

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. sc. techn. Werner K. Lutz

**Kombination von Paclitaxel und Bestrahlung:
Gentoxizität in Säugerzelllinien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Daniela Maria Wück
aus Schweinfurt

Würzburg, Januar 2002

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper
Koreferent: PD Dr. med. German Ott
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 2002

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Krebs	1
1.2	Paclitaxel.....	2
1.2.1	Physiologische Grundlagen	2
1.2.2	Wirkmechanismus	4
1.2.3	Indikationen.....	5
1.2.4	Dosierung	5
1.3	Strahlentherapie.....	6
1.4	Kombinationstherapie	8
1.5	Der <i>in vitro</i> Mikrokerntest	8
1.6	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	12
2.1.3	Zelllinien.....	13
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Zellkultur	13
2.2.2	Bestimmung von Mikrokernen.....	13
3	Ergebnisse.....	15
3.1	Mikrokerninduktion in Kulturzellen	15
3.1.1	Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Maus Lymphom Zellen L5178Y (MoLy)	16

3.1.2	Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Lungenfibroblasten- Zellen des Chinesischen Hamsters V79.....	17
3.1.3	Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Zervixplattenepithelkarzinom-Zellen des Menschen HeLa.....	18
3.1.4	Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei humanen Brustadenokarzinom-Zellen MCF-7.....	19
3.1.5	Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung in humanen Lungenkarzinom-Zellen A549.....	20
3.2	Mikrokerninduktion bei Kombination von Paclitaxel und Strahlung.....	21
4	Diskussion.....	27
5	Zusammenfassung.....	31
6	Abkürzungsverzeichnis.....	33
7	Literaturverzeichnis.....	34
8	Anhang.....	40

1 Einleitung

1.1 Krebs

In der Bundesrepublik Deutschland erkrankt jeder dritte Einwohner an einem malignen Tumor. Durch den bösartigen Verlauf stellen Krebserkrankungen nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den hochzivilisierten Industrieländern dar. Die meisten soliden Tumoren befinden sich durchschnittlich 5 bis 10 Jahre im „präklinischen Tumorwachstum“ und entziehen sich der Diagnostik (Achenbach, 1997). Dadurch ist eine Vorsorge schwer realisierbar und die Hauptbemühungen liegen in der Therapie maligner Tumoren. Aber nur ca. 40 % der Tumorpatienten können durch die derzeitigen therapeutischen Maßnahmen für länger als 10 Jahre geheilt werden. So hat das kleinzellige Bronchialkarzinom eine 5-Jahresüberlebensrate von 5 % und 80 % der Patienten mit einem Glioblastom sterben innerhalb von 6 bis 12 Monaten (Achenbach, 1997). Der Großteil der Patienten erfährt nur eine palliative oder symptomatische Behandlung. Um so wichtiger ist es, möglichst früh den Tumor zu diagnostizieren und mit der Behandlung zu beginnen. Je frühzeitiger und radikaler die Therapie erfolgt, desto größer sind die Heilungschancen. So hat das Zervixkarzinom im Frühstadium, begrenzt auf die Zervix, eine Fünfjahresüberlebensrate von 75-90 %. Im fortgeschrittenen Stadium ausgebreitet bis zur Beckenwand oder bis zum unteren Drittel der Vagina nur noch von 30 %. Für die prognostische Beurteilung und stadiengerechte Therapieeinleitung ist die Ausbreitung (Staging) und der Grad der Differenzierung (Grading) des Tumorgewebes wichtig. Das Staging erfolgt nach der von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) organspezifisch entwickeltem TNM -System (T-Primärtumor, N-Noduli lymphatici/ lymphogene Metastasierung, M-hämatogene Metastasierung/ Fernmetastasen). Das Grading, durch das der histologische Differenzierungs- und Malignitätsgrad beschrieben wird, stellt eine Ergänzung zum TNM-System dar.

Neben der frühestmöglichen Diagnosesicherung und Festlegung des Tumorstadiums ist ein multimodales Therapiekonzept wichtig. Das heißt, es werden gleichzeitig bzw. sequentiell verschiedene Therapieverfahren eingesetzt. Die

wichtigsten Behandlungsformen stellen die chirurgische Tumorthherapie, die Strahlentherapie und die Chemotherapie dar. Das genaue Therapieschema hängt von der Art des Tumors (Strahlensensibilität), Lokalisation des Tumors, Tumorgroße, Ausbreitung sowie Alter und Allgemeinzustand des Patienten ab.

1.2 Paclitaxel

Taxol mit dem Wirkstoff Paclitaxel ist ein potentes antineoplastisches Mittel, das zur Gruppe der Taxane gehört. Paclitaxel wurde erstmals 1967 aus der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, isoliert (Wani, et al., 1971). Heute wird es semisynthetisch aus Nadeln und Ästen anderer Eibenarten gewonnen (Appendino, et al., 1993). Paclitaxel verfügt über einen vorher nicht bekannten Wirkungsmechanismus. Anders als klassische antimikrotubulär wirkende Stoffe wie Kolchizin und die Vinca-Alkaloide, die eine Depolarisation der Mikrotubuli induzieren, fördert Paclitaxel die Polymerisation von Mikrotubuli aus Tubulin und bildet extrem stabile, funktionsunfähige Mikrotubuli (Kumar, 1981; Manfredi und Horwitz, 1984; Schiff und Horwitz, 1980). Die normal ablaufende Reorganisation der Mikrotubuli und damit die Mitose und G2-Phase (Interphase) der Zelle wird gehemmt.

1.2.1 Physiologische Grundlagen

Mikrotubuli befinden sich als Bestandteil des Zytoskeletts im Zytoplasma. Sie sorgen für die zelluläre Beweglichkeit, die Aufrechterhaltung der Zellform und sind wichtig für den intrazellulären Transport. Zusätzlich modulieren sie die Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren auf der Zelloberfläche und sind Hauptbestandteil der mitotischen Zellspindel (Dustin, 1980; Rowinsky, et al., 1990). Mikrotubuli sind längliche, zylinderförmige Röhren mit einem Aussendurchmesser von circa 25 nm und einem Innendurchmesser von circa 15 nm. Die Länge kann von einem bis zu mehreren Mikrometern betragen. Sie laufen gerichtet und können einzeln liegen oder in Bündel. Viele Mikrotubuli orientieren sich zum Zentriol hin. Dieses Zentriol hat die Funktion eines Mikrotubulusorganisationszentrums (MTOC). Mikrotubuli bestehen vor allem aus

Tubulin, ein globuläres Protein, das sich aus zwei Untereinheiten, dem α - und β -Tubulin zusammensetzt. Neubildung und Längenwachstum von Mikrotubuli erfolgt durch Polymerisation freier Tubulinmonomere und Tubulindimere zu Tubulinprotofilamenten. 13 dieser Tubulinprotofilamente in ringförmiger Anordnung bilden einen Mikrotubulus. Die Polymerisation ist von freien Bindungsstellen an den Tubulinmolekülen abhängig. Jedes Tubulindimer verfügt über zwei Nukleotid-Bindungsstellen. Diese Bindungsstellen dienen der Verknüpfung der Tubulinmoleküle untereinander und der Anlagerung von Mg^{2+} -ATP, dessen Spaltung die Energie für die Polymerisation liefert. An der einen Bindungsstelle kommt es zu einem schnellen Austausch mit freiem Guanosin-5-Triphosphat (GTP), an der anderen Bindungsstelle findet ein solcher Austausch gar nicht oder nur sehr langsam statt. GTP wird während der Polymerisation zu Guanosin-5-Diphosphat (GDP) hydrolysiert. Des Weiteren sind mit den Mikrotubuli eine Reihe von Proteinen assoziiert. Diese werden als Mikrotubuli- assoziierte Proteine bezeichnet. Sie binden über ihre ganze Länge an die Mikrotubuli und sind für die Polymerisation erforderlich (Schiff, et al., 1979; Schiff und Horwitz, 1980).

Das Wachstum erfolgt asymmetrisch. Die Mikrotubuli haben ein relativ stabiles, langsam wachsendes Minusende. Dieses befindet sich im Bereich der Mikrotubulusorganisationszentren (z.B. Zentriol, Kinetosom). Diese Zentren sind in lebenden Zellen an der Teilungskontrolle der Mikrotubuli beteiligt. Das relativ instabile, schnell wachsende Plusende befindet sich in der Peripherie. Auf- und Abbau der Mikrotubuli verläuft sehr schnell. Er ist abhängig von den Bedürfnissen der Zelle. Das Gleichgewicht zwischen Tubulindimeren und Mikrotubuli wird durch Signale bestimmt. Diese Signale in Form von GTP, Kalzium und anderen intrazellulären Mediatoren werden in bestimmten Zyklusphasen produziert (Rowinsky, et al., 1990). Die frei gewordenen Tubulinmonomere können zum Wiederaufbau neuer Protofilamente verwendet werden. *In vitro* ist das Tubulin vor Beginn der Polymerisation in Form von freien Dimeren und Oligomeren vorhanden (Schiff, et al., 1979). Die Polymerisation beginnt mit dem Öffnen der Ringe. Es bilden sich kurze Protofilamente. Diese lagern sich dann entweder Seit-zu-Seit oder End-zu-End aneinander an. Gleichzeitig kommt es zu einer Anlagerung zusätzlicher Dimere an die Protofilamente und deren Aggregate. Sind 13 Protofilamente vorhanden, falten sich diese zu der zylindrischen Mikrotubulusstruktur. An beiden Enden des Mikrotubulus

lagern sich weitere Dimere an. Unter Gleichgewichtsbedingungen findet an beiden Enden des Mikrotubulus eine ständige Polymerisation und Depolymerisation statt.

1.2.2 Wirkmechanismus

Paclitaxel verfügt über eine andere Bindungsstelle an den Mikrotubuli als die bekannten antimikrotubulären Substanzen wie Colchicin oder die Vincaalkaloide (Kumar, 1981). Es bindet spezifisch und reversibel an die Mikrotubuli, genauer an die β - Untereinheiten des Tubulins (Rao und Horwitz, 1992; Rao, et al., 1992). Paclitaxel ist die erste bekannte zytotoxische Substanz, die die Bildung von anomalen Mikrotubuli fördert und zu einer Stabilisierung der gebildeten Mikrotubuli führt (Manfredi und Horwitz, 1984). Die Hauptwirkungen von Paclitaxel sind:

- verstärkte Bildung von Mikrotubuli *in vitro*,
- Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Tubulindimeren und -polymeren zugunsten der Polymere,
- Verminderung der erforderlichen kritischen Tubulinkonzentrationen für die Mikrotubulusbildung und
- Verstärkung der Polymerisationsreaktionen und Stabilisierung der gebildeten Mikrotubuli.

