym verwendet, das aus dem murinen Maloney-Leukämie-Virus (M-MLV) isoliert wurde.

Bei der cDNA-Synthese wurden je nach Konzentration der RNA im Ansatz 0,25- 0,8 μg RNA eingesetzt. Je geringer die Konzentration der RNA war, desto größer war das benötigte Volumen zur Herstellung der cDNA. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 2 μl Oligo (dT)₁₈ Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) beigefügt und mit deionisiertem nukleasefreiem Wasser auf 24 μl aufgefüllt. Es wurde vorsichtig gemischt und bei short Spin zentrifugiert. Danach wurde das Gemisch bei 70°C für 5 min inkubiert. Nach Platzieren der Tubes auf Eis wurden 14 μl Mastermix beigemischt, bestehend aus:

- 8 μl 5x Reaktionspuffer
- 2 μl Ribonuklease-Inhibitor (20 U/ μl)
- 4 μl 10 mM dNTP-Mix

pro Ansatz. Auf das Zentrifugieren bei short Spin folgte eine Inkubation bei 37°C für 5 min. Danach wurden 2 µl RevertAid_{TM} H Minus M-MuLV RT (200 U/µl) zugefügt. Das Gemisch wurde nun bei 42°C für 1 h inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Abkühlen auf Eis für 2 min erhält man cDNA mit einem Gesamtvolumen von 40 µl, die bei -20°C gelagert und für die PCR eingesetzt werden kann.

3.2.4 PCR

Der Nachweis von sehr schwach exprimierten RNA-Sequenzen gelingt durch Kombination von Reverser Transkription und anschließender Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Mit der Entdeckung und Isolierung der thermostabilen DNA-Polymerase Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) wurde die Voraussetzung geschaffen, bestimmte cDNA-Sequenzen mit hoher Ausbeute und Spezifität bei stringenter Temperatur von 72°C mittels PCR zu amplifizieren. DNA-Polymerasen synthetisieren matrizenabhängig neue DNA-Stränge durch Katalysieren einer schrittweisen Addition von frei vorliegenden Desoxyribonukleotideinheiten (dNTPs) an eine DNA-Kette. Zwei Primer, auch Primerpaar genannt, sprich zwei unabhängige aus 20 bis 30 Basen bestehende Oligonukleotide, die im Abstand von 150 bis 700 Basenpaaren (bp) an einen der beiden komplementären DNA-Stränge binden können, dienen als Starter für die Polymerase. Die Kettenverlängerung erfolgt in 5'->3'-Richtung durch nukleophilen Angriff der freien 3'-OH-Gruppe der Startsequenz auf das innerste Phosphoratom des neuen dNTPs. Bedingung für die Bildung einer solchen Phosphodiesterbrücke ist, dass die neue Base komplementär zu der des Matrizenstrangs ist. Mit Hilfe eines Mikroprozessors wird die Matrizenabhängige Synthese in Zyklen wiederholt. Die Zahl der spezifischen DNA-Fragmente verdoppelt sich mit jedem Zyklus und es resultiert eine exponentielle Amplifikation (n Zyklen=> 2^n Kopien). Doch nimmt die Aktivität der Taq-Polymerase aufgrund der hohen Denaturierungstemperatur mit der Zeit rapide ab, und ihre Konzentration im Verhältnis zur Konzentration der amplifizierten Matrizen-DNA sinkt stark, so dass die Effektivität in der Praxis sehr viel geringer ist.

Ein kompletter Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus 3 Phasen:

1. Denaturierung der cDNA bei 95°C, um die Doppelstränge aufzulösen und dadurch die Anlagerung zu ermöglichen.

2. Anlagerungsphase, in der sich die Primer an die komplementären Sequenzen anlagern. Die optimale Temperatur wird durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen ermittelt, welche die Primer mit ihrer komplementären Sequenz eingehen (= GC-Anteil der Primer). Die Stringenz der Reaktion sinkt bei zu niedrigen Temperaturen, mit höheren Temperaturen steigert man die Spezifität.
3. Polymerisationsphase, bei der die komplementären Stränge durch die Taq-Polymerase bei 72°C vervielfältigt werden.

Semiquantitative PCR

Zu Beginn wurde eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt um die Effizienz der cDNA-Synthese nachzuweisen und darauf aufbauend die jeweiligen cDNA-Mengen einander anzugleichen. **Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** ist ein Stoffwechsellzym, welches an der für die Zelle essentiellen Glykolyse beteiligt ist. GAPDH-mRNA wird in allen Zellen daher in einer recht konstanten Menge produziert. Das Gen wird deshalb auch als sogenanntes „Housekeeping-Gen“ bezeichnet; die spezifische cDNA eignet sich gut als interner Konzentrationsstandard für die Gesamt-cDNA.

Für die PCR werden 0,5 µl der zu testenden cDNA mit 49,5 µl Mastermix vermischt.

Ein Mastermix setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 5 µl 10 x Puffer
- 5 µl 5 x Taq M
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 2,5 µl GAPDH-sense-Primer (1:10)
- 2,5 µl GAPDH-antisense-Primer (1:10)
- 33 µl Ultra Pure Water
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase

Ein Mastermix wurde von der Firma Eppendorf verwendet. Nach dessen Zugabe zur entsprechenden cDNA wird diese im Thermocycler amplifiziert. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA können die Banden densitometrisch ausgewertet oder anhand der unterschiedlichen Bandenintensitäten miteinander verglichen werden. Bei erneuten PCRs für GAPDH werden die cDNA-Mengen variiert, um gleiche

Ausgangsmengen zu erreichen bzw. damit die Bandenintensitäten der jeweiligen Ansätze übereinstimmen. Nach Angleichen der GAPDH-Banden gilt für alle weiteren PCRs, dass dickere Banden für eine stärkere, dünne oder keine Banden für eine schwache bis ausbleibende Expression der untersuchten Gene stehen. Die potentiellen Unterschiede werden densitometrisch ausgewertet. Wie schon erwähnt bestehen Unterschiede in den PCR-Bedingungen was die Annealing- (Anlagerungs-) Temperatur der einzelnen Primerpaare sowie die Amplifikationszyklen betrifft. Da die Amplifikation nur bis zu einem bestimmten Punkt exponentiell verläuft können nach Erreichen der Plateauphase Banden von unterschiedlichen cDNA-Mengen gleiche Intensitäten aufweisen. Der Zeitpunkt des Übergangs in die Plateauphase ist von der Ausgangszahl der amplifizierten Moleküle abhängig (Kellogg et al., 1990). Die mRNA bzw. cDNA der GAPDH liegt in großen Mengen vor, so dass in diesem Fall die Plateauphase schneller erreicht ist. Im Allgemeinen gilt um potentiell quantitative Unterschiede in der mRNA-Expression analysieren zu können muß eine Anzahl von Zyklen durchlaufen werden, bei der einerseits das Produkt nachweisbar ist, andererseits die Plateauphase noch nicht erreicht ist. Eine Analyse der optimalen Zykluszahl ist daher im Vorfeld erforderlich. Aufgrund der höheren Konzentration der cDNA der Zelllinien gegenüber der der Primärkulturen wurden für die Amplifikation geringere Zykluszahlen benötigt. Die verwendeten Bedingungen der jeweiligen Gene sind aus der Tabelle zu entnehmen:

	Primersequenz	Annealing-Temp.	Zykluszahl- ZL	Zykluszahl- PK	Amplifikat
GAPDH	s GCA GGG GGG AGC CAA AAA GGG a TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG	68°C	20	24	567 bp
MMP2	s TTT CCA TTC CGC TTC CAG GGC ACA T a TCG CAC ACC ACA TCT TTC CGT CAC T	62,6°C	28	32	252 bp
MMP9	s GCG CTG GGC TTA GAT CAT TCC TCA a GCA GCG CGG GCC ACT TGT C	61°C	37	37	475 bp
TIMP1	s TTT GAG CCC CTG GCT TCT GG a AAG CAA TGA GTG CCA CTC TGC	57,5°C	25	40	497 bp

Gelelektrophorese von DNA

Bei der horizontalen Agarosegelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach dem Molekulargewicht, da die Wanderungsrate der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld zum dekadischen Logarithmus (\log_{10}) der Anzahl der Basenpaare umgekehrt proportional ist. Je kleiner ein DNA-Fragment folglich ist, umso schneller wandert es im Gel. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit v definiert als:

$$v = Q \times Z$$

Q – Feldstärke = $6p \times n \times r$
 Z – Ladung
 N – Viskosität
 r – Teilchenradius

Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen laufen die Nukleinsäuren in Richtung Anode. Durch Zugabe von interkalierenden Ethidiumbromid (EtBr) in das Gel kann die DNA in diesem unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Verfolgung der Lauffront wird ein Loading Dye (Bromophenolblau) in den Ladepuffer gegeben. Um die Größe der PCR-Produkte bestimmen zu können läuft am Rande jedes Gels ein Molekulargewichtsmarker mit.

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wird 1,5 g Agarose in 150 ml 1 x TAE Puffer gegeben und das Becherglas mit dem Gemisch in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Flüssigkeit klar ist. Nachdem die Lösung handwarm ist wird ihr 7 μ l Ethidiumbromid beigefügt, nach kurzem Schütteln blasenfrei in die Gelkammer gegossen. Sobald das Gel erkaltet ist kann die Gelkammer mit Laufpuffer (1 x TAE Puffer) gefüllt werden, bis das Gel vollständig bedeckt ist.

Es wurden 16 μ l des Amplifikationsproduktes mit 2 μ l Loading Dye in einem Cap gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde der Molekulargewichtsmarker „Smart Ladder“ aufgetragen, der sowohl die Bandengröße, wie auch das Gewicht einer jeden Bande bestimmbar macht. Bei einer Spannung von 100 V erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente. Mit Hilfe des Videodokumentationssystems kann das Ergebnis im Bild festgehalten werden.

3.3 Proteinbiologische Methoden

3.3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um zelluläre Antigene zu detektieren und zu lokalisieren. Ein primärer Antikörper bindet dabei an das Protein, welches nachzuweisen ist. Ein markierter sekundärer Antikörper bindet in einer weiteren Reaktion an den Primärantikörper. Nach Zugabe eines Substrates kommt es durch den markierten Sekundär-AK zu einer Farbreaktion, die ein Signal an dem Ort des nachgewiesenen Proteins abgibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IHC an Zelllinien und Primärkulturen durchgeführt. Sie diente dem Nachweis von Metalloproteinasen und ihren natürlichen Inhibitoren. Dabei wurde das Vorhandensein von MMP2, MMP9 und TIMP1 untersucht. Zur Durchführung aller immunhistochemischen Färbungen wurde der Histostain®-Plus-Kit von Zymed® verwendet.

Antikörper

Die Konzentrationen der Primärantikörper waren wie folgt:

MMP2 [Gelatinase A]	10µg/ ml
MMP9 [Gelatinase B]	2 µg/ ml
TIMP1	5 µg/ ml

Die Antikörper erkennen sowohl die Pro- als auch die aktive Form der MMPs.

Positivkontrolle

Als Positivkontrolle diente während aller IHC-Experimente das Gewebe von entzündeten Tonsillen. Dieses wurde freundlicherweise von der HNO-Klinik bereitgestellt. Direkt nach Entnahme im OP wurde das Tonsillengewebe in einen 2 cm³ Kubus gelegt und dieser mit Tissue Tek aufgefüllt. Der Kubus wurde dann in einem mit Propanol gefüllten Becherglas, welches sich in flüssigem Stickstoff befand, 30 s geschwänkt. Sobald Tissue Tek und Tonsillengewebe fest wurden, konnte die Lagerung des Blockes bei -80 °C erfolgen. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 7 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger

aufgebracht. Die Schnitte wurden 1,5 h luftgetrocknet, anschließend mit Aceton bei 4°C für 10 min fixiert und bei -20°C bis zur eigentlichen Färbung gelagert.

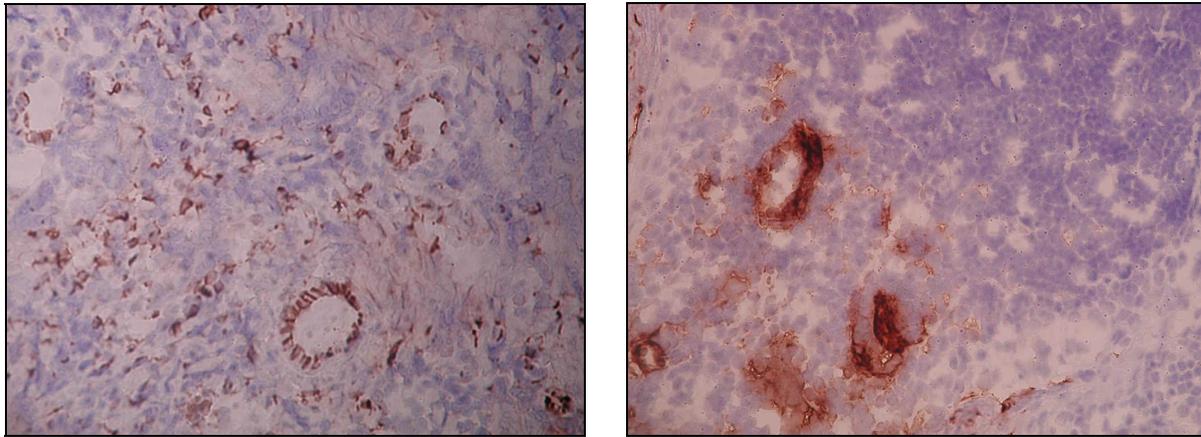


Abbildung 1: Immunhistochemie (links MMP2, rechts MMP9) einer entzündeten Tonsille mit Farbstoff DAB. Nachzeichnung der Gefäßstrukturen in typischer Weise.

Lab Teks

Zelllinien und Primärkulturen wurden in sog. Lab Teks, mit Kammern besetzte Objektträger, in denen man Zellen getrennt voneinander kultivieren kann, ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Bei dieser Arbeit wurden 8-Kammer-Plastik-Lab Teks verwendet, die aufgrund der sehr geringen Oberfläche einer Kammer nur geringe Zellzahlen erfordern. In jede Kammer wurden 400 µl Zellsuspension pipettiert, teils ohne teils mit den entsprechenden Konzentrationen der Antibiotika Doxycyclin und Cefotaxim. 48 Stunden später wurde das Medium abgekippt, die Kammer vom Objektträger gelöst, und die Zellen auf den Lab Teks mit 1x PBS gewaschen. Nach Fixierung mit eiskaltem Aceton für 10 min bei 4°C und darauffolgender Lufttrocknung wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Nachweis von MMP2, MMP9, TIMP1

Vor jeder Färbung wurden die Lab Teks, wie auch die Schnitte mit einem Pap-Pen umrandet, um das Verbleiben der Färbelösungen in dem mit Zellen oder Gewebeschnitten besetzten Areal zu sichern. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde in Methanol/ 0,6 % H₂O₂ für 1 min blockiert. Nach 3 x-igem Waschen in PBS (pH 7,4) für je 2 min wurde eine Blocklösung (Lösung A im Kit) aufgetragen, 10 min inkubiert und vorsichtig abgeklopft. Der Primär-AK

in oben angegebenen Konzentrationen wurde aufgetragen und in einer feuchten Färbekammer 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Lab Teks und Tonsillenschnitte 3 x 2 min in PBS gewaschen und mit einem biotinylierten Sekundär-AK (Lösung B) für 10 min inkubiert. Dem Waschen in PBS 3 x je 2 min folgte die Zugabe des Enzym-Konjugates (Lösung C) für 10 min. Nach erneutem Waschen 3 x je 2 min in PBS wurde die Peroxidase-Reaktion mit 0,5% DAB für 10 min entwickelt. Daraufhin wurden die Objektträger 10 min in Aqua dest. gewaschen, bevor sie mit frisch gefiltertem Hämatoxylin gegengefärbt wurden. Abschließend wurden die gefärbten Zellen und Schnitte mit 2 Tropfen Aquatex eingedeckt. Nach Färbung konnten die Objektträger bis zu 6 Monate dunkel bei 4°C aufbewahrt werden. Die Auswertung der Färbereaktionen erfolgte durch den Autor und Herrn Dr. G.H. Vince semiquantitativ an einem histologischen Mikroskop.

3.3.2 Apoptosefärbung

Mit Hilfe des In Situ Cell Death Detection Kit mit POD von Roche wurde die Apoptosefärbung durchgeführt. Hierbei können DNA-Strangbrüche durch Markierung der freien OH-Enden mittels modifizierter Nukleotide in einer Enzymreaktion nachgewiesen werden.

Auch für den Apoptosenachweis wurden Lab Teks verwendet und wie oben beschrieben vorgegangen. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank folgte das Abkippen des Mediums. Dann wurden die Lab Teks für 20 min in 4% PFA in PBS (pH 7.4, frisch angefertigt) fixiert, in PBS gewaschen und für 2 min in Ethanol getaucht, bevor sie bei -20 °C zwischengelagert werden konnten.

Nach Auftauen der Lab Teks wurden diese in einer frisch präparierten Permeabilisierungslösung, bestehend aus 0.1% Triton X-100 in 0.1%iger Natriumcitrat, inkubiert, anschließend 3 mal in PBS gewaschen.

Die im Kit vorhandene Enzymlösung wurde zunächst mit einer Pufferlösung, im Verhältnis 1:9 gemischt und etwa 50 ml des Gemisches auf jedes Lab Tek pipettiert. Für die Negativkontrolle wurde reine Pufferlösung verwendet. Nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C wurden die Lab Teks 3 mal mit PBS gespült. 50 ml der Entwicklerslösung POD (horse-radish peroxidase) wurden nun auf jedes Lab Tek aufgetragen.

Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde erneut 3 mal mit PBS gespült, die Objektträger getrocknet und in Aquatex eingebettet.

Positivkontrolle

Um eine Positivkontrolle zu erhalten wurden 1 mg/ml DNase I und die gleiche Menge BSA in 50 mM TrisHCl (pH 7.5) gelöst und je ein Lab Tek mit fixierten Zelllinien sowie mit Primärzelllinien für 10 min in dieser Lösung inkubiert. Dabei werden die DNA-Strukturen derart beschädigt, dass die entstehenden Fragmente denen apoptotischer Zellen ähneln.

3.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung des MTT-Assays, des Adhäsions-, Migrations-, und Invasions- Assays wurde der Student's t-test verwendet, wobei ein p-Wert von < 0.05 als statistisch signifikant galt.

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es die Auswirkung der Antibiotika Doxycyclin und Cefotaxim auf Zellproliferation, -adhäsion, -migration und -invasion von Gliomzellen in vitro zu untersuchen und gleichzeitig deren Wirkung auf das Expressionsmuster von MMP2, MMP9 und TIMP1 zu ermitteln. Für die Versuche verwendeten wir drei verschiedene humane Gliomzelllinien, GaMG, U251 und U373 sowie eine Gliomzelllinie der Ratte, C6. Außerdem gelangen uns genannte Versuche mit 4 humanen Primärzellen, die da waren 2406, 2418, 2421 und 2464.

4.1 MTT

Mit Hilfe des MTT- Assays hat man die Möglichkeit die Anzahl der lebenden Zellen densitometrisch zu bestimmen. Wir nahmen uns diesen Proliferationsassay zunutze um das Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen mit den behandelten zu vergleichen. Durchgeführt haben wir diesen Versuch mit 3 humanen Gliomzelllinien, der Rattenzelllinie C6, und den oben beschriebenen Primärzelllinien.

Bei allen Zelllinien wurde sowohl unter Behandlung unter Doxycyclin (1.5µg/ml) als auch unter Behandlung mit Cefotaxim (2µg/ml) eine signifikante Abnahme der Proliferation nachgewiesen. Der stärkste Doxycyclin- Effekt zeigte sich bei der Gliomzelllinie U251 (44.2% Abnahme der Proliferation) und bei der Rattenzelllinie C6 (47.6% Abnahme der Proliferation). Auf Cefotaxim reagierte die Gliomzelllinie U373 (51.9% Abnahme der Proliferation) mit der größten Proliferationsabnahme. Bei zwei der drei humanen Zelllinien (GaMG und U373) hatte Cefotaxim den deutlicheren Effekt gezeigt, bei der dritten humanen Zelllinie (U251) war der Effekt von Doxycyclin gering stärker, bei der Zelllinie C6 war der antiproliferative Effekt von Doxycyclin dem von Cefotaxim deutlich überlegen. Der Mittelwert der Hemmung der Proliferation aller Zelllinien beträgt für Doxycyclin 38.5%, für Cefotaxim 40.37%. Die Standardabweichungen waren bei allen Versuchen sehr gering, so dass man mittels t-Test ohne Ausnahme von signifikanten Ergebnissen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sprechen kann.

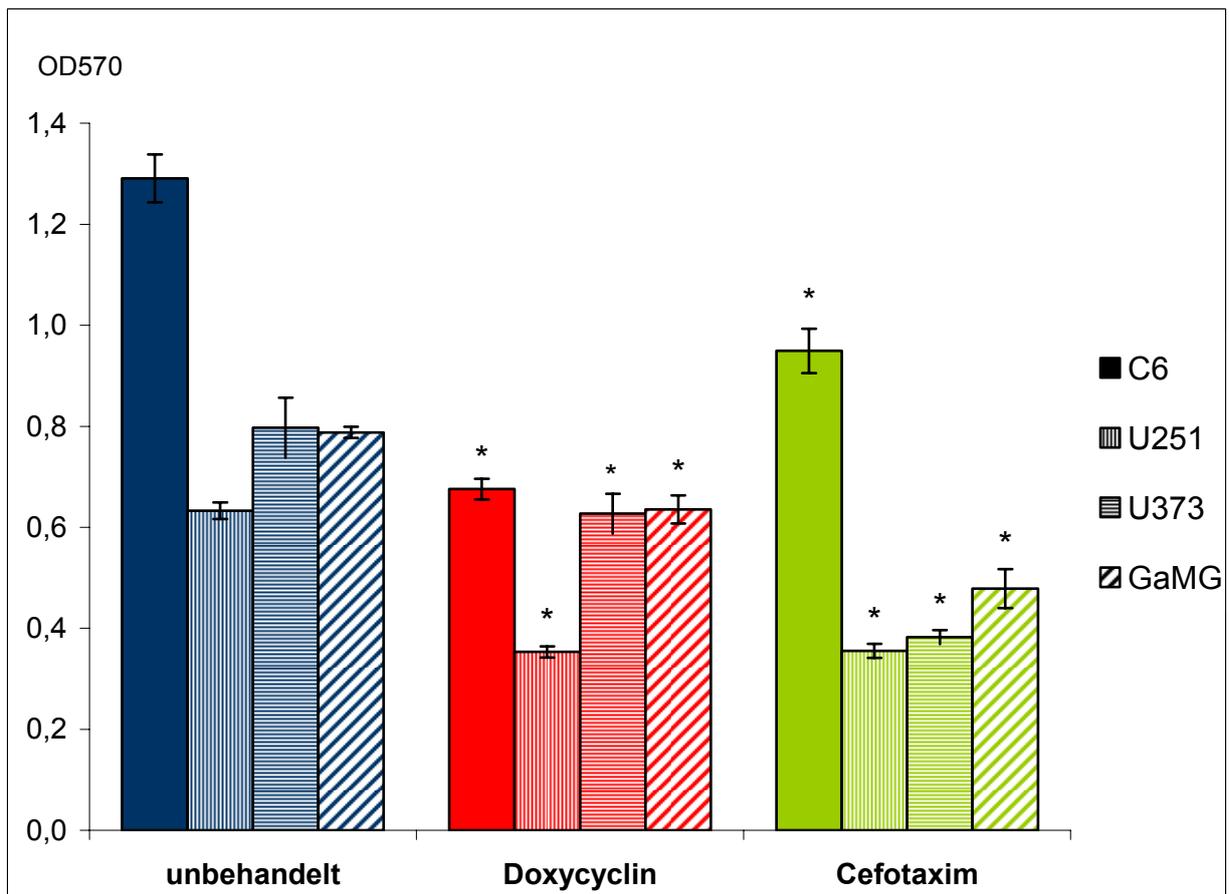


Abbildung 1: Proliferationsassay (MTT- Test) der Zelllinien C6, U251, U373 und GaMG; Vergleich der unbehandelten Zellen mit behandelten Zellen (Doxycyclin; Cefotaxim). Bei allen Zelllinien signifikante Abnahme der Proliferation mit $p < 0.05$.

