

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje**

**Einfluss von Camptothecin und Röntgenbestrahlung in vitro
auf Induktion und Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche
in Glioblastomzellen**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Sabrina Berger
aus Kürnach**

Würzburg, Juli 2009

Referenten

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. habil. T. Djuzenova

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Flentje

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2010

Die Promovendin ist Ärztin

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines über Hirntumoren	1
1.2 Behandlungsstrategie bei Hirntumoren	5
1.2.1 Operative Therapie	5
1.2.2 Postoperative Strahlentherapie	6
1.2.3 Adjuvante Chemotherapie	8
1.3 Camptothecin und ionisierende Strahlung	9
1.4 Wirkungsmechanismen der ionisierenden Strahlung	11
1.5 In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Strahlenwirkungen	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Verwendete Zelllinien	19
2.2 Zellkultivierung	19
2.3 Kolonietest	20
2.4 Human Total Survivin ELISA	22
2.5 Rad50-Foci-Anfärbung	22
2.6 Western Blot	24
2.7 Statistik	24
2.8 Materialien	25
2.9 Geräte und Software	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Wachstumsverhalten im Kolonietest	29
3.1.1 Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zelllinien	31
3.1.2 Überlebensraten der untersuchten Zelllinien	32
3.2 Untersuchung der Auswirkungen von CPT und Bestrahlung auf die Expression von extrazellulärem Survivin mittels ELISA	37
3.2.1 Expression von extrazellulärem Survivin 48 Stunden nach Bestrahlung und Vorbehandlung mit CPT	37
3.2.2 Expression von extrazellulärem Survivin 96 Stunden nach Bestrahlung und Vorbehandlung mit CPT	40
3.3 Untersuchung der Expression von DNA-Reparatur-Protein Rad50	43
3.3.1 Expression von Rad50-Protein in Kontrollzellen	44
3.3.2 Expression von Rad50-Protein nach CPT-Behandlung	45
3.3.3 Expression von Rad50-Protein nach ionisierender Bestrahlung	47
3.3.4 Expression von Rad50-Protein nach kombinierter Behandlung mit CPT und ionisierender Strahlung	49
3.3.5 Kinetik der DNA-Reparatur nach kombinierter Behandlung mit CPT und ionisierender Strahlung	50
3.4 Analyse der Expression von intrazellulärem Survivin, cleaved Caspase 3, p53 und DNA-TopoI-Proteine mittels Western Blot	53
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung und Ausblick	65
Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary units
BCNU	Carmustin, Nitrosharnstoff
BSA	Bovines Serumalbumin
CCNU	Lomustin, Nitrosharnstoff
CDDP	Cisplatin
CFGE	Konstantfeldgelelektrophorese
CPT	Camptothecin, Topoisomerase I-Hemmstoff
CPT-11	Irinotecan, Topoisomerase I-Hemmstoff
CPT-IR- Behandlung	kombinierte Therapie bestehend aus CPT und ionisierender Strahlung
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor (deutsch: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Foetal bovine serum
GHE	Glioblastoma Humain E, Glioblastomzelllinie
Gy	Gray
γ H2AX	Phosphorylierte Form der Histon-Variante H2AX
H2AX	Variante des Histons H2A
HR	homologous recombination, homologe Rekombination
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	phosphate buffered saline
PCV-Schema	Procarbazin + CCNU + Vincristin
PE	Plating efficiency
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese

SD	standard deviation (deutsch: Standardabweichung)
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SF	surviving fraction
SF2	surviving fraction at 2 Gy
SN-38	aktiver Metabolit von Irinotecan
TopoI	Topoisomerase I
VM-26	Teniposid, Topoisomerase II-Hemmstoff

1. Einleitung

1.1 Allgemeines über Hirntumoren

Unter dem Begriff „Hirntumor“ versteht man eine bösartige Neubildung, die sich im Hinblick auf Histologie, Inzidenz und Prognose sehr variabel gestalten kann. Eine zutreffendere Bezeichnung für Hirntumoren wäre „intrakranielle Neoplasmen“, da nicht alle Tumoren des zentralen Nervensystems von Hirngewebe abstammen (z.B. Meningeome und Lymphome). 2005 diagnostizierte man in den Vereinigten Staaten rund 18.500 neu aufgetretene primär maligne intrakranielle Tumoren. In demselben Jahr verstarben annähernd 12.760 Personen an einem primären Tumor des zentralen Nervensystems [CBTRUS et al., 2005]. Es ist schwer eine genaue Inzidenz der primären intrakraniellen Tumoren aufzuzeigen, da das Gehirn auch einen bevorzugten Ort für Fernmetastasen (Metastasen aus anderen Organtumoren) darstellt, welche häufig nur schwer von einem Primärtumor abgegrenzt werden können [Becker et al., 1984]. Als Primärtumor sind Tumoren zu verstehen, die entweder aus den Nervenzellen des Gehirns hervorgehen oder von dem Hirnstützgewebe (der Glia), den Hirnhäuten, den Hirnanhangsgebilden, den Hirngefäßen oder dem Plexus choroideus herrühren. Außerdem zählen Lymphome, die primär im zentralen Nervensystem auftreten, hierzu. In der Zeitspanne von 1950 bis 1989 betrug die Inzidenz an primären Tumoren des zentralen Nervensystems an der Mayo Klinik 19,1 pro 100.000 Personen pro Jahr (11,8 / 100.000 mit symptomatischen Tumoren, 7,3 / 100.000 mit asymptomatischen Tumoren) [Radhakrishnan et al., 1995]. Den unterschiedlichen Krebsregistern zufolge treten derartige Tumoren häufiger in Nordamerika und Europa (4,0-10,0 für Männer; 2,5-9,0 für Frauen) als in Asien und Afrika (1,0-4,0 bei Männern; 1,0-5,0 bei Frauen) auf. Außerdem sind häufiger Weiße als Farbige betroffen. In der Bundesrepublik liegt die Inzidenz zwischen 4,1 und 6,7 bei Männern und 2,7 und 3,6 bei Frauen [Becker et al., 1984]. Hirntumoren treten ebenfalls gehäuft in Verbindung mit genetischen Syndromen auf. Hierzu zählen unter anderem das Li-Fraumeni-Syndrom, das Von-Hippel-Lindau-Syndrom, die tuberöse Sklerose und die Neurofibromatose I und II [Greenberg et al., 1999]. Anaplastische Astrozytome und Glioblastome zählen zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren und stellen über 30 % der glialen Tumoren dar [Lohr et al., 2007]. Zu den glialen Tumoren zählen das pilozytische Astrozytom (WHO Grad I, relativ benigne, häufiger im Kindesalter), Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome (WHO Grad II), des Weiteren anaplastische Astrozytome,

anaplastische Oligodendrogliome und anaplastische Oligoastrozytome (WHO Grad III) sowie die Glioblastome und Gliosarkome (WHO Grad IV) [Sathornsumetee et al., 2006; Hermanek, 2000]. Bei dieser nach der Weltgesundheitsorganisation histologisch klassifizierten Einteilung handelt es sich um die häufigsten und wichtigsten supratentoriellen hirneigenen Tumoren des Erwachsenenalters [Hermanek, 2000]. In Tabelle 1 ist die Graduierung astrozytärer Tumoren entsprechend der Weltgesundheitsorganisation im Vergleich zur St. Anne/Mayo-Klassifikation aufgeführt.

Tabelle 1: Graduierung astrozytärer Tumoren – Vergleich WHO und St. Anne/Mayo-Klassifikation [Grisold et al., 2000]

WHO-Grad	Nomenklatur	St. Anne/Mayo Benennung	Histologische Kriterien
I	Pilozytisches Astrozytom		
II	Niedriggradiges, diffuses Astrozytom	Astrozytom Grad 1 Astrozytom Grad 2	kein Malignitätskriterium ein Malignitätskriterium, meist „Kernatypie“, „Mitosen“
III	Anaplastisches Astrozytom	Astrozytom Grad 3	zwei Malignitätskriterien, meist „Kernatypie“ und „Mitosen“
IV	Glioblastom	Astrozytom Grad 4	drei Malignitätskriterien, meist „Kernatypie“, „Mitosen“, „Endothelproliferation“ und/oder „Nekrose“

Das Glioblastoma multiforme stellt den aggressivsten primären Hirntumor dar [Farray et al., 2006]. Glioblastome können sich über zwei Pathways (Hauptwege) manifestieren. Zum einen können sie über maligne Progression eines „low grade“ Tumors zu einem anaplastischen Astrozytom und weiter zu einem Glioblastom entstehen und zum anderen können sie ebenfalls de novo von einer Astrozytenzelle über EGFR-

Amplifikation (Epidermal-Growth-Factor-Receptor) herrühren [Greenberg et al., 1999].
Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht über die zwei Entstehungsmechanismen.

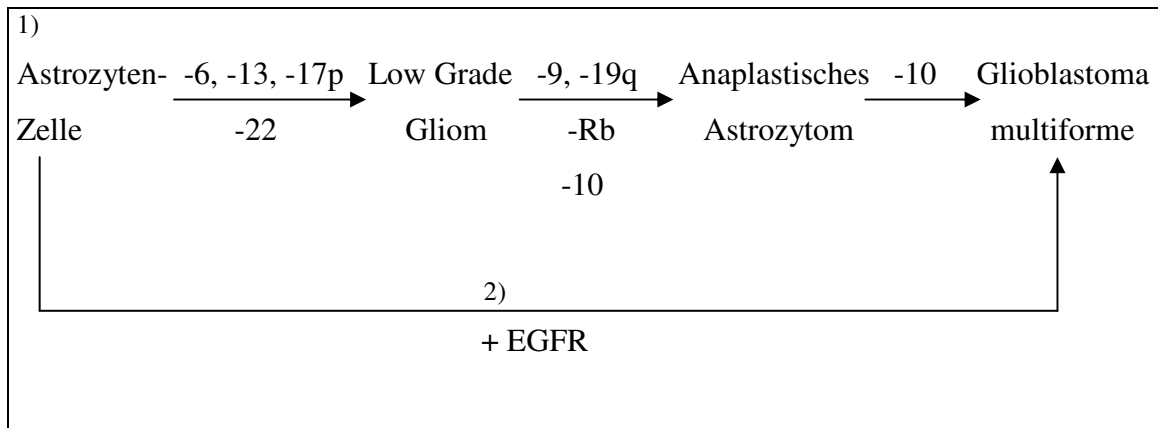


Abbildung 1: Chromosomenverlust (-) oder -gewinn (+) assoziiert mit der Evolution des Malignitätsprozesses in Astrozyten-Tumoren. Glioblastome können sich über zwei Pathways entwickeln: 1) Progression von low-grade zu anaplastischem Astrozytom und Glioblastoma multiforme über p53-Mutationen oder 2) de novo aus einer Astrozytenzelle über EGFR-Amplifikation [Greenberg et al., 1999].

Histologisch zeichnet sich das Glioblastom durch ein pleomorphes Zellbild, Kernatypien, Gefäßproliferationen und Nekrosen aus. Häufige Entstehungsorte stellen die Großhirnhemisphären und zu einem geringen Anteil auch der Balken dar, über den sich der Tumor häufig als charakteristisches Schmetterlingsgliom in die beiden Hemisphären ausbreitet [Schlegel et al., 2003]. In Abbildung 2 ist ein MRT eines Glioblastoms dargestellt.

Die Inzidenz des Glioblastoma multiforme liegt bei zwei bis drei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Das 1-Jahresüberleben bei Glioblastoma multiforme beträgt in der Regel ca. 30-40 % mit einem mittleren Überleben von zehn bis zwölf Monaten [Sathornsumetee et al., 2006]. Ein fortgeschrittenes Alter (über 60 Jahre) stellt hierbei einen prognostisch ungünstigen Faktor dar [Lohr et al., 2007]. Zudem spielen auch die Tumorphistologie und der Allgemeinzustand des Patienten für die jeweilige Prognose eine entscheidende Rolle. Häufig werden viele Hirntumoren erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt, da diese eine Vielzahl spezifischer und unspezifischer Symptome aufweisen können.

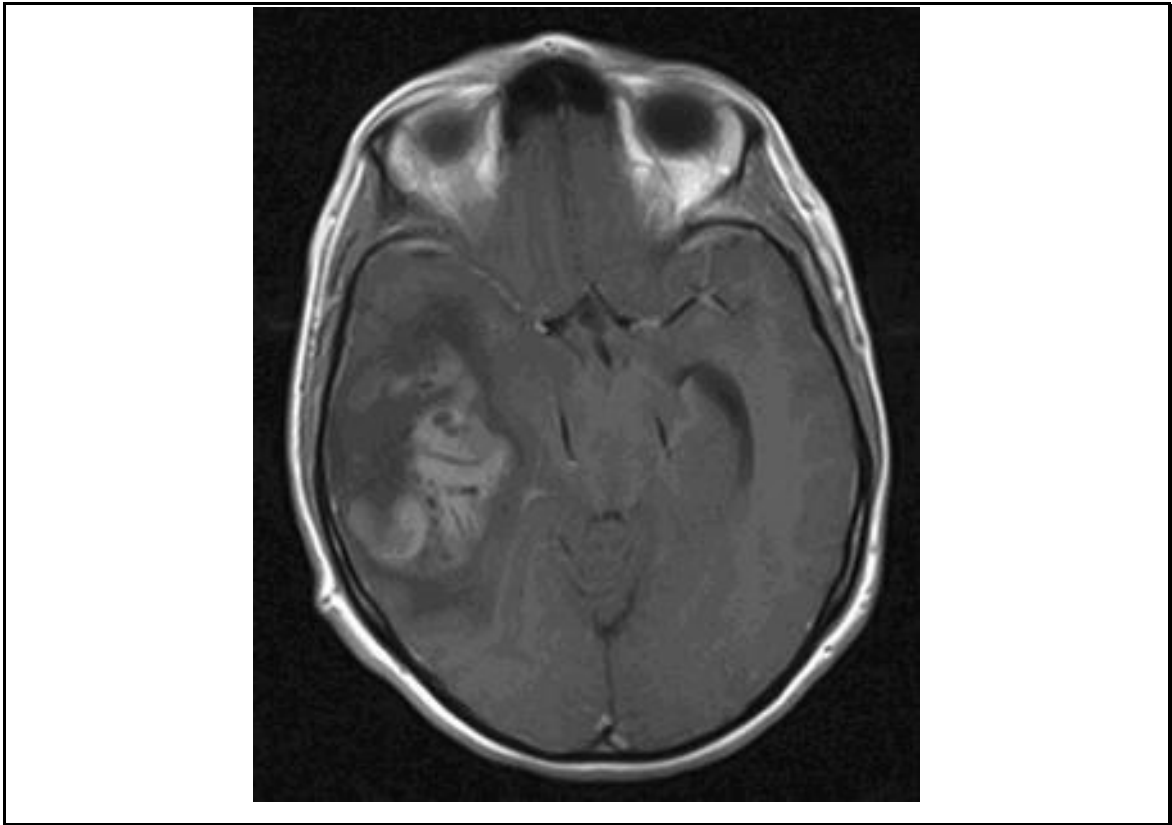


Abbildung 2: Das MRT-Bild zeigt ein Glioblastom im linken Schläfenlappen (temporal) [<http://www.klinikum-dessau.de/klinikenundinstitute/neurochirurgischeklinik/leistungsspektrum/10/hirntumoroperationen.html>].

Ca. 50 % der Patienten klagen über Kopfschmerzen, welche somit das häufigste, aber auch unspezifischste Symptom bei intrakraniellen Tumoren darstellen. Sie sind Zeichen für eine intrakranielle Druckerhöhung und können mit Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Müdigkeit, Leistungsminderung, Konzentrationsstörungen oder auch psychischen Veränderungen wie Reizbarkeit oder emotionaler Verflachung einhergehen. Oftmals werden dieser Art von Symptomen leider erst nach Diagnosestellung Beachtung geschenkt und vorher häufig übersehen. Typischerweise ist das Schmerzmaximum der Kopfschmerzen in den frühen Morgenstunden lokalisiert [DeAngelis et al., 2001; Wilmanns et al., 2000; Schlegel et al., 2003]. Weiterhin kann die Symptomkaskade von neurologisch fokalen Ausfällen begleitet sein, die durch Kompression, Druckschädigung oder infolge einer Ischämie durch Tumordinfiltration hervorgerufen werden. Je nach Tumorlokalisation können verschiedene neurologische Ausfälle verzeichnet werden. Auch psychische Störungen können zu den Symptomen bei Hirntumoren gezählt werden. Es bietet sich ein vielseitiges Spektrum, das unter anderem Persönlichkeitsveränderungen, Stimmungsschwankungen, Affektlabilität und

Beeinträchtigung der intellektuellen und kognitiven Fähigkeiten umfasst. Im Allgemeinen ist zu beachten, dass auch Hirntumoren ein komplexes Bild an psychiatrischen Symptomen auslösen können, so wie sie sich bei primär psychiatrischen Störungen darstellen [Rieke, 1975; Günzel u. Tennstedt 1983; Pollak et al., 1996; John et al. 1997]. Auch neuromuskuläre Symptome können je nach Tumorlokalisation eine Rolle spielen. Hierzu zählen u. a. Hirnnervenläsionen, von denen einige weniger neoplastisch bedingt sind, als vielmehr auf die Neurotoxizität von Zytostatika und Antibiotika oder auf eine operative Schädigung zurückzuführen sind [Grisold et al., 2000]. Aus diesem Grund ist es umso wichtiger die Vor- und Nachteile, die aus der jeweiligen Behandlungsstrategie für den Patienten resultieren würden, gut abzuwägen. Im Folgenden werden einige Behandlungskonzepte vorgestellt.

1.2 Behandlungsstrategie bei Hirntumoren

1.2.1 Operative Therapie

Die operative Therapie steht stets an erster Stelle des therapeutischen Vorgehens mit Ausnahme der präoperativen Embolisierung bei gefäßreichen Tumoren, speziell bei den Meningeomen, und sei es nur aus Gründen der bioptischen Sicherung der Diagnose in den Fällen, in denen man sich auf eine Strahlen- und Chemotherapie beschränken muss [Grisold et al., 2000]. Das Therapieziel umfasst die möglichst komplette operative Resektion des Hirntumors insofern dieser eine gute Zugänglichkeit aufweist, ohne dabei eine dauerhafte Schädigung wichtiger Hirnstrukturen in Kauf nehmen zu müssen. Das Ausmaß der Tumorentfernung und das verbleibende Restvolumen des Tumors korrelieren signifikant mit der mittleren Tumorprogression und der Überlebenszeit des Patienten [Laws et al., 2003; Hsieh et al., 2005]. „Low-grade“ oder diffuse Astrozytome (WHO Grad II) sind langsam, aber zugleich infiltrativ wachsende Tumoren, die häufig bei jungen Erwachsenen auftreten [Sathornsumetee et al., 2006]. Sie betreffen häufig ein zu großes Hirnareal oder grenzen an kritische Hirnstrukturen wie z.B. das Sprachzentrum an, was ein Hindernis für eine komplette Resektion darstellen kann [DeAngelis et al., 2001]. In Fällen, in denen nicht von einer kompletten operativen Entfernung des Tumors ausgegangen werden kann, ist abzuwägen, ob eine partielle Tumorentfernung die Beschwerden des Patienten bessern würde und man ihn so für eine anschließende konservative Behandlung besser zugänglich machen könnte, oder ob man das Fortschreiten des Tumorleidens nur hinauszögern würde. Bei Vorliegen von

multiplen Hirnmetastasen oder bei Befall des Liquors wird von einem operativen Vorgehen Abstand genommen [Wilmanns et al., 2000]. Da die komplette Tumorsektion bei malignen Hirntumoren häufig nicht erreicht werden kann, sind interdisziplinäre Therapiekonzepte vonnöten, die u.a. radio- und chemotherapeutische Ansätze einschließen.

1.2.2 Postoperative Strahlentherapie

Bei „high-grade“ Tumoren kommt nach histologischer Sicherung ein multimodales interdisziplinäres Therapiekonzept zum Tragen, bestehend aus operativer Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie [Sathornsumetee et al., 2006]. Obwohl Gliome nur eine mäßige bis geringe Strahlensensibilität aufweisen, bewirkt eine postoperative Bestrahlung, insbesondere bei einer geringen Resttumormasse, eine Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten bei guter Lebensqualität [Hermanek et al., 2000]. Indikation und Durchführung der Bestrahlung richten sich erstens nach dem histologischen Grading (WHO-Klassifikation) und zweitens nach entsprechenden Prognoseparametern (Radikalität des operativen Ergebnisses, Alter, Allgemeinzustand etc.). Tabelle 2 verschafft einen groben Überblick über die standardisierte Hirntumorbehandlung entsprechend der Leitlinien der WHO.

Tabelle 2: Standardisierte Hirntumorbehandlung in Abhängigkeit vom WHO-Malignitätsgrad. Topographie und Größe des Tumors oder der Zustand des Patienten können Modifikationen erzwingen bzw. sinnvoll machen [Wilmanns et al., 2000]

Grad I	Operation mit dem Ziel der kompletten Tumorentfernung. Selten „Radiochirurgie“
Grad II	Operation mit individuellem Therapieziel, u.U. nur stereotaktische Biopsie. Bestrahlung bei progredientem Tumor. Vorwiegend individuelles Therapiekonzept. Chemotherapie nach Ausschöpfung von Operation und Bestrahlung
Grad III und IV	Primär multimodale Behandlung mit Operation, postoperativer Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie. Ausnahmen: lokales Germinom (Bestrahlung in der Regel kurativ), anaplastisches Hypophysenadenom (keine Chemotherapieerfahrungen, sehr selten)

Die Vorgehensweise bei anaplastischen Astrozytomen und Glioblastoma multiforme ist identisch. Es wird zunächst eine möglichst totale Resektion angestrebt, um die neurologische Symptomatik zu verbessern. Anschließend folgt eine fraktionierte Radiotherapie, die bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy (5 x 2,0 Gy/Woche) [Grisold et al., 2000] reicht, innerhalb von sechs Wochen durchgeführt wird und signifikant eine Lebensverlängerung von sechs bis acht Monaten [Laperriere et al., 2002] bewirkt [DeAngelis et al., 2001]. Hierbei ist es Ziel, den gesunden Hirnbereich mit einem Sicherheitsabstand von 2-3 cm vom Tumorareal zu schonen [Grisold et al., 2000]. Bei gutartigen Tumoren mit langer Überlebenserwartung kommen äquivalente Dosen von 30 x 1,8 Gy innerhalb von sechs Wochen im gesunden Gewebe als Obergrenze zum Einsatz [Wilmanns et al., 2000]. Eine primäre Bestrahlung eines durch stereotaktische Biopsie gesicherten Glioms (WHO-Grad III und IV) sollte unter Berücksichtigung der Prognosekriterien, die u.a. Alter und Allgemeinzustand umfassen, in Erwägung gezogen werden. Außerdem sollte auch bei Gliomen WHO-Grad II, die eine klinische Symptomatik bzw. Hirndruckzeichen aufweisen, eine primäre Bestrahlung diskutiert werden [Hermanek et al., 2000].

Andere Verfahren, wie z.B. eine Bestrahlung mit Gesamtdosis bis zu 90 Gy, Brachytherapie (u.a. Implantation von radioaktiven Seeds) oder stereotaktische Radiochirurgie (sog. Gammaknife vs. X-knife) zeigten bis jetzt keine Verbesserung im

Vergleich zur konventionellen Radiotherapie [Fiveash et al., 2003]. Es sind viele verschiedene Radio- und Chemotherapie-Protokolle in Erprobung, von denen nur wenige das mittlere Überleben der Patienten mit Glioblastoma multiforme über ein Jahr hinaus verlängern können [Cavaliere et al., 2006].

1.2.3 Adjuvante Chemotherapie

Voraussetzungen für eine Behandlung mit Zytostatika sind ein normales Blutbild, normale Leber- und Nierenfunktion sowie eine kardiopulmonale Kompensation des Patienten. Regelmäßige Blutbildkontrollen unter der Therapie gehören zur Routine, da nicht selten Leuko- und Thrombozytopenien die Folge von Zytostatikatherapie sein können, die eventuell eine Dosisreduktion oder einen Wechsel des Behandlungsprotokolls nach sich ziehen [Hermanek, 2000]. Im Allgemeinen hat die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie, sei es in einer Einfach- oder in einer Mehrfachkombination, nicht den gewünschten Durchbruch in der Behandlung von malignen Gliomen mit Ausnahme der Oligodendrogliome verschafft. Die zusätzliche Überlebenszeit beläuft sich auf einige wenige Monate [Kleihues et al., 2000]. Die Kombinationsschemata, die für Gliome WHO-Grad III und IV empfohlen werden, umfassen VM-26 und die Nitrose-Harnstoffderivate ACNU (Nimustin) sowie BCNU (Carmustin) oder die Kombination aus Procarbazin, CCNU (Lomustin) und Vincristin (PCV-Schema). Bei Erreichen einer Vollremission sollte die Dauer der Chemotherapie auf vier Zyklen, einem halben Jahr Therapiedauer entsprechend, limitiert werden, um etwaige Langzeitkomplikationen der Therapie zu verhindern. Bei Patienten in einem schlechten Allgemeinzustand (Karnofsky-Index < 50 %) sollte eine Chemotherapie nur bei Tumorprogression im Rahmen einer individuellen Therapieentscheidung in Erwägung gezogen werden [Hermanek et al., 2000]. Die amerikanische Standardchemotherapie für Glioblastoma multiforme besteht gewöhnlich aus Nitrose-Harnstoffderivaten wie BCNU [Walker et al., 1978; 1980]. CCNU wird meistens in Kombination mit Vincristin und Procarbazin (PCV) eingesetzt. Sie stellen die Chemotherapie der Wahl für die Behandlung von höhergradigen oligodendroglialen Tumoren dar [Cavaliere et al., 2006]. Zu den neuen Errungenschaften in der Chemotherapie zählt auch u.a. der Einsatz von Temozolomid kombiniert mit Radiotherapie, wodurch das mittlere Überleben auf 14,6 Monate von zuvor 12,1 Monaten unter alleiniger Radiotherapie erhöht werden konnte, wie Stupp et al., 2005

veröffentlichten [Stupp et al., 2005]. Temozolomid ist in Europa neu für die Behandlung von Glioblastomrezidiven und in den USA vorwiegend für die Therapie von anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) zugelassen. Bei etwa gleicher Wirksamkeit wie die Nitrose-Harnstoffderivate weist Temozolomid weniger Nebenwirkungen auf [Wilmanns et al., 2000]. Auch Camptothecin-Derivate, wie Topotecan sind zunehmend Bestandteil gegenwärtiger Studien geworden, da eine synergistische Verstärkung der Zytotoxizität der ionisierenden Strahlung durch Einsatz diverser Camptothecin-Derivate belegt werden konnte [Übersicht: Wardman et al., 2007].