Paclitaxel fördert unter Gleichgewichtsbedingungen die Zusammenlagerung von Tubulindimeren und damit die zusätzliche Bildung von Mikrotubuli. Dies geschieht durch die Verlängerung bereits gebildeter Mikrotubuli und durch die Neubildung von Mikrotubuli. Anders als bei der physiologischen Mikrotubulusbildung kann dies auch in Abwesenheit von GTP und Mikrotubuli-assoziiierter Proteine erfolgen (Hamel, et al., 1981; Schiff und Horwitz, 1981).

Zellen, die mit Paclitaxel behandelt sind, bilden eine sternförmige Strahlung von unorganisierten Mikrotubuli. Diese ordnen sich während des gesamten Zellzyklus in parallelen Bündel an, sind funktionsunfähig und können sich nicht mehr auflösen. Desweiteren induziert Paclitaxel die Bildung von anormalen sternförmigen Konfigurationen während der Mitose (Roberts, et al., 1989). Dadurch kann sich keine normale Mitosespindel bilden. Auch die Chromosomen ordnen sich nicht in der für die

Mitose typischen Art und Weise an, was zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Zellteilung führt (De Brabander, et al., 1982). Die Störungen in der Interphase/ G2-Phase (postsynthetische und prämitotische Phase, in der der Eiweißaufbau und Umbau der Zellmembran stattfindet) durch Paclitaxel können zum Teil durch den Einfluss auf das Zytoskelett, die Hemmung der dynamischen Anpassung an Zellfunktionen und die Schädigung des Tubulins der Zellmembran erklärt werden. Die Beweglichkeit der Zelle, der intrazelluläre Transport und die Übertragung von proliferativen Transmembransignalen können gestört werden.

1.2.3 Indikationen

Paclitaxel wird in Deutschland eingesetzt zur Behandlung von metastasierendem Ovarialkarzinom nach Versagen einer platinhaltigen Standardtherapie. Darüberhinaus beim metastasierendem Mammakarzinom nach Versagen einer anthracyclinhaltigen Standardtherapie.

In den USA ist die Kombination von Paclitaxel und Platinderivaten Standardtherapie für die Behandlung von fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach vorausgegangener Operation. In klinischen Studien wurde auch beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom und malignem Melanom eine bemerkenswerte Wirkung von Paclitaxel gezeigt (Arbruck und Blaylock, 1995; Runowicz, et al., 1993).

1.2.4 Dosierung

Die empfohlene Dosierung von Paclitaxel ist 175 mg/m² Körperoberfläche als intravenöse Infusion über drei Stunden. Zwischen den Therapiezyklen sollten drei bis vier Wochen Pause liegen und die Folgedosierung auf die individuelle Verträglichkeit abgestimmt werden.

Bei allen Patienten hat vor der Behandlung eine Prämedikation mit Kortikosteroiden (wegen ausgeprägter Hypersensibilitätsreaktionen), Antihistaminika und H₂-Antagonisten (wegen der Gefahr gastrointestinaler Nekrosen mit Perforation) zu erfolgen.

1.3 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie stellt zusammen mit der Chirurgie und der Chemotherapie eine der wichtigsten Behandlungsformen maligner Neoplasien dar. Das Ziel der Strahlentherapie ist eine maximale Schädigung des Tumorgewebes bei möglichst maximaler Schonung des umgebenden Gewebes. Dazu wird in der Regel ionisierende Strahlung eingesetzt. Ob eine Bestrahlung in *kurativer Absicht* erfolgt hängt von der Art des Tumors, dem Tumorstadium (Staging) und der Lokalisation des Tumors ab. Sehr strahlensensibel und gut durch Strahlentherapie heilbar sind zum Beispiel maligne Lymphome, Medulloblastome und Seminome. Die in *palliativer Absicht* durchgeführte Strahlentherapie versucht in erster Linie die Linderung von Beschwerden bzw. eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen. So kann die durch mediastinale Lymphome bedingte obere Einflusstauung zum Beispiel bei Bronchialkarzinomen strahlentherapeutisch zur Rückbildung gebracht werden. Die Bestrahlung von Knochenmetastasen kann zur Linderung von Schmerzen beitragen und Spontanfrakturen der Wirbel, die zu einer Querschnittssymptomatik führen können, verhindern. Von *adjuvanter Bestrahlung* spricht man, wenn die Bestrahlung zusätzlich zu einem anderen therapeutischen Verfahren wie zum Beispiel der Operation bei Mammakarzinom eingesetzt wird. Eine *prophylaktische Bestrahlung* wird im Anschluss an die Chemotherapie zum Beispiel im Bereich des Schädels bei akuten Leukämien oder beim kleinzelligen Bronchialkarzinom durchgeführt. Damit sollen vom ZNS ausgehende Rezidive verhindert werden, da das ZNS durch die Blut-Liquor-Schranke nicht ausreichend von Zytostatika erreicht wird.

Die *Strahlentherapie* wird meist nicht als *primäre*, alleinige Therapie eingesetzt, sondern mit chirurgischen oder seltener chemotherapeutischen Verfahren kombiniert. Bei der postoperativen *Nachbestrahlung* versucht man eventuell verbliebene Tumorreste zu vernichten. Im allgemeinen werden dabei das Operationsgebiet und die benachbarten Lymphknotenregionen bestrahlt. Die präoperative *Vorbestrahlung* hat zum Ziel die Tumormasse zu verkleinern und dadurch die Operabilität zu verbessern. Auch kann durch eine Kurzzeitvorbestrahlung das Risiko der intraoperativen Streuung von Krebszellen vermindert werden. Bei *intraoperativer Bestrahlung* können sehr hohe Dosen appliziert werden. Dies macht man sich zum Beispiel beim Pankreaskarzinom zu

Nutzen. Bei manchen Tumoren lassen sich die Therapieergebnisse durch eine Kombination der Strahlentherapie mit einer Chemotherapie und oder einer Hormontherapie verbessern (zum Beispiel Mammakarzinom).

Da Tumorgewebe eine hohe Proliferationsrate hat, ist es besonders strahlensensibel. Die Tumorheilungschancen steigen mit zunehmenden Dosen. Dabei nimmt aber auch das Risiko der Schädigung des gesunden Gewebes zu. Somit stellt die Dosiswahl einen Kompromiss zwischen beiden Größen dar. Die maximal applizierbare Gesamtdosis hängt stark von der Lokalisation des Tumors ab, also von der Nachbarschaft zu strahlenempfindlichen Organen wie zum Beispiel dem Rückenmark. Darüberhinaus von der Histologie des Tumors, der Tumorgroße und der Sauerstoffversorgung des Tumors. Schlecht mit Sauerstoff versorgte Tumoren wie zum Beispiel Tumorrezidive in Narbengewebe sind weniger strahlensensibel als gut versorgte mit einer hohen Teilungsrate.

Die Bestrahlungsdosis wird in Gray (Gy) gemessen. Die tumorwirksame Gesamtdosis liegt bei den meisten Tumoren ungefähr bei 60 Gy. Die Belastbarkeit des gesunden Gewebes und des Organismus zwingen aber zu einer Fraktionierung. So wird die Gesamtdosis in Einzeldosen von 2 bis 3 Gy fraktioniert verabreicht.

Akute Nebenwirkungen der Strahlentherapie sind Beschwerden und Organreaktionen, die während oder im Anschluss an die Radiotherapie auftreten. Sie treten aufgrund der Dosisfraktionierung relativ selten auf und hängen von vier Faktoren ab (Achenbach, 1997):

- dem bestrahlten Volumen,
- der Einzel- und Gesamtdosis,
- der Gesamtdauer der Bestrahlung und
- den im Bestrahlungsfeld liegenden Organen.

Am häufigsten sind entzündliche Reaktionen im Bereich des Bestrahlungsfeldes wie zum Beispiel Hautreaktionen in Form von akuten Erythemen und Hautläsionen, Mundschleimhautdefekte, Strahlenpneumonitis, radiogene Enteritis und Strahlenproktitis.

Spätfolgen der Bestrahlung können erst Monate oder Jahre nach der Therapie auftreten. Sie sind meistens durch eine Schädigung des Gefäßbindegewebes bedingt wie zum Beispiel im Bereich der Lunge die Lungenfibrose und im Abdomen Darmstrikturen. Am Auge kann es zum Auftreten eines sogenannten Bestrahlungsstar, einer Linsentrübung, kommen. Bei Kindern muss besonders beachtet werden, dass das Mitbestrahlen der kindlichen Wachstumsfugen zu Wachstumsstörungen führen kann.

1.4 Kombinationstherapie

Wie oben schon beschrieben ist bei der Tumorbekämpfung ein multimodales Vorgehen wichtig. Das Therapiekonzept sollte sich immer nach Art, Größe, Ausbreitung und Lokalisation des Tumors aber auch nach schon gesammelten Erfahrungen über verschiedene Therapieschemata richten. Entsprechend der Tumorzellheterogenität erfordert die Tumorbehandlung den Einsatz verschiedener Behandlungsstrategien wie Strahlungs-therapie, Chirurgie, Chemotherapie, Hormontherapie und Immuntherapie. So wurde die Tumorchemotherapie in den 50er Jahren noch meist in Form von einer Monotherapie mit schlechten Ergebnissen durchgeführt. Mit dem Konzept der Polychemotherapie Mitte der 60er Jahre wurden die Langzeittherapieergebnisse deutlich besser (Achenbach, 1997). Zur Optimierung der Therapieergebnisse werden für die jeweiligen Tumorstadien Behandlungsschemata basierend auf klinischen Studien vorgeschlagen. Neben dem ständigen Erfahrungsaustausch über interdisziplinäre Grenzen hinaus ist eine fortwährende Erforschung neuer Medikamente und Kombinationsmöglichkeiten, sowohl verschiedener Wirkstoffe als auch Therapien, nötig um die Ergebnisse für den Patienten zu verbessern.

1.5 Der *in vitro* Mikrokerntest

Der *in vitro* Mikrokerntest ist ein etablierter Test zur Messung chromosomaler DNA-Schäden (Miller, et al., 1998; Stopper und Müller, 1997). Dieser Test lässt eine schnelle

und einfache Analyse von gentoxischen Effekten zu und erlaubt die Untersuchung von verschiedenen gewebespezifischen humanen Zelllinien wie auch Säugertierzelllinien.

