

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer

**Quantifizierung der Hyperthermie-induzierten Apoptose an
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mittels
Durchflusszytometrie und Magnetresonanztomographie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Suna Ertongur

aus
Ankara

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. S. Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Emmerich
Prof. Dr. M. Siebeck

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Ing. V. Reiman

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2002

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.
Bu tezi anne ve babama armağan ediyorum.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs.....	1
1.2	Therapiemöglichkeiten.....	3
1.3	Nekrose.....	5
1.3.1	<i>Vorkommen.....</i>	5
1.3.2	<i>Morphologie.....</i>	5
1.4	Apoptose.....	6
1.4.1	<i>Vorkommen.....</i>	6
1.4.2	<i>Morphologie.....</i>	7
1.4.3	<i>Apoptoseinduktion.....</i>	8
1.4.4	<i>Regulationsmechanismen.....</i>	11
1.5	Zielsetzung.....	14
2	Material.....	16
2.1	Allgemeine Laborgeräte.....	16
2.2	Plastikwaren.....	16
2.3	Chemikalien, Färbereagenzien, Enzyme, Medien, Zellkulturzusätze.....	16
2.4	Puffer, Lösungen.....	17
2.4.1	<i>Medien und Lösungen für die Zellkultur.....</i>	17
2.4.2	<i>DNA-Gelelektrophorese.....</i>	18
2.4.3	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	18
2.5	Humane Zelllinien.....	19
2.5.1	<i>Lymphome.....</i>	19
2.5.2	<i>HNO-Zelllinien.....</i>	19
2.5.3	<i>Endothelzellen.....</i>	19
3	Methoden.....	20
3.1	Zellkultur.....	20
3.1.1	<i>Kultivierung der Zelllinien.....</i>	20
3.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen der Zellen.....</i>	21
3.1.3	<i>Bestimmung der Zellzahl.....</i>	21

3.2	Apoptoseinduktion.....	22
3.2.1	<i>Serumreduktion.....</i>	22
3.2.2	<i>Zytostatikabehandlung.....</i>	22
3.2.3	<i>Antikörperbehandlung.....</i>	22
3.2.4	<i>Hyperthermie.....</i>	22
3.3	Nekroseinduktion.....	22
3.4	Methoden zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose	23
3.4.1	<i>Mikroskopie.....</i>	23
3.4.2	<i>DNA-Gelelektrophorese.....</i>	23
3.4.3	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	24
3.4.3.1	TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling).....	25
3.4.3.2	ANNEXIN-V-Fluos.....	25
3.4.3.3	Hypotone fluorochrome Lösung.....	26
3.4.3.4	Einfache PI-Markierung.....	26
3.4.4	<i>Fluoreszenzanalyse.....</i>	27
3.5	Magnetresonanzspektroskopie MRS.....	27
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Allgemeine Beschreibung der Fluorimetrischen Nachweisverfahren der Apoptose und Nekrose.....	30
4.1.1	<i>Bestimmung der DNA-Degradation mittels enzymatischer Markierungsmethode (TUNEL-Assay).....</i>	30
4.1.2	<i>Untersuchung von Membranveränderungen durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Membrankomponenten (ANNEXIN-V-Fluos)....</i>	31
4.1.3	<i>Bestimmung des DNA-Gehalts durch Anfärbung mit DNA-bindenden fluorochromen Farbstoffen (Hypotone fluorochrome Lösung).....</i>	33
4.1.4	<i>Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie.....</i>	34
4.1.5	<i>Mikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen.....</i>	35
4.2	Etablierung von in vitro-Modellen für Apoptose und Nekrose bei Lymphomzelllinien.....	37
4.2.1	<i>Apoptoseinduktion durch Serumreduktion in BL 41-Lymphomzellkulturen.....</i>	37

4.2.2	<i>Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Methotrexat (MTX) in Jurkat-Lymphomzellkulturen.....</i>	41
4.2.3	<i>Apoptoseinduktion durch Aktivierung des Fas/Fas-Ligand – Apoptose-Wegs (CD 95-System).....</i>	44
4.2.4	<i>Apoptoseinduktion durch Hyperthermiebehandlung.....</i>	45
4.3	Etablierung von in vitro-Modellen für Apoptose und Nekrose bei HNO-Zelllinien.....	47
4.3.1	<i>Apoptoseinduktion durch Aktivierung des CD 95-Systems.....</i>	47
4.3.2	<i>Apoptoseinduktion durch Hyperthermiebehandlung.....</i>	49
4.4	Nachweis der Apoptose bei der Endothelzelllinie HMEC.....	50
4.5	Gelelektrophoretische Analyse degradiertes DNA in apoptotischen Zellen.....	51
4.6	Nachweis von Nekrose in vitro.....	51
4.6.1	<i>Nekroseinduktion durch Hyperthermiebehandlung.....</i>	51
4.6.2	<i>Anteil nekrotischer Populationen in vitalen und Apoptose-induzierten Zellkulturen.....</i>	53
4.7	Vergleich der durchflusszytometrischen Markierungsverfahren.....	53
4.8	Magnetresonanzspektroskopie.....	57
4.8.1	<i>Spektroskopische Analyse der Lymphomzelllinie Jurkat.....</i>	59
4.8.2	<i>Spektroskopische Analyse der Endothelzelllinie HMEC.....</i>	62
4.8.3	<i>Spektroskopische Analyse der HNO-Zelllinie FaDu.....</i>	63
4.8.4	<i>Zusammenfassung.....</i>	64
5	Diskussion.....	66
5.1	Bedeutung der Analyse des Apoptotischen und Nekrotischen Zelluntergangs in der Onkologie.....	66
5.2	Induzierbarkeit der Apoptose und Nekrose	68
5.2.1	<i>Apoptoseinduktion.....</i>	68
5.2.1.1	<i>Serumreduktion.....</i>	68
5.2.1.2	<i>Methotrexatbehandlung.....</i>	69
5.2.1.3	<i>Antikörper-induzierte Apoptose.....</i>	70
5.2.1.4	<i>Hyperthermie.....</i>	70
5.2.2	<i>Nekroseinduktion.....</i>	71
5.3	Durchflusszytometrische Methoden zur Charakterisierung der in vitro induzierten Apoptose und Nekrose.....	72

5.3.1	<i>Lichtstreuung</i>	73
5.3.2	<i>TUNEL-Assay</i>	74
5.3.3	<i>ANNEXIN-V-Fluos</i>	77
5.3.4	<i>Inkubation in hypotoner fluorochromer Lösung</i>	79
5.3.5	<i>Vitalitätstest durch Anfärbung mit Farbstoffen</i>	80
5.4	<i>Gelelektrophorese</i>	81
5.5	<i>Charakterisierung der Zellzustände mittels ¹H-MRS</i>	82
5.5.1	<i>Beurteilung der Malignität mittels ¹H-MRS</i>	83
5.5.2	<i>Beurteilung der apoptotischen und nekrotischen Degeneration mittels ¹H-MRS</i>	84
5.5.3	<i>¹H-MRS Ergebnisse bezüglich Apoptose und Nekrose in vitro</i>	85
5.5.4	<i>¹H-MRS Ergebnisse bezüglich Apoptose und Nekrose in vivo</i>	86
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	90

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AO	Acridin-orange
ATCC	American type culture collection
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CD	Cluster of differentiation
CH ₂	Methylen
CH ₃	Methyl
Cho	Cholin
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fuorescence-activated cell sorter
f.c.	final concentration
FCS	Fötales Kälberserum
FL	Fluorescence
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunden
¹ H-MRS	Protonenresonanzspektroskopie
H	Wasserstoff
HIV	human immunodeficiency virus
HNO	Hals-Nasen-Ohren
IL2	Interleukin 2
ILP	interstitielle Laser-Phototherapie
Kr	Kreatin
KrP	Kreatinphosphat

La	Laktat
LITT	laserinduzierte Thermotheapie
LL	lower left
LR	lower right
M	Molar
mg	milligramm
min	Minuten
ml	milliliter
mM	millimolar
MRI	Magnetic resonance imaging
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MTX	Methotrexat
μ l	mikroliter
N	Stickstoff
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PI	Propidiumiodid
ppm	parts per million
PKC	Proteinkinase C
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
SSC	sideward scatter
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TSP	Trimethylsilylpropionat
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UL	upper left
Upm	Umdrehungen pro Minute
UR	upper right
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Epidemiologie

Jährlich erkranken etwa 600.000 Menschen weltweit an bösartigen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. Mit einer Inzidenz von über 80.000 Neuerkrankungen stehen die Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck = SCCHN) auf Platz 6 der Tumorstatistik der U.S.A. und Europa¹. Trotz verbesserter chirurgischer Techniken, neuer Bestrahlungsverfahren und der Einführung adjuvanter Chemotherapeutika blieb die Gesamtüberlebensrate in den letzten Jahrzehnten nahezu unverändert schlecht². Etwa ein Drittel aller Patienten mit Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches sterben an ihrer Erkrankung, wobei Männer öfter betroffen sind als Frauen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen bei etwa zwei Drittel der betroffenen Patienten bereits fortgeschrittene Tumorerkrankungen der Stadien III und IV vor³. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass Tumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich in der Initialphase oftmals nur geringe Symptome zeigen. Mit Ausnahme der frühzeitigen, anhaltenden Heiserkeit bei Stimmlippenkarzinomen treten Alarmzeichen wie Schmerzen, Schluckbeschwerden, tastbare Knoten, Befall von Hirnnerven usw. erst in fortgeschrittenen Stadien auf.

Ätiologie

Alkohol und Tabak sind die wichtigsten Ursachen für die Entwicklung eines malignen Tumors der Schleimhaut des oberen Atem- und Verdauungstraktes, insbesondere nach langem und exzessivem Konsum^{4, 5}. Beide Genussmittel können sich zusätzlich in ihrem karzinogenen Effekt gegenseitig verstärken. Mangelnde Mundhygiene und damit verbundene Mundschleimhautirritationen, chronische Holzstaubinhalation oder verstärkte Nickel-Exposition können als weitere Risikofaktoren für Tumore des oberen Aerodigestivtraktes genannt werden⁶. Der Begriff der Feldkanzerisierung beschreibt dabei sehr gut die Prädisposition einer geschädigten Gewebsregion, multiple Malignome zu entwickeln^{7, 8}. Die Einwirkung chronisch-toxischer Noxen führt über eine Akkumulation genetischer Schäden zur Entwicklung von karzinomatösen Strukturen im Gewebe, die sich allerdings nur an bestimmten Stellen ausbilden. Dies führt zu der Annahme, dass neben der Karzinogenexposition auch zusätzliche andere Faktoren über die Transformation von Zellen entscheiden, die bislang noch nicht vollständig geklärt werden konnten. Beispielsweise konnte bei der Entstehung von nasopharyngealen Tumoren eine Virusassoziation

nachgewiesen werden. Neben dem Herpes Simplex Virus Typ1 wird hierfür vor allem das Epstein-Barr-Virus verantwortlich gemacht. Bei Malignomen der Speicheldrüsen und der Schilddrüse spielt auch ionisierende Strahlung als ätiologischer Faktor eine große Rolle^{4, 6}. Auch genetische Veränderungen, hereditär oder durch Umweltfaktoren verursacht, werden der Tumorgenese im Kopf-Hals-Bereich zugrunde gelegt⁹. Zu nennen wären hier die häufig auftretenden Anomalien am Chromosomenloкус 11q13 oder Polysomien der Chromosomen 7 und 17¹⁰⁻¹³. Als Folge einer chromosomalen Instabilität tritt eine gesteigerte bzw. reduzierte Gen-Expression der auf diesem Chromosom lokalisierten regulativen Moleküle ein. Die u.a. betroffenen Gene wie das Tumorsuppressorgen p53, Protoonkogen bcl-1 oder erb-B, die das Zellwachstum regulieren, können dann eine maligne Transformation bewirken^{14, 15}. Patienten mit SCCHN weisen zudem eine Immunsuppression auf, deren Ursache u.a. in einer erhöhten Produktion immunsupprimierender Substanzen durch den Tumor liegt¹⁶⁻¹⁸.

Prognose

Über 90 % der aus den Schleimhautzellen des oberen Atem- und Verdauungstraktes stammenden malignen Tumoren sind histologisch Plattenepithelkarzinome. Patienten mit Tumoren in frühen Stadien können zwar durch Anwendung adäquater therapeutischer Methoden erfolgreich behandelt werden, jedoch besteht weiterhin eine hohe Rezidivrate¹⁹⁻²¹. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zeichnen sich vor allem durch einen lymphogenen Metastasierungsweg aus. Zur Abschätzung der klinischen Prognose eines Patienten wird daher der Status der regionären Lymphknoten als ein wichtiges Kriterium heran gezogen. Das Auftreten von Tumor-befallenen Lymphknoten im lokoregionären Lymphabflussgebiet verschlechtert die Prognose um bis zu 50 % und gilt als ein Überleben limitierender Faktor. Aber auch die hämatogene Fernmetastasierung scheint eine große Rolle zu spielen^{22, 23}. So wird schon viel früher als nach klinisch-radiologischer Beurteilung eine hämatogene Dissemination in Lunge, Knochenmark oder Leber vermutet⁶. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist sehr variabel. In Abhängigkeit von der Lokalisation und des Tumorstadiums bewegt sie sich zwischen 70 % - 90 % bei früh behandelten Malignomen des Larynx und der Lippen, zwischen 50 % - 65 % bei fortgeschrittenen Larynxkarzinomen und kann sich bis auf 10 % - 20 % bei entsprechenden Malignomen des Hypopharynx reduzieren²⁴. Faktoren, die die Prognose von SCCHN-Patienten erheblich verschlechtern sind unter anderem das Auftreten von lokoregionären Tumor-Metastasen oder eine Invasion der Weichteile^{25, 26}.

Bis heute fehlen nicht-invasive Verfahren, die eine sensitive und spezifische Diagnostik von SCCHN-Malignomen erlauben würden. Damit bleibt als Standarddiagnostik weiterhin das invasive Verfahren der Histologiegewinnung, welches oftmals eine hierfür notwendige Vollnarkose erfordert. Dies stellt einerseits eine Belastung für den Patienten dar und lässt andererseits auch nicht unbedingt submukös wachsende Malignome erkennen. Die radiologische Bildgebung mittels Computer- oder Magnetresonanztomographie gibt zwar aufgrund der Schnittbildtechnik einen Tiefeneinblick in die Gewebestrukturen, kann aber bei einer verdächtigen Raumforderung nicht zwischen benignem oder malignem Befund differenzieren. Als Konsequenz bleibt nur die Erzwingung einer Histologie bzw. bei Rezidivverdacht die Wiederholung der Bildgebung nach einigen Wochen und der Vergleich mit den Voraufnahmen, um so eine eventuelle Tumorprogression zu verifizieren.

Wenn in den letzten Jahren ein Fortschritt im Sinne einer Senkung der Mortalität zu verzeichnen war, dann nicht nur im Rahmen der Verbesserung konventioneller Therapieverfahren, sondern insbesondere bei der Früherkennung von Malignomen⁴. Gerade durch die Etablierung einer sensitiven und spezifischen Diagnostik könnten Neoplasie-Frühschichten erkannt werden und somit durch rechtzeitigen Therapieeinsatz bei noch fehlender lokoregionärer oder Fernmetastasierung einen entscheidenden Beitrag zur Kuration dieser Erkrankung leisten. Darüber hinaus würde dies auch die Tumornachsorge bereits operierter Patienten erleichtern, da so besser zwischen Narbe und Frührezidiv differenziert werden könnte.

1.2 Therapiemöglichkeiten

Konventionelle Therapiemethoden zur Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen bestehen derzeit aus operativen Verfahren, der Radiotherapie und der Chemotherapie, wobei diese Strategien oftmals in Kombination eingesetzt werden. Zusätzlich wurde in den letzten Jahren eine Reihe adjuvanter, alternativer Therapieformen entwickelt. Beispielsweise werden radioaktiv-markierte monoklonale Antikörper, die gegen tumorspezifische Epitope gerichtet sind, zur Radioimmuntherapie verwendet^{27, 28}. Andere Immuntherapieverfahren setzen bispezifische Antikörper ein, die die Ausbildung eines Immunkomplexes aus Tumorzelle, T-Lymphozyt und Antigen präsentierender Zelle induzieren²⁹. Daneben werden gentherapeutische Ansätze u.a. mit Interleukin 2 (IL 2) oder koloniestimulierenden Faktoren beschrieben (GM-CSF)^{30, 31}. Darüber hinaus existieren alternative, palliative Therapiemöglichkeiten wie die interstitielle Laser-Phototherapie (ILP)³²⁻³⁴ oder MR-gesteuerte laserinduzierte Thermotherapie (LITT)^{35, 36}. Dabei wird die Energie des

Laserlichtes über eine Glasfaser gelenkt und kann dann ohne extensiven chirurgischen Eingriff, minimal invasiv, auch wiederholt direkt intratumoral appliziert werden. Auch andere Methoden, die mit Wärmeapplikation arbeiten, wie die unterschiedlichen Formen der Hyperthermie^{37, 38}, dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Bei diesen Therapieformen ist es möglich durch Wärmekoagulation eine lokalisierte Zerstörung des entarteten Gewebes, ohne Strahlenbelastung und ohne systemische Toxizität durchzuführen.

Ziel einer chemischen, thermischen oder strahlentherapeutischen Tumorthherapie ist es stets durch Schädigungsreize eine Zerstörung möglichst aller Tumorzellen zu erreichen. Dies erfordert eine so hohe Intensität der Reize, dass über molekulare und strukturelle Zellschädigungen letztendlich eine Nekrose des Gewebes entsteht, die dann zu einer Remission der Raumforderung führt. Ein Problem dabei ist, dass bei diesen Therapien - unter der Zielsetzung einer radikalen Tumorzellelimination - auch gesundes Gewebe geschädigt wird. Neue Therapieansätze gehen daher nicht von einer unspezifischen nekrotischen Zerstörung des Gewebes aus, sondern versuchen entweder immunologisch oder durch spezifische chemische, radiotherapeutische oder thermische Reize möglichst selektiv die Tumorzellen zu treffen. Dabei soll keine passive nekrotische Zerstörung, sondern der aktive Prozess des apoptotischen Zellunterganges induziert werden. Der Vorteil gegenüber den Nekrose-induzierenden Hochdosistherapien liegt darin, dass erstens nur die Tumorzellen geschädigt werden, und zweitens für die Auslösung der Apoptose wesentlich geringere Schädigungsintensitäten erforderlich sind als für die nekrotische Gewebeerstörung. Nach der apoptotischen Selbstzerstörung des Tumors kann dieser dann phagozytotisch abgebaut werden. Dies bedeutet eine in ihren Nebenwirkungen reduzierte und damit den Patienten weniger belastende Therapieform mit dem Ziel, gesundes Gewebe möglichst zu schonen. Noch höhere Erfolgsaussichten wären zu erwarten, wenn es zudem gelingen würde den Apoptosereiz gezielt in den vaskulären Endothelzellen des Tumors zu applizieren um die Mikrozirkulation zu zerstören.

