

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE UND RADIOLOGISCHE ONKOLOGIE

Klinikum rechts der Isar

Technische Universität München

(Direktor: Univ. - Prof. Dr. M. Molls)

Beeinflussung der Strahlensensibilität einer Tumorzelllinie des Kopf-Hals-Bereiches durch Patupilon

PATRICIA BLASCHKE

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ. Prof. Dr. G. Multhoff
2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 06.02.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

**Gewidmet meinen Eltern,
die mir alles ermöglicht haben**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	A
Abbildungsverzeichnis	C
Tabellenverzeichnis	E
Abkürzungsverzeichnis	F
1 Einleitung	1
1.1 <i>HNO-Tumoren</i>	1
1.1.1 <i>Epidemiologische Daten</i>	1
1.1.2 <i>Ätiologie und Pathogenese</i>	1
1.1.3 <i>Prognose und Therapiestrategien</i>	2
1.2 <i>Auswirkungen ionisierender Strahlung auf eukaryotische Zellen</i>	5
1.2.1 <i>Schadensantwort der Zelle</i>	6
1.2.2 <i>DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur</i>	7
1.2.3 <i>γH2AX</i>	10
1.2.4 <i>Klonogener Zelltod</i>	12
1.3 <i>Patupilon (Epothilon B)</i>	15
1.3.1 <i>Wirkmechanismus</i>	16
1.3.2 <i>Vergleich Taxol vs. Epothilon</i>	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 <i>Materialien und Geräte</i>	18
2.1.1 <i>Zellen</i>	18
2.1.2 <i>Medikament</i>	18
2.1.3 <i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	18
2.1.4 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	19
2.1.5 <i>Lösungen und Puffer</i>	19
2.1.6 <i>Antikörper</i>	20
2.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	20
2.1.8 <i>Geräte</i>	21
2.1.9 <i>Vollautomatisches Bildanalysesystem</i>	22
2.2 <i>Methoden</i>	23
2.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	23
2.2.1.1 <i>Kulturbedingungen</i>	23
2.2.1.2 <i>Auftauen und Kultivierung der Zellen</i>	23
2.2.1.3 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	25
2.2.2 <i>Anwendung von Patupilon</i>	26
2.2.2.1 <i>Herstellen einer Stocklösung</i>	26
2.2.2.2 <i>Behandlung der Zellen mit Patupilon</i>	27
2.2.3 <i>Bestrahlung der Zellen</i>	27
2.2.4 <i>γH2AX-Nachweis</i>	28
2.2.4.1 <i>Vorbereitung und Aussaat der Zellen</i>	28
2.2.4.2 <i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	28

2.2.4.3	Quantifizierung von γ H2AX-Foci	29
2.2.5	Koloniebildungsassay	30
2.2.5.1	Vorbereitung und Aussaat der Zellen	30
2.2.5.2	Fixierung und Färbung	31
2.2.5.3	Auswertung	32
2.2.6	Allgemeine Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Reparaturkapazität strahleninduzierter Doppelstrangbrüche	34
3.2	Einfluss von Patupilon auf die Anzahl der γ H2AX-Foci	36
3.3	Einfluss von Patupilon auf die Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci	38
3.4	Dosis-Wirkungskurve der Zelllinie FaDu	41
3.5	Einfluss von Patupilon auf das klonogene Überleben	42
3.6	Kombinationseffekte im Koloniebildungsassay	43
3.7	Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Quantifizierung	46
4	Diskussion	47
4.1	Zielsetzung der Arbeit	47
4.2	γ H2AX-Foci-Quantifizierung	47
4.3	Klonogenes Überleben	51
4.4	Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Quantifizierung	53
4.5	Stand der Forschung und Ausblick	54
5	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	I
	Danksagung	XI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben von circa 3247 Patienten in Abhängigkeit vom UICC-Stadium der aktuell gültigen TNM-Klassifikation.....	2
Abb. 1.2 Indirekte und direkte Strahlenwirkung auf die DNA und die induzierten Schäden	6
Abb. 1.3 Ablauf der nicht-homologen Endverknüpfung (non homologous end-joining, NHEJ).....	8
Abb. 1.4 Ablauf der homologen Rekombination (HR).....	9
Abb. 1.5 Die Organisation der DNA innerhalb der Chromatinstruktur	11
Abb. 1.6 Überlebenskurve für HeLa-Tumorzellen nach Photonenbestrahlung	14
Abb. 1.7 Strukturformel von Etoposid (Patupilon)	15
Abb. 2.1 FaDu-Zellen, die den Kulturflaschenboden nach vier Tagen annähernd dicht und adhärent bewachsen haben.....	24
Abb. 2.2 Neubauer-Zählkammer	25
Abb. 2.3 Das vollautomatische Bildanalysesystem Metafer (von MetaSystems).....	30
Abb. 2.4 12-Well-Platte	31
Abb. 2.5 schematischer Ablauf des Koloniebildungstests.....	32
Abb. 3.1 Bestimmung der Reparaturkapazität strahleninduzierter Doppelstrangbrüche in FaDu-Zellen durch Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach einer und nach 24 Stunden post radiatio mit zwei unterschiedlichen Strahlendosen.....	34
Abb. 3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von γ H2AX-Foci (grün) in FaDu-Zellkernen (blau) der Kontrolle und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy.	35
Abb. 3.3 Klassendiagramm aus der gemessenen Focianzahl nach 0, 2 und 5 Gy jeweils nach einer und nach 24 Stunden.....	36
Abb. 3.4 Anzahl der γ H2AX-Foci nach 1- und nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Patupilon.....	37
Abb. 3.5 Klassendiagramm aus der nach 1 Stunde gemessenen Focianzahl nach Zugabe von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon.....	38
Abb. 3.6 Einfluss von Patupilon auf die Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci. Die Fixierung und Quantifizierung der Foci erfolgte in unabhängigen Versuchen 1h (A) und 24h (B) nach Bestrahlung.....	39

Abb. 3.7 Effekte von Strahlung (5 Gy) und Patupilon (0,05 nM) separat und in Kombination, jeweils nach 24-stündiger Inkubation.....	40
Abb. 3.8 Effekte von Strahlung (5 Gy) und Patupilon (0,05 nM) separat und in Kombination im Klassendiagramm, jeweils nach 24-stündiger Inkubation....	41
Abb. 3.9 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Bestrahlung mit 2 und 5 Gy.	42
Abb. 3.10 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Behandlung mit 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon.....	42
Abb. 3.11 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit Strahlung und Patupilon.....	43
Abb. 3.12 Glatte Approximation der Einflussgrößen Strahlung [Gy] und Patupilonkonzentration [nM] auf das zelluläre Überleben [%].....	44
Abb. 3.13 Isobologramm der Einflussgrößen Strahlung [Gy] und Patupilonkonzentration [nM] auf das zelluläre Überleben [%].....	45
Abb. 3.14 Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Foci-Detektion nach einer Stunde (A) und nach 24 Stunden (B).....	46
Abb. 4.1 Wachstumsverhalten von FaDu-Zellen im Lab-Tek TM - (A) und im Lab-Tek TM II Chamber Slide (B).....	48
Abb. 4.2 Sättigungskurve der γ H2Ax-Focianzahl bei steigender Strahlendosis 1 Stunde nach Bestrahlung.....	49
Abb. 4.3 γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung; A: Ergebnisse für menschliche Fibroblasten (aus: Rothkamm und Löbrich, 2003); B: eigene Ergebnisse, erhalten nach Bestrahlung von Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx (Zelllinie FaDu)	50
Abb. 4.4: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von FaDu-Zellen.....	52

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 3.1 Mittelwerte der nach Bestrahlung pro Zellkern gemessenen Foci nach 1 und nach 24 Stunden.....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 3.2 Einfluss von Patupilon auf die Reparatur strahleninduzierter DSB.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 3.3 Aufführung der SFs in % nach Bestrahlung und Behandlung mit Patupilon..</i>	<i>43</i>

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM- und Rad3-bezogen (engl. ATM- and Rad3-related)
BfS	Bundesamt für Strahlenschutz
BSA	Rinderalbuminserum (engl. bovine serum albumine)
CCD	Charge-coupled Device
CdK	Cyclin-abhängige Kinase (engl. cyclin-dependend kinase)
cm	Centimeter
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch (engl. DNA double-strand break)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-PK
D-PBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
DSB	Doppelstrangbruch
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G1-Phase	erste gap-Phase des Zellzyklus
G2-Phase	zweite gap-Phase des Zellzyklus
Gy	Gray (Einheit der Strahlungsdosis)
HDM-2	human-double-minute chromosome 2 gene
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination

IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
kV	Kilovolt
l	Liter
mAs	Milliampere pro Sekunde
MDR	Multidrugresistance
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mre11	meiotic recombination protein 11
MRT	Magnetresonanztomographie
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren (engl. non essential aminoacids)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. non homologous end-joining)
nM	nanomol
OH	Hydroxylradikal
P	Phosphatrest
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PC	personal computer
PE	Plating Efficiency
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
R0	kein Resttumor nach Operation
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	rounds per minute
SEM	Standardfehlers des Mittelwertes (engl. standard error of the mean)
SF	Surviving Fraction
SF2	Surviving Fraction nach 2 Gy
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSB	Einzelstrangbruch (engl. single-strand break)
UICC	Union for International Cancer Control
UV	ultraviolett

1 Einleitung

1.1 HNO-Tumoren

1.1.1 Epidemiologische Daten

Die aktuelle Schätzung des Robert Koch-Instituts weist für das Jahr 2010 insgesamt ca. 450 200 Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus. Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes umfassen maligne Erkrankungen des Mund und Rachenraumes, der Nase und der Nasennebenhöhlen sowie des Kehlkopfes. Dabei treten 15 510 Fälle jährlich in der Mundhöhle, dem Rachen und am Kehlkopf auf, den häufigsten Tumorlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich. Die Tendenz ist weiter steigend. Kopf-Hals-Malignome stellen mit einem Anteil von 3,5 % bei Männern die siebthäufigste Krebskrankheit dar, bei Frauen stehen sie mit 1,5 % an 16. Stelle. Im Mittel erkranken Frauen etwa mit 64 Jahren, Männer bereits mit 60 Jahren. Das Lebenszeitrisiko liegt für Frauen bei 0,6 % und für Männer bei 1,4 % (RKI 2006).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung der HNO-Tumoren ist multifaktoriell. Auslösende Faktoren sind insbesondere Nikotin und Alkohol, daneben virale Infektionen, kanzerogene Chemikalien, UV- und radioaktive Strahlung, schlechte Mundhygiene und chronische Traumen. Alkoholkonsum potenziert die toxische Wirkung des Rauchens, so dass es histologisch zu einer Entzündungsreaktion kommt und auf molekularbiologischer Ebene DNA-Veränderungen induziert werden (Weber A. 2002). Bei kontinuierlicher Einwirkung der Noxen, erschöpfen körpereigene Reparatursysteme, wodurch es letztlich zu einer Akkumulation genetischer Veränderungen kommt. Neben der genetischen Instabilität spielen Fehlregulationen des Zellzyklus, Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, sowie intra- und extrazellulärer Wachstumsfaktor- bzw. Rezeptorkaskaden eine Rolle (Scully C. 2000). Das Tumorsuppressorgen p53, das die Apoptose von geschädigten und irreparablen Zellen induziert, weist allein in 43 % der invasiv wachsenden Karzinome im Kopf-Hals-Bereich eine Mutation auf (Boyle J.O. 1993). So kann dann über die Vorstufen der epithelialen Dysplasien ein Karzinom entstehen. 80 – 90 % der Kopf-Hals-Tumore sind auf kombinierten Tabak- und Alkoholkonsum zurückzuführen (Kim L. 2010). Weitere kanzerogen wirkende inhalative Noxen sind Holz- und Metallstäube, so-

wie chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke, weshalb die damit in Verbindung stehende Entstehung von Karzinomen als Berufskrankheit in der Textilindustrie anerkannt ist (Berger D.P. 2002). Eine virale Genese durch EBV ist mit der Entstehung von Nasopharynxkarzinomen assoziiert, die endemisch v.a. in Ostasien auftreten. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich scheint auch eine HPV-Infektion, besonders vom Typ 16, zu spielen (Syrjänen S. 2005). Histologisch handelt es sich in > 90 % um Plattenepithelkarzinome, in geringerem Prozentsatz finden sich Adenokarzinome, Lymphome, Sarkome und Melanome.

1.1.3 Prognose und Therapiestrategien

Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich sind Erkrankungen, die sich zumeist durch ein großes Tumolvolumen am Primärherd sowie an den Lymphknoten am Hals auszeichnen. Charakteristisch ist eine rasche Tumorphiliferation mit sehr kurzen potenziellen Tumorverdopplungszeiten von wenigen Tagen. Bei etwa 60 % der erstmals wegen eines Plattenepithelkarzinoms im oberen Aerodigestivtrakt behandelten Patienten, ist die Tumorerkrankung fortgeschritten (UICC-Stadium III oder IV) (Lang S. 2002). So liegen die 5-Jahresüberlebensraten im Stadium IV in Abhängigkeit von Primär-Tumorlokalisation und dem Ausmaß der Metastasierung (lokale Metastasierung versus Fernmetastasierung) zwischen 4 und 30 % (Waldfahrer F. 1999).

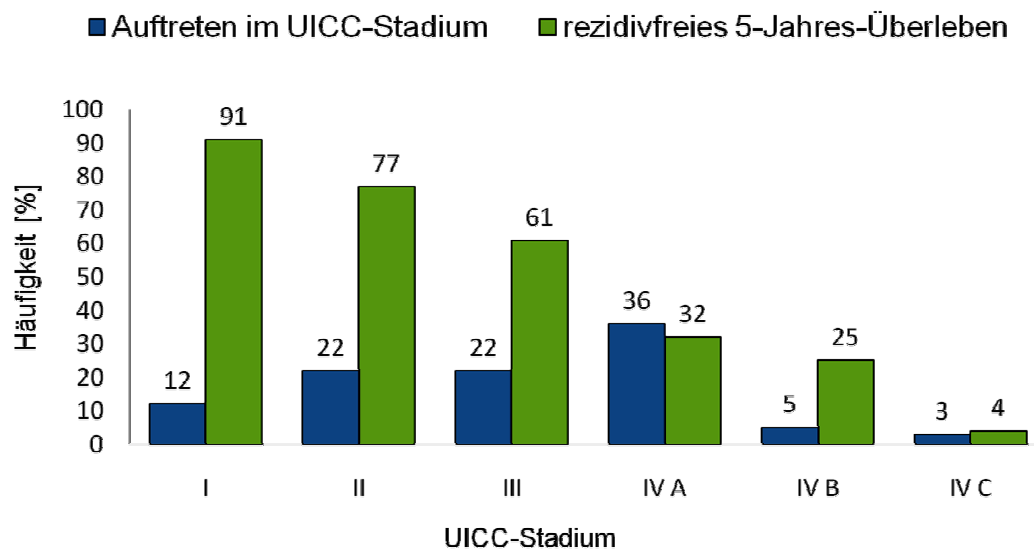


Abb. 1.1 Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben von circa 3247 Patienten in Abhängigkeit vom UICC-Stadium der aktuell gültigen TNM-Klassifikation. Häufigkeiten erstellt nach Waldfahrer et al. (1999).

Dieses schlechte Ergebnis des krankheitsfreien Überlebens hängt vor allem damit zusammen, dass neben den 20 – 30 % lokoregionären Rezidiven, auch 20 % Fernmetastasierungsraten (Wittekind C. 2001) registriert werden, die heute immer noch praktisch ohne Chance auf Heilung sind. Außerdem tragen die Patienten dieser Stadien ein besonders hohes Risiko einer Zweitmalignomerkrankung in den tieferen Abschnitten des Aerodigestivtraktes (Tumorzentrum München 2009). So bleibt die therapeutische Herausforderung, vor allem für diese fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV die lokale Behandlungsoption der Strahlentherapie weiter zu optimieren und sie frühzeitig mit den Möglichkeiten der neuen systemischen Therapieansätze zu kombinieren, um die lokoregionären Kontrollraten zu verbessern und der fatalen Fernmetastasierung wirksamer entgegenzutreten zu können.

Die Behandlung von Karzinomen der Kopf-Hals-Region stellt allerdings eine enorme Herausforderung an die moderne Onkologie dar. In dieser funktionell und ästhetisch sehr sensiblen Körperregion führt ausgedehntes Tumorwachstum, aber auch eine radikale Operation zu körperlichen Stigmata, die die Lebensqualität des betroffenen Patienten entscheidend beeinflussen können. Beeinträchtigung des Sprechvermögens, Störungen der Nahrungsaufnahme, und nicht zuletzt die negativen kosmetischen Folgen können zu erheblichen psychosozialen Belastungsfaktoren werden. Die Tatsache, dass die Gesamtüberlebensraten in den letzten 30 Jahren gemessen am therapeutischen Aufwand nur geringfügig verbessert werden konnten, hat letztlich zu einem Umdenkprozess in der Behandlung von HNO-Tumoren geführt. Aufgrund dessen waren die letzten 10 Jahre stark von der Suche nach organerhaltenden Kombinationstherapien geprägt. Das Ziel der meisten derzeit laufenden klinischen Studien ist herauszufinden, in welcher Weise Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie kombiniert werden können, um bei gleichem Ergebnis hinsichtlich Kontrolle des Primärherdes und der Fernmetastasierung einen akzeptablen Funktionserhalt und damit eine bessere Lebensqualität garantieren zu können.

Die Chirurgie ist, v. a. in frühen Stadien, nach wie vor das wichtigste Standbein im therapeutischen Konzept von HNO-Tumoren, da bereits sehr früh organschonende Operationstechniken wie z. B. verschiedene Formen der Larynxteilresektion entwickelt wurden. Auch Fortschritte in der Mikrochirurgie und die Einführung des chirurgischen Lasers haben deutliche Verbesserungen in der Funktionserhaltung gebracht. In vielen Fällen jedoch, liegt bereits bei der Erstdiagnose eine Situation vor, die durch eine alleinige Operation nicht kurativ zu therapieren ist oder eine R 0-Resektion die funktionell vertretbaren Grenzen überschreiten würde. Bei fortgeschrittenen inoperablen Tumoren, bei Resttumor nach Operation, einem ausgedehntem Lymphknotenbefall und/oder einem hohem

Lokalrezidivrisiko, besteht daher die Indikation für eine primäre, adjuvante und selten auch neoadjuvante Radiochemotherapie. Studienergebnisse und auch die Meta-Analyse von Pignon J.P. et al. (2000), haben eine signifikante Überlegenheit der konkomitanten Radiochemotherapie gegenüber einer alleinigen Radiotherapie, aber auch der Induktions-Chemotherapie gefolgt von einer Radiotherapie gezeigt. Durch die simultane Radiochemotherapie kann die lokoregionäre Tumorkontrolle, sowie das Gesamtüberleben nach 5 Jahren gegenüber einer konventionell fraktionierten alleinigen Radiotherapie verbessert werden, weshalb diese Vorgehensweise heute als Standardtherapie anzusehen ist. Die Rationale der Kombination von Radiotherapie und Chemotherapie liegt in der gegenseitig additiven tumorzelltötenden Wirkung beider Modalitäten bei einer gleichzeitigen sogenannten Dissoziation der Nebenwirkungen, d. h. einer noch tolerablen Erhöhung der akuten Therapietoxizität bei kombinierter im Gegensatz zur separaten Anwendung. In der Kombinationstherapie haben sich Platinderivate, Fluorouracil (5-FU), Taxane, Methotrexat und Mitomycin als wichtigste Substanzen etabliert. Die Kombination von Cisplatin mit einer 5-FU-Dauerinfusion stellt eines der best-dokumentierten Regime dar. Vielversprechend sind auch die Ergebnisse der Taxane als Radiosensitizer, wobei vor allem Paclitaxel – als Monotherapie oder in Kombinationsregimen – bereits in zahlreichen Studien eingesetzt wurde (Kies M.S. 2001), (Elomaa L. 1995), (Hampel G. 1995). Die Verstärkung der Strahlenwirkung durch Chemotherapeutika resultiert scheinbar auch durch eine Inhibition der DNA-Reparatur (Molls M 2009). Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) - Rezeptor, der eine wesentliche Rolle in der Genese von soliden Tumoren (Progression, Metastasierung) spielt und häufig in Plattenepithelkarzinomen überexprimiert wird, wird als Angriffspunkt für die targeted therapy genutzt. Die Anwendung des monoklonalen EGF-Rezeptor-Antikörpers Cetuximab in Kombination mit einer Radiotherapie hat in klinischen Studien eine erhöhte lokoregionäre Tumorkontrolle bei gleichzeitiger Senkung der Mortalität gezeigt (Bonner J.A. 2006). Vorteil dieser Therapie ist außerdem, dass auch bei therapierefraktären Tumoren eine Remission erzielt werden kann und die sehr gute Verträglichkeit von Cetuximab, auch in Kombination mit Zytostatika.

Die Radiotherapie ist heutzutage durch die rasanten technischen Entwicklungen in der Bestrahlungsplanung, der radiologischen Bildgebung (PET mit neuartigen Tracern, MRT und andere) und durch die neueren sogenannten konformalen, d.h. dem Tumor angepassten, Bestrahlungstechniken wesentlich schonender durchzuführen. Hier ist vor allem die sogenannte intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) zu nennen, die eine verbesserte Anpassung der Bestrahlungsfelder mit möglichst großer Schonung der Risikoorgane im Kopf-Hals-Bereich ermöglicht. Dadurch kann einerseits eine

Dosiseskalation erfolgen, andererseits die Rate an unerwünschten Wirkungen, wie Mundtrockenheit und Mukositis, verringert werden.

Intensivierte Bestrahlungsprotokolle sowie der Einsatz von Chemotherapeutika zur Strahlensensibilisierung erhöhen die Effektivität, aber auch die akute Therapietoxizität. Vor diesem Hintergrund sind das optimale Fraktionierungsschema und die optimale Substanzkombination Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen.

1.2 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf eukaryotische Zellen

Die DNA stellt nach heutiger Kenntnis das wichtigste Target bei der Zellabtötung durch Strahlung dar. Die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung beruht auf Anregungen oder Ionisationen im Gewebe, wobei es zu Wechselwirkungen mit der DNA als kritischem Angriffspunkt kommt. Dabei unterscheidet man zwischen der direkten und der indirekten Strahlenwirkung der ionisierenden Strahlung. Da die Masse einer organischen Zelle zu einem Großteil aus Wasser besteht, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass ionisierende Strahlung zunächst durch Wassermoleküle absorbiert wird (bis zu 80 %). Dabei entstehen freie Wasserradikale (Spitz D.R. 2004), die weit genug diffundieren, um ein kritisches Target erreichen und schädigen zu können. Das ionische Radikal weist aufgrund des ungepaarten Elektrons eine positive Ladung auf, ist hoch reaktiv, aber sehr kurzlebig. Es reagiert daher mit anderen Wassermolekülen in unmittelbarer Umgebung, was zur Bildung von freien Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) führt. Wenn solche Hydroxylradikale im Abstand von nur wenigen Nanometern zur DNA entstehen, können sie dort chemische Veränderungen hervorrufen und DNA-Schäden induzieren (Chatgililoglu C. 2001). Energieabsorption und Bioeffekt erfolgen folglich in unterschiedlichen Strukturen, weshalb dies als indirekte Strahlenwirkung bezeichnet wird. Bei Photonen- und Elektronenstrahlen, die in der Klinik vorrangig angewandt werden, stellt die indirekte Strahlenwirkung mit 65 - 70 % den dominierenden Effekt dar. Trifft und schädigt die Strahlung das Molekül, z.B. die DNA, unmittelbar, so spricht man von direkter Wirkung ionisierender Strahlung. Zu den strahlungsinduzierten Läsionen gehören DNA-Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden, Schäden an Wasserstoffbrückenbindungen, Vernetzungen innerhalb der DNA und DNA-Protein-Quervernetzungen (sog. Crosslinks), sowie Bulky Lesions (Mehrfachereignisse) (Ward 1988). Die Anzahl der Einzel- als auch die der Doppelstrangbrüche nimmt dabei linear mit der Dosis zu und obwohl der DNA-Einzelstrangbruch im Vergleich mit dem Doppelstrangbruch die weitaus häufiger auftretende strahleninduzierte Läsion darstellt (Powell S. 1990), ist die schädigende Auswirkung der Doppelstrangbrüche drastischer (Gent van D. C. 2001).