Auch mit den Primärzelllinien 2406, 2418, 2421 und 2464 führten wir den MTT- Assay durch, um den proliferationshemmenden Einfluss der Antibiotika auf Gliomzellen zu überprüfen. Bei allen Primärzelllinien führte die Behandlung von Doxycyclin und auch von Cefotaxim zu einer Proliferationshemmung. Der stärkste Effekt unter Doxycyclinbehandlung wurde bei der Primärzelllinie 2406 beobachtet (30.3% Abnahme der Proliferation). Cefotaxim rief den stärksten Effekt bei 2406 (41.2% Abnahme der Proliferation) und bei 2464 (34.95% Proliferationsabnahme) hervor. Bei allen Primärzelllinien wurde unter Cefotaxim (35.6%) eine größere Abnahme der Proliferation beobachtet als unter Doxycyclin (26.5%). Auch bei den Primärzelllinien waren alle Ergebnisse signifikant.

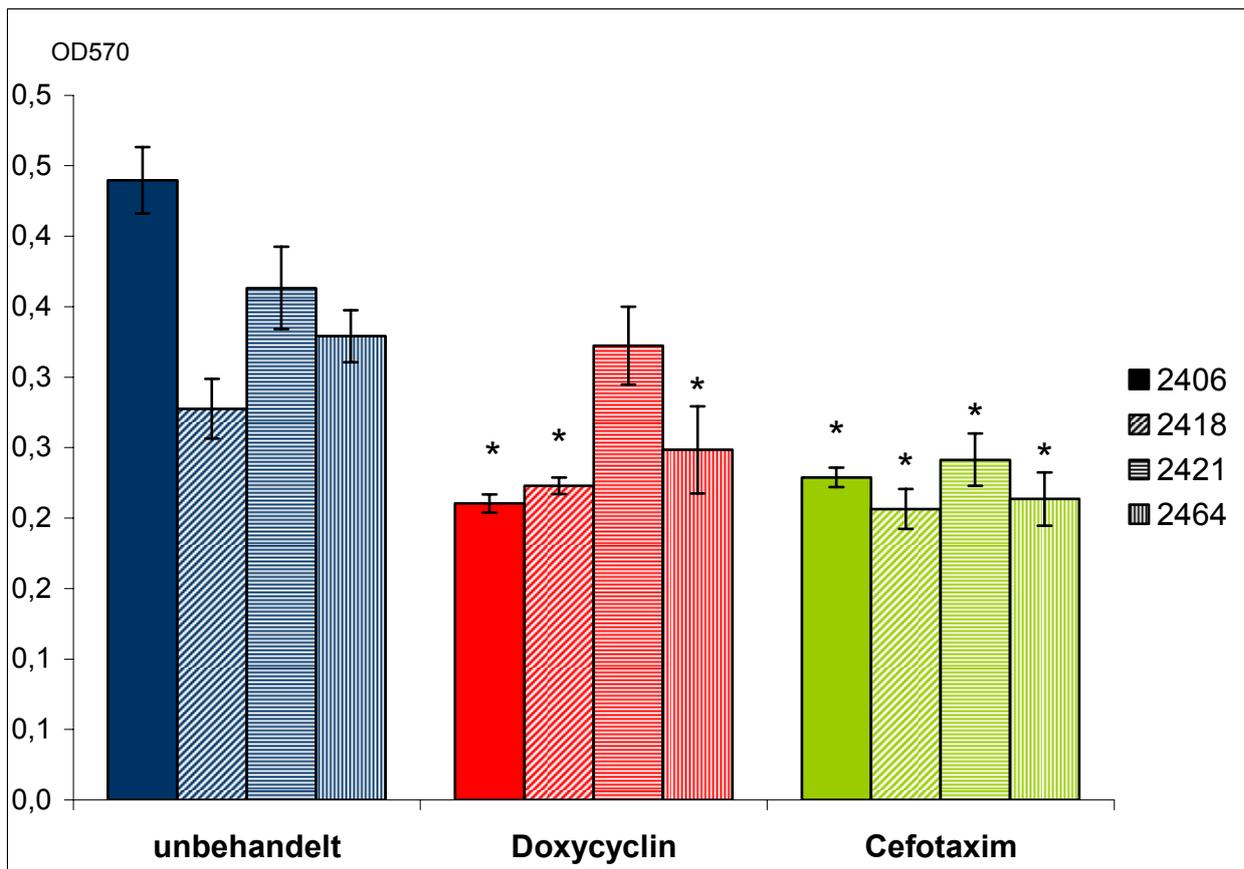


Abbildung 2: Proliferationsassay (MTT- Test) der Primärkulturen 2406, 2418, 2421 und 2464. Unbehandelte Zellen sind blau dargestellt, behandelte (Doxycyclin bzw. Cefotaxim). Bei den mit * gekennzeichneten Balken signifikante Abnahme der Proliferation mit $p < 0,05$.

4.2 Adhäsionsassay (Amidoblack- Assay)

Die Adhäsion von Gliomzellen stellt den ersten Schritt der Invasion und Metastasierung dar. Durch die Suppression der MMPs wird die Degradierung der Extrazellulärmatrix gebremst, demzufolge bleiben Laminin, Kollagen und andere Komponenten der EZM erhalten, die eine Steigerung der Adhäsion hervorrufen. Je adhärenter eine Tumorzelle ist, desto unwahrscheinlicher wird eine Invasion und Ausbreitung in das umgebende Gewebe sein.

Wir führten diesen Test mit allen Gliomzelllinien durch, nicht jedoch mit den Primärzelllinien, da diese eine so geringe Adhäsion zeigten, dass die Untersuchung der Adhäsionsänderung nicht sinnvoll wäre.

Unbehandelt stellten sich die C6-Rattengliomzellen am adhärenstesten dar, gefolgt von U251 und U373, am wenigsten adhären waren GaMG-Zellen.

Unter Doxycyclin kam es wie erwartet bei allen Zelllinien zu einer Adhäsionszunahme. Die stärkste Zunahme war bei der Zelllinie GaMG zu verzeichnen (152.2% Zunahme der Adhäsion); auch U373 reagierte auf Doxycyclin mit einer deutlichen Adhäsionszunahme (Adhäsionssteigerung von 64.9%).

Auf Cefotaxim reagierten die Zelllinien unterschiedlich. Bei lediglich 2 der 4 Zelllinien kam es zu einer Steigerung der Adhäsion (GaMG: 95.7% ige Adhäsionszunahme, U373: 16.2% ige Adhäsionszunahme). C6 und U251 fielen durch eine Adhäsionsabnahme auf (C6: 32.3% Adhäsionsabnahme, U251: 17.2% Adhäsionsabnahme).

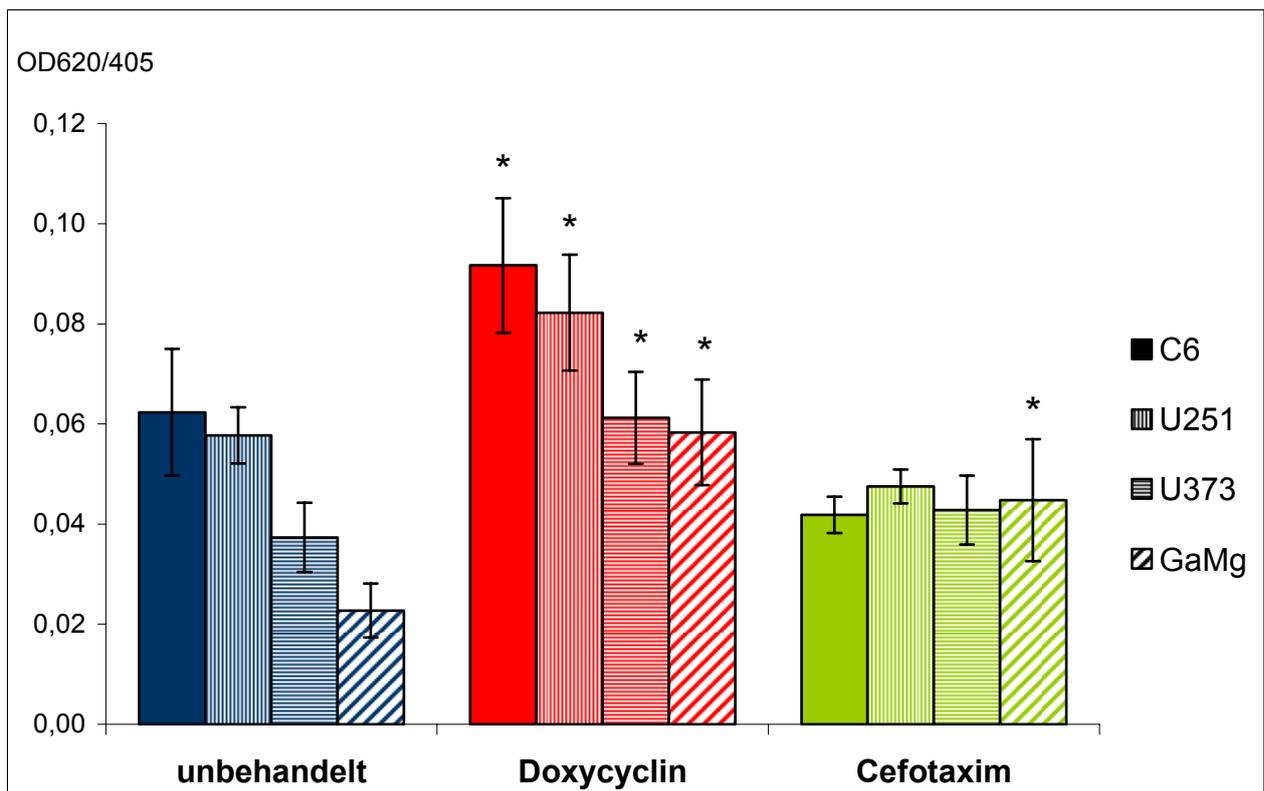


Abbildung 3: Adhäsionsassay (Amidoblack- Assay) der Zelllinien C6, U251, U373, und GaMG.

Unbehandelte Zellen, mit Doxycyclin behandelte Zellen und mit Cefotaxim behandelte Zellen. Bei den mit * markierten Balken signifikante Zunahme der Adhäsion mit $p < 0.05$.

4.3 Migrationsassay

Der Migrationsassay gibt Auskunft über die Fähigkeit von Tumorzellen sich zweidimensional auszubreiten. Daher können genauere Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit und das Wachstumsverhalten getroffen werden.

Der Migrationsassay wurde mit Hilfe von Gliomzellsphäroiden durchgeführt, die zuvor in einer mit Agar beschichteten Flasche auf einen Durchmesser von 200 bis 300µm (Zelllinien) und 150 bis 200 µm (Primärzelllinien) heranwuchsen. Es stellte sich heraus, dass C6-Rattengliomzellsphäroide bereits nach 2 Tagen diese Größe erreichten, Sphäroide von humanen Gliomzelllinien nach durchschnittlich 3 Tagen. Primärzellsphäroide wuchsen aber sehr langsam heran und benötigten etwa 4 Tage. Dieser Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend nahmen auch die Sphäroide der Zelllinien nach 24 und nach 48 Stunden mehr an Ausdehnung zu.

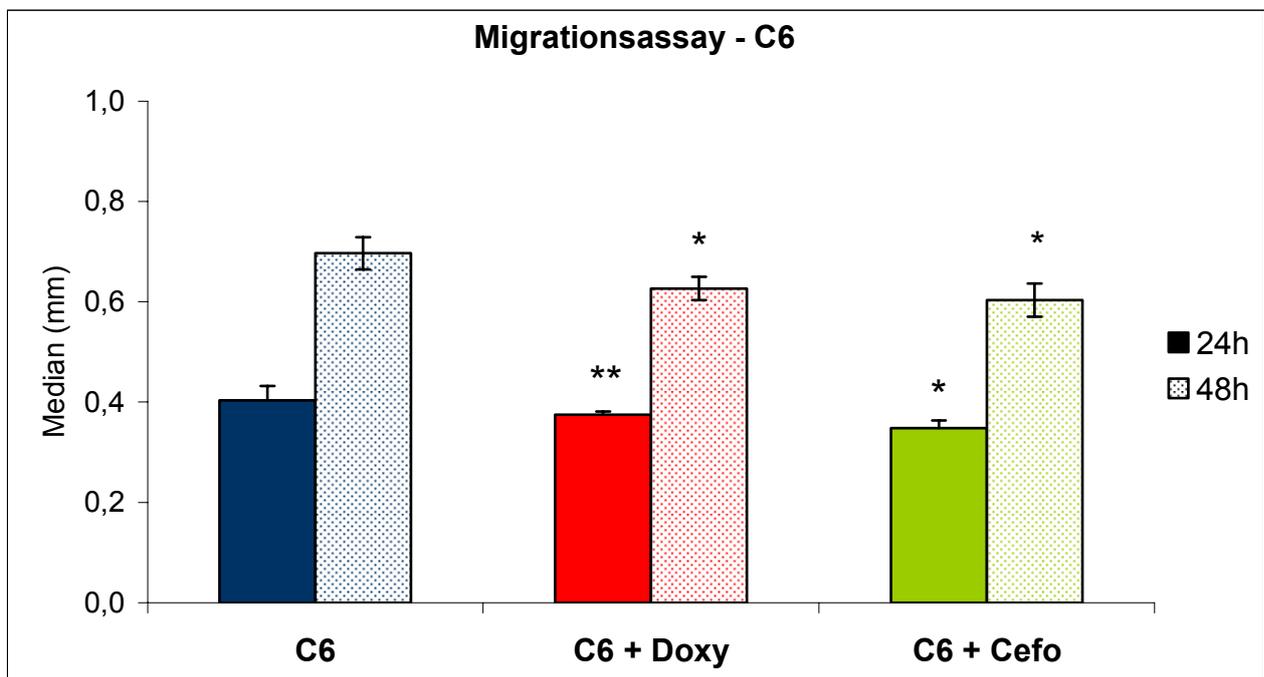


Abbildung 4: Migrationsassay der Rattenzelllinie C6. Dargestellt ist der Median des Sphäroids nach 24h und nach 48h. Signifikante Abnahme der Migration unter Doxycyclin und unter Cefotaxim mit $p < 0.05$ bei den mit * gekennzeichneten Balken, $p = 0.2$ bei dem mit ** markierten Balken.

Bei allen Zelllinien konnte beobachtet werden, dass der Median der Sphäroide nach 24 Stunden, wie auch nach 48 Stunden, unter Behandlung mit Doxycyclin und mit Cefotaxim weniger an Größe zulegte als der der unbehandelten Sphäroide. Bei einer der vier Zelllinien (GaMG) erwies sich Doxycyclin als das potentere wachstumshemmende Mittel (Hemmung der Migration von 16% nach 24h, von 10.5% nach 48h). Cefotaxim hingegen stellte sich in der von uns gewählten Konzentration bei der Rattenzelllinie C6 (Hemmung der Migration unter Cefotaxim von 13.7% nach 24h, von 13.4% nach 48h), aber auch bei den zwei humanen Zelllinien U251 (Hemmung der Migration durch Cefotaxim von 12.2% nach 24h, von 11.1% nach 48h) und U373 (Migrationshemmung durch Cefotaxim von 11.8% nach 24h, von 7.3% nach 48h) als das stärkere migrationshemmende Antibiotikum dar.

Betrachtet man den Mittelwert der vier Primärzelllinien, so erkennt man unter Doxycyclin eine Hemmung der Migration nach 24 Stunden von 9.0%, nach 48 Stunden von 8.3%, jeweils im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien zur selben Zeit. Unter Cefotaxingabe konnte man eine Hemmung der Migration von 9.9% nach 24 Stunden und 8.9% nach 48 Stunden.

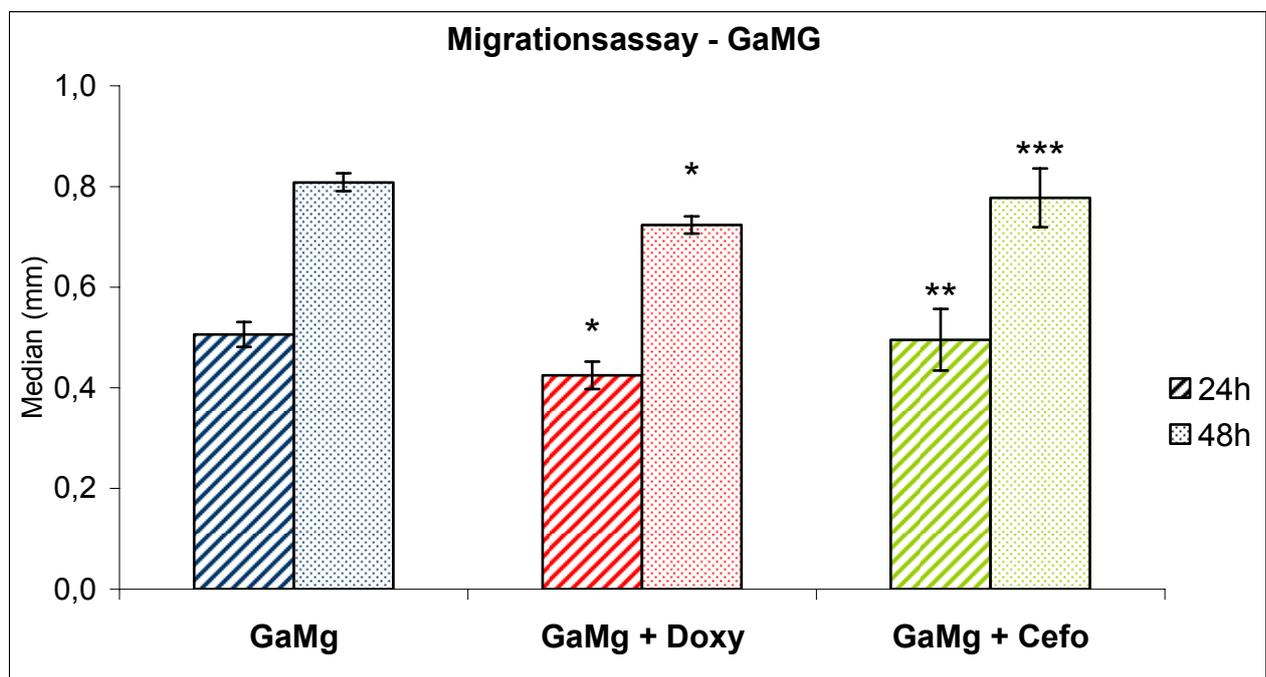


Abbildung 5: Migrationsassay der Zelllinie GaMG. Median der Sphäroide nach 24h und nach 48h. Bei den mit * markierten Balken signifikante Abnahme der Migration mit $p < 0.02$. Bei dem mit ** gekennzeichneten Balken $p = 0.8$, bei dem mit *** gekennzeichneten Balken $p = 0.5$.

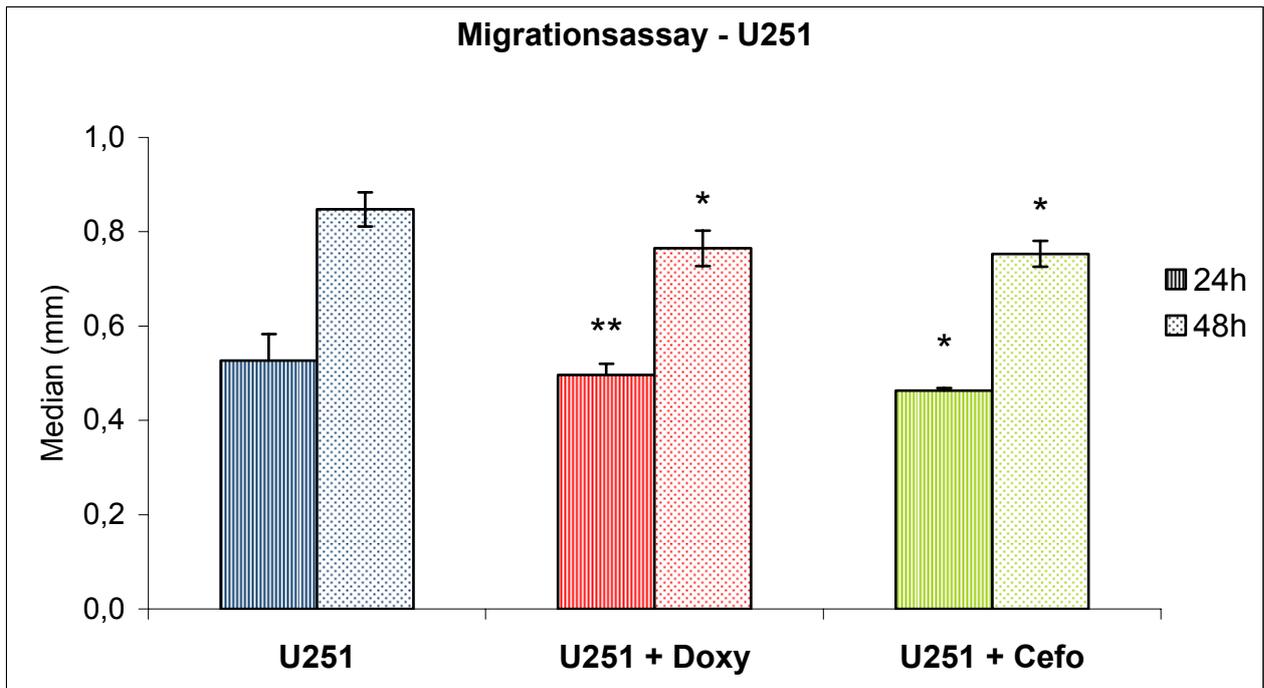


Abbildung 6: Migrationsassay der Zelllinie U251. Median der Sphäroide nach 24h und nach 48h. Bei allen mit * markierten Balken signifikante Abnahme der Migration mit $p < 0.05$. Bei dem mit ** markierten Balken $p = 0.45$.