Neben der Auswahl eines geeigneten Wirkungsprinzips einer Therapieform ist eine Kontrolle der induzierten Therapiewirkung essentiell. Hier wird zur Zeit neben der Computertomographie (CT), Sonographie oder Positronenemissionstomographie (PET) u.a. auch die „strukturelle“ und „funktionelle“ Magnetresonanztomographie (MRI) eingesetzt. Beschränkt auf die Beurteilung von extrazellulären Effekten können diese Verfahren allerdings nicht alle erforderlichen Informationen zur Differenzierung vitaler, nekrotischer und apoptotischer Zustände liefern. Zusätzliche Information liefert hier die Magnetresonanzspektroskopie (MRS), die es erlaubt Veränderungen molekularer Strukturen

sowohl im Energiemetabolismus als auch in der Membran der Zelle frühzeitig und nicht-invasiv zu analysieren.

Eine kombinierte Anwendung von spezifisch Apoptose-induzierenden Verfahren bei gleichzeitiger Überwachung der Wirkung durch MRS könnte eine Optimierung des Therapieverlaufs noch während der Therapie ermöglichen und so die Prognose von Tumorpatienten verbessern.

1.3 Nekrose

1.3.1 Vorkommen

Sterben Zellen oder Teile eines Gewebes innerhalb des lebenden Organismus ab, so treten bestimmte morphologische Veränderungen ein, die in ihrer Gesamtheit als Nekrose bezeichnet werden. Die Nekrose ist ein Vorgang, dem eine Zellschädigung vorausgeht, in deren Verlauf sich die Kompensationsmöglichkeiten der Zelle erschöpfen, so dass der sogenannte „point of no return“ überschritten wird. Damit ist der Zustand der irreversiblen Zellzerstörung erreicht. Wichtige Ursachen von Nekrosen sind Störungen der Homöostase durch Hypoxidosen, Schäden durch Hitze, ionisierende Strahlen und Toxine. Hinzu kommen noch mechanisch bedingte Verletzungen sowie bakterielle und virale Infektionen.

1.3.2 Morphologie

Lichtmikroskopisch lässt sich die Nekrose an charakteristischen Kennzeichen erkennen, die zum einen durch Veränderungen der betroffenen Zellen selbst und zum anderen durch die Reaktionen des umliegenden Gewebes bedingt sind.

Die ersten Veränderungen treten dabei an den Mitochondrien auf. Die Atmungskette wird gestört und der Zelle gehen die Energievorräte aus. Weiterhin maßgebend sind die Denaturierung von Proteinen und Degradation der Nukleinsäuren. Lysosomale DNasen leiten den Abbau der DNA ein. Der Zellkern verliert dadurch seine Anfärbbarkeit und ist nur noch ganz schwach erkennbar (Karyolyse).

Das Anschwellen des Zelleibs führt zur Ruptur der Zytoplasmamembran und der Zellinhalt kommt in Kontakt mit dem extrazellulären Milieu. Das benachbarte Gewebe reagiert mit dem Vollbild einer akuten Entzündungsreaktion, um die Nekrose zu beseitigen und damit die Voraussetzung für eine nachfolgende Regeneration oder Reparatur zu schaffen. Die

beschriebenen Phänomene treten meistens nach Ablauf einer bestimmten Manifestationszeit ein, die bis zu mehreren Stunden dauern kann⁴.

Falls eine Regeneration des Gewebes durch Mangel an funktionstüchtigen Zellen nicht möglich ist, kann als Folge einer Nekrose erwartungsgemäß eine Narbe entstehen. Aber auch zystische Gebilde oder Ulcera können nach einer beseitigten Nekrose auftreten.

1.4 Apoptose

1.4.1 Vorkommen

Das Phänomen des sogenannten „programmierten Zelltods“, der Apoptose - abgeleitet vom altgriechischen Ausdruck für das Herabfallen des Laubes im Herbst -, wurde bereits 1972 von Kerr³⁹ und Mitarbeitern beschrieben und analysiert⁴⁰. Der Apoptosevorgang ist ein kompliziertes, durch viele Faktoren reguliertes Phänomen, das sowohl im physiologischen als auch pathologischen Zusammenhang vorkommen kann⁴¹.

Apoptose in gesundem Gewebe

In der Biologie existieren oft Situationen, in denen es erforderlich ist, Gewebe ab- oder umzubauen, ohne dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. So hat die Apoptose eine große Bedeutung bei der Metamorphose von Insekten oder in der Embryo- und Organogenese von Vielzellern^{40, 42, 44}. Grundsätzlich kommt sie gehäuft vor in proliferationsfreudigen, labilen Gewebe. Dabei werden durch physiologischen Zellverschleiß verbrauchte Zellen fortgehend durch nachwachsende, neue Zellen ersetzt. Beispiele sind etwa die Haut, die Schleimhäute oder die blutbildenden Zellen des Knochenmarks. Ursache des programmierten Zelltodes ist z.B. bei den Erythrozyten des Blutes oder den Keratinozyten der Haut letztlich die physiologische Reifung. Eine Reihe von weiteren Prozessen im Körper wie die Rückbildung der weiblichen Brust nach der Laktationsperiode, oder die Atresie von ovarialen Follikeln, oder die Rückentwicklung von Haarfollikeln⁴¹, zeigen erwartungsgemäß hohe Apoptoseraten. Vermutlich spielt hier die hormonelle Stimulation eine große Rolle.

Apoptosevorkommen im Immunsystem

Ebenfalls von Interesse ist die Apoptose für die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Funktionen des Immunsystems^{40, 42, 43}. Bereits bei der Eliminierung nicht funktioneller T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus wird die Apoptose eingesetzt. T-Zellen, die

beispielsweise defekte Rezeptoren tragen oder zu stark mit Selbst-Antigenen reagieren, werden apoptotisch aussortiert, um eventuellen Autoimmunerkrankungen vorzubeugen. Aber auch reife T-Zellen können unter bestimmten Voraussetzungen zur Apoptose getrieben werden. So kann ihre Eliminierung erfolgen, wenn während einer immunogenen Stimulation die kostimulatorischen Signale nicht im richtigen zeitlichen Zusammenhang eintreffen. Dieses Phänomen wird beispielsweise als verantwortlich für das Zugrundegehen von nicht-infizierten T-Helfer-Zellen im Verlauf einer HIV-Infektion diskutiert⁴⁰. Auch zur Beendigung einer regulären Immunreaktion mit erfolgreicher Beseitigung des Auslösers ist die Apoptose von Bedeutung (s. 1.4.3).

Apoptosevorkommen in Tumorgewebe

Eine erhöhte Apoptoserate lässt sich in nahezu allen unbehandelten malignen Tumoren auffinden. Dafür scheint es verschiedene Erklärungen zu geben. Die Nähe von ischämischen Nekroseherden, die Induktion durch Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) oder durch zytotoxische T-Lymphozyten scheinen eine besondere Rolle dabei zu spielen⁴¹. Es ist möglich, dass eine erhöhte Apoptoserate zur Regulation der zu Beginn der Karzinogenese gesteigerten Zellproliferationsrate durch Abwehrmechanismen der betroffenen Zelle induziert wird⁴¹.

Andererseits ist die Massenzunahme von Tumoren auch als Summe von ungesteuertem Wachstum bei gleichzeitig reduziertem Zellsterben durch eine verminderte Apoptose erklärbar. Intrazelluläre anti-apoptotische Programme (s. 1.4.4), die durch genetische Veränderungen aktiviert sind, können zur Tumorentstehung und zur Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika beitragen⁴⁰ (s. 1.4.3).

1.4.2 Morphologie

Apoptose und Nekrose unterscheiden sich in einer Reihe funktioneller und morphologischer Eigenschaften^{40, 41, 44}.

Die Apoptose als physiologischer Vorgang betrifft meistens genau definierte und ausgewählte Zellen in einem Gewebsverband. Sie dient der Differenzierung der Gewebestruktur.

Die Mitochondrien spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Apoptose. Durch Ausbildung von durchlässigen Poren an ihren Membranen, verursacht durch Rückgang des Membranpotentials, können verschiedene potentiell apoptotisch wirkenden Substanzen, wie Cytochrom c, Procaspase-2, -3, -9 und AIF (Apoptose-induzierender Faktor)⁴⁵, den

intermembranären Spalt verlassen. AIF ist durch Aktivierung von Endonukleasen dazu in der Lage, bestimmte morphologische Veränderungen im Bereich des Zellkerns zu bewirken, wie Kondensation der Chromatinstruktur (Karyopyknose) und Fragmentation des Zellkerns (Karyorrhesis). Die Zelle beginnt zu schrumpfen, weshalb der apoptotische Zelltod früher auch als „Schrumpfnekrose“ bezeichnet wurde. Die Membran bleibt allerdings so lange intakt, bis die Zelle von einer phagozytierenden Zelle aufgenommen und verdaut wird. Von der äußeren Zellmembran schnüren sich kleine Vesikel ab, sogenannte „Apoptosekörperchen“, die Kernmaterial und zytoplasmatische Bestandteile enthalten. Dieser Vorgang wird auch als „blebbing“ bezeichnet. Die Beseitigung der apoptotischen Zelle geschieht so schnell, so dass dieser Vorgang selbst in Geweben mit hohen Apoptoseraten (z.B. Thymus) nur selten beobachtet werden kann. Von entscheidender Bedeutung ist, dass bei dieser Form des Zelluntergangs keine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird, d.h. die Phagozyten werden durch den Kontakt mit apoptierenden Zellen nicht aktiviert. Hierfür sind vor allem eine vermehrte Expression von Phosphatidylserin und ein Verlust von bestimmten Kohlenhydratresten auf der Außenseite der apoptotischen Zellmembran verantwortlich. Auf der phagozytierenden Zelle scheinen dabei die CD 36/Vitronectin-Rezeptor Moleküle eine bedeutende Rolle zu spielen⁴⁰.

1.4.3 Apoptoseinduktion

Mutagene Schädigung

In den meisten Zellen wird Apoptose ausgelöst nach einer potentiell mutagenisierenden Schädigung, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung, oxidativem Stress oder aber durch Protein- und Lipidmodifikationen⁴⁶. Es wird vermutet, dass das Tumorsuppressorgen p53 bei der Apoptoseinduktion beteiligt ist. Bei entstandenem DNA-Schaden, z.B. durch Bestrahlung, wird der Zellzyklus durch p53 in der G1-Phase arretiert, um so Zeit für die Reparatur zu gewinnen. Gelingt dies nicht, wird der Weg der Selbstzerstörung durch Apoptose eingeschlagen⁴¹. Die Persistenz von Stammzellen mit einem DNA-Fehler könnte sonst zur Vermehrung von genetischen Anomalitäten führen.

Chemotherapeutika

Von verschiedenen Zytostatika ist bekannt, dass sie ihre therapeutische Wirkung durch Auslösen der Apoptose entfalten. Neben Tumoren sind auch schnell proliferierende Normalgewebe und lymphatische Effektor-Populationen betroffen^{47, 48}. Eine erhöhte Apoptoserate ist verantwortlich für viele der unerwünschten Chemotherapie-

Nebenwirkungen und für Tumorregressionen. Dabei ist der genauere Wirkungsmechanismus dieser Medikamente größtenteils noch ungeklärt. Da die Apoptose ein regulierbares Phänomen darstellt, finden sich hier möglicherweise Ansätze zur Therapieverbesserung. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass eine gesteigerte Expression des Protoonkogens bcl-2 eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bewirken kann⁴¹, da dieses Gen in der Lage ist den Apoptosevorgang zu hemmen (s. 1.4.4). Ähnlich verhält es sich bei Überexpression der Proteinkinase C (PKC), die für eine verzögerte Tumorzellantwort auf den zytostatischen Reiz verantwortlich sein kann⁴⁹. Eine Potenzierung der Wirkung lässt sich dagegen durch kombinierte Anwendung von Hyperthermie und Chemotherapie erreichen⁵⁰.

Hyperthermie

Starke und lange anhaltende Hitzeinwirkung kann bekanntlich nekrotische Vorgänge einleiten. Dosierte Hitzebehandlung dagegen ist in empfindlichen Geweben dazu in der Lage Apoptose zu induzieren, wobei der genauere Mechanismus noch diskutiert wird. Bei der Hyperthermiebehandlung werden erhöhte Temperaturen von 41 - 43 °C für circa 30 min eingesetzt. Besonders empfängliche Gewebe sind proliferationsfreudige, lymphatische oder tumoröse Gewebe. Eine Temperaturerhöhung kann einerseits eine Zunahme von Reaktionsgeschwindigkeiten, andererseits eine deutliche Zunahme der Proteindenaturierung in der Zelle bewirken. Konformationsänderungen der Proteine beeinflussen zytoplasmatische und intrazelluläre Membranen in ihrer Stabilität, Fluidität und Transporteigenschaften, der Energiehaushalt wird gestört. Es gibt widersprüchliche Angaben über Hyperthermie-induzierte pH Veränderungen im Gewebe⁵¹. Die Temperaturerhöhung bewirkt u.a. eine Sensibilisierung gegenüber applizierter Strahlendosis und bestimmter Zytostatikagruppen⁵². Allerdings ist die individuelle Reaktionsbereitschaft der Tumore auf Wärmereize je nach Art sehr variabel³⁷.

In der Literatur wird ein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Hyperthermie-induzierten Apoptose und der Funktionstüchtigkeit des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben^{53, 54}. Zellsysteme mit intakter p53 – Aktivität zeigen u.a. nach einer Hyperthermiebehandlung eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase für mehrere Stunden mit anschließender Apoptoseeinleitung⁵⁵. Ebenfalls ist die Rede von einem Zusammenhang bezüglich eines nachweisbar starken Anstiegs der Konzentration an Tumornekrosefaktor α und der Hyperthermie-induzierten Apoptose⁵⁶. Einige Zellsysteme sind dazu in der Lage sich gegen die angewandte Hitzeinwirkung und ihre Folgen durch

Entwicklung sogenannter Hitzeschockproteine zu wehren⁵⁷. Boreham et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass sich Lymphozyten nach einer sogenannten Hitzeschockbehandlung neben der Sensibilisierung zum Teil auch resistent gegenüber bestrahlungsinduzierter Apoptose verhalten⁵⁸. Durch die Hemmung der Expression solcher Hitzeschockproteine könnte wiederum ein besseres Ansprechen bei der Tumorbekämpfung erreicht werden⁵⁹. Genauere Erklärungsansätze der Hyperthermiefolgen blieben allerdings bisher noch aus.

Hormonelle Stimulation

Eine Atrophie durch Apoptose wird stets eingeleitet bei nachlassender hormoneller Stimulation in Hormon-abhängigen Organen, wie Prostata, Uterus oder Nebennierenrinde⁴¹. Die Apoptoserate bei Hormon-abhängigen Tumoren ist nach Hormonentzug ebenfalls stark erhöht. Im Gegensatz dazu kann durch gesteigerten Glucocorticoideinfluss Apoptose in Thymozyten, lymphatischen Leukämieformen und malignen Lymphomen induziert werden⁴¹. Auch hier wird als Ursache der Tumorresistenz die Expression des Protoonkogens *bcl-2* diskutiert⁶⁰.

Antigen/Antikörper - Reaktion

Seit 1989 ist auch ein molekularer Schalter für die Apoptose bekannt, das *Fas* oder *APO-1* System. Dieser auch als *CD 95* bezeichnete Rezeptor wurde unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen unter Krammer⁶¹ und Yonehara⁶² entdeckt und gehört der Tumor Nekrose Faktor (TNF)- Rezeptorfamilie an. Auch der natürliche Ligand *Fas-L* dieses Rezeptors ist bekannt und charakterisiert⁶³. Die Stimulation dieses Rezeptors führt zur Aggregation der intrazellulären „Todesdomänen“, die unter Einschaltung von weiteren Signalproteinen zu einem gemeinsamen Komplex zusammengeführt werden. Dieser Komplex wird als *DISC* für „death-inducing signaling complex“ bezeichnet⁶³. Der weitere *CD 95* assoziierte Apoptoseweg zeichnet sich durch Aktivierung von verschiedenen Caspasen (Cystein-Aspartasen) aus. Dies sind inaktive Proenzyme, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden müssen. Besonders Caspase-8 und Caspase-3 scheinen bei der Apoptoseinduktion eine große Rolle zu spielen⁶⁴. Sie werden je nach Zelltyp unabhängig von der Zellzyklusphase auf unterschiedlichen Wegen, entweder durch mitochondriale Aktivierung über Cytochrom c oder direkt, in den Apoptosemechanismus eingeschaltet^{65, 66}. Dieses System ist vor allem bei der Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten sowie für das Abschalten von Immunreaktionen von Bedeutung. Dabei reagiert der Fas-Rezeptor, der auf

der Zelloberfläche von T-Lymphozyten exprimiert wird, mit seinem Liganden Fas-L, der sich auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten befindet. Diese Interaktion löst über den oben beschriebenen Mechanismus die Apoptose der Fas-exprimierenden Zelle aus. Zu Beginn einer Immunantwort führt die antigenspezifische Erkennung von infizierten Zellen zu ihrer Abtötung und zur Aktivierung von weiteren Lymphozyten. Wenn die Anzahl der infizierten Zellen dadurch sinkt und die Anzahl der aktivierten Lymphozyten steigt, kommt es immer häufiger zu der oben beschriebenen Fas/Fas-L Interaktion und zur Reduktion des antigenspezifischen T-Zellklones⁶⁷. Allerdings ist es auch möglich, dass ein und derselbe Lymphozyt nach seiner Aktivierung sowohl den Fas-Rezeptor, als auch den Fas-Ligand exprimiert. Damit ist diese Zelle in der Lage sich selber zu zerstören, was als „autokriner Tod“ bezeichnet wird. Dieser Mechanismus wird bei der alkoholischen Leberzirrhose als Ursache für den Leberzelluntergang diskutiert. Es wird vermutet, dass toxische Alkoholabbauprodukte ein CD 95-abhängiges Selbstzerstörungsprogramm in Hepatozyten einschalten können, das über eine mitochondriale Aktivierung funktioniert. Im Gegensatz dazu können beim „parakrinen Tod“ auch Nachbarzellen von dem ausgelösten Apoptosevorgang betroffen sein⁴⁴.

Perforin / Granzyme - Weg

Neben der Eliminierung über den CD 95-Weg sind aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten auch in der Lage Virus-infizierte Zellen, wie beispielsweise bei der Hepatitis-B-Virus Infektion, durch eine andere Art der Apoptoseinduktion zu zerstören. Sie sezernieren das Enzym Perforin, das dazu in der Lage ist die Membranen der Zielzellen zu permeabilisieren, was aber nicht ausreicht um sie zu zerstören⁶⁸. Es stellte sich heraus, dass Perforin das Eindringen von Serinesterasen (Granzyme A und B) in die Zelle ermöglicht, die wiederum den Apoptoseprozess einleiten können⁶⁹.