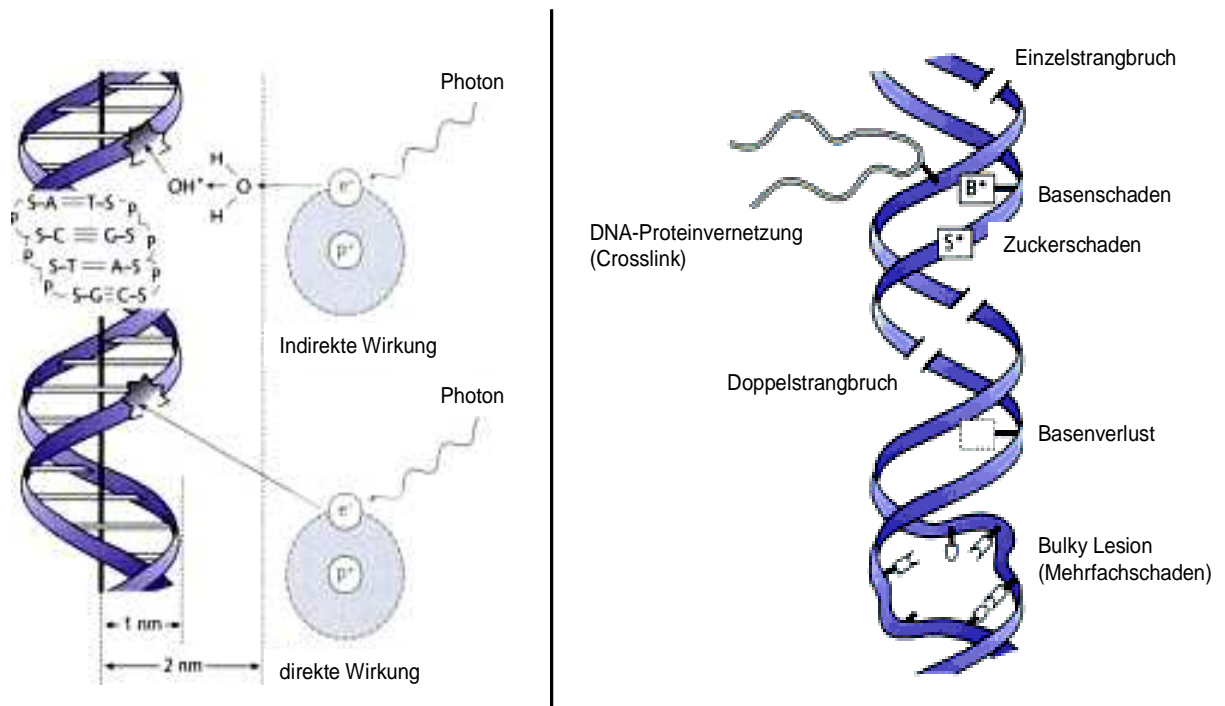


Abb. 1.2 Indirekte und direkte Strahlenwirkung auf die DNA und die induzierten Schäden (Kauffmann G. W. 2006)

1.2.1 Schadensantwort der Zelle

Der endgültige Strahlenschaden einer Zelle hängt sowohl vom primären Schaden, als auch von der Reparaturfähigkeit des Systems ab. Dabei kann eine geschädigte Zelle sich zwischen zwei Hauptstrategien entscheiden, um auf eine DNA-Schädigung zu reagieren: „to die or not to die“. Die Zelle verfügt über ein hoch spezialisiertes Zellzyklus-Kontrollsystem, das das Genom auf das Vorhandensein von DNA-Schäden überprüft und das den Zellzyklus zur Reparatur von vorliegenden Schäden an spezifischen Kontrollpunkten (Checkpoints) anhalten kann. Zellzyklus-Kontrollpunkte existieren am Übergang von der G1- in die S-Phase (G1/S-Checkpoint), innerhalb der S-Phase (intra-S-Checkpoint), am Übergang von der G2-Phase in die Mitose (G2/M-Checkpoint), sowie innerhalb der Mitose. Die größte Bedeutung kommt dabei dem G1/S- und dem G2/M-Checkpoint zu, da an diesen Kontrollpunkten ein Zellzyklusarrest zur Reparatur geschädigter DNA eingeleitet oder im Falle eines irreparablen Schadens der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert werden kann. Das p53-Protein ist in seiner nicht mutierten Form (sog. Wildtyp) an der Steuerung dieses Kontrollschritts wesentlich beteiligt. Die Aktivierung von p53 erfolgt dabei via Phosphorylierung durch das Enzym ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM-Kinase), welches bei DNA-schädigenden Reizen, wie ionisierender Strahlung, induziert wird. Durch die Phosphorylierung verändert das

p53-Protein seinen Konformationszustand, so dass HDM-2 (human-double-minute chromosome 2 gene), der Inhibitor von p53, abdiffundiert und p53 in aktivierter Form vorliegt. Das aktivierte p53 induziert die Transkription von p21, welches nachfolgend die für die Zellzyklusprogression essentiellen Cdk/Cyclin-Komplexe inhibiert (Coultas L. 2000). Die Folge ist eine Blockade des Zellzyklus am G1/S- bzw. G2/M-Checkpoint. So gewinnt die Zelle Zeit, entstandene Schäden zu reparieren, wodurch verhindert wird, dass fehlerhafte DNA in der S-Phase repliziert wird bzw. die Zelle die Mitose durchläuft.

1.2.2 DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur

Unter den verschiedenen Typen von DNA-Schäden, die innerhalb einer Zelle auftreten können, sind DNA-Doppelstrangbrüche (DNA double-strand breaks, DNA-DSBs) die schwerwiegendsten. Ihre Reparatur ist problematisch und kann, sollte sie fehlerhaft ablaufen, zum Zelltod führen oder die Entstehung von Mutationen zur Folge haben. Experimentelle Studien haben bewiesen, dass DNA-Doppelstrangbrüche eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung von Chromosomenaberrationen sind (Natarajan A. T. 1978), (Pfeiffer P. 2000). Ihre fehlerhafte Wiederverknüpfung kann zu Verlust, zum Austausch oder der Amplifikation von chromosomalem Material führen. Kommt es beispielsweise zur Deletion einer Chromosomenregion, die für ein Tumorsuppressorgen kodiert oder wird eine Region amplifiziert, die ein Onkogen trägt, kann dies das Risiko für eine Tumorentstehung begünstigen (Khanna K. K. 2001).

Ein DNA-Doppelstrangbruch resultiert aus dem Bruch der kovalenten Bindungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats beider Stränge der DNA-Doppelhelix in enger Nachbarschaft, wodurch die Basenpaarung unterbrochen wird. Die Reparatur ist komplex, da im Gegensatz zu Einzelstrangbrüchen, beide DNA-Stränge unterbrochen sind. Somit fehlt eine räumlich unmittelbar benachbarte Matrize für die Wiederherstellung der Basensequenz. In eukaryotischen Zellen existieren zwei Hauptreparaturwege, um die durchtrennten DNA-Stränge wieder zu vereinigen: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (non homologous end-joining, NHEJ) (Christmann M. 2003), (Haber J.E. 2000), (Khanna K. K. 2001).

Bei der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) bindet nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen zunächst das Ku70/Ku80-Heterodimer an die freien Bruchenden, um diese vor einem Abbau durch Exonukleasen zu schützen. Dadurch wird die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs) rekrutiert und bildet zusammen mit dem Ku70/Ku80- Heterodimer das aktive DNA-PK-Holoenzym. Die Bindung der entstandenen DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK) an Doppelstrangbrüche aktiviert ihre Serin-/Threonin-Kinaseaktivität (Gottlieb 1993), durch die infolge von Phos-

phorylierung der XRCC4/LigaseIV-Komplex induziert wird, welcher abschließend die Bruchenden ligiert (Leber 1998). Allerdings ist die Ligation nicht in allen Fällen ohne weiteres möglich, da die freien Bruchenden zunächst entsprechend zugeschnitten werden müssen. Dies wird mit Hilfe des ebenfalls durch die DNA-PK aktivierten Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex bewerkstelligt, der als Endo- und Exonuklease fungiert. An diesem Bearbeitungsprozess sind höchstwahrscheinlich weitere Faktoren, wie Fen1 und Artemis beteiligt.

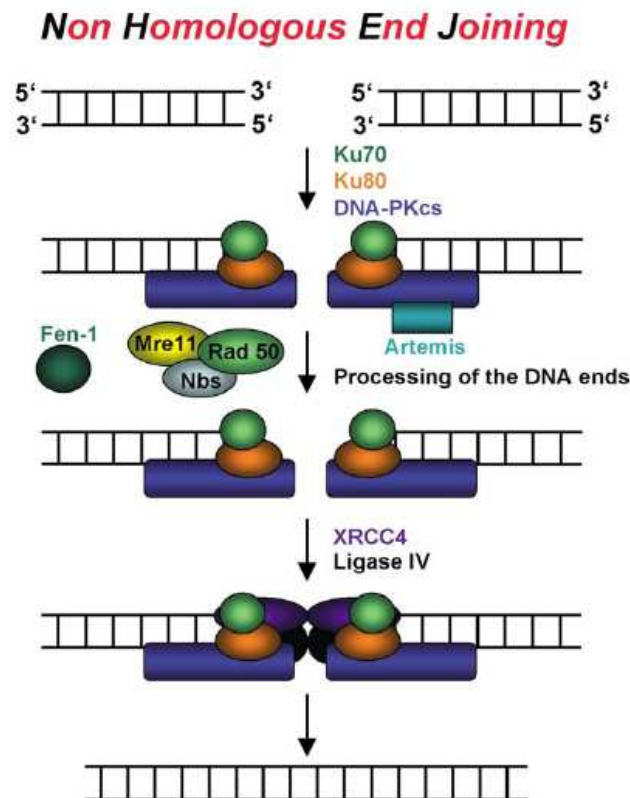


Abb. 1.3 Ablauf der nicht-homologen Endverknüpfung (non homologous end-joining, NHEJ)
(nach Christmann M. 2003)

Der Ablauf der homologen Rekombination ist wesentlich komplexer als der des Non-homologous end-joining. Zunächst werden bei der HR die freien DNA-Enden des Doppelstrangbruchs durch den auch beim NHEJ beteiligten Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex in 5'→ 3'-Richtung zugeschnitten und durch Bindung von Rad52 vor weiterem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Die entstandenen 3'-Einzelstrang-Enden dringen nachfolgend mit Hilfe von Rad51 in die DNA-Doppelhelix eines homologen, ungeschädigten Partnermoleküls ein. Dort werden sie durch DNA-Polymerase verlängert, wobei der komplementäre DNA-Strang des homologen Partners als Vorlage dient. Die dabei erzeugten Überkreuzungen der DNA-Stränge („Holliday junctions“) werden abschließend gelöst, so

dass zwei intakte DNA-Doppelstränge erhalten bleiben (Christmann M. 2003), (Khanna K. K. 2001).

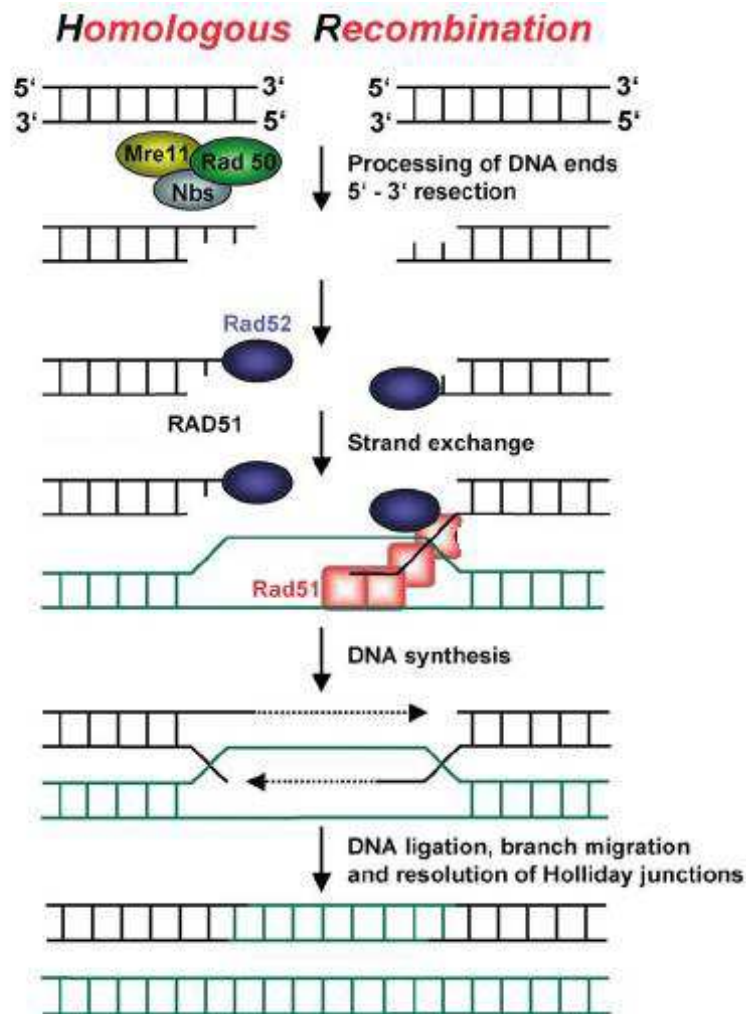


Abb. 1.4 Ablauf der homologen Rekombination (HR) (nach Christmann M. 2003)

Die HR ist ein präziser und weitestgehend fehlerfreier Reparaturweg, der aber nur eingeschlagen werden kann, wenn DNA-Bruchenden eine ausreichende Anzahl von Homologien zu einem anderen DNA-Strang aufweisen. Die Nicht-homologe Endverknüpfung basiert hingegen auf der direkten Verknüpfung freier DNA-Enden (Haber J.E. 2000), ohne homologe DNA-Sequenzen, die als Matrize für den Reparaturvorgang dienen könnten. Aufgrund dessen weist das NHEJ eine höhere Fehlerrate als die Homologe Rekombination auf und verursacht häufiger Mikrodeletionen.

Welcher der beiden Reparaturwege letztendlich eingeschlagen wird, hängt unter anderem von der Phase im Zellzyklus ab. NHEJ kommt hauptsächlich in der G0/G1-Phase vor, wohingegen die HR eher in der späten S-Phase und der G2-Phase auftritt (Takata

1998). Zudem gilt als wahrscheinlich, dass sich die beiden Reparaturwege nicht gegenseitig ausschließen, sondern ergänzen und vervollständigen können. So vermuten Hansen L. et al. (2003), dass durch HR kompliziertere Doppelstrangbrüche repariert werden, deren Reparatur durch die NHEJ zuvor nicht möglich gewesen ist. Als kompliziert gilt ein Doppelstrangbruch, wenn die überhängenden DNA-Enden nicht komplementär sind oder weitere Schäden in den Nukleotiden aufweisen. Iliakis und Wang (2004) gehen dagegen davon aus, dass alle durch Strahlung induzierten Doppelstrangbrüche zunächst durch NHEJ geschlossen werden und die HR nur bei einem kleinen Teil angewandt wird oder erst nach einer initialen Endverknüpfung durch NHEJ greift.

1.2.3 γ H2AX

In Eukaryoten liegt die DNA hoch kondensiert vor, so dass sie in Form des Chromatins im Zellkern Platz findet. Die kleinste Untereinheit des Chromatins bilden die Nukleosomen (Kornberg R. D. 1999). In diesen Proteinkomplexen ist die DNA in einer linksgängigen superhelikalen Windung um ein zentrales Histon-Oktamer gewunden (siehe Abb. 1.5), (Noll M. 1974). Dieses setzt sich wiederum aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammen (Luger K. 1997). Neben der reinen „Verpackungsfunktion“, spielen Histone auch eine Rolle bei der Modulation von Replikation, Transkription und DNA-Reparatur. Um den Proteinen, die bei den genannten Prozessen eine Rolle spielen, den Zugang zur Nukleotid-Basensequenz zu ermöglichen, kommt es zu Umgestaltungen am Chromatin. Dazu gehören kovalente Veränderungen von Histonen, wie z.B. Acetylierung, Deacetylierung, Phosphorylierung, ATP-abhängige Strukturveränderungen und der Austausch von Histonvarianten derselben Histonfamilie (Mersfelder E. L. 2006). Unter diesen verschiedenen Histonmodifikationen, spielt die Phosphorylierung eine elementare Rolle in der DNA-Schadensantwort. Sie erleichtert verschiedenen Reparaturproteinen den Zugang zu DNA-Strangbrüchen, signalisiert diese der Zelle und fördert damit die chromosomale Stabilität. Insbesondere die Phosphorylierung des Serins 139 am C-terminalen Bereich des Histons H2AX, einer Subfamilie der H2A-Familie, nimmt eine herausragende Stellung unter den posttranslationalen Histonmodifikationen im Rahmen der DNA-Schadensantwort ein. Bereits 1-3 Minuten nach einem induzierten Doppelstrangbruch, werden hunderte bis tausende H2AX-Moleküle pro DNA-Doppelstrangbruch phosphoryliert und werden dann als γ H2AX bezeichnet (Paull T.T. 2000), (Rogakou E. P. 1998). An diesen Reaktionen sind PI 3-Kinasen, einschließlich DNA-abhängige Protein-Kinasen (DNA-PK), ataxia teleangiectasiamutated (ATM) und ATM- und Rad3-bezogene (ATR) Kinasen beteiligt (Durocher D. 2001).

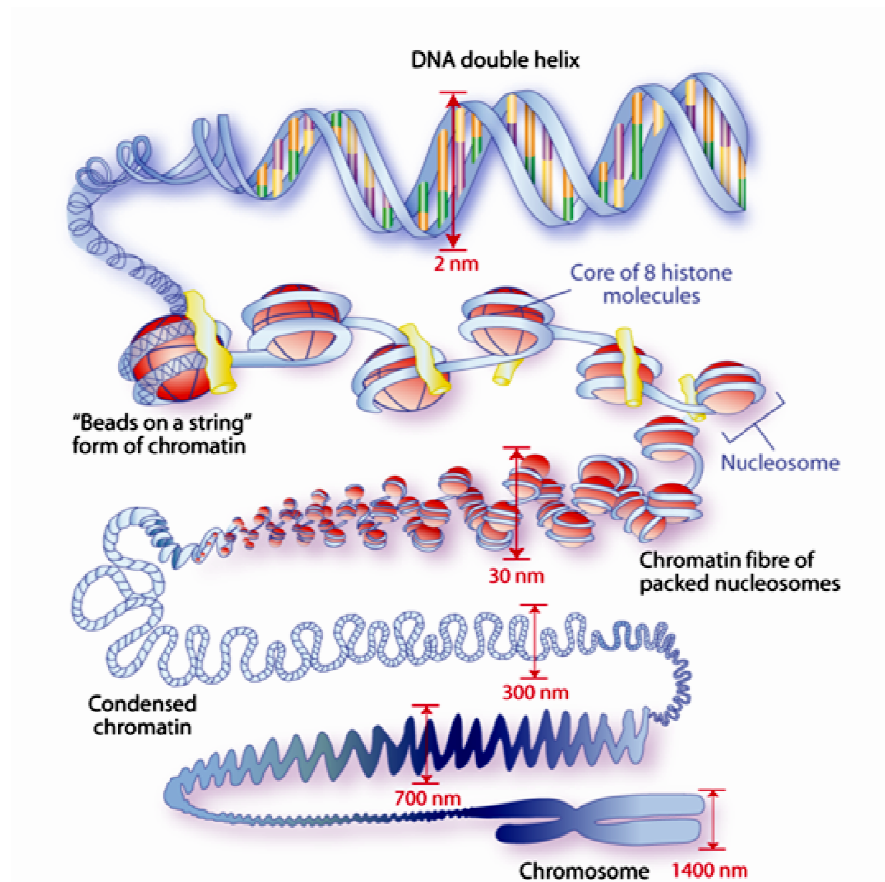


Abb. 1.5 Die Organisation der DNA innerhalb der Chromatinstruktur

Jedes Chromosom besteht aus dicht zusammengefalteten Chromatinfasern, Das Chromatin setzt sich wiederum aus der DNA-Doppelhelix, die um Histonoktamere gewunden ist, und zahlreichen weiteren Proteinen zusammen. DNA und Histon bilden die kleinste Untereinheit, das Nucleosom (aus The EPITRON Project 2010)

Die Phosphorylierung von H2AX, welches etwa 10 % der H2A-Population innerhalb des Chromatins ausmacht und gleichmäßig innerhalb des Chromatins verteilt zu sein scheint (Mannironi C. 1989), (Rogakou E. P. 1998), gilt als einer der frühesten Schritte in der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche (Vidanes G.M. 2005). Zwar stellen Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung das effektivste Signal zur Phosphorylierung von H2AX dar, jedoch kommt es auch durch eine Vielzahl weiterer exogener Faktoren, wie ultraviolettes Licht (Limoli C.L. 2002), Hitze (Takahashi A. 2004), niedriger pH-Wert (Xiao H. 2003) und diverse Chemikalien (Banath J. P. 2003), (Liu J.S. 2003) zur Bildung von γ H2AX. Ebenso lässt sich γ H2AX während der apoptotischen DNA-Fragmentierung (Rogakou E.P. 2000) und im Rahmen von Alterungsprozessen der Zelle (Sedelnikova O.A. 2004) nachweisen. Da H2AX in der DNA-Schadensantwort, insbe-

sondere bei der Rekrutierung diverser Reparatur-Faktoren (Paull T.T. 2000), eine herausragende Rolle spielt, ist dessen Verlust oder Mutation mit chromosomaler Instabilität und erhöhter Strahlensensibilität assoziiert. Bassing et al. (2003) zeigten, dass es bei H2AX- und p53- defizienten Mäusen rasch zu einer Tumorentwicklung kommt.

Die starke Akkumulation von γ H2AX-Molekülen an den Enden von Doppelstrangbrüchen macht es möglich, diese mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers immunfluoreszenzmikroskopisch als distinkte Punkte bzw. so genannte „ γ H2AX-Foci“ sichtbar zu machen und zu quantifizieren (Rogakou E.P 1999). Die Fähigkeit diese γ H2AX-Foci nachzuweisen, eröffnet neue Möglichkeiten der DNA-Schadenserkenung, bei der Analyse der Reparatur-Enzym-Rekrutierung, sowie bei der Ermittlung, wie effizient klinische chemo- und strahlentherapeutische Protokolle sind. So korreliert die Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche, die Geschwindigkeit der Foci-Rückbildung und auch die Anzahl der nach 24 Stunden residualen γ H2AX-Foci mit der zellulären Strahlensensibilität (MacPhail S.H. 2003), (Taneja N. 2004), (Dikomey E. 1998), (McMillan T.J. 1990). Dabei ist die Bildung von γ H2AX abhängig von der Strahlendosis und zeigt einen Zusammenhang sowohl mit der Induktion der Apoptose (Taneja N. 2004), als auch mit dem klonogenen Überleben von Zellen (Banath J. P. 2004).

1.2.4 Klonogener Zelltod

Hauptziel der Strahlentherapie maligner solider Tumoren ist eine maximale Zerstörung des Tumors bei weitestgehender Schonung des Normalgewebes. Aus radiobiologischer Sicht ist der entscheidende Mechanismus, um Tumorzellen am Weiterwachsen zu hindern, der klonogene Zelltod (Ross G.M. 1999). Als klonogen werden Zellen bezeichnet, die das Potenzial besitzen, mehrere Zellteilungen zu durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden. Durch Bestrahlung oder Chemotherapeutika können Tumorzellen die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung und damit zur Bildung von Kolonien verlieren, was als klonogener oder reproduktiver Zelltod bezeichnet wird. Dabei sterben die meisten Zellen nicht sofort, sondern durchlaufen sogar noch eine, zwei oder mehr Mitosen, bevor sie aus Mangel an genetischem Material oder Chromosomenaberrationen an der Teilung gehindert werden und ihre Proliferation einstellen. Einige Zellen können bereits vor der Mitose ohne jegliche Teilung durch ein frühes Apoptoseprogramm sterben. Dieser als Interphasetod bezeichnete Mechanismus ist allerdings weitaus seltener als der klonogene Zelltod. Ebenso kann durch Bestrahlung eine Differenzierung von Zellen beschleunigt bzw. induziert werden, so dass aus klonogenen Zellen terminale Funktionszellen entstehen, die nicht mehr in der Lage sind

Kolonien zu bilden. Dieser Prozess spielt eventuell eine entscheidende Rolle bei der Entstehung radiogener Fibrosen (Herrmann T. 2006).