Mikrokerne sind Strukturen, die Chromatin enthalten und von einer eigenen Membran ohne Verbindung zum Zellkern umgeben sind (Schiffmann und DeBoni, 1991). Sie werden während der Zellteilung durch Ausschluss von ganzen Chromosomen oder Chromatinfragmenten aus dem Zellkern als Endpunkt der gentoxischen Schädigung gebildet. Mikrokerne können durch unterschiedliche DNA-Färbungen dargestellt werden und ihre Frequenz mikroskopisch durch Auszählen oder mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden (Nüsse, et al., 1994). Sie weisen eine ausgesprochen große Ähnlichkeit zum Zellkern auf (Schiffmann und DeBoni, 1991). Die DNA Menge in den Mikrokernen hängt ab von der Chromosomenschädigung, der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt des Mikrokernnachweises und ob sie ganze Chromosomen oder nur Chromatinfragmente enthalten (Nüsse, et al., 1992). Es ist auch bekannt, dass hohe Behandlungsdosen zu Mikrokernen mit vielen Chromatinfragmenten führen können und der Wirkungsmechanismus der verwendeten Substanz nicht unbedingt mit der Größe der Mikrokerne in Verbindung gebracht werden kann (Stopper und Müller, 1997). Da alle Mikrokerne zum Zeitpunkt des aktuellen DNA-Schadens während der Mitose entstehen, gibt die Zeitspanne des ersten Auftretens von Mikrokernen Aufschluss über die Wirkungsweise und in welcher Phase des Zellzyklus die verwendete Substanz wirkt. So kommt es bei der Störung der Ausbildung des Spindelapparates in der Mitose zu einem frühen Auftreten von Mikrokernen (Stopper, et al., 1994), bei Störungen in der G1 Phase des Zellzyklus zu einem sehr viel späteren Auftreten von Mikrokernen (Fenech und Neville, 1992). Das Auftreten von Mikrokernen scheint aber auch von DNA Reparaturmechanismen beeinflusst zu werden. Es wurde gezeigt, dass Reparatur-Inhibitoren selbst die Bildung von Mikrokernen induzieren (Shaeff, et al., 1991). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen Zellalterung, Reparaturvermögen und der Frequenz von Mikrokernen in menschlichen Fibroblastenzellen gefunden (Weirich-Schwaiger, et al., 1994). Mikrokerne sind auch in der Lage DNA zu bilden (Das, 1962; Kramer, et al., 1990). Aber es ist noch nicht geklärt, ob diese genetische Information von der Zelle verwertet werden kann.

Erhöhte Mikrokernfrequenzen in präkanzerogenem Gewebe (Garewal, et al., 1993; Herens, et al., 1995; Rosin, 1993) und der Zusammenhang zwischen Mikrokernfrequenz und der Malignität von Zellen lassen darauf schließen, dass die Bildung von Mikrokernen ein wichtiger Prozess in der Kanzerogenese von Tumoren sein könnte. Diese Annahme wird durch eine Studie von Van Goethem *et al.* (Van Goethem, et al., 1993) unterstützt. Dabei wurden Rattenhepatozyten in verschiedenen Stadien der Kanzerogenese von Leberzellkarzinomen isoliert und die jeweiligen Mikrokernfrequenz bestimmt, die die genetischen Veränderungen während der Karzinogenese widerspiegeln.

Es wird auch diskutiert, dass Mikrokerne bei der Beseitigung von genetischen Schäden eine wichtige Rolle spielen. So hat Von-Hoff et al. (Von-Hoff, et al., 1992) in menschlichen Tumorzellen Onkogene, die mit einer schlechten Prognose einher gehen, oft in Form von extrachromosomalen Strukturen gefunden. Die Elimination solcher Strukturen könnte durch Mikrokerne beschleunigt werden (Stopper und Müller, 1997).

Der Endpunkt Mikrokerne erwies sich für Kombinationsbehandlungen als ein geeigneter Test für die Analyse nicht-additiver Effekte (Stopper, et al., 2000). Zusätzlich können auch verschiedene Zelltypen analysiert werden, was einen Hinweis auf den Behandlungserfolg verschiedener Tumortypen geben könnte.

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit Paclitaxel eine Strahlensensibilisierung oder eine Strahlenresistenz bewirkt. Eine erhöhte Strahlensensibilisierung wäre dann ein Hinweis auf einen besseren Behandlungserfolg der Kombinationstherapie (Paclitaxel und Bestrahlung) als bei der jeweiligen Monotherapie von Tumoren. Eine Strahlensensibilisierung würde durch eine synergistische Wirkung von Paclitaxel und ionisierenden Strahlen induziert werden. Eine weitere wichtige Frage ist, ob synergistische Effekte vom Zelltyp bzw. Tumortyp abhängig sind. Um diese Fragen zu beantworten, wurden fünf Tumorzelllinien sowohl einer Einzelbehandlung mit Paclitaxel und Strahlung als auch verschiedenen

Kombinationsbehandlungen dieser beiden Behandlungsformen unterzogen und die Bildung von Mikrokernen als Maß für den gentoxischen Effekt der jeweiligen Behandlung gemessen.

Da der *in vitro* Mikrokerntest ein empfindlicher Indikatortest für Spindelgifte wie Paclitaxel und Klastogene wie ionisierende Strahlung ist, wurde dieser Test als einfaches und schnelles System zur Messung von additiven bzw. nicht-additiven Effekten von Paclitaxel und Strahlung verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Berlin
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus B5060 EK/CO ₂ , Heraeus, Hanau
Coulter Counter	Modell N Industry, Coulter Electronics, Luton, Großbritannien
Fluoreszenz-Mikroskop	Labophot 2A/2 Nr. 519437, Nikon GmbH, Düsseldorf
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Sterile Werkbank	Laminar Air Flow, Gelaire BH 26, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Zentrifuge	Hettich Universal/K2S, Hettich, Tuttlingen; Sorvall RC 5B Plus, Sorvall Newton, Conneticut, USA
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, Astmoor, England

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner (Nürtingen), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) erworben. Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert (0,2 µm). Hochreines Wasser wurde der hauseigenen Reinstwasser Anlage entnommen (Millipore System).

2.1.3 Zelllinien

- Maus-Lymphom-Zellen L5178Y tk+/- (Klon 3.7.2C; MoLy) (Clive, et al., 1972) wurden von Dr. W. J. Caspary, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA zur Verfügung gestellt.
- Lungenfibroblasten-Zelllinie des Chinesischen Hamsters V79 (V79) wurden von Dr. D. Wild, Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.
- Zervixplattenepithel-Karzinom-Zellen des Menschen HeLa S3 (HeLa) wurden erworben von American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- Brustadenokarzinom-Zellen des Menschen MCF-7 wurden erworben von American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- Lungenkarzinom-Zellen des Menschen A549 wurden erworben von American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

MoLy Zellen wurden in Suspensionskultur in RPMI 1640 mit 10 % Pferdeserum (hitzeinaktiviert) (v/v), Antibiotika, Natrium-Pyruvat und L-Glutamin gehalten. Kulturmedium für V79 und HeLa Zellen war MEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika. MCF-7 wurden in RPMI 1640 mit 5 % FCS und Antibiotika gehalten. A549 wurden in Ham's F12K mit 10 % FCS ernährt. Alle Zellen wurden bei 37 °C / 5 % CO₂ kultiviert.

Alle Zelllinien, bis auf MoLy, wachsen adherent und wurden mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen gewonnen.

2.2.2 Bestimmung von Mikrokernen

In diesem Test wird die Induktion von Mikrokernen durch DNA-schädigende Wirkungen zur mikroskopischen Quantifizierung genutzt. Mikrokerne liegen vom Kern separiert im Zytoplasma, besitzen eine intakte Kernmembran und enthalten Chromatin

(Stopper und Müller, 1997). Voraussetzung für die Methode des Mikrokerntests ist, dass die Morphologie des Zellkerns eine Unterscheidung zwischen einer Kerndeformation und einem Mikrokern zulässt und nicht übermäßig häufig fragmentierte oder apoptotische Kerne vorhanden sind. Mikrokern kommen auch spontan vor. Ihre Häufigkeit ist unter bestimmten Umständen aber erhöht, wie zum Beispiel bei Präkanzerosen, Tumoren, nach Kontakt mit bestimmten Xenobiotika.

Lösungen:	Soerensen-Puffer	33mM Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O, pH 6,8 34mM KH ₂ PO ₄
	Färbelösung	67,5 ml Soerensen-Puffer 4,5 ml 0,1 % (v/v) Acridinorange
	Bisbenzimid, Nr. 33258	1 mg/ml in DMSO
	Bisbenzimid Färbelösung	99,5 ml PBS/CMF 0,5 ml Bisbenzimid

Zur Bestimmung der Mikrokernfrequenz wurden suspendierte Zellen mit einer Zytocentrifuge (110 x g, 5 min) auf Objektträger aufgebracht und mit Methanol bei -20 °C für mindestens eine Stunde fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid Nr. 33258). Die Objektträger wurden in 5µg/ml Bisbenzimid für 5 min getaucht und anschließend drei mal mit PBS/CMF gewaschen und für die Mikroskopie mit einem Eindeckmittel eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit 500-facher Vergrößerung. Mikrokern werden definiert als Strukturen, die deutlich getrennt vom Zellkern liegen, eine Größe von weniger als ¼ des Zellkerns aufweisen, rund oder oval sind und eine dem Kern vergleichbare Färbung haben. Zur Quantifizierung der Mikrokern werden von je zwei Objektträgern 1000 Kerne gezählt und jeweils die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen als Mittelwert angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrokerninduktion in Kulturzellen

Der Mikrokerntest wurde mit fünf Säugetierzelllinien durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde die geeignete Paclitaxelkonzentration und Strahlendosis für die Kombinationsversuche in vorher einzeln durchgeführten Experimenten ermittelt. Für die Bestimmung der Mikrokernrate in Abhängigkeit von der Paclitaxelkonzentration wurden die exponentiell wachsenden Zellen mit jeweils verschiedenen Paclitaxelkonzentrationen (gelöst in DMSO, maximale DMSO Endkonzentration 1 %) für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Paclitaxel durch Mediumwechsel entfernt, die Zellen zur Schadensexpression weiter kultiviert (Erholungs-/Expressionszeit) und dann geerntet. Das Zellwachstum wurde zu Versuchsbeginn, nach der Behandlung mit Paclitaxel und zum Zeitpunkt der Ernte bestimmt. Zur Bestimmung der Mikrokernrate in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis wurden die Zellen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen durch ein Caesa-Gammatron-1-Gerät behandelt, zur Schadensexpression weiter kultiviert und dann geerntet. Das Zellwachstum wurde zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der Ernte bestimmt. Die jeweiligen Konzentrationen für die Kombinationsversuche wurden so ausgewählt, dass eine ausagefähige Mikrokernrate induziert wurde, dabei die Zellen aber nicht zu geschädigt waren und eine sichere Auszählung der Mikrokernrate noch möglich war.

Die Erholungszeit richtete sich nach der Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie. Sie wurde so gewählt, dass die Zellen genügend Zeit hatten, sich zu vermehren und dabei Mikrokernrate zu bilden. Um diese Zeit bestimmen zu können, wurde zunächst die Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinien ermittelt. Hierzu wurden zu Beobachtungsbeginn sieben bzw. acht Kulturflaschen mit einer jeweils identischen Zelldichte in den Brutschrank gestellt. Es wurden dann im weiteren Verlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils eine Flasche auf ihre Zelldichte hin überprüft und verworfen. Aus den ermittelten Werten ergaben sich Kurvenverläufe, sogenannte Wachstumskurven, aus denen sich die Verdopplungszeit bestimmen lässt (Tab. 1).