1.4.4 Regulationsmechanismen

Die unterschiedlichen Auslösefaktoren der Apoptose scheinen letztendlich in ein und dem selben Apoptosepfad zu münden, der zusätzlich durch verschiedene Genprodukte positiv oder negativ moduliert werden kann.

Einfluss von c-myc Protoonkogen

Wachstumsfaktoren sind unentbehrlich für die Proliferation von Zellen. Bei einem Wachstumsfaktormangel ist eine Vermehrung nicht mehr möglich. Dieser Zustand kann bei

Faktor-abhängigen Zellverbänden zur Apoptose führen⁷⁰. Dabei kommt dem c-myc Protoonkogen eine große Rolle zu, weil es die Abhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren verstärken kann. An einer IL 3-abhängigen myeloischen Zelllinie konnte beobachtet werden, dass alleiniger Wachstumsfaktorentzug zum Stillstand der Zellproliferation führte, während der gleiche Versuch nach Transfektion mit c-myc zur Apoptose führte⁷¹. Aktivierung des c-myc-Gens kann je nach adjuvanten Signalen zur Proliferation oder zum Zelltod führen⁷². Bei genügendem Vorhandensein an Wachstumsfaktoren wird die Zelle zur Mitose angetrieben, da der Apoptoseweg blockiert wird⁷⁰.

Einfluss von bcl-2 Protoonkogen

Das Protoonkogen bcl-2 ist ein intrazelluläres Protein, das mit der Mitochondrien- und Zellkernmembran eng verbunden ist. Es ist in der Lage den Vorgang der Apoptose zu blockieren⁷³, in dem es mit zytoplasmatischen Komponenten interagiert. Dieses Protoonkogen wurde ursprünglich durch sein Auftreten an der Bruchstelle des Translokationschromosoms t(14;18) entdeckt, das für das folliculäre B-Zell-Lymphom verantwortlich ist⁷⁴. Es ist einer der wichtigsten Überlebensfaktoren von ruhenden T- und B-Lymphozyten. Beispielsweise kann die bcl-2 Expression IL 3-abhängige myeloische und lymphatische Zelllinien nach IL 3-Entzug vor dem Zelltod durch Apoptose bewahren⁷⁵. Es spielt außerdem eine große Rolle als Inhibitor bei der c-myc⁷⁶ und Adenovirusprotein E1A⁷⁷ induzierten Apoptose. Allerdings werden nicht alle Apoptose auslösenden Systeme blockiert. Eine große Ausnahme bildet die Apoptoseinduktion durch zytotoxische T-Lymphozyten⁷⁸. Eine pathologisch hohe bcl-2-Expression im Zusammenhang mit begünstigtem Auftreten von Tumoren der Prostata, Lunge, Niere, Schilddrüse, Brust und Darm wurde vielfach beschrieben⁷⁹. Dies gilt nicht für das Vorkommen in Malignomen aus dem Kopf-Hals-Bereich. Bei Überexpression konnte hier lediglich festgestellt werden, dass weniger Lymphknoten befallen sind⁷⁹ und dass kein Zusammenhang mit der Tumorprogression besteht. Weiterhin ist bekannt, dass bcl-2 bevorzugt die durch ionisierende Strahlung ausgelöste Apoptose verhindert. Dieser Effekt muss bei der Bestrahlungstherapie berücksichtigt werden.

Einfluss des Tumorsuppressorgens p53

Tumorsuppressorgene sind Regulatoren der Zellproliferation, welche die Zellvermehrung aktiv unterdrücken können. Sie spielen vor allem bei der Tumorgenese eine große Rolle.

Wenn sie inaktiviert werden, kommt es zur übermäßigen Zellproliferation. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 stellen einen der häufigsten genetischen Defekte bei Tumoren dar. Durch das Einbringen des p53-Gens vom Wild-Typ in Zellen mit fehlender normaler p53-Aktivität konnten einige seiner Funktionen identifiziert werden. Darunter befinden sich die Regulierung der Zellproliferation durch Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase^{80, 81}. Andererseits konnten in einigen Tumoren auch erhöhte Apoptoseraten nach p53-Expression gefunden werden^{82, 83}. Versuche, bei denen Zellen mit bekannter p53-Deletion resistent gegen die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung, nicht jedoch durch Glucocorticoideinsatz waren, zeigen, dass manche Mechanismen der Apoptoseauslösung nur im Beisein von intaktem p53 funktionieren^{84, 85}. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Kombination einer konventionellen Strahlentherapie mit einer Gentherapie im Sinne der Wiederherstellung eines funktionstüchtigen p53-Gens, nicht sinnvoll wäre⁸⁶. Es wird vermutet, dass p53 durch die Blockierung der Proliferation und mit Hilfe zusätzlicher Faktoren die Zellen in Richtung Apoptose treibt. So konnte beobachtet werden, dass das Adenovirusprotein E1A, das in der Lage ist, sowohl Proliferation als auch Zelltod zu induzieren, durch das Mitwirken von p53 den Apoptosemechanismus auslöst⁸⁷. Das Mitwirken von p53 bei der c-myc aktivierten Apoptose ist noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte festgestellt werden, dass eine p53-Überexpression stark mit dem Auftreten von Kopf-Hals-Tumoren und dessen Progression korreliert. Der Einsatz von anti-p53-Antikörpern könnte beispielsweise der frühzeitigen Diagnosesicherung oder als prognostischer Marker dienen⁸⁸.

1.5 Zielsetzung

Die Anwendung der chemischen, thermischen oder strahlentherapeutischen Therapieverfahren zur Behandlung von Malignomen aus dem Kopf-Hals-Bereich ist hauptsächlich dadurch begrenzt, dass eine selektive nekrotische Zerstörung des Tumors einschließlich der Tumorrandbereiche ohne eine Schädigung des umgebenden gesunden Gewebes oftmals nicht möglich ist. Dies ist insbesondere für die Behandlung von tief liegenden Tumoren im Kopf-Hals-Bereich von Bedeutung, wo stets sensible Strukturen wie Nerven oder Gefäße zu schonen sind.

Eine für die klinische Anwendung wichtige Modifikation dieser Verfahren könnte darin bestehen, die intratumoral zur Schädigung des Malignomgewebes applizierte Energie kontrolliert so zu modifizieren, dass der Zelluntergang selektiv Apoptose-vermittelt abläuft. Nach der aktiven Zerstörung des Tumors kann dieser dann phagozytotisch abgebaut werden. So können Tumorzellen zerstört, umliegendes gesundes Gewebe jedoch in Form und Funktion geschont werden, was eine in ihren Nebenwirkungen reduzierte und damit den Patienten weniger belastende Therapieform bedeutet. Dies kann jedoch nur erreicht werden, wenn ein Verfahren zur Verfügung steht, welches noch während der Therapie eine Beurteilung des durch die jeweilige Therapieform induzierten Zellunterganges erlaubt. Hierbei ist die magnetresonanzspektroskopische Analyse (MRS) von größter Bedeutung, da sie berührungsfrei, d.h. nicht invasiv und ohne Strahlenbelastung durchgeführt werden kann und eine kontinuierliche Beobachtung, ein „online Monitoring“ molekularer Prozesse im Gewebe der Patienten im Verlauf der Therapie ermöglicht. Zusätzlich werden die charakteristischen Strukturunterschiede in der Membran zeitlich sehr früh und lange vor makroskopischen morphologischen Veränderungen erkennbar. Ein solches Monitoring-Verfahren der induzierten Zellschädigung während der Anwendung beispielsweise einer interstitiellen Lasertherapie könnte eine neue Strategie zur schonenderen Behandlung von SCCHN darstellen.

Ziel dieser Untersuchung war es daher mittels *in vitro* Analysen modellhaft Ausgangswerte der Behandlungsparameter für eine Apoptose-induzierende interstitielle Lasertherapie am Patienten zu finden. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein geeignetes Apoptose-Zellmodell etabliert werden, an der mit Hilfe von zellbiologischen Verfahren wie Flusszytometrie die Zellzustände vital, apoptotisch und nekrotisch differenziert werden könnten. Hierfür wurden Karzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich unterschiedlichen Apoptose- und Nekrose-induzierenden Reizen ausgesetzt und durchflusszytometrisch analysiert. Mit Hilfe der

Protonenresonanzspektroskopie ($^1\text{H-MRS}$) sollte im Anschluss der Vitalzustand, die Apoptose und die Nekrose von Tumorzellen ebenfalls differenziert und charakterisiert werden. Simultan durchgeführte spektroskopische Untersuchungen würden so eine Korrelation mit den etablierten zellbiologischen Verfahren erlauben. Die gefundenen spezifischen Parameter würden dann die Möglichkeit liefern, am Patienten nicht-invasiv, zu einem sehr frühen Zeitpunkt den Beginn und das Ausmaß von Nekrose und Apoptose noch während der Therapie zu beurteilen. Damit wäre nahezu ein „online Monitoring“ des Therapieverlaufs und seine Optimierung noch während der Therapie möglich.

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Die sterile Werkbank stammt von der Firma NUAIRE (Plymouth/US), der Brutschrank von der Firma Revco (Ashville/Canada), die Mikroskope von der Firma Zeiss (Oberkochen), die Pipetten von der Firma Eppendorf (Köln).

Die Geräte zur Gel-Elektrophorese von den Firmen Stratagene (Heidelberg) und LKB Pharmacia (Freiburg i. Br.), die Kamera mit Videodrucker und Monitor zur bildlichen Fixierung von Agarosegelen von der Firma Cybertech (Berlin).

Die DNA-Konzentrationen wurden mit einem Uvikon 860-Spektralphotometer von der Firma Kontron (Zürich) gemessen.

Die verwendeten Zentrifugen sind von den Firmen Jouan CR 422 (Saint Herblain/Frankreich), Heraeus Biofuge 13 und Biofuge fresco (Hanau) und Hettich (Tuttlingen), die Waagen von den Firmen Sartorius und Mettler (Giessen), das Wasserbad von der Firma Julabo (Seelbach), der -80 °C Gefrierschrank von der Firma Heraeus (Hanau), der Flüssigstickstofftank von der Firma Messer (Griesheim).

Das Durchflusszytometer FACS Calibur wurde von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg), das Magnetresonanzspektroskop von der Firma Bruker (Rheinstetten) hergestellt.

2.2 Plastikwaren

Die gebrauchten Einweg-Materialien wie Einfrierröhrchen Cryo Tubes, FACS-Röhrchen, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturflaschen wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden), die Pipettenspitzen von der Firma Eppendorf (Hamburg), die Reaktionsgefäße von der Firma Eppendorf, die Spektroskopieröhrchen (ø 5 mm) von der Firma Norell (Dietzenbach) und die MD-Koya Raster 10-Objektträger, die zur Zellzählung verwendet wurden, von der Firma Madaus Diagnostik (Köln) hergestellt.

2.3 Chemikalien, Färbereagenzien, Enzyme, Medien, Zellkulturzusätze

Alle gängigen Chemikalien, Zellkulturzusätze, Enzyme und Färbereagenzien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco BRL, Life Technologies (Gaithersburgh/MD),

Seromed/Biochrom KG (Berlin), Merck (Darmstadt), SIGMA (Deisenhofen), Pharmacia (Freiburg i. Br.) oder PAA Laboratories GmbH (Linz) bezogen.

Die Medien für die Zellkultur lieferten die Firmen Seromed/Biochrom KG (Berlin) und PromoCell (Heidelberg), das fötale Kälberserum FCS, Gibco BRL, Life Technologies (Gaithersburgh/MD).

Das verwendete Zytostatikum Methotrexat stammte von der Firma SIGMA (Deisenhofen) und der Antikörper CD 95 von der Firma PharMingen (Hamburg), clone DX2.

2.4 Puffer, Lösungen

2.4.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Zu den *Kulturmedien RPMI* (Roswell Park Memorial Institute) und *DMEM* (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

L-Glutamin, 200mM	1% (v/v)
HEPES, 1M	1% (v/v)
Nicht essentielle Aminosäuren	1% (v/v)
Natriumpyruvat, 100mM	1% (v/v)
Penicillin/Streptomycin, 10000U/10mg/ml	1% (v/v)
FCS	10% (v/v)

Das Endothelzellmedium wurde bereits mit kompletten Zusätzen bezogen und war somit gleich einsatzfähig.

Das *Einfriermedium* setzte sich wie folgt zusammen: 50 % (v/v) Kulturmedium

40 % (v/v) FCS

10 % (v/v) Dimethylsulfoxid DMSO

PBS (Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung)

Für 1 Liter: 0.21 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4

9.00 g Natriumchlorid NaCl

0.726 g Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4

mit H_2O dest. Auf 1 Liter auffüllen

Trypanblau-Lösung (1%): 1g Trypanblau in 100 ml PBS

2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

- *TBE-Puffer*: 0.1 M Tris, 33 mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8.6

Für 1 Liter:

12.1 g	Tris
5.135 g	Borsäure
0.372 g	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure EDTA

- *Lysepuffer*: 1 % (w/v) SDS, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,7
- *Proteinase K* (10 mg/ml)
- *RNase A* (10 mg/ml)
- *Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung* (25:24:1)
- *Standard-Marker*: 100 base-pair-ladder, molekularer Gewichtsmarker
- *Ethidium-Bromid-Lösung* (0.02 % f.c.): 2 µl Stocklösung (1% f.c.) in 100 ml TBE-Puffer

2.4.3 Durchflusszytometrie

TUNEL-Assay

- *In situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein (Boehringer Mannheim)
enthält Enzym und Enzympuffer
- *FACS-Puffer*: FCS 2 % (v/v) gelöst in PBS
- *PFA 2 %*: 2 g PFA abwiegen, in 80 ml PBS unter Erwärmung lösen,
abkühlen auf RT
mit NaOH auf pH 7 einstellen
mit PBS auf 100 ml auffüllen
- *Triton X-100*: 10 % (v/v) Stammlösung mit FACS-Puffer verdünnt

ANNEXIN-Test

- *Annexin-V-FLUOS* (Boehringer Mannheim)
- *Inkubationspuffer*: 0,50 ml Hepes-Puffer 1M, (1 % f.c.)
0,25 ml CaCl₂ 1M, (0,5 % f.c.)
1,40 ml NaCl 5M, (2,8 % f.c.)
mit H₂O dest. Auf 50 ml auffüllen
- *Propidiumiodidlösung* (PI): 50µg/ml

Hypotone fluorochrome Lösung (pH 7): 50 mg NaCitrat (0,1% w/v)

50 µl Triton X-100 (0,1% v/v)

1 ml PI (50µg/ml) mit dest. H₂O auf 50 ml auffüllen

2.5 Humane Zelllinien

2.5.1 Lymphome

BL 41	B-Zell-Lymphom	GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Jurkat	T-Zell-Lymphom	ATCC TIB-152

2.5.2 HNO-Zelllinien

FaDu	Plattenepithelkarzinom aus dem Pharynx	ATCC HTB-43
GHD-1	Plattenepithelkarzinom aus dem Hypopharynx	Klinik u. Poliklinik für HNO-Kranke, Klinikum Großhadern, München
HLaC 78	Plattenepithelkarzinom aus dem Larynx	Würzburg, HNO-Klinik
PCI-1	Plattenepithelkarzinom aus dem Hypopharynx	Pittsburgh Cancer Institute

2.5.3 Endothelzellen

HMEC	Human Endothelial Cells	GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
------	-------------------------	--

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu verhindern. Die Zelllinien, FaDu, HLaC 78, Jurkat, GHD-1 und PCI-1 wurden in DMEM-Medium, BL 41 in RPMI-Medium und HMEC in Endothelzellmedium nach Hinzufügen von Supplementen (siehe 2.4.1) kultiviert. Sie wurden in Zellkulturflaschen aus Polypropylen angesetzt und in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung in geeigneten Brutschränken inkubiert. In dieser Atmosphäre werden die auf physiologische Werte eingestellten pH-Werte der CO₂/Bicarbonat-gepufferten Medien aufrechterhalten.

Die Zellen wurden wie folgt umgesetzt:

In Suspension wachsende Zelllinien, wie BL 41 und Jurkat, wurden bei 1200 Upm, 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment (Pellet) wurde anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Zelldichte neu ausgesät.

Adhärent wachsende Zelllinien wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen, da das im Medium enthaltene Serum die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt. Die Zellkulturen wurden je nach Größe mit 1 bis 5 ml Trypsinlösung versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die durch Trypsinierung abgelöste Zellschicht wurde in serumhaltigem Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert. Die Zugabe von Serum ist an dieser Stelle wichtig, um die Trypsinwirkung zu inhibieren, die bei übermäßig langer Inkubation zur Zellschädigung bzw. zum Zelltod führen würde. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert.

Die Zellkulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-3 Tage in Verdünnungen von 1:3 oder 1:5 erneut in Kulturflaschen ausgesät.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Einfrieren: Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff bei -192°C gelagert. Dazu wurden die als Pellet vorliegenden Zellen mit einer Zellzahl von $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ in kaltem Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots von 1ml auf sterile und ebenfalls kalte Einfriereröhrchen verteilt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen beim Einfrieren schädigen können. Die Röhrchen wurden langsam auf -80°C heruntergekühlt und spätestens nach 48 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen: Die eingefrorenen Zellen wurden im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut und sofort in 50 ml Kulturmedium verdünnt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei 1200 Upm) wurde das Pellet erneut in Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Tote Zellen nehmen Trypanblau sofort auf, das Zytoplasma färbt sich blau, was sich lichtmikroskopisch erkennen lässt. Die Zellmembran lebender Zellen wird erst nach ca. 5-10 min permeabel, der Farbstoff dringt entsprechend später ein.

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in definiertem Verhältnis mit dem Farbstoff gemischt und auf MD-Koya Raster 10 -Objektträger überführt und ausgezählt. Folgende Formel ergab die Zellzahl pro ml Zellsuspension:

$$N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

N Zahl der gezählten Zellen im Großquadrat (9 Kleinquadrate)

V Verdünnungsfaktor

10^4 Kammerfaktor

3.2 Apoptoseinduktion

Apoptose wurde durch die unten genannten Methoden induziert.

3.2.1 Serumreduktion

Die Reduktion des Serumgehaltes im Kulturmedium von 10 % FCS auf 1 % führte bei der Zelllinie BL 41 zur Apoptose. Die Zellen wurden dafür 1 bis 2 h in reduziertem Medium unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend analysiert.

3.2.2 Zytostatikabehandlung

Für die Durchführung wurde das immunsuppressiv wirkende Medikament Methotrexat MTX gewählt. Es greift als Antimetabolit in den Folsäurestoffwechsel ein und führt letztendlich zum Funktionsverlust und zum Tod der Zelle. Von einer 10 mM MTX-Stammlösung wurden 200 µl pro 1×10^6 Jurkat-Zellen in die Zellsuspension gegeben und diese anschließend bis zu 72 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert.