Mit dem Koloniebildungstest ist es möglich, die Anzahl der proliferierenden Zellen nach Bestrahlung oder Behandlung mit Zytostatika zu ermitteln. Der Koloniebildungstest ist eine der ältesten Methoden zur Beurteilung von Strahlenempfindlichkeiten *in vitro* und wurde schon vor über 50 Jahren entwickelt (Puck T.T. 1956). Die zu testenden Zellen werden bestrahlt und/oder mit Zytostatikum behandelt und anschließend in einem flachen Gefäß 1-3 Wochen lang inkubiert. Zellen, die nach der Behandlung noch teilungsfähig sind, bilden auf dem Boden der Gefäße Kolonien, die sich nach Anfärbung mit einem geeigneten Farbstoff auszählen lassen. Der Prozentsatz an Zellen, der sich nach Aussaat wieder anheftet, proliferiert und Kolonien bildet, bezeichnet man als plating efficiency (PE). Die PE errechnet sich aus dem Verhältnis der gezählten Kolonien zu den ausgesäten Zellen. Die Überlebensrate klonogener Tumorzellen errechnet sich aus der Anzahl der behandelten Kolonien dividiert durch die Anzahl der unbehandelten Kolonien. Als allgemein anerkannter Vergleichsparameter zur Beurteilung der Strahlenempfindlichkeit von Zelllinien gilt die surviving fraction nach 2 Gy (SF2) (Molls M. 1996).

Grafisch wird die Überlebensrate klonogener Zellen in Zellüberlebenskurven bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen dargestellt. Dabei wird die Zellüberlebensrate (SF) in logarithmischer Form gegen die applizierte Dosis (linear) aufgetragen. Der Anfangsteil dieser Kurve weist eine charakteristische Krümmung auf, weshalb sich die Bezeichnung „Schulterkurve“ etabliert hat. Zur mathematischen Auswertung von solchen Zellüberlebenskurven hat sich das Linear-Quadratische-Modell durchgesetzt (Kellerer und Rossi, 1973), welches das Zellüberleben mit folgender Formel beschreibt:

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

($\ln SF$ ist der natürliche Logarithmus der Überlebensfraktion, D die applizierte Dosis, α und β sind zell- bzw. gewebespezifische Konstanten).

Die lineare Komponente ($-\alpha D$) beschreibt die Anfangsneigung der Überlebenskurve (auch Schulter genannt), während die quadratische Komponente ($-\beta D^2$) den weiteren Krümmungsverlauf der Kurve bestimmt, der sich bei höheren Dosen annähernd exponentiell verhält. Der Grundgedanke dieses Modells umfasst die mit steigender Schadenshäufigkeit sinkende Effektivität der Reparatursysteme. Auf molekularer Ebene beschreibt die lineare Konstante die Induktion zweier räumlich sehr nahe beieinander liegenden Doppelstrangbrüche, die durch ein einzelnes Sekundärelektron verursacht werden (Ein-Spur-Ereignis). Die Wahrscheinlichkeit von Ein-Spur-Ereignissen steigt linear mit der Dosis an (αD), d.h. umgekehrt dass das Zellüberleben linear mit der Dosis ab-

nimmt ($-\alpha D$). Die quadratische Abhängigkeit von der Dosis entsteht, wenn zwei benachbarte Doppelstrangbrüche durch unabhängige Sekundärelektronen entstehen (Zwei-Spur-Ereignis).

Eine wichtige Größe zur Beschreibung der Ausprägung der Schulter, ist das α/β -Verhältnis [Gy]. Es gibt diejenige Dosis an, bei der beide Komponenten den gleichen Anteil an der Zellabtötung haben ($-\alpha D = -\beta D^2$). Dabei korreliert die Breite der Schulter mit der Reparaturfähigkeit und damit auch mit der Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie. Je ausgeprägter die Schulter ist, d.h. je mehr die quadratische Komponente überwiegt, desto kleiner ist auch das α/β -Verhältnis und desto größer ist das Reparaturvermögen der jeweiligen Zellen.

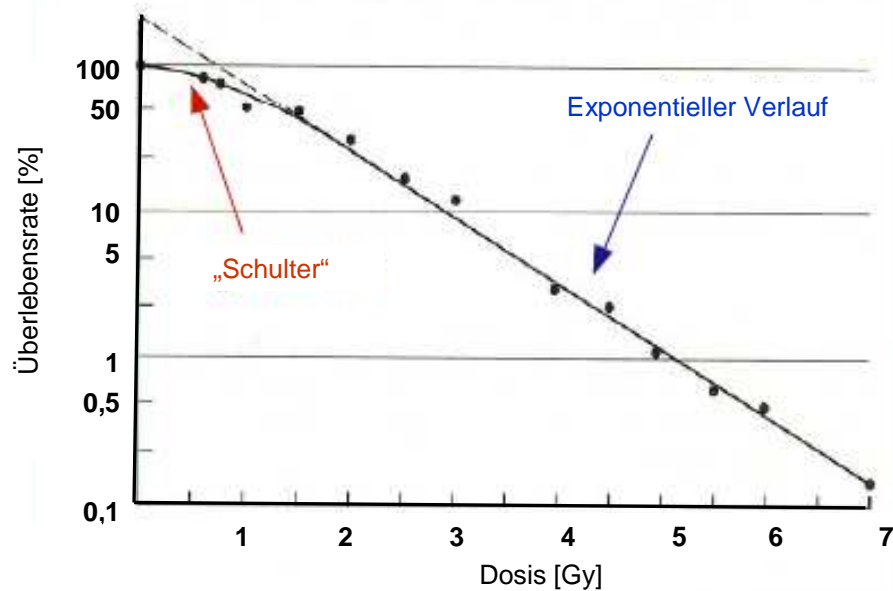


Abb. 1.6 Überlebenskurve für HeLa-Tumorzellen nach Photonenbestrahlung (Puck T.T. 1956)

1.3 Patupilon (Epothilon B)

Wissenschaftler der Arbeitsgruppen um die Professoren Hans Reichenbach und Gerhard Höfle von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig entdeckten im Jahre 1987 verschiedene neue antiproliferativ und zytotoxisch wirksame Substanzen. Die Forscher hatten diese Substanzen, deren Stereochemie sie 1996 aufklärten, aus der Kulturflüssigkeit des im Boden vorkommenden Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* isoliert. Bei der chemischen Bearbeitung durch Höfle und seine Arbeitsgruppe stellte sich heraus, dass es sich um zwei neuartige makrocyclische Polyketide handelte, die nach ihren Struktureinheiten *Epoxid*, *Thiazol* und *Keton* die Namen Epothilon A und B erhielten (Höfle G. 1996).

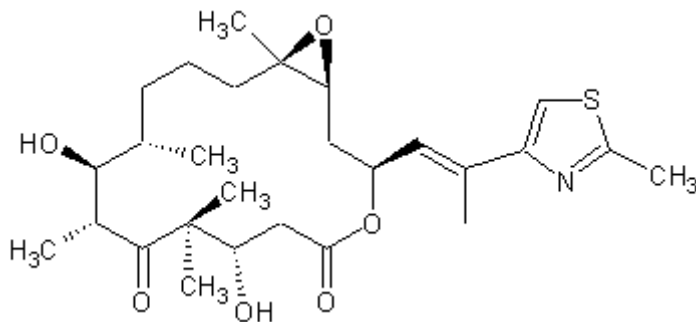


Abb. 1.7 Strukturformel von Epothilon B (Patupilon)

Allerdings wurde der Zytotoxizitätsmechanismus damals nicht näher untersucht und diese Wirkstoffe nicht weiter analysiert. Das Interesse an den beiden Hauptvarianten dieser neuen Naturstoffklasse, den Epothilonen A und B, erwachte acht Jahre später erneut, als Merck, Sharp und Dohme nach alternativen Wirkstoffen für das aus der pazifischen Eibe gewonnene Taxol suchten und schließlich die taxolähnliche Wirkung der Epothilone aufdeckten. Das Besondere an der Entdeckung von Taxol war, dass seine zytotoxische Wirkung auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli beruht, während alle bis dahin gefundenen mikrotubuliaktiven Wirkstoffe wie Colchicin, Vincristin oder Vinblastin die Mikrotubuli destabilisieren und auf diese Weise den Zelltod verursachen (Altmann K.-H. 2008). Seit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus von Taxol vor fast 20 Jahren war trotz intensiver Suche Epothilon die erste Substanz, die den gleichen mikrotubulistabilisierenden Effekt zeigt.

1.3.1 Wirkmechanismus

Mikrotubuli sind Strukturen, die multiple Funktionen in eukaryontischen Zellen übernehmen. Sie können zum einen sehr stabile, statische Strukturen darstellen, z.B. als Bestandteil des Zytoskeletts, andererseits können sie aber auch sehr schnell auf- und wieder abgebaut werden und sind an dynamischen Prozessen wie Zellteilung oder Proteinsekretion beteiligt. Mikrotubuli bestehen aus zwei Proteinen, dem α - und dem β -Tubulin, aus denen sich ein Heterodimer bildet. Im Zytoplasma der Zellen liegt in der Regel ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Tubulin vor. Die Tubulin-Einheiten werden ständig sowohl am plus- als auch am minus-Ende des Mikrotubulus angebaut und auch wieder depolymerisiert, sodass ein Gleichgewicht entsteht, wobei beide Prozesse am plus-Ende schneller verlaufen, was als dynamische Instabilität bezeichnet wird (Kirschner. M. 1986). Diese dynamischen Eigenschaften gestatten eine schnelle Umwandlung von Mikrotubuli-Strukturen, die in Abhängigkeit von den Bedürfnissen der Zelle erfolgen.

Taxol und Epothilon binden an die β -Untereinheit des Heterodimers und stabilisieren dadurch die Mikrotubuli durch Inhibition ihrer Depolymerisation. Das dynamische Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht wird so zugunsten der Mikrotubuli verschoben. Die Zelle ist unfähig die Mitose ordnungsgemäß abzuschließen, es kommt zu einem G2/M Arrest und ggf. zur Apoptose (Bollag D.M. 1995). Substanzen, die einen G2/M-Block induzieren, sind besonders für die Chemotherapie in Kombination mit Bestrahlung von großem Interesse, da die Zellen in dieser Phase des Zellzyklus am strahlensensibelsten sind (Sinclair W.K. 1966), (Dikomey E. 1998). Hofstetter et al. (2005) zeigten allerdings, dass Patupilon in Kombination mit ionisierender Strahlung den Anteil der in der G2/M-Phase befindlichen Zellen eher reduziert, dagegen zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus führt. Dieser S-Phase-assoziierte Mechanismus der Strahlensensibilisierung spielt v.a. in Zellen mit bereits vorhandenen DNA-Schäden, wie dies in Tumorzellen der Fall ist, eine Rolle (Hofstetter B. 2005).

1.3.2 Vergleich Taxol vs. Epothilon

Die klinischen Einsatzmöglichkeiten von Taxol werden durch eine Reihe von Nebenwirkungen und ungünstigen Eigenschaften eingeschränkt. Als Nebenwirkungen treten besonders häufig Neutropenie, Alopezie und periphere Neuropathie auf (Rowinsky E..K 1993), (Rowinsky E.K. 1995). Desweiteren ist Taxol sehr schlecht wasserlöslich, so dass es in einem Lösungsvermittler, Cremaphor, verabreicht werden muss, der wiederum durch die Freisetzung von Histaminen Herzarrhythmien und schwere Überempfindlichkeitsreaktionen hervorrufen kann. Durch die Vorbehandlung mit Antihistaminen und

durch lange Infusionszeiten können die Nebenwirkungen jedoch minimiert werden. Ein anderes Problem ist das Auftreten von Resistenzen, da Taxol wie viele andere Zytostatika aus Zellen mit Multidrug-Resistenz (MDR) durch das Phosphoglykoprotein-Transportsystem herausgepumpt wird. Taxol stellt offenbar ein Substrat für das P-Glykoprotein dar. Vor dem Hintergrund dieser Schwierigkeiten sind neue Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoffe mit anderen Eigenschaftsprofilen von großem Interesse (Altmann K.H. 2001), (Kavallaris M. 2001).

Epothilon ist seit der ursprünglichen Entdeckung von Taxol die erste beschriebene Substanz, die den gleichen Wirkungsmechanismus besitzt. Verdrängungsstudien ergaben, dass Epothilon sogar als kompetitiver Inhibitor von Taxol wirkt. Beide konkurrieren offenbar um die gleiche Mikrotubuli-Bindungsstelle (Bollag D.M. 1995), (Kowalski R.J. 1997). Epothilon besitzt zahlreiche Vorteile gegenüber Taxol. Die Probleme bei der Zubereitung als Arzneimittel, wie sie bei Taxol aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit auftreten, dürften sich für Epothilon nicht stellen, da es ungefähr 30-mal besser in Wasser löslich ist als Taxol. Seine im Vergleich zu Taxol einfache Struktur erleichtert chemische Manipulationen am Epothilon-Molekül. Chemiker können daher relativ leicht Derivate, d.h. mehr oder weniger stark veränderte Varianten von Epothilon, herstellen und so versuchen das Molekül den klinischen Erfordernissen anzupassen. Der entscheidende Vorteil von Epothilon gegenüber Taxol scheint aber seine zytotoxische Wirkung gegen MDR-Zellen zu sein. Entsprechende Studien von Bollag et al. (1995) haben gezeigt, dass die Zytotoxizität von Taxol gegen Zellen, die P-Glykoprotein produzieren, ca. 20 000-fach kleiner ist als gegen Zellen, die dieses Protein nicht herstellen und nicht gegen Zytostatika resistent sind. Epothilon A bzw. B zeigen hingegen einen nur 4- bzw. 12-fachen Aktivitätsabfall. Es ist offenbar ein schlechteres Substrat für das Phosphoglykoprotein und wird in erheblich geringerem Maße aus MDR-Zellen heraus transportiert (Bollag D.M. 1995), (Kowalski R. J. 1995). Dadurch kann Epothilon auch gegen solche Zellen wirksam sein, die sich gegen eine Behandlung mit Taxol als resistent erwiesen haben. Zudem konnte gezeigt werden, dass Epothilone Zellwachstum in vitro bis zu 5-25-mal stärker hemmen als Paclitaxel (Jonge de 2005) und unabhängig vom zytotoxischen Effekt, auch antivaskuläre Wirkung aufweisen (Ferretti S. 2005). In den Phase I und II-Studien mit Patupilon zeigten sich außerdem Unterschiede im Nebenwirkungsprofil. Im Gegensatz zu Taxanen verursacht Patupilon weder Neuropathien, noch Blutbildveränderungen. Dosislimitierend sind hauptsächlich Diarrhoe, Fatigue und Nausea (Jonge de 2005), (Larkin 2007).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Die folgenden Kapitel (2.1.1 - 2.1.9) geben einen Überblick über die Material- und Geräteausstattung, die für die Versuchsdurchführung benötigt wurde.

2.1.1 Zellen

Bei der Zelllinie FaDu, mit der in dieser Arbeit ausschließlich gearbeitet wurde, handelt es sich um humane Hypopharynxkarzinomzellen, die von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA bezogen worden sind. Es handelt sich um Plattenepithelkarzinomzellen, die 1968 von einem 56-jährigen männlichen Patienten in Calcutta isoliert wurden. Die Zellen haben eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 50 Stunden (Rangan S.R.S. 1972) und weisen zudem eine Mutation im p53-Tumorsuppressorgen auf (Reiss M. 1992).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, wurden maximal 40 Passagen alte Zellen verwendet.

2.1.2 Medikament

Patupilon, ein Zytostatikum auf der Basis von Epothilon (Epothilon B), wurde von der Firma Novartis AG, Basel, CH bezogen (interner Name EPO906). Es wird als weiße Substanz in Pulverform geliefert und wird dann mit Hilfe von DMSO in Lösung gebracht (s. 2.2.2.1).

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
HEPES-Puffer	Gibco, Invitrogen, Carlsbad (USA)

Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad (USA)

Das Kulturmedium für die Zelllinie FaDu besteht aus folgenden Komponenten:

DMEM (41966): 500 ml
 FCS: 50 ml
 HEPES: 10 ml
 Pen/Strep: 5 ml
 NEAA: 5 ml

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Koffein ReagentPlus®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kristallviolett 0,1 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderalbuminserum (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau 0,1 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0.05/0,02 % in PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Vectashield® + DAPI	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.1.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Herstellung
Antikörperpuffer für die Immunfluoreszenzfärbung:	
Verdünnung des primären Antikörpers 1:300	3 µl Antikörper in 1000 µl Blocklösung

Verdünnung des sekundären Antikörpers 1:500	2 µl Antikörper in 1000 µl Blocklösung
Blocklösung (PBS ⁺)	1 g BSA und 0,15 g Glycin in 100 ml PBS
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (D-PBS)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad (USA)
Fixierlösung (2 %ig)	2g Paraformaldehyd in 100 ml PBS Auf dem Magnetrührer bei ca. 72°C solange belassen, bis die Lösung klar und das PFA vollständig gelöst ist – auf Raumtemperatur abkühlen lassen
Lyse-Puffer (0,15 %ig)	150 µl Triton X-100 in 100 ml PBS

2.1.6 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
γH ₂ Ax-Primärantikörper Anti-Phospho-Histone γH ₂ Ax (clone JBW 301, mouse monoclonal IgG)	Upstate (Millipore), Billerica (USA)
fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper	Invitrogen, Carlsbad (USA)
(Lagerung: beide Antikörper in Originalbehältern bei -8 °C)	

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Lab-Tek™ Chamber Slide-System (1 Well)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Lab-Tek™ II Chamber Slide-System (1 Well)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Combitips plus (10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser (22 x 50 mm)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Dispenserspitzen für Multipette (10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen (10 ml, 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen, Kunststoff	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Vakuum-Filtrationseinheit	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
96-Well-Platte	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (USA)
12-Well-Platte	Corning Incorporated, Arizona (USA)
Zellkulturflaschen T75	Corning Incorporated, Arizona (USA)
Zellkulturflaschen T25	Corning Incorporated, Arizona (USA)

2.1.8 Geräte

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Bezugsquelle
Bestrahlungsanlage	RT-100	Philips
Brutschrank	Heraeus, Typ BBD6220	Thermo Electron Corporation, Waltham (USA)
Filmdosimeter		PTW, Freiburg
Kolbenhubpipette	Eppendorf-Pipette variabel (0-10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenhubpipette	Eppendorf-Pipette variabel (10-100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenhubpipette	Eppendorf-Pipette variabel (100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg

Kolbenhubpipette	Corning Lambda variabel (10-100 µl)	Corning Incorporated, Arizona (USA)
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Bj.: 2000	Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer mit Heizung	MR 3001K	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Multipette		Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage	AS 60	OHAUS, Nänikon (CH)
Sterilwerkbank	HERAsafe, Typ KS18	Thermo Electron Corporation, Waltham (USA)
Stripettor		Corning Incorporated, Arizona (USA)
Vortex-Mixer	Minishaker®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Zählkammer (nach Neubauer)		Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshof

2.1.9 Vollautomatisches Bildanalysestystem

Bezeichnung	detaillierte Bezeichnung	Bezugsquelle
40x Objektiv	Plan-Neofluar (40x/0,75)	Zeiss, Göttingen
63x Objektiv	Achroplan (63x/0,80)	Zeiss, Göttingen
CCD-Kamera	M1	JAI, Stemmer Imaging, Puchheim
Computer		DELL, Langen
DAPI-Filter	Filtersatz 02	Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Göttingen
Quecksilber Kurzbogenlampe	HBO 103	Zeiss, Göttingen
Software Metafer 4	Version 3.1.2	MetaSystems, Altlussheim

2.2 Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten fanden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 nach Gentechnikgesetz statt, indem Maßnahmen nach Gentechnikverordnung geltend zu machen sind. Der Sicherheitsstufe 2 werden gentechnische Arbeiten zugeordnet, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Bei der verwendeten Zelllinie FaDu handelt es sich um Plattenepithelkarzinomzellen, die ein adhärentes Wachstum zeigen. Sie werden daher in Zellkulturflaschen mit definierter Anwachfläche (T75 = 75 cm² bzw. T25 = 25 cm²) kultiviert. Um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen, wird eine bestimmte Zellzahl in die Kulturflaschen ausgesät. Bei genügend großer Anzahl können sich die Zellen gegenseitig im Wachstum stimulieren, bei zu hoher Zellzahl allerdings kommt es durch Platz- und Nährstoffmangel zu einer Wachstumsverlangsamung. Hierbei sind für eine T75-Kulturflasche $1,5 \times 10^6$ Zellen bei einem maximalen Befüllungsvolumen von 20 ml vorgegeben und bei einer T25-Kulturflasche 5×10^5 Zellen auf maximal 8 ml Volumen.

Das für die verwendete Zelllinie zusammengestellte Medium enthält wichtige Nährstoffe, wie Glucose und Aminosäuren, sowie die im FCS enthaltenen Proteine und Wachstumsfaktoren. Außerdem wird dem Medium Penicillin und Streptomycin zur Prophylaxe von bakteriellen Besiedelungen und eine Puffersubstanz mit einer Pufferkapazität zwischen pH 6,8–8,2 hinzugefügt. Das Milieu im Brutschrank ist mit einer Temperatur von 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % dem im menschlichen Körper nachempfunden.

Alle zellbiologischen Arbeiten finden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank statt, wobei sterile Einmalpipetten, Kulturgefäße und Medien bzw. Medienzusätze verwendet werden.

2.2.1.2 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Die Zellen können in sogenannten Cryoröhrchen über längere Zeit in flüssigem Stickstoff schonend konserviert werden. Um sie wieder in Kultur zu bringen, wird solch ein Cryoröhrchen, das normalerweise 1×10^6 Zellen enthält, im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Hin- und Herschwenken aufgetaut. Sofort nach Verflüssigung der Zellsuspension wird diese in 10 ml vorgelegtes, gekühltes Zellkulturmedium überführt und bei 4°C mit

1000 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, das verbleibende Zellpellet wird in 7 ml Medium gut resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wird in eine T25-Kulturflasche verbracht und einen Tag bebrütet, bis das Medium gewechselt wird.

Die Passage der Zellen wird alle drei bis vier Tage durchgeführt, um zum einen die für das Wachstum ideale Zellzahl pro Kulturflasche wieder herzustellen und zum anderen das Kulturmedium zu erneuern.

Zunächst wird das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert, da diese den Flaschenboden für eine Passage möglichst dicht und adhärent bewachsen haben sollten (siehe Abb. 2.1). Liegen die Zellen nach einigen Tagen noch frei im Medium und in abgekugelter Form vor, spricht dies für die Ablösung und damit für eine Wachstumsbeeinträchtigung der Zellen. Eine Trübung des Kulturmediums kann auf eine bakterielle Kontamination hinweisen.