1.3 Camptothecin und ionisierende Strahlung

Bei dem Chemotherapeutikum Camptothecin (CPT) handelt es sich um ein pflanzliches Alkaloid aus der chinesischen Pflanze *Camptotheca acuminata*. CPT ist S-Phase-spezifisch und sein Wirkungsmechanismus beruht auf Hemmung von Topoisomerase I (TopoI), ein Enzym, das für die DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur eine entscheidende Rolle spielt [Morris et al., 1996; Hsiang et al., 1989; Farray et al., 2006]. Während des Ablaufs der Transkription oder der Replikation bauen sich durch partielle Entschraubung der Doppelhelix Torsionsspannungen auf, die durch laufendes Aufschneiden und Wiederverknüpfen der DNA-Stränge durch Topoisomerasen abgebaut werden [Koecke et al., 2000]. Im Fall von TopoI wird der DNA-Einzelstrang zunächst gespalten, anschließend wird der intakte Strang durch den entstandenen Strangbruch durchtreten und letztendlich werden die DNA-Bruchstellen wiederverknüpft [Lamond et al., 1996]. In den späten 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckte man die antitumoröse Wirkung von CPT [Wall et al., 1966]. Das Interesse an klinischer und experimenteller Forschung sowie an der Weiterentwicklung von CPT nahm zu, als in den frühen 70iger Jahren des 20. Jahrhunderts Berichte über hämorrhagische Zystitis und andere Toxizitäten auftraten [Boothman et al., 1989; Gottlieb et al., 1970; Moertel et al., 1972; Muggia et al., 1972]. Man erkannte, dass die Form mit der Laktonkonstellation im E-Ring (geschlossene Ringform), die im sauren Milieu stabil ist, im alkalischen Milieu spontan zur Dihydroxycarboxylform (offene Ringform) umgelagert wird [Wilmanns et al., 2000]. So erklärte sich auch die Urotheltoxizität von CPT, da im sauren Milieu die geschlossene Ringform und damit die zytostatisch wirksame Form überwog [Slichenmyer et al., 1993; Wilmanns et al.,

2000]. S-Phase Zellen sprechen bis zu 1000-mal sensitiver auf CPT an als Zellen in der G₁- oder G₂-Phase. Da TopoI aber auch in ruhenden Zellen vorhanden ist, kann es auch dort zu zytotoxischen Effekten kommen und letztendlich die Apoptose induzieren [Wilmanns et al., 2000]. Zu den synthetisch hergestellten Derivaten von CPT zählen unter anderem Topotecan (Hycamtin) und Irinotecan (Camptosar, CPT-11). Topotecan weist durch das Hinzufügen eines positiv geladenen tertiären Amins eine bessere Löslichkeit auf und Irinotecan ist als Prodrug erstellt worden und geht intrazellulär durch Einwirkung von Carboxylesterase in einen aktiven Metaboliten (SN-38) über [Liehr et al., 2000]. Topotecan entfaltet seine Wirkung, indem es den vorübergehend spaltbaren Komplex aus DNA und TopoI stabilisiert. Da Topotecan zum Großteil S-Phase-spezifisch wirkt, wird vermutet, dass die DNA-Replikationsgabeln mit dem DNA-TopoI-Komplex kollidieren und mit einem Replikationsgabelarrest, irreparablen Doppelstrangbrüchen, G₂-Zell-Zyklus-Arrest oder dem Zelltod einhergehen [Zhang et al., 1990; Hsiang et al., 1989; Tsao et al., 1992; D'Arpa et al., 1990]. Topotecan entfaltet seine zytostatische Wirkung bei diversen Tumoren, wie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei Ovarial-, Mamma-, Oesophagus-, sowie Kopf- und Halstumoren und Leukämien [Slichenmyer et al., 1993]. Die momentane Indikation für den Einsatz von Topotecan stellt das metastasierte Ovarialkarzinom nach Versagen einer Primär- und Folgetherapie dar [Wilmanns et al., 2000]. Topotecan, das vor allem aufgrund seiner Liquorgängigkeit interessant ist, weist gute Remissionsraten von Hirnmetastasen auf und auch in diversen Phase II-Studien bei malignen Gliomen erreicht es einzelne gute Tumorrückbildungsraten und eine hohe Anzahl an Stabilisierungen. Zu beachten ist dabei unter anderem das Applikationsschema, das sowohl auf die Wirksamkeit als auch auf eine unter Umständen erhebliche Hämatotoxizität (Myelosuppression, insbesondere Neutropenie, weniger Thrombozytopenie) Einfluss nimmt [Grisold et al., 2000]. Seltener treten Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Müdigkeit, Diarrhoe, Alopezie, Hautausschlag, Hyperbilirubinämie, Stomatitis, Bauchschmerzen und leichte Leberenzym erhöhungen auf [Wilmanns et al., 2000]. Wie bei allen Chemotherapie-Konzepten sind auch hier regelmäßige Blutbildkontrollen unerlässlich.

Wie zuvor bereits kurz erwähnt, wurde CPT mit seinen Derivaten in diversen Studien als effektive Radiosensitizer identifiziert [Chen et al., 1997, 1999, 2004]. Unter Radiosensitizer versteht man eine Substanz, in diesem Fall ein Chemotherapeutikum, welche die Strahlenwirkungen zusätzlich verstärkt. Vorstellbar ist dies im Rahmen einer

Verstärkung der Radiotoxizität durch eine Ausweitung der ursächlichen Schädigung, durch Verhindern der Reparatur von Strahlenschäden oder durch Umverteilen der Zellen in radiosensitive Phasen des Zellzyklus [John et al., 1995; Herscher et al., 1999]. Bereits in früheren Studien, in denen kultivierte Zellen und Tiermodelle verwendet wurden, zeigte sich, dass CPT-Derivate den zytotoxischen Effekt der ionisierenden Strahlung verstärken [Mattern et al., 1991; Kim et al., 1992; Boothman et al., 1992; Roffler et al., 1994; Hennequin et al., 1994; Chen et al., 1997; 1999]. Chen et al. [1997] wiesen bereits die Wirksamkeit von CPT-Derivaten in menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) nach, wobei sich der Radiosensitizer-Effekt zwar bei Verabreichung des Chemotherapeutikums vor der Radiotherapie einstellte, aber nicht, wenn dieses erst nach Radiotherapie appliziert wurde [Chen et al., 1997]. Ebenso konnte seine radiosensibilisierende Wirksamkeit in Studien an humanen Karzinomzellen in vitro und an Fibrosarkom-Zellen von Mäusen in vivo dargelegt werden [Kim et al., 1992]. Topotecan war auch in der Lage, das durch ionisierende Strahlung induzierte Abtöten von Ovarzellen bei chinesischen Hamstern und P388 Leukämiezelllinien bei Mäusen [Mattern et al., 1991] oder Melanomzelllinien [Lamond et al., 1996] zu potenzieren. Jedoch, bevor es zu derartigen Potenzierungsprozessen durch CPT kommen kann, muss zunächst einmal die ionisierende Strahlung ihre Wirkungen an den entsprechenden Tumorzellen entfalten.

1.4 Wirkungsmechanismen der ionisierenden Strahlung

In der Medizin werden verschiedene Arten von ionisierenden Strahlen unterschieden. Klinisch relevant sind hierbei elektromagnetische Strahlen, zu denen die Gammastrahlung und die Röntgenstrahlung zählen, sowie die Partikelstrahlung, welche Elektronen, Protonen, Neutronen, Alphastrahlung (Heliumkerne), schwere Ionen und Pi-Mesonen umfassen [Lohr et al., 2007]. Obwohl die ionisierenden Strahlungen sich voneinander doch deutlich unterscheiden, sind die primären physikalischen und chemischen Änderungen, wenn man das unterschiedliche Muster der mikroskopischen Energiedeposition vernachlässigt, gleich. Aus diesem Grund ist es möglich, dieselbe Größe zur Quantifizierung des Ausmaßes einer Strahlenexposition zu verwenden. Diese wird als Energiedosis bezeichnet und erhält die Einheit Joule pro kg (J/kg) oder verkürzt Gray (Gy). Diese Größe bezeichnet die Energie, die pro Masseneinheit auf das Gewebe übertragen wird [ICRU, 1980]. Hauptziel der Strahlentherapie maligner Tumoren ist die

maximale Zerstörung aller Tumorzellen unter Schonung des umgebenden Normalgewebes. Die DNA (deoxyribonucleic acid), die im Zellkern lokalisiert ist, stellt den sensitivsten Angriffspunkt für die Bestrahlung dar. Diese beinhaltet die Erbinformation, die während des Teilungsvorgangs auf die Tochterzellen übertragen wird [Hermanek et al., 2000]. Durch die Radiotherapie kann es u.a. zur Bildung von DNA-Strangbrüchen (Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche), Basenschäden oder Quervernetzungen der DNA kommen, die von zelleigenen Enzymen nicht mehr repariert werden können oder aber falsch repariert werden und so zum Absterben der Zelle führen können oder Mutationen hervorrufen, durch welche das Risiko einer Fehlbildung oder einer Tumorerkrankung erheblich erhöht wird. In Tabelle 3 sind diverse DNA-Schadenstypen nach Anzahl pro Gy und Zelle aufgelistet [Lohr et al., 2007].

Tabelle 3: Anzahl und Art der bestrahlungsinduzierten DNA-Schäden [Lohr et al., 2007]

DNA-Schadenstyp	Anzahl pro Gy und Zelle
Doppelstrangbrüche (dsb)	40
Einzelstrangbrüche (ssb)	500-1000
Basenschäden	1000-2000
Zuckerschäden	800- 1600
DNA-DNA-Vernetzungen (crosslinks)	30
DNA-Proteinvernetzungen (dpc)	150
Alkalilabile Stellen	200-300

Die induzierten DNA-Doppelstrangbrüche stellen im Vergleich zu anderen möglichen Schäden die vital bedrohlichste Läsion dar [Frankenberg et al., 1981]. Man unterscheidet zwei Hauptreparaturwege (Pathways), über die in eukaryotischen Zellen versucht wird DNA-Doppelstrangbrüche zu beheben. Den einen Weg beschreibt das fehleranfälligeren NHEJ (nonhomologous endjoining) [Dasika et al., 1999], das den Ku-Heterodimer (Ku70 und Ku80), XRCC4 und DNA-Ligase IV [Jeggo 1998] einschließt und v.a. für die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen während der G₁- und frühen S-Phase entscheidend ist. Anfänglich glaubte man, es stelle den Hauptmechanismus bei der Behebung von DNA-Doppelstrangbrüchen in

Säugetierzellen dar [Jeggo 1998; Thompson et al., 2001]. Jedoch wurde in der Folge in zahlreichen experimentellen Arbeiten gezeigt, dass die HR (homologous recombination) gleichermaßen bedeutend ist [Liang et al., 1998; Takata et al., 1998] und vorzugsweise in der G₂- und späten S-Phase zum Einsatz kommt [Takata et al., 1998]. Die HR, bei der diverse Reparaturproteine wie die Rad-Proteine (Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59), Mre11 und Xrs2 involviert sind, spielt eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen höherer eukaryotischer Zellen [Thompson et al., 2001]. Dabei stellt ein intakter Rad50-Mre11-NBS1-Komplex die Grundlage für den Ablauf einer normalen DNA-Doppelstrang-Reparatur dar [Petrini 1999]. Obgleich unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, spielt dieser Komplex in beiden Pathways eine wichtige Rolle. In Abbildung 3 sind die zwei unterschiedlichen Pathways nochmals schematisch dargestellt.

Die Prozesse der strahlenphysikalischen Wechselwirkungen finden innerhalb von Sekundenbruchteilen statt ($\ll 10^{-10}$ sec) und die darauffolgenden radiochemischen Vorgänge benötigen ebenfalls nur einen Zeitraum von maximal einer Sekunde. Durch die Ionisation werden chemische Bindungen aufgehoben. Dies kann im Rahmen der direkten Strahlenwirkung einhergehen, was eine Wirkung direkt an der DNA voraussetzt oder es kann über die Radiolyse von zellulärem Wasser ablaufen, was dann allerdings unter indirekter Strahlenwirkung einzuordnen ist [Lohr et al., 2007]. Um derartige Strahlenwirkungen auf zellulärer Ebene und deren Folgen in Bezug auf das Zellwachstum nachweisen zu können, finden diverse in-vitro-Methoden in zahlreichen experimentellen Forschungsreihen Anwendung.

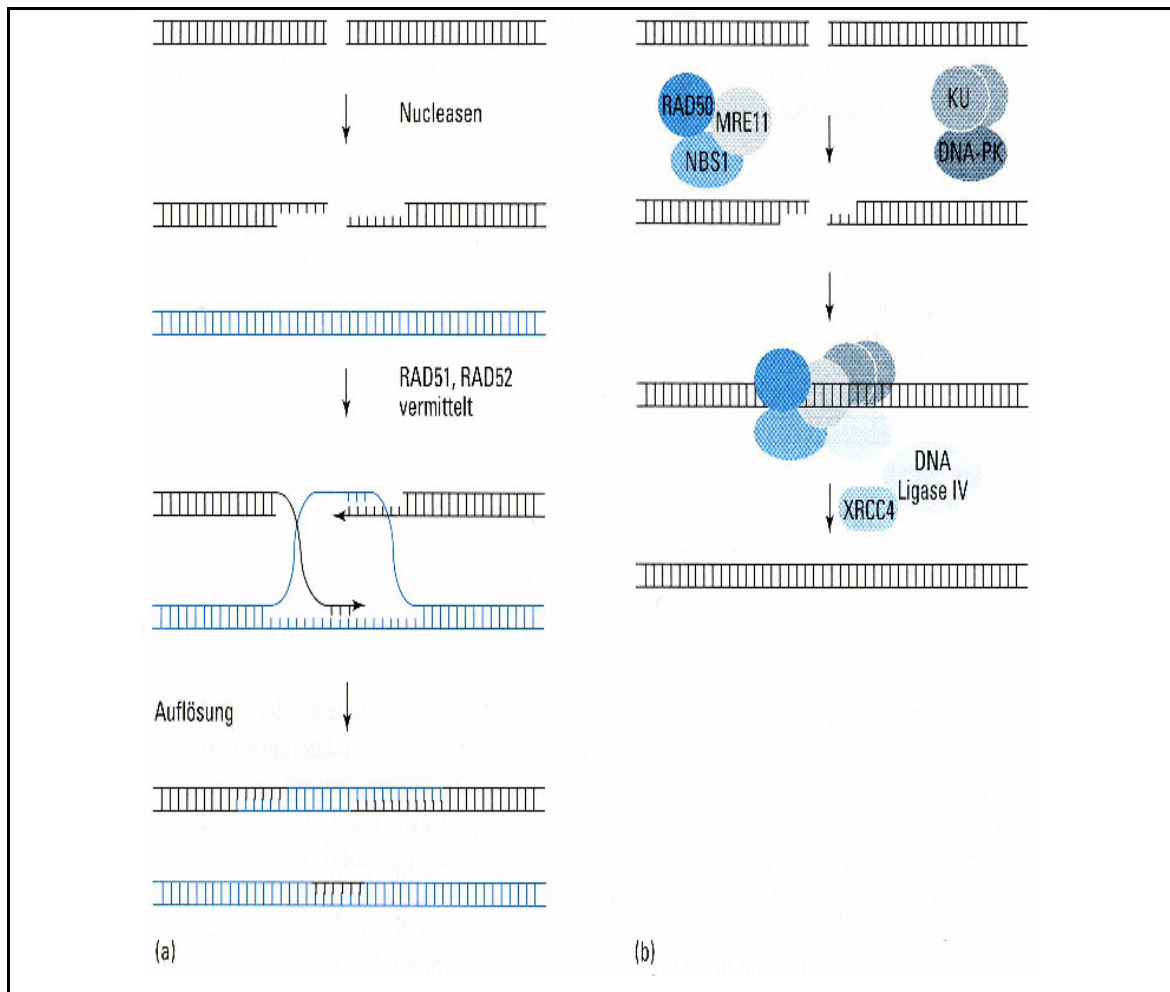


Abbildung 3: Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. Die Reparatur von Läsionen, die beide Stränge der DNA betreffen, wie Doppelstrangbrüche, bedarf besonderer Mechanismen. Darstellung der zwei Hauptreparaturwege: Homologe Rekombination (a), wobei ein nichtbeschädigtes homologes DNA-Molekül benötigt wird und das sog. End-Joining (b), wobei die DNA-Enden über wenigstens zwei z.T. unabhängige Enzymkomplexe wieder miteinander verknüpft werden [Kulozik et al., 2000].

1.5 In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Strahlenwirkungen

Zur Untersuchung der Strahlenwirkungen werden u.a. der Koloniebildungstest, gelelektrophoretische Verfahren wie die PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese), der Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) sowie die Detektionsverfahren unter Verwendung der Antikörper z.B. gegen das Histon γ H2AX oder gegen DNA-Reparaturproteinen herangezogen.

a) Im Jahr 1956 erfuh die Radiobiologie eine Revolution als Puck und Marcus [1956] ihre neu entwickelte Zellkultur-Technik, in Form des Koloniebildungstests, vorstellten und damit einen exponentiellen Verlauf der Strahlendosis-Wirkungsbeziehung bei

humanen Tumorzellen aufzeigten [Nias et al., 1998]. Puck und Marcus verwendeten eine bei der Bakteriologie schon länger gebräuchliche Methode, wobei sie einen Nährboden einsetzten, der das Wachstum von Säugetierzellen unterstützen sollte. Anschließend verteilten sie die Zellen auf Petrischalen. Der Anteil jener Zellen, der in der Lage war auf dem entsprechenden Kulturmedium anzuwachsen, spiegelte sich in der Plating efficiency (PE) wider. Die lebensfähigen Zellen begannen anschließend Kolonien zu bilden. In der Folge bestrahlten sie diese und demonstrierten somit eine verminderte Lebensfähigkeit, die sich in einem Verlust der Koloniebildungsfähigkeit widerspiegelte. Eine Kolonie musste gewöhnlich aus mindestens 50 Zellen bestehen, damit man von einer Koloniebildungsfähigkeit ausging [Nias et al., 1998]. Diese wissenschaftliche Errungenschaft schuf die Basis für alle nachfolgenden Studien, die sich mit Strahlungsauswirkungen auf proliferierende Zellpopulationen und diverse Gewebe beschäftigten. Der Koloniebildungstest ist ein Verfahren, um die Dosis-Wirkungsbeziehung in Form der Überlebensfraktion (surviving fraction, SF) darstellen zu können. In seiner modifizierten Form bedient er sich des SF₂-Wertes, der einer Überlebensfraktion nach einer Bestrahlung mit 2 Gy entspricht und in den 80iger Jahren des 20. Jahrhunderts eingeführt wurde [Nias et al., 1998].

b) Auf dem Weg zur Entwicklung der Detektionsverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen spielen die gelelektrophoretischen Verfahren, in denen Gele als Träger die elektrophoretische Trennung stabilisieren, eine wichtige Rolle. Diese Methoden beruhen im Allgemeinen auf der massenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit entstandener DNA-Fragmente im elektrischen Feld. An die Stelle der ursprünglich verwendeten Systeme wie Cellulose, Silicagel oder Aluminiumoxide sind heute Polyacrylamid- oder Agarose-Gele getreten, da diese u.a. über ein höheres Auflösungsvermögen für Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Proteinfragmente), über eine durchsichtige Konsistenz und über eine weitgehend chemisch inerte Natur verfügen [Richter et al., 2003]. Des Weiteren besitzen die neuen Gele die Fähigkeit sich der Größenordnung der zu trennenden Analyten anzugleichen und die Auflösungsgrenze bis auf etwa 1 kDa herabzusetzen. Diese Arten der Gelmethoden können DNA-Fragmente von max. 50-60 kbp [Wrba et al., 2006] und weniger auftrennen, während hingegen die Einführung der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und andere Weiterentwicklungen der Basistechnik nun eine Separierung von DNA-Fragmenten von bis zu 2×10^3 kbp ermöglichen [Wilson et al., 2000]. Im

Vergleich zu der davor entwickelten Konstantfeldgelelektrophorese (CFGE), die durch ein konstantes Spannungsfeld charakterisiert ist, zeichnet sich die PFGE durch ein Feld aus, bei dem die Richtung in Pulsen periodisch umgekehrt wird [Richter et al., 2003].

c) Ein weiteres Verfahren stellt der Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese), der von Östling und Johanson [1984] etabliert wurde, dar. Dabei handelt es sich um eine Mikrogelelektrophorese-Technik, für die eine Einzellsuspension verwendet wird. Diese Methode beruht ebenfalls auf den zuvor beschriebenen Gelelektrophorese-Techniken, unterscheidet sich jedoch durch Verwendung eines DNA-bindenden Farbstoffs und anschließende Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. DNA-Schäden führen zu einer Wanderung der chromosomalen DNA zur Anode, wobei sich das Bild eines Kometen zeigt. Zur Auswertung des Grades an DNA-Schädigung kann entweder ein Bildanalysesystem zu Hilfe genommen werden oder es kann manuell am Mikroskop ausgewertet werden. Parameter zur Quantifizierung der DNA-Schäden stellen bei manuellem Vorgehen die Schweiflänge, der Prozentsatz der Zellen in verschiedenen Schadensklassen und der Prozentsatz der Zellen mit Schweif (geschädigte Zellen) dar. Der Comet-Assay bietet zahlreiche Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen Testverfahren. Er ist ein sehr einfacher, schneller und sensitiver Test zur Quantifizierung von DNA-Schäden, erfasst ein breites Spektrum verschiedener DNA-Schädigungen, weist die Schäden auf Einzelzellniveau nach und erfordert daher nur sehr geringe Zellmengen. Er ist mit praktisch jeder Zellpopulation durchführbar und findet sowohl bei proliferierenden als auch bei nicht-proliferierenden Zellen Anwendung [Angerer et al., 2001].

d) Eine weitere Methode zur Untersuchung der Strahlenwirkung ist die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels des reparaturassoziierten Histons γ H2AX [West und Bonner, 1980], das u.a. als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche verwendet wird. Es zeigte sich, dass Histon H2AX direkt nach Bestrahlung in seine phosphorylierte Form übergeht. Diese soll Faktoren, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, rekrutieren können, wodurch über Expression und Abbau von γ H2AX-Foci auf die Kinetik der DNA-Reparatur geschlossen werden kann [Olive et al., 2004]. Mittels des DNA-Reparaturproteins Rad50, welches in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Reparaturhalbwertszeiten herangezogen wurde, sind derartige Rückschlüsse ebenfalls möglich.