3.2.3 Antikörperbehandlung

Das Zellpellet von 1×10^6 Zellen wurde mit 1 - 10 µl CD 95 -Antikörper (Stock 1mg/ml, f.c. 1µg/ml) für 10 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Kulturmedium verdünnt und vor der Analyse bis zu 48 h im Brutschrank inkubiert. Dieser Weg der Apoptoseinduktion wurde bei allen verwendeten Zelllinien erprobt mit Ausnahme der BL 41.

3.2.4 Hyperthermie

Durch Inkubation der Zellsuspension in einem Wasserbad bei 43 °C für 30 bis 120 min und anschließender Inkubation von bis zu 48 h im Brutschrank wurde Apoptose induziert. Auch hier wurden die Reaktionen aller verwendeter Zelllinien bis auf BL 41 ausgetestet.

3.3 Nekroseinduktion

Eine nahezu vollständige Nekrose konnte durch Erhitzen aller Zelllinien in einem Wasserbad bei ≥ 65 °C für circa 15 min erreicht werden. Bis zur weiterführenden Messung wurden die Zellen für circa 48 h im Brutschrank aufbewahrt.

3.4 Methoden zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose

3.4.1 Mikroskopie

Bereits ohne Anfärbung der Zellpopulationen sind unterschiedliche Zellstadien lichtmikroskopisch differenzierbar: runde, stark lichtbrechende Zellen weisen auf *vitale* Zellzustände hin, im Gegensatz zu *toten* Zellen, die unregelmäßig geformt und Licht undurchlässiger sind.

Um einzelne Stadien der Apoptose und Nekrose zu differenzieren, lassen sich die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop nach entsprechender Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Acridin-Orange, analysieren. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen geerntet, abzentrifugiert (4000 Upm, 3 min) und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zusatz von 50 μ l Acridin-Orange (0,5 % w/v in PBS) wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Davon wurden 20 μ l auf einen Objektträger aufgetragen und nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

3.4.2 DNA-Gelelektrophorese

Während des Apoptose-Vorganges wird die DNA der Zellen durch Restriktionsendonukleasen in circa 200 bp große Fragmente gespalten, die sich auf Agarosegelen nach ihrer Größe auftrennen lassen und ein für die Apoptose typisches Strickleitermuster ergeben.

Je Probe wurden hierfür 5×10^5 Zellen geerntet, in 1 ml PBS resuspendiert und 3 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert. Nach Zusatz von 1 ml Lysepuffer und 50 μ l Proteinase K wurden die Zellen über Nacht bei 37°C lysiert. 500 μ l des Lysats wurden mit 750 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung gemischt und anschließend 25 Minuten bei 3500 Upm und 4°C zentrifugiert. Die DNA ist in der oberen Phase enthalten, die abgenommen, mit 1 ml Chloroform vermischt und erneut wie oben zentrifugiert wurde.

Dem Pellet wurden 10 μ l RNase A hinzugefügt und ½ h bei Raumtemperatur inkubiert. Die obere Phase wurde mit 1 ml Ethanol (96 % p.a.) und 50 μ l NaAc zur Aussalzung der DNA über Nacht bei -20°C aufbewahrt, anschließend mit 13000 Upm 15 min lang bei 4°C zentrifugiert und in 1 ml Ethanol (70 % p.a.) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet im Vakuum-Trockner 15 min getrocknet und in 400 μ l dest. H₂O gelöst. Nach der DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer wurden 3 μ g DNA pro Geltasche eines 2 % Agarosegels eingebracht. Für das verwendete Gel wurde die

entsprechende Agarosemenge mit 1 %-iger TBE-Lösung in der Mikrowelle aufgekocht und zur Herstellung eines Horizontalgels in die dafür vorgesehene Form aus Plexiglas gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte circa 1 h mit 60 Volt und 350 mA. Anschließend wurde die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt und mit einer Kamera nach Anregung der Fluoreszenz mit UV-Licht fotografiert.

3.4.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Messung unterschiedlicher Eigenschaften einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Jede Zelle interagiert dabei mit dem Laserlicht, was zu einer Streuung des Lichtes führt. Die Streuung wird durch verschiedene zellbiologische Parameter wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und Granularität beeinflusst. Darüber hinaus können Zelloberflächen-Antigene durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Fluorochrome werden durch das Laserlicht angeregt und können gemessen werden.

Es ist möglich folgende optische Parameter gleichzeitig zu messen:

Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter): Ein Teil des Lichtes wird relativ zur Achse der Einstrahlung in einem Winkel von 2 bis 6 Grad gestreut. Diese Streuung gilt als Maß für die Zellgröße, denn große Zellen streuen mehr Licht als kleine Zellen.

Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter): Diese Bezeichnung steht für das im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreute Licht. Die Intensität dieses Lichtes ist von der Granularität, den kernhaltigen Bestandteilen der Zelle abhängig. Höhere Granularität bedingt stärkeres Seitwärtsstreulicht.

Fluoreszenz: Spezielle Filtersysteme zerlegen das seitwärts abgestrahlte Licht in drei verschiedene Spektralbereiche. Damit ist es möglich, sowohl Einzel-, als auch Doppel- und Dreifachfluoreszenzen zu messen. Dies erlaubt eine gleichzeitige Analyse von bis zu drei verschiedenen Zelloberflächenmerkmalen.

Bei der Anfärbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ist zu beachten, dass die gewählten Fluorochrome durch Laserlicht der Wellenlänge 488 nm anregbar sein müssen. Die Emissionsspektren der drei Fluorochrome müssen jedoch verschieden sein, wobei nicht vermeidbare Überlappungen durch Kompensation ausgeglichen werden können.

Darüber hinaus können Zellen durch die Anregung mit Laserlicht auch ohne Markierung fluoreszieren. Diese Autofluoreszenz muss mit Hilfe von Kontrollen von der antigenspezifischen Fluoreszenz unterschieden werden. Im folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Markierungsverfahren erläutert werden.

3.4.3.1 TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling)

Eine der charakteristischen Eigenschaften von apoptotischen Zellen ist der enzymatische Abbau ihrer DNA in Fragmente mit definierter Größe. Diese Einzelstrangbrüche können nach entsprechender Markierung sichtbar gemacht werden und dienen zum Nachweis der Apoptose⁸⁹. Dazu werden die freien 3'-OH Enden der DNA-Fragmente mit einem fluoreszierenden Farbstoff mit Hilfe des Enzyms Terminale-desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) markiert⁹⁰. Der TUNEL-Assay wurde durchgeführt unter Verwendung des „In Situ Cell Detection Kit“ (Boehringer Mannheim, Mannheim).

Alle Reagenzien wurden auf Eis vorgekühlt. Pro Probe wurden 5×10^5 Zellen mit 500 μ l kaltem FACS-Puffer durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert. Das resuspendierte Zellpellet wurde mit 100 μ l kaltem PFA (2 % v/v) fixiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen nochmals wie oben gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde dem Pellet 100 μ l kaltes Triton X-100 (10 % v/v) hinzugefügt. Nach Inkubation von 1 min auf Eis und Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen erneut wie oben gewaschen. Das Pellet wurde entweder mit 50 μ l Enzympuffer alleine (Negativprobe) oder mit 45 μ l Enzympuffer und 5 μ l TdT-Enzymlösung resuspendiert und für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Zusatz von 1 ml kaltem FACS-Puffer und nachfolgendem Waschen (s.o.) wurden die Zellen zur Analyse in 500 μ l FACS-Puffer gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt.

3.4.3.2 ANNEXIN-V-Fluos

Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein. Es besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das sich normalerweise bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. In frühen Apoptose-Stadien, wenn die Zellmembran noch intakt ist, verlagert sich das Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, wo es mit Annexin interagieren kann. Annexin kann somit zum Nachweis für Apoptose-typische Veränderungen eingesetzt werden⁹¹. Da nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden können, ist eine weitere Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen erforderlich. Hierfür eignen sich DNA-Farbstoffe, wie beispielsweise Propidiumiodid (PI), die nur permeabilisierte

Membranen nekrotischer Zellen passieren können. Die simultane Anwendung von Annexin und Propidiumiodid ermöglicht so eine einfache Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen.

5×10^5 Zellen wurden geerntet, in 1 ml PBS gewaschen (4000Upm, 3 min) und in 100 μ l Inkubationspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 3 μ l Annexin-V-Fluos Stammlösung wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erneut zentrifugiert, in 500 μ l Inkubationspuffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Kurz vor der Messung wurde den Proben 5 μ l PI hinzugefügt. Die Proben sollten bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.4.3.3 Hypotone fluorochrome Lösung

Die Inkubation der zu untersuchenden Zellen in hypotoner fluorochromer Lösung mit Propidiumiodid über Nacht führt zu einer Permeabilisierung der Zell- und Kernmembranen. Der Grund hierfür liegt in dem Bestreben die unterschiedlichen osmotischen Drücke intra- und extrazellulär durch Aufnahme von Wasser in die Zellen auszugleichen. Das in der Färbelösung vorhandene Triton (Albumin) soll während der Inkubationszeit die vollständige Lyse der Zellen verhindern. Eventuell vorhandene DNA-Bruchstücke verlassen dabei durch Diffusion die Zelle. Der verwendete Farbstoff Propidiumiodid färbt die verbliebene DNA an, was sich bei der durchflußzytometrischen Analyse von *vitalen* Zellen in einem sogenannten *diploiden*, zweigipfligen Peak, als Zeichen für einen intakten diploiden Chromosomensatz, widerspiegelt. Der *apoptotische* Zerfall der DNA in Fragmente führt zum Auftreten eines *zusätzlichen hypoploiden*, in den negativen Bereich verschobenen Peak. Bei nekrotischen Zellen fehlen diese Peaks aufgrund der nahezu vollständigen DNA-Degradation⁹².

Es wurden 5×10^5 Zellen geerntet, in 1 ml PBS gewaschen (bei 4000 Upm, 3 min), anschließend für 24 h in 1 ml hypotonem Puffer bei 4°C inkubiert und zur Analyse in ein FACS-Probenröhrchen überführt.

3.4.3.4 Einfache PI-Markierung

Intakte Membranen lebendiger Zellen sind dazu in der Lage die Zelle vor der Aufnahme bestimmter Farbstoffe in das Zellinnere zu schützen. Membranen absterbender Zellen dagegen werden durchlässig und ermöglichen die Anfärbung des Zytosols. Kurze Inkubationszeiten mit bestimmten Farbstoffen, wie beispielsweise Propidiumiodid (PI),

stellen somit eine einfache durchflusszytometrische Unterscheidungsmethode von lebendigen und toten Zellen dar.

5×10^5 Zellen wurden geerntet, in 1 ml PBS gewaschen (4000 Upm, 3 min) und zur Analyse in ein FACS-Probenröhrchen überführt. Kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden 2-5 μ l PI-Lösung (50 μ g/ml) hinzugefügt.

3.4.4 Fluoreszenzanalyse

Die vorbereiteten Zellsuspensionen wurden nach ihrer Markierung mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Kontrollen wurden immer parallel mitgeführt. Unmarkierte Zellen dienten zur Einstellung der Streulichtparameter und zur Kontrolle der Autofluoreszenz. Unbehandelte, vitale Zellen wurden stets als Kontrollgruppe parallel gemessen um das Ausmaß der Apoptose und Nekrose in den Versuchsgruppen beurteilen zu können.

Die Daten der gemessenen Zellen wurden mit dem Programm *Cell Quest* (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen und bearbeitet. Durch Verwendung unterschiedlicher graphischer Darstellungen konnten die gemessenen Parameter anschaulich dargestellt und ausgewertet werden.

3.5 Magnetresonanzspektroskopie MRS

Die MRS ist eine molekulare Analysemethode, die nach den gleichen physikalischen Prinzipien arbeitet wie das im klinischen Bereich schon seit längerem eingesetzte Verfahren der MR Bildgebung (MRI, magnetic resonance imaging). Bei beiden Verfahren wird das lebende Gewebe (einer Probe oder eines Patienten) in ein starkes Magnetfeld gebracht und dabei „magnetisiert“. Diese Gewebemagnetisierung kann –ähnlich wie ein Stabmagnet– durch ein zusätzliches magnetisches Wechselfeld zu Schwingungen angeregt werden. Diese sind bei einer bestimmten Frequenz, die charakteristisch für eine bestimmte Atomsorte ist besonders stark, man spricht von Magnetresonanz. Schaltet man danach das anregende Feld ab, schwingt die Magnetisierung noch eine Zeit lang weiter. Dabei gibt die schwingende Magnetisierung des Gewebes eine (elektro)magnetische Strahlung ab, die Informationen über die im Gewebe befindlichen und zur Resonanz gebrachten Moleküle enthält. Bei der MRI emittieren die im Gewebe verschieden stark gebundenen d.h. unterschiedlich mobilen Wassermoleküle unterschiedliche Strahlung, die in eine räumliche Intensitätsverteilung transformiert wird und auf diese Weise die Morphologie einer Körperregion in Form eines Schnittbildes darstellen kann. Im Gegensatz dazu können mit der MRS alle biologisch

wichtigen Moleküle und ihrer Komponenten, bestehend aus den Elementen H, C, O, P, N u.a. analysiert werden. Besonders effektiv ist die Analyse der H-Verbindungen, weil die Empfindlichkeit der Methode für Wasserstoff (H) besonders hoch ist. Das Ergebnis einer solchen H-MRS-Analyse ist ein H-MR-Spektrum. Dieses besteht aus einer Reihe von sog. Resonanzlinien, d.h. Strahlung verschiedener Frequenzen, die von den verschiedenen gebundenen H-Atomen ausgesendet werden. Für unsere Fragestellung interessieren die in den verschiedenen Metaboliten des intrazellulären Energiestoffwechsels und insbesondere die in den einzelnen Komponenten der Lipide der Zellmembran gebundenen H-Atome. Auf diese Weise erhält man u. a. Informationen über Laktat (La), Kreatin (Kr), Kreatinphosphat (KrP) und die Komponenten der Zellmembranlipide: gesättigte $-(CH_2)$ -Methylenketten, mit ungesättigten $-CH$ -Gruppen, CH_3 -Methylendgruppen und Cholin-Kopfgruppen. Dabei sind nicht nur Angaben über die Konzentration der Komponenten möglich, sondern auch solche über die geometrische Struktur der Moleküle und ihre molekulare Mobilität. Dementsprechend ist es z.B. möglich in einer Zellsuspension den gesättigten und ungesättigten Anteil sowie die mittlere Länge der Lipidketten oder ihre Beweglichkeit innerhalb der Lipidmatrix, d.h. die „Fluidität“ der Lipide in der Zellmembran zu bestimmen. Dabei zeigen Molekülkomponenten mit hoher Beweglichkeit sehr schmale Resonanzen mit hoher Amplitude und bei geringer Beweglichkeit breite Resonanzen geringer Amplitude, so dass sie als Linien nicht mehr identifizierbar sind. Insgesamt sind also mit diesem Verfahren mehrere wesentliche Parameter der Zellfunktion gleichzeitig zu gewinnen.

Zwar ist die Empfindlichkeit der H-MRS im Vergleich zu den klassischen Analyseverfahren (Histologie, Gelelektrophorese, Durchflusszytometrie, Fluoreszenzpolarisation, Gas-Chromatographie, Massen-Spektroskopie, Elektronenspinresonanz u.v.a.) um eine Größenordnung geringer, jedoch besitzt die MRS Eigenschaften die gerade für Gewebeanalysen einen enormen Vorteil darstellen. Ein wichtiger Punkt besteht in der Möglichkeit alle oben genannten metabolischen Parameter in einer Messung zu bestimmen, d.h. sowohl die Veränderungen der intrazellulären Energetik als auch die der Zellmembranen simultan zu analysieren. Der wichtigste methodische Vorteil der MRS besteht aber darin, dass die o.a. biochemische Gewebeanalysen nicht-invasiv d.h. berührungsfrei durchführbar sind. Das bedeutet, dass intakte Gewebeproben ohne vorherige aufwendige Präparation zerstörungsfrei und ohne Beeinflussung direkt zu untersuchen sind, so dass lebendes Gewebe und vitale Zellen analysiert werden können ohne die dabei ablaufenden

biochemische Prozesse oder die molekularen Strukturen zu beeinflussen. D.h. die Zellfunktion kann völlig unverfälscht beobachtet werden. Dies hat auch zur Folge, dass eine Vielzahl von aufeinanderfolgenden Messungen an ein und derselben Gewebeprobe möglich sind, so dass schnell ablaufende Prozesse der molekularen Dynamik im Verlauf der Zellfunktion nahezu kontinuierlich (und nicht als einzelne Momentaufnahme) wie in einem Videofilm im Sinne eines „online Monitoring“ erfasst werden können. Ferner hat man die Möglichkeit lange bevor morphologische Veränderungen im Gewebe erkennbar werden die zugrundeliegenden molekularen Prozesse frühzeitig zu registrieren. Diese Eigenschaften sind möglicherweise bei einem zukünftigen klinischen Einsatz dieses Verfahrens am Patienten von großer Bedeutung, weil dann in vivo eine belastungsfreie biochemische Analyse der beschriebenen Art im Gewebe von Patienten durchgeführt werden kann. Insbesondere in der Onkologie sind damit neue Möglichkeiten der Prognose, der Diagnose und des Therapiemonitorings bei Tumorerkrankungen zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Wege zur Differenzierung unterschiedlicher Zellzustände wie Vitalität, Apoptose und Nekrose, die bei der Kanzerogenese und Therapiewirkung eine wesentliche Rolle spielen, erarbeitet werden. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Zellzustände flusszytometrischen und simultan spektroskopischen Analysen unterzogen um charakteristische Resonanzmuster zu erkennen. Die einzelnen Zelllinien wurden nach entsprechender Apoptose- und Nekroseinduktion durchflusszytometrisch identifiziert und dann spektroskopisch analysiert. Hierfür stand ein 11,5 Tesla AMX-500 BRUKER-System (Rheinstetten) zur Verfügung. Die Aquisitiontime betrug 2.2 sec, die Dwelltime 67 μ s, die Aufnahmedauer 35,2 sec. Es wurden 90° Pulse mit 13 μ s Dauer sowie D2--Stabilisation und Wasserunterdrückung verwendet. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte mit dem externen Standard Trimethylsilylpropionat (TSP, Sigma, München). Für die Untersuchung wurden circa 10×10^6 Zellen geerntet und 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Volumen von ca. 200 μ l in speziellen Spektroskopieröhrchen (5mm, Norell, Dietzenbach) eingesetzt. Von diesen Zellsuspensionen (bzw. von Gewebeproben) wurden MR-Spektren gewonnen, und zwar wurden jeweils an ein und derselben Suspension in Zeitabständen von weniger als 1 min über einen Zeitraum von bis zu 3 h Sequenzen von Spektren aufgezeichnet.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zellkultursysteme zu etablieren, die sich zur Differenzierung von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellzuständen eignen. Diese drei Zustände sollten nach standardisierten durchflusszytometrischen Messverfahren einfach nachweisbar und voneinander unterscheidbar sein, um anschließenden spektroskopischen Messungen als Vergleichsparameter zu dienen.