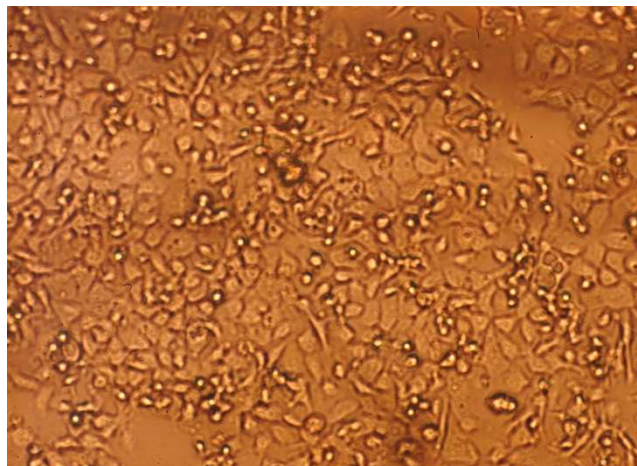


Abb. 2.1 FaDu-Zellen, die den Kulturflaschenboden nach vier Tagen annähernd dicht und adhärent bewachsen haben

Liegen die Zellen entsprechend der gewünschten Bedingungen vor, wird das Medium vollständig abgesaugt und verworfen. Anschließend wird der Flaschenboden zweimalig mit PBS gespült und die Zellen durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin bei T25-Kulturflaschen bzw. 1,5 ml Trypsin bei T75-Kulturflaschen vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank von 4 Minuten, wird die Ablösung durch kräftiges Klopfen der Flasche mechanisch unterstützt. Bei der Kontrolle unter dem Mikroskop sollten die Zellen nun frei beweglich und in abgekugelter Form vorliegen.

Nun wird zügig 2,5 ml Medium bei T25-Kulturflaschen bzw. 4,5 ml Medium bei T75-Kulturflaschen zugegeben, um die Trypsinierung zu beenden. Das im Medium enthaltene FCS liefert dem Enzym so viel Substrat, dass es schließlich durch Übersättigung

inaktiviert wird, so dass es die Zellen nicht weiter proteolytisch angreifen kann. Die Zellen werden gründlich resuspendiert, um die noch aneinander haftenden Zellen voneinander zu trennen und um eine gleichmäßige Durchmischung zu erhalten.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl pro Volumeneinheit in der Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese besteht aus 4 Großquadraten, welche wiederum in je 16 Gruppenquadrate unterteilt ist (siehe Abb. 2.2).

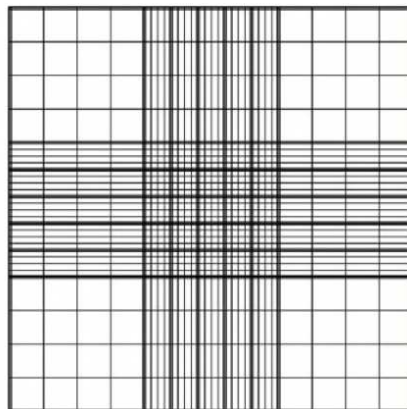


Abb. 2.2 Neubauer-Zählkammer

Zur Differenzierung, ob es sich um vitale oder abgestorbene Zellen handelt, werden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau in einer 96-Well-Platte vermischt. Da der Farbstoff bei abgestorbenen Zellen durch die Membran dringen kann, erscheinen diese unter dem Lichtmikroskop blau. Diese werden bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt.

Ausgezählt werden alle 4 Großquadrate, deren Summe anschließend durch 4 dividiert wird, um den Mittelwert μ zu erhalten. Um die vorhergehende Verdünnung zu berücksichtigen wird der erhaltene Mittelwert noch mit 2 multipliziert. Es ergibt sich also folgende Formel:

$$Z = \mu * 2 * 10^4 \text{ (Zellen/ml)}$$

Der konstante Faktor 10^4 ergibt sich aus der Größe der Zählkammer ($0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$). Um die gewünschte Zellzahl x ($1,5 \times 10^6$ für T75-Flaschen bzw. 5×10^5 für T25-Flaschen) wieder herzustellen, wird das in eine neue Kulturflasche zu überführende Volumen der Zellsuspension berechnet, indem x durch die ausgezählte Zellzahl z dividiert wird.

Das so bestimmte Volumen der Zellsuspension wird in eine neue Zellkulturflasche verbracht und mit Zellkulturmedium auf das maximale Befüllungsvolumen der jeweiligen Flasche aufgefüllt. Durch Schwenken der Zellkulturflasche werden die Zellen verteilt, was erneut unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wird, bevor die Flasche zur Inkubation in den Brutschrank verbracht wird.

2.2.2 Anwendung von Patupilon

2.2.2.1 Herstellen einer Stocklösung

Zunächst wird eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l hergestellt. Als Lösungsmittel für das als Pulver vorliegende Patupilon dient dabei steriles DMSO, da es die Zellen nicht schädigt und sich das Patupilon gut darin lösen lässt.

Um zu berechnen, welches Volumen an DMSO benötigt wird, um eine Konzentration von 1 mmol/l zu erreichen, wird folgende Formel angewendet:

$$n \text{ (Stoffmenge in mol/l)} = \frac{m \text{ (Masse in g/l)}}{M \text{ (molare Masse in g/mol)}}$$

Die molare Masse M von Patupilon beträgt 507,68 g/mol.

Nach m aufgelöst, ergibt sich:

$$m = 0,001 \text{ mol/l} \times 507,68 \text{ g/mol} \approx 0,51 \text{ mg/ml}$$

Daraus resultiert, dass auf ein Gesamtvolumen der Stocklösung von 10 ml 5,1 mg Patupilon abgewogen werden müsste, um eine 1 millimolare Lösung herzustellen. Da das Abwiegen einer solch geringen Menge aber eine enorme Fehlerquelle darstellen würde, wird mit Hilfe des Dreisatzes das Volumen errechnet, das benötigt wird, um die gesamten 10 mg, die im Lieferbehältnis enthalten sind, aufzulösen:

$$\frac{10 \text{ mg}}{5,1 \text{ mg}} * 10 \text{ ml} \approx 19,6 \text{ ml}$$

Um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l zu erhalten, werden somit 10 mg Patupilon in 19,6 ml DMSO gelöst. Die Lösung wird in Aliquots zu je 100 µl bei –18°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Behandlung der Zellen mit Patupilon

Die Behandlung der Zellen mit Patupilon erfolgt unabhängig von der Methodik 23 Stunden nach Aussaat und eine Stunde vor Bestrahlung.

Die verwendeten Konzentrationen von 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon, wurden in Anlehnung an aktuelle Literaturangaben (Trivedi M. 2008), (Hofstetter B. 2005), (Bley C.R. 2009) ausgewählt. Um die Zellen mit den genannten Konzentrationen zu behandeln, wird ein Aliquot á 100 µl im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wird sechsmalig eine 1:10-Verdünnung mittels Zellkulturmedium durchgeführt, so dass eine Konzentration von 1 nmol/l resultiert. Der letzte 10-fache Verdünnungsschritt erfolgt direkt im Kulturgefäß. Für den Koloniebildungsassay beispielsweise werden 12-Well-Platten verwendet, wobei in jedem Well 1 ml Medium enthalten ist. So muss also, um beispielsweise eine Konzentration von 0,1 nM zu applizieren, 100 µl der letzten 1 nanomolaren Verdünnung hinzugegeben werden.

Nach Zugabe des Medikaments werden die Kulturgefäße für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, bevor die Bestrahlung der Zellen erfolgt.

2.2.3 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgt mit einem Orthovoltgerät der Firma Philips bei Raumtemperatur. Dabei wird einheitlich eine Spannung von 70 kV und 10 mAs mit einer 1,25 Aluminiumfilterung verwendet, wobei eine Applikation von 1 Gy einer Bestrahlungsdauer von 1 Minute und 6 Sekunden entspricht. Das Gerät muss zunächst durch Abstrahlung von 5 Gy aufgewärmt werden, um konstante Strahlendosen gewährleisten zu können. Die Strahlung wird mit Hilfe eines 20 x 20 cm Tubus fokussiert. 24 Stunden nach Aussaat werden die Zellen je nach Methodik in 1-Chamber-Slides oder 12-Well-Platten mit Dosen von 2 und 5 Gy bestrahlt. Dabei werden die Kontrollen, die nicht für die Bestrahlung vorgesehen sind, denselben Transportbedingungen ausgesetzt.

2.2.4 γ H2AX-Nachweis

2.2.4.1 Vorbereitung und Aussaat der Zellen

Als Kulturgefäße, in die die Zellen ausgesät werden und alle weiteren Maßnahmen erfolgen, dienen 1-Chamber-Slides mit einem Fassungsvermögen von 4 ml. Angestrebt wird dabei eine möglichst vereinzelte und gleichmäßige Lage der Zellen in den Chamber-Slides, da dies die automatisierte Quantifizierung der γ H2AX-Foci ermöglicht. Als ideale Zellzahl haben sich bei den Vorversuchen 100 000 bis 150 000 Zellen pro ml erwiesen, da diese Zahl noch niedrig genug ist, um Verklumpung und Überlappung der Zellen gering zu halten, jedoch ausreichend hoch ist, um einen zügigen Probendurchlauf zu gewährleisten.

Alle Schritte erfolgen zunächst identisch einer Zellpassage. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer, kann berechnet werden, welches Volumen der Zellsuspension benötigt wird, um die gewünschte Zellzahl in einem Chamber-Slide auszusäen.

Für die Aussaat von 150 000 Zellen/ml in ein Chamber-Slide:

$$\frac{150\,000}{\text{gezählte Zellzahl}} * 4\text{ ml} = x$$

Das so errechnete Volumen x wird in ein Tube gegeben und auf 4 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Es wird gut resuspendiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten und um eventuell aneinander haftende Zellen voneinander zu lösen.

Die Zellsuspension wird in das Chamber-Slide pipettiert und dieses anschließend in den Brutschrank zur Inkubation verbracht.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci fand eine Stunde, sowie 24 Stunden nach Bestrahlung statt. Um die Inkubation nach der jeweiligen Zeit zu beenden, wird das Medium aus den Chamber-Slides entfernt, die Mediumreste mit PBS ausgewaschen und die Zellen 15 Minuten lang mit einer 2-%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Daraufhin wird nochmals mit PBS gespült und anschließend werden die Zellkerne 3-mal 5 min mit Lyse-Puffer (s. 2.1.5) permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen werden danach durch 3-maliges waschen (je 10 min) mit Blocklösung (s. 2.1.5) abgesättigt. Jeweils 200 μ l des Primärantikörper-Puffers (s. 2.1.5) werden anschließend auf den Boden der Chamber-Slides pipettiert. Die Chamber-Slides werden dann über Nacht in einer feuchten Kammer bei -8°C belassen.

Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation wird 5 min mit PBS, 10 min mit Lyse-Puffer und wieder 5 min mit PBS gewaschen, bevor die Zellen erneut 7 min mit Blocklösung behandelt werden. Ab diesem Zeitpunkt finden alle Arbeitsschritte im Dunkeln statt. Denn nun werden die Zellen mit 200 µl des fluoreszierenden Sekundärantikörperpuffers (s. 2.1.5) benetzt und mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgen jeweils zwei Waschschrte mit Lyse-Puffer (je 5 min) und PBS (je 10 min). Nach gründlicher Absaugung der Flüssigkeitsreste, können die Kammern der Chamber-Slides entfernt werden, so dass lediglich die Objektträger mit den darauf befindlichen Zellen vorliegen. Mit Hilfe von Deckgläsern, die mit Vectashield+DAPI beträufelt werden und auf die Objektträger aufgebracht werden, erfolgt die fluoreszenzmikroskopische blaue Anfärbung der DNA und gleichzeitig wird durch Vectashield ein Schutz vor Ausbleichung gewährleistet.

Bei Verwendung des Lab-Tek™ Chamber Slide-Systems, müssen vor Aufbringung des Deckglases die Silikonreste der Kammerbefestigung mit Hilfe eines Skalpells entfernt werden, damit das Deckglas eben aufliegen kann und keine Luftblasen entstehen. Die mikroskopische Auswertung erfolgt innerhalb von 14 Tagen, um Intensitätsverluste der Fluoreszenzsignale zu vermeiden.

2.2.4.3 Quantifizierung von γ H2AX-Foci

Die computervermittelte Quantifizierung von γ H2AX-Fluoreszenzsignalen erfolgte durch das vollautomatische System der Firma MetaSystems, bestehend aus einem Computer, der Software Metafer4 (Version 3.1.2), einer CCD-Kamera, einem Epifluoreszenzmikroskop und einem externen Objektträger-Wechsler. Dieser ermöglicht die Analyse von bis zu 80 Objektträgern. Ursprünglich wurde das System für die FISH-Analyse an Interphasekernen entwickelt, aber wurde in Bezug auf die Messung von γ H2AX-Fluoreszenzsignalen am Bundesamt für Strahlenschutz von Schulz V. (2009) etabliert.

Für die Detektion der fluoreszenzmarkierten Zellkerne wurde ein DAPI-Filter (Filtersatz 02, Anregung: G 365, Strahlteiler: FT 395, Emission: LP 420) verwendet. Die Anregung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 markierten γ H2AX-Foci, erfolgte durch einen FITC-Filter (Filtersatz 10, Anregung: BP 515-565). Außerdem wurden zwei unterschiedlich hoch auflösende Objektive - ein 40x Objektiv (Plan-Neofluar, 40x/0,75) und ein 63x Objektiv (Achromplan, 63x/0,80) – eingesetzt. Bei jedem Versuch wurden so mindestens 300 Zellkerne ausgewertet.



Abb. 2.3 Das vollautomatische Bildanalysesystem Metafer (von MetaSystems)

Links im Bild: der externe Objektträger-Wechsler, der die Analyse von bis zu 80 Objektträgern ermöglicht. Mitte: das Epifluoreszenzmikroskop. Rechts im Bild: die Software Metafer4 (Abb. ohne PC)

2.2.5 Koloniebildungsassay

2.2.5.1 Vorbereitung und Aussaat der Zellen

Der Koloniebildungstest gilt als Goldstandard für die Bestimmung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung von Zellkulturen *in vitro* und wird daher zur Beurteilung der Strahlensensibilität herangezogen.

Für den Koloniebildungsassay werden 12-Well-Platten, mit einem Befüllungsvolumen von 1 ml pro Well verwendet. Analog einer Zellpassage, wird die in der Zellkulturflasche pro Volumeneinheit enthaltene Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Basierend auf der Arbeit von Hagedorn C. (2010) hat sich für Platten, die nicht bestrahlt werden, eine Zahl von 1000 Zellen/Well als geeignet erwiesen. Da nicht nur die Bestrahlung mit 2 und 5 Gy, sondern insbesondere die Kombination mit einem Zytostatikum eine toxische Wirkung auf die Zellen hat, muss die auszusäende Zellzahl in diesem Fall dementsprechend erhöht werden, um eine ausreichend hohe Zelldichte für die nachfolgende Auswertung zu gewährleisten. Somit werden bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy 2000 Zellen/Well und bei einer Dosis von 5 Gy 5000 Zellen/Well ausgesät. Für die Aussaat von 1000 Zellen/ml bei einer 12-Well-Platte wird mit folgender Formel das benötigte Volumen der Zellsuspension errechnet:

$$\frac{1000}{\text{gezählte Zellzahl}} * 12 \text{ ml} = x$$

In den meisten Fällen resultiert ein Volumen, das zu gering ist, um es korrekterweise pipettieren zu können. Aus diesem Grund wird zuvor eine 1:10 Verdünnung mit Kulturmedium hergestellt. Aus dieser Verdünnung wird dann das errechnete Volumen x in ein Tube gegeben, anschließend auf 12 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt und gründlich resuspendiert. Mit Hilfe einer Multipipette kann nun je 1 ml der Zellsuspension in jedes Well gegeben werden. Nach 23 Stunden im Brutschrank, werden die verschiedenen Konzentrationen an Patupilon hinzugefügt (2.2.2.2) und nach einer weiteren Stunde im Brutschrank erfolgt die Bestrahlung der 12-Well-Platten (2.2.3).

Nachfolgend ist schematisch die Versuchsmatrix dargestellt:

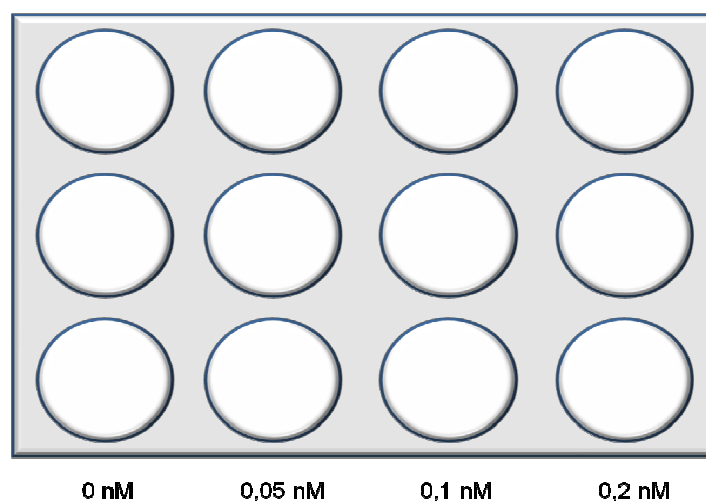


Abb. 2.4 12-Well-Platte

Die verschiedenen Konzentrationen an Patupilon werden in vertikaler Richtung und somit in dreifacher Ausföhrung pro Bestrahlungsdosis in die einzelnen Wells gegeben

Weitere 24 Stunden nach Bestrahlung wird das Medium in den 12 Wells gewechselt und damit das Medikament entfernt. Die 12-Well-Platten werden ca. 14 - 16 Tage bebrötet, so dass Kolonien von mindestens 50 Zellen heranwachsen können.

2.2.5.2 Fixierung und Färbung

Um die Auszählung der Kolonien zu erleichtern, werden diese zunächst fixiert und anschließend gefärbt.

Konnte bei der Kontrolle unter dem Lichtmikroskop eine ausreichende Koloniengröße von > 50 Zellen festgestellt werden, wird das Medium aus den einzelnen Wells abgesaugt und anschließend Medium- und Zellrückstände mit Hilfe von PBS ausgewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit kaltem Methanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), welches 5 Minuten lang in den Wells belassen wird. Nach Entfernung des Methanols, werden die Zellen dann für 2

Minuten mit 0,1%igem Kristallviolett angefärbt. Flüssigkeitsreste werden vorsichtig unter fließendem Wasser aus den Wells heraus gespült. Die 12-Well-Platten werden abschließend zum Lufttrocknen ausgelegt.

2.2.5.3 Auswertung

Die Anzahl der Kolonien kann entweder mit einem Mikroskop oder automatisiert durch einen Elispot Reader bestimmt werden. Um die Anhebrate der Zellen (plating efficiency, PE) in Prozent zu erhalten, werden die ausgezählten Kolonien zu den ausgesäten Kolonien ins Verhältnis gesetzt und mit 100 multipliziert. Die Überlebensrate (surviving fraction, SF) errechnet sich aus der Anzahl der behandelten ausgezählten Kolonien dividiert durch die Anzahl der unbehandelten ausgezählten Kolonien, wobei die SF der unbehandelten Zellen mit 1 gleichzusetzen ist.

Da die plating efficiency der verwendeten Zelllinie FaDu relativ gering ausfällt, wurden die Kolonien visuell unter dem Lichtmikroskop quantifiziert, wobei lediglich Kolonien mit einer Größe von > 50 Zellen berücksichtigt wurden.

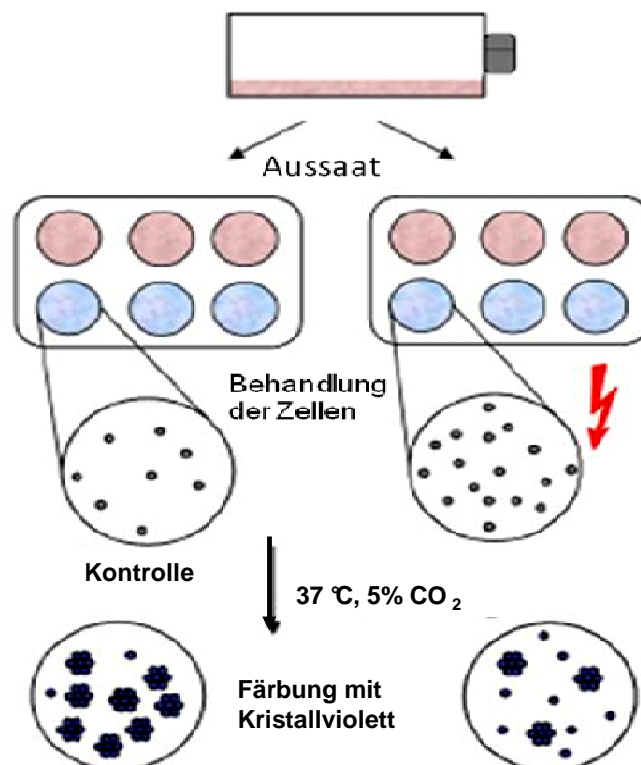


Abb. 2.5 schematischer Ablauf des Koloniebildungstests

2.2.6 Allgemeine Statistik

Zellkultur-Experimente wurden triplikativ durchgeführt, d.h. mindestens drei Mal und unabhängig voneinander. Alle in dieser Arbeit aufgeführten bzw. dargestellten Werte sind, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte mit Standardfehler. Für statistische Auswertungen wurde u.a. der Wilcoxon-Mann-White-Test verwendet, der zur Überprüfung zweier nichtparametrischer Verteilungen herangezogen wird (Sachs L. 2006). Das Signifikanzniveau wurde bei zweiseitiger Fragestellung auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software „SPSS Statistics“ verwendet, alle Berechnungen der Daten, inklusive der Statistik, wurden mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Reparaturkapazität strahleninduzierter Doppelstrangbrüche

In 15 repräsentativen Versuchen wurde zunächst der vorliegende Grundschaden, d.h. die Anzahl an γ H2AX-Foci, die ohne Bestrahlung oder Medikamentenzugabe in der Zelllinie FaDu vorliegt, ermittelt. Im Mittel fanden sich 30 Foci pro Zellkern. Bei Messungen eine Stunde nach applizierten Bestrahlungsdosen von 2 und 5 Gy fanden sich durchschnittlich 20 bzw. 22 Foci mehr pro Zellkern, d.h. in der Summe lagen nach 2 Gy 50 Foci und nach 5 Gy 52 Foci vor.

Um die Reparaturkapazität der Zellen nach Strahleneinwirkung zu ermitteln, wurden die residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden quantifiziert. Dabei differierte die Anzahl nach einer Bestrahlung mit 2 Gy nur noch um 6 bzw. nach 5 Gy um 9 Foci im Vergleich zur Kontrolle (siehe Tab. 3.1).

	Kontrolle	2 Gy	5 Gy
1 Stunde	31,0	50,8	51,7
24 Stunden	29,3	35,9	38,5

Tab. 3.1 Mittelwerte der nach Bestrahlung pro Zellkern gemessenen Foci nach 1 und nach 24 Stunden

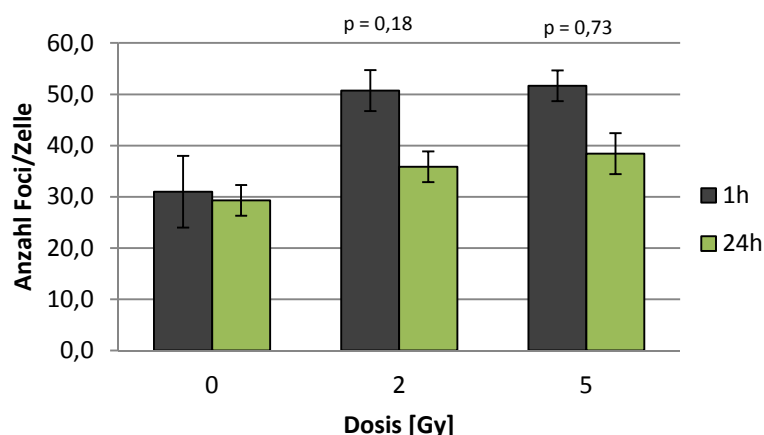


Abb. 3.1 Bestimmung der Reparaturkapazität strahleninduzierter Doppelstrangbrüche in FaDu-Zellen durch Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach einer und nach 24 Stunden post radiatio mit zwei unterschiedlichen Strahlendosen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler aus 6 repräsentativen Versuchen

24 Stunden nach Bestrahlung mit steigender Dosis, konnte auch visuell eine Zunahme der γ H2AX-Foci in den Zellkernen festgestellt werden (siehe Abb. 3.2).