Inwiefern die Kinetik der DNA-Reparatur, die Bestimmung der Zellproliferation oder die Messung von pro- und anti-apoptischen Proteinen sowie die Expression von TopoI zum Nachweis einer potentiellen radiosensibilisierenden Wirkung von CPT beitragen kann, soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Prognose und Therapiekonzepte bei Tumoren lassen sich schlecht verallgemeinern, da jeder Tumor ein speziell angepasstes Behandlungskonzept benötigt und eine auf sich eigens zutreffende Prognose aufweist. Dies trifft auch auf die zahlreichen intrakraniellen Tumoren zu, von denen die Glioblastome, diejenigen mit dem geringsten Durchschnittsüberleben darstellen. Aus diesem Grund werden speziell für die Klasse der astrozytischen Gliome Therapien gesucht, die ihren Fokus darauf richten, den Tumor bereits auf seiner molekularen Ebene zu verstehen und die genetischen Aberrationen der malignen Zellen mittels hochspezifischer und hocheffektiver Therapien zu erforschen [DeAngelis et al., 2001]. Eine Herausforderung stellt die Entwicklung von Chemotherapeutika dar, die, ohne neurotoxische Nebenwirkungen zu verursachen, eine Regredienz oder zumindest einen Stillstand der Tumorerkrankung bewirken. Wie bereits zuvor erwähnt, konnten CPT und einige seiner Derivate (z.B. Topotecan) u.a. als potente Radiosensibilisatoren in P388 Leukämiezellen bei Mäusen [Mattern et al., 1991] oder Melanomzelllinien [Lamond et al., 1996] identifiziert werden. Zusätzlich zu diesen Studien wurde die Wirkung von CPT in Kombination mit ionisierender Bestrahlung in diversen Phase I- und Phase II-Studien, die Patienten mit Glioblastoma multiforme umfassten, untersucht [Fisher et 2001; 2002; Grischow et al., 2002]. Einige dieser Studien, die zu dem Schluss gelangten, dass eine Anwendung von CPT als Radiosensitizer mit anderen Therapieansätzen vergleichbar ist, konnten eine gute Wirksamkeit von CPT in diversen Zelltypen nachweisen [Mattern et al., 1991; Lamond et al., 1996]. Jedoch gibt es auch einige Studien, die keine Wirksamkeit von CPT und dessen Derivaten gegenüber Glioblastoma multiforme aufzeigten, ebenso wie in der Kombination mit ionisierender Bestrahlung [Bernier-Chastagner et al., 2005; Farray et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit kommen zum Nachweis eines möglichen radiosensibilisierenden Effekts von CPT auf verschiedene Glioblastomzelllinien die Bestimmung der Zellproliferation, die Auszählung von Rad50-Foci mit anschließender

Ermittlung der DNA-Reparaturhalbwertszeiten und die Expression verschiedener pro- und anti-apoptischer Proteine wie Survivin, cleaved Caspase 3 und p53 sowie die Messung von TopoI mittels Western Blot zum Einsatz. Die Versuche werden unter alleiniger CPT bzw. ionisierender Bestrahlung oder unter kombinierter CPT-IR-Behandlung durchgeführt. Die vorliegende Arbeit wurde im Hinblick auf die widersprüchliche Literatur bezüglich der radiosensibilisierenden Wirkung von CPT und dessen Derivaten veranlasst und beschäftigt sich mit den nachstehenden Fragen:

- I) Wie wirkt sich eine alleinige CPT- bzw. Strahlenbehandlung oder die Kombination der beiden Behandlungen auf die Überlebensraten in den unterschiedlichen Glioblastomzelllinien im Koloniebildungstest aus?
- II) Welche Auswirkungen hat eine alleinige CPT- bzw. Strahlenbehandlung oder die Kombination der beiden Behandlungen auf die Expression von extrazellulärem Survivin, einem anti-apoptischen Protein?
- III) Ändert sich die Expression von pro-apoptischen Protein (cleaved Caspase 3) oder anti-apoptischen Protein (Survivin) durch die Zugabe von CPT? Sind die Unterschiede p53-abhängig?
- IV) Welche Unterschiede gibt es hinsichtlich der Induktion und dem Abbau von DNA-Reparaturprotein Rad50 nach alleiniger CPT- bzw. Strahlenbehandlung oder Kombination der beiden Behandlungen beim Vergleich unterschiedlicher Glioblastomzelllinien?
- V) Kann anhand der Induktion und dem Abbau des Rad50-Proteins eine Aussage über die radiosensibilisierende Wirkung von CPT in den verschiedenen Glioblastomzelllinien getroffen werden?
- VI) Ergeben sich aufgrund des Angriffspunkts von CPT, dem Enzym TopoI, zelllinienspezifische Unterschiede?
- VII) Welche Mechanismen könnten einer eventuellen CPT-Resistenz einzelner Glioblastomzelllinien zugrunde liegen?

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene kommerziell erhältliche Zelllinien verwendet, die maligne Eigenschaften aufweisen und der Familie der Glioblastome zugeordnet werden können. U87-MG (U87) ist eine Zelllinie, die durch chirurgische Entnahmetechnik, von einer Patientin, die an einem malignen Gliom erkrankte, gewonnen wurde. Es handelt sich dabei um humanes Hirngewebe mit einem diploiden Karyotyp ($2n = 46$), das morphologisch epitheliale Eigenschaften aufweist. Die Zelllinie GaMG entstammte einem Hirntumorbiopsat bei einer 42-jährigen Frau, das sich histologisch als Glioblastom klassifizieren ließ. Zytogenetisch ist GaMG durch einen hypotriploiden Karyotyp mit einem 17 %-igen Anteil an Polyploidie gekennzeichnet. Morphologisch stellen sich adherente, große, spindelähnliche Zellen, die in „Monolayern“ wachsen, dar. U373-MG (U373) wurde aus einem malignen Tumor gewonnen, der ebenfalls der Klasse der Glioblastome zugeordnet werden konnte. Morphologisch ähnelt diese Zelllinie U87-MG (U87), da sie ebenfalls epitheliale Ähnlichkeiten und einen diploiden Chromosomensatz aufweist. GHE (Glioblastoma Humain E) wurde aus einer chirurgischen Entnahmeprobe eines primären Hirntumors WHO Grad II entnommen. SNB-19 (SNB19), ebenfalls in seiner Zelleigenschaft ein humanes Glioblastom, wurde 1980 bei der chirurgischen Resektion eines parieto-occipital gelegenen Hirntumors eines 47-jährigen Mannes gewonnen. Die Morphologie dieser Zelllinie ist durch adherentes, fibroblastenähnliches Zellwachstum als Monolayer charakterisiert. Zytogenetisch liegt ein humaner hypotriploider Karyotyp mit einem 15 %-igen Anteil an Polyploidie vor. Alle fünf Zelllinien wurden entweder über die DSMZ, die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) oder über die ATCC, die American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen.

2.2 Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37° C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Entsprechend der verwendeten Zelllinie kamen die unterschiedlichen Kulturmedien zum Einsatz. Als die Zellen begannen zu konfluieren, wurden sie unter sterilen Bedingungen auf mehrere Kulturflaschen (75 cm² Bodenfläche) aufgeteilt (aufgesplittet), um ein

ungestörtes exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Die Zellen wurden je nach Wachstumsverhalten ein- bis zweimal pro Woche gesplittet. Die Ablösung der Zellen aus den Kulturflaschen erfolgte mit Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat), das über zwei bis fünf Minuten auf die Zellen einwirkte. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde im Anschluss daran durch Abzentrifugieren und Wiederaufnahme der Zellen in Kulturmedium entfernt.

2.3 Kolonietest

2.3.1 Versuchsaufbau

Die fünf Glioblastomzelllinien wurden mit Strahlendosen von 0 bis 8 Gy behandelt. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit und ohne CPT durchgeführt. Der zweiten Versuchsreihe, die mit CPT durchgeführt wurde, wurde 3-4 h vor Bestrahlung der TopoI-Hemmer CPT zugegeben. Zur Kontrolle erhielt die Kulturflasche der ersten Versuchsreihe ohne CPT das Lösungsmittel DMSO.

Es wurden Petrischalen mit frischem Medium à 14 ml gefüllt und im Brutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ aufbewahrt. Man verwendete lediglich jene Kulturflaschen für den Versuch, in denen sich die Zelllinien in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zunächst wurde das alte Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst. Nach der vollständigen Lösung der Zellen wurde die Trypsinisierung mit etwa 4 ml Wachstumsmedium pro Kulturflasche abgestoppt. Mittels der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen in der jeweiligen Kulturflasche bestimmt. Anschließend wurde das Medium abzentrifugiert und die Zellen mit dem Wachstumsmedium so verdünnt, dass sich 1 Million Zellen in 40 ml Medium befanden (= 25 000 Zellen/ml). Davon wurden jeweils 4 ml in sieben gekennzeichnete Röhrchen für die anschließende Bestrahlung mit der entsprechenden Gray-Stufe abgefüllt (Tabelle 4). Im Anschluss daran wurden die Zellen entsprechend des Pipettierschemas in Tabelle 4 auf die Petrischalen (pro Dosis auf 4 Schalen) ausgesät und für etwa zwei Wochen im Brutschrank aufbewahrt.

Tabelle 4: Pipettierschema des Koloniebildungstests

Bestrahlungsdosis (Gy)	Anzahl der ausgesäten Zellen
0	1000
1	1000
2	1000
3	2500
5	5000
7	10000
8	10000

Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei Ausbildung von Kolonien, die etwa 50 Zellen pro Kolonie umfassten, wurde das Zellwachstum abgestoppt. Dabei wurde zunächst das Wachstumsmedium aus den Petrischalen entfernt, anschließend wurden die Zellen zur Fixierung für 10 min mit 6 ml einer Fixativmischung (bestehend aus einem Methanol-Essigsäure-Gemisch mit dem Mischungsverhältnis 3:1, gelagert bei -20°C) behandelt. Im Anschluss wurde das Fixativ entfernt und die Kolonien mit destilliertem Wasser abgespült und mit Kristallviolett-Lösung (~0,6 % in H₂O) versehen. Die Farbe wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen und die Petrischalen zum Trocknen aufgestellt [siehe Dissertation Teresa Güttler und Djuzenova et al., 2008].

2.3.2 Auswertung des Kolonietests

Zur Auswertung des Kolonietests betrachtete man Zellansammlungen von > 50 Zellen als Kolonien. Diese wurden manuell ausgezählt.

Um die Überlebenskurve anhand der Überlebensrate (SF = surviving fraction) darstellen zu können, wurden zunächst die Mittelwerte aus den Koloniezahlen der jeweiligen Einzelversuche errechnet und die Fraktion überlebender Zellen im Anschluss daran normiert. Die so ermittelten Überlebensraten wurden logarithmisch gegen die linear dargestellten Strahlendosen in einem Diagramm aufgetragen. Die zugehörige Überlebenskurve wurde anhand des folgenden linear-quadratischen Modells erstellt:

$$SF = \exp(-\alpha X - \beta X^2) \quad \text{[Gleichung 1]}$$

wobei X die Bestrahlungsdosis in Gray, α (Einheit Gy^{-1}) und β (Einheit Gy^{-2}) zell- bzw. gewebespezifische Konstanten bezeichnen. Die Anfangsneigung der Kurve wird hier durch die lineare Komponente $-\alpha X$ dargestellt, während hingegen der Krümmungsteil der Kurve durch die quadratische Formel $-\beta X^2$ zum Ausdruck gebracht wird.

Folgende Parameter finden zur Beschreibung des Kolonietests Verwendung:

Zum einen die „Plating efficiency“ (PE), die den Anteil der ausgesäten Zellen widerspiegelt, der in der Lage ist eine Kolonie zu bilden. Zur Berechnung der PE wird die Anzahl der gewachsenen Kolonien bei unbestrahlten Proben durch die Anzahl der für diese Proben ausgesäten Zellen dividiert.

Ein weiterer Parameter ist der SF2-Wert („surviving fraction at 2 Gy“), der den Anteil an Zellen beschreibt, der nach Bestrahlung mit 2 Gy noch eine Koloniebildungsfähigkeit besitzt.

Der D_{10} -Wert beschreibt die Strahlendosis, bei der die Anzahl der überlebenden Kolonien auf 10 % reduziert ist.

Dieser Teil der Arbeit wurde zusammen mit Mitdotorandin Frau T. Güttler gestaltet. [siehe Dissertation Teresa Güttler und Djuzenova et al., 2008].

2.4 Human Total Survivin ELISA

Für diesen Versuch wurden Zellkulturüberstände verwendet, die 48 h bzw. 96 h nach Bestrahlung mit/ohne CPT gesammelt wurden. Ziel war, die Konzentration an extrazellulärem Survivin, einem anti-apoptotischen Protein, in den unterschiedlichen Proben zu bestimmen. Die Methode wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Auswertung der optischen Dichte gelang mit Hilfe des Software-Programms Photoread 1.30[®] bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Eichgerade wurde anhand der Extinktionen der Standards erstellt, mit deren Hilfe die Survivinkonzentrationen, die im Anschluss daran auf die entsprechende Zellzahl dividiert wurden, bestimmt wurden.

2.5 Rad50-Foci-Anfärbung

Für den Versuch benötigte man in 70 %-igem Ethanol sterilisierte Objektträger, die anschließend unter der Sterilbank zum Trocknen ausgelegt wurden. Die Objektträger wurden am Mattrand mit den entsprechenden Zeiten (30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 18 h) und den Gy-Stufen (0 Gy, 2 Gy) gekennzeichnet. Der Versuch bestand einmal aus

einem unbestrahlten (0 Gy), aus einem bestrahlten (2 Gy), aus einem unbestrahlten mit CPT (150 nM) behandelten und einem bestrahlten mit CPT (150 nM) behandelten Experimentenpfad. Nachdem die Objektträger gereinigt und entsprechend gekennzeichnet waren, wurden diese mit der Zellsuspension bedeckt und anschließend im Brutschrank aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurde CPT zu den mit CPT gekennzeichneten Petrischalen und entsprechend ein Aliquot von DMSO zu den Kontrollen zugesetzt. Drei Stunden danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium versehen. Nach der Bestrahlung wurden die Petrischalen erneut im Brutschrank entsprechend der oben erwähnten Zeiten inkubiert. Sobald die Inkubationszeit erreicht war, wurden die Objektträger unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette aus dem Medium entfernt und nach kurzer Waschphase mit PBS in 70 %-igem Ethanol bei -20° C im Eisschrank für mindestens eine Stunde fixiert.

Zum Anfärben der Zellen wurden die Objektträger aus dem Fixativ entfernt und dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte ein fünfminütiger Waschgang mit Triton-X-100-Lösung. Anschließend folgte eine einstündige Blockade, die mittels 5 %-iger FBS/PBS-Lösung erreicht wurde. Anschließend wurden die Objektträger in feuchte Kammern gegeben und mit dem ersten Antikörper (50 µl/Objektträger) inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Objektträger zweimal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden zunächst mit 50 µl des zweiten Antikörpers behandelt und nach 20-25 Minuten nochmals mit 30 µl der zweiten Antikörperlösung für weitere 20-25 Minuten inkubiert, um einen möglichst gleichmäßigen Kontakt der Zellen mit den Antikörpern zu erreichen. Im Anschluss fand ein dreimal zehnmütiges Waschen mit 2 %-iger PBS/BSA-Lösung statt. Die Objektträger wurden zum Trocknen ausgelegt und anschließend mit 60 µl DAPI-Lösung pro Objektträger versehen. Die mit der CCD-Kamera aufgenommenen Bilder (1000-fache Vergrößerung; mindestens 50 Zellen je Zeitpunkt bzw. Objektträger) wurden mittels eines Bild-Analyse-Programms (Cell[^]P[®]) ausgewertet.

2.6 Western Blot

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die Proteine Survivin, cleaved Caspase 3, p53 und DNA-TopoI analysiert werden. Dazu verwendete man Zelllysate oder Kernextrakte, die entsprechend Standardprozeduren gewonnen worden waren. Sie wurden in RIPA-Buffer, der die Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und PMSF enthielt, gelöst, für 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend über zehn Minuten mit 500xg zentrifugiert. Die 20-40 µg Protein pro Lane wurden mittels eines 4-12 %-igen SDS-Polyacrylamidgels (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Gleichwertige Ladung und Transfer wurden über anti-β-Aktin- oder anti-β-Tubulin-Antikörper und Ponceau-Rot vermittelt. Um die Protein-Detektion zu gewährleisten, wurden die Membranen mit den jeweiligen primären Antikörpern und anschließend mit spezies-spezifischen peroxidase-gekennzeichneten sekundären Antikörpern, entsprechend den Standardprotokollen, inkubiert. Die verschiedenen Proteinbanden wurden über ein Chemilumineszenz-System (ECL[®], Amersham, Pharmacia Biotech, Braunschweig, Deutschland) detektiert, die unterschiedlichen Proteinexpressionen wurden mittels eines Bild-Analyse-Software-Programms (Kodak 1D, Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) quantifiziert und entsprechend der β-Aktin oder β-Tubulin Levels normiert [Djuzenova et al., 2004].

2.7 Statistik

Die in dieser Arbeit dargelegten Daten werden als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen bzw. Standardfehlern präsentiert. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe des *t*-Tests nach Student miteinander verglichen. Der *p*-Wert für die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Signifikanz wurde über das Software Programm Origin[®] (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA) analysiert.

2.8 Materialien

Zellkulturmedien und die meisten Chemikalien: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Medium für U87-MG, U373-MG, GaMG und GHE

MEM (Minimum Essential Medium, M-2279, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10 % FBS (Foetal bovine serum, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin/Penicillin (100 µg/ml/100 U/ml, P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Medium für SNB-19

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-6046, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10 % FBS

Streptomycin/Penicillin (100 µg/ml/100 U/ml)

L-Glutamin (1 mmol/l)

PBS

Dulbecco's phosphate buffered saline (D-8537, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Trypsinlösung

Trypsin-EDTA-solution (T-3924, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA

Chemikalien

Camptothecin (CPT, C-9911, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Stammlösung von 100 mM in DMSO in Aliquots bei -20° gelagert)

Lösungen für Foci-Anfärbung:

Triton X-100-Lösung

0,5 %-ige Lösung in PBS (X-100, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

DAPI-Lösung

0,2 µg/ml DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol) in antifade Lösung (1,5 % N-Propyl-Gallat, 60 % Glycerol in PBS)

Fixativ

70 %-iges Ethanol

Primärer Antikörper zur Rad50-Markierung

Mouse-monoclonal anti-Rad50 (1:1000, Abcam, Cambridge, UK)

Sekundärer Antikörper zur Rad50-Markierung

Alexa Fluor[®] 594 nm (goat anti-mouse IgG, 1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)

Reagenzien für den Kolonietest

Methanol (4627.5, Roth, Karlsruhe)

Essigsäure (A0820, AppliChem, Darmstadt)

Cristal Violet (~0,6 % in H₂O, C-3886, Sigma-Aldrich)

DMSO (Dimethylsulfoxid, D-5879, Sigma-Aldrich)

(S)-(+)-Camptothecin (C-9911, Sigma)

Reagenzien und Lösungen für Human Total Survivin ELISA (DuoSet[®] IC):

(R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)

Wash Buffer: 0,05 % Tween[®] 20 in PBS

Block Buffer: 1 % BSA, 0,05 % NaN₃ in PBS

IC Diluent #1: 1 % BSA in PBS

IC Diluent #2: 1 % BSA, 1 M Harnstoff in PBS

IC Diluent #5: 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 6 M Harnstoff in PBS

Total Survivin Capture Antibody: 72 µg/ml rabbit anti-human Survivin antibody, mit 200 µl PBS suspendieren

Total Survivin Detection Antibody: 7,2 µg/ml biotinylated rabbit anti-human Survivin antibody, mit 1,0 ml IC Diluent #1 suspendieren

Total Survivin Standard: 180 ng/ml rekombinantes humanes Survivin, mit 500 µl IC Diluent #5 suspendieren, vor Gebrauch sechsfache Verdünnung mit IC Diluent #1 und IC Diluent #2

Streptavidin-HRP: 1,0 ml Streptavidin, konjugiert mit horseradish-peroxidase, 200-fache Verdünnung mit IC Diluent #1 vor Anwendung

Substrate Solution: 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H₂O₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)

Stop Solution: 2 N H₂SO₄

Reagenzien für Western Blot:

RIPA-Buffer:

10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), 150 mM NaCl, 1 % Natrium-Deoxycholat, 1 % Triton-X-100

Protease-Inhibitoren:

Aprotinin (2 µg/ml), Leupeptin (2 µg/ml), Pepstatin (5 µg/ml), Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF, 1 mM)

Nitrocellulose Membran (0,2 µm, LC 200, Invitrogen, Karlsruhe)

SDS-polyacrylamide precast gels (4-12 %, Invitrogen, Karlsruhe)

Röntgenfilm 18x24 cm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg)

Röntgenfilm 5x7 inch (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg)

Primäre Antikörper

Rabbit monoclonal anti-(cleaved)-Caspase-3 (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)

Rabbit polyclonal anti-human survivin (1:2000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Mouse monoclonal anti-human topoI (1:1000, Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA)

Mouse monoclonal anti-p53 (1:400, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt)

Sekundäre Antikörper

Goat-anti-mouse-Antikörper, Horseradish-Peroxidase-konjugiert (1:2000, DAKO, Hamburg, Deutschland)

2.9 Geräte und Software

Mikroskop: Leica[®] DMLB Epifluoreszenzmikroskop (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar)

Kamera: Olympus[®] Color View 12 (Olympus Biosystems, Hamburg)

Photometer: Apollo[®] (Berthold Technologies GmbH und Co. KG, Bad Wildbad)

Software: Cell[^]P[®] (SoftImaging GmbH, Stuttgart)

Microcal Origin[®] (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA)

Photoread[®]1.30 (Berthold Technologies GmbH und Co. KG, Bad Wildbad)

Kodak 1D[®] (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)

WinMDI[®] (J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA)

Bestrahlung: Primus Linearbeschleuniger (6 MV mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min, Siemens Medical Solutions, Concord, USA)

Zellzähler: Standard Hemocytometer Chamber (Neubauer-Zählkammer,
Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Coulter Counter Z1 (Coulter Electronics, Krefeld)

Zentrifuge: Sigma-92958 (Osterode)

Wasserbäder: WB 14 (Mettler, Schwabach)
WB 7 (Mettler, Schwabach)

Sterilbank: HeraSafe HS 12 (Heraeus, Hanau)

Brutschränke: BB5060, Heraeus, Hanau; BB6220, Heraeus, Hanau

Durchflusszytometer: FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)
mit 15 mW Argon-Ionen-Laser

Plastikmaterial: Falcon, Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, USA)

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten im Kolonietest

Alle fünf Glioblastomzelllinien (U87, U373, SNB19, GaMG, GHE) wurden mit Röntgenbestrahlung mit oder ohne Chemotherapeutikum CPT behandelt. Aus den unterschiedlichen Experimentenreihen wurden die „Plating efficiency“, der SF2-Wert und das Verhältnis aus D_{10-CPT} und D_{10+CPT} bestimmt. Auf diese Weise konnte man die Strahlensensibilität der einzelnen Zelllinien untereinander vergleichen. Abbildung 4 zeigt das Koloniewachstum in den behandelten und unbehandelten Petrischalen der Zelllinie GaMG. Das Bild A der Abbildung 4 spiegelt die Koloniebildungsfähigkeit der unbehandelten Zellen wider, während hingegen Bild B und Bild C das Zellwachstumsverhalten nach Bestrahlung mit 2 und 8 Gy darstellen. Nach alleiniger Bestrahlung mit 2 Gy kann bereits eine deutliche Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit verzeichnet werden. Eine noch stärkere Abnahme zeigt sich bei Erhöhung der Strahlendosis auf 8 Gy. Dieser Effekt ist beachtlich, vor allem wenn man bedenkt, dass bei steigender Strahlendosis eine deutlich größere Anzahl an Zellen ausgesät wurde, wie in Tabelle 4 skizziert wurde. Die Bilder D, E und F der Abbildung 4 zeigen zum einen das Koloniewachstum nach alleiniger CPT-Behandlung (Bild D) und zum anderen die Koloniebildungsfähigkeit nach kombinierter Behandlung aus CPT und Bestrahlung mit 2 Gy (Bild E) und 8 Gy (Bild F). Wenn man Bild A und Bild D miteinander in Bezug auf die Koloniebildungsfähigkeit vergleicht, fällt eine immense Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie GaMG nach Behandlung mit CPT auf. Bei der Kombinationsbehandlung aus CPT und Bestrahlung kann eine ähnliche Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit wie nach alleiniger Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

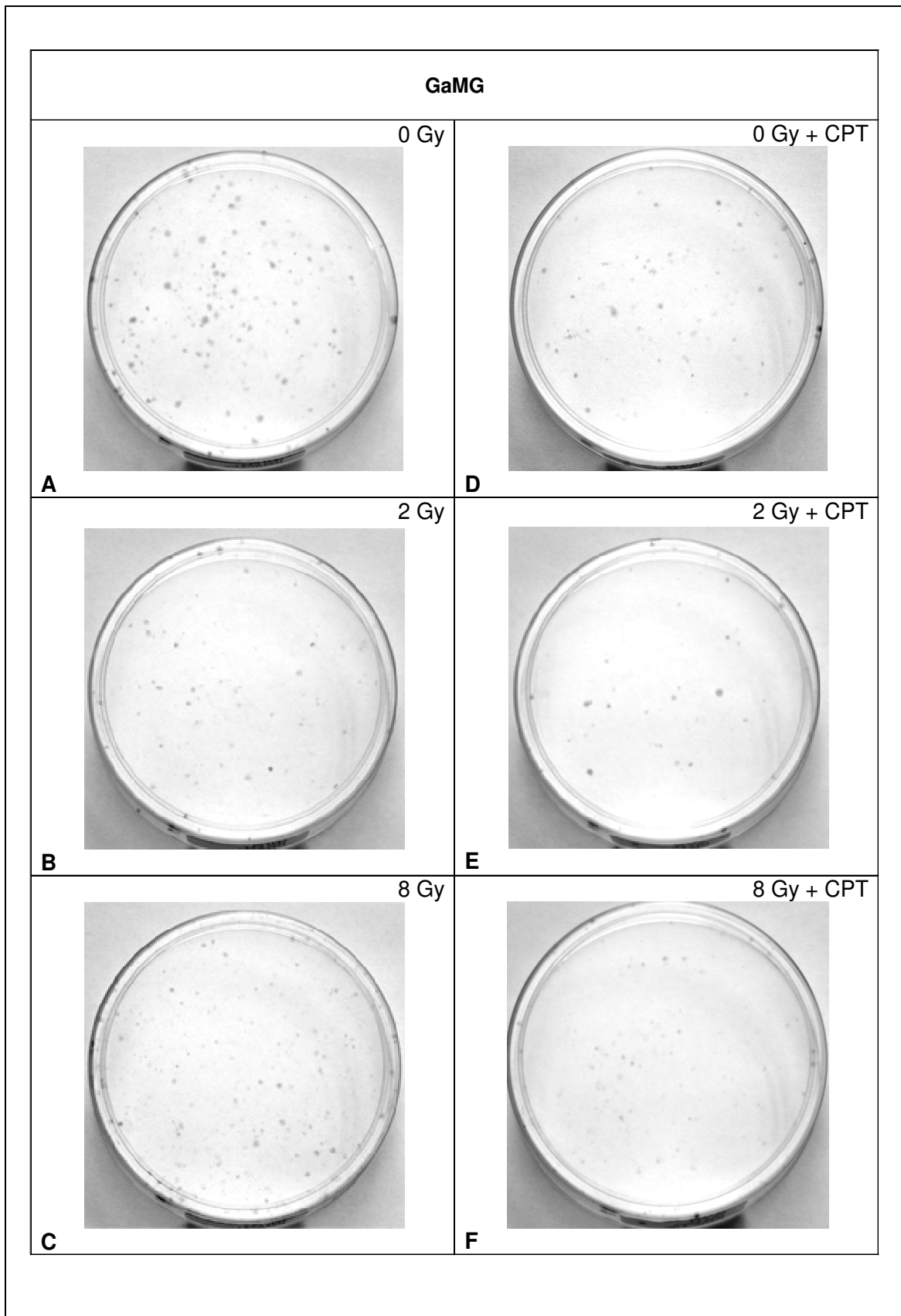


Abbildung 4: Darstellung der Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie GaMG. Die linke Spalte präsentiert das Koloniewachstum von unbehandelten und bestrahlten Zellen. Die rechte Spalte spiegelt die Koloniebildungsfähigkeit nach alleiniger CPT-Behandlung und kombinierter CPT-IR-Behandlung wider.