Um ein geeignetes Zellmodell zu finden, mit dem diese Zellzustände schnell, effizient und reproduzierbar gemessen werden können, mussten zunächst verschiedene, aus der Literatur bekannte Apoptoseinduktionsmethoden und Nachweisverfahren ausgetestet werden. Die Methode, mit der am besten eine durchflusszytometrische Aussage darüber gemacht werden konnte, ob und zu welchem Prozentsatz Apoptose und Nekrose indizierbar sind, wurde schließlich für die nachfolgenden spektroskopischen Versuche übernommen. Mit der Spektroskopie sollten ebenfalls Charakteristika der drei Zellzustände herausgearbeitet werden, um ihre Differenzierung zu ermöglichen.

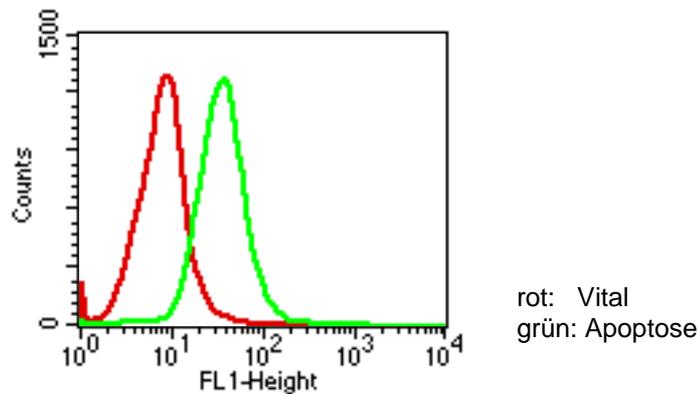
4.1 Allgemeine Beschreibung der fluorimetrischen Nachweisverfahren der Apoptose und Nekrose

Zur Fluoreszenzmarkierung für die durchflusszytometrischen Messungen stehen die drei unter 3.4.3 beschriebenen Vorgehensweisen zur Verfügung, der TUNEL-Assay, der ANNEXIN-V-Fluos-Test und die Markierung in hypotonem fluorochromen Puffer. Da alle drei Markierungsverfahren unterschiedliche Vorgänge an apoptotischen Zellen beurteilen, müssen bei der Analyse verschiedene Darstellungsformen gewählt werden. Um die Auswertung der nachfolgend beschriebenen Apoptose- und Nekroseinduktionsversuche besser verstehen zu können, werden zunächst die unterschiedlichen Darstellungsweisen vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellzustände durch die drei Markierungsverfahren näher erläutert.

4.1.1 Bestimmung der DNA-Degradation mittels enzymatischer Markierungsmethode (TUNEL-Assay)

Die Markierung der 3'-OH Enden der während des apoptotischen Abbaus entstandenen DNA-Fragmente mit einem fluoreszierenden Farbstoff lässt sich durchflusszytometrisch wie folgt darstellen. In Abbildung 1 ist die Intensität des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes (FL1-Height) gegen die Anzahl der gemessenen Zellen (Counts) aufgetragen. Diese

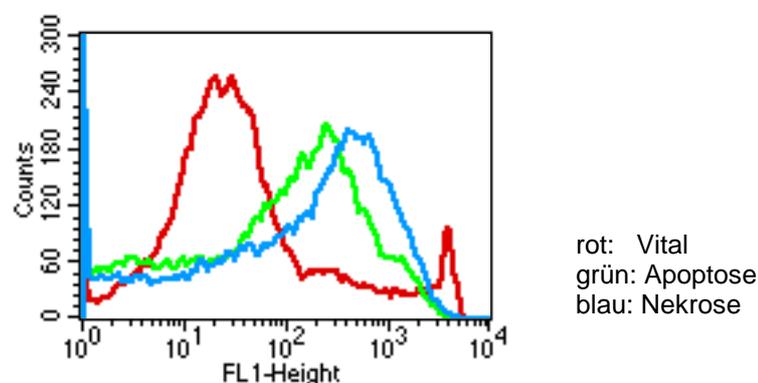
Darstellungsform ergibt für vitale Zellen eine Kurve, die für FL1 negativ ist. Apoptotische Zellen zeigen typischerweise einen positiven, nach rechts verschobenen Peak für diesen Farbstoff.



**Abbildung 1: Histogrammdarstellung apoptotischer Zellen (BL 41-Zellen, Apoptoseinduktion durch Serumreduktion) nach Markierung mit TUNEL-Assay; FL1-Height: Fluoreszein- Intensität
rot: Kontrollpopulation, vitale Zellen; grün: Zellen mit beginnender Apoptose;**
(Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.1.2 Untersuchung von Membranveränderungen durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Membrankomponenten (ANNEXIN-V-Fluos)

Die Fluoreszenzmarkierung des während der Apoptose auf die Außenseite der Membran verlagerten Lipides Phosphatidylserin mittels ANNEXIN lässt sich an Hand eines einfachen Diagrammes darstellen.



**Abbildung 2: Histogrammdarstellung apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Annexin-V-Fluos-Färbung (Jurkat-Zellen, hyperthermisch behandelt); FL1-Height: Fluoreszein- Intensität,
rot: Kontrollpopulation, vitale Zellen; grün: apoptotische Zellen; blau: nekrotische Zellen**
(Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Wie in Abbildung 2 gezeigt, ergibt sich mit diesem Markierungsverfahren bei der Anordnung des Farbstoffes (FL1-Height) gegen die Zellzahl (Counts) eine Rechtsverschiebung der Kurve bei apoptotischen Zellen (FL1 positiv) im Vergleich zur Kontrollpopulation (FL1 negativ). Allerdings äußert sich die Darstellung nekrotischer Zellen mit diesem Markierungsverfahren ebenfalls in einer nach rechts verschobenen, Annexin positiven Kurve.

Um Annexin-positive, apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen, die nach Auflösung ihrer Membran auch anfärbbar werden, differenzieren zu können, muss eine zusätzliche zweite Färbung durchgeführt werden. Man verwendet hierfür DNA-Farbstoffe, wie beispielsweise Propidiumiodid (PI), die nur permeabilisierte Membranen durchdringen können. Bei Auftragung des Annexins (FL1-Height) gegen PI (FL2-Height) lassen sich die Vitalzustände wie folgt voneinander unterscheiden:

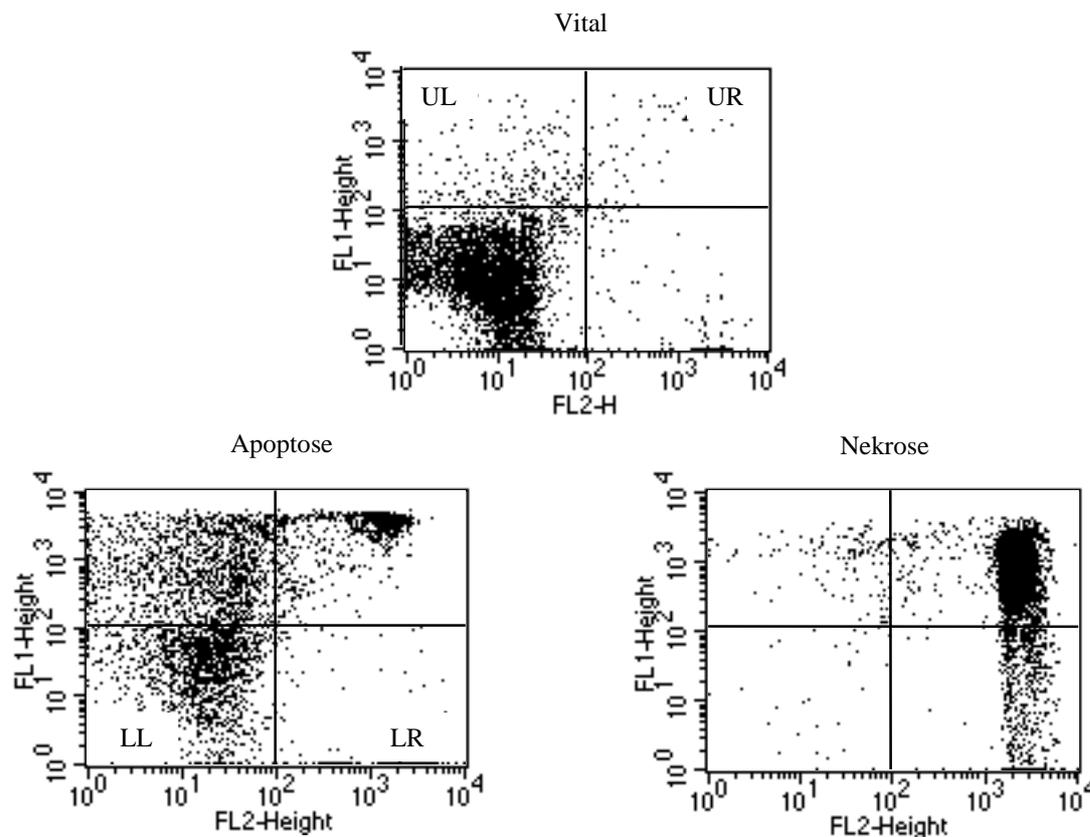


Abbildung 3: Dot-Plot-Darstellung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Annexin (FL1) und PI (FL2) Doppelfärbung (Jurkat-Zellen, MTX-behandelt)

(Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Vitale Zellen mit intakter Membran sind nicht gefärbt, sie befinden sich im negativen Bereich beider Parameter, in diesem Fall im linken unteren Quadranten (lower left LL). Nekrotische Zellen dagegen sind durch den Verlust ihrer Membranintegrität stark positiv für Annexin und PI, sie befinden sich im rechten oberen Quadranten (upper right UR). Apoptotische Zellen sind einerseits durch die Phosphatidylserin-Expression stark FL1 positiv, andererseits durch ihre intakte Membran PI negativ gefärbt. Sie befinden sich im Idealfall im linken oberen Quadranten (upper left UL). Hier wird schon deutlich, dass sich die Zellen einer Population nicht alle gleichzeitig in Apoptose treiben lassen. Bei den Messungen, die Momentaufnahmen entsprechen, befindet sich lediglich ein Prozentsatz von circa 20 - 40 % in dem Zustand der Apoptose. Das mag daran liegen, dass die Auslösung des Apoptosevorgangs nicht nur von äußerer Stimulation, sondern auch von der „Bereitschaft“ der Zellen abhängt, die beispielsweise durch die Zellzyklusphase, das Vorhandensein kostimulatorischer Signale etc. bestimmt wird.

Bei einigen Darstellungen konnte die Quadranteneinteilung nicht eingehalten werden, da sich die zu messenden Parameter nicht immer wie gewünscht einstellen ließen. Der Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde in diesen Fällen durch Markierung der entsprechenden Populationen ermittelt (siehe z.B. Abbildung 21).

4.1.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes durch Anfärbung mit DNA-bindenden fluorochromen Farbstoffen (Hypotone fluorochrome Lösung)

Vitale, apoptotische und nekrotische Zellen weisen starke Unterschiede im DNA-Gehalt auf. Bei der Darstellung des markierten DNA-Anteils durch den im Puffer enthaltenen Farbstoff Propidiumiodid (PI) gegen die Zellzahl (Counts) zeigen sich die in Abbildung 4 dargestellten charakteristischen Unterschiede.

Unbehandelte, vitale Zellen (M1) mit intakter DNA weisen nach Inkubation in hypotonem fluorochromem Puffer einen diploiden Peak auf, der ihren diploiden Chromosomensätzen entspricht. Die zweigeteilte Spitze zeigt Zellpopulationen in den Zellzyklusphasen G1 und G2 auf. Apoptotische Zellen (M2) zeigen aufgrund der beginnenden DNA-Fragmentierung und daraus folgender Abnahme des DNA-Gehaltes zusätzlich einen hypoploiden, nach links verschobenen negativen Peak. Je nach Fragmentierungsgrad können auch mehrere hypoploide Peaks entstehen. Bei nekrotischen Zellen fehlen diese Peaks aufgrund der DNA-Degradation.

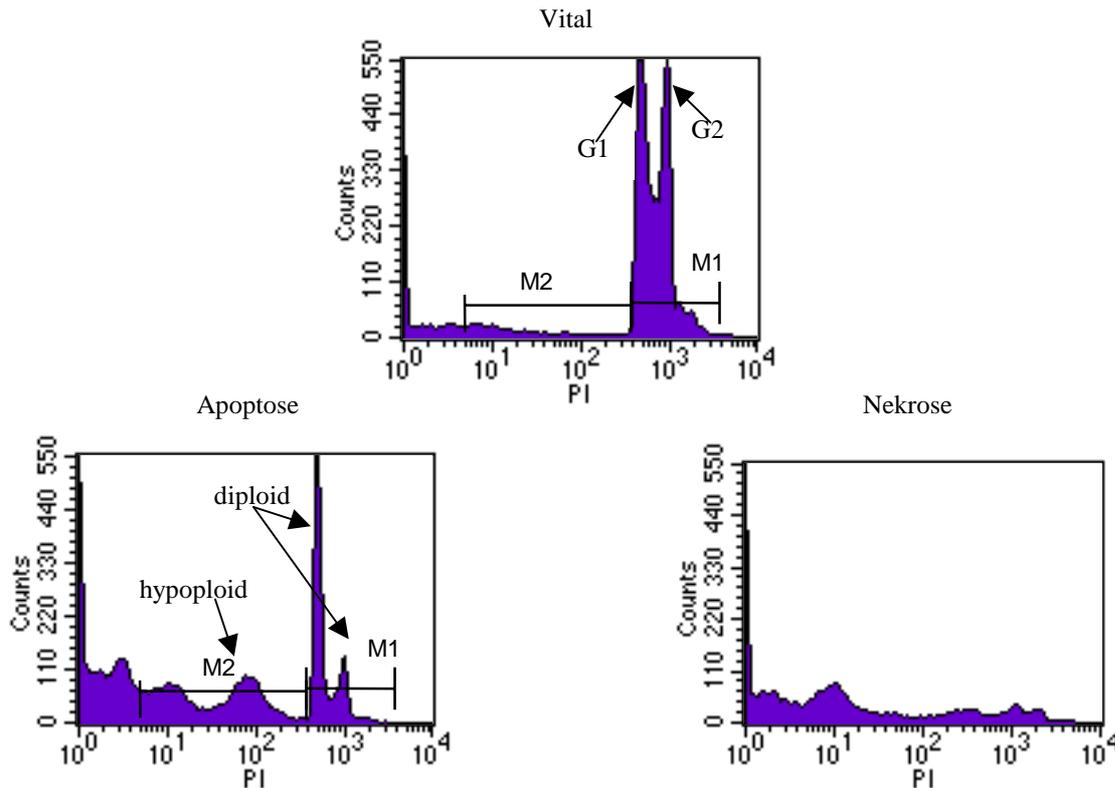


Abbildung 4: Histogrammdarstellung der drei Zellzustände Vital, Apoptose und Nekrose durch Inkubation in hypotonem fluorochromen Puffer (enthält PI); (Jurkat-Zellen, Hyperthermie-behandelt)
M1 Anteil vitaler Zellen mit diploidem Chromosomensatz, G1/G2 Zellzyklusphasen; M2 Anteil apoptotischer Zellen mit hypoploidem Chromosomensatz

(Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.1.4 Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie

Vitale, apoptotische und nekrotische Zellzustände unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Zellgröße und Granularität. Durch Auftragung der Zellgröße (FSC-Height) gegen die Granularität (SSC-Height) können diese Zellzustände differenziert dargestellt werden.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, nimmt die Zellgröße apoptotischer Zellen (R2) bei gleichbleibendem Granularitätsgrad definitionsgemäß, im Vergleich zu vitalen Zellen (R1), stark ab. Dagegen sind nekrotische Populationen (R3) durch eine starke Zunahme der Granularität mit geringerer Größenveränderung charakterisiert.

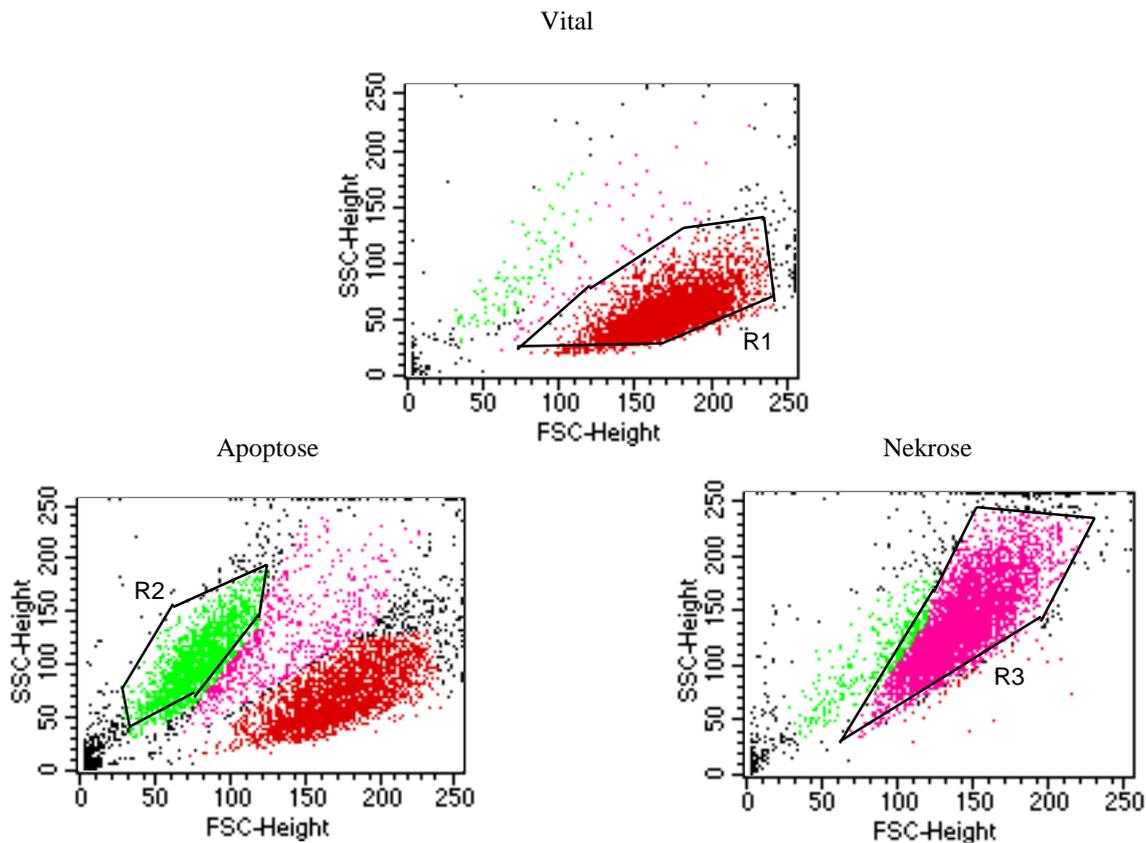


Abbildung 5: Dot-plot-Darstellung der morphologischen Unterschiede vitaler (R1), apoptotischer (R2) und nekrotischer (R3) Zellen mittels Durchflußzytometrie; (Jurkat-Zellen, Hyperthermie-behandelt)
FSC Zellgröße; SSC Granularität

(Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.1.5 Mikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen

Die einfachste Art, vitale von toten Zellen zu unterscheiden ist die lichtmikroskopische Betrachtung nach Anfärbung mit Vitalfarbstoffen wie Trypanblau. Vitale Zellen, die rund und stark lichtbrechend sind, lassen sich gut von toten Zellen, die unregelmäßig geformt und Licht-durchlässiger sind unterscheiden. So lässt sich die Proliferation der Zelllinien gut beurteilen, um beispielsweise den Zeitpunkt des Splittens oder aber der Apoptose- bzw. Nekroseinduktion festlegen zu können.