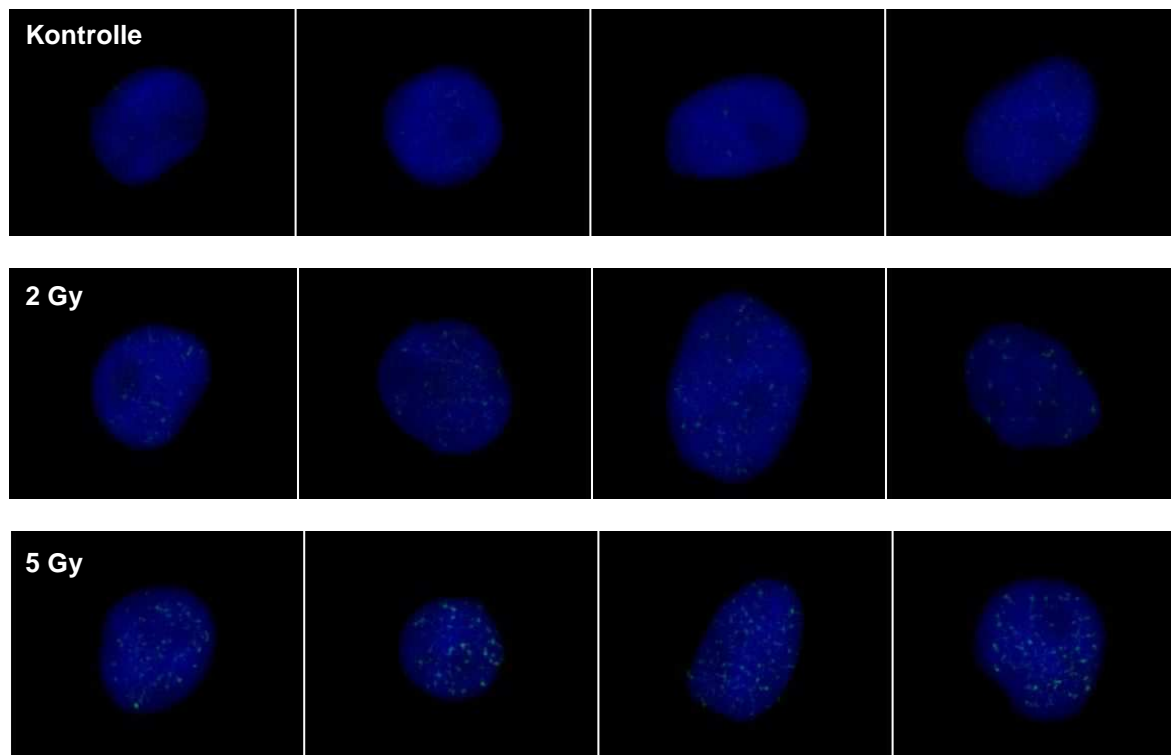


Abb. 3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von γ H2AX-Foci (grün) in FaDu-Zellkernen (blau) der Kontrolle und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy.

Die Software Metafer4, mit der die γ H2AX-Foci quantifiziert wurden, fasst Zellkerne mit einer nahe beieinanderliegenden Focianzahl zu Klassen zusammen. Dies erlaubt die unten gezeigte Darstellung der Häufigkeitsverteilungen. Erkennbar ist eine Rechtsverschiebung des Peaks mit steigender Dosis bzw. nach kürzerer Erholungszeit nach Bestrahlung (eine Stunde), was bedeutet, dass der Anteil der Zellkerne mit hoher Focianzahl zunimmt.

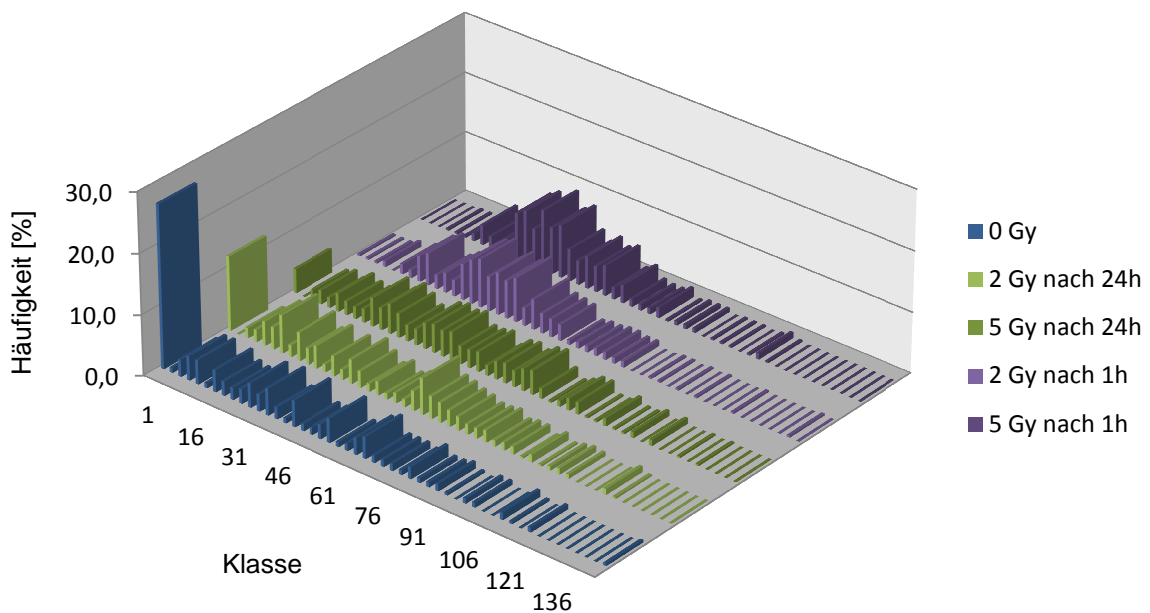


Abb. 3.3 Klassendiagramm aus der gemessenen Focianzahl nach 0, 2 und 5 Gy jeweils nach einer und nach 24 Stunden

3.2 Einfluss von Patupilon auf die Anzahl der γ H2AX-Foci

Um den alleinigen Effekt von Patupilon auf FaDu-Zellen zu analysieren, wurde Patupilon in steigenden Konzentrationen (0,05 nM, 0,1 nM und 0,2 nM) dem Zellmedium zugesetzt und je eine oder 24 Stunden lang inkubiert.

Nach einstündiger Inkubation von Patupilon, zeigte sich eine deutliche Differenz der DSB-Anzahl gegenüber der Kontrolle. Dabei induzierte eine Konzentration von 0,05 nM interessanterweise die meisten γ H2AX-Foci, nämlich im Mittel 23 mehr im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Patupilonkonzentration von 0,1 nM lag eine Differenz von 16 Foci vor, wohingegen die Zellen, die mit 0,2 nM Patupilon behandelt wurden, noch 14 Foci mehr als die Kontrolle aufwiesen. Mit steigender Konzentration nahm die Differenz an

Doppelstrangbrüchen zwar ab, wobei deren Anzahl numerisch, über der der Kontrolle lag. Die Differenzen waren allerdings mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant.

Nach 24-stündiger Einwirkzeit von Patupilon, fand sich in den Zellkernen eine geringere Focianzahl als nach nur einstündiger Inkubation. Die γ H2AX-Zahl differierte aber im Mittel noch 7,4 Foci im Vergleich zur Kontrolle. Unter den verschiedenen Konzentrationen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied. Die Focidifferenzen zwischen der ein- und der 24-stündigen Einwirkzeit waren statistisch ebenfalls nicht signifikant, wobei sich die p-Werte mit steigender Patupilonkonzentration dem Signifikanzniveau annäherten (vgl. Abb. 3.4).

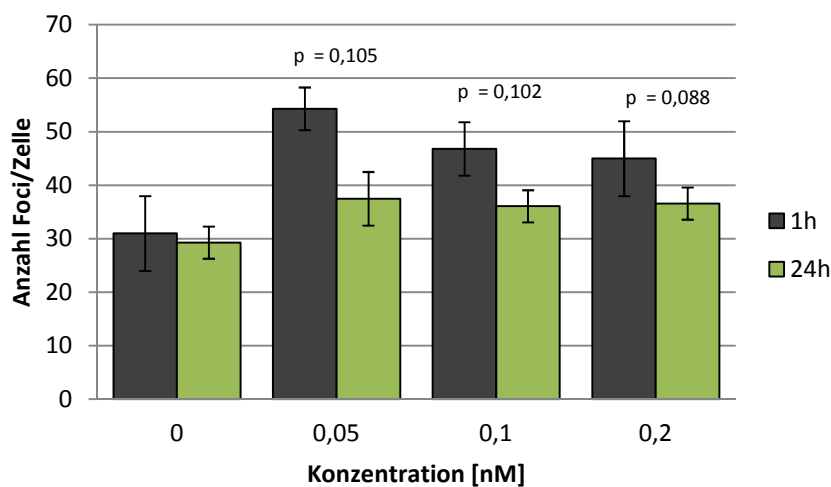


Abb. 3.4 Anzahl der γ H2AX-Foci nach 1- und nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Patupilon. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mind. 5 repräsentativen Versuchen

Auch im Klassendiagramm (Abb. 3.5) zeigt sich durch Patupilonzugabe eine Zunahme der Focianzahl bereits nach einer Stunde, was die Rechtsverschiebungen des Peaks verdeutlichen. Die Höhe des Peaks, sowie dessen Rechtsverschiebung ist in dieser Darstellung bei 0,05 nM ebenfalls am ausgeprägtesten. Allerdings lässt sich auch erkennen, dass kein wirklich eindeutiger Unterschied zwischen den steigenden Patupilonkonzentrationen besteht.

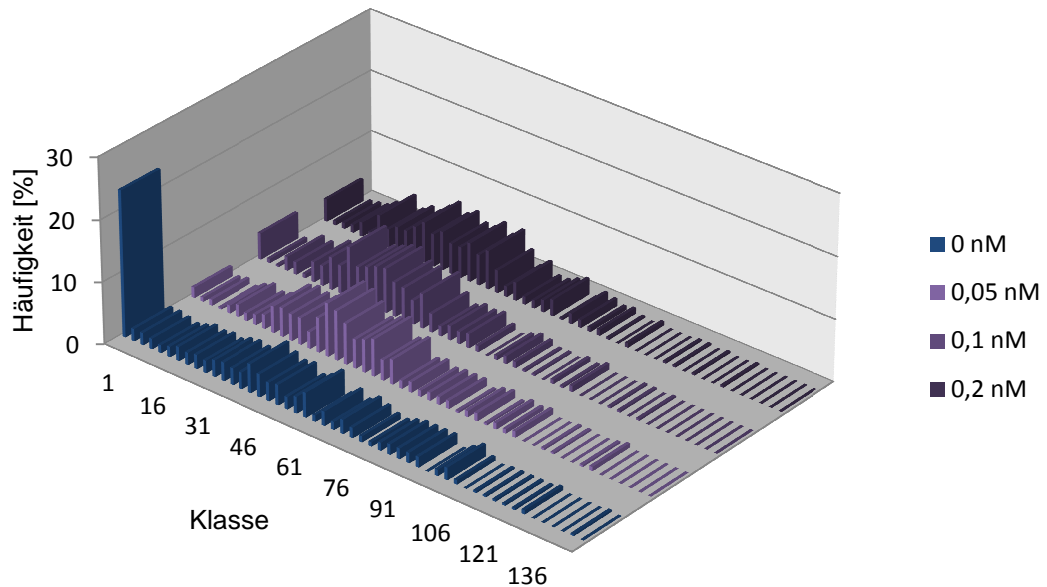


Abb. 3.5 Klassendiagramm aus der nach einer Stunde gemessenen Focianzahl nach Zugabe von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon

3.3 Einfluss von Patupilon auf die Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci

Im Kombinationsversuch sollte untersucht werden, inwieweit Patupilon die Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität nach Bestrahlung beeinflusst. Hierfür wurden die Zellen eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Patupilon vorbehandelt, anschließend mit 2 und 5 Gy bestrahlt und nach Reparaturzeiten von einer und 24 Stunden die γ H2AX-Foci quantifiziert.

Strahlendosis	Reparaturzeit	0 nM	0,05 nM	0,1 nM	0,2 nM
2 Gy	1 h	50,8	57,0	52,7	55,5
	24 h	35,9	45,5	42,7	44,9
5 Gy	1 h	51,7	58,3	56,8	56,8
	24 h	38,5	49,1	44,4	43,5

Tab. 3.2 Einfluss von Patupilon auf die Reparatur strahleninduzierter DSB. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus mind. 4 unabhängigen Versuchen (n = 4)

Aus

Tab. 3.2 ist zu entnehmen, dass nicht nur die Anzahl induzierter Doppelstrangbrüche, also eine Stunde nach Bestrahlung, sondern auch die Anzahl residueller Foci nach einer 24-stündigen Reparaturzeit durch Zugabe von Patupilon erhöht ist.

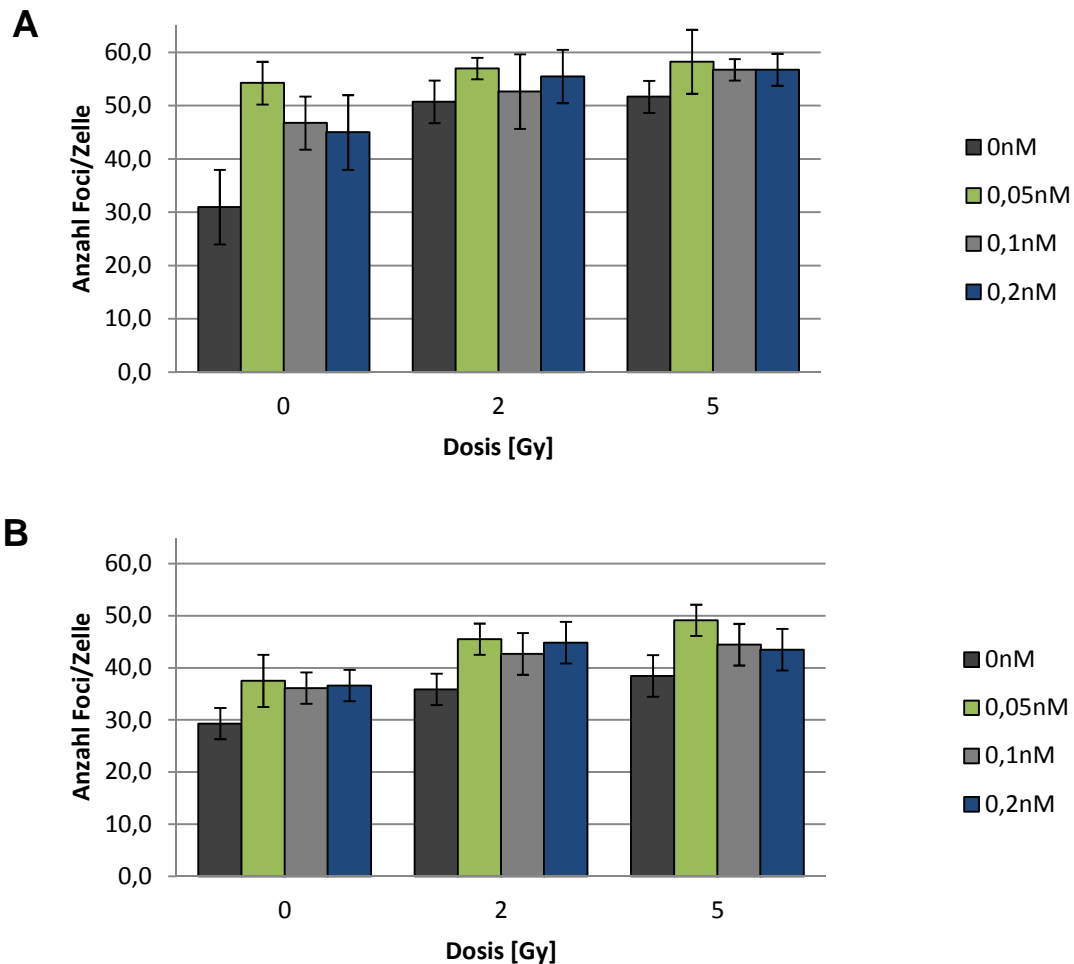


Abb. 3.6 Einfluss von Patupilon auf die Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci. Die Fixierung und Quantifizierung der Foci erfolgte in unabhängigen Versuchen 1h (**A**) und 24h (**B**) nach Bestrahlung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler

Abb. 3.6 A und B zeigen graphisch den Einfluss von Patupilon in verschiedenen Konzentrationen auf die Anzahl der induzierten bzw. residuellen γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

Eine Stunde nach Bestrahlung, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied nach einer Kombinationsbehandlung (p-Werte lagen im Bereich von 0,108 bis 0,748) gegenüber alleiniger Anwendung von Patupilon oder ionisierender Strahlung. Bei einer Konzentration von 0,05 nM lag die Anzahl der γ H2AX-Foci unabhängig davon, ob zusätzlich bestrahlt wurde oder nicht, relativ konstant bei 56,3 (\pm 2,0). Auch bei höheren Konzent-

rationen von Patupilon (0,1 und 0,2 nM) zeigte die Kombination mit Strahlung keinen signifikanten Effekt auf die Quantität der Foci. In Abb. 3.6 A ist auch gut ersichtlich, dass bereits Patupilon alleine zu einer deutlichen Zunahme der γ H2AX-Foci führte.

Nach 24 Stunden (siehe Abb. 3.6 B) allerdings, konnte mit steigender Strahlendosis ein Anstieg der residualen γ H2AX-Foci bei Verwendung von Patupilon festgestellt werden (mit p-Werten von 0,186 bis 0,974 ebenfalls statistisch nicht signifikant), was auf einen Einfluss von Patupilon auf die Reparaturkapazität strahleninduzierter Doppelstrangbrüche hinweisen könnte.

Insgesamt zeigte eine Patupilonkonzentration von 0,05 nM, wie schon bei alleiniger Anwendung, zeitunabhängig den größten Einfluss auf die Induktion von γ H2AX-Foci. Nach 24 Stunden konnten bei einer Behandlung mit 0,05 nM Patupilon im Durchschnitt 37,5 Foci pro Zelle quantifiziert werden. Eine Bestrahlung mit 5 Gy induzierte im Mittel 38,5 Foci pro Zelle. In Abb. 3.7 ist dargestellt, dass die Kombination beider Parameter eine deutliche Erhöhung der Doppelstrangbrüche, nämlich auf 49,1 Foci/Zelle, zur Folge hatte. Mit $p = 0,19$ wies dieses Ergebnis allerdings keine statistische Signifikanz auf.

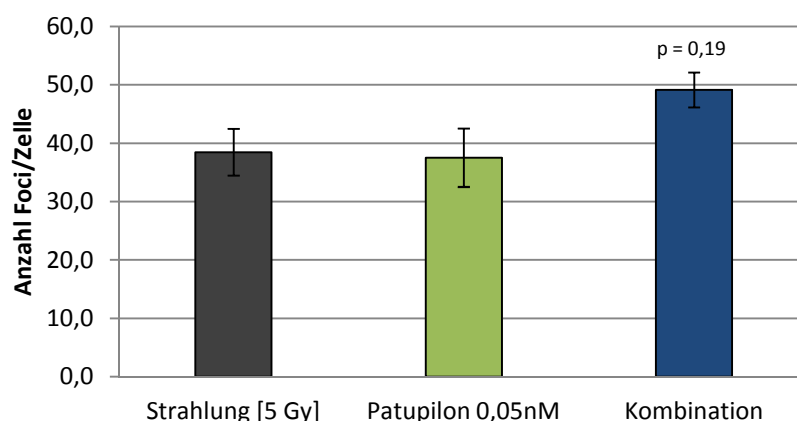


Abb. 3.7 Effekte von Strahlung (5 Gy) und Patupilon (0,05 nM) separat und in Kombination, jeweils nach 24-stündiger Inkubation. Aus 8 unabhängigen Versuchen wurden die dargestellten Mittelwerte mit Standardfehler errechnet

Das Klassendiagramm (vgl. Abb. 3.8) zeigt ebenfalls, dass die Kombination aus 0,05 nM Patupilon und 5 Gy ionisierender Strahlung gegenüber der Einzelanwendung den Zellanteil mit größerer Focianzahl erhöht. Zellen ohne oder mit sehr wenigen Doppelstrangbrüchen, sprich niedrige Klassenwerte im Diagramm, kommen nach Kombinationsbehandlung kaum noch vor, wohingegen die hohen Klassenwerte überwiegen und einen unscharfen Peak ausbilden.

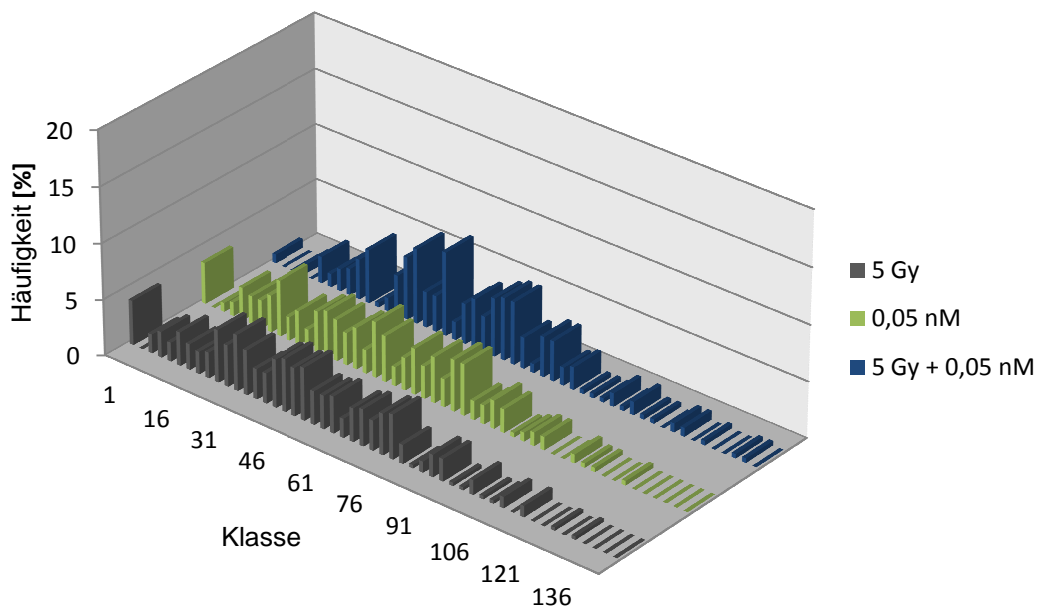


Abb. 3.8 Effekte von Strahlung (5 Gy) und Patupilon (0,05 nM) separat und in Kombination im Klassendiagramm, jeweils nach 24-stündiger Inkubation

3.4 Dosis-Wirkungskurve der Zelllinie FaDu

Um Dosis-Wirkungs-Beziehungen herzustellen und eine Strahlensensibilisierung durch Patupilon zu untersuchen, wurde der Koloniebildungsassay durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Nach Aussaat von 1000 Zellen konnten im Schnitt 41 Kolonien überleben, folglich wies die Zelllinie FaDu in den Versuchen eine sehr geringe PE von 4 % auf. Wie Abb. 3.9 zeigt, nahm das Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit steigender Dosis kontinuierlich ab. Dabei lag die SF der mit 2 Gy bestrahlten Proben bei $40,5 \pm 7\%$. Bei einer Strahlendosis von 5 Gy sank die SF auf $8,7 \pm 5\%$.