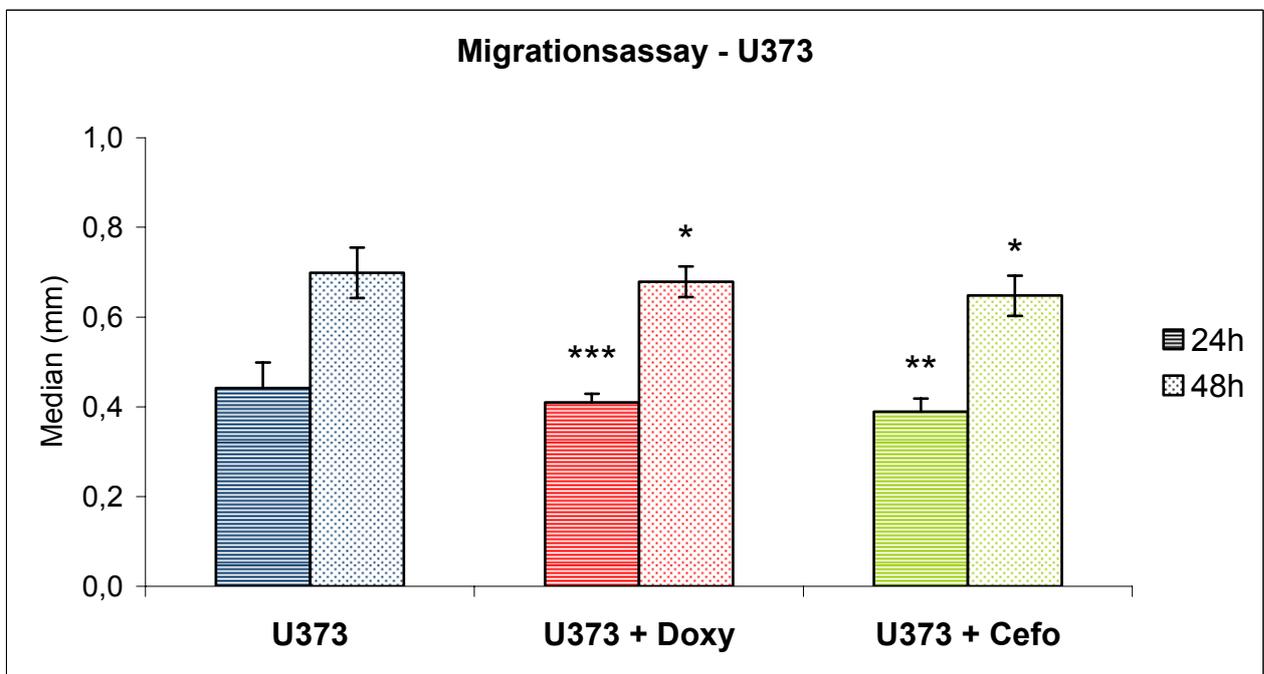


Abbildung 7: Migrationsassay der Zelllinie U373. Median der Sphäroide nach 24h und 48h. Signifikante Abnahme der Migration mit $p < 0.3$ bei den mit * gekennzeichneten Balken, mit $p = 0.45$ bei dem mit ** markierten Balken, mit $p = 0.63$ bei dem mit *** gekennzeichneten Balken.

	24h	48h
C6 + Doxycyclin	7.2%	10.1%
C6 + Cefotaxim	13.7%	13.4%
U251 + Doxycyclin	5.8%	9.7%
U251 + Cefotaxim	12.2%	11.1%
U373 + Doxycyclin	7.3%	2.9%
U373 + Cefotaxim	11.8%	7.3%
GaMG + Doxycyclin	16%	10.5%
GaMG + Cefotaxim	2%	3.8%

Abbildung 8: Migrationsabnahme in Prozent der Zelllinien C6, U251, U373 und GaMG unter Behandlung mit Doxycyclin und Cefotaxim nach 24h und nach 48h.

Der Migrationsassay der Primärzelllinien konnte nur mit drei der vier Zelllinien, nämlich 2406, 2418 und 2421 durchgeführt werden, da sich herausstellte, dass die Zelllinie 2464 nicht in der Lage war Sphäroide zu bilden.

Bei allen drei Primärzelllinien konnte man eine Verminderung der Größenzunahme unter Doxycyclin und Cefotaxim nach 24 Stunden und nach 48 Stunden feststellen. Dabei stellte sich bei den von uns festgelegten Konzentrationen Cefotaxim als das potentere Antibiotikum heraus. So konnte die stärkste Hemmung der Migration bei der Primärzelllinie 2418 festgestellt werden, bei der das Wachstum der Sphäroide nach 24 Stunden um 53.8%, nach 48 Stunden um 41.8% unter Cefotaxim gehemmt wurde.

Doxycyclin bewirkte die größte Migrationshemmung bei Primärzelllinie 2406, die nach 24 Stunden um 7.9%, nach 48 Stunden um 30.6% in ihrem Wachstum eingeschränkt wurde im Vergleich zur unbehandelten Primärzelllinie unter denselben Bedingungen.

Bildet man aus allen 3 Primärzelllinien einen Mittelwert, erkennt man eine Abnahme der Migration nach 24 Stunden von 10.6%, nach 48 Stunden von 19.2% unter Doxycyclin. Deutlichere Ergebnisse erhielt man nach Behandlung der Primärzellen mit Cefotaxim. Hier wurde die Migration nach 24 Stunden um 37%, nach 48 Stunden um 33.4% gehemmt.

Für weitere Ergebnisse siehe bitte Tabelle und Diagramme weiter unten.

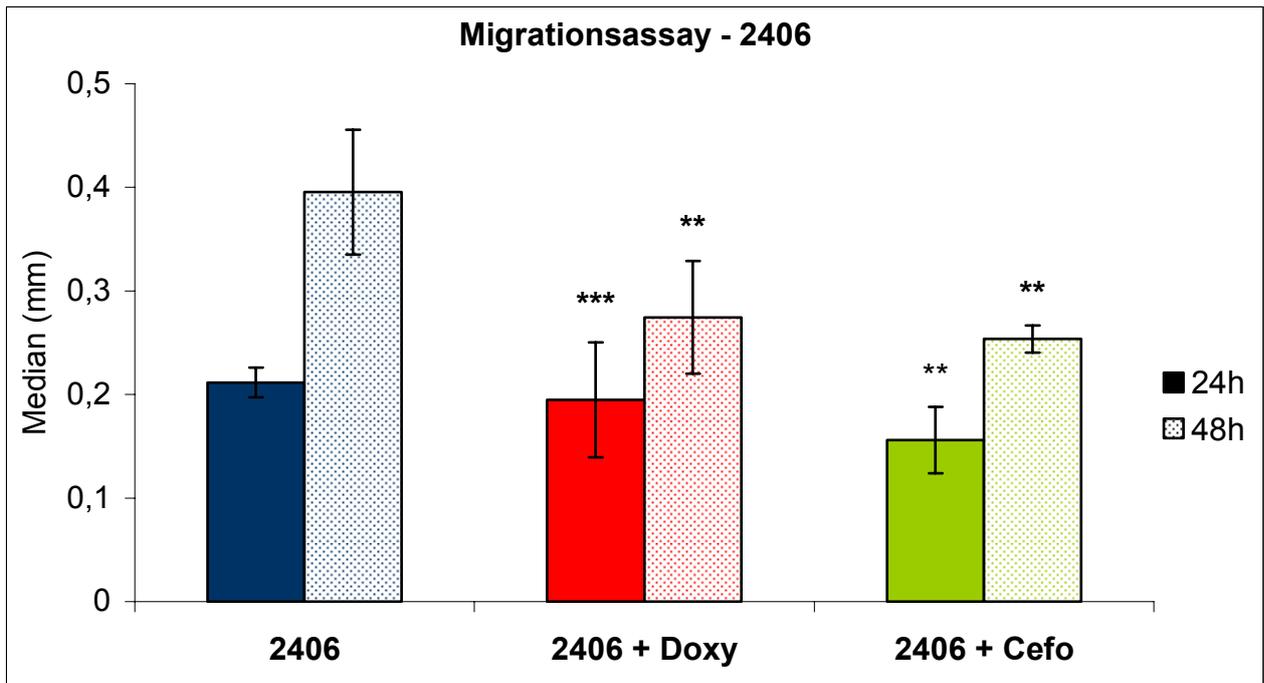


Abbildung 9: Migrationsassay der Primärzelllinie 2406. Median der Sphäroide nach 24h und 48h. Mit ** gekennzeichnete Balken mit $p < 0.08$. Mit *** gekennzeichnete Balken mit $p = 0.66$.

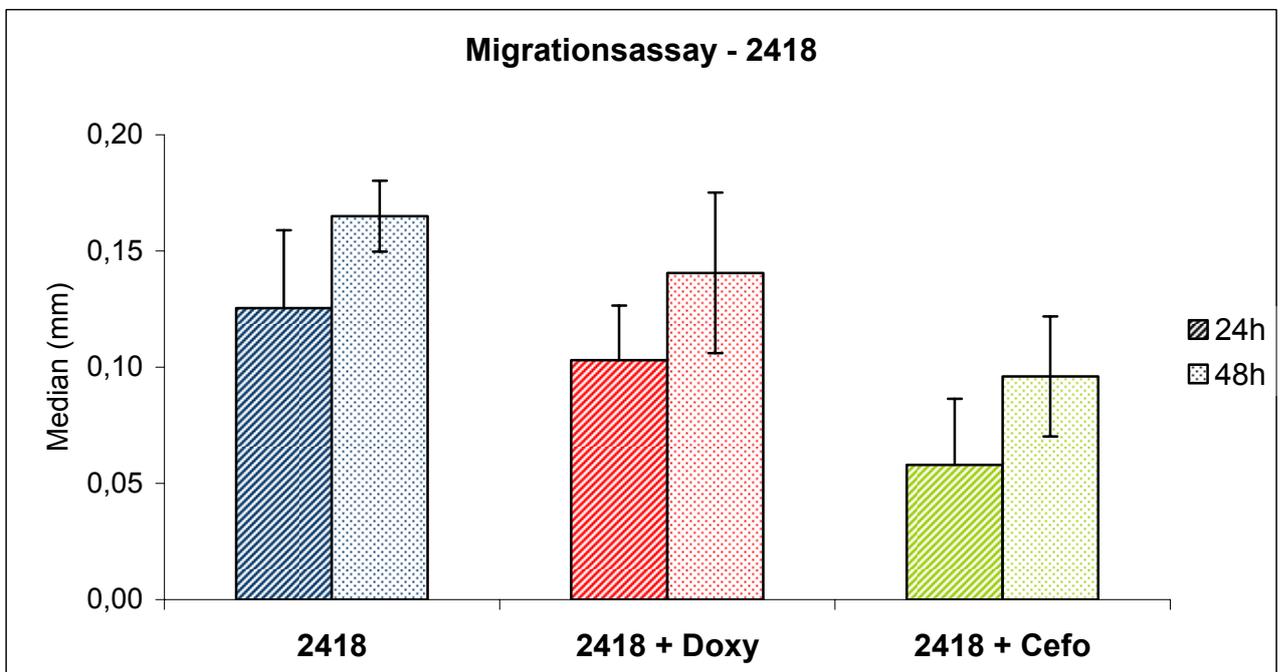


Abbildung 10: Migrationsassay der Primärzelllinie 2418. Median der Sphäroide nach 24h und 48h. Abnahme der Migration mit $p < 0.4$ bei + Doxycyclin; $p = 0.06$ bei + Cefotaxim nach 24h, $p = 0.03$ bei + Cefotaxim nach 48h.

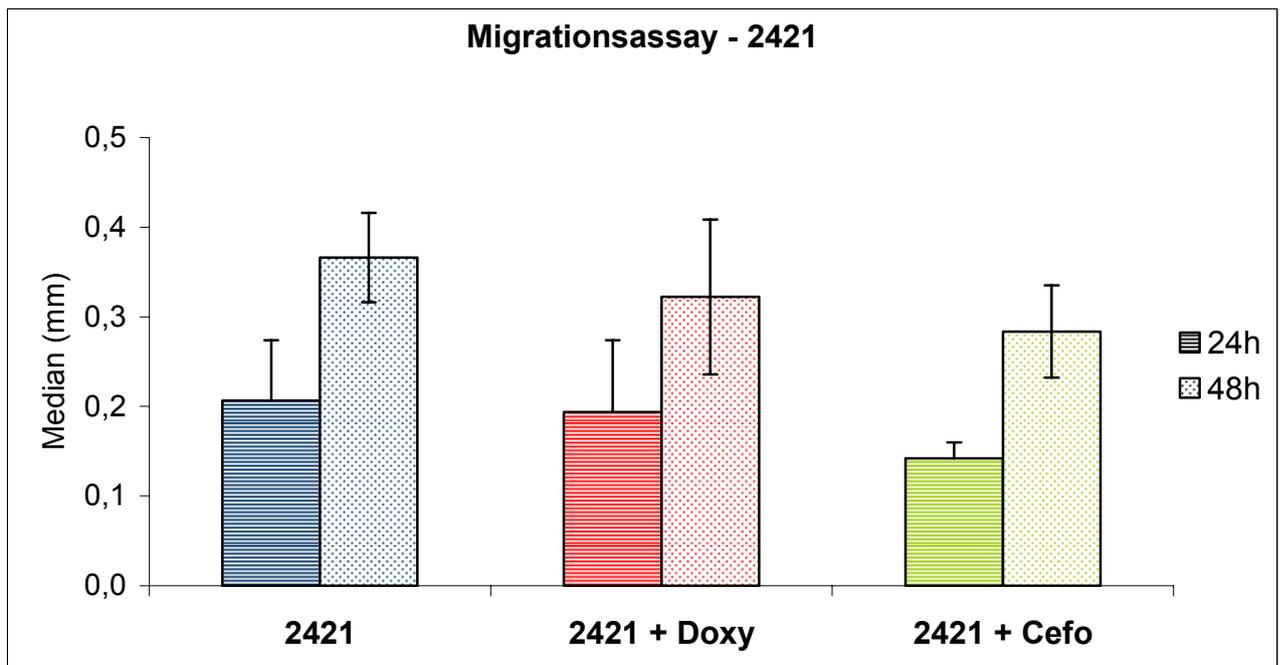


Abbildung 11: Migrationsassay der Primärzelllinie 2421. Median der Sphäroide nach 24h und 48h. Abnahme der Migration mit $p = 0.8$ nach 24h, $p = 0.5$ nach 48 h unter Doxycyclin; $p = 0.25$ nach 24h und $p = 0.12$ nach 48h unter Cefotaxim.

	24h	48h
2406 + Doxycyclin	7.9%	30.6%
2406 + Cefotaxim	26.1%	35.9%
2418 + Doxycyclin	17.9%	14.9%
2418 + Cefotaxim	53.8%	41.8%
2421 + Doxycyclin	6.2%	12.0%
2421 + Cefotaxim	31.1%	22.5%

Abbildung 12: Migrationsabnahme in Prozent der Primärzelllinien 24.6, 2418 und 2421 unter Behandlung mit Doxycyclin und Cefotaxim nach 24h und nach 48h.

4.4 Invasionsassay

Durch den Invasionsassay ist es möglich, das dreidimensionale Ausbreitungsmuster der Gliomzellsphäroide zu beurteilen. Mittels Kollagengel, in das man die Tumorsphäroide platziert, können einzelne Zellausläufer ohne Barriere in alle Richtungen des Raumes auswachsen.

Auch der Invasionsassay wurde mit Zelllinien (C6, U251, U373 und GaMG) und Primärzelllinien (2406, 2418 und 2421) durchgeführt. Aus je 4 Sphäroiden derselben Zelllinie und unter gleichen Behandlungsbedingungen wurde der Mittelwert errechnet.

4.4.2 Invasionsassay der Zelllinien

Bei allen 4 Zelllinien kam es zu einer Verminderung des Sphäroiddurchmessers unter Behandlung mit Doxycyclin und mit Cefotaxim bis zum Tag 5. Die stärkste Hemmung des Sphäroidwachstums konnte bei der Zelllinie GaMG festgestellt werden (signifikante Hemmung des Sphäroidwachstums bei Doxycyclinzugabe um 62.9%, bei Cefotaximzugabe um 62.2% im Vergleich zu den unbehandelten Sphäroiden unter gleichen Bedingungen, das entspricht einem Sphäroidvolumen von 10.47mm³ unter Doxycyclin, von 10.68mm³ unter Cefotaxim, und 28.25mm³ unbehandelt). Bei den Zelllinien U251 und U373 war Cefotaxim das potentere Antibiotikum (Hemmung von 18.2% bei U251 und 57.1% bei U373), bei der Rattenzelllinie C6 konnte die Invasion durch Doxycyclin deutlicher gehemmt werden (32.64%). Betrachtet man den Mittelwert der prozentualen Hemmung aller Zelllinien am fünften Tag, so konnte unter Doxycyclin eine Hemmung von 35.29%, unter Cefotaxim eine Hemmung von 37.37% beobachtet werden.

		Volumen am Tag 5	Invasionshemmung
C6	unbehandelt	57.14 mm ³	
	Doxycyclin	38.49 mm ³	32.6%
	Cefotaxim	50.27 mm ³	12.0%
U251	unbehandelt	21.14 mm ³	
	Doxycyclin	17.05 mm ³	17.05%
	Cefotaxim	17.29 mm ³	18.20%
U373	unbehandelt	4.25 mm ³	
	Doxycyclin	3.03 mm ³	28.54%
	Cefotaxim	1.82 mm ³	57.08%
GaMG	unbehandelt	28.25 mm ³	
	Doxycyclin	10.47 mm ³	62.93%
	Cefotaxim	10.68 mm ³	62.18%

Abbildung 11: Invasionsassay der Zelllinien C6, U251, U373 und GaMG. Volumen der Sphäroide am 5. Tag und Wachstumshemmung in % unter Behandlung.

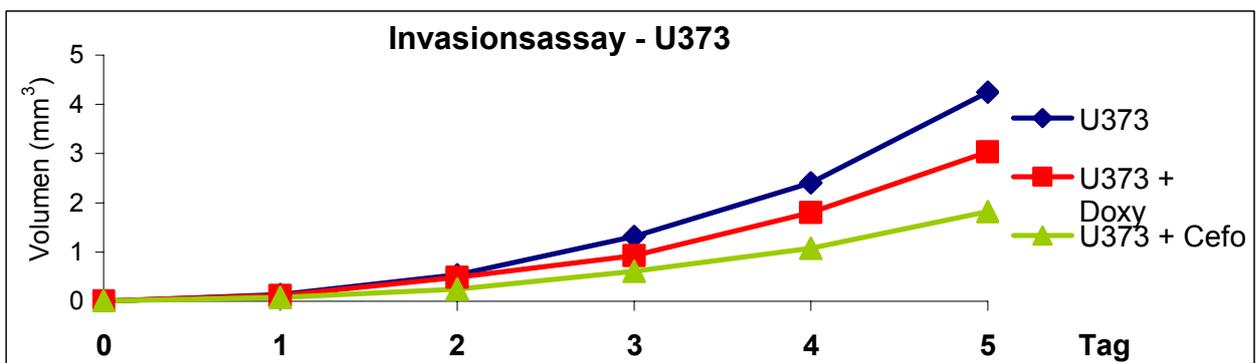
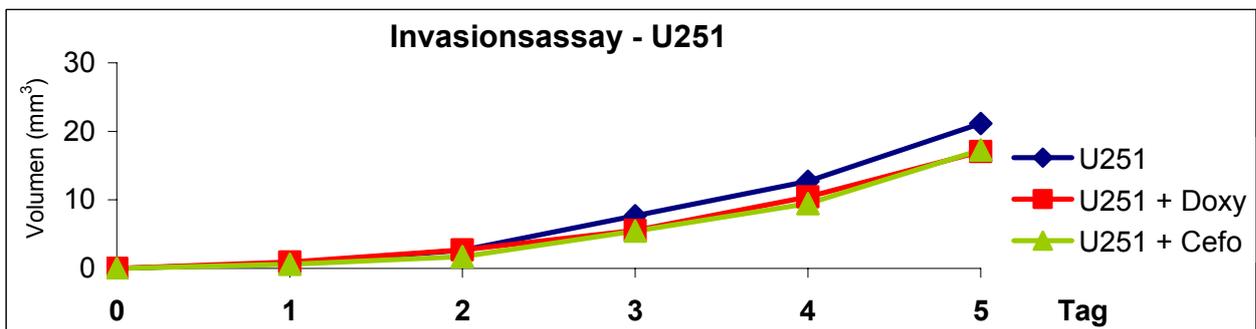
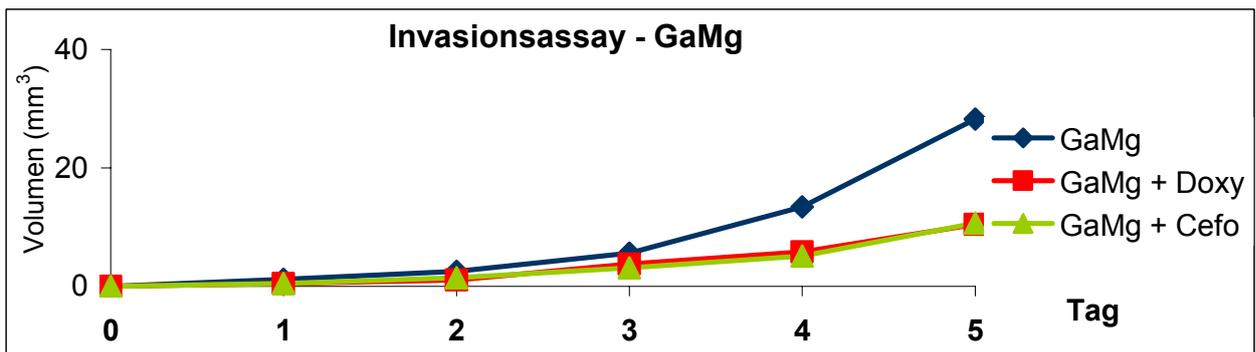
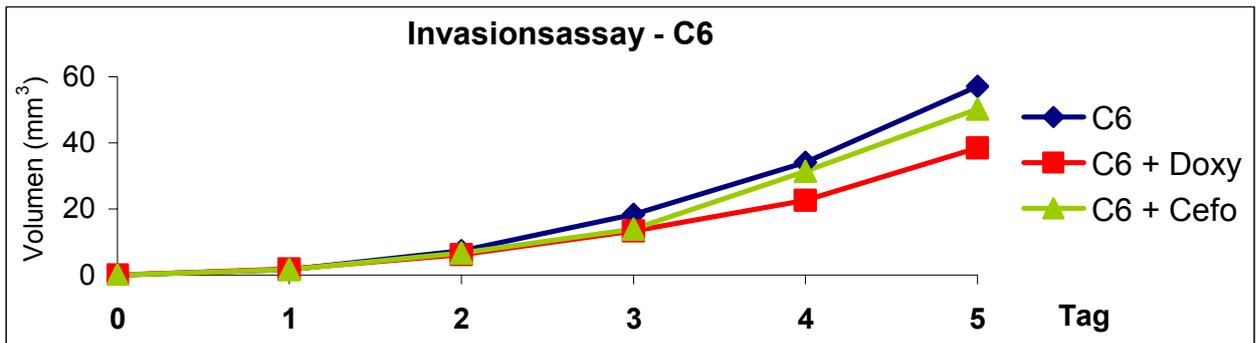


Abbildung 12: Invasionsassay der Rattenzelllinie C6 sowie der humanen Zelllinien GaMG, U251 und U373. Dargestellt sind die Volumina der Sphäroide in mm³ von Tag 0 bis Tag 5 ohne Behandlung (blau), mit Doxycyclin behandelt (rot) und mit Cefotaxim behandelt (grün). Abnahme der Invasion mit

$p < 0.05$ bei U373 und GaMG am Tag 5. $p = 0.03$ bei U251 am Tag 5. $p < 0.01$ bei C6 unter Doxycyclin und $p = 0.12$ bei C6 unter Cefotaxim am Tag 5.