Der lichtmikroskopische Nachweis von apoptotischen Zellen dagegen lässt sich nicht so einfach erbringen, da sich die morphologischen Veränderungen vorwiegend im Zellinneren oder an der Zellmembran abspielen. Hierfür ist der fluoreszenzmikroskopische Nachweis besser geeignet. Durch das Anfärben der Zellen mit Acridin-orange, ein Farbstoff, der in die DNA eingebaut wird, ließen sich einzelne Apoptosephasen wie Kondensation der

Chromatistruktur, Fragmentation des Zellkerns oder Abschnürung von Vesikeln der Membran, wie in der folgenden Abbildung sichtbar ist, voneinander unterscheiden.

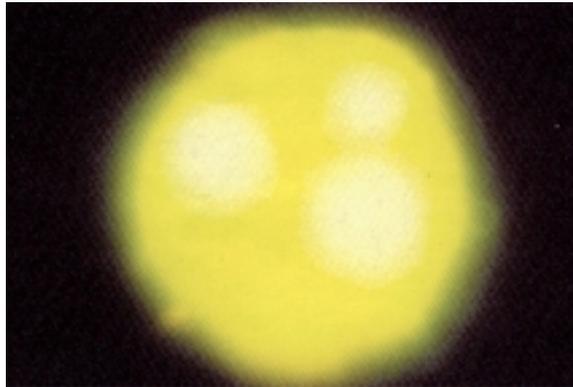


Abbildung 6:

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer apoptotischen Zelle nach Acridin-orange-Färbung

Die Fluoreszenzmikroskopie ist auch für die Quantifizierung der induzierten Apoptoserate geeignet. Die Fluoreszenz-markierten Zellen lassen sich auszählen und aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften einteilen. Allerdings ist diese Methode extrem zeitaufwendig und aufgrund der Subjektivität fehlerbelastet. Zur einfacheren Quantifizierung der Apoptose wurden deshalb im folgenden durchflusszytometrische Verfahren gewählt.

4.2 Etablierung von *in vitro*-Modellen für Apoptose und Nekrose bei Lymphomzelllinien

Um die Apoptose- bzw. Nekrosevorgänge spektroskopisch untersuchen zu können, ist es notwendig, ein geeignetes Zellsystem zu finden, in dem *in vitro* Apoptose und Nekrose induziert und mit geeigneten Methoden dargestellt werden können. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Apoptose- und Nekrosemodelle *in vitro* etabliert, und apoptotische bzw. nekrotische Vorgänge mit durchflusszytometrischen Messverfahren analysiert und quantifiziert. Zu Beginn der Studien wurden Lymphomzelllinien für die Experimente herangezogen, da diese etablierte Referenzlinien für Apoptoseversuche darstellen. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit ausgetesteten zellulären Apoptose- und Nekrosemodelle mit den angewandten Messverfahren, deren Ergebnisse nachfolgend erläutert werden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Zelllinien:	Apoptose / Nekroseinduktion:	Analyseverfahren:
BL 41 ❶	SR	TA, AX, HP
Jurkat ❷	MTX, Fas, HYT	TA, AX, HP, DNA, MRS
FaDu ❸	Fas, HYT	AX, HP, MRS
PCI-1 ❸	Fas, HYT	AX, HP, MRS
GHD ❸	Fas, HYT	AX, HP, MRS
Hlac78 ❸	Fas, HYT	AX, HP, MRS
HMEC ❹	Fas, HYT	AX, HP, MRS

Tabelle 1: Apoptose- und Nekrosemodelle *in vitro*

Zelllinien: ❶ B-Zell-Lymphom, ❷ T-Zell-Lymphom, ❸ HNO-Zelllinien, ❹ Endothelzelllinie

Apoptose/

Nekroseinduktion: SR Serumreduktion, MTX Methotrexat, Fas Fas-Antikörper, HYT Hyperthermie

Analyseverfahren: TA TUNEL-Assay, AX Annexin-Test, HP hypotoner Puffer, DNA DNA-Gelelektrophorese, MRS Magnetresonanzspektroskopie

4.2.1 Apoptoseinduktion durch Serumreduktion in BL 41- Lymphomzellkulturen

Apoptose kann im allgemeinen induziert werden durch Entzug essentieller Nahrungsbestandteile. Bei humanen Zelllinien genügt für die Induktion von Apoptose oft bereits eine Reduktion des Anteils an fetalem Kälberserum, einem wichtigen Bestandteil des Zellkultivierungsmediums. Diese Methode wurde an der Zelllinie BL 41 (menschliche B-

Zell-Lymphomzellen) getestet, die mit Medium kultiviert wurden, dessen Serumgehalt von üblicherweise 10 % auf 1 % Volumenanteile reduziert wurde. Vor Induktion der Apoptose wurden die Zellen mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen um Reste von serumhaltigem Kulturmedium zu entfernen. Es wurden Kinetik-Versuche mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten in reduziertem Kulturmedium durchgeführt, wobei die Inkubationszeit in dem weiter unten dargestellten Versuch 1 h betrug. Anschließend wurden die Zellen nach dem Prinzip des TUNEL-Assays markiert und analysiert (Abbildung 7). Die rote Kurve stellt unbehandelte vitale Zellen, die grüne Kurve Zellen nach der Apoptoseinduktion dar. Die unbehandelten Zellen sind zu ca. 97 % vital, während hingegen der Anteil vitaler Zellen nach Serumreduktion ca. 68 % beträgt. Apoptotische Populationen sind bei beiden Kurven durch die Bezeichnung M2 markiert und lassen sich im Idealfall als zweiter Gipfel der Kurve darstellen.

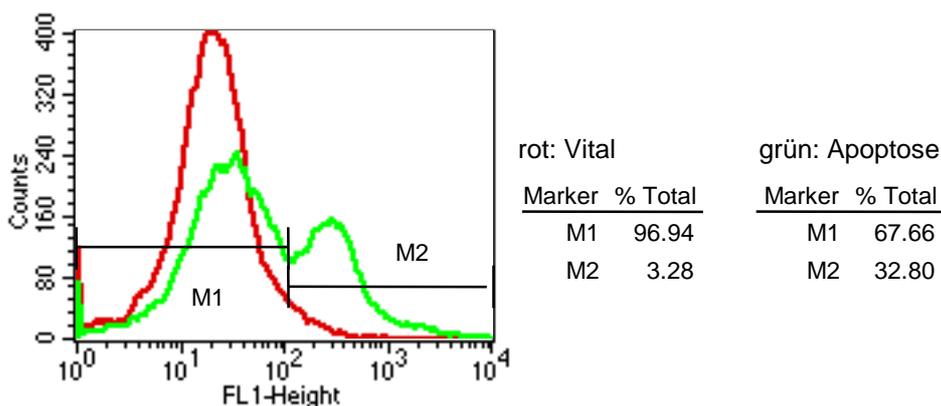


Abbildung 7: Apoptoseinduktion bei BL 41 - Lymphomzellen, gemessen mittels TUNEL-Assay

rot: Kontrollprobe, vitale Zellen

grün: 1 h Apoptoseinduktion durch Serumreduktion (1 % FCS)

M1 Anteil der vitalen Zellen, M2 Anteil der apoptotischen Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Nach einstündiger Serumreduktion beträgt die absolute Apoptoserate bei BL 41 Zellen ca. 33 % (grüne Kurve, M2). Da die Ausgangspopulation bereits einen bestimmten Anteil an apoptotischen Zellen aufweist (ca. 3 %), beträgt der Anteil durch Serumreduktion induzierten Apoptose ca. 30 %. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die im weiteren Verlauf genannten Prozentsätze für apoptotische oder nekrotische Zellen korrigierte Werte darstellen, d.h. der gemessene absolute Wert wird um den entsprechenden Anteil in der Ausgangspopulation korrigiert. Um den Zeitpunkt maximaler Apoptose feststellen zu

können, wurden in den folgenden Versuchen alle Parameter in Form von Kinetiken ausgetestet.

Mit dem TUNEL-Verfahren lassen sich auch Zellen detektieren, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden. Auch sie weisen DNA-Fragmente auf, die durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden können, was zu falsch-positiven Werten bei der Apoptosemessung führen kann. Deshalb mussten weitere, Apoptose-induzierende Methoden ausgetestet werden. Da sich das TUNEL-Markierungsverfahren u.a. auch als zu zeitaufwendig in der Durchführung herausstellte, und um die Messgenauigkeit verschiedener Messverfahren zu vergleichen, wurden einfachere Verfahren zur Apoptosemessung etabliert, wie beispielsweise das ANNEXIN-V-Fluos Verfahren. Der Anteil Annexin-positiver Zellen entspricht bei dieser Methode allerdings nicht genau dem Anteil apoptotischer Zellen, da auch nekrotische Zellen anfärbbar sind. Aber obwohl bei diesem Verfahren eine Doppelfärbung zur genaueren Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen durchgeführt werden muss, schien diese Methode aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit und besseren Differenzierung für die Kinetikversuche vorteilhafter. Zunächst wurde allerdings auf die Doppelfärbung verzichtet, da bei der Apoptoseinduktion durch Serumreduktion bei BL 41 Zellen in der Regel dem TUNEL-Verfahren vergleichbare Apoptoseraten ermittelt werden konnten. Die Werte betragen bei dem exemplarisch unter Abbildung 8 gezeigten Versuch ca. 7 % bzw. ca. 14 % Annexin-positive Zellen nach 1- bzw. 2-stündiger Apoptoseinduktion.

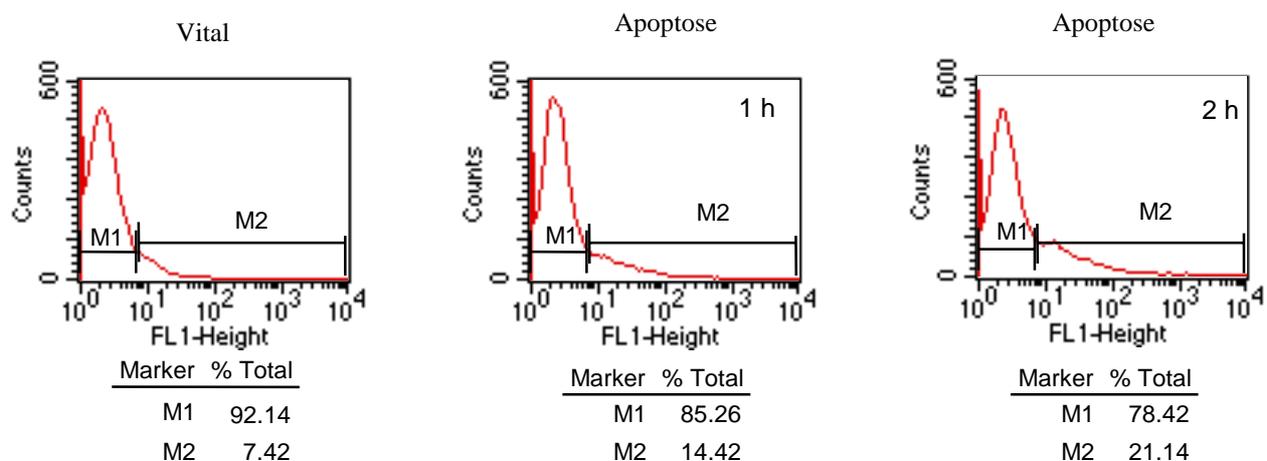


Abbildung 8: Apoptoseraten 1 bzw. 2 h nach Serumreduktion (1 % FCS) bei BL 41, gemessen nach Markierung mit ANNEXIN-V-Fluos (FL-1)

M1 Annexin-negativ, M2 Annexin-positiv

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Auch unter Anwendung eines dritten Apoptosenachweisverfahrens, der Inkubation der Zellproben nach Apoptoseinduktion in hypotonem fluorochromen Puffer, wurde 1 h nach Reduktion des Serumgehaltes eine Apoptoserate von ca. 14 % ermittelt, was mit den Ergebnissen des Annexinversuchs nach 2 h Inkubationszeit übereinstimmt (Abbildung 9). Bei diesem Apoptosenachweisverfahren werden vitale Zellen durch einen zweigipfligen Peak (M1), das für den intakten diploiden Chromosomensatz spricht, dargestellt. Der apoptotische Zerfall der DNA in Fragmente führt zu einem zusätzlichen hypoploiden Gipfel, hier gekennzeichnet durch die Markierung M2.

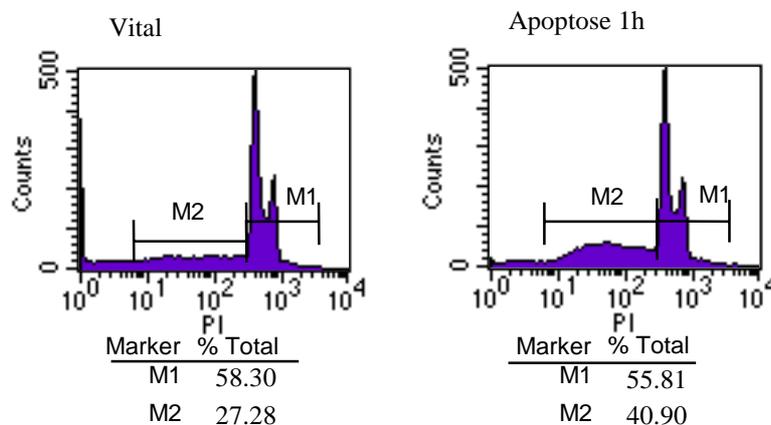


Abbildung 9: Apoptoseraten bei BL 41 unter Serumreduktion (1 % FCS) nach 1 h, gemessen nach Inkubation mit hypotonem fluorochromem Puffer

M1 Anteil der vital Zellen, M2 Anteil der apoptotischen Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Die Analyse von BL 41 Zellen mittels Annexin und nach Inkubation in hypotonem Puffer zeigen übereinstimmend niedrige Apoptoseraten von ca. 14 - 20 %, auch nach längeren Inkubationszeiten. Als Grund für die geringen Prozentsätze kann angenommen werden, dass BL 41 Zellen auch mit geringen Serumkonzentrationen offensichtlich unvermindertes Wachstum zeigen. Die mit Hilfe des TUNEL-Assays gemessenen Apoptoseraten von ca. 30 % schienen aufgrund der mangelnden Spezifität fälschlicherweise zu hoch. Da die für die geplanten MRS-Untersuchungen erforderlichen Apoptoseraten von circa 40 % mit dem BL 41-Apoptosemodell nicht erzielt werden konnten, mussten eine Reihe weiterer Zellsysteme ausgetestet werden.

4.2.2 Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Methotrexat (MTX) in Jurkat-Lymphomzellkulturen

Die meisten biologischen Zellsysteme reagieren nach Behandlung mit zytostatischen Substanzen wie Methotrexat, das in den Zellstoffwechsel eingreift, mit der Einstellung der Proliferation und der Einleitung von apoptotischen Prozessen. In den nachfolgenden Experimenten wurden Jurkat-Zellen (T-Zell-Lymphom) für die Apoptosemessungen verwendet. Zwei Stunden vor der Apoptoseinduktion wurden diese in frisches, kaltes Kulturmedium umgesetzt, um den Zellzyklus der Population zu synchronisieren und dadurch höhere Apoptoseraten zu erzielen. Die Zellen wurden bis zu 24 h mit MTX (200 μ l einer 10 mM Stammlösung auf 10^6 Zellen) versetzt und anschließend mit Annexin markiert und analysiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Kinetikversuchs. Vitale, d.h. unbehandelte Zellen wurden jeweils zu Beginn und nach 24 h gemessen. Da der Anteil vitaler Zellen in dieser Kontrollpopulation jeweils > 90 % betrug, wird der Vitalitätszustand nur zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Die Einteilung nach Annexin-negativen (M1) und Annexin-positiven Zellen (M2) wurde anhand der Verteilung der Kontrollprobe gewählt und für die mit MTX behandelten Proben beibehalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach kurzer Inkubationszeit, hier 4 h, ähnliche Apoptoseraten wie im BL 41-Modell erzielt wurden. Die Rate der Annexin positiven Jurkat-Zellen (M2) nach 4 h MTX-Behandlung beträgt nach Abzug des Anteils Annexin positiver Zellen in der Ausgangspopulation ca. 12 %. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt der Anteil vitaler Zellen (M1) in den MTX-behandelten Gruppen drastisch ab. Nach 24 h Inkubationszeit sind lediglich <60 % der Zellen vital und nicht mit Annexin-V-Fluos gefärbt. Der Anteil Annexin positiver Zellen steigt nach 24 stündiger Inkubation auf etwa 31 %.

Um den genauen Anteil an apoptotischen Zelle bestimmen zu können, wurde bei gleichem Versuchsaufbau eine Doppelfärbung mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Da apoptotische Zellen im Unterschied zu nekrotischen Zellen intakte Zellmembranen besitzen, nehmen sie PI nicht auf. Apoptotische Zellen befinden sich daher bei durchflusszytometrischen Darstellungen als sogenanntes Dot-Plot, also als Punktwolke, im linken oberen (UL, upper left), nekrotische dagegen im rechten oberen Quadranten (UR, upper right). Vitale, ungefärbte Zellen lassen sich im linken unteren Quadranten (LL, lower left) finden. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe dargestellt. Maximale Apoptoseraten von > 40 % wurden nach einer MTX-Inkubationsdauer von 48 h ermittelt.