Tabelle 1. Verdopplungszeit und daraus abgeleitete Erholungszeit im Mikrokerntests.

Zelllinie	Verdoppelungszeit	Erholungszeit
MoLy	10 Stunden	15 Stunden
V79	24 Stunden	20 Stunden
HeLa	30 Stunden	20 Stunden
MCF-7	48 Stunden	48 Stunden
A549	50 Stunden	48 Stunden

3.1.1 Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Maus Lymphom Zellen L5178Y (MoLy)

Die Maus-Lymphom-Zellen wurden in einer Dichte von 150000 Zellen/ml mit Paclitaxelkonzentrationen von 0-5-10-50-100-1000 nM behandelt bzw. mit Dosen von 1-2-4-6-8 Gy bestrahlt (Abb. 1). Die Erholungsphase betrug 15 Stunden. Die Mikrokernfrequenz war sowohl durch Paclitaxelbehandlung als auch durch Strahlung dosisabhängig erhöht, wobei die unbehandelten Zellen 1 Mikrokern / 1000 Kernen zeigten und die maximale Mikrokerninduktion bei Paclitaxel bei 21 Mikrokernen / 1000 Kernen und bei Bestrahlung bei 430 Mikrokernen / 1000 Kernen lag (Abb. 1).

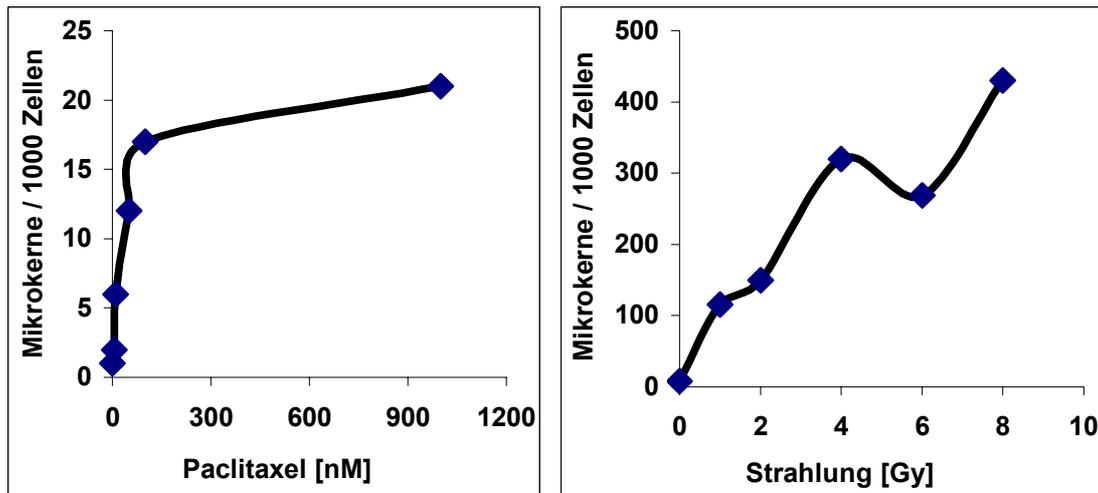


Abb. 1. Dosis-abhängige Mikrokerninduktion in MoLy Zellen. Gezeigt sind die induzierten Mikrokerne / 1000 Kerne als Durchschnitt einer Doppelbestimmung. Zellen wurden mit ansteigenden Dosen an Paclitaxel (nM) für vier Stunden behandelt (linke Graphik) bzw. mit steigenden Dosen (Gy) bestrahlt (rechte Graphik).

3.1.2 Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Lungenfibroblasten-Zellen des Chinesischen Hamsters V79

Die Lungenfibroblasten-Zellen V79 wurden in einer Dichte von 110000 Zellen/ml mit Paclitaxelkonzentrationen von 5-10-50-100-500 nM behandelt (Abb. 2). Im Bestrahlungsversuch wurden sie mit Dosen von 1-2-4-6-8 Gy bestrahlt (Abb. 2). Die Erholungsphase betrug 20 Stunden. Die Mikrokernfrequenz war sowohl durch Paclitaxelbehandlung als auch durch Strahlung dosisabhängig erhöht, wobei die unbehandelten Zellen 8 Mikrokern / 1000 Kernen hatten und die maximale Mikrokerninduktion bei Paclitaxel bei 26 Mikrokernen / 1000 Kernen und bei Bestrahlung bei 61 Mikrokernen / 1000 Kernen lag (Abb. 2).

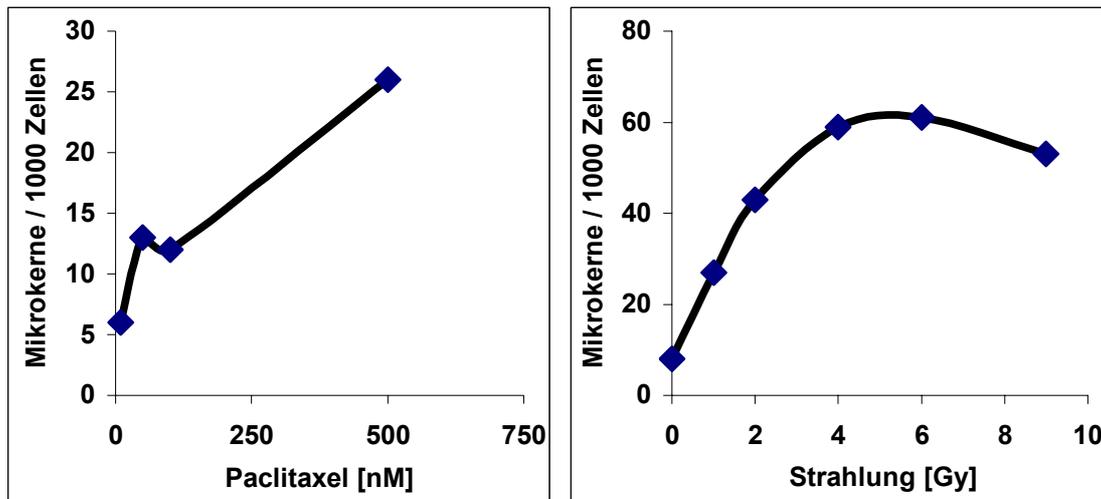


Abb. 2. Dosis-abhängige Mikrokerninduktion in V79 Zellen. Gegeben sind die induzierten Mikrokerne / 1000 Kerne als Durchschnitt einer Doppelbestimmung. Zellen wurden mit ansteigenden Dosen an Paclitaxel (nM) für vier Stunden behandelt (linke Graphik) bzw. mit steigenden Dosen (Gy) bestrahlt (rechte Graphik).

3.1.3 Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei Zervixplattenepithelkarzinom-Zellen des Menschen HeLa

Die Zervixplattenepithelkarzinom-Zellen HeLa wurden in einer Dichte von 110000 Zellen/ml mit Paclitaxelkonzentrationen von 5-10-50-100-500 nM behandelt. Im Bestrahlungsversuch wurden sie mit Dosen von 1-2-4-6-8 Gy bestrahlt. Die Erholungsphase betrug 20 Stunden. Die Mikrokernfrequenz war sowohl durch Paclitaxelbehandlung als auch durch Strahlung dosisabhängig erhöht, wobei die unbehandelten Zellen 16 Mikrokerneln / 1000 Kernen hatten und die maximale Mikrokerninduktion bei Paclitaxel bei 170 Mikrokerneln / 1000 Kernen und bei Bestrahlung bei 96 Mikrokerneln / 1000 Kernen lag (Abb. 3).

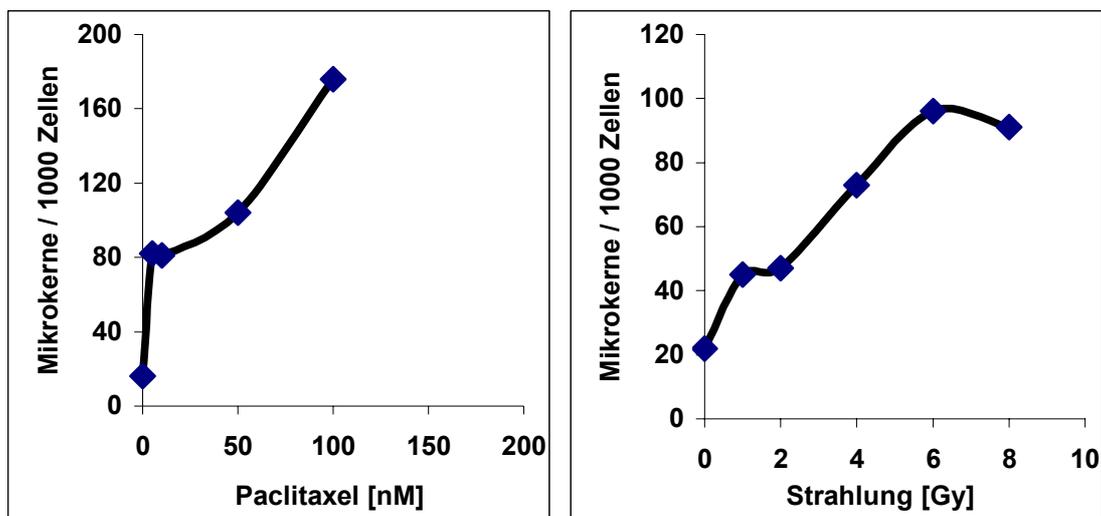


Abb. 3. Dosis-abhängige Mikrokerninduktion in HeLa Zellen. Gegeben sind die induzierten Mikrokerne / 1000 Kerne als Durchschnitt einer Doppelbestimmung. Zellen wurden mit ansteigenden Dosen an Paclitaxel (nM) für vier Stunden behandelt (linke Graphik) bzw. mit steigenden Dosen (Gy) bestrahlt (rechte Graphik).

3.1.4 Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung bei humanan Brustadenokarzinom-Zellen MCF-7

Die Brustadenokarzinom-Zellen MCF-7 wurden in einer Dichte von 300000 Zellen/ml angesetzt. Nach zwei Tagen erfolgte Mediuemwechsel und die Zellen wurden am dritten Tag mit Paclitaxelkonzentrationen von 5-10-50-100-500 nM behandelt bzw. mit Dosen von 1-2-4-6-8 Gy bestrahlt (Abb. 4). Die Erholungsphase betrug 48 Stunden. Die Mikrokernfrequenz war sowohl durch Paclitaxelbehandlung als auch durch Strahlung dosisabhängig erhöht, wobei die unbehandelten Zellen 20 Mikrokernen / 1000 Kernen hatten und die maximale Mikrokerninduktion bei Paclitaxel bei 201 Mikrokernen / 1000 Kernen und bei Bestrahlung bei 96 Mikrokernen / 1000 Kernen lag (Abb. 4).