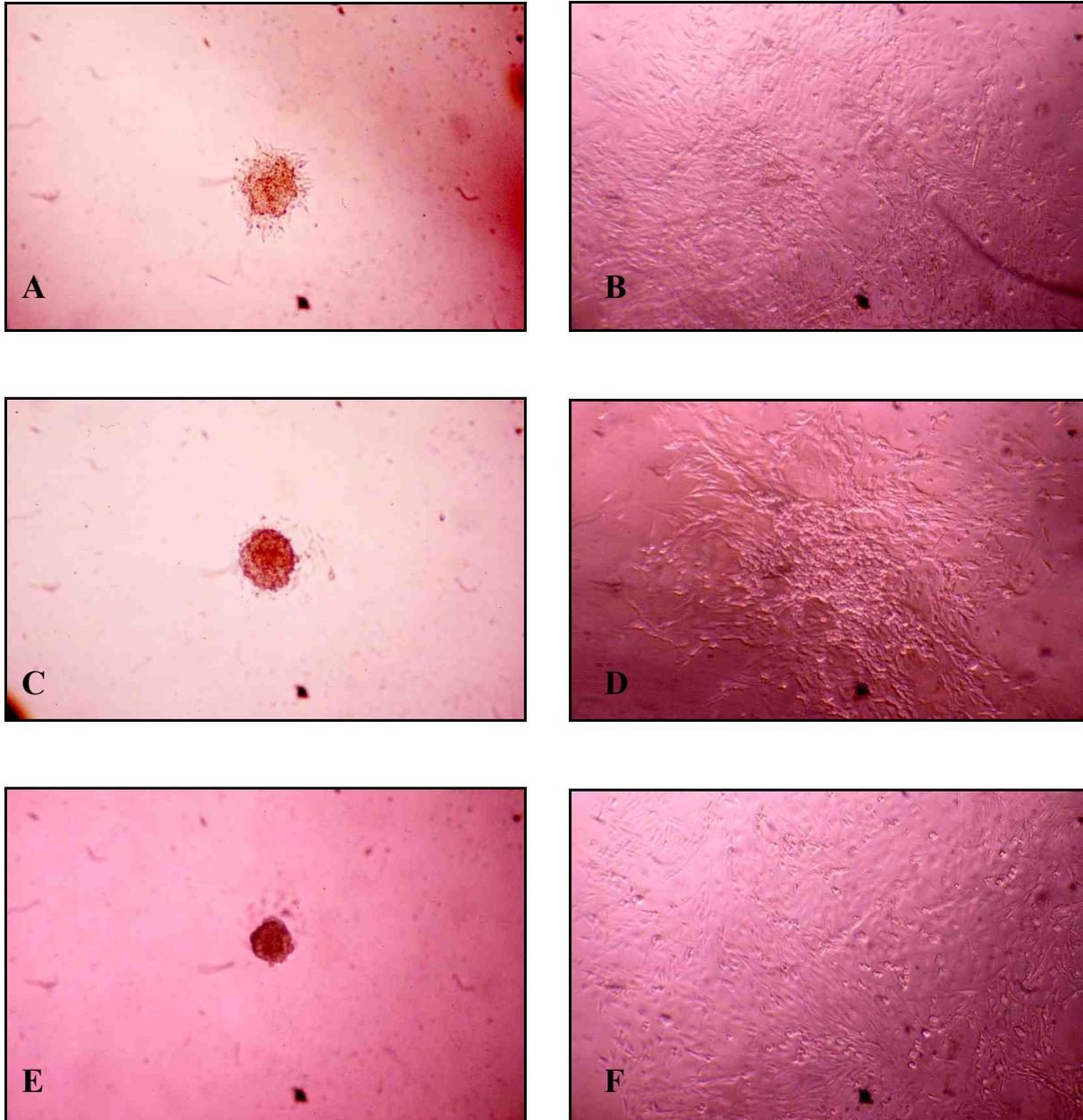


Abbildung 13: Inhibition der Invasion von Sphäroiden der Zelllinie GaMG durch Doxycyclin und Cefotaxim. Tag 0 (A) und Tag 4 (B) eines unbehandelten Sphäroids, Tag 0 (C) und Tag 4 (D) eines mit Doxycyclin behandelten Sphäroids, sowie Tag 0 (E) und Tag 4 (F) eines mit Cefotaxim behandelten Sphäroids

4.4.3 Invasionsassay der Primärzelllinien

Auch alle Primärzellsphäroide konnten durch beide Antibiotika in ihrer invasiven Ausbreitung gehemmt werden. Das Wachstum von 2406 wurde leicht mehr durch Doxycyclin eingeschränkt (Wachstumshemmung 66.44% durch Doxycyclin am Tag 5). Cefotaxim konnte bei den Primärzellsphäroiden 2418 und 2421 eine deutlichere Wirkung erzielen (signifikante Hemmung der Invasion von 2418 durch Cefotaxim von 71.10%, von 2421 von 69.81%).

Der Mittelwert aller drei Primärzelllinien der prozentualen Invasionshemmung zeigt einen Wert von 41.92% bei Verwendung von Doxycyclin und einen Wert von 71.46% bei Zugabe von Cefotaxim, d.h. 30% stärkere Hemmung durch letzt genanntes Antibiotikum.

		Volumen am Tag 5	Invasionshemmung
2606	unbehandelt	16.72 mm ³	
	Doxycyclin	5.61 mm ³	66.44%
	Cefotaxim	6.11 mm ³	63.46%
2418	unbehandelt	4.92 mm ³	
	Doxycyclin	2.76 mm ³	43.95%
	Cefotaxim	1.42 mm ³	71.10%
2421	unbehandelt	10.60 mm ³	
	Doxycyclin	8.97 mm ³	15.36%
	Cefotaxim	2.14 mm ³	79.81%

Abbildung 14: Invasionsassay der Primärzelllinien 2406, 2418 und 2421. Volumen der Sphäroide am 5. Tag und Wachstumshemmung in % unter Behandlung.

Vergleicht man die Mittelwerte der Invasionshemmung von allen vier Zelllinien mit denen aller drei Primärzelllinien, so fällt eine stärkere Wirkung auf die Primärzellsphäroide (Hemmung von 41.92% durch Doxycyclin, von 71.46% durch Cefotaxim) als auf die Sphäroide der Zelllinien (Hemung von 35.29% durch Doxycyclin, von 37.37% durch Cefotaxim) auf. Beiden gemeinsam ist die größere Potenz durch Cefotaxim in den von uns gewählten Konzentrationen.

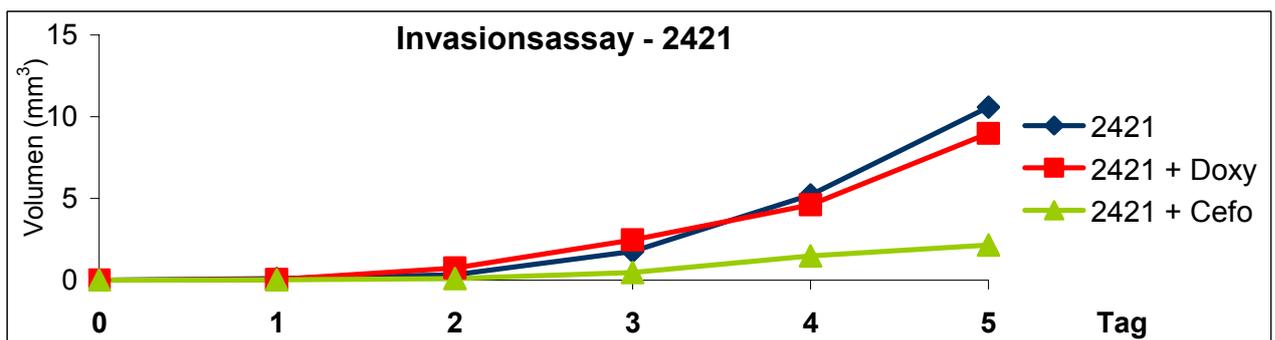
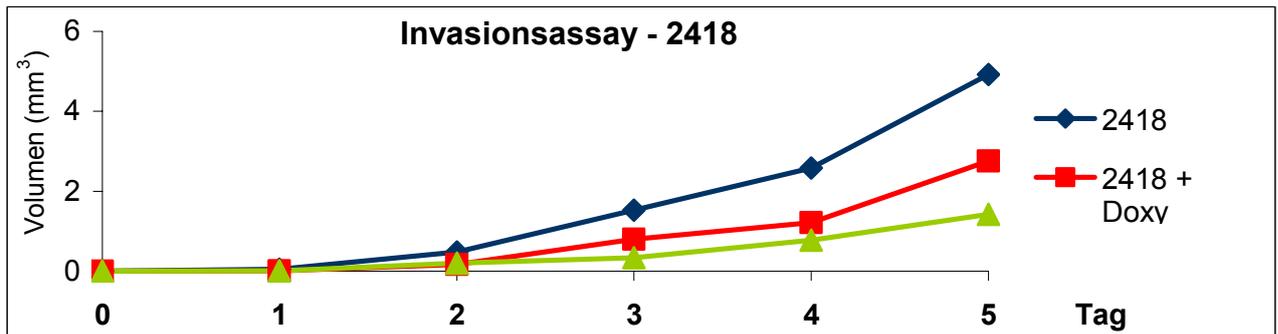
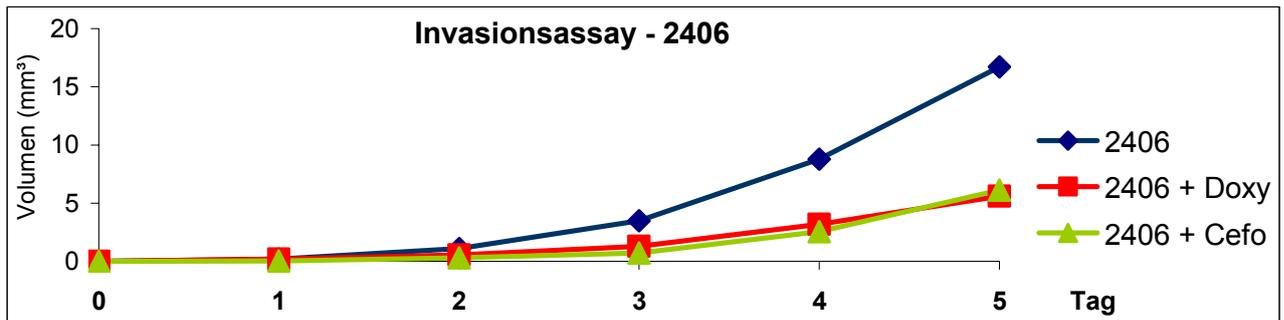


Abbildung 15: : Invasionsassay der Primärzelllinien 2406, 2421, und 2464. Dargestellt sind die Volumina der Sphäroide in mm^3 von Tag 0 bis Tag 5 ohne Behandlung (blau), mit Doxycyclin behandelt (rot) und mit Cefotaxim behandelt (grün). Signifikante Abnahme der Invasion mit $p < 0.05$ bei 2406 und 2418 am Tag 5. Abnahme der Invasion mit $p = 0.46$ bei 2421 unter Behandlung mit Doxycyclin und signifikante Abnahme der Invasion mit $p < 0.01$ bei 2421 unter Behandlung mit Cefotaxim am Tag 5.

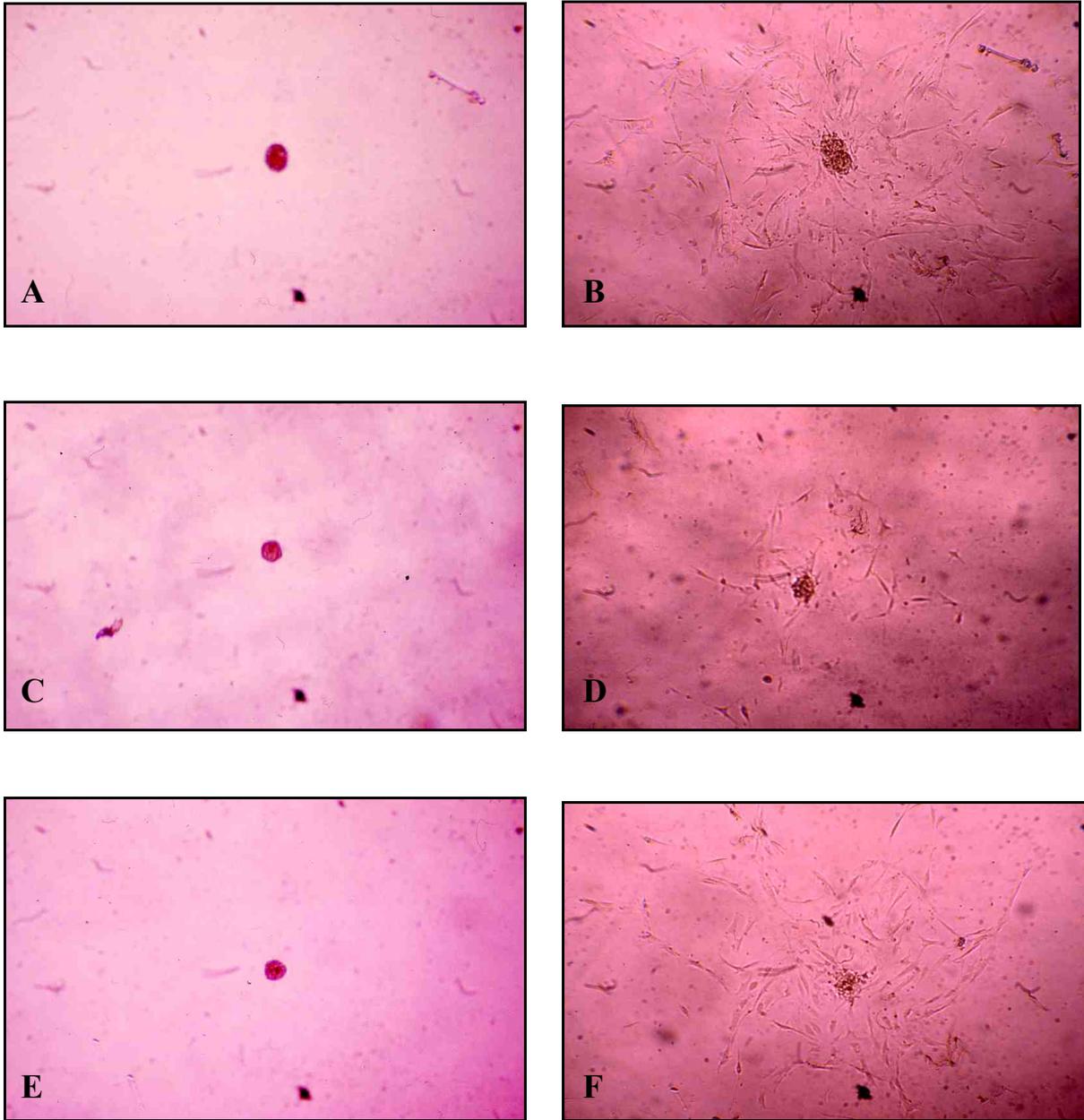


Abbildung 16: Inhibition der Invasion von Sphäroiden der Primärzelllinie 2406 durch Doxycyclin und Cefotaxim. Tag 0 (A) und Tag 4 (B) eines unbehandelten Sphäroids, Tag 0 (C) und Tag 4 (D) eines mit Doxycyclin behandelten Sphäroids, sowie Tag 0 (E) und Tag 4 (F) eines mit Cefotaxim behandelten Sphäroids

4.5 PCR

Mittels semiquantitativer PCR konnte die Expression der Proteasen MMP2, MMP9 und TIMP1 indirekt gemessen werden. Der erste Schritt bestand in dem Angleichen der GAPDH-Banden. Die anschließenden PCRs mittels spezifischer Primer von MMP2, MMP9 und TIMP1 brachten folgende Ergebnisse:

PCR der Zelllinien

Die MMP2- Expression wurde bei allen drei Zelllinien durch die Antibiotika nicht beeinflusst. Zu Erkennen war aber eine starke Expression von MMP2 bei den Zelllinien U251 und U373, eine schwächere Expression hingegen bei der Zelllinie GaMG.

Anhand der MMP9-Banden lässt sich eine Beeinflussung der Expression durch beide Antibiotika ablesen. Die MMP9 Expression wurde durch die Zugabe von Doxycyclin verringert, durch die Zugabe von Cefotaxim ist keine Bande mehr erkennbar. Bei der Zelllinie U373 konnte die Expression von MMP9 wiederum durch Doxycyclin herunterreguliert werden, durch Cefotaxim stark herunterreguliert werden. Die Zelllinie GaMG zeigte die stärkste Expression von MMP9, verglichen mit den anderen beiden Zelllinien. Hier konnte durch Doxycyclin ein Downregulieren erreicht werden, bei Zugabe von Cefotaxim blieb die Bande annähernd unverändert.

TIMP1 gilt als der natürliche „Gegenspieler“ der MMPs. Unter Zugabe von Doxycyclin konnte bei U251 keine signifikante Änderung der Bandenintensität beobachtet werden, ebenso unter Cefotaximzugabe. Gleiches gilt für die Zelllinie U373, bei der die Banden von TIMP1 allerdings dicker ausfielen. Bei der Zelllinie GaMG äußerte sich eine Zugabe von Doxycyclin wie auch von Cefotaxim durch eine Zunahme der Expression von TIMP1; fehlte ohne Behandlung eine TIMP1-Bande, konnte in beiden Fällen eine dünne Bande nach Behandlung gesehen werden.

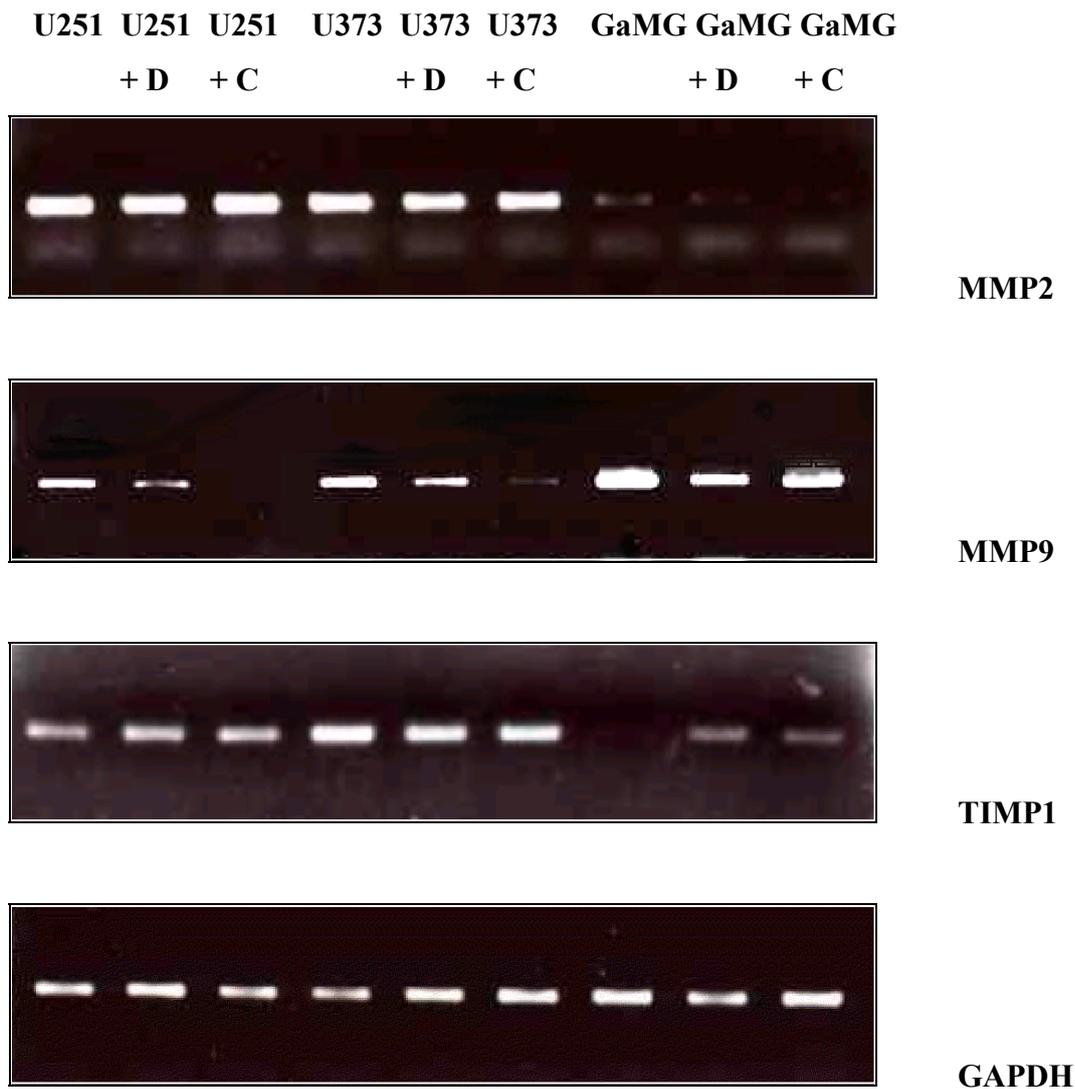


Abbildung 17: PCR von MMP2, MMP9 und TIMP1 der Zelllinien U251, U373 und GaMG unbehandelt und unter Behandlung mit Doxycyclin (+ D) und Cefotaxim (+ C).

PCR der Primärkulturen

Die MMP2- Expression wurde bei allen Primärzellen von beiden Antibiotika beeinflusst. Während bei der Zelllinie 2406 keine Änderung der Expression durch Doxycyclin zeigte, konnte durch Cefotaxim aber eine signifikante Abnahme der Expression erzielt werden. Die Primärzelllinie 2418 zeigte keine Bande für MMP2, nach Behandlung aber eine dünne Bande unter Doxycyclin und unter Cefotaxim. 2421 wies die deutlichste Bande von MMP2 auf. Nach Doxycyclin nahm diese signifikant ab, nach Cefotaximbehandlung kam es zu keiner signifikanten Änderung der Bandenintensität für MMP2.

Die Expression von MMP9 bei den hier angewandten Primärzelllinien konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beurteilt werden. Sowohl ohne als auch mit Behandlung konnten keine Banden beobachtet werden.

Für alle drei hier angewandten Primärzelllinien galt, dass die TIMP1- Expression durch die Zugabe beider Antibiotika nicht beeinflusst wurde. In allen Fällen erhielt man eine gleich starke TIMP1- Bande.