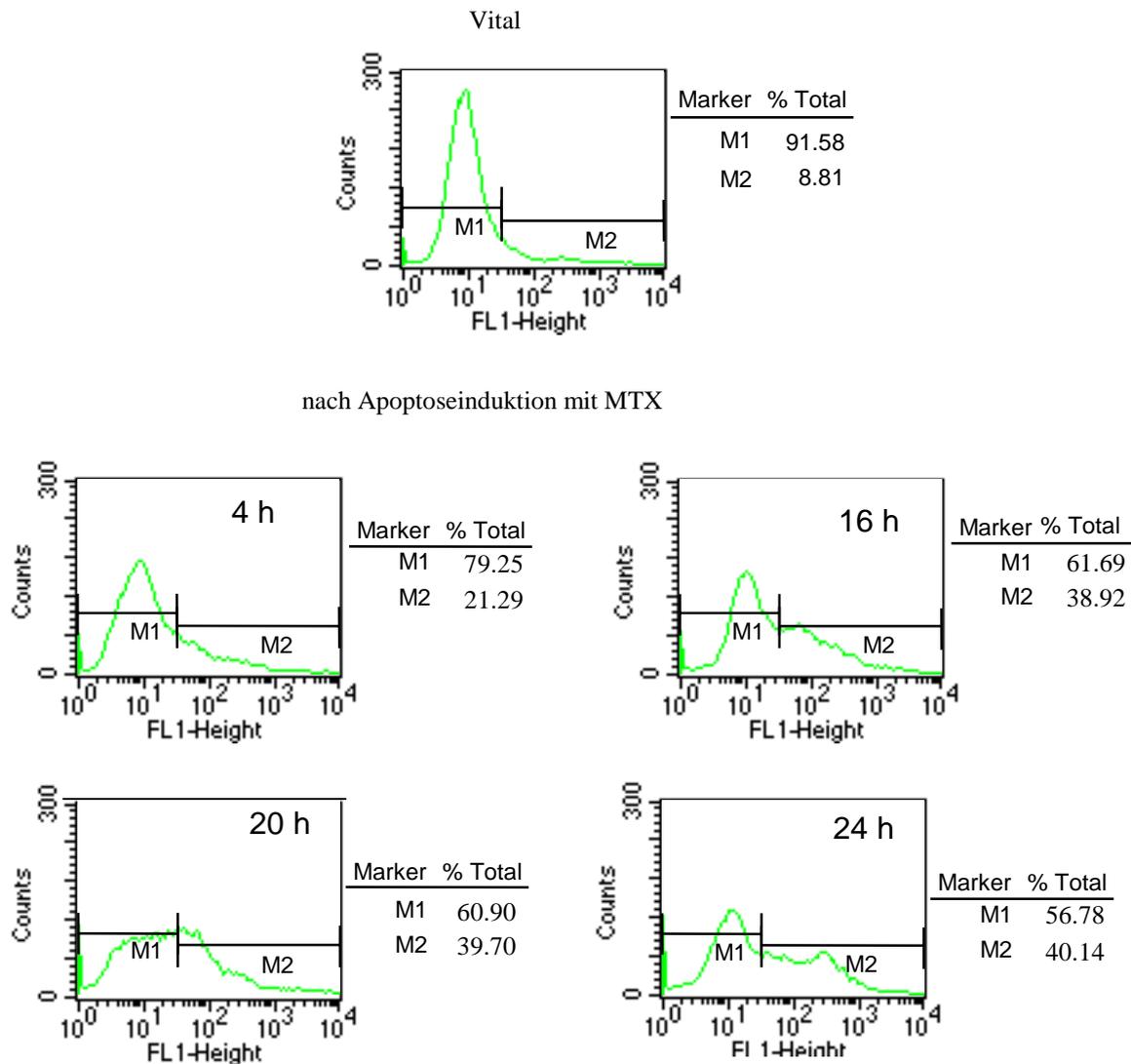


Abbildung 10: Kinetik der Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen durch MTX-Behandlung (4-24 h) nach Inkubation mit Annexin (FL-1)

M1 Annexin negativ, M2 Annexin positiv

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Die gleichen Proben wurden parallel dazu nach der Methode des hypotonen fluorochromen Puffers gemessen. Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass eine Inkubation von 48 h mit dem Zytostatikum MTX eine Apoptoserate von circa 30 % ergibt. Längere Inkubationszeiten von 60 h bzw. 72 h zeigen eine konstante Abnahme der Anzahl an vitalen und apoptotischen Zellen. Das bedeutet, dass alle vitalen Jurkat-Zellen nach entsprechend langer Inkubationszeit mit MTX in ihrer Proliferationsfähigkeit gestört und abgetötet werden. Nach dem Übergang zur apoptotischen Phase werden sie zu Zelldebris aufgelöst.

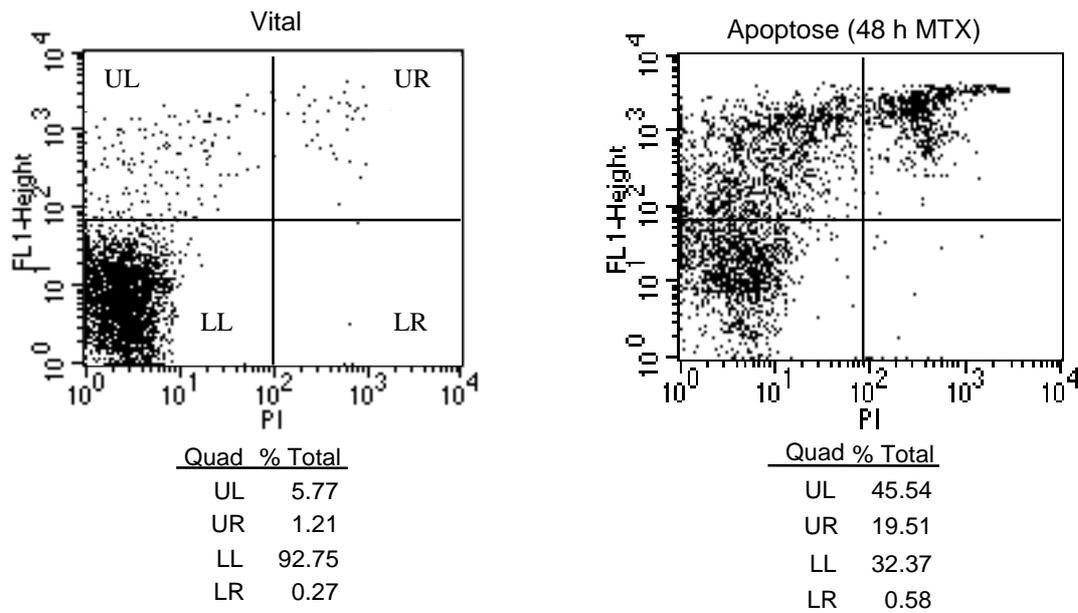


Abbildung 11: Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen durch MTX-Behandlung (48 h) nach Annexin (FL1) und Propidiumiodid (PI) – Doppelfärbung

UL apoptotische Zellen; UR nekrotische Zellen; LL vitale Zellen

(Dot-Plot-Darstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Die durch MTX-Behandlung erzielten Apoptoseraten betragen im Mittel etwa 35 % und ließen sich in diesem Induktionssystem auch nach Veränderung der MTX-Konzentration und der MTX-Inkubationszeit nicht weiter steigern.

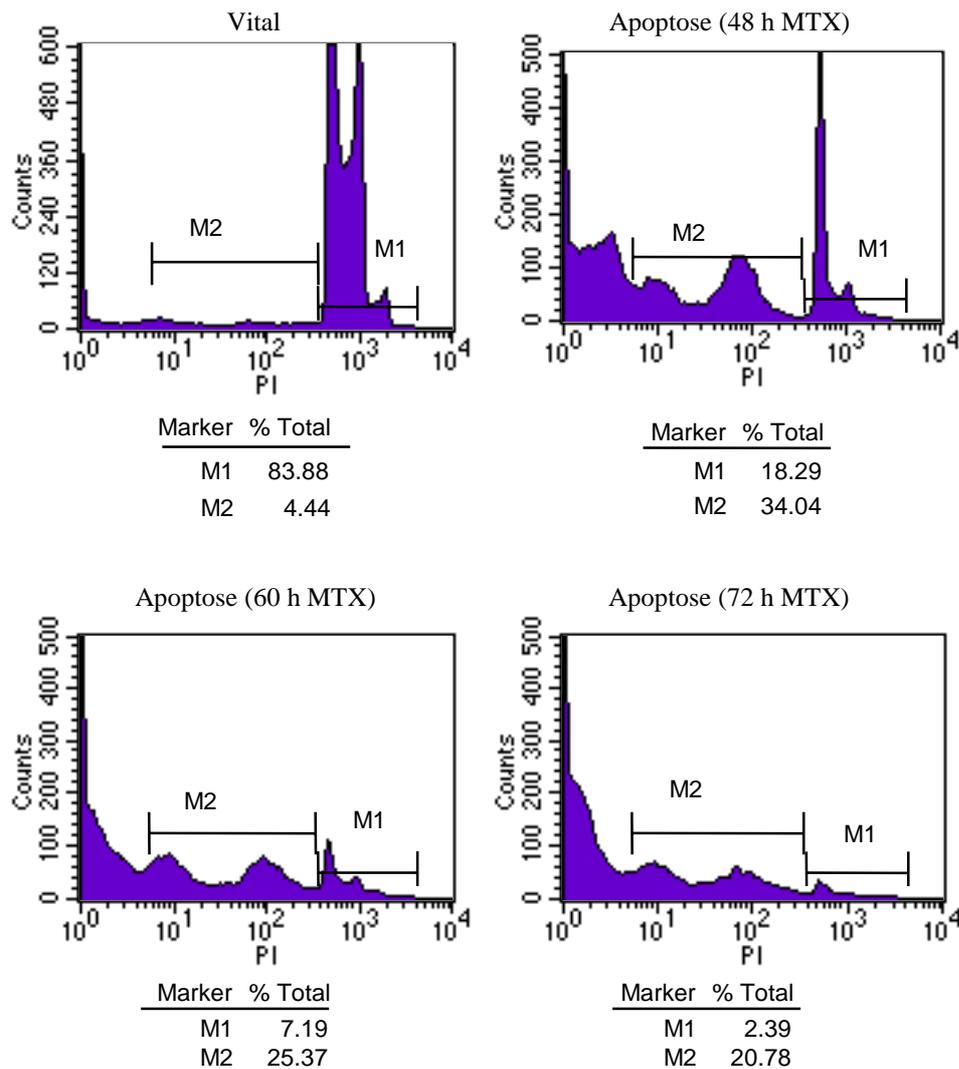


Abbildung 12: Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen durch MTX (0-72 h) nach Inkubation mit hypotonem fluorochromem Puffer, M1: vitale Zellen; M2: apoptotische Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.2.3 Apoptoseinduktion durch Aktivierung des Fas/Fas-Ligand-Apoptose-Wegs (CD 95 - System)

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Jurkat-Zelllinie empfindlich auf apoptotische Impulse reagiert. Mit dem Ziel noch höhere Apoptoseraten zu erreichen wurden im weiteren Verlauf andere Wege der Apoptoseinduktion ausgetestet. Wie aus der Literatur bekannt, exprimieren Jurkat-Zellen den Fas-Rezeptor (CD 95) auf ihrer Zelloberfläche und sollten somit in der Lage sein, auf Stimulation durch den Antikörper Fas-L mit Apoptoseeinleitung zu reagieren. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Jurkat-Zellen zunächst durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein des Fas-Rezeptors untersucht (hier nicht gezeigt) und die nötige Konzentration an CD 95 (Pharmingen, clone DX2) ausgetestet.

Zur Apoptoseinduktion wurden Jurkat-Zellen 30 min lang unterschiedlich hohen anti-CD 95-Antikörper-Konzentrationen (1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ausgesetzt und bis zu 6 h vor der durchflusszytometrischen Beurteilung im Brutschrank inkubiert. Sowohl mit Annexin (Abbildung 13) als auch mit hypotonem fluorochromen Puffer (hier nicht dargestellt) ließen sich im Vergleich zur Apoptoseinduktion mit MTX Zeichen der Apoptose aufzeigen. Mit beiden Apoptose-Induktionsansätzen (6h CD 95 / 48h MTX) konnten gleichwertige Apoptoseraten von ca. 17-21 % erzielt werden.

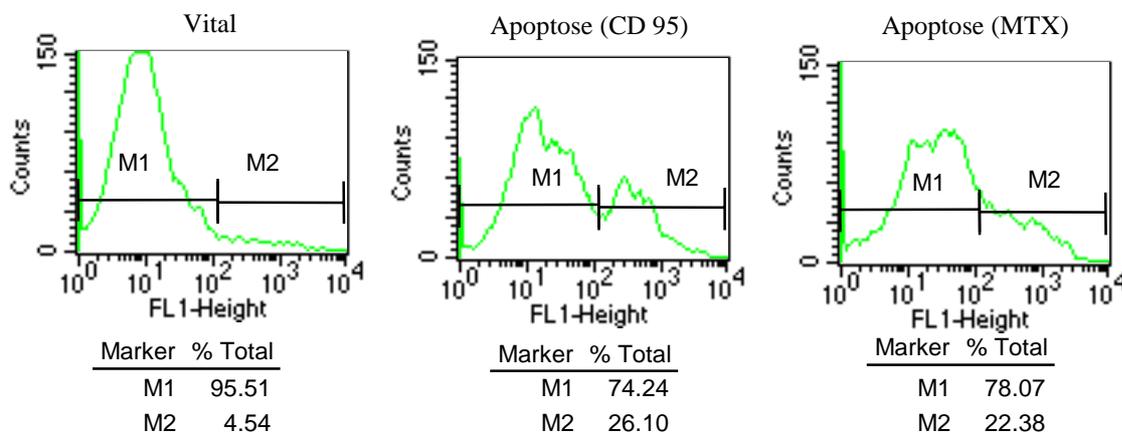


Abbildung 13: Apoptoseinduktion durch Aktivierung des Fas-Systems (Anti-CD 95, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für 6h) im Vergleich zur Apoptoseinduktion durch MTX (48 h) bei Jurkat-Zellen nach Markierung mit Annexin (FL1); M1: vitale Zellen; M2: Annexin-positive Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.2.4 Apoptoseinduktion durch Hyperthermiebehandlung

Ein weiterer Ansatz der Apoptoseinduktion beruht auf der Tatsache, dass Zellen durch eine Temperaturerhöhung reproduzierbar inaktiviert werden können. Konformationsänderungen von Proteinen können dabei den Apoptosevorgang auslösen. Um diesen Effekt zu erzielen müssen Temperaturen von mindestens 42-43 °C über länger als 30-45 Minuten einwirken. Diese hier angewandte Hyperthermie-Behandlung im Wasserbad sollte als Modell für die Laser-vermittelte hyperthermische Behandlung dienen.

Für den exemplarisch in der Abbildung 14 gezeigten Versuch wurden Jurkat-Zellen bei 43 °C bis zu 120 min erhitzt nachdem sie ca. 2 Stunden vorher in frisches, kaltes Kulturmedium umgesetzt wurden, um den Zellzyklus zu synchronisieren. Nach anschließender 4-40 stündiger Inkubationszeit im Brutschrank, wurden die Proben zur durchflusszytometrischen

Analyse mit Annexin oder hypotonem fluorochromen Puffer versetzt. Nach einer Hyperthermie-Behandlung *in vitro* von mindestens 90 min mit anschließender Inkubation im Brutschrank für mindestens 20 h konnten maximale Apoptoseraten (M2) von im Durchschnitt 29 % erzielt werden.

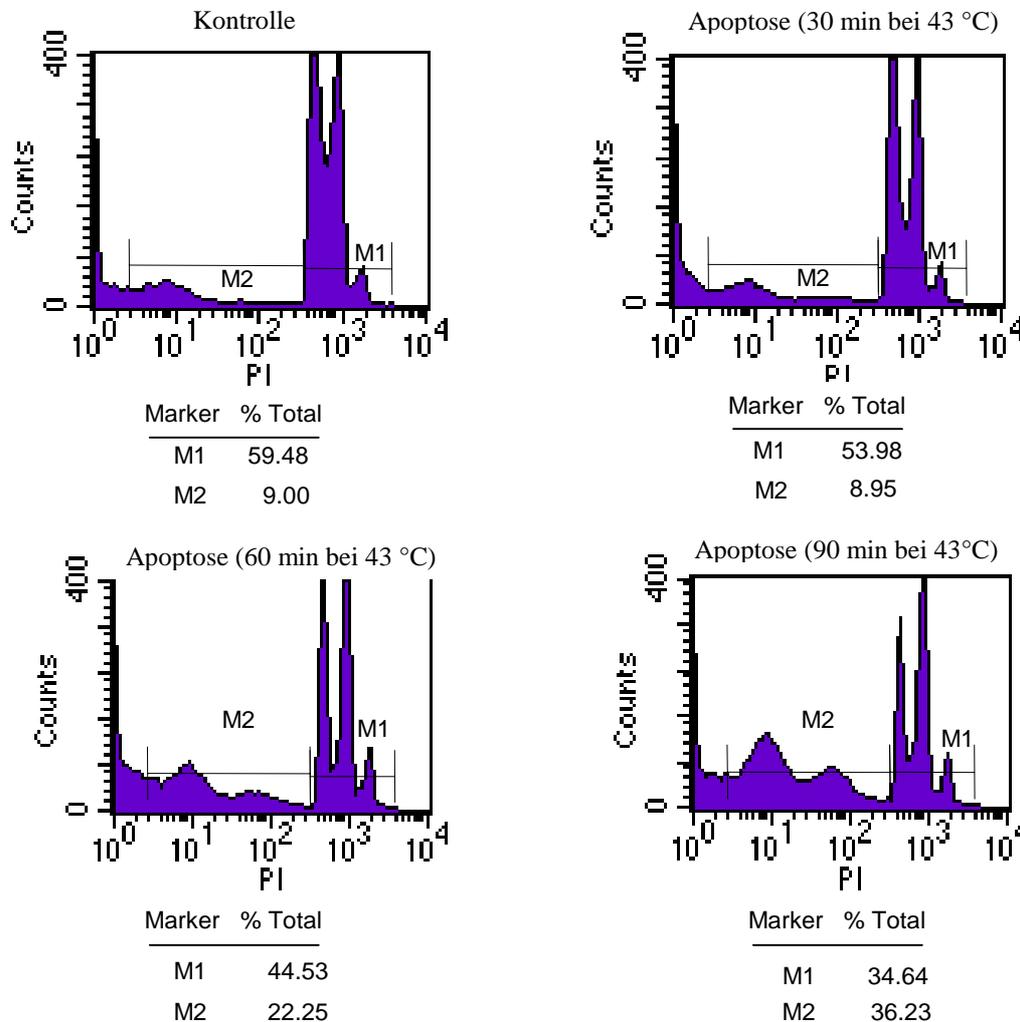


Abbildung 14: Apoptoseinduktion durch Hyperthermiebehandlung (30-90 min bei 43 °C, anschließend 20 h bei 37°C) bei Jurkat-Zellen nach Inkubation mit hypotonem fluorochromem Puffer

M1: vitale Zellen; M2: apoptotische Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Mit der Hyperthermiebehandlung ließen sich Jurkat-Zellen einfach, reproduzierbar und in ausreichender Höhe in Apoptose treiben. Die Behandlung mit Annexin bzw. hypotonem Puffer ermöglichte eine ausreichende Quantifizierung. Dieser Versuchsaufbau sollte deshalb im Folgenden an unterschiedlichen HNO-Zelllinien erprobt werden.