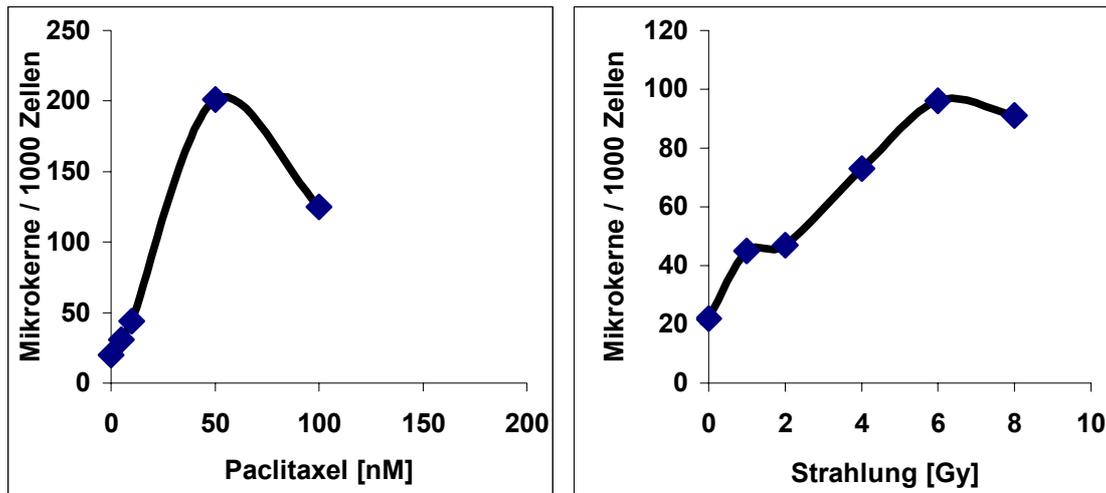


Abb. 4. Dosis-abhängige Mikrokerninduktion in MCF-7 Zellen. Gegeben sind die induzierten Mikrokerne / 1000 Kerne als Durchschnitt einer Doppelbestimmung. Zellen wurden mit ansteigenden Dosen an Paclitaxel (nM) für vier Stunden behandelt (linke Graphik) bzw. mit steigenden Dosen (Gy) bestrahlt (rechte Graphik).

3.1.5 Dosisabhängigkeit von Paclitaxel und Bestrahlung in humanen Lungenkarzinom-Zellen A549

Die Lungenkarzinom-Zellen A549 wurden am Vortag in einer Dichte von 100000 Zellen/ml angesetzt. Die Zellen wurden dann mit Paclitaxelkonzentrationen von 5-10-50-100-500 nM behandelt. Im Bestrahlungsversuch wurden sie mit Dosen von 1-2-4-6-8 Gy bestrahlt (Abb. 5). Die Erholungsphase betrug 48 Stunden. Die Mikrokernfrequenz war sowohl durch Paclitaxelbehandlung als auch durch Strahlung dosisabhängig erhöht, wobei die unbehandelten Zellen 27 Mikrokernen / 1000 Kernen hatten und die maximale Mikrokerninduktion bei Paclitaxel bei 189 Mikrokernen / 1000 Kernen und bei Bestrahlung bei 189 Mikrokernen / 1000 Kernen lag (Abb. 5).

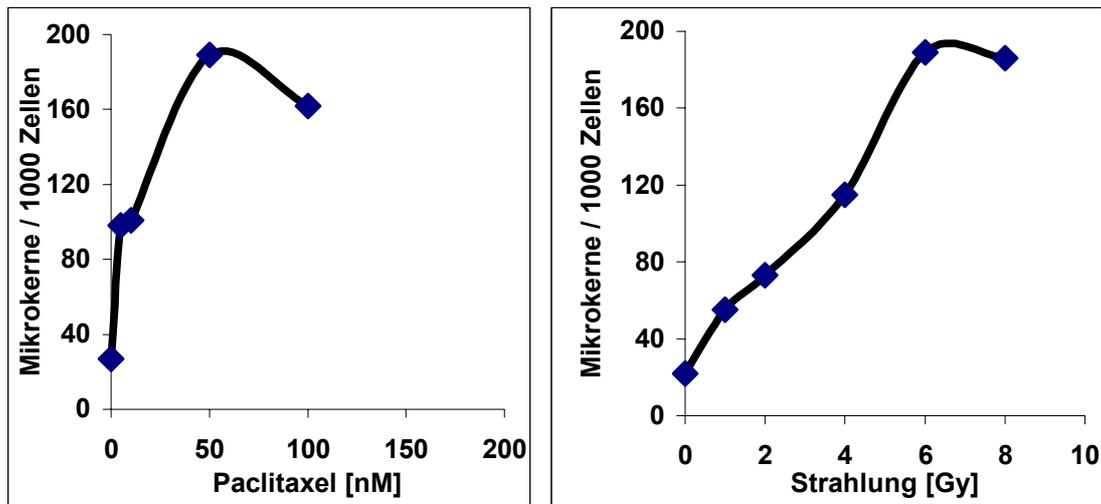


Abb. 5. Dosis-abhängige Mikrokerninduktion in A549 Zellen. Gegeben sind die induzierten Mikrokerne / 1000 Kerne als Durchschnitt einer Doppelbestimmung. Zellen wurden mit ansteigenden Dosen an Paclitaxel (nM) für vier Stunden behandelt (linke Graphik) bzw. mit steigenden Dosen (Gy) bestrahlt (rechte Graphik).

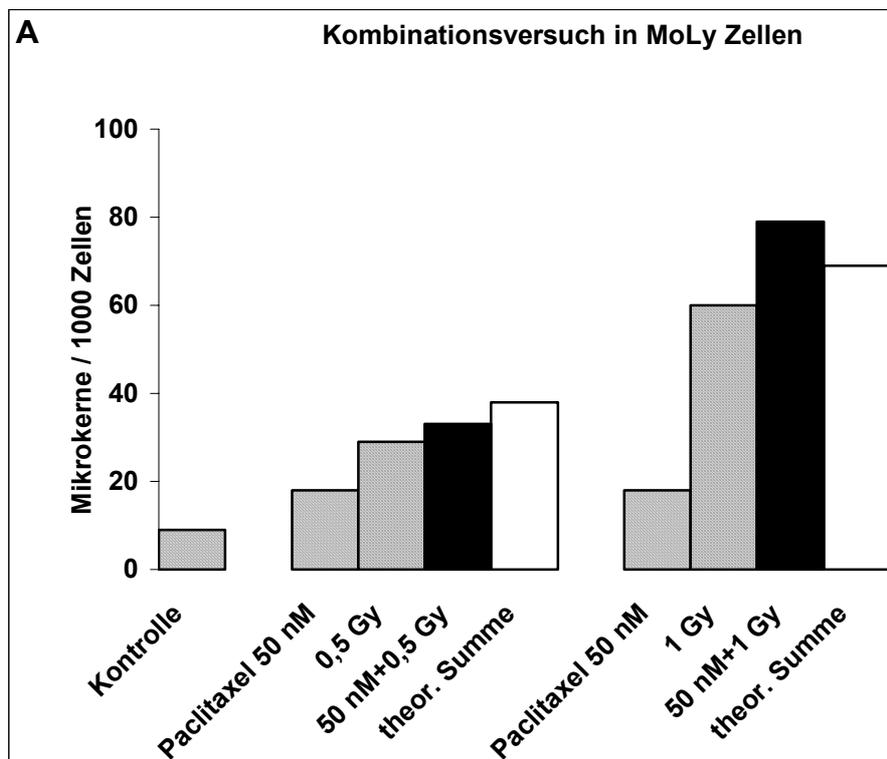
3.2 Mikrokerninduktion bei Kombination von Paclitaxel und Strahlung

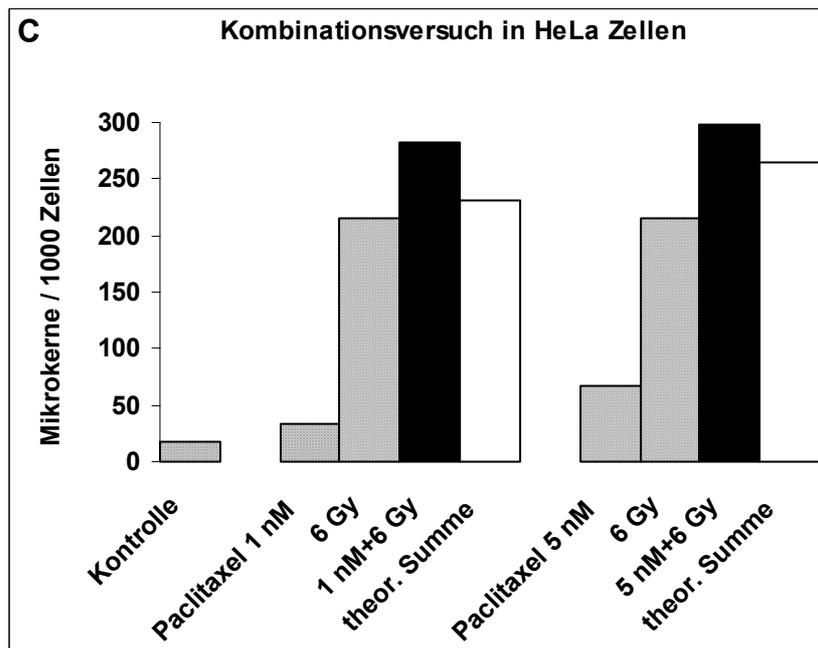
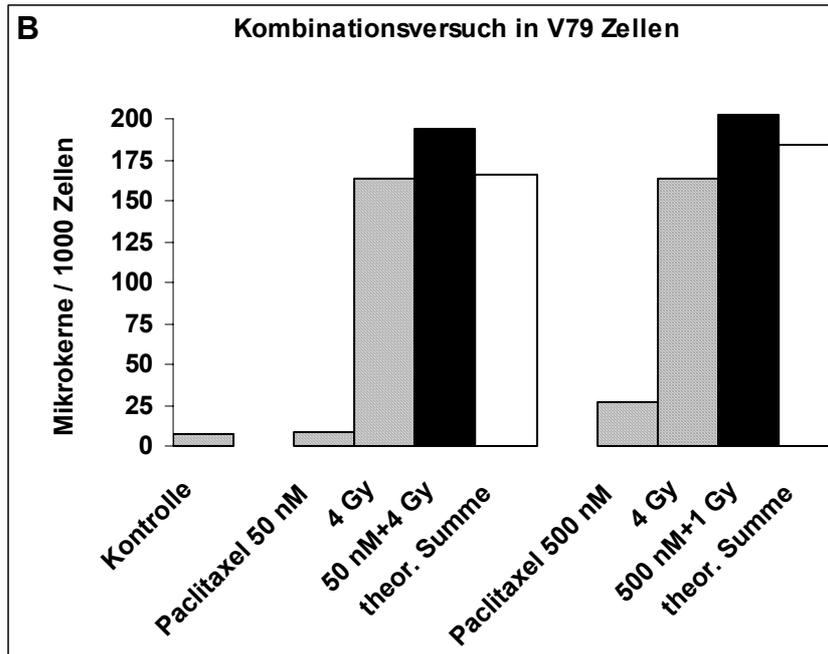
Um eine eventuelle zelltypabhängige Radiosensibilisierung von Paclitaxel zu testen, wurden die verschiedenen Säugertierzellen zuerst mit Paclitaxel für vier Stunden vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Anhand der Ergebnisse der vorausgegangenen Experimente mit Einzelbehandlungen wurden die Behandlungsdosen für die Kombinationsversuche und die Erholungszeit für die jeweilige Zelllinie ausgewählt (Tab. 2).