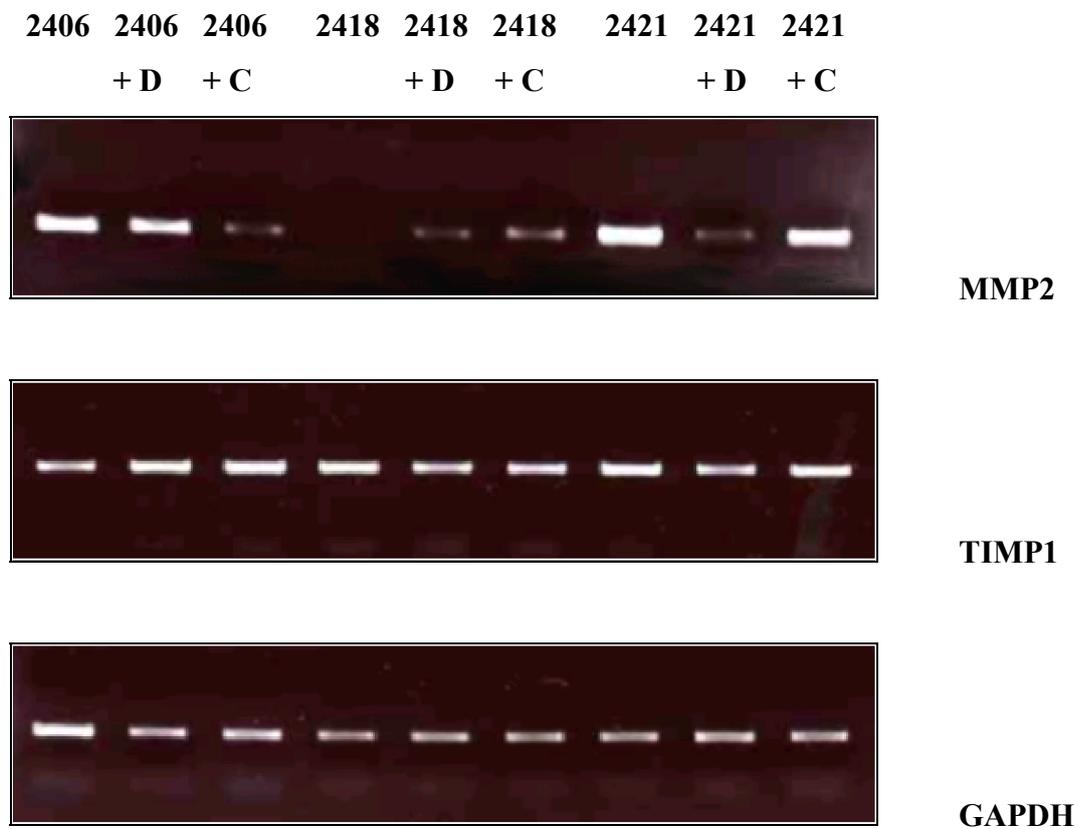


Abbildung 18: PCR von MMP2, MMP9 und TIMP1 Primärzelllinien 2406, 2418 und 2421 unbehandelt und unter Behandlung mit Doxycyclin (+ D) und Cefotaxim (+ C).

4.6 Immunhistochemie

Um nicht nur die Expression von Matrixmetalloproteasen auf RNA-Ebene nachzuweisen, sondern auch die Bildung der pro-MMPs und MMPs auf Proteinebene zu detektieren wurde die Immunhistochemie von MMP2, MMP9 und TIMP1 durchgeführt.

Färbungen von MMP2

Die Konzentration von MMP2 bei den Zelllinien wurde durch beide Antibiotika beeinflusst. Durch die Wirkung von Doxycyclin wurde bei den Zelllinien U373 und GaMG eine Drosselung der MMP2-Produktion nachgewiesen. Cefotaxim führte bei allen drei Zelllinien zu einer Reduktion der MMP2-Produktion, bei den Zelllinien U373 und GaMG kam es sogar zu einem völligen Stopp der MMP2-Bildung, erkennbar an dem Wegfall der Braunfärbung der Zellen. (siehe auch Abbildung 19 und 20).

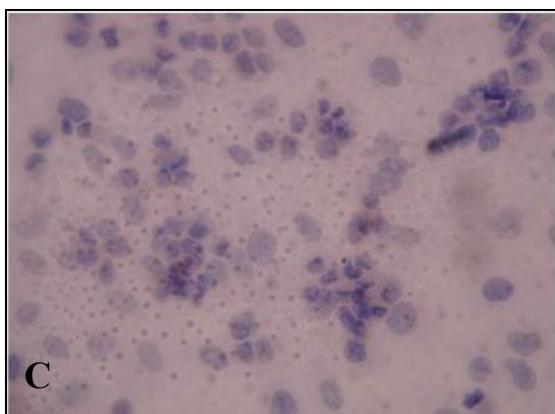
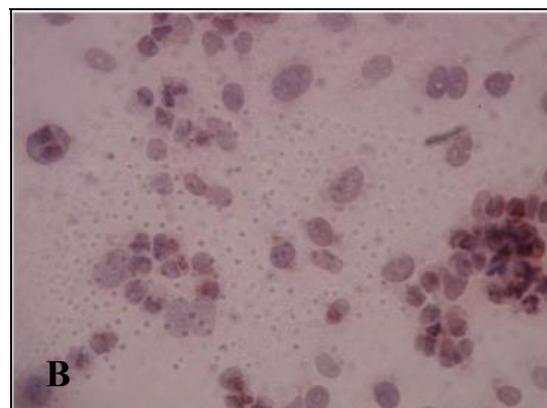
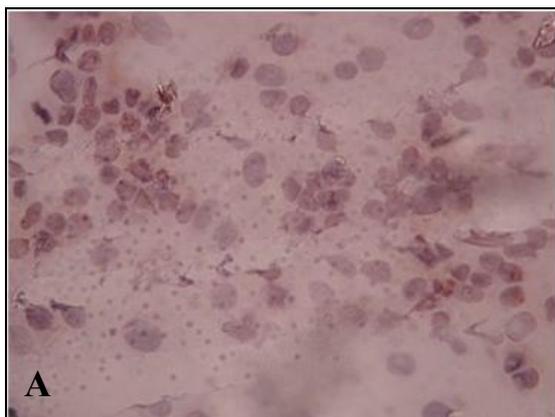


Abbildung 19: Immunhistochemie von MMP2 der Zelllinie GaMG. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

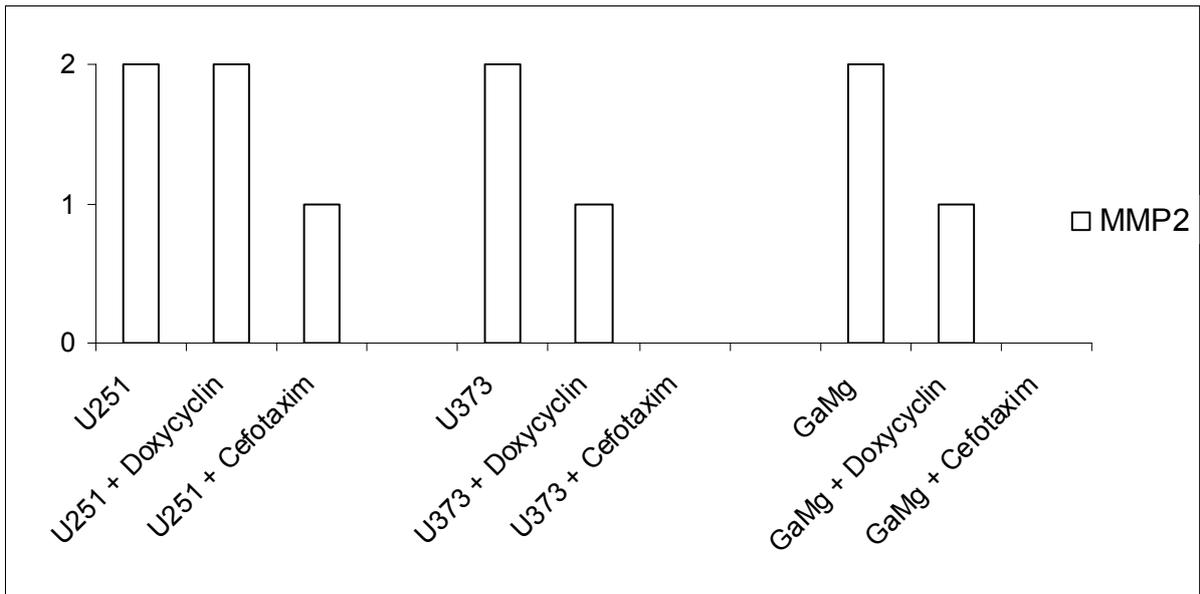


Abbildung 20: Auswertung der Immunhistochemie von MMP2 der Zelllinien U251, U373 und GaMG.

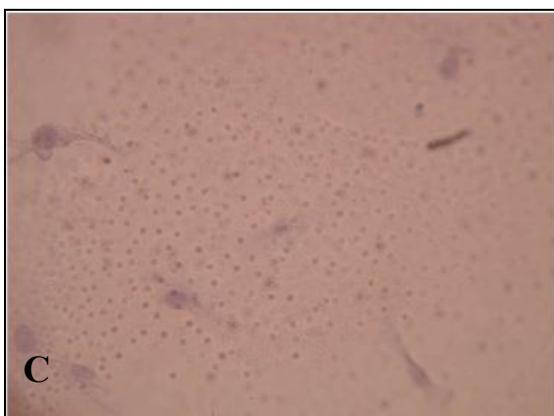
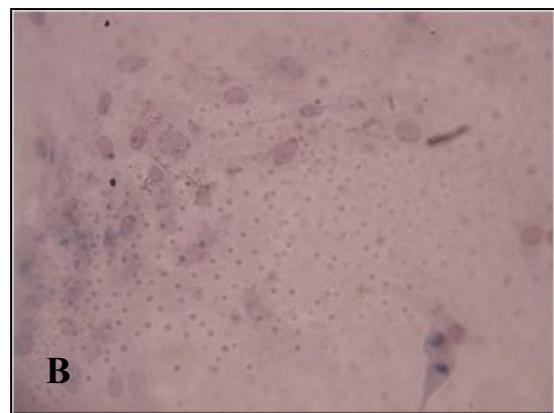
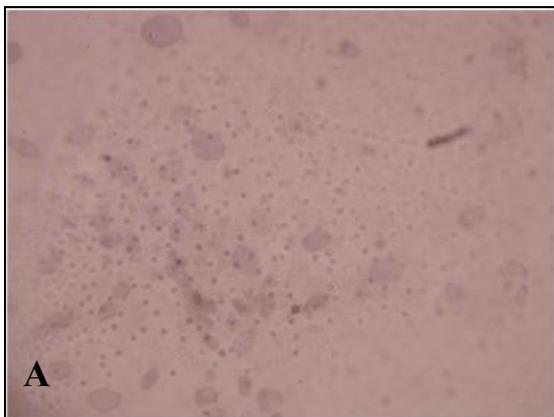


Abbildung 20: Immunhistochemie von MMP2 der Primärzelllinie 2406. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

Färbungen von MMP9

Auch die Produktion von MMP9 wurde durch die Antibiotika Doxycyclin und Cefotaxim beeinflusst. Doxycyclin hemmte die Bildung von MMP9 bei allen Zelllinien U373 und GaMG, bei der Zelllinie U251 kam es zu keiner Konzentrationsänderung von MMP9. Cefotaxim hatte einen hemmenden Effekt auf die Zelllinien U251 und GaMG, nicht jedoch auf die Zelllinie U373. Demzufolge wurde durch jedes Antibiotikum bei je zwei der drei Zelllinien die Bildung von MMP9 gehemmt. (Siehe dazu auch Abbildung 22 und 23.)

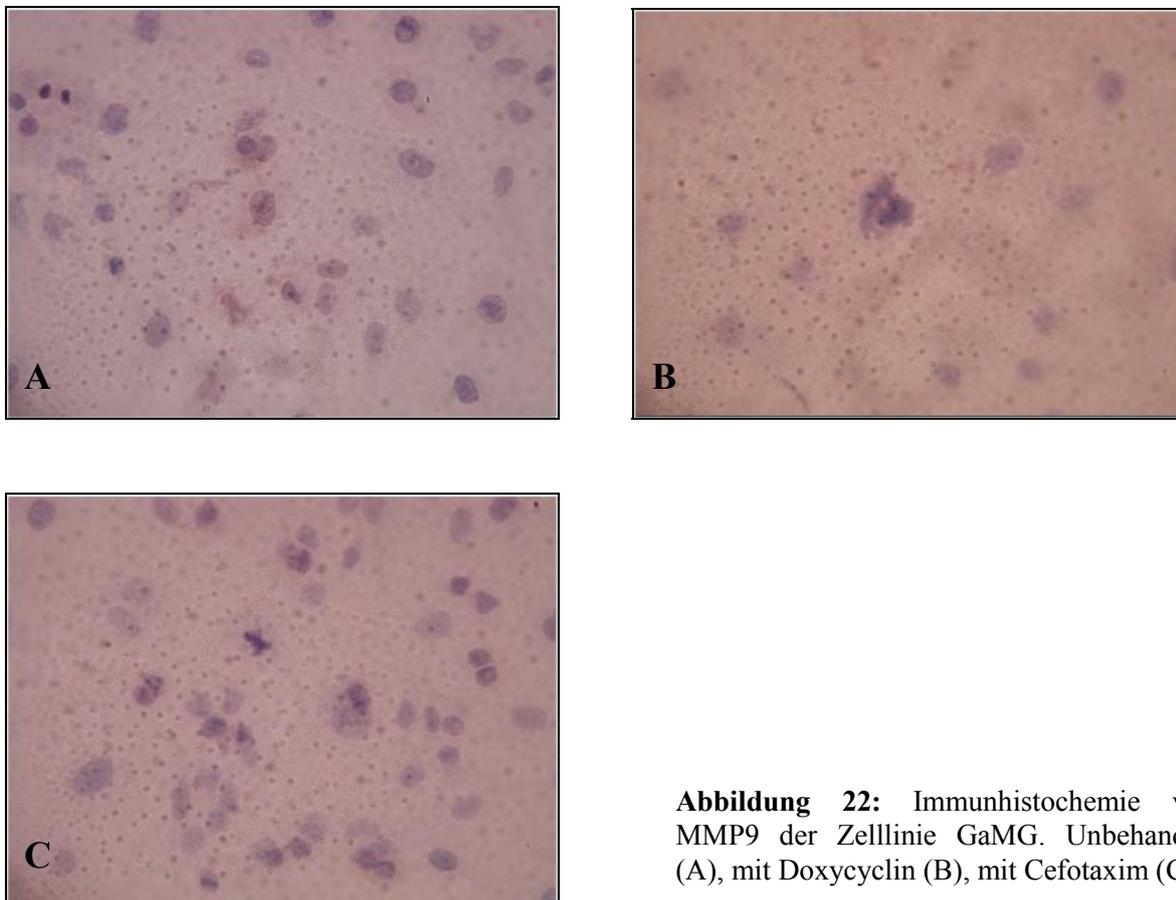


Abbildung 22: Immunhistochemie von MMP9 der Zelllinie GaMG. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

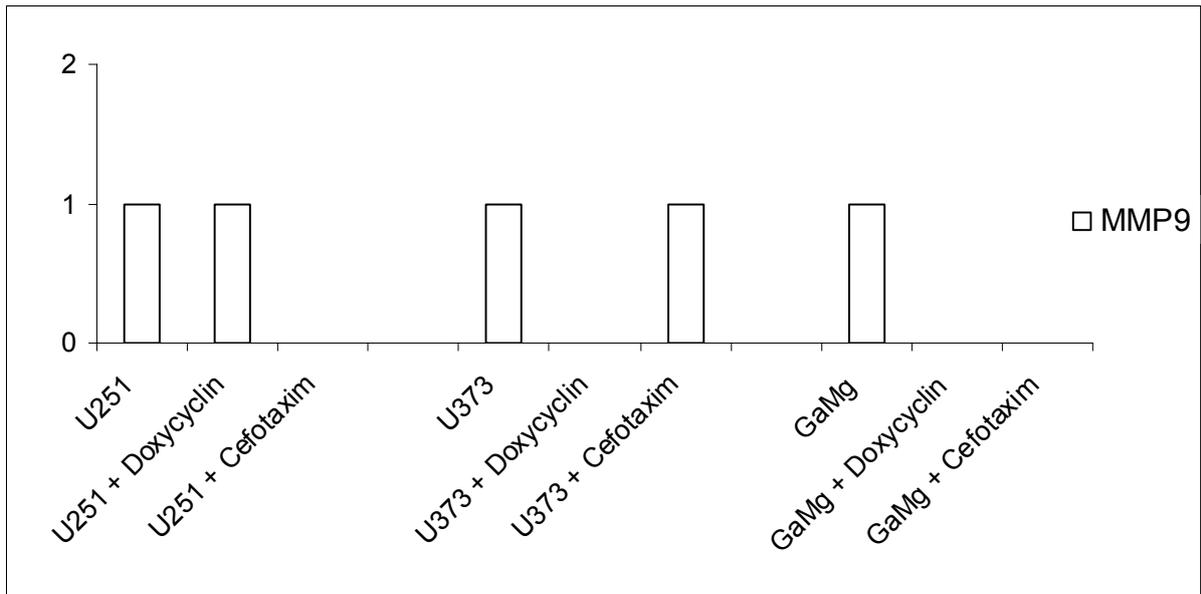


Abbildung 23: Auswertung der Immunhistochemie von MMP9 der Zelllinien U251, U373 und GaMG.

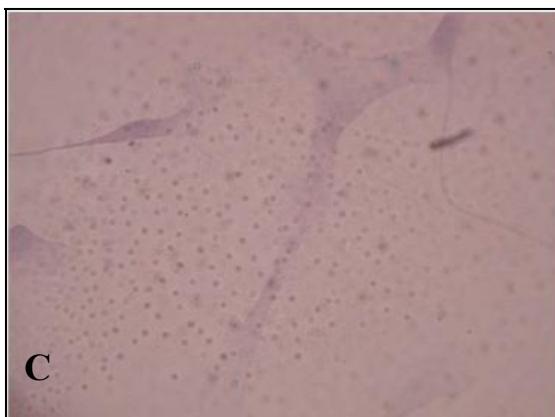
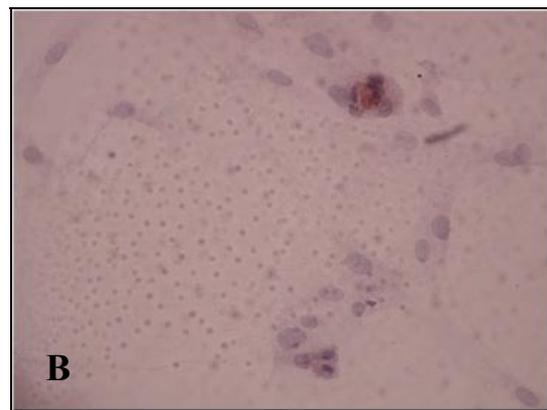
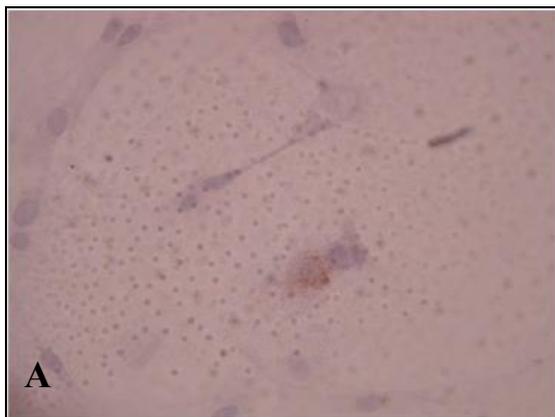


Abbildung 24: Immunhistochemie von MMP9 der Primärzelllinie 2406. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

Färbungen von TIMP1

Die Konzentration von TIMP1 wurde durch die Behandlung mit beiden Antibiotika weitgehend nicht beeinflusst. Bei den Zelllinien U251 und U373 konnte kein Effekt erkannt werden, sowohl durch Doxycyclin, wie auch durch Cefotaxim nicht. Lediglich bei der Zelllinie GaMG war eine Zunahme der Konzentration von TIMP1 nach Doxycyclinbehandlung festzustellen, unter Cefotaxim kam es auch hier zu keinem Effekt. (Siehe auch Abbildung 25 und 26.)

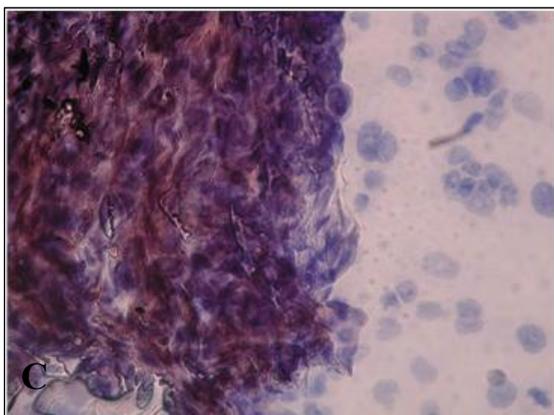
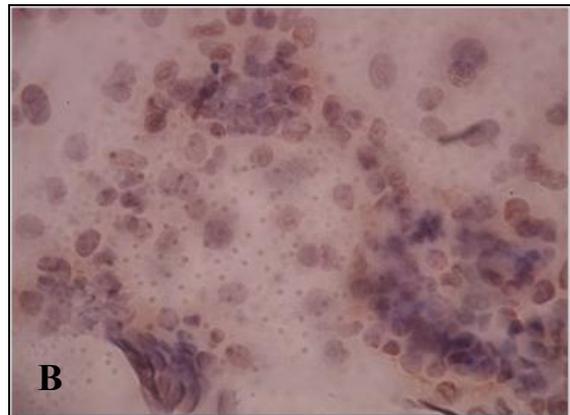
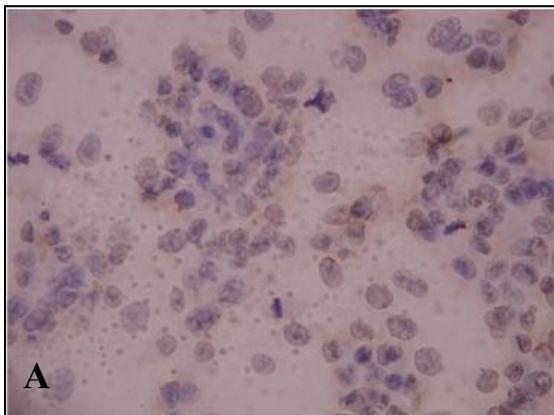


Abbildung 25: Immunhistochemie von TIMP1 der Zelllinie GaMG. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

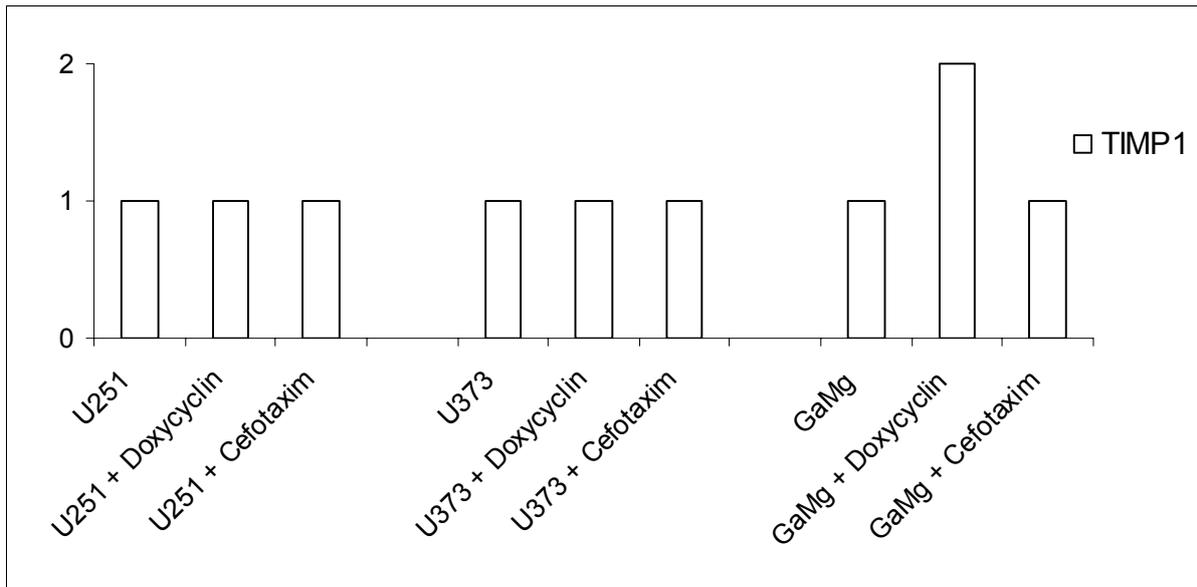


Abbildung 26: Auswertung der Immunhistochemie von TIMP1 der Zelllinien U251, U373 und GaMG.