3.1.1 Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zelllinien

Für jede Bestrahlungsstufe wurde eine bestimmte Zellanzahl der jeweiligen Zelllinie ausgesät (siehe 2.3). Im Falle der unbestrahlten Petrischalen wurden 1000 Zellen dem Wachstumsmedium zugegeben. Die „Plating efficiency“ (PE) lässt sich aus dem Mittelwert der jeweiligen Einzelversuche im Verhältnis zu den ausgesäten 1000 Zellen ermitteln. Abbildung 5 spiegelt die Koloniebildungsfähigkeiten der unbestrahlten Zellen mit und ohne CPT wider.

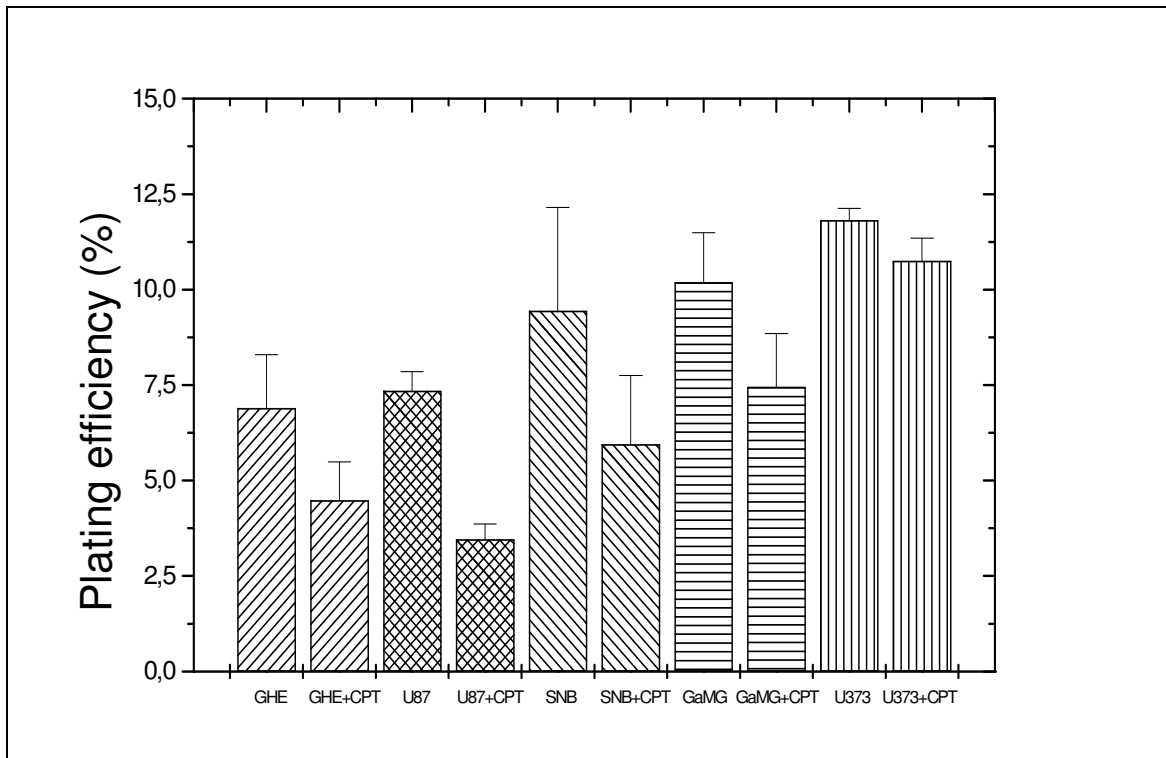


Abbildung 5: „Plating efficiency“ der einzelnen unbestrahlten und unbehandelten Zelllinien im Vergleich zur Behandlung mit CPT. Die Werte (\pm SD) wurden aus mindestens zwei Einzelversuchen ermittelt.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der Koloniebildungsfähigkeiten der unbestrahlten und unbehandelten Zelllinien. Während die Zelllinie GHE die geringste PE mit 6,9 % aufweist, kann hingegen bei der Zelllinie U373 die höchste PE mit 11,8 % nachgewiesen werden. Bezüglich der „Plating efficiency“ konnte nach Behandlung mit CPT bei allen Zelllinien eine Abnahme verzeichnet werden. Dies zeigte sich am deutlichsten bei U87 und SNB19. Dort nahm die PE von 7,4 % auf 3,5 % bei U87 und von 9,5 % auf 6,0 % bei SNB19 ab, wobei sich die Unterschiede als nicht signifikant erwiesen.

Die einzelnen Werte können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 5: „Plating efficiency“-Werte mit den dazugehörigen Standardabweichungen

Zelllinie	Plating efficiency, (%)
U87	7,4 ± 1,5
U87 + CPT	3,5 ± 1,1
U373	11,8 ± 9,1
U373 + CPT	10,8 ± 1,7
GHE	6,9 ± 3,9
GHE + CPT	4,5 ± 2,9
GaMG	10,2 ± 4,6
GaMG + CPT	7,5 ± 4,7
SNB	9,5 ± 10,9
SNB + CPT	6,0 ± 7,4

3.1.2 Überlebensraten der untersuchten Zelllinien

Die Überlebenskurven der einzelnen Zelllinien, die mittels des linear-quadratischen Modells (siehe Gleichung 1) angefitet wurden, werden in Abbildung 6 präsentiert.

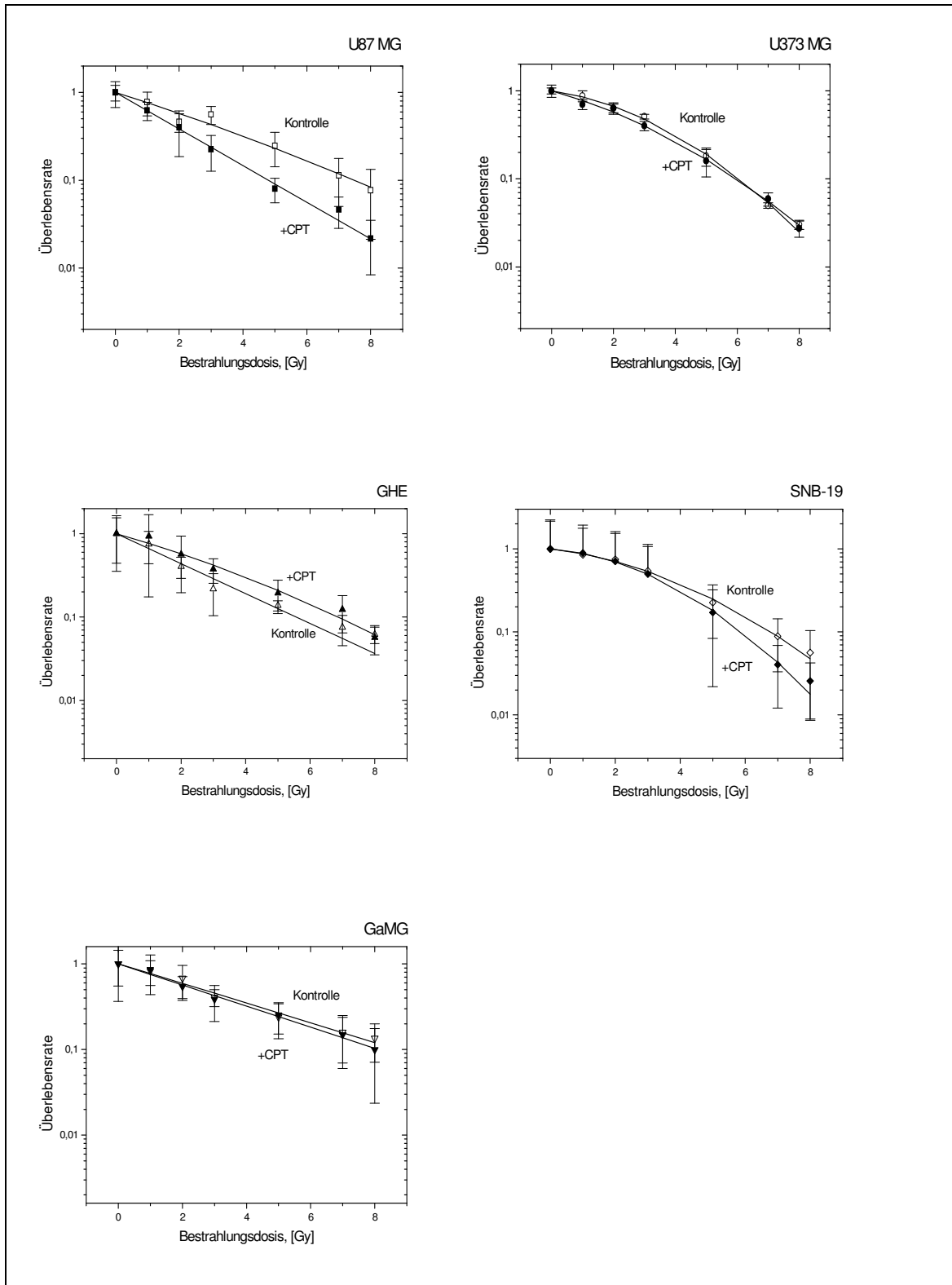


Abbildung 6: Überlebenskurven aller 5 Zelllinien mit und ohne CPT-Behandlung. Die Koloniezahl wurde aus mindestens zwei Einzelversuchen ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die zugehörigen Standardabweichungen dar [Djuzenova, Güttler, Berger et al., 2008]. Reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Landes Bioscience.

Es konnten unterschiedliche Kurvenverläufe bei den fünf Glioblastomzelllinien eruiert werden (Abbildung 6). Die Überlebensrate bei der Zelllinie U87 nahm unter zusätzlicher CPT-Behandlung im Vergleich zur Kontrollkurve deutlich ab, während sich hingegen bei den Zelllinien U373 und GaMG bei zusätzlicher CPT-Behandlung fast kein Unterschied in den jeweiligen Kurvenverläufen zeigte. Bei der Zelllinie SNB19 konnte ebenfalls eine Abnahme der Überlebensrate bei zusätzlicher CPT-Gabe verzeichnet werden, wenn auch erst nach höheren Bestrahlungsdosen als bei U87. Die Zelllinie GHE wies nach zusätzlicher CPT-Behandlung sogar etwas höhere Überlebensraten als nach alleiniger Bestrahlung auf.

Abbildung 7 stellt die SF2-Werte der fünf Glioblastomzelllinien mit und ohne CPT-Behandlung dar. Der SF2-Wert spiegelt die Überlebensfraktion der Kolonien bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy wider.

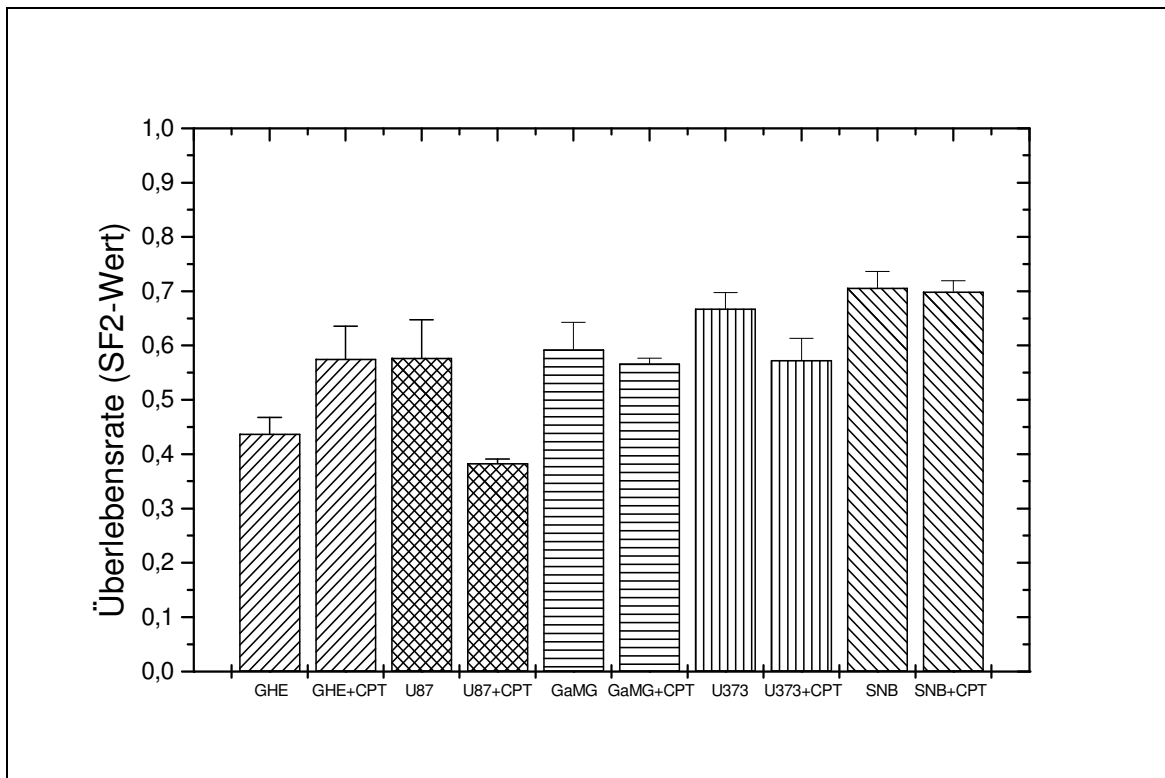


Abbildung 7: Überlebensfraktion der Zelllinien bei Bestrahlung mit 2 Gy. Vergleich von Kontrollzellen und CPT-behandelten Zellen. Die Werte (\pm SD) wurden aus mindestens zwei Einzelversuchen ermittelt.

Der SF2-Wert nahm bei U87 von 0,58 auf 0,38 bei zusätzlicher CPT-Behandlung ab, was einer Reduktion der Überlebensrate bei CPT-Zugabe entspricht. Diese Abnahme erwies sich auch mit $p < 0,01$ als statistisch signifikant. SNB19 und GaMG hingegen zeigten keine wesentlichen Veränderungen. Die Überlebensraten bei bestrahlten SNB19

und bei GaMG blieben bei zusätzlicher CPT-Gabe unverändert. Die Zelllinie GHE verzeichnete eine Zunahme der Überlebensrate von 0,44 auf 0,57.

Tabelle 6 präsentiert die entsprechenden Werte für die Parameter SF2, α und β .

Tabelle 6: Darstellung des SF2-, α - und β -Wertes und den dazugehörigen Standardabweichungen mit und ohne CPT-Behandlung

Zelllinie	SF2	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
U87 MG	0,58 ± 0,07	0,26 ± 0,06	0,006 ± 0,01
U87 MG + CPT	0,38 ± 0,008	0,48 ± 0,01	0,0001 ± 0,0001
U373 MG	0,67 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,004
U373 MG + CPT	0,57 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,03 ± 0,007
GHE	0,44 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,0001 ± 0,0001
GHE + CPT	0,57 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,01 ± 0,009
GaMG	0,59 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,0006 ± 0,0006
GaMG + CPT	0,57 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,0001 ± 0,0001
SNB19	0,71 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,03 ± 0,004
SNB19 + CPT	0,70 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,003

Zusätzlich wurde der D₁₀-Wert ermittelt. Dieser Wert gibt diejenige Strahlendosis an, unter der 10 % der Zellen noch fähig sind Kolonien zu bilden. Für eine bessere Vergleichbarkeit bestimmte man das Verhältnis von D₁₀ ohne CPT zu D₁₀ mit CPT-Behandlung. In Tabelle 7 werden die genauen Einzelwerte dargestellt.

Tabelle 7: D₁₀-Werte und Verhältnis der D₁₀-Werte zwischen unbehandelten und mit CPT-behandelten Zellen

Zelllinie	D ₁₀ (Gy)	(D ₁₀ -CPT) / (D ₁₀ +CPT)
U87 MG	7,5	1,6
U87 MG + CPT	4,8	
U373 MG	6,1	1,0
U373 MG + CPT	6,0	
GHE	5,5	0,8
GHE + CPT	6,9	
GaMG	8,7	0,9
GaMG + CPT	9,7	
SNB19	6,8	1,2
SNB19 + CPT	6,0	

Mittels CPT-Behandlung konnte eine Abnahme der D₁₀-Werte von 7,5 auf 4,8 bei U87 und von 6,8 auf 6,0 bei SNB19 erreicht werden. Dies spiegelt sich auch im Verhältnis (D₁₀-CPT)/(D₁₀+CPT) wider. Daraus kann man schließen, dass sich bei U87 unter zusätzlicher CPT-Behandlung der ausgeprägteste radiosensibilisierende Effekt bei einem (D₁₀-CPT)/(D₁₀+CPT)-Wert von 1,6 darstellte, gefolgt von SNB19 mit einem Verhältniswert von 1,2. Bei den Zelllinien GHE, U373 und GaMG konnte durch CPT-Zugabe kein radiosensibilisierender Effekt gemessen werden. GHE und GaMG benötigten sogar trotz CPT-Zugabe eine höhere Strahlendosis um die gleiche Überlebensrate zu erzielen.

Mittels des SF₂- und D₁₀-Verhältniswertes konnte kein radiosensibilisierender Effekt bei zusätzlicher CPT-Behandlung bei den Zelllinien GHE, U373 und GaMG gemessen werden. Bei U87 wiesen beide Parameter auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei zusätzlicher CPT-Behandlung hin. SNB19 zeigte ebenfalls eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit unter CPT-Behandlung, jedoch erst bei höheren Strahlendosen. Der Koloniebildungstest konnte auf diese Weise zelllinienabhängige Unterschiede bezüglich des radiosensibilisierenden Effekts des CPTs darlegen.

Da die kombinierte CPT-IR-Behandlung bei einzelnen Tumorzelllinien einen ausgeprägten radiosensibilisierenden Effekt bewirkt, wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob in diesen auch ein Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen ist.

3.2 Untersuchung der Auswirkungen von CPT und Bestrahlung auf die Expression von extrazellulärem Survivin mittels ELISA

Survivin ist ein Apoptose-hemmendes Protein, welches zu einem großen Teil von Krebszellen produziert wird. Da es eine entscheidende Rolle für die Apoptoseregulation in transformierten Zellen spielt, kann man über die Messung der extrazellulären Survivin-Konzentration Kenntnis über die mögliche Effektivität eines Therapieansatzes erlangen. Außerdem könnte es einen bedeutenden Anknüpfungspunkt für neue Krebstherapien darstellen und ist daher auch Gegenstand gegenwärtiger Forschungen [Quick et al., 2006].

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden nach Auszählung der Zellzahl 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung mit 2, 4, 6 und 8 Gy mit oder ohne Einsatz von CPT (150 nM, 3 h), die Zellüberstände in Eppendorf-Caps gesammelt und bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben aufgetaut und die ELISA-Versuche, wie zuvor im Material und Methoden-Abschnitt erläutert, durchgeführt.

3.2.1 Expression von extrazellulärem Survivin 48 Stunden nach Bestrahlung und Vorbehandlung mit CPT

Das anti-apoptotische Protein Survivin beträgt in den Kontrollzellen (0 Gy, ohne CPT) der fünf Glioblastomzelllinien nach 48 Stunden zwischen $1,5$ und $3,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle. Dabei weisen die Zelllinien SNB19, U87 und U373 die geringste Menge an Survivin in den Kontrollzellen auf mit $1,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle, während hingegen GaMG und GHE mit jeweils 3 und $3,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle die höchste Konzentration pro Zelle zeigen. Bei der höchsten Bestrahlungsdosis mit 8 Gy werden Konzentrationen von 0,5 bis $19,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle gefunden. Bei allen Zelllinien steigt die Konzentration an extrazellulärem Survivin pro Zelle im Bezug zu der jeweiligen Kontrollgruppe an, außer bei SNB19. Dort nimmt diese von 1,5 auf $0,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle ab. Unter alleiniger CPT-Einwirkung (150 nM, 3 h) nehmen die Konzentrationen an extrazellulärem Survivin im Vergleich zu den Kontrollgruppen aller fünf Glioblastomzelllinien zu. In

den Zelllinien U87, SNB19 und GHE übertrifft die alleinige CPT-Behandlung ($5,5 \times 10^{-4}$, $9,5 \times 10^{-4}$ und 9×10^{-4} pg/Zelle) ebenfalls die Werte, die bei Bestrahlung mit 8 Gy gemessen wurden. Bei U373 nimmt die Konzentration an extrazellulärem Survivin pro Zelle zwar ab, jedoch nur leichtgradig von 8,5 auf 7×10^{-4} pg/Zelle. Bei der Zelllinie GaMG ist hingegen ein deutlicher Rückgang an extrazellulärem Survivin von 19,5 auf $10,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle zu verzeichnen. Unter der kombinierten CPT-IR-Behandlung lassen alle Glioblastomzelllinien die höchsten Survivin-Konzentrationen pro Zelle erkennen mit Ausnahme von GaMG. Bei der Zelllinie GaMG steigt die Survivin-Konzentration mit 17×10^{-4} pg/Zelle im Vergleich zur alleinigen CPT-Behandlung mit $10,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle zwar an, allerdings wird die Survivin-Konzentration von $19,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle nach Bestrahlung mit 8 Gy nicht übertroffen. Bei den übrigen Zelllinien werden Spitzenwerte zwischen 13 und 42×10^{-4} pg/Zelle gefunden. Im Vergleich der Absolutwerte weisen U87 und SNB19 nach kombinierter CPT-IR-Behandlung zusammen mit GaMG die niedrigsten Survivin-Konzentrationen auf. Tabelle 8 spiegelt die Daten nochmals im Überblick numerisch wider. Die Mittelwerte samt Standardabweichungen sind aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen gewonnen.

Tabelle 8: Expression von extrazellulärem Survivin pro Zelle der fünf Glioblastomzelllinien. Abgebildet sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen 48 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy bei Behandlung mit bzw. ohne CPT im Vergleich. Die Daten sind aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen ermittelt

Zelllinie	Survivin/Zelle 0 Gy [10 ⁻⁴ pg/Zelle]	Survivin/Zelle 8 Gy [10 ⁻⁴ pg/Zelle]
SNB19	1,5 ± 1,5	0,5 ± 1,0
SNB19 + CPT	9,5 ± 2,0	17 ± 2
GHE	3,5 ± 4,5	6,5 ± 8,0
GHE + CPT	9,0 ± 1,5	42 ± 9
GaMG	3,0 ± 0,25	19,5 ± 28
GaMG + CPT	10,5 ± 5,0	17,0 ± 1,5
U373	1,5 ± 1,0	8,5 ± 5,5
U373 + CPT	7,0 ± 2,5	23,5 ± 5,5
U87	1,5 ± 1,5	2,5 ± 3,0
U87 + CPT	5,5 ± 0,5	13 ± 5,5

In Abbildung 8 sind die Werte aus Tabelle 8 nochmals separat für jede Glioblastomzelllinie in fünf einzelnen Diagrammen wiedergegeben.