Tabelle 2. Versuchsbedingung für die Kombination Strahlung und Paclitaxel im Mikrokerntest.

Zelllinie	Paclitaxel Konzentration [nM]	Bestrahlung Dosis [Gy]	Erholungs- zeit [h]
L5178Y	50	0,5, 1	15
V79	50, 500	4	16
HeLa	1, 5	6	16
MCF-7	25, 100	2	42
A549	2,5, 5	2	48

In Abbildung 6 ist jeweils die Mikrokernelinduktion für die Einzelbehandlung (nM Paclitaxel bzw. Gy Bestrahlung) sowie für die Kombinationsbehandlung (nM + Gy) angegeben. Zusätzlich ist die theoretische Addition der kontrollbereinigten Mikrokernelinduktion gezeigt.





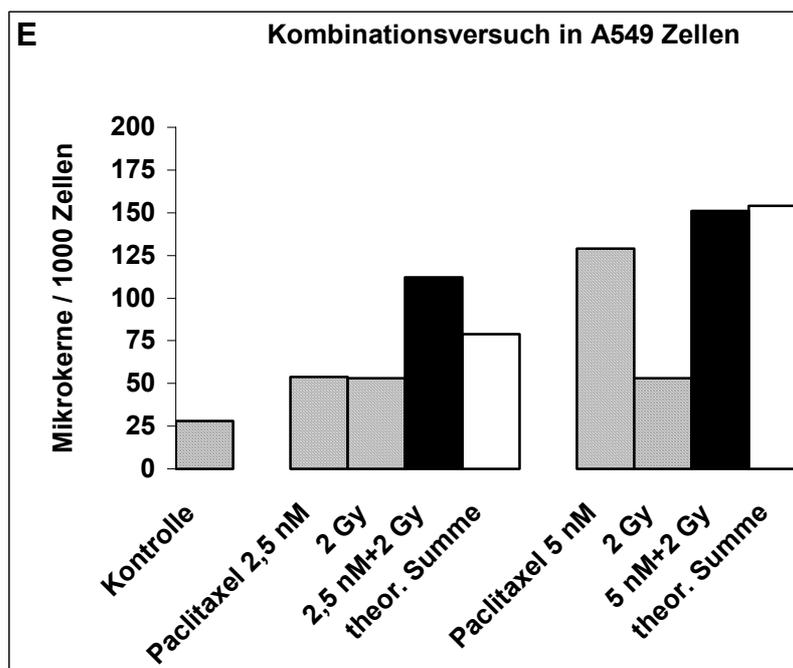
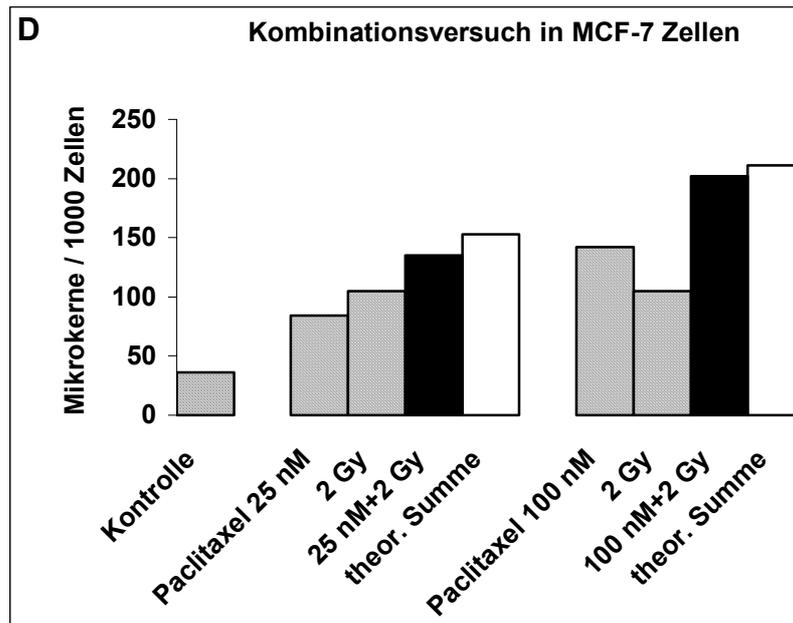


Abb. 6. Mikrokerninduktion durch eine Kombination von Paclitaxel und Bestrahlung in MoLy (A), V79 (B), HeLa (C), MCF-7 (D) und A549 (E) Zellen. Gezeigt ist die unbehandelte Kontrolle und jeweilige Einzelbehandlung (graue Streifen), die Kombinationsbehandlung (schwarz) und die theoretische, kontrollbereingte Addition der Einzelbehandlungen (weiß).

Bei den gewählten Kombinationsbehandlungen zeigte sich für die MoLy und V79 sowie die humanen HeLa und MCF-7 Zellen nur geringe Abweichungen zwischen Kombinationsbehandlungen und der theoretischen Summe der Einzelbehandlungen (Abweichungen < 15%). Jedoch zeigten die humanen Lungenkarzinomzellen A549 einen deutlicheren nicht-additiven Effekt (Abb. 6 E). Bei einer Vorbehandlung mit 2,5 nM Paclitaxel und Bestrahlung mit 2 Gy von A549 Zellen zeigte die Kombinationsbehandlung eine Mikrokerninduktion, die um mehr als 30 % über der theoretischen Summe der Einzelbehandlung lag.

Für alle Zelllinien wurden mindestens drei Wiederholungsexperimente durchgeführt, die jedoch nicht identisch waren (s. Anhang Kapitel 8). Insgesamt zeigte sich über alle Experimente hinweg keine reproduzierbare deutliche Abweichung der Kombinationsbehandlung von der theoretischen Summe der Einzelbehandlungen, was auf eine additive Mikrokerninduktion der Kombination Paclitaxel und Bestrahlung hindeutet. Um ein besseres Maß für die Schwankungen zwischen den Experimenten zu bekommen, wurde mit den MoLy Zellen identische Wiederholungsexperimente durchgeführt. Die gleichen Behandlungen, wie in Tabelle 2 und Abbildung 6 A gezeigt, wurden dreimal unter identischen Bedingungen wiederholt. Zur Analyse der Daten wurde der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung berechnet (Tab. 3).

Tabelle 3. Mikrokerninduktion durch eine Kombination von Paclitaxel und Bestrahlung in MoLy Zellen.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen^a
Kontrolle	10 ± 5,7
50 nM Paclitaxel	16 ± 4,3
0,5 Gy Strahlung	37 ± 8,3
50 nM Paclitaxel + 0,5 Gy Strahlung	38 ± 5,4
<i>Theoretische Summe</i>	43
1 Gy Strahlung	60 ± 0,6
50 nM Paclitaxel + 1 Gy Strahlung	80 ± 10
<i>Theoretische Summe</i>	66

^a Der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die experimentellen Schwankungen waren im Bereich der Abweichung der Summe der Einzelbehandlungen von der Kombinationsbehandlung, wodurch sich auch hier keine signifikante Abweichung von der Additivität bestimmen ließ. Die Daten im Ganzen deuten damit auf einen additiven Effekt der Kombination von Paclitaxel und Strahlung bezüglich Mikrokerninduktion in den fünf benutzten Zelllinien hin.

4 Diskussion

Paclitaxel wird als neoplastisches Medikament gegen eine Vielzahl von Tumoren eingesetzt (Arbruck und Blaylock, 1995; Rowinsky, et al., 1990; Runowicz, et al., 1993). Seine Wirkung beruht auf einer Störung der Reorganisation der Mikrotubuli des Zytoskeletts, was eine Störung der Zellteilung und einen Arrest in der G2- und in der Mitose-Phase des Zellzyklus (G2/M Block) bewirkt (Horwitz, 1994; Rowinsky, et al., 1990). Dieser G2/M Block wird schon bei niedriger Konzentration und geringer Behandlungsdauer von Paclitaxel erreicht. Da Zellen mit einem G2/M Zellzyklusarrest sensitiv gegenüber Strahlung sind, wurde eine mögliche Strahlensensibilisierung durch Paclitaxel in zahlreichen Studien untersucht (Sinclair, 1968; Tishler, et al., 1992b).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine mögliche Radiosensibilisierung von Paclitaxel in verschiedenen tumorigenen Säugierzelllinien nachzuweisen. Andere Studien haben in verschiedenen Zelllinien eine ähnliche Fragestellung, mit dem Endpunkt Zelltod zu beantworten versucht (Choy, et al., 1993; Liebmann, et al., 1994; Steren, et al., 1993; Tishler, et al., 1992a; Tishler, et al., 1992b). Die gentoxische Wirkung einer Kombination von Paclitaxel und Strahlung wurde jedoch noch nicht systematisch untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit der Mikrokerntest als ein einfaches und valides Testsystem für die Messung von gentoxischen Schäden durch Paclitaxel und ionisierender Strahlung benutzt (Miller, et al., 1998; Stopper und Mueller, 1997).

Da der Erfolg einer Tumorthherapie auch von der Art des Tumors, d.h. der Art des transformierten Zelltyps abhängt, wurden für diese Untersuchungen verschiedene Tumorzelllinien benutzt. Mögliche Unterschiede der Kombinationsbehandlung, die einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden können, könnten dann möglicherweise einen Hinweis auf den Behandlungserfolg des entsprechenden Tumortyps geben. Bevor eine Kombinationsbehandlung durchgeführt werden konnte, wurden zuerst geeignete Konzentrationen von Paclitaxel und Bestrahlungsdosen bestimmt. Die durch Paclitaxel und Strahlen induzierte Mikrokernbildung wurde in verschiedenen humanen und Säugertumorzelllinie untersucht. Dabei konnte eine zelltypabhängige Mikrokerninduktion festgestellt werden. So zeigten Maus-Lymphom Zellen eine stark erhöhte Mikrokernrate schon bei weniger als 100 nM Paclitaxel, wohingegen in V79

Zellen dies erst bei 500 nM auftrat. Die humanen Cervixkarzinom- und Lungenkarzinomzelllinien HeLa und A549 zeigten eine noch stärkere Empfindlichkeit gegenüber Paclitaxel, wohingegen die Brustkrebszellen MCF-7 ähnlich empfindlich wie MoLy Zellen waren.