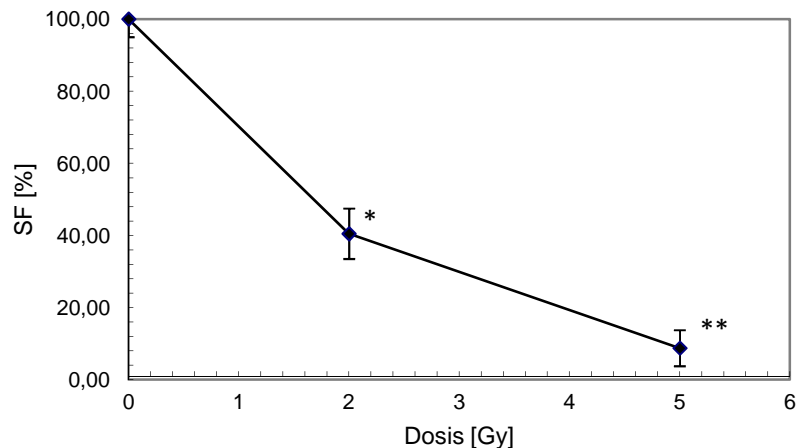


Abb. 3.9 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Bestrahlung mit 2 und 5 Gy. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + Standardabweichung aus je sechs unabhängigen Experimenten (n=6) mit statistischer Signifikanz (** $p \leq 0,001$ und * $p \leq 0,05$)

3.5 Einfluss von Patupilon auf das klonogene Überleben

Das Überleben der Zellen, die über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Patupilon behandelt worden sind, nahm mit zunehmender Konzentration signifikant ab (siehe Abb. 3.10). Die mit 0,05 nM inkubierte Probe, zeigte eine SF von $81,4 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$), die mit 0,1 nM von $49,8 \pm 3 \%$ ($p < 0,001$) und eine Behandlung mit 0,2 nM führte zu einer SF von $38,1 \pm 5 \%$ ($p = 0,003$). Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen wurde deutlich reduziert, wobei Bestrahlung einen größeren Effekt hatte.

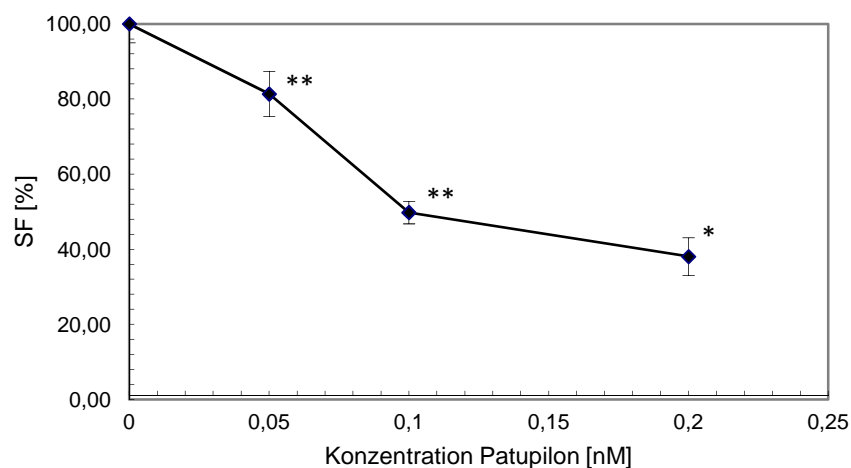


Abb. 3.10 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Behandlung mit 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + Standardabweichung aus je sechs unabhängigen Experimenten (n=6) mit statistischer Signifikanz (** $p \leq 0,001$ und * $p \leq 0,05$)

3.6 Kombinationseffekte im Koloniebildungsassay

Wurde ionisierende Strahlung von jeweils 2 und 5 Gy mit den Konzentrationen 0,05, 0,1 und 0,2 nM Patupilon kombiniert, zeigte sich ein additiver Effekt der beiden Faktoren. In Tab. 3.3 sind die berechneten surviving fractions (SF) in Prozent aus den einzelnen Versuchen tabellarisch, sowie graphisch in Abb. 3.11 dargestellt. Eine Bestrahlungsdosis von 5 Gy reduzierte die Koloniebildungsfähigkeit signifikant auf eine SF von lediglich 8,7 %. Die höchste Konzentration an Patupilon, die in dieser Arbeit verwendet wurde, war 0,2 nM, welche zu einer SF von 38,1 % führte. Die Kombination von Strahlung und Patupilon reduzierte die SF allerdings am deutlichsten auf 3,2 %.

	0 Gy	2 Gy	5 Gy
0 nM	100,0	40,5	8,7
0,05 nM	81,4	34,6	7,0
0,1 nM	49,8	27,3	4,9
0,2 nM	38,1	19,2	3,2

Tab. 3.3 Aufführung der SFs in % nach Bestrahlung und Behandlung mit Patupilon aus sechs unabhängigen Versuchen (n = 6)

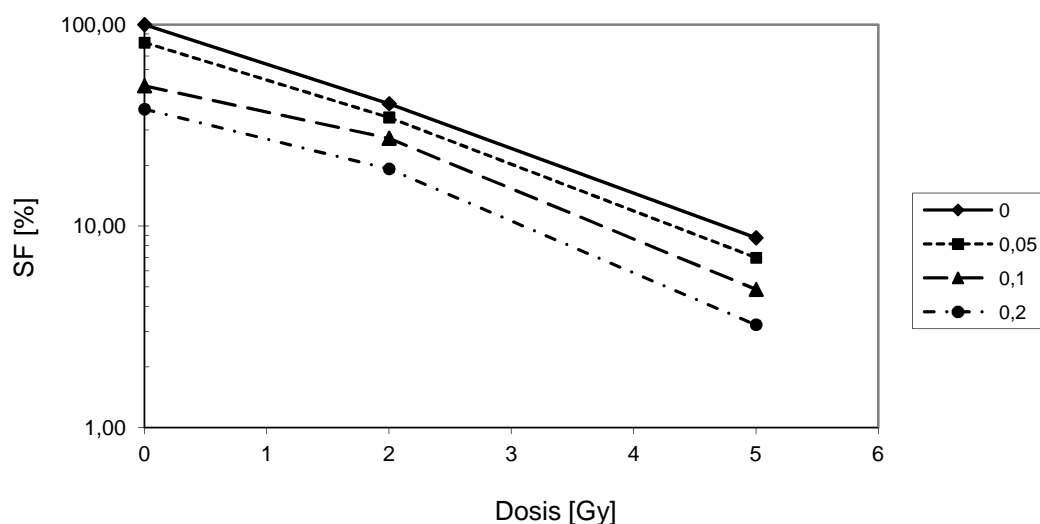


Abb. 3.11 Klonogener Assay mit FaDu-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit Strahlung und Patupilon. Gezeigt sind die SFs [%] aus sechs unabhängigen Versuchen (n = 6) in logarithmischer Skalierung

Die Abb. 3.12 zeigt den Einfluss beider Größen, sowohl Strahlungsdosis, als auch Patupilonkonzentration, in einer glatten Approximation. Anhand des steileren Verlaufs der Gy-Kurve ist ebenfalls ersichtlich, dass ionisierende Strahlung ein größeren Effekt auf das Zellüberleben hat, als Patupilon. Beide Komponenten gemeinsam reduzieren das Überleben jedoch am stärksten.

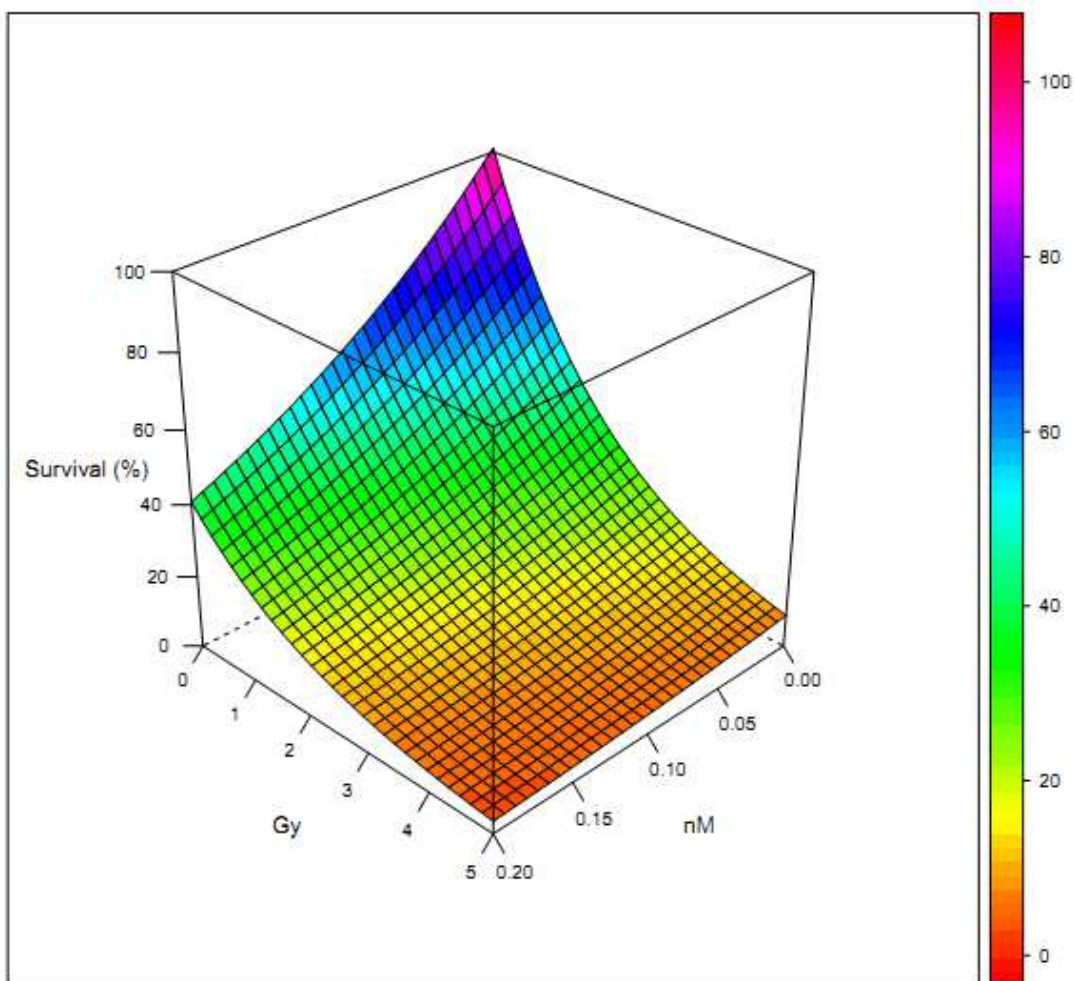


Abb. 3.12 Glatte Approximation der Einflussgrößen Strahlung [Gy] und Patupilonkonzentration [nM] auf das zelluläre Überleben [%]

Das folgende Isobologramm veranschaulicht ebenso den additiven Effekt von Strahlung und Patupilon. Isobolen sind Linien gleichen Effektes, in diesem Fall ist das zelluläre Überleben als Effekt dargestellt. Liegen die einzelnen Werte, wie hier, auf einem Linienniveau, ist von Additivität auszugehen. Subadditive (antagonistische) Kombinationen ergeben eine konvex verlaufende Linie. Konkave Isobolen charakterisieren supraadditive (synergistische) Kombinationen.

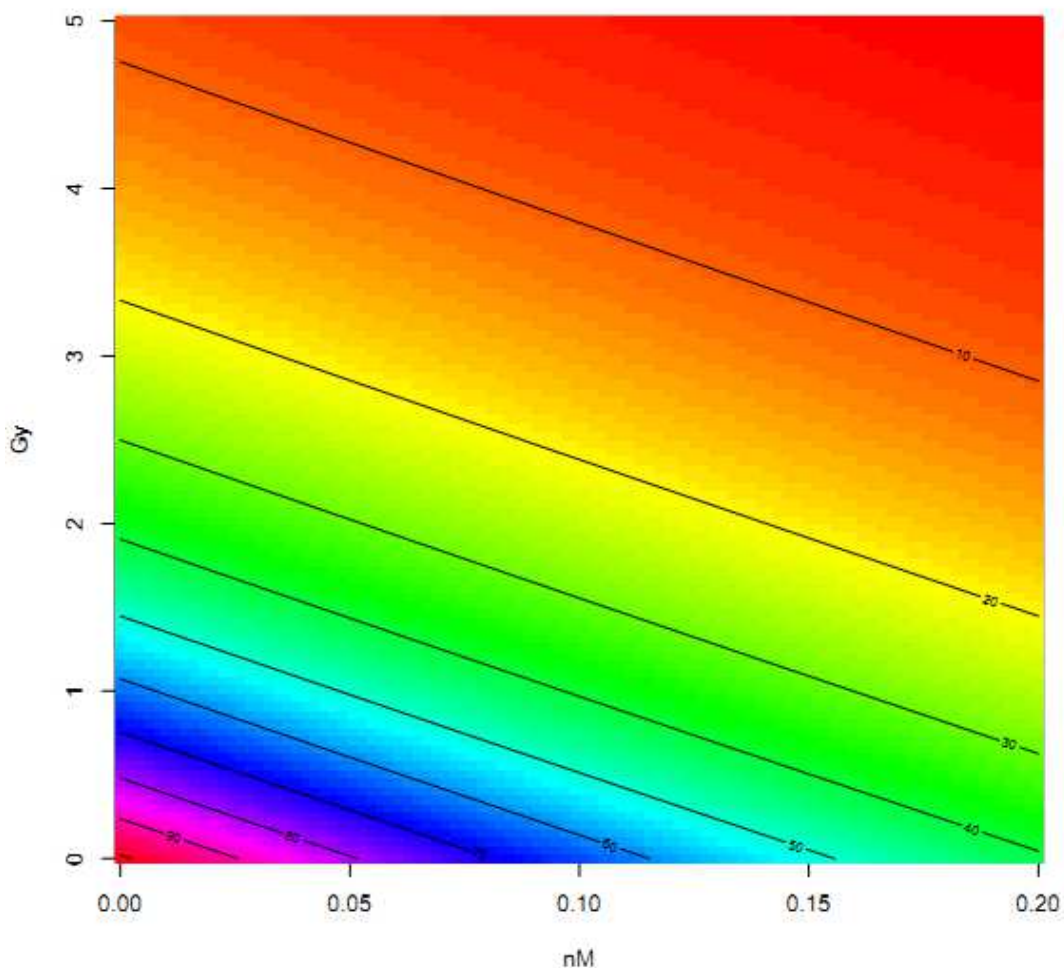


Abb. 3.13 Isobologramm der Einflussgrößen Strahlung [Gy] und Patupilonkonzentration [nM] auf das zelluläre Überleben [%]

3.7 Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Quantifizierung

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 beschrieben, stellt der Koloniebildungstest den aktuell geltenden Goldstandard dar, um die Sensibilität einer Zelllinie gegenüber ionisierender Strahlung oder Zytostatika anhand ihrer klonogenen Überlebensrate zu testen. Aus diesem Grund, wurden die Ergebnisse des Koloniebildungstests mit den gewonnenen γ H2AX-Werten auf Korrelationen hin untersucht.

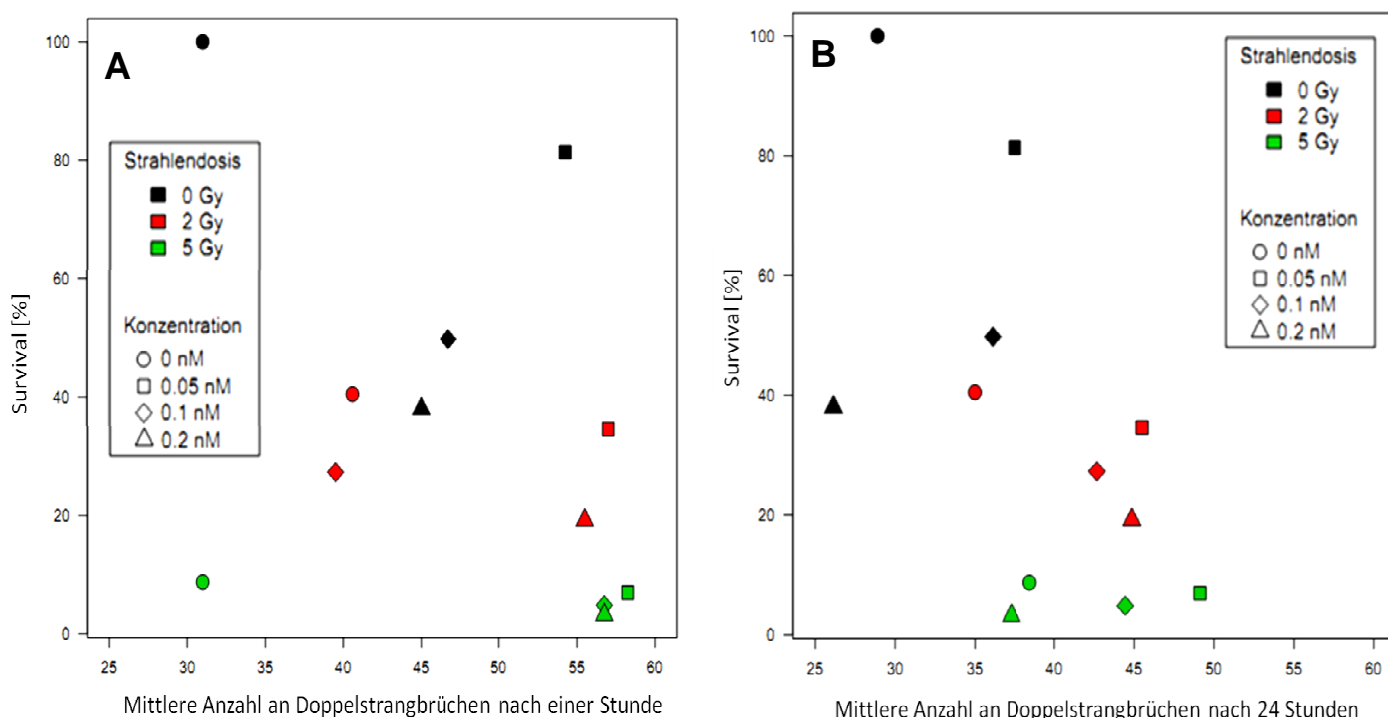


Abb. 3.14 Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Foci-Detektion nach einer Stunde (A) und nach 24 Stunden (B)

Abb. 3.14 A und B zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen Survival und Anzahl der Doppelstrangbrüche, sowohl nach einer Stunde, als auch nach 24 Stunden. Je mehr Doppelstrangbrüche detektiert wurden, desto geringer fällt das zelluläre Überleben aus. Deutlicher ist diese Beziehung allerdings eine Stunde nach Bestrahlung. In der Zusammenschau fällt auf, dass nach 24 Stunden die Zahl der Doppelstrangbrüche insgesamt sinkt, wohingegen das Überleben weitestgehend konstant gegenüber der einstündigen Messung bleibt. Zudem kann man dieser Darstellung wiederholt entnehmen, dass eine Strahlendosis von 5 Gy den deutlichsten Effekt auf das zelluläre Überleben hat und dass Patupilon alleine konzentrationsunabhängig eine eher geringere Wirkung hat.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung der Arbeit

Unter den verschiedenen heute angewendeten Chemotherapeutika, repräsentieren die Taxane als Mikrotubulistabilisatoren eine der effektivsten Substanzen in der Antitumortherapie. Deren klinische Einsatzmöglichkeiten werden jedoch zunehmend eingeschränkt, nicht nur aufgrund einer Reihe von Nebenwirkungen, sondern v.a. durch das Auftreten von Multidrug-resistenten (MDR) Zellen. Der neue Wirkstoff Patupilon (EPO906, Epothilon B) fungiert ebenfalls als Stabilisator von Mikrotubuli, allerdings ist der Naturstoff auch in MDR-Tumoren wirksam, in denen Paclitaxel in klinisch vertretbarer Dosierung keine Wirkung mehr zeigt. Bekanntermaßen führt Paclitaxel zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M Phase, die als sehr strahlensensibel gilt (Terasima T. 1961), weshalb Paclitaxel als sogenannter Radiosensitizer wirksam ist. Besonders für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich konnten radiosensibilisierende Effekte von Paclitaxel sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden (Elomaa L. 1995), (Hampel G. 1995), (Hoffmann W. 1997), (Rübe C. 1996). Aufgrund der Analogie des Wirkmechanismus wurde in dieser Arbeit das radiosensibilisierende Potential von Patupilon an der Zelllinie FaDu (Plattenepithelkarzinomzellen aus dem Hypopharynx) untersucht. Der Einfluss von Patupilon auf die Quantität und das Reparaturvermögen von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Methode analysiert, während zusätzlich das klonogene Überleben mit dem Koloniebildungsassay betrachtet wurde.

4.2 γ H2AX-Foci-Quantifizierung

Da die Anzahl der induzierten γ H2AX-Foci, die Geschwindigkeit der Foci-Rückbildung und auch die Anzahl der nach 24 Stunden residualen γ H2AX-Foci mit der zellulären Strahlensensibilität korreliert (MacPhail S.H. 2003), (Taneja N. 2004), (Dikomey E. 1998) (McMillan T.J. 1990), wurden die Effekte von Patupilon mit dieser Methodik untersucht. Dabei erreicht die Phosphorylierung des Histons H2AX etwa 30-60 Minuten nach Entstehung eines Doppelstrangbruchs maximale Werte (Rogakou E.P 1999), (Tanaka T. 2007), weshalb Messungen 1 Stunde nach Bestrahlung, dazu dienen, den unmittelbar induzierten DNA-Schaden festzustellen, Messungen 24 Stunden nach Bestrahlung dagegen sollten die Reparaturkapazität der Zellen aufzeigen.

Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte vollautomatisiert durch die Software Metafer4 von MetaSystems. Das System am Bundesamt für Strahlenschutz wird vorwiegend zur Auswertung des Comet Assays eingesetzt (Rössler U. 2006), wurde allerdings 2009 von Schulz V. auch für die Quantifizierung von γ H2AX-Foci etabliert. Da in jener Arbeit ausschließlich mit primären Lymphozyten gearbeitet wurde und diese im Gegensatz zu Tumorzelllinien kein adhärentes Wachstum zeigen, musste die Methodik für die Zelllinie FaDu entsprechend modifiziert und optimiert werden. Dies beinhaltete zu Anfang die Suche nach dem idealen Kulturgefäß, das eine reibungslose automatische Messung gestattete. Verwendet wurden letztendlich zwei verschiedene 1-Chamber-Slide-Systeme der Fisher Scientific GmbH. Bei Verwendung des Lab-Tek™ Chamber Slide-Systems, bei denen die Kammerwände mit Silikon befestigt sind, zeigten sich regelmäßig Verklumpungen der Zellen, was anschließend zu enormen Schwierigkeiten bei der automatisierten Quantifizierung durch Überlappungen der Zellkerne führte. Beim Lab-Tek™ II Chamber Slide-System dagegen, sind die Kammerwände mit einem biokompatiblen Kleber angebracht. Um Wachstum und Adhäsion der Zellkulturen zu verbessern, ist dieses Produkt zusätzlich mit einer hydrophoben Grenzschicht überzogen und die Glasoberfläche durch einen speziellen Waschschrift in seiner Konsistenz verbessert. Die Zellen ließen sich in diesen Chamber-Slides sehr gut und gleichmäßig verteilen. Den Unterschied im Wachstumsverhalten einen Tag nach Aussaat der Zellen zeigen Abb. 4.1 A und B.