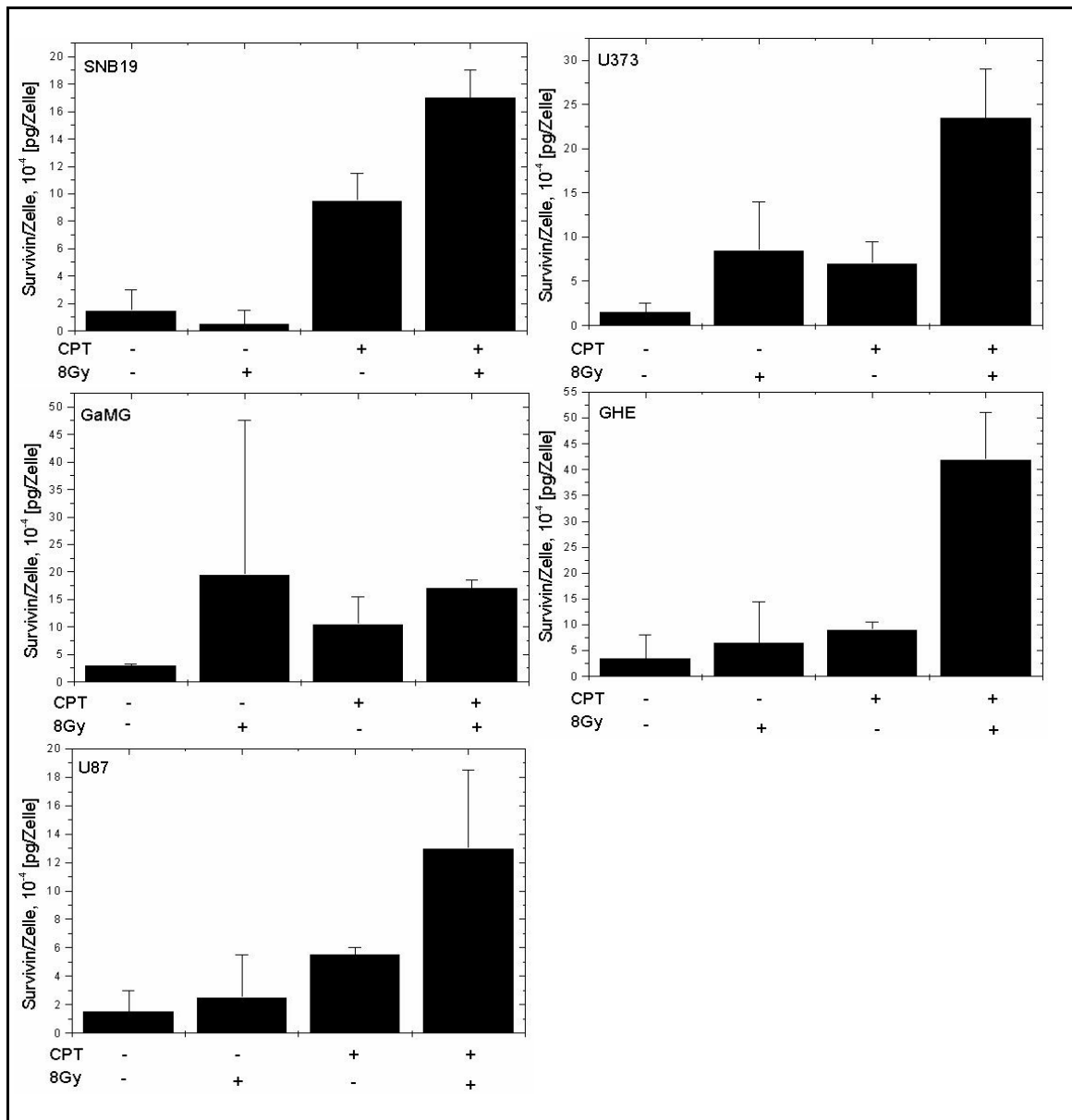


Abbildung 8: Expression von extrazellulärem Survivin pro Zelle 48 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy mit bzw. ohne CPT-Vorbehandlung im Vergleich. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichungen, SD) sind aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen ermittelt.

3.2.2 Expression von extrazellulärem Survivin 96 Stunden nach Bestrahlung und Vorbehandlung mit CPT

Die Survivin-Menge pro Zelle beträgt nach 96 Stunden in den Kontrollzellen (0 Gy, ohne CPT) der verschiedenen Glioblastomzelllinien zwischen $0,15$ und $3,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle. U87 weist die geringste Menge an extrazellulärem Survivin mit $0,15 \times 10^{-4}$ pg/Zelle auf, gefolgt von SNB19 und U373 mit je $0,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle und GHE und GaMG mit jeweils 2×10^{-4} bzw. $3,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle. Bei allen fünf Zelllinien wird die

Survivin-Konzentration pro Zelle der jeweiligen Kontrollgruppen von der Survivin-Menge nach Bestrahlung mit 8 Gy übertroffen. Die Werte der Survivin-Konzentrationen bewegen sich dort in einem Bereich von $0,5-18 \times 10^{-4}$ pg/Zelle, wobei U87 wiederum die niedrigste Konzentration aufweist und sich die Zelllinien SNB19 mit $2,5 \times 10^{-4}$, U373 mit $5,5 \times 10^{-4}$, GaMG mit 7×10^{-4} und GHE mit 18×10^{-4} pg/Zelle anschließen. Bei der alleinigen CPT-Applikation steigen die Werte in den Zelllinien U87, U373 und GaMG im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen und den mit 8 Gy bestrahlten Zellen weiterhin an. Es finden sich Werte von 2×10^{-4} pg/Zelle für U87, 8×10^{-4} pg/Zelle für U373 und $9,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle für GaMG. In der SNB19-Linie nimmt die Konzentration an extrazellulärem Survivin im Vergleich zu den Kontrollzellen zwar zu, übersteigt aber nicht die Werte, die durch die alleinige Radiotherapie mit 8 Gy erreicht wurden. Die Werte variieren ungefähr im gleichen Bereich zwischen 2×10^{-4} und $2,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle. GHE ist die einzige Zelllinie, bei der eine Abnahme der Survivin-Konzentration pro Zelle nach alleiniger CPT-Behandlung im Bezug auf unbehandelte, unbestrahlte und bestrahlte Zellen verzeichnet werden kann. Hier werden kleinste Werte um $0,02 \times 10^{-4}$ pg/Zelle gemessen. In allen Zelllinien außer GHE werden die höchsten Konzentrationen an extrazellulärem Survivin pro Zelle bei der kombinierten CPT-IR-Behandlung gefunden. Es können Spitzenwerte zwischen 4×10^{-4} und $30,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle ermittelt werden. Den höchsten Wert weist dabei GaMG mit $30,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle auf. Danach folgen U373 mit $11,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle, SNB19 mit $7,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle und U87 mit 4×10^{-4} pg/Zelle. In der Zelllinie GHE wird unter CPT-IR-Behandlung eine Konzentration von $0,5 \times 10^{-4}$ pg/Zelle gemessen. Somit wird zwar die Konzentration, die in der alleinigen CPT-Gruppe bestimmt worden war, übertroffen, allerdings weisen die Kontrollgruppe und die mit ionisierender Strahlung behandelte Gruppe höhere Konzentrationen auf. Auch hier weisen wiederum die Zelllinien U87 und SNB19 zusammen mit GHE die niedrigsten Survivin-Konzentrationen nach kombinierter CPT-IR-Behandlung im Vergleich der fünf Glioblastomzelllinien auf. Diese soeben dargelegten Werte werden in Tabelle 9 nochmals präsentiert.

Tabelle 9: Expression von extrazellulärem Survivin pro Zelle in den fünf Glioblastomzelllinien 96 Stunden nach Bestrahlung und CPT-Vorbehandlung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (0 Gy, ohne CPT). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen

Zelllinie	Survivin/Zelle	Survivin/Zelle
	0 Gy [10^{-4} pg/Zelle]	8 Gy [10^{-4} pg/Zelle]
SNB19	0,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,5
SNB19 + CPT	2 \pm 1	7,5 \pm 0,25
GHE	2 \pm 0,5	18 \pm 8,5
GHE + CPT	0,02 \pm 0,02	0,5 \pm 0,5
GaMG	3,5 \pm 3,5	7 \pm 10
GaMG + CPT	9,5 \pm 0,5	30,5 \pm 26,5
U373	0,5 \pm 0,5	5,5 \pm 6,5
U373 + CPT	8 \pm 1	11,5 \pm 1,5
U87	0,15 \pm 0,005	0,5 \pm 0,15
U87 + CPT	2 \pm 1	4 \pm 2

In der nachfolgenden Abbildung 9 sind die Daten der extrazellulären Survivin-Konzentration pro Zelle jeder einzelnen Zelllinie aus Tabelle 9 nochmals graphisch wiedergegeben.

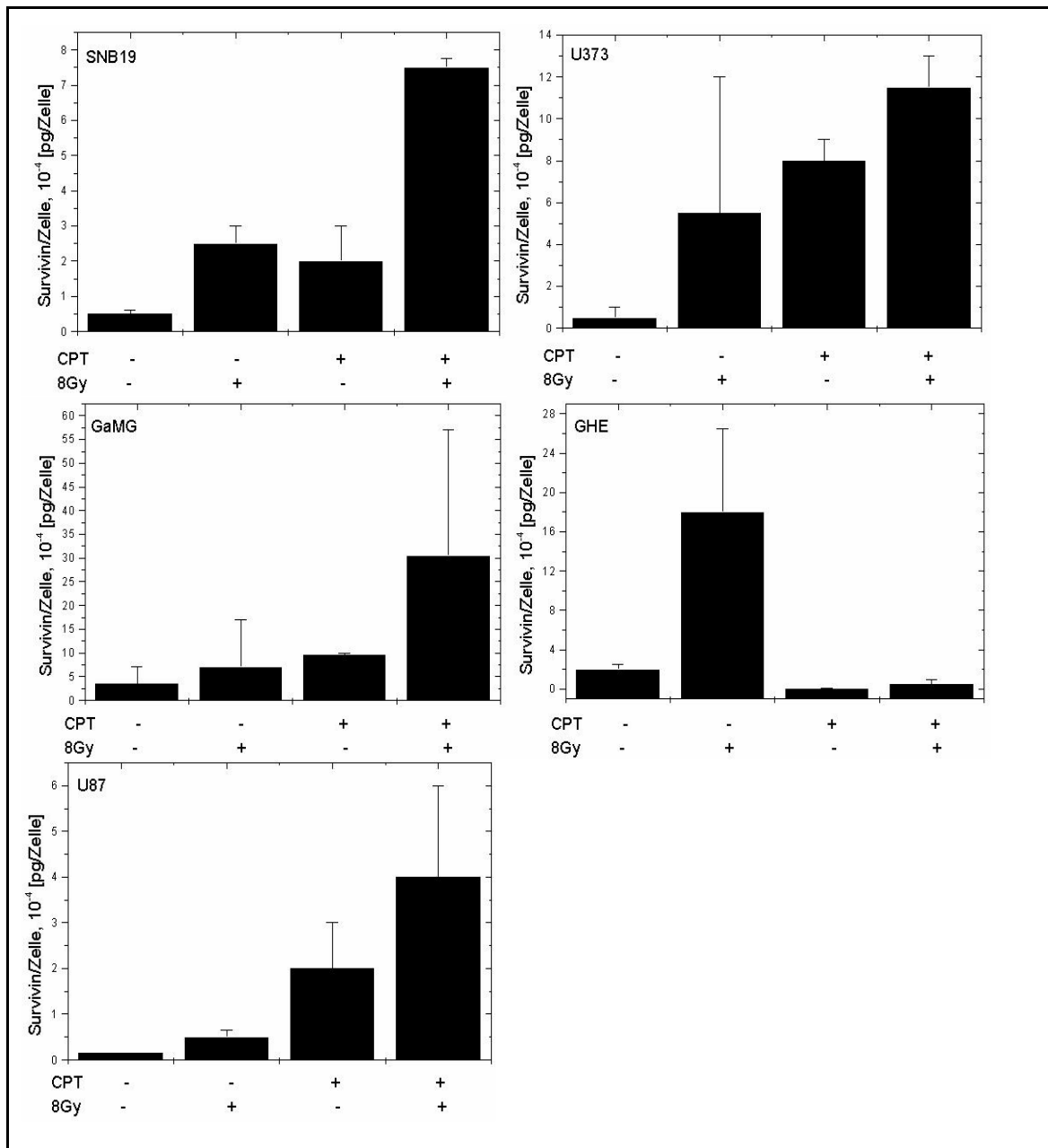


Abbildung 9: Expression von extrazellulärem Survivin pro Zelle der fünf Glioblastomzelllinien 96 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy und Vorbehandlung mit CPT. Die Mittelwerte (\pm SD) sind aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen gewonnen.

3.3 Untersuchung der Expression von DNA-Reparatur-Protein Rad50

Da in unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde, dass eine kombinierte Behandlung mit CPT und ionisierender Bestrahlung zur Erhöhung von DNA-Doppelstrangbrüchen führte [siehe Dissertation Teresa Güttler und Djuzenova et al., 2008], wäre es sinnvoll im Folgenden die Geschwindigkeit der Reparatur der DNA-Schäden zu untersuchen. Dafür wurden Kontrollzellen, CPT-behandelte und bestrahlte Zellen auf Expression von DNA-Reparaturprotein Rad50 untersucht.

Die fünf Glioblastomzelllinien wurden mit 2 Gy bestrahlt und mit CPT (150 nM, 3 h) vorbehandelt. Die Auswertungen der Rad50-Foci, über welche die Induktion und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ermittelt werden sollte, fanden zu den Zeitpunkten 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 18 h nach Bestrahlung statt.

3.3.1 Expression von Rad50-Protein in Kontrollzellen

Zur Ermittlung der Hintergrundexpression von Rad50 wurden die unbestrahlten und unbehandelten Zellen herangezogen. In allen fünf Glioblastomzelllinien wurde bereits in den Kontrollen eine gewisse Anzahl an Rad50-Foci nachgewiesen. In Abbildung 14 sind die jeweiligen Mittelwerte der Rad50-Foci aus den fünf Zelllinien in einem Balkendiagramm inklusive Standardabweichungen dargestellt. Die Foci-Anzahl variiert in allen Glioblastomlinien in einem Bereich von rund 3-5 Rad50-Foci pro Zellkern. Dabei weist U87 mit 2,8 die geringste und SNB19 mit 5,3 Foci pro Nukleus die höchste Hintergrundexpression auf.

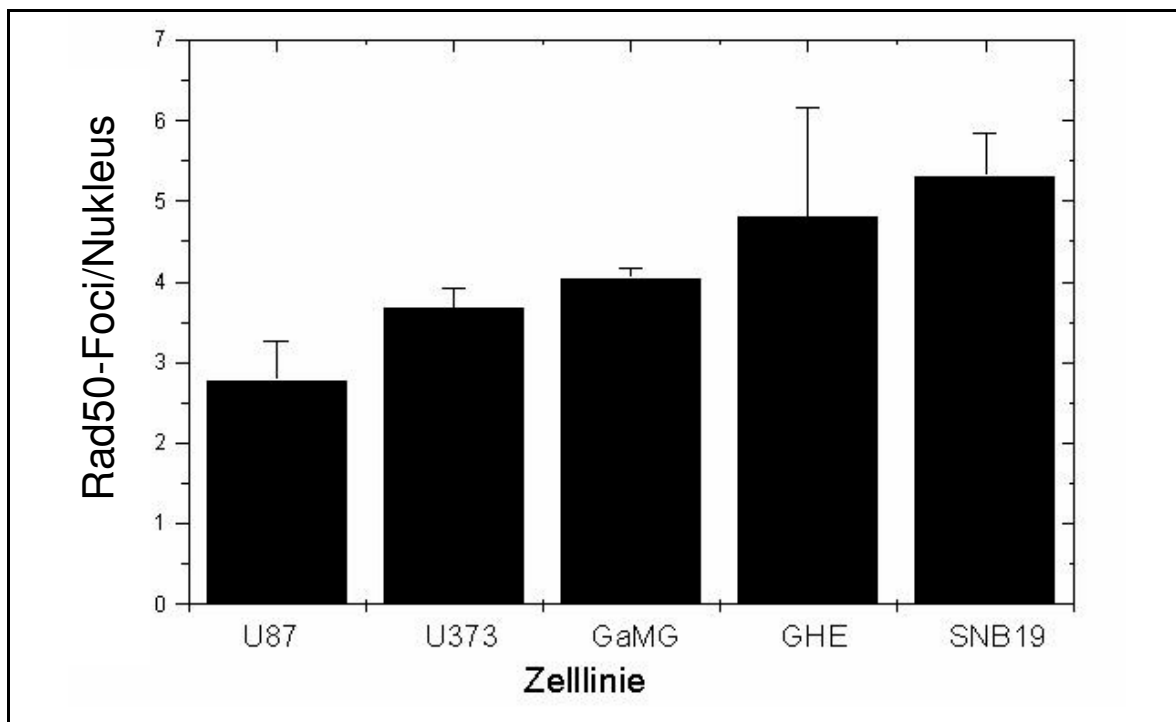


Abbildung 10: Anzahl der Rad50-Foci pro unbestrahlter unbehandelter Zelle. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von unbehandelten und unbestrahlten Zellen. Die Daten wurden aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen von mindestens 75 Zellen mit der computerunterstützten Auszählung ermittelt.

In Tabelle 10 ist die Hintergrundexpression von Rad50 der einzelnen Glioblastomzelllinien nochmals in Zahlenwerten inklusive Standardabweichungen aufgelistet.

Tabelle 10: Die Anzahl von Rad50-Foci, ermittelt durch computerunterstütztes Auszählen der Foci bei unbestrahlten, unbehandelten Zelllinien aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit Auswertung von mindestens 75 Zellen pro Versuch

Zelllinie	Rad50-Foci/Kontrollzelle
U87	2,8 ± 0,5
U373	3,7 ± 0,3
GHE	4,8 ± 1,4
GaMG	4,0 ± 0,1
SNB19	5,3 ± 0,5

3.3.2 Expression von Rad50-Protein nach CPT-Behandlung

Nach Behandlung mit CPT ist die Anzahl der Rad50-Foci stark angestiegen (Abbildung 11, Tabelle 11). Abbildung 11 präsentiert die Mittelwerte samt Standardabweichungen je Zelllinie nach Behandlung mit CPT (150 nM, 3 h). Die Anzahl der Rad50-Foci bei U373-Zellen bewegt sich unter CPT-Einwirkung im Bereich von 7,2 Rad50-Foci pro Nukleus, bei den Zelllinien U87 und GaMG liegt er zwischen 8 und 9 Foci und SNB19 weist eine Rad50-Foci-Anzahl von im Durchschnitt 10,7 pro Zellkern auf. GHE zeigte die größte Rad50-Expression nach CPT-Behandlung mit rund 30,5 Foci pro Zellnukleus.

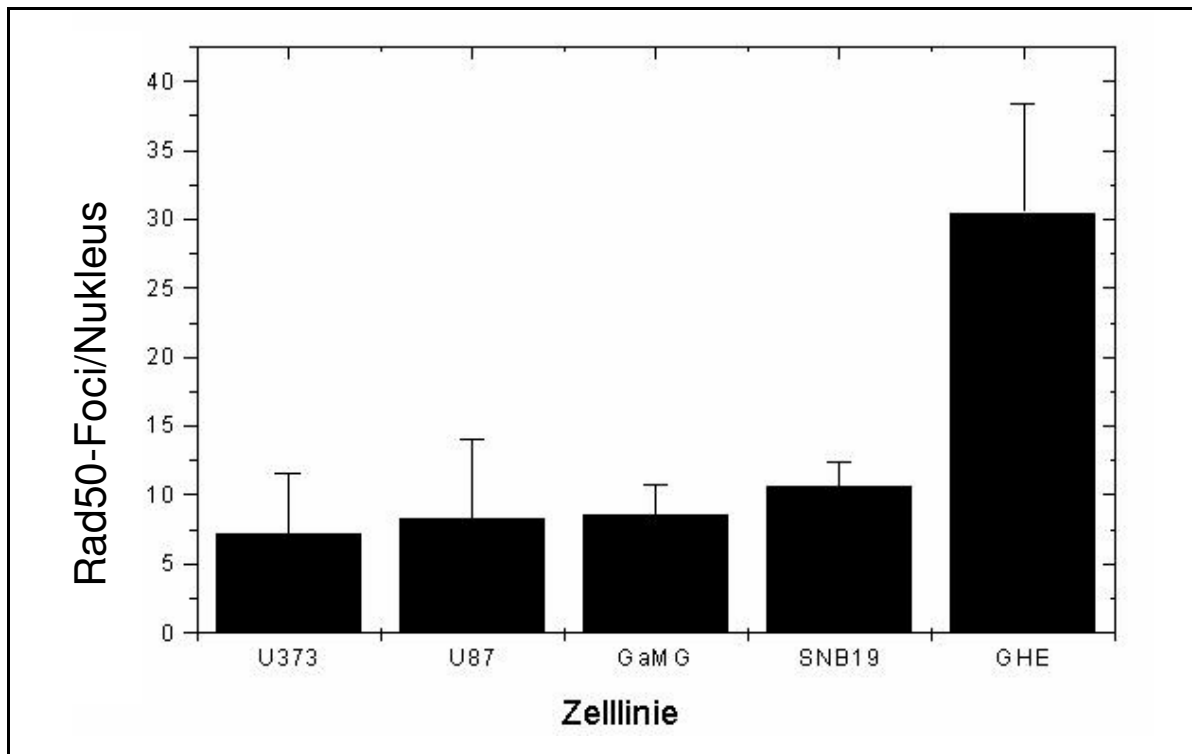


Abbildung 11: Anzahl von Rad50-Foci nach CPT-Behandlung. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\pm SD) der fünf Glioblastomzelllinien zum Zeitpunkt 30 Minuten mit alleiniger CPT-Behandlung (150 nM, 3 h). Die Daten wurden aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen von 75-100 Zellen gewonnen.

Tabelle 11 bietet nochmals einen numerischen Überblick über die in Abbildung 11 präsentierten Daten.

Tabelle 11: Anzahl der Rad50-Foci nach CPT-Behandlung (150 nM). Die Daten werden in Form von Mittelwerten (\pm SD) aus mindestens zwei Einzelversuchen von je 75-100 Zellen präsentiert

Zelllinie	Anzahl der Rad50-Foci nach CPT-Behandlung
U87	8,3 \pm 5,8
U373	7,2 \pm 4,4
GHE	30,5 \pm 7,9
GaMG	8,6 \pm 2,1
SNB19	10,7 \pm 1,7

3.3.3 Expression von Rad50-Protein nach ionisierender Bestrahlung

In diesem Versuchsabschnitt werden die Anzahl von Rad50-Foci nach einer Bestrahlung der verschiedenen Zelllinien mit 2 Gy und Reparaturzeiten bis zu 18 Stunden ermittelt. Die initialen Rad50-Foci (nach 30 Minuten Reparaturzeit) sind in den Zelllinien U87 und SNB19 mit durchschnittlich 10,6 und 7,8 Foci pro Zellkern am höchsten. Mit Durchschnittswerten von 6,0 und 5,4 Foci folgen ihnen die Zelllinien U373 und GaMG nach. Den geringsten Mittelwert an initialen Rad50-Foci nimmt GaMG mit 5,4 ein. 18 Stunden nach der Bestrahlung variieren die jeweiligen Mittelwerte der fünf Glioblastomzelllinien zwischen 2,2 und 2,9 Foci pro Zellkern.

In den Abbildungen 12, 13 und 14 werden repräsentative Bilder von drei (U87, GaMG, U373) der fünf untersuchten Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung mit 2 Gy zu unterschiedlichen Reparaturzeiten (30 min, 2 h, 18 h) gezeigt.

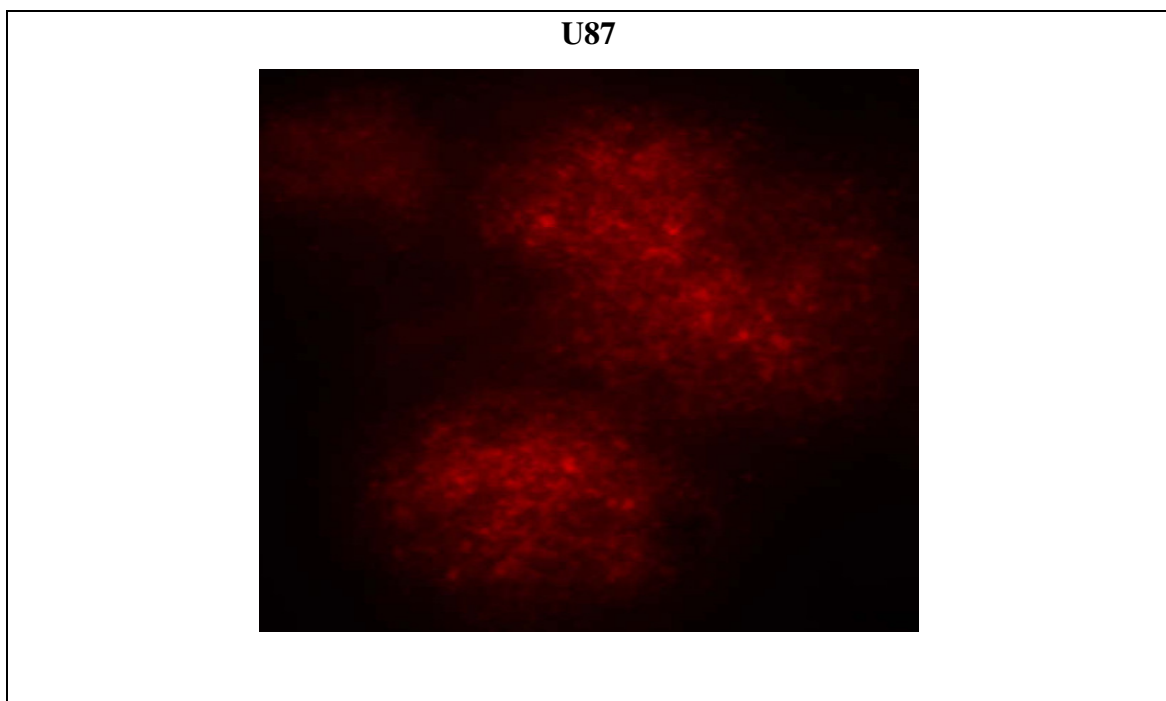


Abbildung 12: Repräsentative Aufnahmen der Rad50-Foci in Zellkernen der Zelllinie U87 nach einer Bestrahlung mit 2 Gray und 30 min Reparaturzeit.

Dabei ist eine reparaturbedingte Abnahme der Rad50-Foci nach einem Maximum der Foci bei 30 Minuten zu erkennen.