Die Relevanz einer zelllinienabhängigen Sensitivität gegenüber Zytostatika wie Paclitaxel und ionisierender Strahlung spiegelt sich auch im Therapieerfolg verschiedener Tumore wider. Die unterschiedliche Strahlensensibilität von Tumoren kann ihre molekulare Grundlage in der Mutation von zellzyklusregulierenden Genen wie p53 oder des sogenannten Ataxia telangiectasia (AT) -Gens haben. Charakteristisch für die AT ist eine Hypersensitivität gegenüber Strahlung und eine erhöhte Krebsinzidenz. Diese Strahlenempfindlichkeit beruht auf der Mutation eines Gens, des AT mutierten Gens (ATM), welches für ein Protein kodiert, das den Zellzyklus kontrolliert (Kastan, et al., 1995; Kastan, et al., 1992). Zellen von AT-Patienten oder genetisch modifizierte Zellen, die das ATM Gen tragen, zeigen eine Dysregulierung der p53 vermittelten Zellzykluskontrolle, was zu verminderter DNA Reparatur und fehlender Eliminierung von mutierten Zellen führt (Kastan, et al., 1992). Zusätzlich weisen diese Zellen auch eine erhöhte Induktionsrate in Tests, die DNA Bruch messen auf (Antocchia, et al., 1997; Rüniger, et al., 1992). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass abhängig von der Art des Zell- bzw. Tumortyps die Suszeptibilität gegenüber potentiellen Mutagenen oder Medikamenten individuell definiert werden muss.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelllinien Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Paclitaxel oder Bestrahlung aufweisen. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob eine Kombinationsbehandlung von Paclitaxel und Bestrahlung eine erhöhte oder verminderte Schädigung in Abhängigkeit vom Zelltyp bewirken könnte. Um eine potentielle Radiosensibilisierung (synergistischer Effekt) oder die Induktion einer Radioresistenz (antagonistischer Effekt) detektieren zu können, wurden die Zellen zuerst mit Paclitaxel behandelt und anschließend bestrahlt. Die Ergebnisse in Maus-Lymphom Zellen, humanen Cervix-Karzinom und Fibroblasten des chinesischen Hamsters V79 zeigten eine additive Mikrokerninduktion bei einer Kombinationsbehandlung. Andere Arbeiten zeigten ebenso einen additiven Effekt von Paclitaxel und Strahlung in humanen Cervixkarzinomzellen und der Lungenkarzinomzelllinie A549 (Geard und Jones, 1994; 28

Geard, et al., 1993; Liebmann, et al., 1994). Im Gegensatz dazu wurde für humane Ovarialkarzinomzellen und die Brustkrebszelllinie MCF-7 eine Radiosensibilisierung durch Paclitaxel gefunden (Geard und Jones, 1994; Liebmann, et al., 1994). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten für MCF-7 Zellen keine synergistische Mikrokerninduktion bei Behandlung mit Paclitaxel und Bestrahlung.

Im Gegensatz zu den additiven Effekten in MCF-7 Zellen wurde in dieser Arbeit ein synergistischer Effekt in A549 Zellen in einem Experiment entdeckt. In Wiederholungsexperimenten, bei denen jedoch die Behandlungsdauer und -dosen verändert wurden, konnte jedoch lediglich eine Additivität festgestellt werden. Diese letzteren Ergebnisse sind im Einklang mit publizierten Studien in denen ein additiver Effekt in A549 Zellen gefunden wurde (Liebmann, et al., 1994). Bei dem zuerst durchgeführten Experiment zeigte sich bei Paclitaxel Vorbehandlung und nachfolgender Bestrahlung eine um mehr als 30 % erhöhte Bildung von Mikrokernen verglichen zur Summe der Einzelbehandlungen. Dies würde auf eine Radiosensibilisierung durch Paclitaxel in dieser Lungenkarzinomzelllinie hindeuten. Eine mögliche Erklärung für eine Radiosensibilisierung in A549 Zellen könnte an der weiter oben beschriebenen Induktion eines G2/M-Phasen Arrests der Zellen durch niedrige Konzentrationen von Paclitaxel liegen. Da Zellen eine erhöhte Sensitivität in der G2 und M-Phase des Zellzyklus gegenüber Strahlungsschädigung haben, könnte Paclitaxel auf diesem Wege als Radiosensibilisierer wirken. Bei den Kombinationsbehandlungen mit A549 Zellen wurde bei Paclitaxel Konzentrationen von 2,5 nM eine Radiosensibilisierung detektiert, dieser Effekt war in den Wiederholungsexperimenten, in denen eine höhere Paclitaxelkonzentration von 5 nM verwendet wurde, jedoch nicht mehr beobachtbar. Dies könnte auf eine mögliche Schwellendosis hindeuten, ab der keine Radiosensibilisierung mehr auftritt.

Um zu einer validen Aussage einer möglichen synergistischen Mikrokerninduktion in A549 Zellen durch Paclitaxel und Strahlung zu gelangen, müssten Wiederholungsexperimente mit identischen Versuchsbedingungen durchgeführt werden. Für MoLy Zellen wurden entsprechende identische Wiederholungsexperimente durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass die experimentellen Schwankungen der Mikrokerninduktion durch die Einzelbehandlung mit Paclitaxel bzw. Bestrahlung größer oder gleich der beobachteten Abweichungen von einer Additivität der

Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung und Paclitaxel waren. Dies läßt den Schluss zu, dass in Maus Lymphom Zellen keine Radiosensibilisierung von Paclitaxel auftritt. Ungeklärt bleibt jedoch, ob diese auch auf die anderen getesteten humanen Zelllinien extrapoliert werden kann.

Abschließend kann gesagt werden, dass diese Ergebnisse eine Grundlage für weitere Experimente liefern, um das mögliche Potential von Paclitaxel radiosensibilisierend zu wirken, näher zu untersuchen. In Folgeexperimenten sollten verschiedene Versuchsbedingungen, wie unterschiedliche Behandlungsdauern und niedrigere oder höhere Konzentrationen an Paclitaxel getestet werden. Eine andere mögliche Erklärung für das Fehlen einer eindeutigen Radiosensibilisierung durch Paclitaxel im Mikrokernstest ist, dass dieser Kurzzeit-Gentoxizitätstest möglicherweise ein ungeeigneter Assay für die Fragestellung dieser Arbeit ist. Daher sollten in zukünftigen Studien auch andere gentoxische Endpunkte wie Mutation und chromosomale Aberration (Arni, et al., 1991; Choy, 1996) sowie Zytotoxizität und Zellzyklusmessungen durchgeführt werden. Ein breiteres Spektrum an Endpunkten sowie der Einsatz von Zelllinien mit definiertem Genotyp der Zellzyklusregulatoren wie zum Beispiel Zellen mit dem ATM-Gen oder p53 mutierten Genen, sollte eine bessere Aussage bezüglich des möglichen Einsatzes von Paclitaxel als Radiosensibilisator in der Tumorthherapie erlauben.

5 Zusammenfassung

Paclitaxel wird als antineoplastisches Agens hauptsächlich gegen Ovarial- und Brusttumore eingesetzt. Seine Wirkung beruht auf einer Störung der mikrotubulären Dynamik und Struktur des Zytoskeletts, die einen Arrest der Zelle in der G2- und Mitosephase des Zellzyklus bewirkt. Da Zellen, die in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert sind, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen, könnte Paclitaxel als Strahlensensibilisierer in einer Kombinationstherapie mit Bestrahlung Vorteile in der Tumorthherapie haben. In dieser Arbeit wurden daher die genotoxischen Effekte einer Einzelbehandlung und einer Kombinationsbehandlung von Paclitaxel und Strahlung untersucht. Da eine Tumorthherapie stark von der Art des Tumors abhängt, wurden verschiedene Tumorzelllinien untersucht. Als genotoxischen Endpunkt wurde die Induktion von Mikrokernen *in vitro* gewählt. Der *in vitro* Mikrokerntest ist ein valider und empfindlicher Test, der sensitiv gegenüber Spindelgiften wie Paclitaxel und chromosomenbrechenden Agentien, wie ionisierender Strahlung ist. In der Maus Lymphom Zelllinie L5178Y, den Lungenfibroblasten V79, den humanen Cervixkarzinomzellen HeLa und in den humanen Brustkrebszellen MCF-7 konnte keine Radiosensibilisierung durch Paclitaxel detektiert werden. Die Anzahl der induzierten Mikrokerne lag immer im Bereich der theoretischen Addition der Einzelbehandlung mit Paclitaxel und Bestrahlung. In der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549, die als fünfte Zellreihe untersucht wurde, konnte für eine Kombination von 2,5 nM Paclitaxel und 2 Gy Bestrahlung ein synergistischer Effekt gefunden werden (30 %ige Erhöhung der Mikrokernrate bei Kombinationsbehandlung verglichen mit der Summe der Einzelbehandlungen). Dieser Effekt konnte in Wiederholungsexperimenten, in denen höhere Dosen an Paclitaxel verwendet wurden jedoch nicht reproduziert werden. Insgesamt konnten damit die Ergebnisse des *in vitro* Mikrokerntestes in fünf verschiedenen Zelllinien keine eindeutige Radiosensibilisierung von Paclitaxel zeigen. In Folgestudien sollten daher verschiedene Konzentrationen und Behandlungsdauern von Paclitaxel sowie andere Endpunkte untersucht werden, um eine abschließende

Beurteilung, ob Paclitaxel als zelltypabhängiger Radiosensibilisierer fungieren könnte, zu erlauben.

6 Abkürzungsverzeichnis

A549	Lungenkarzinomzelllinie A549
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
Gy	Gray
h	Stunden
HeLa	Cervixkarzinomzellen HeLa S3
min	Minuten
MCF-7	Brustkrebszelllinie MCF-7
MoLy	Maus Lymphom Zellen L5178Y tk +/-
nM	nanomolar
TNM	Primärtumor, Noduli lymphatici/ lymphogene Metastasierung, hämatogene Metastasierung/ Fernmetastasen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichteinheit (<i>weight</i>) pro Volumeneinheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

Achenbach, W. (1997) Rationale Praxis-Onkologie, Demeter Verlag, Balingen.

Antoccia, A., R. Ricordy, P. Maraschio, S. Prudente und C. Tanzarella (1997) Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines, *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 41-49.

Appendino, G., P. Gariboldi, B. Gabetta et al. (1993) Four new taxanes from the needles of *Taxus baccata*, *Fitoterapia*, 64, 47-51.

Arbruck, S.G. und B.A. Blaylock (1995) Taxol: clinical results and current issues in development, in: M. Suffness (Ed.), *Taxol: Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 379-415.

Arni, P., R. Fahrig, H.R. Glatt, R. Lang, S. Madle, B.L. Pool-Zobel und F.E. Würgler (1991) Genetische Endpunkte, *Bioforum*, 10/91, 376-380.