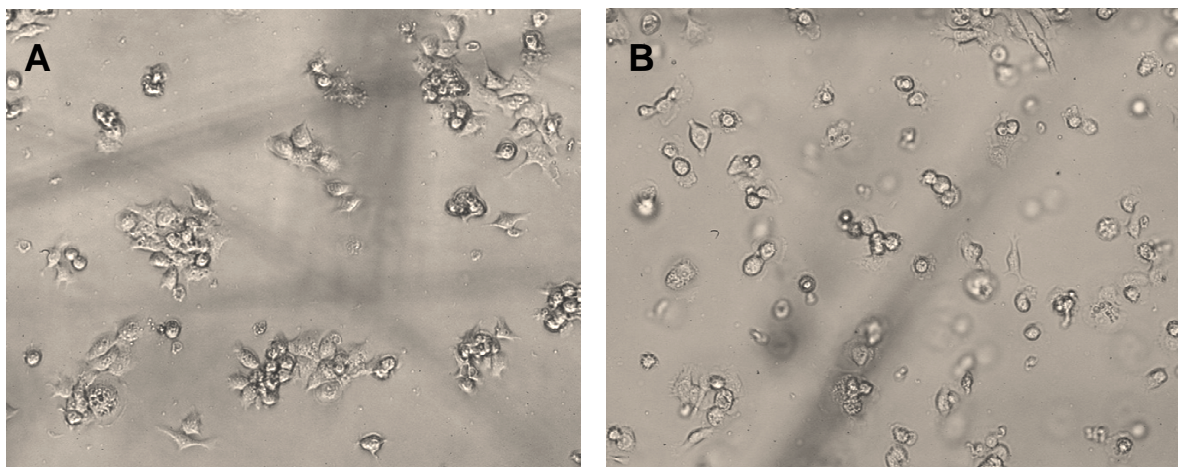


Abb. 4.1 Wachstumsverhalten von FaDu-Zellen im Lab-Tek™ - (A) und im Lab-Tek™ II Chamber Slide (B)

Anschließend mussten auch Zellzahlen und damit auch Mengenangaben des Protokolls für die immunzytochemische Anfärbung der Zellen entsprechend angepasst werden. Um mit Hilfe der Software γ H2AX-Foci in den Zellkernen detektieren bzw. quantifizieren zu

können, müssen außerdem zu Beginn der Messungen Schwellenwerte festgelegt werden. Dabei wird ein Focus in Metafer4 über seine Fläche, seine minimale Distanz zum nächsten Fluoreszenzsignal und über die Intensität des Fluoreszenzsignals definiert. Abhängig von diesen für alle Messungen gleichbleibenden Schwellenwerten, kommt es zu einer früher oder späteren Sättigung des Systems. Betrachtet man den Verlauf der Foci-Induktion mit steigender Strahlendosis, so geht der Kurvenverlauf bei Strahlendosen über einem Gray in eine Sättigungskurve über, d.h. eine Erhöhung der Dosis zeigt keinen weiteren Anstieg der Anzahl der γ H2AX-Foci. So wurden bei Messungen eine Stunde nach Bestrahlung mit 2 Gy im Mittel 50 Foci detektiert, wohingegen nach einer Dosis von 5 Gy lediglich 2 Foci mehr, nämlich 52 Foci pro Zellkern vorlagen (siehe Abb. 4.2).

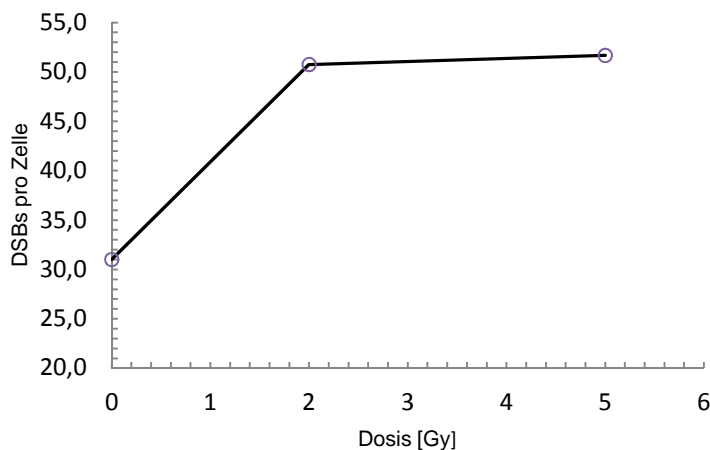


Abb. 4.2 Sättigungskurve der γ H2Ax-Focianzahl bei steigender Strahlendosis 1 Stunde nach Bestrahlung

Auch die Messungen eine Stunde nach Kombination von Strahlung und Patupilon ließen keine deutlichen Differenzen mehr erkennen. Die maximal zu detektierende Focianzahl lag in der Regel bei ca. 55 Foci/Zellkern. Höchstwahrscheinlich ist diese geringe Differenz bei steigender Strahlendosis auf die Überlappung zweier oder mehrerer Fluoreszenzsignale in der Maximalprojektion zurückzuführen, die dann bei der Quantifizierung der γ H2AX-Foci nicht mehr als getrennt liegende Objekte gezählt werden können. Dies wirkt sich umso deutlicher aus, je mehr Foci pro Zellkern vorliegen (Rogakou E.P 1999), (Böcker W. 2006), (Tanaka T. 2007). Diese Problematik wird auch bei manueller Foci-Quantifizierung ab einer Dosis von 2 Gy beschrieben (Rogakou et al. 1999). Die Beeinträchtigung der ermittelbaren Anzahl an γ H2AX-Foci bei höheren Bestrahlungsdosen wird in verschiedenen Veröffentlichungen kritisch diskutiert (Bouquet F. 2006), (Tanaka T. 2007). Bisher finden sich nur wenige Publikationen, in denen strahlungsinduzierte

Foci mit Hilfe von Computerprogrammen quantifiziert wurden, da der Anteil der Untersuchungen, in denen γ H2AX-Signale per Auge ausgezählt werden, noch überwiegt. In Arbeiten, in denen die Quantifizierung der Foci mit einem Bildanalysesystem durchgeführt wurde, konnte das Problem der Sättigung durch Verwendung eines sehr hoch auflösenden Objektivs (400x) reduziert werden (Wykes S. M. 2006).

Die Zelllinie FaDu wies bereits ohne Bestrahlung oder Patupilonbehandlung einen relativ hohen Grundschaden auf. Im Mittel wurden 30 Foci pro Zellkern detektiert. Im Vergleich dazu, finden sich in humanen Fibroblasten mit manueller Auszählung erst nach 1 Gy Röntgenstrahlung ca. 29 Foci/Zellkern (Rothkamm K. 2007). Allerdings sollte man bedenken, dass es sich bei FaDu um Tumorzellen handelt und diese ohnehin durch ihre hohe Anzahl an DNA-Schäden und Mutationen gekennzeichnet sind und somit eine hohe endogene Focianzahl erklärbar wird (Sedelnikova O. 2006). Zusätzlich handelt es sich bei der Zelllinie FaDu um eine p53-Mutante. Nach den Ergebnissen von Yu et al. (2006) und Tanaka et al. (2006) hat auch der p53-Status einer Zelllinie einen wesentlichen Einfluss auf ihre γ H2AX-Hintergrundwerte, wobei p53-Wildtypen weniger γ H2AX-Hintergrundfoci als p53-Mutanten aufweisen.

Die Anzahl der Doppelstrangbrüche, die durch 2 und 5 Gy ionisierende Strahlung induziert wurden, sind mit Ergebnissen aus den bereits zuvor (beispielsweise von Rothkamm und Lobrich, 2003) veröffentlichten Daten für Dosen zwischen 0,001 und 90 Gy ionisierender Strahlung durchaus vergleichbar (siehe Abb. 4.3).

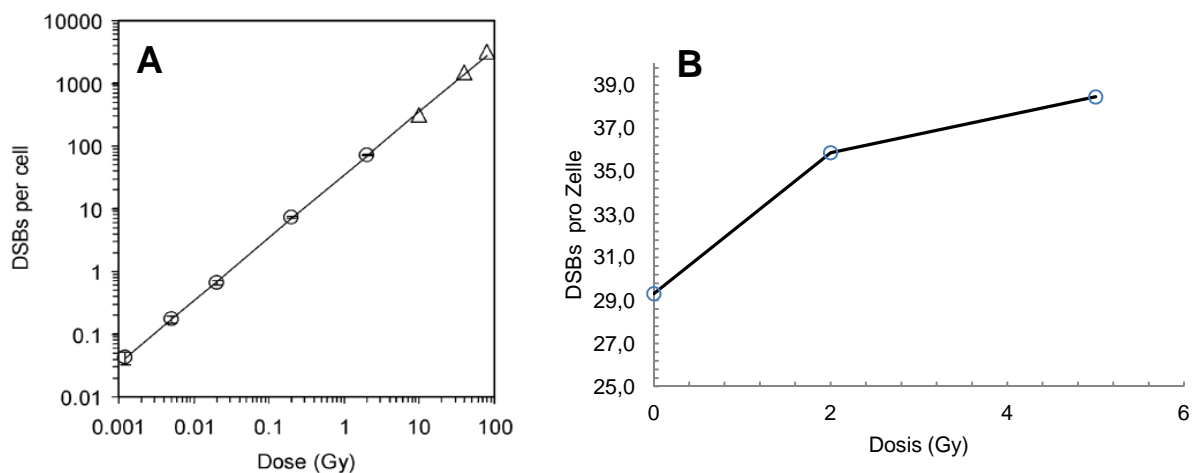


Abb. 4.3 γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung; **A:** Ergebnisse für menschliche Fibroblasten (aus: Rothkamm und Löbrich, 2003); **B:** eigene Ergebnisse, erhalten nach Bestrahlung von Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx (Zelllinie FaDu)

In dieser Arbeit induzierte eine Strahlendosis von 5 Gy nahezu dieselbe Anzahl an γ H2AX-Foci wie 0,05 nM Patupilon. Diese Ergebnisse stützen die These, dass nicht nur

ionisierende Strahlung zur Bildung von γ H2AX-Foci führt. Eine Vielzahl weiterer exogener Faktoren, wie ultraviolettes Licht (Limoli C.L. 2002), Hitze (Takahashi A. 2004), niedriger pH-Wert (Xiao H. 2003) und diverse Chemikalien (Banath J. P. 2003), (Liu J.S. 2003) führen ebenfalls zur Bildung von γ H2AX. Dies konnte auch für Paclitaxel gezeigt werden (Shi J. 2008), wobei der Mechanismus, der die Phosphorylierung von H2AX triggert, nicht geklärt ist. Zudem gilt die H2AX-Phosphorylierung als relativ frühes Ereignis in der Apoptose, der zeitgleich mit der Aktivierung von Caspase-3 abläuft (Tanaka T 2007). Apoptotische Zellen zeigen sogar einen extrem hohen Gehalt an γ H2AX, was im Verlauf des Zelltods wieder abnimmt. Zellen, die sich in der späten Apoptosephase befinden, weisen nur noch wenig γ H2AX auf (Tanaka T 2007). Dies könnte erklären, weshalb in dieser Arbeit nach einstündiger Inkubation von Patupilon mehr γ H2AX-Foci quantifiziert wurden, als nach 24-stündiger Einwirkzeit. Nach einer Stunde konnten die noch in der Apoptose befindlichen Zellen mit erfasst werden, während diese nach 24 Stunden den Zelltod bereits durchlaufen hatten. So ist es möglich, dass die avitalen Zellen zu Beginn der Fixation ausgewaschen wurden und damit bei der Fociquantifizierung nicht berücksichtigt wurden. Auch an humanen Ovarialkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit Patupilon in die Apoptose übergeht (Khabele D. 2004). Dies impliziert gleichzeitig die noch ungeklärte Frage, ob die Abnahme der Foci mit der Zeit aus einer Dephosphorylierung von γ H2AX und damit aus einer Reparatur resultiert oder durch den proteolytischen Abbau der apoptotischen Zellen zu erklären ist. Patupilon zeigte in dieser Arbeit einen Einfluss auf die Anzahl residueller strahleninduzierter γ H2AX-Foci. Da der proteolytische Abbau apoptotischer Zellen von Patupilon eher nicht beeinträchtigt wird, kann man davon ausgehen, dass Patupilon die Reparaturkapazität der Zellen herabsetzt. Dies zeigte sich besonders deutlich bei Messungen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gy und zusätzlicher Behandlung mit 0,05 nM Patupilon. Gegenüber alleiniger Anwendung von Strahlung oder Patupilon, war nach Kombination die residuelle Focianzahl deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht. Nach Bestrahlung konnten innerhalb von 24 Stunden 76 % der DSB repariert werden, Patupilon senkte das Reparaturvermögen auf 60 % herab.

4.3 Klonogenes Überleben

Bei der Zelllinie FaDu handelt es sich um Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx, die als moderat strahlensensibel gelten. Die in dieser Arbeit ermittelte SF2 lag bei ca. 0,4, was im Vergleich zu den Ergebnissen von Menegakis A. et al. (2007) relativ niedrig ist. Die mittleren SF-Werte nach 5 Gy waren dagegen nahezu

analog zu den Ergebnissen in der Literatur. Gründe für die interindividuellen Differenzen der Strahlensensibilität, können methodischen Ursprungs sein. Eine Vielzahl an experimentellen Bedingungen und Vorgehensweisen nehmen Einfluss auf die Zellüberlebenskurven und somit auf die scheinbare intrinsische Strahlensensibilität der Zellen. Unterschiede sind v.a. bei niedrigen Dosen zu beobachten, insbesondere im Dosisbereich um 2 Gy (Gerweck 1994).

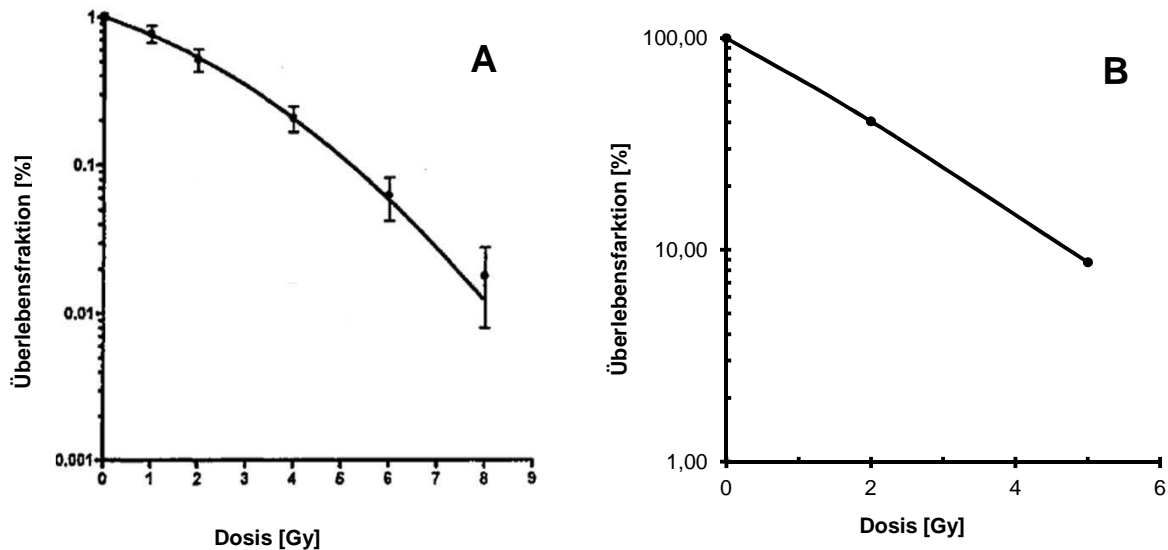


Abb. 4.4: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von FaDu-Zellen

A: Überlebenskurve nach Ergebnissen von Menegakis A. et al. (2007) **B:** Überlebenskurve nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

Analog zu den Ergebnissen bei der γ H2AX-Quantifizierung, zeigte sich die größte Reduktion des Überlebens im Koloniebildungstest durch die Kombinationsbehandlung von Strahlung und Patupilon. Dennoch handelte es sich nicht um einen synergistischen Effekt der beiden Modalitäten, sondern um eine Addition der beiden Wirkungen. Geht man davon aus, dass beide Behandlungsarten unabhängig und nacheinander ihre Wirkung in der Zelle entfalten, so lässt sich aus dem Überleben der mit nur einer Noxe behandelten Zellen (aus den Einfachproben) das Überleben errechnen, das bei einem additiven Effekt zu erwarten wäre. Wie anhand der in Tab. 3.3 aufgeführten Werte nachzuvollziehen ist, zeigte die mit 0,2 nM Patupilon behandelte Probe eine SF von 38,1 %. Die mit 5 Gy bestrahlte Probe führte zu einer SF von 8,7 %. Die Kombination von Strahlung und Patupilon hatte eine SF von 3,2 % zur Folge. Folglich ergibt sich eine berechnete SF_b von $0,381 \times 0,087 = 0,033$, entsprechend 3,3 %. Das experimentell erhaltene Ergebnis entspricht also sehr genau dem Wert, den man bei einem additiven Effekt erwarten würde. Auch die Parallelität der Überlebenskurven in Abb. 3.11 spricht für keinen synergisti-

schen Effekt, sondern verdeutlicht die Additivität. Zusätzlich ist in Abb. 3.13 veranschaulicht, dass 0,2 nM Patupilon nahezu denselben Effekt auf das Zellüberleben hatte, wie eine Strahlendosis von 2 Gy. Beide Modalitäten reduzierten die SF somit um etwa 60 %. Dieses Resultat lässt ebenfalls auf einen additiven Effekt schließen.

Mehrere Arbeiten haben einen Zusammenhang zwischen verbleibenden γ H2AX und dem Überleben gezeigt und unterstreichen somit die eigenen beobachteten Ergebnisse (MacPhail S.H. 2003), (L. M. Rothkamm K. 2003), (Wykes S. M. 2006). Ein vermindertes klonogenes Überleben in Kombination mit einer verminderten Abnahme von γ H2AX-Foci in der Focusanalyse, lässt den Schluss auf eine biologisch relevante insuffiziente DSB-Reparatur zu. Kong et al. (2010) konnten ebenfalls eine Verzögerung bzw. Hemmung der DSB-Reparatur durch Patupilon an Prostatakarzinomzellen feststellen. Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass bestrahlte Zellen nach einem durch Patupilon induzierten G2/M-Block vermehrt in die Apoptose übergehen. Auch Hofstetter et al. (2005) konnten eine radiosensibilisierende Wirkung von Patupilon an Kolonadenokarzinomzellen nachweisen. Sehr tiefe nanomolare Konzentrationen von Patupilon reichten aus, um einen supraadditiven zytotoxischen Effekt in Kombination mit Bestrahlung zu erzielen. Im Gegensatz zu Kong et al. postulierten sie für niedrige Patupilonkonzentrationen einen S-Phase-abhängigen Mechanismus der Strahlensensibilisierung. Da in der vorliegenden Arbeit keine Bestimmung der Zellzyklusphase durchgeführt wurde, kann hier nicht ausreichend geklärt werden, welcher Mechanismus für die Ergebnisse an FaDu-Zellen verantwortlich ist. Auch ist bei Betrachtung der unterschiedlichen Ergebnisse zu berücksichtigen, dass verschiedene Zellsysteme beziehungsweise Zellstämme eine individuelle Strahlenempfindlichkeit zeigen, abhängig von der Qualität der Strahlung, dem Zelltyp, dem Alter der Zellen und von vielen weiteren Umwelteinflüssen und methodischen Vorgehensweisen.

4.4 Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Koloniebildungstests und den Resultaten der γ H2AX-Quantifizierung

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierten γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten nicht streng mit den SF-Werten der Koloniebildungstests korrelieren. Dies liegt zum einen an der relativ geringen Anzahl der Versuche in dieser Arbeit und zum anderen an dem großen Unterschied der beiden angewendeten Methoden, v.a. in deren zeitlichem Ablauf. Während die Zellen beim Koloniebildungstest erst nach einer ca. 14-tägigen Inkubationszeit fixiert und bewertet werden können, kann bei der γ H2AX-

Quantifizierung schon nach der maximalen Testzeit von 24 Stunden ausgewertet werden. So können die Ergebnisse der beiden Methoden nur bedingt miteinander in Korrelation gesetzt werden. Es ist allenfalls eine Tendenz auf einen Zusammenhang der Parameter, wie in Kapitel 3.7 aufgeführt, auszumachen. Auch an anderer Stelle (MacPhail S.H. 2003), (Olive P.L. 2003), (M. S. Banath J. P. 2004) konnten keine entsprechenden Korrelationen gefunden werden. Die von uns, als auch von den genannten Autoren gefundenen Ergebnisse, widersprechen diesbezüglich denen von El-Awady et al. (2003) publizierten Resultaten. Bei El-Awady et al. (2003) wurde eine Korrelation zwischen den gelelektrophoretisch gemessenen induzierten DNA-DSB und den SF2-Werten der Koloniebildungstests erkannt. Interessanterweise konnten Dikomey et al. (1998) aus derselben Arbeitsgruppe wie El-Awady und unter Verwendung derselben Verfahrensweisen eine Korrelation zwischen den residuellen DNA-DSB und den SF2-Werten, nicht hingegen zwischen den induzierten DNA-DSB und den SF2-Werten finden. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass trotz Anwendung derselben Methodik, sogar innerhalb einer Arbeitsgruppe widersprüchliche Ergebnisse erzielt werden können. Diese Widersprüche verdeutlichen die Schwierigkeit, die sich erst beim Vergleich zwischen den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen und Methoden ergeben (Menegakis A. 2007), (Yoshikawa T. 2009), (Klokov D. 2006).

4.5 Stand der Forschung und Ausblick

Epothilon ist seit der ursprünglichen Entdeckung von Taxol die erste beschriebene Substanz, die den gleichen Wirkungsmechanismus besitzt. Zudem ist Epothilon auch gegen solche Zellen wirksam, die sich gegen eine Behandlung mit Taxol als resistent erwiesen haben. Epothilon B besitzt außerdem eine Reihe von tumoriziden Eigenschaften, die dem Taxol sehr ähneln. Beispielsweise wiesen Kong Z. et al. (2010) eine radiosensibilisierende Wirkung von Patupilon an strahlenresistenten Prostatakarzinomzellen nach, die auf eine verzögerte DSB-Reparatur, einen verlängerten G2-Block sowie auf eine gesteigerte Apoptoserate zurückzuführen ist. Zwar lagen die verwendeten Patupilonkonzentrationen noch im nanomolaren Bereich, waren allerdings um das 300-fache höher als in der vorliegenden Arbeit. Als potenter Radiosensitizer stellte sich Patupilon auch an Medulloblastomzellen heraus, wobei in der Arbeit von Oehler C. et al. (2011) lediglich pikomolare Konzentrationen nötig waren, um das klonogene Überleben effektiv zu reduzieren. Nicht nur die erwähnten sowie weitere in vitro-Effekte von Patupilon, sondern auch zahlreiche in vivo-Studien an humanen Xenograft-Modellen, konnten zeigen, dass es sich bei Patupilon um ein potentes Antitumormittel handelt. Dies führt dazu, dass an Epothilonen intensiv geforscht wird und bereits 2008 sieben Epothilon-Varianten

existierten, die zurzeit in klinischen Studien evaluiert werden (Altmann K.-H. 2008). Dazu gehören neben dem in dieser Arbeit untersuchten Epothilon B (Patupilon, EPO906 von Novartis) auch Epothilon A (Ixabepilon, BMS-247550), Epothilon D (KOS-862 von Kosan/Roche), BMS-310705 (C21-Amino-Epo B), ABJ879 (C20-Desmethyl-C20-Methylsulfanyl-EpoB von Novartis), 9,10-Didehydro-EpoB (KOS-1584 von Kosan/Roche) und das vollsynthetische ZK-EPO (von Bayer-Schering). Patupilon war eines der ersten Epothilone, die klinisch untersucht wurden (Jonge de 2005). Von der Fa. Novartis AG wurde Patupilon (interner Name EPO906) bis zur klinischen Phase III entwickelt, die Substanz hat aber in mehreren klinischen Studien bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom keine signifikante lebensverlängernde Wirkung gezeigt und eine Zulassung wird nicht beantragt. Obwohl Patupilon gegenüber Doxil®/Caelyx® (pegylated liposomal doxorubicin), der aktuell eingesetzten Substanz bei Ovarialkarzinomen, nicht überlegen war, muss erwähnt werden, dass auch keine unerwarteten und/oder schwerwiegenden negativen Auswirkungen identifiziert werden konnten (Novartis 2010). Diese Tatsache gepaart mit den vielversprechenden Eigenschaften von Patupilon führt dazu, dass dessen Wirkung weiterhin intensiv an zahlreichen Tumorentitäten evaluiert wird. So führt beispielsweise die Fa. Novartis aktuell eine Phase II – Multicenterstudie an Patienten mit hormonrefraktärem, metastasiertem Prostatakarzinom durch. Ebenso wird die Wirkung von Patupilon derzeit in der CINATRA-Studie, einer Phase II – Studie von der Organisation Cancer Research UK, an Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom untersucht. Konsequenterweise wird Epothilon B und dessen Strukturanaloga in Zukunft auch weiterhin in klinischen Studien getestet.