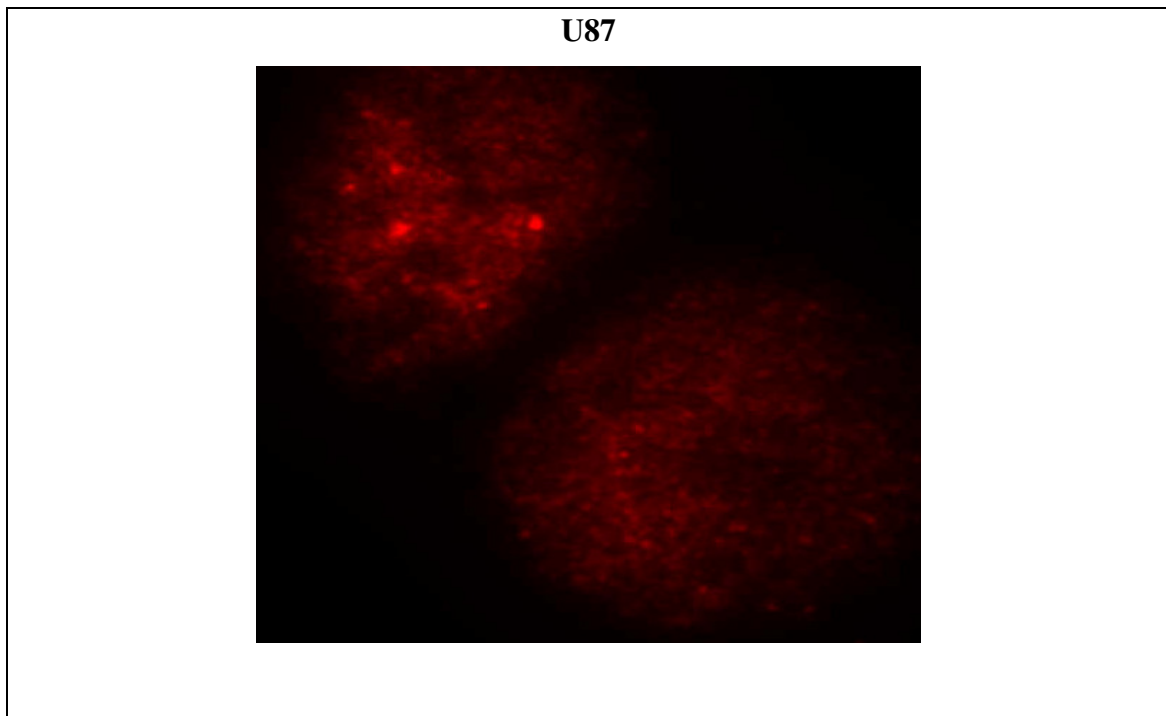


Abbildung 13: Repräsentative Aufnahmen der Rad50-Foci in Zellkernen der Zelllinie U87 nach einer Bestrahlung mit 2 Gray und 2 h Reparaturzeit.

Gleichzeitig ist eine Größenprogredienz der einzelnen Foci mit zunehmender Reparaturzeit zu verzeichnen. Dies kann besonders gut in den Zelllinien GaMG und U373 beobachtet werden (Abbildung 14). Die Reparaturzeit gibt die Zeit zwischen Bestrahlung und Fixierung der Zellen in 70%igem, -20°C kaltem Ethanol an.

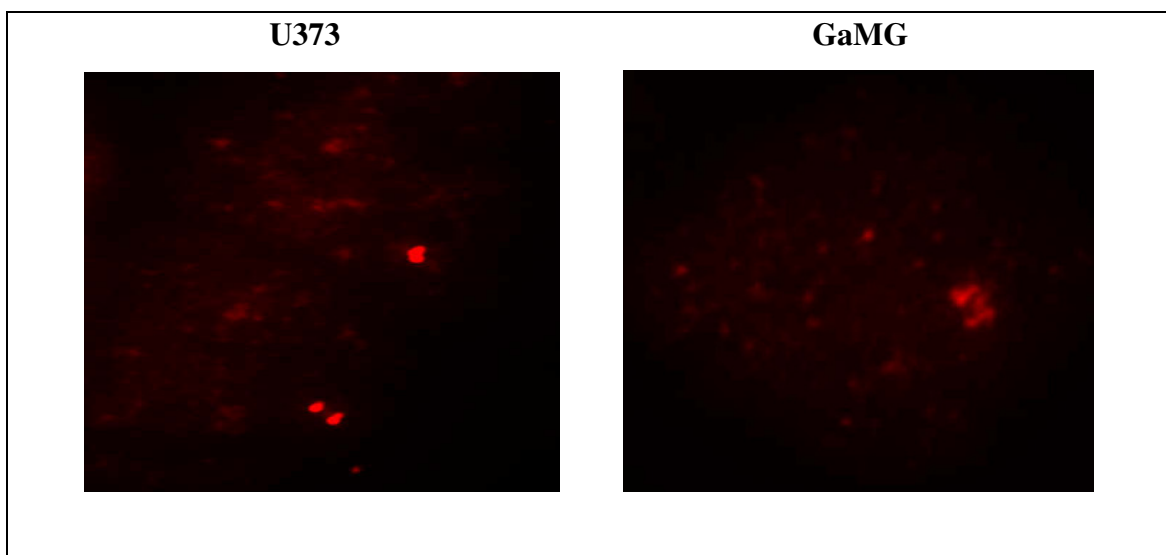


Abbildung 14: Repräsentative Aufnahmen der Rad50-Foci in Zellkernen der Zelllinien U373 und GaMG nach einer Bestrahlung mit 2 Gray und 18 h Reparaturzeit.

3.3.4 Expression von Rad50-Protein nach kombinierter Behandlung mit CPT und ionisierender Strahlung

In diesem Abschnitt des Experiments wurden die fünf Glioblastomzelllinien mit 150 nM des Chemotherapeutikums CPT vorbehandelt und im Anschluss nach einer Einwirkzeit von 3 Stunden einer Bestrahlung mit 2 Gy ausgesetzt. Dabei liegt die GaMG-Zelllinie mit einem durchschnittlichen Wert von 17,9 Foci pro Nukleus bei Bestimmung der initialen Rad50-Foci (30 min nach Bestrahlung mit 2 Gy und CPT-Vorbehandlung) an erster Stelle. SNB19 und U87 folgen dieser mit Mittelwerten um die 16,8 Rad50-Foci je Zellkern. Mit durchschnittlich 10-12 Foci liegen die Zelllinien U373 und GHE bei den initialen Foci im unteren Bereich. Die residualen Rad50-Foci (18 h nach Bestrahlung mit 2 Gy und CPT-Vorbehandlung) variieren bei den Zelllinien U373, SNB19, GHE und U87 in einem Spektrum von 3,8-5,9 Foci und bei GaMG in einem Bereich von 7,5 Foci pro Zellnukleus.

In den Abbildungen 15 und 16 sind nochmals repräsentative Bilder der Zelllinien GaMG und U373 nach Bestrahlung mit 2 Gy und Vorbehandlung mit CPT (150 nM, 3 h) aufgezeigt.

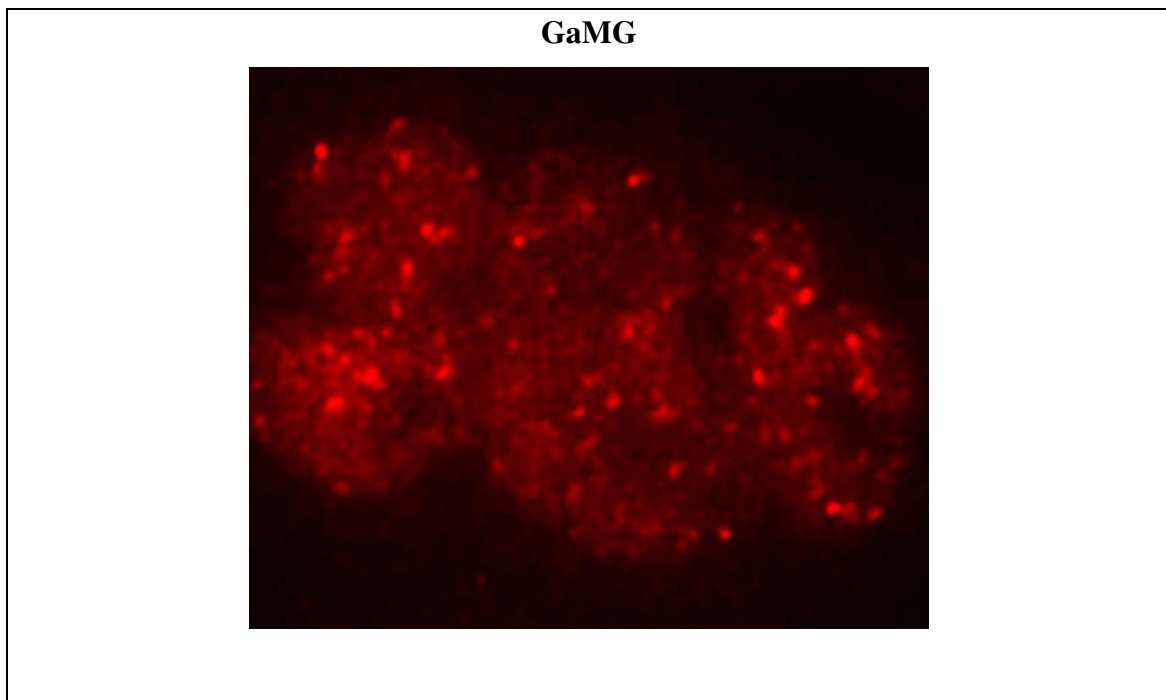


Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen der Rad50-Foci in Zellkernen der Zelllinie GaMG nach einer Bestrahlung mit 2 Gray und Vorbehandlung mit CPT (150 nM, 3 h) und 30 min Reparaturzeit.

Ebenso wie bei den Bildern nach alleiniger Bestrahlung mit 2 Gy weisen auch hier die Zelllinien mit Zunahme der Reparaturzeiten einen reparaturbedingten Abbau der Rad50-Foci auf. Ebenfalls nehmen die einzelnen Foci im Verlauf an Größe zu. Dies kann wiederum v.a. in den Linien GaMG und U373 (Abbildung 16) gut beobachtet werden.

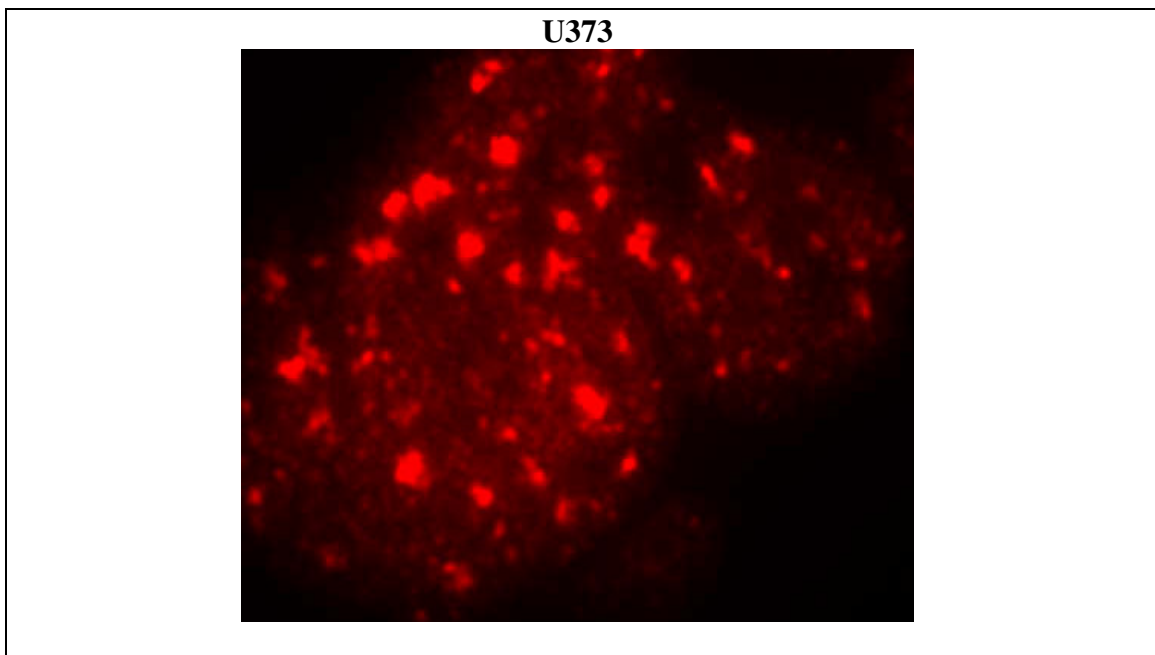


Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der Rad50-Foci in Zellkernen der Zelllinie U373 nach einer Bestrahlung mit 2 Gray und Vorbehandlung mit CPT (150 nM, 3 h) und 18 h Reparaturzeit.

3.3.5 Kinetik der DNA-Reparatur nach kombinierter Behandlung mit CPT und ionisierender Strahlung

Die Auswertung der Rad50-Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 18 h) nach alleiniger Bestrahlung bzw. nach kombinierter CPT-IR-Behandlung ermöglicht die Kinetik der DNA-Reparatur für die unterschiedlichen Glioblastomzelllinien zu bestimmen. In Abbildung 17 kann man erkennen, dass bei U87 und SNB19 durch die kombinierte CPT-IR-Behandlung eine Verlängerung der Reparaturhalbwertszeit resultiert.

Rad50-Foci/Nukleus

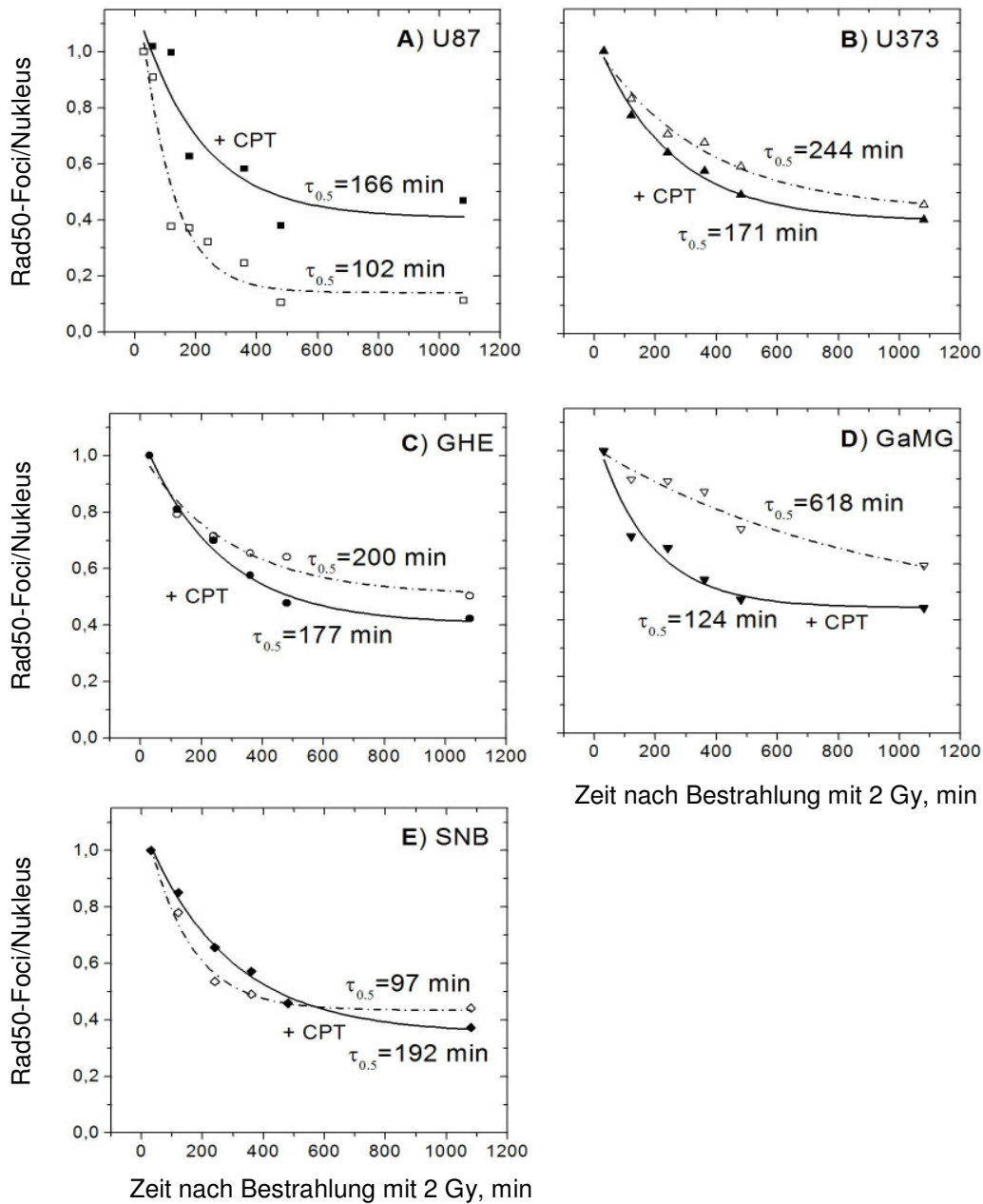


Abbildung 17: Kinetik der DNA-Reparatur ermittelt durch Rad50-Foci der 5 Glioblastomzelllinien bis zu einer Reparaturzeit von 18 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die Daten wurden auf den jeweiligen Mittelwert der initialen Expression von Rad50-Foci der 5 Zelllinien normiert. Die Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt. Die gefüllten und leeren Symbole geben einerseits die Zellen nach CPT-IR-Behandlung und andererseits die nur mit ionisierender Strahlung behandelten Zellen wieder [Djuzenova, Güttler, Berger et al., 2008]. Reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Landes Bioscience.

Bei SNB19 beträgt sie nach CPT-Vorbehandlung rund 192 Minuten, im Vergleich zu 97 Minuten in Kontrollzellen. U87 weist nach CPT-Vorbehandlung eine Reparaturhalbwertszeit von 166 Minuten und ohne CPT eine von 108 Minuten auf. Bei den restlichen Zelllinien kann keine Verlängerung der Reparaturhalbwertszeiten nach CPT-Vorbehandlung festgestellt werden. Bei U373, GHE und GaMG kommt es zu einer Verkürzung der Reparaturhalbwertszeiten von 244 auf 171 Minuten für U373, von 200 auf 177 Minuten für GHE und von 618 auf 124 Minuten für GaMG. Aus den in Abbildung 17 gezeichneten Graphen lassen sich die unterschiedlichen Reparaturhalbwertszeiten nach alleiniger Bestrahlung bzw. nach kombinierter CPT-IR-Behandlung ablesen. Die Daten wurden dabei auf den Mittelwert der jeweiligen initialen Rad50-Foci-Anzahl pro Zellkern (2 Gy, 30 min, bzw. 2 Gy, 30 min + CPT) normiert. Die Kurven sind mit einer monoexponentialen Funktion angefitet. Die Reparaturhalbwertszeiten sind über bzw. unter der jeweiligen Kurve in der Graphik vermerkt.

In Tabelle 12 werden abschließend nochmals alle Parameter, die die Induktion und den Abbau der Rad50-Foci in den bestrahlten mit und ohne CPT-behandelten Glioblastomazelllinien widerspiegeln, numerisch samt ihrer Standardabweichungen aufgelistet. Zusätzlich ist ein Faktor, der sich aus der Reparaturhalbwertszeit mit und ohne CPT-Vorbehandlung errechnen lässt, aufgelistet, aus dem sich eine Verlängerung bzw. eine Verkürzung der Reparaturhalbwertszeiten unter CPT-Einwirkung ablesen lässt. U87 und SNB19 variieren in einem Faktor-Bereich von 1,6-2,0 und U373, GaMG und GHE erstrecken sich über einen Bereich von 0,2-0,9. Die letzte Spalte der Tabelle 12 gibt die Reparaturkapazitätssteigerung nach CPT-Behandlung an.

Tabelle 12: Induktion und Abbau von Rad50-Foci (Mittelwerte \pm SD) nach alleiniger Bestrahlung bzw. nach kombinierter CPT-IR-Behandlung aus mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen mit Auswertung von 75-100 Zellen für jeden Zeitpunkt. Zusätzlich sind die Reparaturhalbwertszeiten, sowie ein Faktor, der die Verkürzung (<1) bzw. die Verlängerung (>1) der Reparaturhalbwertszeiten widerspiegelt, angegeben, ebenso wie die Reparaturkapazitätssteigerung nach CPT-Vorbehandlung.

Zelllinie	Hintergrund Rad50-Foci/Nukleus 0 Gy, 30 min	Initiale Rad50-Foci/Nukleus 2 Gy, 30 min	Residuale Rad50-Foci/Nukleus 2 Gy, 18 h	Residuale Rad50-Foci %	Reparaturhalbwertszeit, min	Faktor $(\tau_{1/2} + \text{CPT}) / (\tau_{1/2} - \text{CPT})$	Reparaturkapazitätssteigerung nach CPT-Behandlung
U87	2,8 \pm 0,5	10,6 \pm 1,3	2,4 \pm 1,3	18%	102 \pm 60	1,6	-
U87+CPT	8,3 \pm 5,8	16,8 \pm ,0	5,9 \pm 2,1	41%	166 \pm 60		
U373	3,7 \pm 0,3	6,0 \pm 3,0	2,5 \pm 2,0	42%	244 \pm 80	0,7	+
U373+CPT	7,2 \pm 4,4	10,0 \pm 3,6	3,8 \pm 2,2	38%	171 \pm 80		
GHE	4,8 \pm 1,4	5,0 \pm 0,6	2,7 \pm 0,6	54%	200 \pm 85	0,9	+
GHE+CPT	30,5 \pm 7,9	12,0 \pm 1,0	5,7 \pm 2,5	48%	177 \pm 143		
GaMG	4,0 \pm 0,1	5,4 \pm ,0	2,2 \pm 2,0	41%	618 \pm 200	0,2	+
GaMG+CPT	8,6 \pm 2,1	17,9 \pm 2,5	7,5 \pm 2,5	42%	124 \pm 80		
SNB	5,3 \pm 0,5	7,8 \pm 2,0	2,9 \pm 1,4	37%	97 \pm 50	2,0	-
SNB+CPT	10,7 \pm 1,7	16,8 \pm 3,0	5,1 \pm 2,8	30%	192 \pm 160		

3.4 Analyse der Expression von intrazellulärem Survivin, cleaved Caspase 3, p53 und DNA-TopoI-Proteine mittels Western Blot

Da die CPT-Vorbehandlung stark die Radiosensibilität in den verschiedenen Glioblastomzelllinien erhöht hat, wäre es sinnvoll die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen mittels Western Blot zu untersuchen.

Die fünf Glioblastomzelllinien wurden auf die Expression von intrazellulärem Survivin, cleaved Caspase 3, p53 und DNA-TopoI-Protein nach alleiniger Bestrahlung bzw. CPT-Behandlung sowie nach kombinierter CPT-IR-Behandlung untersucht. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, ist die Expression von intrazellulärem Survivin in den Kontrollzellen von U87 sowie nach CPT-Vorbehandlung viel höher (0,5 und 0,57 a.u.) als diejenige nach alleiniger Bestrahlung (0,22 a.u.) oder nach kombinierter CPT-IR-Behandlung (0,23 a.u.). Abbildung 18 zeigt, dass die Expression des anti-apoptotischen

Proteins Survivin sowohl in bestrahlten als auch in CPT-behandelten und bestrahlten U87-Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung niedriger war als in den Kontrollzellen und nach CPT-Behandlung. Die gemessenen Werte bewegen sich in einem Bereich von 0,5-0,6 a.u. in Kontrollzellen und CPT-behandelten Zellen und zwischen 0,22 und 0,23 a.u. für bestrahlte sowie mit Bestrahlung und CPT-behandelten U87-Zellen. Hingegen weisen U373, GHE und SNB19-Zellen sowohl in bestrahlten (1,2-2,2 a.u.) als auch in bestrahlten und CPT-behandelten (1,5-2,4 a.u.) Zellen eine höhere Expression auf als in den dazugehörigen Kontrollzellen (0,7-2 a.u.). Die Zelllinie GaMG zeigte annähernd unveränderte Ausprägungen von intrazellulärem Survivin in allen Behandlungsmodalitäten im Bereich von 1,9-2,1 a.u. In den Zelllinien U373, GHE und SNB19, in denen zuvor eine erhöhte Expression von intrazellulärem Survivin in den bestrahlten und zuvor mit CPT-behandelten Zellen ermittelt worden war, liegen nun bei der Bestimmung des Apoptose-Markers cleaved Caspase 3 erhöhte Werte von 0,3-1,4 a.u. vor. Im Gegensatz dazu weisen U87 und GaMG kaum detektierbare Expressionswerte für cleaved Caspase 3 auf. Die Expression von p53 variiert deutlich unter den fünf Glioblastomzelllinien. In der U87-Kontrollgruppe zeigt sich eine nur sehr schwache Expression von p53 im Bereich von 0-0,01 a.u., was ein typisches Zeichen von Glioblastomzellen des p53-Wildtyps (p53 wt) ist. Die höchsten Hintergrundwerte für p53 wurden bei SNB19 und U373 gemessen. Diese befinden sich in einem Bereich von 0,82 und 1,15 a.u.. Die unterschiedlichen Behandlungsoptionen rufen lediglich wenige bis keine Veränderungen in der Expression von p53 in allen Zelllinien hervor.