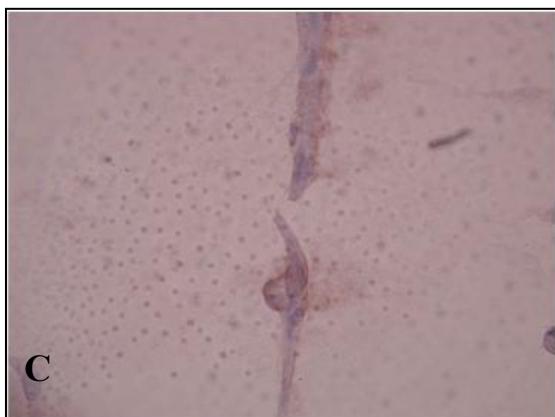
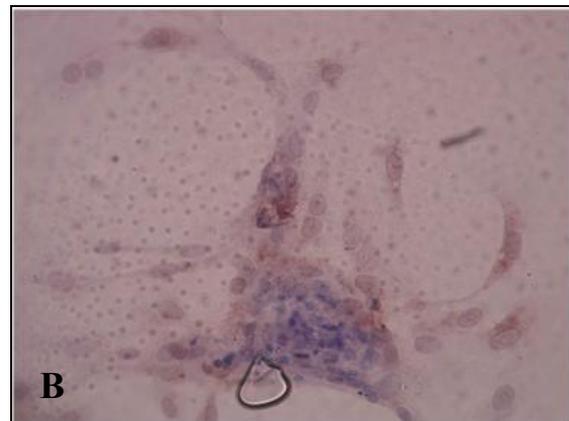
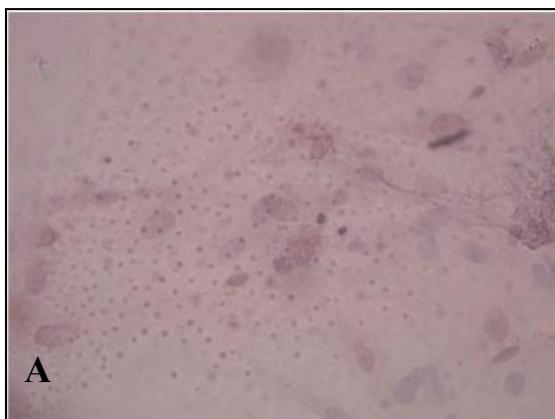
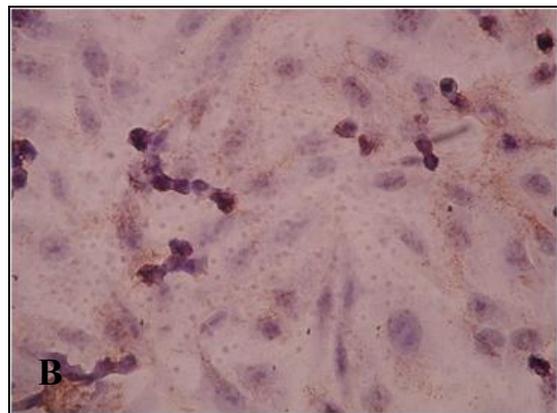
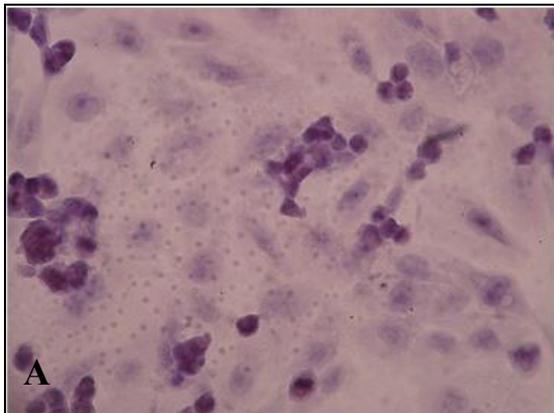


Abbildung 27: Immunhistochemie von TIMP1 der Primärzelllinie 2406. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

Bei der Immunhistochemie von TIMP1, MMP2 und MMP9 der Primärkulturen wurden die Ergebnisse der Zelllinien bestätigt. Dennoch waren die Signale insgesamt weniger stark, somit schlechter auszuwerten. Gründe für den Signalverlust könnten Auswaschvorgänge sein, da sich MMPs in hohem Maße an der Außenseite der Zellmembran befinden.

4.7 Apoptosefärbung

Die Apoptosefärbung wurde als abschließende Untersuchung vorgenommen, mit dem Ziel herauszufinden, ob die Effekte auf die Proliferation, Migration und Invasion einzig auf eine Zunahme der Apoptose zurückzuführen sind, oder ob es andere Mechanismen für diese Beobachtungen gibt. Mittels des In Situ Cell Death Detection Kit mit POD von Roche wurde diese Färbung durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass es bei allen Zelllinien und allen Primärkulturen unter beiden Antibiotika zu einer geringen Zunahme der Apoptose kam. Jedoch ist der Anstieg der in Apoptose gehenden Zellen zu gering um alleine für die Abnahme der Proliferation, die Abnahme der Migration und der Invasion verantwortlich zu sein.



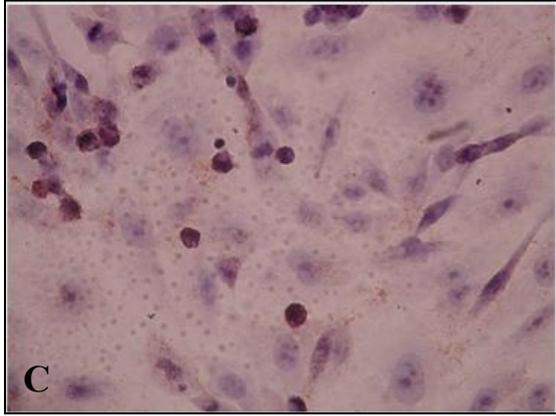


Abbildung 28: Apoptosefärbung der Zelllinie GaMG. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

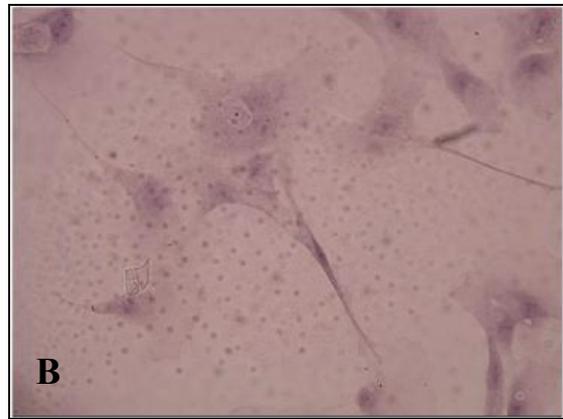
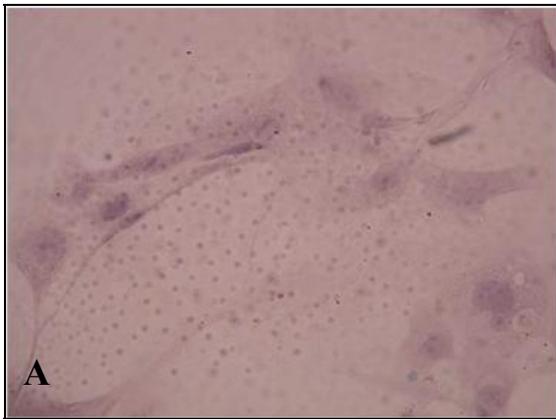


Abbildung 29: Apoptosefärbung der Primärzelllinie 2406. Unbehandelt (A), mit Doxycyclin (B), mit Cefotaxim (C).

5 Diskussion

Das Glioblastom ist der häufigste primäre Hirntumor. Trotz moderner Diagnostik und Behandlung mittels Operation, Radiatio und Chemotherapie mit Temozolamid konnte die mittlere Überlebenszeit von 14.6 Monaten bis dato nicht überschritten werden (Stupp et al., 2005). Eines der wichtigsten Kennzeichen von malignen Gliomen ist das invasive Wachstumsverhalten. Glioblastome exprimieren eine Reihe proteolytischer Enzyme in einem übernormalen Maße, um die Extrazellulärmatrix zu verdauen und die Hirnstrukturen zu passieren. Diese Proteasen, vor allem Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen, induzieren neben der Gewebepenetration auch die Neovaskularisierung (Rao, 2003).

5.1 MMPs

Matrixmetalloproteinasen sind eine Familie von neutralen zinkabhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind die Extrazellulärmatrix zu degradieren (Chang et al., 2001; Venitz et al., 2004; Forsyth et al., 1999). In nahezu allen Tumoren sind MMPs überexprimiert (Arenas-Huertero et al., 1999; Vihinen et al., 2002; Egablad, Werb, 2002, Lokeshwar et al., 2002). Folge ist eine vermehrte Proliferation, Zellmigration und Invasion; es resultiert ein erhöhtes Tumorstadium, Metastasierung und Neovaskularisierung. Während einige MMPs direkt von den Tumorzellen exprimiert werden, werden viele andere vor allem von den umgebenden Stromazellen gebildet. Tumorzellen wiederum sind in der Lage die Stromazellen zur Synthese von MMPs zu stimulieren durch Sekretion von Interleukinen, Interferonen und Wachstumsfaktoren (Sternlicht, Werb, 2001).

Auch in Glioblastomen besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Level der MMPs und der Tumorzellinvasivität (Mc Cawley et al., 2001; Rao, 2003; Demuth, Berens, 2004). Bisher wurden die Gelatinasen MMP2 und MMP9, verschiedene MT-MMPs, Matrilysin, MMP12, sowie TIMP1 in Glioblastomen nachgewiesen (Vince et al., 1999; Lampert et al., 1998). Die stärkste Expression wurde bei den Gelatinasen beobachtet. Die Höhe dieser Gelatinasen, MMP2 und MMP9, ist assoziiert mit einer verstärkten Tumorstadium (Forsyth et al., 1999).

5.2 Klinische Bedeutung der MMP- Inhibitoren

In den letzten 20 Jahren wurden unterschiedlichste Strategien der MMP-Inhibition gegen viele verschiedene Tumorarten und andere Erkrankungen in präklinischen und klinischen Studien untersucht. So blocken TK-Inhibitoren überwiegend die Transkription, während MMP-antisense und RNA-Ribozyme die Translation der MMPs hemmen. Ein anderer Weg der MMP-Inhibition ist die Blockade ihrer enzymatischen Aktivität. Die natürlichen Inhibitoren zeigten Effizienz in experimentellen Modellen, beispielsweise bei der Behandlung von Wilms-Tumoren durch intramuskuläre Injektion von TIMP (Celiker, 2001), oder bei der Behandlung von Lebermetastasen durch adenoviralen Transfer von TIMP2 (Brand et al., 2000). Jedoch kann die systemische Administration von TIMP wiederum eine tumorinduzierende Wirkung haben. Stattdessen gibt es die Möglichkeit des Einsatzes von synthetischen MMP-Inhibitoren, die man in drei Kategorien einteilt: Kollagen-peptidomimetische Inhibitoren wie Batimastat und Marimastat, Kollagen-nonpeptidomimetische Inhibitoren wie BAY 12-9566, Prinomastat und BMS 275291, und Tetrazylinderivate. Daneben entwickelte man eine neue Klasse von MMP-Inhibitoren, sogenannte „kleine Peptide“, die eine hohe Spezifität für bestimmte MMPs besitzen. So konnten Peptide gefunden werden, die speziell MMP2 und MMP9 inhibieren (Koivunen et al., 1999).

5.2.1 Klinisch relevante MMP- Inhibitoren IN - VITRO

Von all den pharmakologischen Angriffspunkten wurde der Inhibition der Funktion der MMPs in der EZM nach Sekretion am meisten nachgegangen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Doxycyclin und Cefotaxim auf die Expression von MMP2, MMP9 und TIMP1 in Glioblastomzellen untersucht. Außerdem wurde das Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten dieser Zellen unter Einfluss der beiden Antibiotika in vitro bestimmt. Doxycyclin, eines der gebräuchlichsten Tetracycline, wie auch COL-3, ein nicht-antimikrobiell wirksames Tetracyclinderivat, wurden intensiv in der Antitumorthherapie erforscht (Fife et al., 1997; Gilbertson-Beadling et al., 1995). In MDA-MB-435-Brustkrebszelllinien konnte durch Doxycyclin die Sekretion und Aktivität von MMP2 und MMP9 gehemmt werden (Fife und Sledge, 1995). Außerdem hemmte Doxycyclin die Proliferation von U 2OS Osteosarkomen und PC-3 Prostata-Zelllinien und induzierte Apoptose (Liu et al., 2001). Bei der Melanomzelllinie C8161 wurde unter Doxycyclin und

CMT1 und 3 bei einer Dosis von 3-50 μ g eine dosisabhängige Abnahme der Invasion von 12-79% beobachtet, wie auch eine Abnahme der Konzentrationen an MMP2 und MMP9 (Seftor et al., 1998). Onoda et al. untersuchten humane HT-29 Kolonkarzinomzellen und fanden heraus, dass Doxycyclin und COL-3 antiproliferative Effekte haben und in dosisabhängiger Art und Weise Apoptose induzieren (Doxycyclin bei 20 μ g/ml, COL-3 bei 5-10 μ g/ml) (Onoda et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die bisherigen Forschungsergebnisse. Aufgrund der vielfältigen Wirkungen von Doxycyclin ist es sinnvoll die einzelnen Ergebnisse getrennt zu betrachten.

Proliferation. Bestimmt wurde das Proliferationsverhalten mittels des MTT-Assay. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien, d.h. bei der Rattenzelllinie C6 und bei den humanen Zelllinien U251, U373 und GaMG, wie auch bei allen Primärzellen, 2406, 2418, 2421 und 2464, wurde eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Zugabe von 1.5 μ g/ml Doxycyclin verzeichnet. So wurde die Proliferation der Zelllinie U251 unter Doxycyclin um 44.2% gehemmt. Den stärksten Effekt bei den Primärzelllinien hatte Doxycyclin bei der Primärzelllinie 2406 (Hemmung der Proliferation um 30.3%).

Auch unter Zugabe von Cefotaxim in einer Konzentration von 2 μ g/ml wurde bei allen oben genannten Zelllinien und Primärzellen eine signifikante Abnahme der Proliferation beobachtet. Die stärkste Proliferationsabnahme unter den Zelllinien gelang bei GaMG (Proliferationshemmung um 52%), unter den Primärzellen bei 2406 (Proliferationshemmung um 48%).

Bei beiden Antibiotika war der Effekt der Behandlung bei den Zelllinien größer als bei den Primärzellen. Außerdem wurde unter beiden Antibiotika die Primärzelllinie 2406 am stärksten gehemmt. Gibt es einen gemeinsamen Mechanismus für beide Antibiotika, der einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation hat? In einer von uns durchgeführten Apoptosefärbung konnte ein geringes Ausmaß an Apoptose festgestellt werden, die wahrscheinlich für die Abnahme der Proliferation nicht ausschließlich zuständig ist.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gehen mit unseren Ergebnissen konform. Onoda et al. beschrieb einen antiproliferativen Effekt von Docycyclin auf HT-29 Kolonkarzinomzellen, der unter anderem durch Apoptose erklärt wird (Onoda et al., 2005). Außerdem ist bekannt, dass COL-3 Apoptose in Osteoklasten (Bettany et al., 2000) und in Monozyten und Makrophagen (Bettany, Wolowacz, 1998) induziert. Versuche an Prostatakrebszellen stellten

eine antiproliferative Aktivität von 5 verschiedenen Tetracyclinderivaten dar, welche durch Apoptose, Induktion von Membranpermeabilisierung und Aktivierung von Caspase-3 hervorgerufen wird (Lokeshwar et al., 2001). Desweiteren wurden cytotoxische Effekte von CMTs gegen die Makrophagenzelllinie J774 gezeigt, die durch die Aktivierung eines Apoptoseweges durch Erhöhung von Bcl2 und c-myc mRNA-Expression erklärt wurden (D'Agostino et al., 2003). Cefotaxim wurde hinsichtlich einer antiproliferativen oder apoptoseinduzierenden Wirkung in Tumorzellen noch nicht untersucht.

Adhäsion. Die Adhäsion ist ein weiterer wichtiger Parameter, der die Invasions- und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen widerspiegelt. Allgemein gilt, je adhärenter die Zellen sind, umso weniger haben sie die Möglichkeit sich aus dem Zellverband zu lösen und in umliegendes Gewebe auswandern. Man geht dennoch davon aus, dass die Adhäsion den ersten Schritt in der Migration von Zellen darstellt. Das adhärente Verhalten wird durch viele verschiedene Adhäsionsrezeptoren, unter anderem Integrine, verursacht. Zellen mit großen Integrin-Clustern („focal adhesions“) sind stark adhärent und sind typischerweise nonmigratorisch oder bewegen sich sehr langsam (Ridley et al., 2003). Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch Cadherine gesteuert, welche Calcium-abhängige Interaktionen zwischen den Zellen formen (Franco et al., 2006). Zur Untersuchung der Adhäsion fand der Amidoblack-Assay in dieser Arbeit Anwendung (Schulz et al., 1994). Bei allen Zelllinien konnte eine signifikante Zunahme der Adhäsion unter Doxycyclin beobachtet werden. Dabei zeigte die Zelllinie GaMG die stärkste Adhäsionszunahme (Zunahme der Adhäsion um 152.2%). Unter Behandlung mit Cefotaxim waren die Ergebnisse uneinheitlich. Sie variierten von einer Steigerung der Adhäsion, wie bei GaMG (95%ige Adhäsionszunahme), bis hin zu einer Abnahme der Adhäsion, z.B. bei der Zelllinie C6 (Adhäsionsabnahme um 32.3%). Der Adhäsionsassay konnte bei den Primärzellen nicht durchgeführt werden. Grund für die mangelhafte Adhärenz der Zellen war eventuell ein Fehlen von Adhäsionsfaktoren, die unter anderem durch das undichte Zellnetz nicht gebildet werden konnten.

Neben der bekannten Rolle der MMPs bei der Degradierung von Matrixmolekülen haben neuere Arbeiten gezeigt, dass MMPs Integrine, Discoidin-Domänen-Rezeptoren und Cadherin-extrazelluläre Domänen spalten können und so Zell-Substrat- und Zell-Zell-Adhäsionen destabilisieren (Franco et al., 2006). Die Effekte von Doxycyclin auf die Adhäsion sind wahrscheinlich durch MMP-Inhibition hervorgerufen, entweder direkt durch Schutz vor MMP-reguliertem Abbau von Adhäsionsrezeptoren, oder indirekt durch Beeinträchtigung der Freigabe von Matrixsubstraten und somit der Stabilisierung von Zell-

Matrix-Kontakten. Eine Studie hat gezeigt, dass ein chemisch modifiziertes Tetracyclinderivat, CMT-8, die Expression des E-Cadherin-Proteins in MDA-MB-468 Brustkrebszellen erhöht (Meng et al., 2000). Eine andere Studie an COH Ewing's Sarkomzellen vermutet, dass MMP9 den Abbau von Cadherinen reguliert, und dies durch einen Mechanismus unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität (Sanceau et al., 2003).

Migration. Die Migration stellt einen entscheidenden Schritt in der Invasion von Glioblastomzellen in die umliegenden Hirnstrukturen dar. Die Zellmigration ist ein mehrere Schritte umfassender, komplexer Prozess. Er beginnt mit der Polarisierung und Ausbildung von Pseudopodien, Lamellipodien und Filopodien (Lauffenberger et al., 1996). Diese Ausläufer enthalten filamentäres Aktin und verschiedene Struktur- und Signalproteine, die für die stabile Anheftung der Zelle an die EZM notwendig sind. Schließlich wird der Zellkörper in die Richtung des „leading edge“ bewegt und die hinteren Adhäsionen werden aufgelöst. Abschließend wird der hintere Teil der Zelle aktiv nachbewegt (Webb et al., 2002). Viele Rezeptoren sind an der Migration beteiligt, aber dennoch sind die Integrine die Hauptdarsteller unter den Migration-promoting-receptors (Ridley et al., 2003). Daneben spielen Matrix-degradierende Enzyme, Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle und Zell-Zell-Kommunikationen eine wichtige Rolle (Friedl, Wolf, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit führten wir einen Migrationsassay mit Hilfe von Tumorzellsphäroiden von vier Glioblastomzelllinien und drei Primärkulturen durch. Eine Auswertung wurde nach 24 Stunden und nach 48 Stunden vorgenommen. Bei allen Zelllinien und allen Primärkulturen kam es zu einer Hemmung der Migration sowohl unter Doxycyclinbehandlung, als auch unter Cefotaximbehandlung. So betrug die durchschnittliche Hemmung durch Doxycyclin 8.3% bei den Zelllinien, 19.2% bei den Primärzellen, jeweils nach 48 Stunden. Durch Cefotaxim konnte nach 48 Stunden eine durchschnittliche Hemmung von 11.1% bei den Zelllinien, von 33.4% bei den Primärzelllinien erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass bei den von uns gewählten Konzentrationen der Antibiotika Cefotaxim eine stärkere Hemmung der Migration als Doxycyclin hervorruft. Andererseits ist erkennbar, dass die Primärzellen stärker auf beide Antibiotika reagieren als die Zelllinien. Letzteres ist dadurch erklärbar, dass Primärzellen grundsätzlich weniger resistent sind als die widerstandsfähigen Zelllinien, dennoch aber die natürlichen Eigenschaften der Tumorzellen besser widerspiegeln.