Choy, H., F.F. Rodriguez, S. Koester et al. (1993) Investigation of taxol as a potential radiation sensitizer, *Cancer*, 71, 3774-3778.

Choy, W.N. (1996) Principles of genetic toxicology, *Drug Chem. Toxicol.*, 19, 149-160.

Clive, D., W.G. Flamm, M.R. Machesko und N.J. Bernheim (1972) Mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.*, 16, 77-87.

Das, H.K. (1962) Synthetic capacities of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material, *J. Cell Biol.*, 15, 121-130.

De Brabander, M., G. Geuens, R. Nuydens et al. (1982) Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 227-240.

Dustin, P. (1980) Microtubules, Sci. Am., 243, 66-76.

Fenech, M. und S. Neville (1992) Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, Environ. Mol. Mutagen., 19(1), 27-36.

Garewal, H.S., L. Ramsey, G. Kaugars und J. Boyle (1993) Clinical experience with the micronucleus assay, J. Cell. Biochem., Suppl. 17F, 206-212.

Geard, C.R. und J.M. Jones (1994) Radiation and taxol effects on synchronized human cervical carcinoma cells, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 29, 565-569.

Geard, C.R., J.M. Jones und P.B. Schiff (1993) Taxol and Radiation, J. Natl. Cancer Inst., 15, 89-94.

Hamel, E., A. del Campo, C. Lowe et al. (1981) Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization, J. Biol. Chem., 256, 11887-11894.

Herens, C., S. Massart, B. Bouzahzah, L. Koulischer und H. Barbason (1995) Nuclear lesions during rat hepatocarcinogenesis II. Measuring the micronuclei during initiation, promotion and progression of rat hepatocarcinogenesis induced with diethylnitrosamine, Mutat. Res., 329, 161-171.

Horwitz, S.B. (1994) Taxol (paclitaxel). Mechanism of action, Ann. Oncol., 5, 53-56.

Kastan, M.B., C.E. Canman und C.J. Leonard (1995) P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, 14, 3-15.

Kastan, M.B., Q. Zhan, W.S. El-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein und A.J. Fornace (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*, 71, 587-597.

Kramer, J., G. Schaich-Walch und M. Nüsse (1990) DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti-BrdUrd antibodies, *Mutagen.*, 5(5), 491-495.

Kumar, N. (1981) Taxol-induced polymerization of purified tubulin: mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 256, 256, 10435-10441.

Liebmann, J., J.A. Cook, J. Fisher et al. (1994) Changes in radiation survival curve parameters in human tumour and rodent cells exposed to paclitaxel (Taxol^R), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 29, 559-564.

Manfredi, J. und S. Horwitz (1984) An antimicotic agent with a new mechanism of action, *Pharmacol. Ther.*, 25, 83-125.

Miller, B., F. Locher, A. Seelbach, H. Stopper, D. Utesch und S. Madle (1998) Evaluation of the *in vitro* micronucleus test (MNT) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay (CA): position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test, *Mutat. Res.*, 410, 81-116.

Nüsse, M., W. Beisker, J. Kramer, B.M. Miller, G.A. Schreiber, S. Viaggi, E.M. Weller und J.M. Wessels (1994) Measurement of micronuclei by flow cytometry, *Methods in Cell Biology*, 42, 149-158.

Nüsse, M., J. Kramer und B.M. Miller (1992) Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(5), 587-602.

Rao, S. und S. Horwitz (1992) A multidrug resistance murine cell line is partially dependent on taxol for growth and has an increased tubulin content, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 33, Abstract 2754.

Rao, S., S. Horwitz und I. Ringel (1992) Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol, *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 785-788.

Roberts, J., E. Rowinsky, R. Donehower et al. (1989) Demonstration of the cell cycle positions for taxol-induced "asters" and "bundles" by measurement of fluorescence, Feulgen-DNA content, and autoradiographic labeling of the same cells, *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 1659-1665.

Rosin, M.P. (1993) Genetic alterations in carcinogenesis and chemoprevention, *Environ. Health Perspect.*, 101(3), 253-256.

Rowinsky, E., L. Cazenave und R. Donehower (1990) Taxol: A novel investigational antineoplastic agent, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1247-1259.

Rünger, T.M., M. Poot und K.H. Kraemer (1992) Abnormal processing of transfected plasmid DNA in cells from patients with ataxia teleangiectasia, *Mutation Res.*, 293, 47-54.

Runowicz, C.D., P.H. Wiernik und A.I. Einzig (1993) Taxol in ovarian cancer, *Cancer*, 71, 1591-1596.

Schiff, P., J. Fant und S. Horwitz (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol, *Nature*, 227, 665-667.

Schiff, P. und S. Horwitz (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1561-1565.

Schiff, P. und S. Horwitz (1981) Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins, *Biochemistry*, 20, 3247-3252.

Schiffmann, D. und U. DeBoni (1991) Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise, *Mutat. Res.*, 246, 113-122.

Shaeff, R., D. Ilsley und R. Kuchta (1991) Mechanism of DNA polymerase a inhibition by aphidicolin, *Biochemistry*, 30, 8590-8597.

Sinclair, W.K. (1968) Cyclic X-ray responses in mammalian cells *in vitro*, *Radiat. Res.*, 33, 620-643.

Steren, A., B. Sevin, J. Perras et al. (1993) Taxol sensitizes human ovarian cancer cells to radiation, *Gynecol. Oncol.*, 48, 252-258.

Stopper, H., I. Eckert, D. Schiffmann, D.L. Spencer und W.J. Caspary (1994) Is micronucleus induction by aneugens an early event leading to mutagenesis?, *Mutagen.*, 9(5), 411-416.

Stopper, H. und S.O. Mueller (1997) Micronuclei as biological endpoint for genotoxicity: A minireview, *Tox. in vitro*, 11, 661-667.

Stopper, H., S.O. Mueller und W.K. Lutz (2000) Supra-additive genotoxicity of a combination of gamma- irradiation and ethyl methanesulfonate in mouse lymphoma L5178Y cells, *Mutagen.*, 15, 235-238.

Tishler, R.B., C.R. Geard, E.J. Hall und P.B. Schiff (1992a) Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation, *Cancer Res.*, 52, 3495-3497.

Tishler, R.B., P.B. Schiff, C.R. Geard und E.J. Hall (1992b) Taxol: A novel radiation sensitizer, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22, 613-617.

Van Goethem, F., M.A. Ghahroudi, P. Castelain und M. Kirsch Volders (1993) Frequency and DNA content of micronuclei in rat parenchymal liver cells during experimental hepatocarcinogenesis, *Carcinogenesis*, 14, 2397-2406.

Von-Hoff, D.D., J.R. McGill, B.J. Forseth, K.K. Davidson, T.P. Bradley, D.R. Van-Devanter und G.M. Wahl (1992) Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(17), 8165-8169.

Wani, M.C., H.L. Taylor und M.E. Wall (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325-2327.

Weirich-Schwaiger, H., H.G. Weirich, B. Gruber, M. Schweiger und M. Hirsch-Kaufmann (1994) Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes, *Mutation Res.*, 316, 37-48.

8 Anhang

Tabelle 4. Wiederholungsexperiment 1 für MoLy-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 3 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 15 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	3,4
50 nM Paclitaxel	9,8
0,5 Gy Strahlung	48
50 nM Paclitaxel + 0,5 Gy Strahlung	46
1 Gy Strahlung	60
50 nM Paclitaxel + 1 Gy Strahlung	92

Tabelle 5. Wiederholungsexperiment 2 für MoLy-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 6 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 15 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	12
50 nM Paclitaxel	20
0,5 Gy Strahlung	37
50 nM Paclitaxel + 0,5 Gy Strahlung	51
1 Gy Strahlung	68
50 nM Paclitaxel + 1 Gy Strahlung	91

Tabelle 6. Wiederholungsexperiment 1 für V79-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 3 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 16 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	6,3
50 nM Paclitaxel	6,9
4 Gy Strahlung	157
50 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	153
500 nM Paclitaxel	13
500 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	234

Tabelle 7. Wiederholungsexperiment 2 für V79-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 6 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 16 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	8,9
50 nM Paclitaxel	18
4 Gy Strahlung	104
50 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	118
500 nM Paclitaxel	100
500 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	246

Tabelle 8. Wiederholungsexperiment 1 für HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 3 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 16 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen^a
Kontrolle	18
1 nM Paclitaxel	25
4 Gy Strahlung	210
1 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	198
4 Gy Strahlung	210
5 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	277

Tabelle 9. Wiederholungsexperiment 2 für HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 6 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 16 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	38
1 nM Paclitaxel	52
4 Gy Strahlung	174
1 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	156
4 Gy Strahlung	174
5 nM Paclitaxel + 4 Gy Strahlung	209

Tabelle 10. Wiederholungsexperiment 1 für MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 3 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 42 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	30
25 nM Paclitaxel	58
2 Gy Strahlung	101
25 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	89
100 nM Paclitaxel	90
100 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	90

Tabelle 11. Wiederholungsexperiment 2 für MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 6 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 42 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	18
25 nM Paclitaxel	23
2 Gy Strahlung	58
25 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	47
100 nM Paclitaxel	70
100 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	99

Tabelle 12. Wiederholungsexperiment 1 für A549-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 3 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 48 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	27
2,5 nM Paclitaxel	31
2 Gy Strahlung	95
2,5 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	84
5 nM Paclitaxel	59
5 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	101

Tabelle 13. Wiederholungsexperiment 2 für A549-Zellen. Die Zellen wurden 4 Stunden mit Paclitaxel behandelt, gewaschen, 6 Stunden weiter kultiviert und dann bestrahlt. Ernte nach einer Erholungszeit von 48 Stunden.

Behandlung	Mikrokerne / 1000 Zellen
Kontrolle	23
2,5 nM Paclitaxel	22
2 Gy Strahlung	71
2,5 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	68
5 nM Paclitaxel	21
5 nM Paclitaxel + 2 Gy Strahlung	88

Danksagung

Frau Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper möchte ich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats sowie vor allem für die gute Betreuung und die wertvollen Anregungen herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. German Ott für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Stopper sowie des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Daniela Maria Wück
Adresse	Alicenstrasse 28 64293 Darmstadt Tel. 06151/504 9174
Geburtsdatum	4.10.1969
Geburtsort	Schweinfurt
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule in Werneck
1980 - 1981	Teilhauptschule in Schleerith
1981 – 1990	Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Schweinfurt

Berufsausbildung

1990 – 1993	Ausbildung zur Hebamme an der Berufsfachschule für Hebammen im Klinikum Bamberg
-------------	---

Hochschulausbildung

1993 - 1996	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
-------------	---

1996 - 1999	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
1999 - 2000	Praktisches Jahr an der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg
Oktober 2000	3. Staatsexamen
seit Januar 2001	Ärztin im Praktikum im St. Marienkrankenhaus, Frankfurt/Main

Darmstadt, den 13. Januar 2002