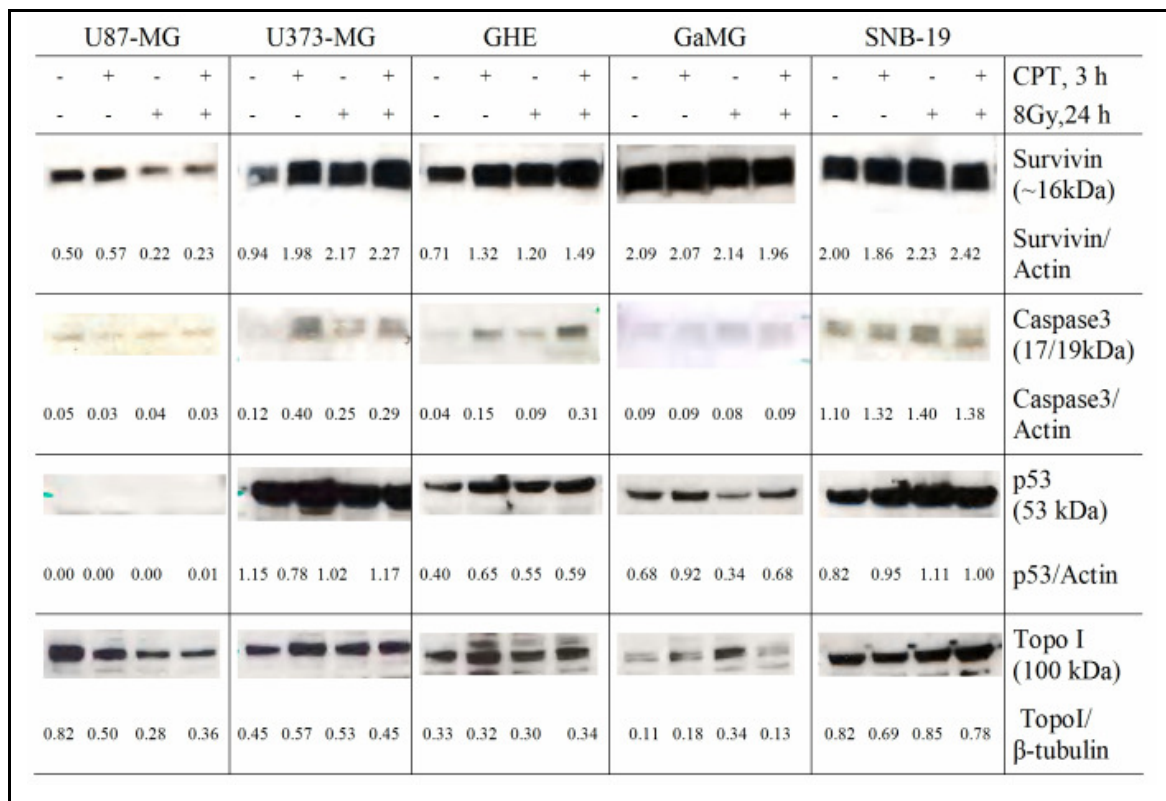


Abbildung 18: Western Blot-Analyse der Expression von intrazellulärem Survivin, cleaved Caspase 3, p53 und TopoI-Protein in unbehandelten, CPT-behandelten und/oder bestrahlten Glioblastomzelllinien. Jede einzelne Proteinbande wurde zur Intensität von β -Aktin oder β -Tubulin normiert [Djuzenova, Güttler, Berger et al., 2008]. Reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Landes Bioscience.

Ebenso wie bei p53 variiert auch die Expression von TopoI beträchtlich in allen fünf Zelllinien. U87 und SNB19 werden mit den höchsten Hintergrundwerten für TopoI in Abbildung 18 abgebildet. Die Werte befinden sich für diese beiden Zelllinien im Bereich von 0,8 a.u., während hingegen die Werte für die Kontrollzellen von U373, GHE und GaMG zwischen 0,1-0,45 a.u. schwanken. 24 Stunden nach Behandlung mit CPT tritt eine Abnahme der TopoI-Ausprägung lediglich in der U87-Zelllinie auf. In den übrigen Zelllinien macht sich keine Beeinträchtigung der TopoI-Ausprägung nach CPT-Behandlung bemerkbar.

4. Diskussion

Das Glioblastoma multiforme stellt den aggressivsten primären Hirntumor mit einem mittleren Überleben von 10-12 Monaten und einem 1-Jahresüberleben von ca. 30-40 % dar. Die Behandlung derartiger Tumoren setzt sich häufig aus einem interdisziplinären Therapiekonzept zusammen, bestehend aus operativer Resektion, postoperativer Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie. Im Allgemeinen hat die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie, sei es in einer Einfach- oder in einer Mehrfachkombination, nicht den gewünschten Durchbruch in der Behandlung von malignen Gliomen mit Ausnahme der Oligodendrogliome verschafft. Die zusätzliche Überlebenszeit beträgt lediglich wenige Monate [Kleihues et al., 2000]. Aus diesem Grund sind verschiedene Chemotherapeutika in Erprobung, die dabei helfen sollen das Langzeitüberleben über ein Jahr hinaus zu verlängern. Zu diesen zählt auch CPT mit dessen Derivaten, deren radiosensibilisierender Effekt bereits in zahlreichen anderen Studien belegt werden konnte [Chen et al., 1997, 1999, 2004] und der ebenfalls im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht. Es wird versucht über die Bestimmung der Zellüberlebensrate im Koloniebildungstest, der Ermittlung der Kinetik der DNA-Reparatur mittels Rad50-Foci und über die Messung von pro- und anti-apoptotischen Proteinen (Survivin, cleaved Caspase 3, p53) sowie über die Expression von TopoI mittels Western Blot einen potentiellen radiosensibilisierenden Effekt von CPT auf die unterschiedlichen Glioblastomzelllinien nachweisen zu können.

Im Koloniebildungstest kann bei den Zelllinien U87 und SNB19 eine zytotoxische Wirkung von CPT in Kombination mit ionisierender Strahlung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6). Die übrigen Zelllinien, U373, GHE und GaMG, lassen hingegen nach der CPT-IR-Behandlung keine Reduktion der Überlebensrate gegenüber unbehandelten Zellen im Verlauf der Überlebenskurven erkennen. Dies kann ein Hinweis auf eine Resistenz dieser drei Zelllinien gegenüber der kombinierten CPT-IR-Behandlung sein.

Die Überlebensraten bei der Zellauszählung, die zusätzlich in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, zeigten vergleichbare Ergebnisse [Djuzenova et al., 2008]. Auch dort zeigte sich ein entsprechender radiosensibilisierender Effekt nach kombinierter CPT-IR-Behandlung lediglich in den Zelllinien U87 und SNB19.

Diese Ergebnisse lassen auf einen radiosensibilisierenden Effekt von CPT in den beiden Zelllinien U87 und SNB19 schließen. Weitere Experimente sollten die Mechanismen der Strahlenempfindlichkeit CPT-behandelter Zellen untersuchen.

Bereits Rave-Fränk et al. [2002] konnten unter anderem mit der Zelllinie U373-MG bei Durchführung eines Koloniebildungstests nach Bestrahlung und Behandlung mit unterschiedlichen Topotecan-Dosen, die stets 15 Minuten vor und entweder eine Stunde (short-term) nach oder 24 Stunden (long-term) nach Bestrahlung verabreicht wurden, eine konzentrations- und zeitabhängige Reduktion des klonogenen Zellüberlebens für Topotecan allein ermitteln. In derselben Studie konnte Topotecan ebenfalls als Radiosensitizer für alle getesteten Zelllinien, unter denen sich auch U373-MG befand, identifiziert werden [Rave-Fränk et al., 2002].

Ein Grund für die radiosensibilisierende Wirkung von CPT in zwei von fünf getesteten Zelllinien kann die Erhöhung der DNA-Schäden sein, die mittels Histon γ H2AX in unserer Arbeitsgruppe [siehe Dissertation von T. Güttler und Djuzenova et al., 2008] gemessen wurde. Demzufolge sind zwei Subpopulationen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Ansprechen auf CPT gemessen worden, die mittels Durchflusszytometrie über Bestimmung des γ H2AX-Gehalts parallel ermittelt wurden [Djuzenova et al., 2008]. Die eine Subpopulation, die auf CPT ansprach, bestand hauptsächlich aus den Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Ein Grund, der das Auftreten von zwei Subpopulationen je Zelllinie erklären würde, könnten zellzyklusphasenabhängige Variationen in der Sensitivität der einzelnen Zellen gegenüber CPT sein, obwohl es immer noch fraglich ist, ob CPT in einer speziellen Zellzyklus-Phase angreift [Djuzenova et al., 2008]. Horwitz et al. [1973] entdeckten bei der Untersuchung von HeLa-Zellen, dass diese, wenn sie in der G₁-Phase mit CPT behandelt wurden, zu dem selben Ausmaß gelangten wie unbehandelte Kontrollzellen, während hingegen die Zellen, die in der S-Phase mit CPT versehen wurden, keine Zellteilungen in den folgenden 60 Stunden durchlaufen konnten, wodurch eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen war [Horwitz et al., 1973]. O'Connor et al. [1991] hingegen beobachteten bei ihrer Studie an humanen Kolon-Karzinomzellen HT-29, dass nach einer 30-minütigen Behandlung mit CPT 90-95 % der Zellen vernichtet wurden, obwohl sich lediglich 21 % der Zellen zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befanden [O'Connor et al., 1991]. Es wurde entdeckt, dass sich die Mengen an TopoI, welche den Angriffspunkt von CPT darstellt, mit der Resistenz gegenüber CPT korrelieren lassen. Davis et al. [1998] berichteten in einer Studie über

Brustkrebszelllinien, dass ein niedriges Level an TopoI-Protein und dessen enzymatische Aktivität mit einer erhöhten Resistenz gegenüber CPT assoziiert werden kann [Davis et al., 1998]. Dieser Sachverhalt fand sich ebenfalls in der in 2007 veröffentlichten Studie von Naniwa et al., in der es u.a. um die Chemosensitivität von CPT-11 in Kombination mit Cisplatin (CDDP) in Ovarial-Karzinomzellen ging [Naniwa et al., 2007]. Wenn man in Betracht zieht, dass, über den gesamten Zellzyklus verteilt, relativ konstante Ausprägungen an TopoI bestehen [Hsiang et al., 1988], lässt sich die vermutete S-Phasen-Spezifität von CPT [Horwitz et al., 1973; Li et al., 1972] nicht allein über TopoI-Expressionsmengen erklären. Daher könnte das Auftreten der unterschiedlichen Subpopulationen nach CPT-Behandlung nicht allein zellzyklusphasenabhängig sein, sondern die über CPT-vermittelten DNA-Schäden, könnten auch zelllinienspezifisch begründet sein [Djuzenova et al., 2008]. Zudem verstärkte CPT signifikant die strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche in den Zelllinien U87 und SNB19, jedoch nicht in den Zelllinien U373, GHE und GaMG (Abbildungen 6 und 7), die mittels Zellwachstum und Koloniebildungstest als CPT-resistent identifiziert werden konnten.

Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die Expression von extrazellulärem Survivin in den Zelllinien GHE und U373 nach 48 Stunden und in den Zelllinien GaMG und U373 nach 96 Stunden (siehe Abbildungen 8 und 9) erhöht ist. Die Zelllinien SNB19 und U87 jedoch, weisen jeweils zu beiden Messzeitpunkten niedrigere Survivin-Konzentrationen auf (siehe Tabellen 8 und 9). Vergleicht man die Ergebnisse des Koloniebildungstests und der in unserer Arbeitsgruppe ermittelten Zellauszählung mit denen, die aus dem Survivin-ELISA gewonnen wurden, kann man sehen, dass die Ergebnisse im Hinblick auf das Verhältnis der Survivin-Konzentrationen und der Reduktion der Zellüberlebensraten nach kombinierter CPT-IR-Behandlung korrelieren. SNB19 und U87 ließen im Koloniebildungstest und in der Zellauszählung eine Abnahme der Überlebenskurven bzw. eine Reduktion der Zellproliferation nach kombinierter CPT-IR-Behandlung erkennen, was im Survivin-ELISA mit einer im Vergleich zu den übrigen Zelllinien verminderten Survivin-Konzentration einherging. Somit konnte sowohl im Koloniebildungstest und der Zellauszählung, als auch im Survivin-ELISA ein radiosensibilisierender Effekt von CPT in den beiden Zelllinien SNB19 und U87 nachgewiesen werden.

Wenn man nun die über den Western Blot bestimmten Werte an intrazellulärem Survivin betrachtet, fällt auf, dass die Zelllinien U373, SNB19 und GHE mit einem bis teilweise zweifachen Anstieg der Survivin-Konzentrationen nach kombinierter CPT-IR-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einhergehen, während hingegen bei U87 die Konzentrationen an intrazellulärem Survivin nach erfolgter Bestrahlung und kombinierter CPT-IR-Behandlung im Vergleich zu Kontroll- und CPT-vorbehandelten Zellen um ca. die Hälfte abnehmen. Im Gegensatz hierzu weist GaMG im Western Blot über das gesamte Behandlungsspektrum weitgehend gleichbleibende Survivin-Konzentrationen auf. Jedoch ist auch hier beim Vergleich der Absolutwerte der Survivin-Konzentrationen nach kombinierter CPT-IR-Behandlung ein deutlich verminderter Survivin-Wert bei der Zelllinie U87 zu erkennen, was wiederum mit den Ergebnissen des Koloniebildungstests, der Zellauszählung und des Survivin-ELISA's korreliert. In diversen Forschungsarbeiten [Quick, 2008; Kucukzeybek et al., 2008], in denen man die Expression von Survivin in unterschiedlichen Tumorzelllinien untersuchte, wurden einige andere chemotherapeutische Wirkstoffe ausgetestet. In einem Großteil dieser Arbeiten wurde eine Abnahme von Survivin nach erfolgter Behandlung verzeichnet. So wurde zwar eine Survivin-Abnahme in p53 mutierten Glioblastomzelllinien, nicht aber in p53-Wild-Typ Glioblastomzellen, nach erfolgter Behandlung mit Etoposid B entdeckt [Quick, 2008]. Ebenso beschrieben Kucukzeybek et al. [2008] bei ihrer Forschung an der hormon- und chemoresistenten Prostatakrebszelllinie, DU-145, einen verstärkenden Effekt der Docetaxel-induzierten Zytotoxizität und Apoptose durch ATRA (all-trans retinoic acid), der unter anderem in einer Survivin-Abnahme resultierte. Zhang et al. [2006] führten eine Studie an Ovarialtumorzelllinien durch, von denen zwei Zelllinien (SKOV-3, OVCAR-3) chemoresistent und eine (OV2008) chemosensitiv waren. Diese wurden entweder für 24 Stunden mit CDDP behandelt, alleinig mit 2 Gy bestrahlt oder für drei Stunden mit CDDP und einer Bestrahlung von 2 Gy versehen. In SKOV-3 und OVCAR-3 wurde nach den jeweiligen Behandlungen ein Anstieg von Survivin verzeichnet während die Apoptoseraten in diesen Zelllinien keine Veränderung zeigten. In OV2008 hingegen konnte eine Survivin-Abnahme mit gleichzeitigem Anstieg der Apoptoserate sowohl nach erfolgter CDDP-Behandlung als auch nach der Kombinationstherapie ermittelt werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse an Survivin in den soeben aufgezählten Studien gegenüber der vorliegenden Arbeit könnten zum einen durch die unterschiedlichen chemotherapeutischen Reagenzien, die nicht zur Gruppe der TopoI-

Inhibitoren zählen begründet sein. Zum anderen könnten auch die unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den jeweiligen Chemotherapeutika (24 Stunden CDDP-Einwirkung bei Zhang et al., 2006 im Vergleich zu drei Stunden CPT-Einwirkung in der vorliegenden Studie) für die abweichenden Resultate verantwortlich sein. Des Weiteren können die in diesen Studien verwendeten Methoden (z.B. Immunfluoreszenz und ELISA bei Quick et al., 2008) je nach Anleitung des Herstellers unterschiedlich ausgeführt werden und in der Folge eine Ursache für die abweichenden Ergebnisse darstellen. Außerdem könnten die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle (Einfach-, Mehrfachchemotherapie vs. kombinierte CPT-IR-Behandlung), die in den Studien Anwendung fanden und bei denen sowohl unterschiedliche Chemodosen bei diversen Chemotherapeutika als auch lediglich eine Bestrahlung mit 2 Gy zum Einsatz kamen, diese Abweichungen bewirken. Daneben könnten auch zelllinienspezifische Unterschiede (p53-Mutante vs. p53-Wild-Typ, Quick et al., 2008) eine Rolle in der unterschiedlichen Expression von Survivin in den fünf Glioblastomzelllinien spielen.

Ein weiterer Faktor, der Unterschiede in der Radiochemosensibilität der fünf Glioblastomzelllinien aufzeigt, konnte über Bestimmung der DNA-Reparatur ermittelt werden.

Wir haben gezeigt, dass sich die Anzahl der Foci des DNA-Reparaturproteins Rad50 nach CPT-Behandlung um den Faktor 2 bis 6 erhöht. Wenn man nun den Rad50-Hintergrund der einzelnen Glioblastomzelllinien mit dem Hintergrund an Histon γ H2AX, der mittels Durchflusszytometrie parallel in unserer Arbeitsgruppe bestimmt wurde, vergleicht, fällt auf, dass sich die unbestrahlten, unbehandelten Zellen doch entscheidend voneinander abheben.

Die Expression von Rad50-Foci nach alleiniger Behandlung mit CPT ist bei der Zelllinie GHE mit Abstand am größten. SNB19, GaMG, U87 und U373 erreichen drei- bis vierfach niedrigere Expressionen an Rad50. U373 weist dabei die niedrigste Konzentration an Rad50-Foci auf. Dies ergibt folgende Reihenfolge, beginnend mit der höchsten Expression von Rad50 nach Behandlung mit CPT: GHE > SNB19 > GaMG > U87 > U373 (siehe Abbildung 11 und Tabelle 11). Im Vergleich dazu verhalten sich die Kontrollzellen entsprechend ihrer Rad50-Expression folgendermaßen: SNB19 > GHE > GaMG > U373 > U87 (siehe Abbildung 10 und Tabelle 10). Wenn man nun diese Ergebnisse der Rad50-Expression nach CPT-Einwirkung mit denen für den γ H2AX-Gehalt nach CPT-Behandlung, die man parallel in unserer Arbeitsgruppe mittels

Durchflusszytometrie gewonnen hat, vergleicht, erhält man die nachstehende Reihenfolge: GaMG > U373 > SNB19 > GHE > U87 [Djuzenova et al., 2008]. Allein durch den Vergleich der Reihenfolgen kann auf keine eindeutige Korrelation geschlossen werden.

Allerdings im Vergleich der Kinetik der DNA-Reparatur der fünf getesteten Zelllinien stellte sich heraus, dass die Reparatur der DNA-Schäden, die über Rad50-Foci ermittelt wurde, in den Glioblastomzelllinien U373, GHE und GaMG nach erfolgter CPT-IR-Behandlung um einiges schneller als nach alleiniger Bestrahlung ablief (siehe Abbildung 17 und Tabelle 12). In den Zelllinien U87 und SNB19 konnten entgegengesetzt längere Reparaturhalbwertszeiten unter zusätzlicher Einwirkung von CPT nachgewiesen werden. Die Reparaturhalbwertszeiten nahmen um ca. 60 % bei U87 und ca. 100 % bei SNB19 im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu (siehe Abbildung 17 und Tabelle 12). Djuzenova et al. [2004] fanden in Experimenten an Hautfibroblasten von Krebspatienten mit einer verstärkten Hautreaktion gegenüber ionisierender Strahlung eine ähnliche Verlangsamung der DNA-Reparaturkinetik gemessen mittels Rad50-Foci heraus. Eine verlangsamte Kinetik der Reparatur der DNA-Schäden nach CPT-IR-Behandlung korreliert ebenfalls mit den Ergebnissen aus dem Survivin-ELISA. Dort gehen die durch längere Reparaturhalbwertszeiten gekennzeichneten, CPT-sensitiven Zelllinien U87 und SNB19 mit einer deutlich geringeren Menge an Survivin im Vergleich zu den übrigen Zelllinien einher. Aus der schnelleren Reparatur von DNA-Schäden in den Zelllinien U373, GaMG und GHE könnte ein vermindertes Ansprechen auf CPT als Radiosensitizer abgeleitet werden. Bao et al. [2006] berichteten, dass Krebsstammzellen gefunden wurden, die zu einer Radioresistenzentwicklung in Gliomen mittels einer begünstigten Aktivierung der DNA-Reparatur-Antwort und einer Erhöhung der DNA-Reparaturkapazität beitragen. Außerdem fanden Morandi et al. [2006] heraus, dass U87-MG-Zellen einer CPT-resistenten Sublinie eine stärkere Rad50-Expression aufzeigten als die ursprüngliche U87-Zelllinie, was eine schnellere DNA-Reparaturkinetik in CPT-resistenten Zelllinien U373, GHE und GaMG in unserer Studie unterstützen würde. Parallel in unserer Arbeitsgruppe konnte nach kombinierter CPT-IR-Behandlung durch CPT ebenfalls eine signifikant erhöhte Induktion von Doppelstrangbrüchen in U87 und SNB19 verzeichnet werden, nicht aber in den CPT-resistenten Linien U373, GHE und GaMG [Djuzenova et al., 2008].

Ein weiterer Faktor, der ein unterschiedliches Ansprechen der verschiedenen Glioblastomzelllinien auf kombinierte CPT-IR-Behandlung erklären könnte, ist die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen sowie DNA-TopoI.

Mittels Western Blot wurden die zellulären Marker wie cleaved Caspase 3, p53 und DNA-TopoI untersucht. Der Anstieg des anti-apoptotischen Proteins Survivin, das bereits zuvor diskutiert worden war, wurde in den Zelllinien GHE, U373 und SNB19 nach erfolgter CPT-IR-Behandlung von einem Anstieg des Apoptosemarkers cleaved Caspase 3 begleitet (siehe Abbildung 18). Man sollte jedoch nicht außer Acht lassen, dass die in der Durchflusszytometrie identifizierten Subpopulationen [Djuzenova et al., 2008], die nach CPT-Behandlung hohe Mengen an γ H2AX exprimierten, auch durchaus Zellen beinhalten könnten, die sich der Apoptose unterziehen. Bei Tanaka et al. [2007] wurde eine kleine Anzahl von apoptotischen HL-60 humanen Leukämiezellen drei Stunden nach Topotecan-Behandlung mit einer bivariaten Caspase 3 und Histon- γ H2AX-Färbung gefunden. Es sollte jedoch dabei auch berücksichtigt werden, dass Tanaka et al. [2007] ein Laser Scan Zytometer für die Messungen einsetzte, das sich durch hohe Sensitivität auszeichnet. Des Weiteren gehören die HL-60 humanen Leukämiezellen zu den Zelllinien, die leicht, nach Inkubation mit diversen Chemotherapeutika, die Apoptose durchlaufen [Solary et al., 1994]. Im Gegensatz dazu stammen die in der vorliegenden Studie verwendeten Zellen von malignen Gliomen, die in der Regel sehr resistent gegenüber Radiotherapie und Chemotherapie sind [Sathornsumetee et al., 2006].

Die Expression von p53 unterschied sich merklich in den fünf Glioblastomzelllinien. In U87 wies p53 lediglich eine Konzentration von 0,01 a.u. in der Kombinationstherapie auf. In den Kontrollzellen war es kaum messbar, was ein typisches Zeichen für Glioblastomzellen des p53-Wild-Typs ist [Quick et al., 2006]. Die höchste Expression von p53 in Kontrollzellen wurde in U373 und SNB19 gemessen (1,15 und 0,82 a.u.). In den unterschiedlichen Behandlungskonzepten konnten lediglich geringe bzw. keine Veränderungen bezüglich der p53-Expression erzielt werden (Abbildung 18). Wenn man die unterschiedlichen Ausprägungen von cleaved Caspase 3 und p53 in den fünf Glioblastomzelllinien betrachtet, konnten keine konkreten Korrelationen mit dem Koloniebildungstest und der Zellproliferation in Bezug auf p53 und cleaved Caspase 3 gefunden werden.