Geht man davon aus, dass die antimigratorischen Effekte auf eine Hemmung der MMPs zurückzuführen sind, können die Ergebnisse durch den protektiven Einfluss der Antibiotika als potentielle MMP-Inhibitoren auf die EZM und auf die Adhäsionsrezeptoren erklärt werden.

In Übereinstimmung mit unseren Resultaten an Glioblastomzelllinien liegen diverse Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bei anderen Tumoren vor. So hemmen Doxycyclin und chemisch modifizierte Tetracycline die Zellmigration von Colo-205 Kolonadenokarzinomzellen durch Herunterregulierung von Trypsinogen-2-expression und -aktivität (Lukkonen et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das migratorische Potential von humanen Brustkrebszellen MDA-MB-648 durch CMT-3 und CMT-8 gehemmt bzw. aufgehoben wird (Meng et al., 2000). Desweiteren hemmen CMTs die Migration von Keratinozyten (Makela et al., 1998). In einer Arbeit mit A 549 humanen Lungeneithelzellen verminderte Doxycyclin die Migration um 55% (Raza et al., 2006). Außerdem hemmt Docycyclin die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen bei einer Konzentration von 31-104µmol/L (Franco et al., 2006).

Invasion. Die Invasion von Tumorzellen in normales Hirngewebe wird als ein multifaktorieller Prozess angesehen, welcher Zell-Interaktionen mit der EZM und mit umliegenden Zellen erfordert, aber auch biochemische Prozesse, die zur aktiven Zellbewegung erforderlich sind, beinhaltet (Demuth, Berens, 2004). Die Invasivität eines Tumors korreliert mit der Fähigkeit der Tumorzellen die EZM durch sezernierte proteolytische Enzyme zu verdauen. Immunhistochemische Analysen in der Grenzregion zwischen Gliomgewebe und normalem Hirngewebe haben interstitielles Kollagen, Laminin, Fibronectin und Typ-IV-Kollagen nachgewiesen. Invasion wird daher für die meisten primären Hirntumoren als ein Geschehen angesehen, das von Proteasen, hauptsächlich Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen, gesteuert wird (Rao, 2003). Durch Inhibition dieser Proteasen, vor allen der Matrixmetalloproteinasen, versucht man deren invasives Potential zu stoppen.

In dieser Arbeit wurde der Invasionsassay mit Gliomzellsphäroiden in einem 3-D-Kollagen gel durchgeführt. 4 Zelllinien und 3 Primärzellen wurden verwendet, und nach 1-5 Tagen ihr Volumen bestimmt. Bei allen Zelllinien und allen Primärzelllinien kam es zu einer Abnahme der Invasion unter Docycyclin und unter Cefotaxim. Die Invasion der Zelllinien wurde um 35.3%, der Primärzellen um 41.9% durch Doxycyclin am Tag 5 gehemmt. Besonders stark

war der hemmende Effekt auf die Zelllinie GaMG (Hemmung der Invasion um 62.9%), und auf die Primärzelllinie 2406 (Hemmung der Invasion um 66.44%). Durch Cefotaxim konnte am Tag 5 eine Invasionshemmung bei den Zelllinien um 37.4% und bei den Primärzellen um 71.5% beobachtet werden. Der stärkste Effekt auch hier bei der Zelllinie GaMG (Hemmung der Invasion um 62.2%), sowie bei der Primärzelllinie 2421 (Hemmung der Invasion um 79.8%). Wie bei dem Migrationsassay haben auch bei diesem Versuch die Primärzellen empfindlicher auf die Gabe der Antibiotika reagiert.

Auch mit diesen Resultaten konnten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich des hemmenden Einflusses von Tetracyclinen auf Invasivität von Tumorzellen bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch erstmals der Effekt von Doxycyclin und Cefotaxim an Glioblastomzellen untersucht. Bei Versuchen mit C8161-Zellen, einer humanen Melanomzelllinie, erreichte man durch die Behandlung mit Doxycyclin, CMT-1, CMT-3 und CMT-6 dosisabhängig eine Hemmung der Invasivität bei Konzentrationen von 3-50µg/ml (Seftor et al., 1998). Eine andere Gruppe untersuchte den Effekt von Minocyclin, einem halbsynthetischen Tetracyclinderivat, auf das Invasionsverhalten von Lungenmetastasen von renalen Adenokarzinomen der Maus. Minocyclin hemmt signifikant die Invasion der MRAC-PM2-Zellen bei Konzentrationen von 0.5µg/ml und 5.0µg/ml (Masumori et al., 1998). Es wurde der Einfluss von CMT-3 und CMT-8 auf MDA-MB 468 humane Brustkrebszellen und U373 MG humane Glioblastomzelllinien mittels Boyden-chamber-Assay untersucht. CMT-3 und CMT-8 hemmen die in vitro Zellinvasion in nicht zytotoxischen Konzentrationen von 10µg/ml von MDA-MB 468-Zellen, wie auch von U373 MG-Zellen (Meng et al., 2000). Außerdem hemmt CMT-3 die Invasion von humanen Kolonkarzinomzellen COLO 205 (Gu et al., 2001). Lokeshwar et al. haben die antiinvasiven Eigenschaften mehrerer CMTs und Doxycyclin mittels Matrigel-Invasionsassay miteinander verglichen. Doxycyclin and CMTs hemmen das invasive Potential von TSU PR1 humanen Prostatakarzinomzellen und Dunning Mat LyLu Prostatakarzinomzellen der Ratte in vitro, um 10% (CMT-6) bis um mehr als 90% (CMT-3) (Lokeshwar et al., 2002).

MMP2, MMP9 und TIMP1. Tetracycline, wie Doxycyclin und Minocyclin, und chemisch modifizierte Tetracycline (CMTs) sind in der Lage MMPs zu inhibieren. Sie hemmen Kollagenasen (MMP1, MMP3 und MMP 13), aber vor allem auch die Gelatinasen MMP2 und MMP9. Diese Inhibition erfolgt über verschiedene Mechanismen: durch Blockade der Aktivität der MMPs durch Chelatierung des Zinkatoms an der Enzymbindestelle, durch Interferenz mit der proteolytischen Aktivierung der proMMPs in ihre aktive Form, durch

Reduzierung der Expression der MMPs, und durch Schutz vor MMPs und ihrer proteolytischen und oxidativen Degradierung (Hidalgo, Eckhardt, 2001; Golub et al., 1984; Golub et al., 1998).

Tetracycline wurden bisher extensiv auf ihre inhibitorischen Effekte auf MMP-Produktion und MMP-Aktivität in Krebszellen untersucht (Smith et al., 1999). Versuche an MDA-MB-435 Brustadenokarzinomzellen ergaben, dass Doxycyclin die Sekretion und Aktivität von MMP2 und MMP9 senkt (Fife, Sledge, 1995). Weitere Untersuchungen wurden an Osteosarkomzellen via Gelatinzymographie durchgeführt. Doxycyclin in einer Konzentration von 10µg/ml hemmte die MMP-Aktivität von 6 verschiedenen Osteosarkomzelllinien gleichermaßen um mehr als 50% (Fife et al., 1997). Doxycyclin und verschiedene CMTs in einer Konzentration von 3-50µg/ml inhibieren MMP2 und MMP9 in C8161-Melanomzellen (Seftor et al., 1998). Bei COLO 205 humanen Kolonkarzinomzellen bewirkte Doxycyclin eine Inhibition der Aktivierung von proMMP9 (Lukkonen et al., 2000). Weitere Untersuchungen an COLO 205 Zellen deckten auf, dass CMT-3 die Aktivität und die Expression von MMP2 hemmt (Gu et al., 2001). CMT-3 (COL-3) hemmt außerdem die MT1-MMP2-Aktivierung von proMMP2 und inhibiert die Expression von MT1-MMP und proMMP2 in der Fibrosarkomzelllinie HT-1080 (Lee et al., 2001). In TSU PR1 humanen Prostatakarzinomzellen und Dunning Mat LyLu Prostatakarzinomzellen der Ratte senken Doxycyclin und CMT-3 die Sekretion von MMP2, TIMP1 und TIMP2 und inhibieren die Aktivität der sezernierten MMPs; CMT-3 in einem wesentlich stärkerem Maße als Doxycyclin und andere CMTs (Lokeshwar et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von MMP2, MMP9 und TIMP1 unter Doxycyclin und Cefotaxim mit einer semiquantitativen PCR bei 3 Zelllinien und 3 Primärzellen untersucht. Weiterhin wurde eine Quantifizierung von MMP2, MMP9 und TIMP1 sowie ihrer Pro-Formen mittels Immunhistochemie vorgenommen.

Die Expression von MMP2 änderte sich bei den Zelllinien unter Doxycyclin und unter Cefotaxim nicht. Bei den Primärkulturen konnte eine deutliche Verminderung der MMP2-Expression bei der Primärzelllinie 2421 unter Doxycyclin beobachtet werden, unter Cefotaxim wurde die Expression von MMP2 bei 2406 und 2421 gehemmt. Die MMP9-Expression wurde bei allen 3 Zelllinien durch Doxycyclin und durch Cefotaxim gehemmt. Die Expression von TIMP1 änderte sich unter Doxycyclin und Cefotaxim bei den Zelllinien und Primärzelllinien nicht.

In der Immunhistochemie konnte eine Hemmung von MMP2 unter Doxycyclin bei 2 der 3 Zelllinien, unter Cefotaxim aller Zelllinien beobachtet werden. MMP9 wurde durch Doxycyclin und Cefotaxim je bei 2 der 3 Zelllinien gehemmt. Die Konzentration an TIMP1 blieb weitgehend unverändert. Die Ergebnisse zeigen, dass Doxycyclin bei einer Konzentration von 1.5µg/ml und Cefotaxim bei einer Konzentration von 2.0µg/ml in der Lage sind, die Expression von MMP9, sowie teilweise von MMP2, bei humanen Glioblastomzelllinien zu hemmen. Auch auf Proteinebene konnten MMP2 und MMP9 durch beide Antibiotika gehemmt werden. Diese Ergebnisse bei humanen Glioblastomzelllinien stimmen mit den oben genannten Resultaten bei anderen Tumorentitäten überein.

Die Inhibition der Proliferation, die Zunahme der Adhäsion, die Abnahme der Migration und die Abnahme der Invasion können dem nach durch die Hemmung von MMP9 unter Doxycyclin erklärt werden. Weitere in vitro Versuche könnten mit einer höheren Konzentration von Doxycyclin erfolgen. Außerdem wäre es sinnvoll zu überprüfen, ob der Effekt von CMT-3 auch in Gliomzelllinien den von Doxycyclin übertrifft.

Cefotaxim in einer Konzentration von 2µg/ml war ebenfalls befähigt die Expression von MMP9 in Glioblastomzelllinien zu inhibieren. Es wäre daher möglich, dass die Inhibition der Proliferation, die Zunahme der Adhäsion, die Abnahme der Migration und der Invasion ebenfalls auf eine Inhibition der MMPs zurückzuführen sind. Bisher fanden Cephalosporine in der Antitumorthherapie keine Anwendung. Die Daten dieser Studie sind jedoch viel versprechend und rechtfertigen weitergehende Forschungen.

5.2.2 Klinisch relevante MMP- Inhibition IN – VIVO

Nach den erfolgreichen präklinischen Studien wurden und werden Doxycyclin, vor allem aber die chemisch modifizierten Tetracyclinderivate, in klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren angewandt (Rudek et al., 2001). In einer ersten Phase-I-Studie wurden 35 Patienten mit Tumoren in fortgeschrittene Stadien mit COL-3 bei einer Dosis von 36-98mg/m²/Tag behandelt. Die maximal tolerierte Dosis lag bei 70mg/m²/Tag, dosislimitierend war die bei 69% der Patienten beobachtete kutane Photosensibilität. Andere Nebenwirkungen waren Anämie, Anorexie, Konstipation, Schwindel, erhöhtes Bilirubin, erhöhte Transaminasen, Müdigkeit, Fieber, Kopfschmerz, Übelkeit, Erbrechen, Neurotoxizität, sowie 3 Fälle von medikamenteninduziertem Lupus erythematodes. In diesem Versuch erreichten 7 Patienten den Zustand des „stable disease“ für 4-32 Monate (Rudek et al., 2002).

Auswertungen diverser Studien deuteten an, dass COL-3 bei den Dosis- und Plasmakonzentrationen, die in diesem Versuch erreicht wurden, die zirkulierenden Mengen an MMP2 und MMP9, sowie die Produktion von MMP9 in peripheren mononukleären Zellen des Blutes reduzieren kann. Die Höhe des EGFR veränderte sich nicht. Die Herabregulierung von MMP2 war jedoch 30% geringer, verglichen mit den in vitro-Daten, die von einer Hemmung der Expression um 60-70% ausgingen (Heath, Grochow, 2000). In einer weiteren Phase-I-Studie bei Patienten mit Kaposisarkomen, verursacht durch AIDS, bewirkte COL-3 ein komplettes Ansprechen und 7 partielle Ansprechen. Das entspricht einer Ansprechrate von 44% und einer medialen Ansprechdauer von 25 Wochen (Cianfrocca et al., 2002). Klinische Studien zur Wirksamkeit von Tetracyclinen wurden außerdem von Munoz-Mateu et al. unternommen, die eine Suppression von MMP2 und MMP9 im Plasma und in Hautbiopsien unter COL-Therapie bei Krebspatienten nachwies (Munoz-Mateu et al., 2001). Zurzeit werden Phase-II-Studien bei Patienten mit Kaposisarkomen durchgeführt (Dezube et al., 2006; Acharya et al., 2004). Schließlich wird COL-3 momentan bei Patienten mit hochgradigen anaplastischen Astrozytomen, anaplastischen Oligodendrogliomen und Glioblastoma multiforme in klinischen Phase I- und II-Studien erprobt (Rudek et al., 2002). Hierbei wird die Effektivität von COL-3 bei Patienten mit progressiven und wiederkehrenden Hirntumoren untersucht, die außerdem Radiatio und Chemotherapie erhalten.

Doxycyclin fand bisher in klinischen Studien bei Krebspatienten wenig Anwendung. In einer Studie mit der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 in einem Mausmodell resultierte die Gabe von Doxycyclin in einer 70%igen Abnahme der Tumorlast sowie einer Abnahme der Knochenmetastasierung (Duivenvoorden et al., 2002). Jedoch haben klinische Studien die Wirksamkeit von Doxycyclin (Periostat) bei Parodontitis untersucht. Subantimikrobielle Dosen von 20mg BID verbessern signifikant das klinische Attachmentniveau und reduzieren die Sondierungstiefen verglichen mit einem Placebo (Caton et al., 2001). Außerdem finden Doxycyclin und CMTs Anwendungen in klinischen Studien bei kardiovaskulärer Herzkrankheit (Peterson, 2004).

Andere MMP-Inhibitoren, so die peptidomimetischen Inhibitoren Marimastat und Batimastat, wie auch die nonpeptidomimetischen Inhibitoren wurden intensiv in klinischen Studien Phase I-III an diversen Krebsarten getestet. Ein hohes Maß an Nebenwirkungen, wie das Muskuloskelettale Syndrom (MSS), und ein Mangel an Effekten führten jedoch in vielen Fällen zu unbefriedigenden Ergebnissen und einem Abbrechen der Versuche. Betrachtet man die guten Resultate der präklinischen Studien, so könnte es sein, dass die klinischen Studien nicht ideal geplant wurden. MMP-Inhibitoren wurden bisher mit cytotoxischen

Chemotherapeutika verglichen und bei Patienten mit late-stage-Tumorerkrankungen eingesetzt. Da MMP-Inhibitoren aber cytostatisch sind, und eine Rolle in der Angiogenese und der frühen Tumorentstehung haben, sind diese Patienten nicht geeignet (Bergers et al., 1999). Präklinische Studien an Tiermodellen weisen darauf hin, dass MMP-Inhibitoren eine Verkleinerung der Tumorlast bewirken können, wenn die Therapie schon 2 Wochen nach Inokulation der Tumorzellen beginnt (Acharya et al., 2004). Daraus ist zu schlussfolgern, dass es wichtig ist neue Versuche zu kreieren, die MMP-Inhibitoren in frühen Tumorstadien einsetzen, bzw. in Kombination mit anderen Chemotherapeutika (Egeblad, Werb, 2002).

Weiterhin ist die Entwicklung von besseren Tiermodellen, besseren Darstellungsmethoden für *in vivo*-Analysen und die Identifizierung von Ersatzmarkern für die MMP-Aktivität wichtig (Weissleder, 2002; Schatzkin, Gail, 2002).

Alternativ zu der Anwendung der MMP-Inhibitoren in inoperablen Tumoren wäre ihr Einsatz in der Präventivmedizin. So könnten Patienten mit genetischen Prädispositionen zur Krebsentstehung oder Patienten nach erfolgreicher Entfernung eines Primärtumors ohne Nachweis von Metastasen von der präventiven Therapie mit MMP-Inhibitoren profitieren (Egeblad, Werb, 2002).

Betrachtet man die vorliegenden *in-vitro* Daten und ersten ermutigenden präklinischen Studien mit Doxycyclin zur Behandlung von Tumoren anderer Organsysteme, erscheint es dringend notwendig, die Sicherheit und klinische Effektivität von Doxycyclin für das Glioblastom im Rahmen einer klinischen Studie zu überprüfen.

5.3 Bedeutung der MMP- Inhibition im Zellkulturversuch für Tetracyclin-regulierbare Expressionssysteme

Das Tet-ON-System (Gossen et al., 1995) und das Tet-OFF-System (Gossen und Bujard, 1992) sind die wahrscheinlich gebräuchlichsten Systeme zur Kontrolle der Genexpression in Säugetierzellen. Beide Systeme sind einfach, effizient und erlauben eine gute Kontrolle der transgenen Expression in einer Reihe von experimentellen Systemen.

Beim Tet-OFF-System resultiert die Zugabe von Tetracyclin in einer verminderten Transkription durch Abkopplung des Tetracyclin-responsive-Transkriptionsaktivators (tTA) vom Promotor. Beim Tet-ON-System aktiviert der reverse Tetracyclin-response-Aktivatoren die Transkription durch Bindung an den Promotor in Anwesenheit von Tetracyclin

Auf diese Weise können durch Zugabe von Doxycyclin als Tetracyclin-Effektor in der Zellkultur Gene und Genprodukte reguliert werden. Sipo et al. verwendeten das Tet-System zur Regulation von FasL in der Behandlung von malignen Lungentumoren (Sipo et al., 2005). In einer jüngeren tierexperimentellen Studie inhibierten Miraux et al. den FGF Rezeptor in C6 Gliomzellen (Miraux et al., 2004). Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Zugabe von Tetracyclinen zu einer grundlegenden Veränderung von Zelleigenschaften führen kann. Behandelte Zellen werden ein anderes Migrations-, Proliferations- und Invasionsverhalten aufweisen. In zahlreichen auf das Tet-On/Off basierenden Studien, werden behandelte Zellpopulationen mit unbehandelten Zellen unkritisch verglichen. Hieraus können gravierende Fehleinschätzungen und falsche Studienaussagen entstehen.

Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste primäre maligne Hirntumor. Es zeichnet sich durch ein besonders aggressives und invasives Wachstumsverhalten aus. So konnte bis heute trotz moderner Diagnostik und Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bestehend aus Operation, Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolamid die mittlere Überlebenszeit von 14,6 Monaten nicht überschritten werden.

Matrixmetalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die in der Lage sind die Extrazellulärmatrix zu degradieren, die Basalmembran zu durchbrechen, und somit Migration, Invasion, und Neovaskularisierung von Tumoren zu erleichtern. In zahlreichen Tumoren, so auch im Glioblastom, konnte eine Überexpression von MMPs, besonders von MMP2 und MMP9, nachgewiesen werden.

Verschiedene Substanzen sind in der Lage, auf unterschiedlichen Ebenen die MMP-Synthese zu hemmen. Vor allem Doxycyclin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline, sowie COL-3, ein chemisch modifiziertes Tetracyclinderivat, wurden an vielen Tumorentitäten in präklinischen und klinischen Studien erfolgreich eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 Antibiotika, Doxycyclin und Cefotaxim, auf ihre Wirkung auf 4 Gliomzelllinien, C6, U251, U373 und GaMG, sowie 4 Primärzellen, 2406, 2418, 2421 und 2464, untersucht.

Sowohl Doxycyclin, als auch Cefotaxim hemmen teilweise die Expression von MMP2 und MMP9, was durch eine semiquantitative PCR nachgewiesen wurde; die Expression von TIMP1 bleibt weitgehend unverändert. Auch auf Proteinebene konnte mittels Immunhistochemie ein Rückgang von MMP2 und MMP9 bei den meisten Zelllinien und Primärzellen unter Behandlung mit den Antibiotika beobachtet werden.

Außerdem konnten Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zellen in der Zellkultur verzeichnet werden, wahrscheinlich durch Inhibition der MMPs bedingt. Bei allen Zelllinien und allen Primärzellen wurde eine Abnahme der Proliferation im MTT-Assay, eine Zunahme der Adhäsion im Amidoblackassay, eine Abnahme der Migration im Migrationsassay, und eine Abnahme der Invasion im 3-D-Kollagengel-Assay beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die Resultate anderer Arbeitsgruppen mit Doxycyclin an anderen Tumoren, wie dem Prostata-Ca.

Der deutliche Einfluss des Doxycyclins auf grundlegende Zelleigenschaften, wie z.B. dem Migrations-, Proliferations- und Invasionsverhalten, erfordert einen kritischen Umgang mit

dem Tet-On/Off Systems zur Genregulation, insbesondere dann, wenn funktionelle Untersuchungen Teil der Versuchszielsetzung sind.