Die vorliegende Arbeit bildet die Basis, weiterführende Experimente, darunter auch solche am Tiermodell, zukünftig zu planen und durchzuführen, um genauere Aussagen über die Wirkung von Patupilon an Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zu erhalten. Es empfiehlt sich, zunächst auch Experimente mit synchronisierten Zellen durchzuführen, um differenzierte Aussagen über das Überleben bei stationären und sich teilenden Zellen treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Die kombinierte Radiochemotherapie stellt in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren einen effektiven Standard dar. In dieser Kombinationsbehandlung sind Taxane etablierte Substanzen, v.a. aufgrund ihrer Wirkung als sogenannte Radiosensitizer. Die natürlich vorkommende Substanz Etoposid wirkt über eine Mikrotubuli-Stabilisierung zytotoxisch und besitzt damit denselben Wirkmechanismus wie Taxol. Aus diesem Grund wurden die Effekte von Etoposid B (Patupilon, EPO906 von Novartis) allein und in Kombination mit ionisierender Strahlung erstmalig an Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs (Zelllinie FaDu) untersucht. Hierzu wurde sowohl das zelluläre Überleben mit Hilfe des klonogenen Assays, als auch der Einfluss auf die DSB-Reparatur mittels γ H2AX-Quantifizierung betrachtet. Um die Rolle der Inkubationsdauer von Patupilon nach Bestrahlung zu evaluieren, wurden γ H2AX-Foci sowohl nach einstündiger, als auch nach 24-stündiger Inkubation quantifiziert. Die Versuche wurden mit Patupilonkonzentrationen von 0,05, 0,1 und 0,2 nM und Bestrahlungsdosen von 2 und 5 Gy durchgeführt. Die Resultate der vorliegenden Arbeit können im Wesentlichen durch folgende Punkte wiedergegeben werden:

- (1) Im klonogenen Assay zeigten sich additive Effekte durch die Kombinationsbehandlung von Patupilon und ionisierender Strahlung. Die Kombination beider Faktoren führte zu einer signifikant stärker inhibierten Koloniebildung.
- (2) Strahlung alleine hatte eine stärkere Wirkung auf das Überleben als Patupilon, wobei Patupilon die SF mit steigender Konzentration ebenfalls signifikant reduzierte.
- (3) Bei Messungen 24 Stunden nach Bestrahlung wurde die Anzahl der residuellen γ H2AX-Foci durch die Behandlung mit Patupilon erhöht (statistisch nicht signifikant), was auf einen Einfluss auf die Reparatur hinweisend sein kann.
- (4) Die Anzahl der γ H2AX-Foci lag nach ein- und nach 24-stündiger Inkubation von Patupilon konzentrationsunabhängig numerisch über der Kontrolle, allerdings mit keiner statistischen Signifikanz. Dies zeigt, dass Patupilon als Phosphorylierungssignal des Histons H2AX fungiert.
- (5) Zwischen den SF-Werten der Koloniebildungstests und der Induktion, sowie der residuellen Anzahl des Markers γ H2AX, konnten keine strengen Korrelationen gefunden werden, was u.a. auf den großen Unterschied der Methoden zurückzuführen ist.

Die antiproliferative Wirkung von Patupilon auf FaDu-Zellen, bereits in sehr niedrigen Konzentrationen, konnte durch die γ H2AX-Fociinduktion, sowie die Reduzierung des klonogenen Überlebens gezeigt werden. Durch die erhaltenen Ergebnisse ist auch ein Einfluss auf die zelluläre Reparaturkapazität durch Patupilon äußerst wahrscheinlich. In Kombination mit ionisierender Strahlung im therapeutischen Dosisbereich, zeigten sich additive Effekte, die das Potential von Patupilon als Chemotherapeutikum unterstreichen. Aufgrund dieser Eigenschaften, ist Patupilon ein vielversprechender Wirkstoff für die Behandlung von Kopf- und Halstumoren und sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Altmann K.H. „Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs.“ *Curr Opin Chem Biol* 5, 2001: 424-431.
- Altmann K.-H., Memmert K., „Epothilones as lead structures for new anticancer drugs — pharmacology, fermentation, and structure-activity-relationships.“ *In Progress in Drug Research*, Vol. 66, von Amstutz R. Peterson F., 273-334. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2008.
- Banath J. P., Macphail S. H., Olive P. L. „Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines.“ *Cancer Res* 64, 2004: 7144-7149.
- Banath J. P., Olive P. L. „Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks.“ *Cancer Res* 63, 2003: 4347-4350.
- Bassing C.H., Suh H., Ferguson D.O., Chua K.F., Manis J., Eckersdorff M., Gleason M., Bronson R. Lee C., Alt F.W. „Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors.“ *Cell* 114, 2003: 359-370.
- Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R. *Das rote Buch*. Freiburg: Ecomed, 2002.
- Bley C.R., Jochum W., Orłowski K., Furmanova P., Vuong V., McSheehy P.M.J., Pruschy M. „Role of the Microenvironment for Radiosensitization by Patupilone.“ *Clin Cancer Res* 15, 2009: 1335-1342.
- Böcker W., Iliakis G. „Computational Methods for Analysis of Foci: Validation for Radiation-Induced γ -H2AX Foci in Human Cells.“ *Radiation Research* 165, 2006: 113-124.
- Bollag D.M., McQueney P.A., Zhu J., Hensens O., Koupal L., Liesch J., Goetz M., Lazarides E., Woods C.M. „Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action.“ *Cancer Res* 55, 1995: 2325-2333.

- Bonner J.A., Harari P.M., Giralt J., Azarnia N., Shin D.M., Cohen R.B., Jones C.U., Sur R., Raben D., Jassem J., Ove R., Kies M.S., Baselga J., Youssoufian H., Amellal N., Rowinsky E.K., K. Kian Ang. „Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck.“ *N Engl J Med* 354, 2006: 567-578.
- Bouquet F., Muller C., Salles B. „The loss of γ H2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage.“ *Cell Cycle* 5, 2006: 1116-1122.
- Boyle J.O., Hakim J., Koch W., Riet v.d.P., Hruban R.H., Arturo Roa R., Correo R., Eby Y.J., Ruppert J.M., Sidransky D. „The Incidence of p53 Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer.“ *Cancer Res* 53, 1993: 4477.
- Chatgililoglu C., O'Neill P. „Free radicals associated with DNA damage.“ *Exp Gerontol* 36, 2001: 1459-1471.
- Christmann M., Tomacic M.T., Roos W.P., Kaina B. „Mechanisms of human DNA repair: an update.“ *Toxicology* 193, 2003: 3-34.
- Coultas L., Strasser A. „The molecular control of DNA damage-induced cell death .“ *Apoptosis* 5, 2000: 491-507.
- Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I., Martensen R., Kaina B. „Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.“ *Int J Radiat Biol.* 73, 1998: 269-278.
- Durocher D., Jackson S.P. „DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?“ *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 2001: 225-231 .
- El-Awady R.A., Dikomey E., Dahm-Daphi J. „Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks.“ *Br J Cancer* (89), 2003: 593-601.
- Elomaa L., Joensuu H., Kulmala J., Klemi P., Grenman R. „Squamous cell carcinoma is highly sensitive to taxol, a possible new radiation sensitizer.“ *Acta Otolaryngol Stockh* 115, 1995: 340-344.
- Ferretti S., Allegrini P.R., O'Reilly T., Schnell C., Stumm M., Wartmann M., Wood J., McSheehy P.M. „Patupilone induced vascular disruption in orthotopic rodent tumor models detected by magnetic resonance imaging and interstitial fluid pressure.“ *Clin Cancer Res.* 11, 2005: 7773-7784.

- Gerweck, L.E., Dullea, R., Zaidi, S.T., Budach, W., Hartford, A. „Influence of experimental factors on intrinsic radiosensitivity assays at low doses of radiation: Cell multiplicity.“ *Radiat. Res.* 138, 1994: 361-366.
- Gottlieb, T.M., Jackson, S.P. „The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen.“ *Cell* 72, 1993: 131–142.
- Haber J.E. „Partners and pathways: repairing a double-strand break.“ *Trends Genet* 16, 2000: 259-264.
- Hagedorn, C.: „mündliche Mitteilung“. Klinikum Rechts der Isar, München, 07.06.2010.
- Hampel G., Rube C., Willich N. „Radiosensitizing effect of paclitaxel in-vivo in a xenotransplanted human squamous cell carcinoma.“ *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 1995: T28 (abstract of posters).
- Hansen L., Lundin C., Spang-Thomsen M., Petersen L., Helleday T. „The role of Rad51 in etoposide (VP-16) resistance in small cell lung cancer.“ *Int J Cancer* 105, 2003: 472–479.
- Herrmann T., Baumann M., Dörr W. *Klinische Strahlenbiologie*. München: Urban & Fischer Verlag, 2006.
- Hoffmann W., Rodemann H.P., Belka C., Budach W., Schmidberger H., Bochtler H., Heinrich V., Bamberg M. „Paclitaxel in simultaneous radiochemotherapy of head and neck cancer: preclinical and clinical results.“ *Seminars In Oncology* 24, 1997: 2-72.
- Höfle G., Bedorf N., Steinmetz H., Schomburg D., Gerth K., Reichenbach H. „Epothilon A und B - neuartige, 16-gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung.“ *Angewandte Chemie* 108, 1996: 1671-1673.
- Hofstetter B. *ionizing radiation and epothilone - mechanism and efficacy in combined radiochemotherapy*. Dissertation, Zürich: Swiss Federal Institute of Technology (ETH), 2005.
- Hofstetter B., Vuong V., Broggin-Tenzer A., Bodis S., Ciernik I.F., Fabbro D., Wartmann M, Folkers G., Pruschy M. „Patupilone Acts as Radiosensitizing Agent in Multidrug-Resistant Cancer Cells In vitro and In vivo.“ *Clin. Cancer Res.* 15, 2005: 1588-1596.
- Iliakis G., Wang H., Perrault A., Boeckera W., Rosidia B., Windhofer F., Wu W., Guanb J., Terzoudic G., Pantelias G. „Mechanisms of DNA double strand

- break repair and chromosome aberration formation.* "Cytogenet Genome Res 104, 2004 : 14-20.
- Jonge de, M., Verweij J. „*The Epothilone Dilemma.*“ *Journal of Clinical Oncology* 23, 2005: 9048-9050.
- Kauffmann G. W., Moser E., Sauer R. *Radiologie. München: Urban & Fischer Verlag, 2006.*
- Kavallaris M., Verrills N.M., Hill B.T. „*Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs.*“ *Drug Resist Updat* 4, 2001: 392-401.
- Kellerer A.M., Rossi H.H. „*The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. VI. Interpretation of results.*“ *Radiat Res.* 55, 1973: 447-456.
- Khabele D., Lopez-Jones M., Yang, W.C., Arango D., Gross S.J., Augenlicht L.H., Goldberg G.L. „*Tumor necrosis factor- α related gene response to Epothilone B in ovarian cancer.*“ *Gynecologic Oncology* 93, 2004: 19-26.
- Khanna K. K., Jackson S. „*DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.*“ *Nat Genet* 27, 2001: 247-254.
- Kies M.S., Haraf D.J., Rosen F., Stenson K., List M., Brockstein B., Chung T., Mittal B.B., Pelzer H., Portugal L., Rademaker A., Weichselbaum R., Vokes E.E., „*Concomitant infusional paclitaxel and fluoruracil oral hydroxyurea and hyperfractionated radiation therapy for locally advanced squamous head and neck cancer.*“ *J Clin Oncol* 19, 2001: 1961-1969.
- Kim L., King T., Agulnik M. „*Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications.*“ *Oncology (Williston Park)*, 24, 2010: 915-9, 924.
- Kirschner. M., Mitchison, T. „*Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis.*“ *Cell* 45, 1986: 329-342.
- Klokov D., MacPhail S.M., Banath J.P., Byrne I.P., Olive P.L. „*Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays.*“ *Radiother Oncol* 80, 2006: 223-229.
- Kong Z., Raghavan P., Xie D., Boike T., Burma S., Chen D., Chakraborty A., Hsieh J.T., Saha D. „*Epothilone B confers radiation dose enhancement in DAB2IP gene knock-down radioresistant prostate cancer cells.*“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 78, 2010: 1210-1218.

- Kornberg R. D., Lorch Y. „Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.“ *Cell* 98, 1999: 285-294.
- Kowalski R. J., Ter Haar E., Longley R. E., Gunasekera S. P., Lin C. M., Day B. V., Hamel E. „Comparison of novel microtubule polymerizing agents, discodermolide and epothilone A/B, with Taxol.“ *Mol. Biol. Cell* 6, 1995: 2137.
- Kowalski R.J., Giannakakou P., Hamel E. „Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®).“ *J Biol Chem* 272, 1997: 2534-2541.
- Lang S., Wollenberg B., Dellian M., Steuer-Vogt M.K., Schwenzler K., Sautier W., Chucholowski M., Eckel R., Faas I., Wilmes E., Ehrenfeld M., Arnold W., Kastenbauer E., Hoelzel D. „Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck.“ *Laryngorhinootologie* 81, 2002: 499-508.
- Larkin, J.M.G., Kaye S.B. „Potential clinical applications of epothilones: a review of phase II studies.“ *Annals of Oncology* 18, 2007: 28-34.
- Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R., Meek, K. „The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase.“ *J. Biol. Chem.* 273, 1998: 1794–1801.
- Limoli C.L., Giedzinski E., Bonner W.M., Cleaver J.E. „UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, γ -H2AX formation, and Mre11 relocalization.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2002: 233-238.
- Liu J.S., Kuo S.R., Melendy T. „Comparison of checkpoint responses triggered by DNA polymerase inhibition versus DNA damaging agents.“ *Mutat Res.* 532, 2003: 215-226.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. „Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.“ *Nature* 389, 1997: 251-260.
- MacPhail S.H., Banath J.P., Yu T.Y., Chu E.H.M., Lambur H., Olive P.L. „Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays.“ *Int J Radiat Biol* 79, 2003: 351-358.
- Mannironi C., Bonner W. M., Hatch C. L. „H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both

- DNA replication type and polyA 3' processing signals.* " *Nucleic Acids Research* 17, 1989: 9113-9126.
- McMillan T.J., Cassoni A.M., Edwards S., Holmes A., Peacock J.H. „*The relationship of DNA double-strand break induction to radiosensitivity in human tumour cell lines.*“ *Int J Radiat Biol.* 58, 1990: 427-438.
- Menegakis A., Krause M., Eicheler W., Doerfler A., Yaromina A., Baumann M. „*Residual γ -H2AX foci correlate with clonogenic cell survival after irradiation of 2 human squamous cell carcinoma lines in vitro.*“ In *Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie Band 16*, von Dahm-Daphi J., Dikomey E., Petersen C., Rodemann H.P., Zips D. Baumann M., 23-26. Dresden: Eigenverlag, 2007.
- Mersfelder E. L., Parthun M.R. „*The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure.*“ *Nucleic Acids Res.* 34, 2006: 2653–2662.
- Molls M, Andratschke N. „*Verstärkung der Strahlenwirkung.*“ In *Radioonkologie*, von Molls M., Sack H. Bamberg M., 280-298. München: Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2009.
- Molls M. „*Strahlenbiologische Grundlagen der Strahlentherapie.*“ In *Kompendium Internistische Onkologie*, von Höffken K., Possinger K. Schmoll H.J., 299-304. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
- Natarajan A. T., Obe G. „*Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: I. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 state of the cell cycle .*“ *Mutation Research* 52, 1978: 137-149.
- Noll M. „*Internal structure of the chromatin subunit.*“ *Nucleic Acids Res* 1, 1974: 1573-1578.
- Novartis. „*www.novartis.com.*“ *Novartis Phase III trial examining EPO906 (patupilone) for patients with advanced ovarian cancer failed to meet primary endpoint.* 2010. <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2010/1419057.shtml> (Zugriff am 03. 08 2011).
- Oehler C., von Bueren A.O., Furmanova P., Brogini-Tenzer A., Orłowski K., Rutkowski S., Frei K., Grotzer M.A., Pruschy M. „*The microtubule stabilizer patupilone (epothilone B) is a potent radiosensitizer in medulloblastoma cells.*“ *Neuro Oncol.*, 2011.

- Olive P.L., Banáth J.P. „Phosphorylation of Histone H2AX as a measure of Radiosensitivity.“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (58), 2003: 331-335.
- Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. „A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.“ *Current Biology* 10, 2000: 886-895.
- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. „Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations.“ *Mutagenesis* 15, 2000: 289-302.
- Pignon J.P., Bourhis J., Domenge C., Designé L., „Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: Three meta-analyses of updated individual data. MACHNC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer.“ *Lancet* 355, 2000: 949-955.
- Puck T.T., Marcus P.I. „Action of X-rays on mammalian cells.“ *J Exp Med.* 103, 1956: 653-666.
- Rangan S.R.S. „A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma.“ *Cancer* 29, 1972: 117-121.
- Reiss M., Brash D.E., Muñoz-Antonia T., Simon J.A., Ziegler A., Vellucci V.F., Zhou Z.L. „Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines.“ *Oncol.Res.* 4, 1992: 349-357.
- RKI. Robert-Koch-Institut. *Krebs in Deutschland-Häufigkeit und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland.* 2006.
- Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. „DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.“ *J Biol Chem* 273, 1998: 5858-5868.
- Rogakou E.P, Boon C., Redon C., Bonner W.M. „Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo.“ *J Cell Biol* 146, 1999: 905-916.
- Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M. „Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139.“ *J Biol Chem* 275, 2000: 9390-9395.
- Ross G.M. „Induction of cell death by radiotherapy.“ *Endocr Relat Cancer* 6, 1999: 41-44.

- Rössler U., Hornhardt S., Seidl C., Muller-Laué E., Walsh L., Panzer W., Schmid E., Senekowitsch-Schmidtke R., Gomolka M. „The sensitivity of the alkaline comet assay in detecting DNA lesions induced by X rays, gamma rays and alpha particles.“ *Radiat Prot Dosimetry* 122, 2006: 154-159.
- Rothkamm K., Balroop S., Shekhdar J., Fernie P., Goh V. „Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure.“ *Radiology* 242, 2007: 244-251.
- Rothkamm K., Löbrich M., „Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses.“ *PNAS* 100, 2003: 5057-5062.
- Rowinsky E.K, Eisenhauer E.A., Chaudhry V., Arbuck S.G., Donehower R.C. „Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol).“ *Semin Oncol* 20, 1993: 1-15.
- Rowinsky E.K., Donehower R.C. „Paclitaxel (taxol).“ *N Engl J Med* 332, 1995 : 1004-1014.
- Rübe C., Hampel G., Schuck A.W.N. „Combined effect of Paclitaxel and ionizing radiation. Experimental data of in-vitro and in-vivo models.“ *Strahlenther Onkol* 172, 1996: 2-5.
- Sachs L., Hedderich J. „Wilcoxon Rangsummentest für zwei unabhängige Stichproben.“ *In Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R*, 391-397. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2006.
- Schulz, V. *Nachweis geringer strahleninduzierter DNA-Schäden mittels automatisierter Quantifizierung von gH2AX*. 2009.
- Scully C., Field J.K., Tanzawa H. „Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control.“ *Oral Oncology* 36, 2000: 256-263.
- Sedelnikova O., Bonner W.M. „GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence.“ *Cell Cycle* (24), 2006: 2909-2913.
- Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M. und Barrett J.C. „Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks.“ *Nat Cell Biol* 6, 2004: 168-170.

- Shi J., Orth J.D., Mitchison T. „Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5.“ *Cancer Res.* 68, 2008: 3269-3276.
- Sinclair W.K., Morton R.A. „X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells.“ *Radiat Res* 29, 1966: 450–474.
- Spitz D.R., Azzam E.I., Jian Jian L., Gius D. „Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology.“ *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 2004: 311–322.
- Syrjänen S. „Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer.“ *Journal of clinical virology* 32, 2005: 59-66.
- Takahashi A., Matsumoto H., Nagayama K., Kitano M., Hirose S., Tanaka H., Mori E., Yamakawa N., Yasumoto J., Yuki K., Ohnishi K., Ohnishi T. „Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing.“ *Cancer Res* 64, 2004: 8839-8845.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, 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.* 17, 1998: 5497–5508.
- Tanaka T, Halicka H.D., Traganos F., Seiter K., Darzynkiewicz Z. „Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: Relation to the cell cycle phase.“ *Cell Cycle* (6), 2007: 371-376.
- Tanaka T., Huang X., Halicka H. D., Zhao H., Traganos F., Albino A. P., Dai W., Darzynkiewicz Z. „Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents.“ *Cytometry A* 71, 2007: 648-661.
- Tanaka T., Kurose A., Huang X., Traganos F., Dai W., Darzynkiewicz Z. „Extent of constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 varies in cells with different TP53 status.“ *Cell Prolif.* 39, 2006: 313-323.
- Taneja N., Davis M., Choy J. S., Beckett M. A., Singh R., Kron S. J., Weichselbaum R. R. „H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy.“ *J Biol Chem* 279, 2004: 2273-2280.
- Taneja N., Davis M., Choy J.S., „Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy.“ *J Biol Chem* 279, 2004: 2273-2280.

- Terasima T., Tolmach L.J. „Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle.“ *Nature* 190, 1961: 1210-1211.
- The EPITRON Project. 2010. <http://www.epitron.eu> (Zugriff am 25. Dezember 2010).
- Trivedi M., Budihardjo I., Loureiro K., Reid T.R., D Ma J.D.†. „Epothilones: A Novel Class of Drugs for the Treatment of Cancer: Patupilone (EPO906, epothilone B).“ *Future Oncology* 4, 2008: 483-500.
- Tumorzentrum München. „MANUAL.“ In *Kopf-Hals-Malignome*, von Zimmermann F. Mast G. München: Zuckschwerdt Verlag, 2009.
- Vidanes G.M., Bonilla C.Y., Toczyski D.P. „Complicated Tails: Histone Modifications and the DNA Damage Response.“ *Cell* 121, 2005: 973–976.
- Waldfahrer F., Maldea L., Altendorf-Hofmann A., Iro H. „Evaluation of the "new" TNM classification of head and neck tumors in 3247 patients.“ *HNO* 47, 1999: 957-962.
- Weber A., Tannapfel A. „Prognosefaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen.“ *HNO* 30, 2002: 35-42.
- Wittekind C., Weber A., Weidenbach H. „Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.“ *Onkologie* 7, 2001: 498-504.
- Wykes S. M., Piasentin E., Joiner M. C., Wilson G. D., Marples B. „Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks.“ *Radiat Res* 165, 2006: 516-524.
- Xiao H., Li T. K., Yang J. M., Liu L. F. „Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2003: 5205-5210.
- Yoshikawa T., Kashino G., Ono K., Watanabe M. „Phosphorylated H2AX Foci in Tumor Cells Have No Correlation with Their Radiation Sensitivities.“ *Journal of Radiat Res* 50, 2009: 151-160.
- Yu T., MacPhail S.H., Banáth J.P., Klovov D., Olive P.L. „Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability.“ *DNA Repair* 5, 2006: 935-346.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei meinem Betreuer Dr. Khashayar Fakhrian, der mir trotz des zeitintensiven Klinikalltages immer hilfreich zur Seite stand und meine Arbeit durchweg aufmerksam begleitete.

Besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Multhoff für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die stete Förderung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Michael Molls danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank außerdem an Caroline Hagedorn und Nathalie Lippmann für die Einführung in die Laborarbeit und die ständige Hilfestellung und Unterstützung bei den Experimenten.

Frau Dr. Ute Rössler sowie Herrn Frank Bunk vom Bundesamt für Strahlenschutz möchte ich an dieser Stelle herzlich für die angenehme Zusammenarbeit, ihr großes Engagement und die fachliche Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des radioonkologischen Labors des Helmholtz-Zentrums, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und die durch das freundliche Arbeitsklima die Arbeit erleichtert haben.

Herrn Tibor Schuster, Herrn Bernhard Haller sowie Herrn Matthias Wallner danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir alles erst möglich gemacht haben, die mich jederzeit liebevoll motiviert und mir den Rücken gestärkt haben. Ebenso ein riesen Dankeschön an Benno Stamp für seine Unterstützung, sein Vertrauen und seine stete Geduld mit mir.