Bei Betrachtung der Ausprägung von TopoI fällt auf, dass die höchsten Expressionswerte für dieses Enzym in den Zelllinien U87 und SNB19 (0,82 a.u.)

gefunden wurden. In den anderen Zelllinien U373, GHE und GaMG wurden ca. zwei- bis achtfach niedrigere Werte ermittelt (siehe Abbildung 18). Wenn man nun die Daten für TopoI, die aus dem Western Blot gewonnen wurden, mit denen aus der Durchflusszytometrie [s. Doktorarbeit von Mitdotorandin T. Güttler] vergleicht, entdeckt man doch deutliche Übereinstimmungen. Die unbehandelten und unbestrahlten U87-Zellen weisen neben der SNB19-Zelllinie auch in der Durchflusszytometrie die höchsten Werte an TopoI auf. Die anderen drei Zelllinien zeigen, wie bereits im Western Blot, viel niedrigere Expressionswerte für TopoI. Daraus ergeben sich fast identische Reihenfolgen der Zelllinien bezüglich ihres TopoI-Hintergrunds: U87 = SNB19 > U373 > GHE > GaMG für den Western Blot (Abb. 18) und U87 > SNB19 > U373 > GaMG > GHE für die durchflusszytometrische Bestimmung der TopoI [s. Doktorarbeit von Mitdotorandin T. Güttler]. Diese Reihenfolgen für den TopoI-Hintergrund verhalten sich ähnlich aber zugleich invers zu dem parallel in unserer Arbeitsgruppe ermittelten Hintergrund an γ H2AX: GaMG > U373 > GHE > SNB19 > U87 [Djuzenova et al., 2008]. Aus diesen Reihenfolgen kann auf immense Unterschiede zwischen den fünf Glioblastomzelllinien geschlossen werden. Demzufolge zeigten U87 und SNB19, die bereits eine verlängerte Reparaturhalbwertszeit unter Zusatz von CPT aufwiesen, im Vergleich zu den restlichen Zelllinien, einen höheren Hintergrund an TopoI, dem Angriffspunkt von CPT, eine im Vergleich zu den übrigen Zelllinien niedrigere Survivin-Konzentration im Survivin-ELISA, und eine Reduktion der Überlebensraten im Koloniebildungstest und in der Zellauszählung. Der Ansatz, dass CPT-sensitive Glioblastomzelllinien mit einer höheren, und CPT-resistente Linien mit einer niedrigeren Expression von TopoI einhergehen, findet sich ebenfalls bei einigen anderen Krebszelllinien. So wurden niedrige Mengen an TopoI in drei CPT-resistenten Sublinien von chinesischen Hamster-Lungenzellen (V79^r, IRS-1^r, und IRS-2^r) [Chang et al., 1992] und eine verminderte Expression von TopoI in Homocamptothecin (hCPT)- und Diflomotecan (BN80915)-resistenten SF295 humanen Glioblastomzellen [Liao et al., 2008] entdeckt. Ebenso konnte bei Untersuchung der Reaktion von sechs epithelialen Brustkrebszelllinien auf TopoI- und II-Inhibitoren u.a. bei der Zelllinie BT474 eine niedrige Aktivität an TopoI gefunden werden [Davis et al., 1998], woraus man schlussfolgerte, dass niedrige Mengen an TopoI bzw. eine niedrige enzymatische Aktivität von TopoI mit einer erhöhten Resistenz gegenüber CPT zu assoziieren ist. Dieser Aspekt konnte auch bei gegen SN38-resistenten Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SBC-3/SN-38) gefunden werden, in denen ebenfalls eine Abnahme

von TopoI und II verzeichnet wurde [Chikamori et al. 2004]. Auf der anderen Seite, waren weder S-Phase-Spezifität noch die Expression von TopoI mittels Western Blot ausreichend, um eine CPT-Wirkung in sieben Kolonkarzinomzelllinien korrekt vorherzusagen [Goldwasser et al., 1996].

5. Zusammenfassung und Ausblick

CPT-Derivate wie Topotecan sind zunehmend Bestandteil gegenwärtiger Studien geworden, da eine synergistische Verstärkung der Zytotoxizität der ionisierenden Strahlung durch diese belegt werden konnte. Bei dem Chemotherapeutikum CPT handelt es sich um ein pflanzliches Alkaloid aus der chinesischen Pflanze *Camptotheca acuminata*. Es wirkt S-Phase-spezifisch und sein Wirkmechanismus beruht auf Hemmung von TopoI, ein Enzym, das für die DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur eine entscheidende Rolle spielt [Morris et al., 1996; Hsiang et al., 1989; Farray et al., 2006].

Der Nachweis einer radiosensibilisierenden Wirkung von CPT stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Untersucht wurde dabei das Ansprechen der fünf Glioblastomzelllinien U87-MG, U373-MG, SNB19, GHE und GaMG auf CPT und ionisierende Strahlung.

Im Wesentlichen wurde ein signifikanter radiosensibilisierender Effekt des CPTs in den Zelllinien U87 und SNB19 gezeigt.

Weiterhin erkannte man, dass das anti-apoptotische Protein Survivin nach kombinierter CPT-IR-Behandlung beim Vergleich der Survivin-Konzentrationen der fünf Glioblastomzelllinien in den Zelllinien U87 und SNB19 die niedrigsten Werte aufzeigte, was mit den Ergebnissen des Koloniebildungstests und der Zellauszählung korreliert. Dies kann ebenfalls als Indiz für einen radiosensibilisierenden Effekt von CPT in den beiden Zelllinien U87 und SNB19 gewertet werden.

Des Weiteren wurden, parallel in unserer Arbeitsgruppe, nach CPT-Behandlung mindestens zwei Subpopulationen in jeder der fünf getesteten Glioblastomzelllinien ermittelt, die sich bezüglich ihres DNA-Schadens merklich voneinander unterschieden [Djuzenova et al., 2008]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Menge der DNA-Schäden nach kombinierter CPT-IR-Behandlung höher war als in den einzelnen Behandlungsmodalitäten.

Die Untersuchung der Kinetik der DNA-Reparatur mittels Rad50-Foci ließ einen radiosensibilisierenden Effekt von CPT in den Zelllinien SNB19 und U87 erkennen. Diese wiesen im Vergleich zu den Zelllinien U373, GHE und GaMG eine verlangsamte Reparaturhalbwertszeit unter kombinierter CPT-IR-Behandlung auf.

Der Vergleich der Expression von TopoI in Western Blot und Durchflusszytometrie [s. Doktorarbeit von Mitdotorandin T. Güttler] zeigte die höchsten Hintergrundwerte für

dieses Enzym in den Zelllinien U87 und SNB19. Die erhöhte Expression von TopoI in U87 und SNB19 korrelierte mit den verlängerten Reparaturhalbwertszeiten für diese Zelllinien, mit der Reduktion der Überlebensraten im Koloniebildungstest bzw. der Abnahme des Zellwachstums in der, parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, Zellauszählung, sowie mit der niedrigeren Survivin-Konzentration im Survivin-ELISA. Eine Resistenz gegenüber CPT könnte folglich durch eine schnellere Reparaturhalbwertszeit aber auch durch eine reduzierte Expression von TopoI in den Zelllinien U373, GHE und GaMG begründet sein. Daher ist vorstellbar, dass durch eine schnelle Proliferation von CPT-resistenten Zellen die Apoptose- und Zellabbauraten der CPT-sensitiven Subpopulation kompensiert oder sogar übertroffen werden kann, was für eine Chemoradioresistenz der jeweiligen Zelllinien sprechen würde.

Die weitere Erforschung des radiosensibilisierenden Effekts von Chemotherapeutika sollte auch weiterhin einen wichtigen Bestandteil zukünftiger Forschungsarbeiten darstellen, da sowohl in der vorliegenden als auch in einer Reihe von anderen Arbeiten Ansätze dieses Effekts bereits belegt werden konnten. Die Entwicklung von neuen TopoI-Inhibitoren, wie das Homocamptothecin und dessen Derivate, die sich durch eine verbesserte chemische Stabilität auszeichnen [Teicher, 2008], sollte weiter vorangetrieben werden, um eines Tages die mittleren Überlebensraten bei Glioblastoma multiforme weit über ein Jahr hinaus verlängern zu können. Die Resultate dieser Studie unterstützen das Konzept einer chemotherapeutischen Behandlung kurz vor Bestrahlung und sehen ein derartiges Verfahren als effiziente Methode an, um möglichst schnell das Ansprechen von intrakraniellen Tumoren auf chemotherapeutische Wirkstoffe in vitro zu untersuchen. Außerdem sollte versucht werden diese Erkenntnisse auf die klinische Ebene auszuweiten und man sollte zusätzlich herausfinden, ob weitere DNA-Schadens- oder DNA-Reparatur-Proteine als Marker dienen könnten wie Darzynkiewicz [2008] in seinem Leitartikel zu unserer Publikation vorschlägt.

Literaturverzeichnis

Angerer J et al.: Biological Monitoring: Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin.

WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim; 2001; S. 133-136.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.

Nature 2006; 444: 756-760.

Becker N, Frentzel-Beyme R, Wagner G: Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany.

Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; 2. Auflage; 1984.

Bernier-Chastagner V, Grill J, Doz F, Bracard S, Gentet JC, Marie-Cardine A, Luporsi E, Margueritte G, Lejars O, Laithier V, Mechinaud F, Millot F, Kalifa C, Chastagner P: Topotecan as a radiosensitizer in the treatment of children with malignant brainstem gliomas: Results of a French Society of Paediatric Oncology Phase II Study.

Cancer 2005; 104: 2792-2797.

Boothman DA, Schlegel R, Pardee AB: Anticarcinogenic potential of DANN repair inhibitors.

Mutat Res 1989; 202: 393-411.

Boothman DA, Wang M, Schea RA, Burrows HL, Strickfaden S, Owens JK: Posttreatment exposure to camptothecin enhances the lethal effects of X-rays on radioresistant human malignant melanoma cells.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24: 939-948.

Cavaliere R, Newton H: Cytotoxic and molecular chemotherapy for high-grade glioma: an emerging strategy for the future.

Expert Opin Pharmacother 2006; 7: 749-765.

CBTRUS: Statistical report: primary brain tumors in the United States, 1997-2001.

Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) 2005.

Chang JY, Dethlefsen LA, Barley LR, Zhou BS, Cheng YC: Characterization of camptothecin-resistant Chinese hamster lung cells.

Biochem Pharmacol 1992; 43: 2443-2452.

Chen AY, Okunieff P, Pommier Y, Mitchell J: Mammalian DNA topoisomerase I mediates the enhancement of radiation cytotoxicity by camptothecinderivatives.

Cancer Res 1997; 57: 1529-1536.

Chen AY, Choy H, Rothenberg ML: DNA Topoisomerase I- targeting drugs as radiation sensitizers.

Oncology 1999; 13 (10 Suppl 5): 39-46.

Chen AY, Chou R, Shih SJ, Lau D, Gandara D: Enhancement of radiotherapy with DNA topoisomerase I-targeted drugs.

Critical Reviews in Oncology/Hematology 2004; 50:111-119.

Chikamori M, Takigawa N, Kiura K, Tabata M, Shibayama T, Segawa Y, Ueoka H, Ohnoshi T, Tanimoto M: Establishment of a 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin-resistant small cell lung cancer cell line.

Anticancer Res 2004; 24: 3911-3916.

D'Arpa P, Beardmore C, Liu LF: Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons.

Cancer Res 1990; 50: 6919-6924.

Darzynkiewicz Z: Broken beyond repair. Damaging DNA in glioblastoma cells with radiation and camptothecin.

Cancer Biol Ther 2008; 7: 374-375.

Dasika GK, Lin S-CJ, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY-H: DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.

Oncogene 1999;18: 7883-7889.

Davis PL, Shaiu WL, Scott GL, Iglehart JD, Hsieh TS, Marks JR: Complex response of breast epithelial cell lines to topoisomerase inhibitors.

Anticancer Res 1998; 18: 2919-2932.

DeAngelis LM: Brain tumors

N Engl J Med 2001; 344: 114-123.

Djuzenova CS, Mühl B, Schakowski R, Oppitz U, Flentje M: Normal expression of DNA repair proteins, hMre11, Rad50 and Rad51 but protracted formation of Rad50 containing foci in X-irradiated skin fibroblasts from radiosensitive cancer patients.

Br J Cancer 2004; 90: 2356-2363.

Djuzenova CS, Güttler T, Berger S, Katzer A, Flentje M: Differential response of human glioblastoma cell lines to combined camptothecin and ionizing radiation treatment.

Cancer Biol Ther 2008; 7: 364-373.

Farray D, Ahluwalia MS, Snyder J, Barnett GH, Cohen BH, Suh JH, Peereboom DM: Pre-irradiation 9-Amino [20s] camptothecin (9-AC) in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme.

Invest New Drugs 2006; 24:177-180.

Fisher BJ, Scott C, Macdonald DR, Coughlin C, Curran WJ: Phase I study of topotecan plus cranial radiation for glioblastoma multiforme: results of Radiation Therapy Oncology Group Trial 9507.

J Clin Oncol 2001; 19: 1111-1117.

Fisher B, Won M, Macdonald D, Johnson DW, Roa W: Phase II study of topotecan plus cranial radiation for glioblastoma multiforme: results of Radiation Therapy Oncology Group Trial 9513.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 53: 980-986.

Fiveash JB, Spencer SA: Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme.

Cancer J 2003; 9: 222-229.

Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blocher D, Harbich R : Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions.

Radiat Res. 1981; 88:524-532.

Goldwasser F, Shimizu T, Jackman J, Hoki Y, O'Connor PM, Kohn KW, Pommier Y: Correlations between S and G₂ arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells.

Cancer Res 1996; 56: 4430-4437.

Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB: Preliminary pharmacological and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880).

Cancer Chemother Rep 1970; 54: 461-470.

Greenberg HS, Chandler WF, Sandler HM: Brain Tumors.

Oxford University Press, New York, Oxford, 1999; pp. 23-35.

Grisold W, Krauseneck P, Müller B: Praktische Neuroonkologie.

Springer-Verlag Wien, New York, 2000; S. 12-13, S. 76-87, S.155-160, S. 177.

Grüschow K, Klautke G, Fietkau R: Phase I/II clinical trial of concurrent radiochemotherapy in combination with topotecan for the treatment of brain metastases. Eur J Cancer 2002; 38: 367-374.

Günzel H, Tennstedt A: Psychische Störungen und Hirntumorwachstum. Psychiat Neurol med Psychol 1983; 35: 334-340.

Hennequin C, Giocanti N, Balosso J, Favaudon V: Interaction of ionizing radiation with the topoisomerase I poison camptothecin in growing V-79 and HeLa cells. Cancer Res 1994; 54: 1720-1728.

Hermanek P: Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2000. W. Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York; 2. Auflage; 2000; S. 24, S.358, S. 366-369.

Herscher LL, Cook JA, Pacelli R, Pass HI, Russo A, Mitchell JB: Principles of chemoradiation: theoretical and practical considerations. Oncology 1999; 13 (Suppl 5): 11-22.

Horwitz SB, Horwitz MS: Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. Cancer Res 1973; 33: 2834-2836.

Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF: Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. Cancer Res 1989; 49: 5077-5082.

Hsiang YH, Wu HY, Liu LF: Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. Cancer Res 1988; 48: 3230-3235.

Hsieh JC, Lesniak MS: Surgical management of high-grade gliomas.
Expert Rev Neurother 2005; 5 (6 Suppl.): S33-S39.

<http://www.klinikum-dessau.de/klinikenundinstitute/neurochirurgischeklinik/leistungsspektrum10/hirntumoroperationen.html>; 06.10.08

ICRU Report 33: Radiation Quantities and Units.

Internat Commission on Radiation Units and Measurements, Washington D.C. 1980.

Jeggo PA: DNA breakage and repair.

Adv Genet 1998; 38: 185-218.

John G, Eapen V, Shaw G: Frontal glioma presenting as anxiety and obsessions: a case report.

Acta Neurol Scand 1997; 96: 194-195.

John M, Flam M, Legha S, Phillips T, et al.: Chemoradiation: an integrated approach to cancer treatment. 1st ed. Philadelphia: JB Lippincott;1995.

Kim JH, Kim SH, Kolozsvary A, Khil MS: Potentiation of radiation response in human carcinoma cells in vitro and murine fibrosarcoma in vivo by topotecan, an inhibitor of DNA topoisomerase I.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 22: 515-518.

KleihuesP, Cavenee WK: Pathology and genetics of tumours of the nervous system.

International Agency for Research on Cancer (IARC) and WHO Health Organisation.

Oxford Press, Oxford, UK, 2000.

Koecke HU, Emschermann P, Härle E: Biologie: Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler.

F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, New York; 4. Auflage; 2000; S. 74.

Kucukzeybek Y, Gul MK, Cengiz E, Erten C, Karaca B, Gorumlu G, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R: Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and Ltbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145.
J Exp Clin Cancer Res 2008; 27:37.

Lamond JP, Wang M, Kinsella TJ, Boothman DA: Concentration and timing dependence of lethality enhancement between topotecan, a Topoisomerase I inhibitor, and ionizing radiation.
Int J Radiation Biol Phys 1996; 36: 361-368.

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G: Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group.
Radiother Oncol 2002; 64: 259-273.

Laws ER, Parney IF, Huang W, et al.: Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project.
J Neurosurg 2003; 99: 467-473.

Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R: Present and potential future issues in glioblastoma treatment.
Expert Rev Anticancer Ther 2006; 6: 719-732. Review.

Li LH, Fraser TJ, Olin EJ, Bhuyan BK: Action of camptothecin on mammalian cells in culture.
Cancer Res 1972; 32: 2643-2650.

Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M: Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells.
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 5172-5177.

Liao Z, Robey RW, Guirouilh-Barbat J, To KK, Polgar O, Bates SE, Pommier Y: Reduced expression of DNA topoisomerase I in SF295 human glioblastoma cells selected for resistance to homocamptothecin and diflomotecan.
Mol Pharmacol 2008; 73: 490-497.

Liehr JG, Giovanelle BC, Verschraegen CF, et al.: The Camptothecins-unfolding their anticancer potential.
Ann N Y Acad Sci 2000.

Lohr F, Wenz F, et al.: Strahlentherapie kompakt.
Urban & Fischer Verlag München, Jena; 2. Auflage; 2007; S. 197, S. 306-307.

Mahrhofer H, Bürger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS: Radiation-induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 64: 573-580.

Mattern MR, Hofmann GA, McCabe FL, Johnson RK: Synergistic cell killing by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864).
Cancer Res 1991; 51: 5813-5816.

Moertel CG, Schutt AJ, Reitemeier RJ: Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer.
Cancer Chemother Rep 1972; 56: 95-101.

Morandi E, Zingaretti C, Chiozzotto D, Severini C, Semeria A, Horn W, Vaccari M, Serra R, Silingardi P, Colacci A: A cDNA-microarray analysis of camptothecin resistance in glioblastoma cell lines.
Cancer Lett 2006; 231: 74-86.

Morris EJ, Geller HM: Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase –I: evidence for cell cycle-independent toxicity.
J Cell Biol 1996;134: 757-770.

Muggia FM, Creaven PJ, Hansen H: Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): Correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep* 1972; 56: 515-521.

Naniwa J, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Shimada M, Shimogai R, Kawaguchi W, Sato S, Terakawa N: Genetic diagnosis for chemosensitivity with drug-resistance genes in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 76-82.

Nias AHW: An introduction to radiobiology
John Wiley & sons Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto; 2nd edition; 1998; pp. 3-4, pp. 89-90.

O'Connor PM, Nieves-Neira W, Kerrigan D, Bertrand R, Goldman J, Kohn KW, Pommier Y: S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells. *Cancer Commun* 1991; 3: 233-240.

Olive PL, Banáth JP: Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 331-335.

Östling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-298.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000; 10: 886-895.

Petrini JH: The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA damage response.

Am J Hum Genet 1999; 64: 1264-1269.

Pollak L, Klein C, Rabey J, et al.: Posterior fossa lesions associated with neuropsychiatric symptomatology.

Int J Neurosci 1996; 87: 119-126.

Puck TT, Marcus PI: Action of X-rays on mammalian cells.

J Exp Med 1956; 103: 653-666.

Quick QA, Gewirtz DA: An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells.

J Neurosurg 2006; 105: 111-118.

Quick QA: Epothilone B induces glioblastoma cell death via survivin down-regulation.

Exp Oncol 2008; 30: 195-201.

Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT: The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota.

Ann Neurol 1995; 37: 67-73.

Rave-Fränk M, Glomme S, Hertig J, Weiss E, Pradier O, Hess CF, Virsik-Köpp P, Schmidberger H: Combined effect of topotecan and irradiation on the survival and the induction of chromosome aberrations in vitro.

Strahlenther Onkol 2002; 178: 497-503.

Richter G: Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2003; S. 73, S. 84.

Rieke J: Über depressive Psychosen im Verlauf von Hirntumorerkrankungen.

Nervenarzt 1975; 46: 152-159.

Roffler SR, Chan J, Yeh MY: Potentiation of radioimmunotherapy by inhibition of topoisomerase I.

Cancer Res 1994; 54: 1276-1285.

Sathornsumetee S, Rich JN: New approaches to primary brain tumor treatment.

Anti-Cancer Drugs 2006; 17: 1003-1016. Review

Schlegel U, Weller M, Westphal M: Neuroonkologie.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Auflage; 2003; S. 93-106, S. 196.

Slichenmyer WJ, Rowinsky EK, Donehower RC, Kaufmann SH: The current status of camptothecin analogues as antitumor agents.

J Natl Cancer Inst 1993; 85: 271-291.

Solary E, Bertrand R, Pommier Y: Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells.

Leuk Lymphoma 1994; 15: 21-32.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al.:

Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.

N Engl J Med 2005; 352: 987-996.

Takata M, Sasaki E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S: Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.

EMBO J 1998; 17: 5497-5508.

Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z: Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents.

Cytometry A 2007; 71: 648- 661.

Teicher BA: Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies.

Biochem Pharmacol 2008; 75: 1262-1271.

Thompson LH, Schild D: Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability.

Mutat Res 2001; 477: 131-153.

Tsao YP, D'Arpa P, Liu LF: The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of p34cdc2/cyclin B.

Cancer Res 1992; 52: 1823-1829.

Wardman P: Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy.

Clin Oncol (R Coll Radiol) 2007; 19: 397-417.

Walker MD, Alexander EJr, Hunt WE, et al.: Evaluation of BCNU and/or radiotherapie in the treatment of anaplastic gliomas: a cooperative clinical trail.

J Neurosurg 1978; 49: 333-343.

Walker MD, Green SB, Byar DP, et al.: Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery.

N Engl J Med 1980; 303: 1323-1329

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Plumer KH, McPhail AT, Sim GA: Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*.

J Am Chem Soc 1966; 88: 3888-3890.

West MH, Bonner WM: Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species.

Biochemistry 1980; 19: 3238-3245.

Wilmanns W, Huhn D, Wilms K: Internistische Onkologie.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Auflage; 2000; S. 53, S. 204, S. 747-752.

Wilson K, Walker J: Principles and techniques of practical biochemistry.
Cambridge University Press; 5th edition; 2000; p. 610

Wrba F, Dolznig H, Mannhalter C: Genetik verstehen: Grundlagen der molekularen Biologie.
Facultas Verlags- und Buchhandels AG Wien; 2007; S. 124.

Zhang B, Pan JS, Liu JY, Han SP, Hu G, Wang B: Effects of chemotherapy and/or radiotherapy on survivin expression in ovarian cancer.
Methods Find Exp Clin Pharmacol 2006; 28: 619-625.

Zhang H, D'Arpa P, Liu LF: A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons.
Cancer Cells (Cold Spring Harbor) 1990; 2: 23-27.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. M. Flentje für die Möglichkeit zur Erstellung einer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie sowie für die Überlassung des interessanten Themas und für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. T. Djuzenova, die zu jeder Zeit eine äußerst kompetente, immer freundliche und sehr hilfsbereite Ansprechpartnerin war und mir bei allen aufkommenden Problemen stets zur Seite stand. Für die Übernahme des Referates danke ich ihr recht herzlich.

Weiterhin möchte ich dem ganzen Laborteam, insbesondere Frau Astrid Katzer ganz herzlich für deren Unterstützung während der Durchführung der Experimente danken.

Auch meiner Mitdotorandin Teresa Güttler danke ich für eine schöne und lehrreiche Zeit im Strahlenlabor.

Ein spezieller Dank geht auch an meine Eltern für ihre emotionale und seelische Unterstützung. Ohne sie wäre vieles um ein vielfaches schwerer oder gar unmöglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Sabrina Berger
Geburtsdatum 07.07.1982
Geburtsort Würzburg
Familienstand Ledig

Schulbildung

1989 - 1993 Grundschule in Kürnach
1993 - 2002 St.-Ursula-Gymnasium in Würzburg
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

2002 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Sommer 2004 Physikum (alte AO)
Juni 2009 2. Staatsexamen (neue AO)
Seit 10.05.07 Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Flentje
Thema: Einfluss von Camptothecin und Röntgenbestrahlung in vitro auf Induktion und Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche in Glioblastomzellen

Famulaturen

01.08.05 – 31.08.05 Chefarzt Dr. Karmann, Abteilung für Kardiologie, Kreiskrankenhaus Kitzingen
12.09.05 – 12.10.05 Dr. med. Zwerenz & Dr. med. Sauer, Gemeinschaftspraxis für Kardiologie, Würzburg
01.03.06 – 30.03.06 Chefarzt Prof. Dr. Flentje, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Würzburg
11.08.06 – 25.08.06 Chefarzt Dr. Dreher, Abteilung für Gastroenterologie, Kreiskrankenhaus Kitzingen
01.03.07 – 31.03.07 Chefarzt Prof. Dr. Lange, Klinik für Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen

Praktisches Jahr

20.08.07 – 09.12.07 Prof. Dr. Riedmiller, Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Würzburg
10.12.07 – 30.03.08 Prof. Dr. Ertl, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Abteilung für Kardiologie, Universitätsklinikum Würzburg
31.03.08 – 20.07.08 Prof. Dr. Einsele, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Würzburg
Prof. Dr. Lange, Klinik für Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen

**Zusätzliche berufliche
Erfahrungen**

Seit 01.04.2003

Tätigkeit als Aushilfskraft im Krankenpflegebereich im
Kreiskrankenhaus Kitzingen

WS 2006/2007

EKG-Kurs unter der Leitung von Dr. Johnson,

Universitätsklinikum Würzburg

SS 2007

EKG-Kurs/-Seminar der Medizinischen Klinik I bei PD

Dr. Jahns, Universitätsklinikum Würzburg

06.06.08

Basiskurs Chirurgische Nahttechnik, Aesculap

Akademie, Schweiz

Besondere Kenntnisse

Sprachen

Englisch in Wort und Schrift

EDV

MS Word, MS Excel, Microcal Origin

(Statistiksoftware)

Hobbys und Interessen

Klarinette im Symphonischen Blasorchester, Tennis,

Skifahren, Snowboarden

Kürnach, im Juli 2009

Sabrina Berger