7 Literaturverzeichnis

Acharya M.R., Venitz J., Figg W. D., Sparreboom A.: Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resistance Updates*. 2004, 7, 195-208

Adjei A.A.: Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition. *Clin. Cancer Res*. 2006 Jul, 12(14 Pt 2), 4446s-4450s

Arenas-Huertero F.J., Herrera-Goepfert R., Delgado-Chavez R., Zinser-Sierra J.W., De la Garza-Salazar J.G., Herrera-Gomez A., Perez-Cardenas E.: Matrix metalloproteinases expressed in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation with clinicopathologic features and the neo-adjuvant chemotherapy response. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 1999 Sep, 18(3), 279-284

Bergers G., Javaherian K., Lo K.M., Folkman J., Hanahan D.: Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999 Apr, 284(5415), 808-812

Bernstein J.J., Goldberg W.J.; Laws E.R. Jr.: Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: a model for central nervous system cancer research. *J. Neurosci. Res*. 1989 Feb, 22(2), 134-143

Bernstein J.J., Woodard C.A.: Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery*. 1995 Jan, 36(1), 124-132

Bettany J.T., Peet N.M., Wolowacz R.G., Skerry T.M., Grabowski P.S.: Tetracycline induce apoptosis in osteoclasts. *Bone*. 2000 Jul, 27(1), 75-80

Brand K., Baker A.H., Perez-Canto A., Possling A., Sacharjat M., Geheeb M., Arnold W.: Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into liver tissue. *Cancer Res*. 2000 Oct, 60(20), 5723-5730

Burger P.C., Kleihues P.: Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer*. 1989 May, 63(10), 2014-2023

Caton J.G., Ciancio S.G., Blieden T.M., Bradshaw M., Crout R.J., Hefti A.F., Massaro J.M., Polson A.M., Thomas J., Walker C.: Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct scaling and root planing: post-treatment effects. *J. Clin. Periodontol.* 2001 Aug, 28(8), 782-789

Celiker M.Y., Wang M., Atsidaftos E., Liu X., Liu Y.E., Jiang Y., Valderrama E., Goldberg I.D., Shi Y.E.: Inhibition of Wilm's tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene.* 2001 Jul, 20(32), 4337-4343

Chang C., Werb Z.: The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology,* 2001 Nov, 11(11), 37-43

Choe G., Park J.K., Jouben-Steele L., Kremen T.J., Liao L.M., Vinters H.V., Cloughesy T.F., Mischel P.S.: Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin. Cancer Res.* 2002 Sep, 8(9), 2894-2901

Cianfrocca M., Cooley T.P., Lee J.Y., Rudek M.A., Scadden D.T., Ratner L., Pluda J.M., Figg W.D., Krown S.E., Dezube B.J.: Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS malignancy consortium study. *J.Clin. Oncol.* 2002 Jan, 20(1), 153-159

Coussens L.M., Werb Z.: Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem. Biol.* 1996 Nov, 3(11), 895-904

D'Agostino P., Ferlazzo V., Milano S., La Rosa M., Di Bella G., Caruso R., Barbera C., Grimaudo S., Tolomeo M., Feo S., Cillari E.: Chemically modified tetracyclines induce cytotoxic effects against J774 tumour cell line by activating the apoptotic pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2003 Jan, 3(1), 63-73

Devaux B.C., O'Fallon J.R., Kelly P.J.: Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome. *J. Neurosurg.* 1993 May, 78(5), 767-775

Delpech B., Maingonnat C., Grrard N., Chauzy C., Maunoury R., Olivier A., Tayot J., Creissard P.: Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer.* 1993, 29A(7), 1012-1017

Demuth T., Berens M.E.: Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J. Neurooncol.* 2004 Nov, 70(2), 217-228

Dezube B.J., Krown S.E., Lee J.Y., Bauer K.S., Aboulafia D.M.: Randomized phase II trial of matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* 2006 Mar, 24(9), 1389-1394

Dropcho E.J., Soong S.J.: The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology.* 1996 Sep, 47(3), 684-690

Duivenvoorden W.C., Popovic S.V., Lhotak S., Seidlitz E., Hirte H.W., Tozer R.G., Singh G.: Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Mar, 62(6), 1588-1591

Earp H.S., Calvo B.F., Sartor C.I.: The EGF receptor family-multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2003, 114, 315-333

Edwards D.R: Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy (eds Clendeninn N.J.& Appelt K.) 67-84, (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2001)

Egeblad M., Werb Z.: New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Mar, 2(3), 161-174

Eller J.L., Longo S.L., Hicklin D.J., Canute G.W.: Activity of antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery.* 2002, 51, 1005-1013

Fife R.S., Rougraff B.T., Proctor C., Sledge G.W. Jr.: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J. Lab. Clin. Med.* 1997 Nov, 130(5), 530-534

Fife R.S., Sledge G.W. Jr.: Effects of doxycycline in in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. *J. Lab. Clin. Med.* 1995 Mar, 125(3), 407-411

Fitzek M.M., Thornton A.F., Rabinov J.D., Lev M.H., Pardo F.S., Munzenrider J.E., Okunieff P., Bussiere M., Braun I., Hochberg F.H., Hedley-Whyte E.T., Liebsch N.J., Harsh G.R. 4th: Accelerated fractionated proton/photon irradiation to 90 cobalt gray equivalent for glioblastoma multiforme: results of a phase II prospective trial. *J. Neurosurg.* 1999, 91(2), 251-260

Forsyth P.A., Wong H., Laing T.D., Rewcastle N.B., Morris D.G., Muzik H., Leco K.J., Johnston R.N., Brasher P.M., Sutherland G., Edwards D.R.: Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br. J. Cancer.* 1999 Apr, 79(11-12), 1828-1835

Franco C., Ho B., Mulholland D., Hou G., Islam M., Donaldson K., Bendeck M.P.: Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am. J. Pathol.* 2006 May, 168(5), 1697-1709

Freundlieb S., Schirra-Müller C., Bujard H.: A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1999 Jan-Feb, 1(1), 4-12

Friedl P., Wolf K.: Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 May, 3(5), 362-374

Giese A., Kluwe L., Laube B., Meissner H., Berens M.E., Westphal M.: Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery.* 1996 Apr, 38(4), 755-764

Gilbertson-Beadling S., Powers E.A., Stamp-Cole M., Scott P.S., Wallace T.L., Copeland J., Petzold G., Mitchell M., Ledbetter S., Poorman R.: The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1995, 36(5), 418-424

Golub L.M., Lee H.M., Ryan M.E., Giannobile W.V., Payne J., Sorsa T.: Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res.* 1998 Nov, 12(2), 12-26

Golub L.M., Ramamurthy N., McNamara T.F., Gomes B.C., Wolff M.S., Casino A.: Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 1984, 19, 651-655

Gossen M., Bujard H.: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992 Jun, 89(12), 5547-5551

Gossen M., Freundlieb S., Bendler G., Muller G., Hillen W., Bujard H.: Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995 Jun, 268(5218), 1766-1769

Greenberg M.S.: *Handbook of Neurosurgery*, fifth edition, Thieme, 2001

Greene G.M., Hitchon P.W., Schelper R.L., Yuh W., Dyste G.N.: Diagnostic yield in CT-Guided stereotactic biopsy of gliomas. *J. Neurosurg.* 1989 Oct, 71(4), 494-497

Gu Y., Lee H.M., Golub L.M., Sorsa T., Kontinen Y.T., Simon S.R.: Inhibition of breast cancer cell extracellular matrix degradative activity by chemically modified tetracyclines. *Ann. Med.* 2005, 37(6), 450-460

Haas-Kogan D.A., Prados M.D., Tihan T., Eberhard D.A., Jelluma N., Arvold N.D., Baumber R., Lamborn K.R., Kapadia A., Malec M., Berger M.S., Stokoe D.: Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005 Jun, 97(12), 880-887

Heath E.I., Grochow L.B.: Clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Drugs*. 2000, 59, 1043-1055)

Hidalgo M., Eckhardt S.G.: Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of National Cancer Institute* 2001 Feb, 93(3), 178-193

Jeremic B., Shibamoto Y., Grujicic D., Milicic B., Stojanovic M., Nikolic N., Dagovic A., Aleksandrovic J.: Combined treatment modality for anaplastic oligodendroglioma: a phase II study. *J. Neurooncol.* 1999, 43, 179-185

Kamat A.M., Lamm D.L.: Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology*. 2004 Mar, 63(3), 457-460

Kannan R., Ruff M., Kochins J.G., Manly S.P., Stoll I., El Fahime M., Noel A., Foidart J.M., Rio M.C., Dive V., Basset P.: Purification of active matrix metalloproteinase catalytic domains and its use for screening of specific Stromelysin-3 inhibitors. *Protein Expr. Purif.* 1999 Jun, 16(1), 76-83

Kellogg D.E., Sninsky J.J., Kwok S.: Quantitation of HIV-1 proviral DNA related to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1990 Sep, 189(2), 202-208

Kim T.S., Halliday A.L., Hedley-Whyte E.T., Convery K.: Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J. Neurosurg*, 1991 Jan, 74 (1), 27-37

Kleihues P., Burger P.C., Scheithauer B.W.: The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathology*, 1993, 255-68

Kleihues P., Louis D.N., Scheithauer B.W., Rorke L.B., Reifenberger G., Burger P.C., Cavenee W.K.: The WHO Classification of the Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2002 Mar, Vol. 61, No. 3, pp. 215-225

Kleihues P., Ohgaki H.: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol.* 1999 Jan, 1(1), 44-51

Koivunen E., Arap W., Valtanen H., Rainisalo A., Medina O.P., Heikkila P., Kantor C., Gahmberg C.G., Salo T., Konttinen Y.T., Sorsa T., Ruoslahti E., Pasqualini R.: Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat. Biotechnol.* 1999 Aug, 17(8), 768-774

Kroon A.M., Dontje B.H., Holtrop M., Van den Bogert C.: The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics. *Cancer Lett.* 1984 Nov, 25(1), 33-40

Lampert K., Machein U., Machein M.R., Conca W., Peter H.H., Volk B.: Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am. J. Pathol.* 1998 Aug, 153(2), 429-437

Lassen U., Kristiansen P.E., Wagner A., Kostelianetz M., Poulsen H.S.: Treatment of a newly diagnosed glioblastoma multiforme with carmustine, cisplatin and etoposide followed by radiotherapy. A phase II study. *J. Neurooncol.* 1999, 43(2), 161-166

Lauffenberger D.A., Horwitz A.F.: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996 Feb, 84(3), 359-369

Lee H.M., Golub L.M., Cao J., Teronen O., Laitinen M., Salo T., Zucker S., Sorsa T.: CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC) inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer. *Curr. Med. Chem.* 2001 Feb, 8(3), 257-260

Liu Y., Ramamurthy N., Merecek J., Lee H.M., Chen J.L., Ryan M.E., Rifkin B.R., Golub L.M.: The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). *Curr. Med. Chem.* 2001 Feb, 8(3), 243-252

Lokeshwar B.L., Escatel E., Zhu B.: Cytotoxic activity and inhibition of tumor cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). *Curr. Med. Chem.* 2001 Feb, 8(3), 271-279

Lokeshwar B.L., Selzer M.G., Zhu B.-Q., Block N.L., Golub L.M.: Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *Int. J. Cancer.* 2002, 98, 297-309

Louis D.N., Gusella J.F.: A tighter behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet.* 1995 Oct, 11(10), 412-415. Review

Louis D.N., von Deimling A., Chung R.Y., Rubio M.P., Whaley J.M., Eibl R.H., Ohgaki H., Wiestler O.D., Thor A.D., Seizinger B.R.: Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1993 Jan, 52(2), 31-38

Lukkonen A., Sorsa T., Salo T., Tervahartiala T., Koivunen E., Golub L., Simon S., Stenman U.-H.: Down-regulation of trypsinogen-2 expression by chemically modified tetracyclines: Association with reduced cancer cell migration. *Int. J. Cancer.* 2000, 86, 577-581

Makela M., Sorsa T., Uitto V.J., Salo T., Teronen O., Larjava H.: The effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) on human keratinocyte proliferation and migration. *Adv. Dent. Res.* 1998 Nov, 12(2), 131-135

Marks J. E.: Ionizing radiation. In *Neurobiology of brain tumors*. B. Salzman, ed. (Baltimore: Williams&Wilkins), 1991, pp. 299-320

Masumori N., Miyao N., Takahashi A., Sasamura H., Kitamura H., Tsukamoto T.: Minocycline inhibits in vitro invasion and experimental pulmonary metastasis of mouse renal adenocarcinoma. *Adv. Dent. Res.* 1998 Nov, 12(2), 111-113

McCawley L.J., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001 Oct, 13(5), 534-540

McKeever P.E., Varani J., Papadopoulos S.M., Wang M., McCoy J.P.: Products of cells from gliomas: IX. Evidence that two fundamentally different mechanisms change extracellular matrix expression by gliomas. *J. Neurooncol.* 1995, 24(3), 267-280

Meng Q., Xu J., Goldberg I.D., Rosen E.M., Greenwald R.A., Fan S.: Influence of chemically modified tetracyclines on proliferation, invasion and migration properties of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis.* 2000, 18(2), 139-146

Miroux S., Lemiere S., Pineau R., Pluderi M., Canioni P., Franconi J.M., Thiaudiere E., Bello L., Bikfalvi A., Auguste P.: Inhibition of FGF receptor activity in glioma implanted into the mouse brain using the tetracyclin-regulated expression system. *Angiogenesis*. 2004, 7(2), 105-113

Munaut C., Noel A., Hougrand O., Foidart J.-M., Boniver J., Deprez M.: Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. *Int. J. Cancer*. 2003, 106, 848-855

Munoz-Mateu M., de 'Graffenried L., Eckhardy S.: Pharmacodynamic studies of COL-3, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with advanced cancer. (abstract #302) *Proc. ASCO*. 2001, 20, 76a

Oh J., Takahashi R., Kondo S., Adachi E., Sasahara R.M., Nishimuru S., Imamura Y., Kitayama H., Alexander D.B., Ide C., Horan T.P., Arakawa T., Nishikawa S., Itoh Y., Seiki M., Itohara S., Takahashi C., Noda M.: The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001 Dec, 107(6), 789-800

Onoda T., Ono T. Dhar D.K., Yamanoi A., Nagasue N.: Tetracycline analogues (doxycycline and COL-3) induce caspase-dependent and -independent apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer*. 2006 Mar, 118(5), 1309-1315

Overall C.M., Lopez-Otin C.: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the posttrial era. *Nat. Rev. Cancer*. 2002 Sep, 2(9), 657-672

Parney I.F., Chang L.J.: Cancer immunogene therapy: a review. *J. Biomed. Sci.* 2003 Jan-Feb, 10(1), 37-43

Pilkington C.J.: The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996 Sep, 29(9), 1159-1172

Raza M., Ballering J.G., Hayden J.M., Robbins R.A., Hoyt J.C.: Doxycycline decreases monocyte chemoattractant protein-1 in human lung epithelial cells. *Exp. Lung. Res.* 2006 Jan-Feb, 32(1-2), 15-26

Rao. J.S.: Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 Jul, 3(7), 489-501

Rasheed B.K., Mc Lendon R.E., Herndon J.E., Friedman H.S., Friedman A.H., Bigner D.D., Bigner S.H.: Alterations of the p53 gene in human gliomas. *Cancer Res.* 1994 Mar, 54(5), 1324-1330

Reardon D.A., Rich J.N., Friedmann H.S., Bigner D.D.: Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J. Clin. Oncol.* 2006 Mar, 24(8), 1253-1265

Rich J.N., Rasheed B.K., Yan H.: EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *N.Engl. J. Med.* 2004 Sep, 351(12), 1260-1661

Ridet J.L., Corti O., Pencalet P., Hanoun N., Hamon M., Pjilippon J., Mallet J.: Toward autologous ex vivo gene therapy for the central nervous system with human adult astrocytes. *Hum. Gene Ther.* 1999 Jan, 10(2), 271-280

Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.R.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003 Dec, 302(5651), 1704-1709

Romanic A.M.; Madri J.A.: Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol.* 1994 Apr, 4(2), 145-156

Rong Y., Durden D.L., Van Meir E.G., Brat D.J.: „Pseudopalisading“ necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006, 65(6), 526-539

Roth W., Weller M.: Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999, 56(5-6), 481-506

Rudek M.A., Figg W.D., Dyer V., Dahut W., Turner M.L., Steinberg S.M., Liewehr D.J., Kohler D.R., Pluda J.M., Reed E.: Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2001, Vol 19, No 2, pp 584-592

Rudek M.A., Venitz J., Figg W.D.: Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy*. 2002 Jun, 22(6), 705-720

Saikali Z., Singh G.: Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. *Anticancer Drugs*. 2003 Nov, 14(10), 773-778

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan, 239(4839), 487-491

Salcman M.: Glioblastoma multiforme. *Am. J. Med. Sci.* 1980a, 279, 84-94

Salcman M.: Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* 1980b Nov, 7(5), 435-439

Salomon D.S., Brandt R., Ciasdiello F., Normanno N.: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995 Jul, 19(3), 183-232

Sanceau J., Truchet S., Bauvois B.: Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 2003 Sep, 278(38), 36537-36546

Santavirta S., Takagi M., Kontinen Y.T., Sorsa T., Suda A.: Inhibitory effect of cephalothin on matrix metalloproteinase activity around loose hip prostheses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996 Jan, 40(1), 244-246

Sapolsky R.M., Ho D.Y., McLaughlin J.: The ins and outs of on and off. *Nat. Biotechnol.* 1998 Jun., 16(6), 516

Scarpellini F., Scarpellini L., Sbracia M., Curto C.: Effectiveness of a cephalosporin, cefotan, in inhibition of uterine matrix metalloproteinases by a non-antimicrobial mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994 Sep, 732, 495-496

Schatzkin A., Gail M.: The promise and peril of surrogate end points in cancer research. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Jan, 2(1), 19-27

Scherer H.J.: The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain.* 1940, 63, 1-35

Schulz J., Dettlaff S., Fritzsche U., Harms U., Schiebel H., Derer W., Fusenig N.E., Hülsen A., Böhm M.: The amido black assay: a simple quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation, and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension. *Journal of Immunological Methods.* 1994, 167, 1-13

Seftor R.E., Seftor E.A., De Larco J.E., Kleiner D.E., Leferson J., Stetler-Stevenson W.G., McNamara T.F., Golub L.M., Hendrix M.J.: Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis.* 1998 Apr, 16(3), 217-225

Sipo I., Hurtado Pico A., Wang X., Eberle J., Peterson I., Weger S., Poller W., Fechner H.: An improved Tet-On regulated FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J. Mol. Med.* 2006 Mar, 84(3), 215-225

Smith G.N., Mickler E.A., Hasty K.A., Brandt K.D.: Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis Rheum.* 1999 Jun, 42(6), 1140-1146

Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O; European

Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005 Mar, 10, 352(10), 987-996

Tohma Y., Gratas C., Biernat W., Peraud A., Fukada M., Yonekawa Y., Kleinhues P., Ohgaki H.: PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1998, 57, 684-689

Tonn J.C., Westphal M.: Immuntherapie bei Hirntumoren. *Neuroonkologie*, Thieme, 1997, 423-426

Van den Bogert C., van Kernebeek G., de Leij L., Kroon A.M.: Inhibition of mitochondrial protein synthesis leads to proliferation arrest in the G1-phase of the cell cycle. *Cancer Lett.* 1986 Jul, 32(1), 41-51

Venstrom K.A., Reichardt L.F.: Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993 Aug, 7(11), 996-1003

Vihinen P., Kähäri V.M.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer.* 2002 May; 99(2), 157-166

Vince G.H., Wagner S., Pietsch T., Klein R., Goldbrunner R.H., Roosen K., Tonn J.C.: Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. *Int. J. Devl Neuroscience*, 1999, Vol. 17, Nos.5 pp.437-445

Von Deimling A., Louis D.N., von Ammon K., Peterson I., Hoell T., Chung R.Y., Martuza R.I., Schoenfeld D.A., Yasargil M.G., Wiestler O.D.: Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* 1992 Aug, 77(2), 295-301

Von Deimling A., Louis D.N., Wiestler O.D.: Molecular pathways on the formation of gliomas. *Glia* 1995, 15(3), 328-338

Webb D.J., Parson J.T., Horowitz A.F. : Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat. Cell. Biol.* 2002 Apr, 4(4), E97-100

Weissleder R. : Scaling down imaging : molecular mapping of cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Jan, 2(1), 11-18

Yuhas J.M., Li A.P., Martinez A.O., Ladman A.J. : A simplified method for the production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1977 Oct, 37(10), 2639-3643

Zinkernagel R.M. : Grundlagen der Immunologie. *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme, 1997, 47-147

8 Abkürzungsverzeichnis

BCNU	Carmustin
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CMT	Chemisch modifiziertes Tetracyclin
CED	convection enhanced delivery
CO ₂	Kohlendioxid
COL-3	6-deoxy-6-desmethyl-4-desdimethylamino-Tetracyclin
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(zelluläre) Desoxyribonukleinsäure (engl.: -acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ERK	extracellular regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
HCl	Salzsäure
HER1	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
IHC	Immunhistochemie
l	Liter
M	Molar
Mab	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
MGMT	Methylguanin-DNA-methyltransferase
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-MMP	Membrantyp-Matrixmetalloproteinasen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCV-Schema	Polychemotherapie mit Procarbazin, CCNU, Vincristin
RECK	reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: -acid)
rpm	rotations per minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE Puffer	Tris Acetat EDTA Puffer
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TGF alfa	transforming growth factor alfa
TK	Tyrosinkinase
TMZ	Temozolomid
TNF alfa	Tumornekrosefaktor alfa
t-RNA	transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Veröffentlichungen

Dette K., Meinhardt M., Herbold C., Vince G.H., Hagemann C., Roosen K.: The tetracyclic antibiotic doxycycline downregulates MMP-expression in glioma cells *in vitro* and inhibits cell migration, proliferation and invasion. Jahrestagung der Sektion Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Lübeck. 2004 Nov. Vortrag

Meinhardt M., Dette K., Herbold C., Vince G.H., Roosen K.: The tetracyclic antibiotic doxycycline downregulates MMP-expression in glioma cells *in vitro* and inhibits cell migration, proliferation and invasion. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), Strassburg. 2005 May. Poster akzeptiert.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beitragen konnten.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Roosen für die Übernahme des Erstgutachtens und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G.H. Vince für die Idee dieser spannenden Arbeit, die zahlreichen Anregungen, sowie für die Möglichkeit meine Ergebnisse bei der Jahrestagung der Sektion Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie vorzustellen.

Herrn Dr. C. Hagemann möchte ich danken für die permanente Hilfsbereitschaft, für wertvolle Tipps und Anregungen.

Dankbar bin ich Herrn Dr. M. Meinhardt für die nette Zusammenarbeit und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Roggendorf danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Einen Dank schulde ich auch der HNO-Klinik der Universität Würzburg für die Bereitstellung von Tonsillengewebe.

Ich möchte mich sehr bei all meinen Laborkollegen bedanken für die Hilfsbereitschaft und die überaus nette Zusammenarbeit. Mein spezieller Dank ist dabei an Siggie Kühnel für das Einarbeiten in die Zellkultur sowie an Steffi Gerngras für das Einlernen in molekularbiologische Methoden gerichtet. Sehr dankbar bin ich auch Frau Dr. J. Stojic für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich vor allem meinen Eltern für die grenzenlose Unterstützung jeder Art zu jeder Zeit, sowie meinen Freunden.

Lebenslauf

Katharina Gerda Dette
Rohrbacherstraße 67
Heidelberg

Persönliche Daten:

Familienstand: ledig
Religion: röm. katholisch
Geburtsdatum: 17.04.1980
Geburtsort: Gotha/ Thüringen

Schulbildung:

09/1990 – 07/1998 Gymnasium Ernestinum, Gotha
1998 Abitur

Hochschulausbildung:

Seit 04/1999 Medizinstudium an der Julius – Maximilians – Universität Würzburg
03/2001 Physikum
08/2001 Erstes Staatsexamen
03/2005 Zweites Staatsexamen
04/2005 – 03/2006 Praktisches Jahr
1. Tertial: Neurochirurgie: Würzburg und Sydney
2. Tertial: Chirurgie: Würzburg und Rochester
3. Tertial: Innere Medizin: Zürich
05/2006 Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

Seit 11/2006 Assistenzärztin in der Neurochirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg

Heidelberg, 01.März 2007