4.3 Etablierung von *in vitro*-Modellen für Apoptose und Nekrose bei HNO-Zelllinien

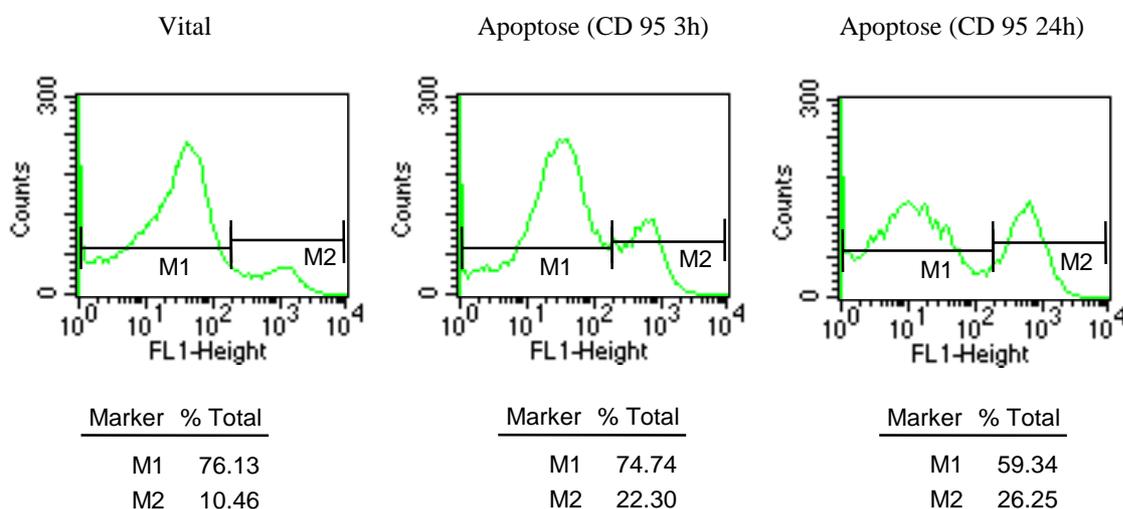
In der Literatur wurde in diesem Zusammenhang bislang nur wenig mit HNO-Zelllinien gearbeitet. Es wurde gezeigt, dass beispielsweise durch eine Paclitaxel-Applikation⁹³ durchaus, dagegen durch die Anwendung des synthetischen Retinoids Fenretinide⁹⁴ keine Apoptose in FaDu-Zellen auslösbar ist. Außerdem wird eine Apoptoseinduktion mittels Arsenitrioxid an PCI-1 Zellen⁹⁵ beschrieben. Im Folgenden wurde versucht, die bereits mit Jurkat-Zellen etablierten Apoptosemodelle, wie CD 95-Antikörper-Behandlung und Hyperthermie, auf die einzelnen HNO-Zelllinien zu übertragen.

4.3.1 Apoptoseinduktion durch Aktivierung des CD 95-Systems

Um eine Apoptoseinduktion durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors durchführen zu können, musste erst überprüft werden, ob die vorliegenden HNO-Zelllinien FaDu, GHD-1, HLaC 78 und PCI-1 diesen Rezeptor exprimieren. Durchflusszytometrische Messungen ergaben bei diesen Zelllinien positive Reaktionen (hier nicht gezeigt) auf Stimulation mit dem CD 95-Antikörper (Pharmingen, clone DX2).

Anschließend wurden diese Zelllinien unterschiedlichen Konzentrationen (1, 1.5, 2, 4 µg/µl) des CD 95 -Antikörpers ausgesetzt und bis zu 48 h im Brutschrank inkubiert. Abbildung 15 zeigt die unterschiedlich starken Reaktionen der einzelnen Zelllinien auf diesen Apoptosereiz (nur gezeigt für PCI-1 und FaDu-Zellen). Bereits nach 3 h waren bei PCI-1 und FaDu Veränderungen zu erkennen. Der Anteil an Annexin-positiven Zellen stieg bei beiden Zelllinien nach Inkubation von 3 – 24 h auf bis zu ca. 15 bzw. 26 % an.

PCI-1



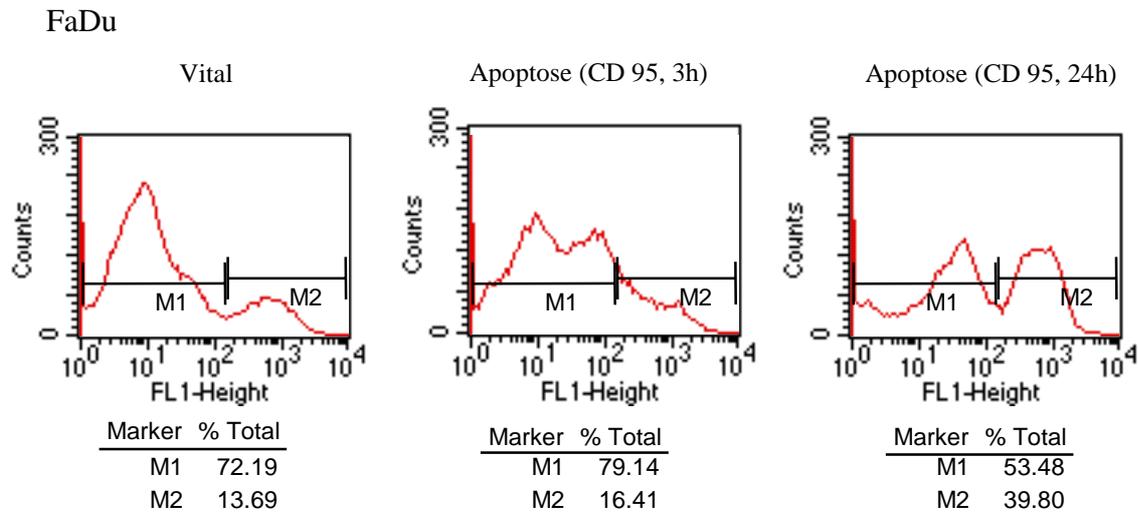


Abbildung 15: Apoptoseinduktion durch Aktivierung des Fas-Systems (CD 95) nach 3 und 24 Stunden bei den Zelllinien PCI-1 und FaDu, gemessen nach Inkubation mit Annexin

M1: Annexin-negative, vitale Zellen; M2: Annexin-positive Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

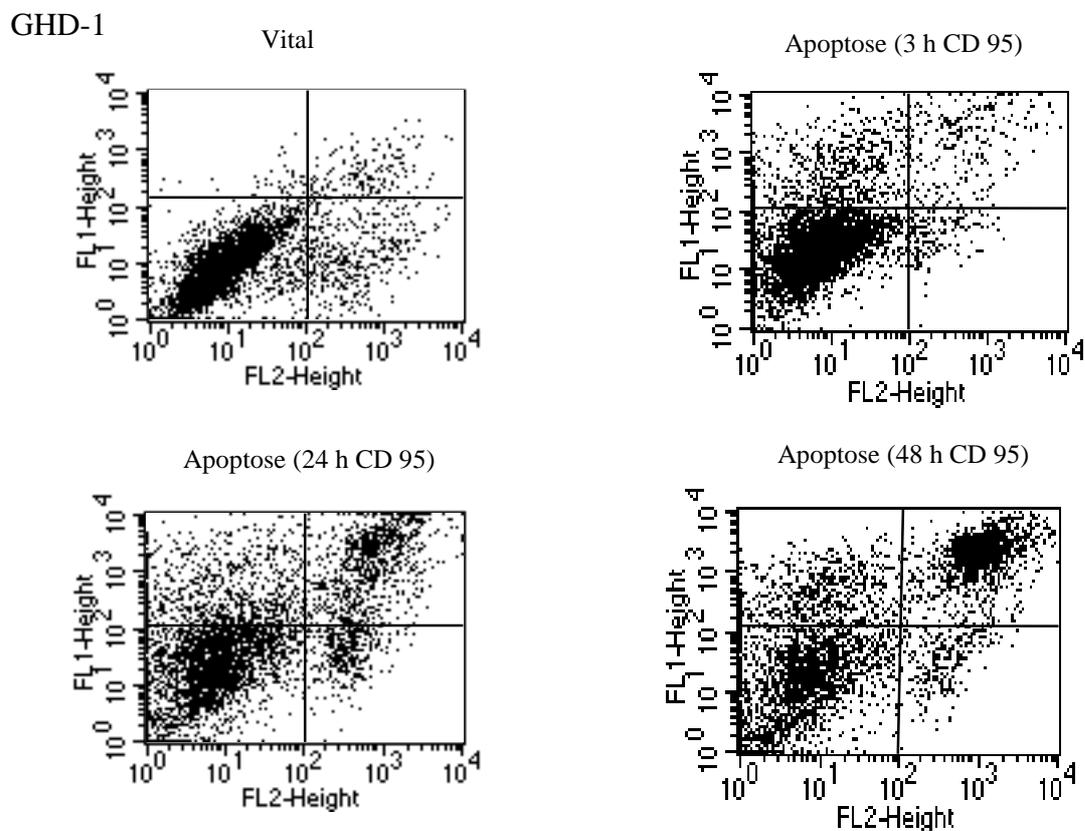


Abbildung 16: Apoptoseinduktion durch Aktivierung des Fas-Systems (CD 95) nach 3, 24 und 48 Stunden bei der Zelllinie GHD-1, gemessen nach Inkubation mit Annexin

(Dot-Plot-Darstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Durch Doppelfärbung mit PI konnte der Großteil Annexin-positiver Zellen als apoptotische Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 16, nur gezeigt für GHD-1 Zellen). Eine maximale Apoptoserate konnte nach einer Inkubationsdauer von 24 h ermittelt werden und betrug in diesem Fall ca. 28 %. Nach einer längeren Inkubation nahm dagegen der Prozentsatz nekrotischer Zellen stärker zu.

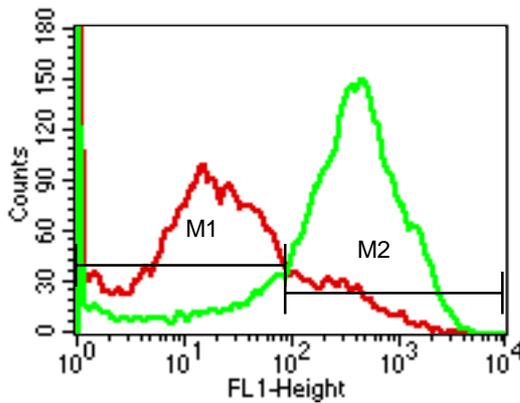
Obwohl alle verwendeten HNO-Zelllinien eine positive Ansprechbarkeit auf CD 95 aufwiesen, reagierten sie sehr unterschiedlich auf die Apoptoseinduktion. Während PCI-1, FaDu und GHD-1 Zellen sehr gut auf diesen Apoptosereiz reagierten, zeigten die übrigen Zelllinien nur mäßige Reaktionen (hier nicht gezeigt). Um eventuell mehr Resonanz zu erhalten wurde dazu übergegangen, Apoptoseversuche über den Induktionsweg der Hyperthermie zu testen.

4.3.2 Apoptoseinduktion durch Hyperthermiebehandlung

Der in Kapitel 4.2.4 ausgearbeitete Hyperthermie-Versuchsaufbau bei Jurkat-Zellen wurde im Folgenden für Versuche mit verschiedenen HNO-Zelllinien und den Endothelzellen HMEC übernommen. Diese wurden 90 min lang bei 43°C erhitzt und anschließend für circa 48 h im Brutschrank inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben mit Annexin bzw. hypotonem fluorochromen Puffer markiert. Die Ergebnisse nach Annexin-Markierung sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 17). Je nach Zellart ergaben sich unterschiedlich hohe Anteile an Annexin-positiven Zellen.

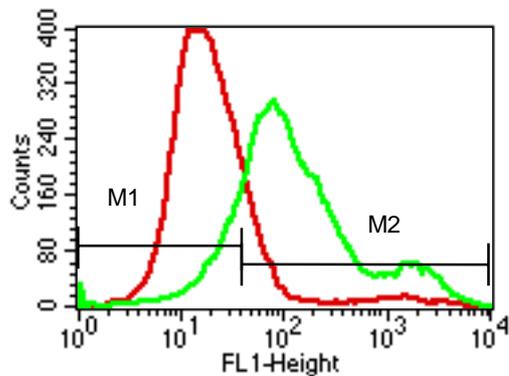
Der gleiche Versuchsaufbau, analysiert nach einer Annexin-PI-Doppelfärbung, konnte genauere Angaben über die induzierte Apoptose machen, die je nach Zellart unterschiedlich ausfiel. Mit den Zelllinien FaDu und GHD-1 konnten die höchsten Apoptoseraten von bis zu 32 % erzielt werden. Dagegen zeigten die anderen verwendeten Zellpopulationen niedrigere Apoptoseraten von 12-20 % (hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten HNO-Zelllinien sehr gut für Apoptose-Versuche eignen. Die besten Apoptoseraten ließen sich bei den Linien FaDu, PCI-1 und GHD-1 erreichen. Dabei ließ sich sowohl durch den Antikörper CD 95 als auch durch die Hyperthermie-Behandlung Apoptose induzieren.



FaDu

Vital		Apoptose	
Marker	% Total	Marker	% Total
M1	83.33	M1	21.39
M2	17.04	M2	78.94



GHD-1

Vital		Apoptose	
Marker	% Total	Marker	% Total
M1	84.39	M1	18.27
M2	16.57	M2	82.59

Abbildung 17: Hyperthermiebehandlung (90 min bei 43 °C, 48h bei 37 °C) von unterschiedlichen HNO-Zelllinien, gemessen nach Inkubation mit Annexin

M1: Annexin-negative, vitale Zellen; M2: Annexin-positive Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.4 Nachweis der Apoptose bei der Endothelzelllinie HMEC

Zusätzlich sei hier noch die Hyperthermie-induzierte Apoptose bei der HMEC-Zelllinie erwähnt. In der folgenden Abbildung dargestellt ist die Apoptoserate nach einer 90 minütigen Hyperthermie-Behandlung bei 43 °C, gemessen nach Inkubation in Annexin. Zu erkennen ist dass die Endothelzelllinie wesentlich geringere Apoptoseraten aufweist als die anderen verwendeten Zellpopulationen. Das bedeutet, dass bei hyperthermischer Behandlung eines soliden Tumors primär eine starke Apoptose im Tumorgewebe und nur eine geringe apoptotische Schädigung des Endothels in den Tumorgefäßen zu erwarten ist. Eine Applikation solcher therapeutischer Reize, die zusätzlich eine starke Apoptose im Gefäßendothel verursachen und damit die Tumorperfusion stören, müsste höhere therapeutische Effekte aufweisen und sollte weiteren Überlegungen in diese Richtung veranlassen. In diesem Zusammenhang sollte noch genannt werden, dass die Methode der

Apoptoseinduktion durch Hyperthermie im Rahmen der von uns durchgeführten Versuche die höchsten Apoptoseraten erzielen konnte.

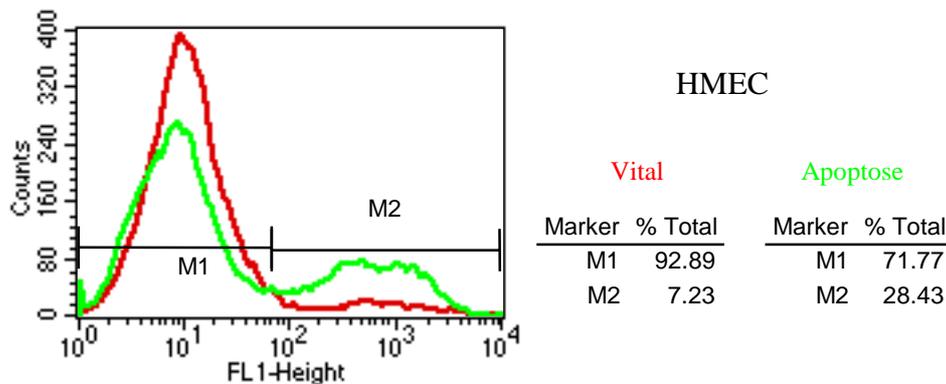


Abbildung 18: Hyperthermiebehandlung (90 min bei 43 °C, 48h bei 37 °C) bei der Zelllinie HMEC, gemessen nach Inkubation mit Annexin

M1: Annexin-negative, vitale Zellen; M2: Annexin-positive Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.5 Gelelektrophoretische Analyse degradiertes DNA in apoptotischen Zellen

Der Versuch die durch Inkubation der Jurkat Zellen mit MTX oder Hyperthermie erreichten Apoptoseraten mit der klassischen Methode der gelelektrophoretischen Auftrennung der fragmentierten DNA nachzuweisen, erwies sich als nicht so einfach durchführbar wie in der Literatur beschrieben wird. Es muss ein hoher Anteil an apoptotischen Zellen vorhanden sein, um genügend DNA zur Fragment-Darstellung extrahieren zu können. Außerdem müssen sich die Zellen in einem bestimmten Stadium der Apoptose befinden, um das sogenannte „Leitersystem“ aufweisen zu können. In der Literatur ist auch die Rede von apoptotischen Vorgängen, die diese Phase nicht aufweisen^{97, 105, 117}, so dass man sich nicht immer danach richten kann. In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Verfahren zur DNA-Gelelektrophorese überführt. Da sich das charakteristische Leitersystem nicht reproduzierbar darstellen ließ, wurde die Durchflusszytometrie zur Nachweismethode der Wahl bestimmt.

4.6 Nachweis von Nekrose in vitro

4.6.1 Nekroseinduktion durch Hyperthermiebehandlung

Um die unterschiedlichen Arten des Zelltodes, d.h. Apoptose und Nekrose, voneinander abgrenzen zu können, mussten Parameter gefunden werden, die jeweils charakteristisch für eine dieser Degradationsformen sind. Morphologische Ereignisse, die nur während der Nekrose auftreten, wie Vergrößerung der Zelle mit anschließendem Zerfall, können mit einfachen lichtmikroskopischen Mitteln sichtbar gemacht werden. Andere Veränderungen, wie die völlige Auflösung der DNA, lassen sich mittels Durchflusszytometrie darstellen. Der pathologische Prozess der Nekrose wird bekanntlich nach stark zellschädigenden Einflüssen ausgelöst, wie beispielsweise durch große und lang anhaltende Hitzeeinwirkungen. Dieses Erkenntnis wurde für die nachfolgenden Versuche übernommen.

Die Zellen wurden zunächst für jeweils 15 min Temperaturen von 42°C, 56°C und 65°C ausgesetzt und anschließend für 48 h im Brutschrank weiter inkubiert, da sich nekrotische ebenso wie apoptotische Abbauvorgänge erst nach einer bestimmten Induktionszeit sichtbar manifestieren. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben kurz vor der Messung mit PI versetzt. Wie in Abbildung 19 gezeigt wird, konnte durch die Inkubation bei 65°C fast vollständige Nekrose (> 90 %) ausgelöst werden. Auch bereits die Behandlung mit 56°C erzielte bei > 60 % der Zellen einen nekrotischen Tod.

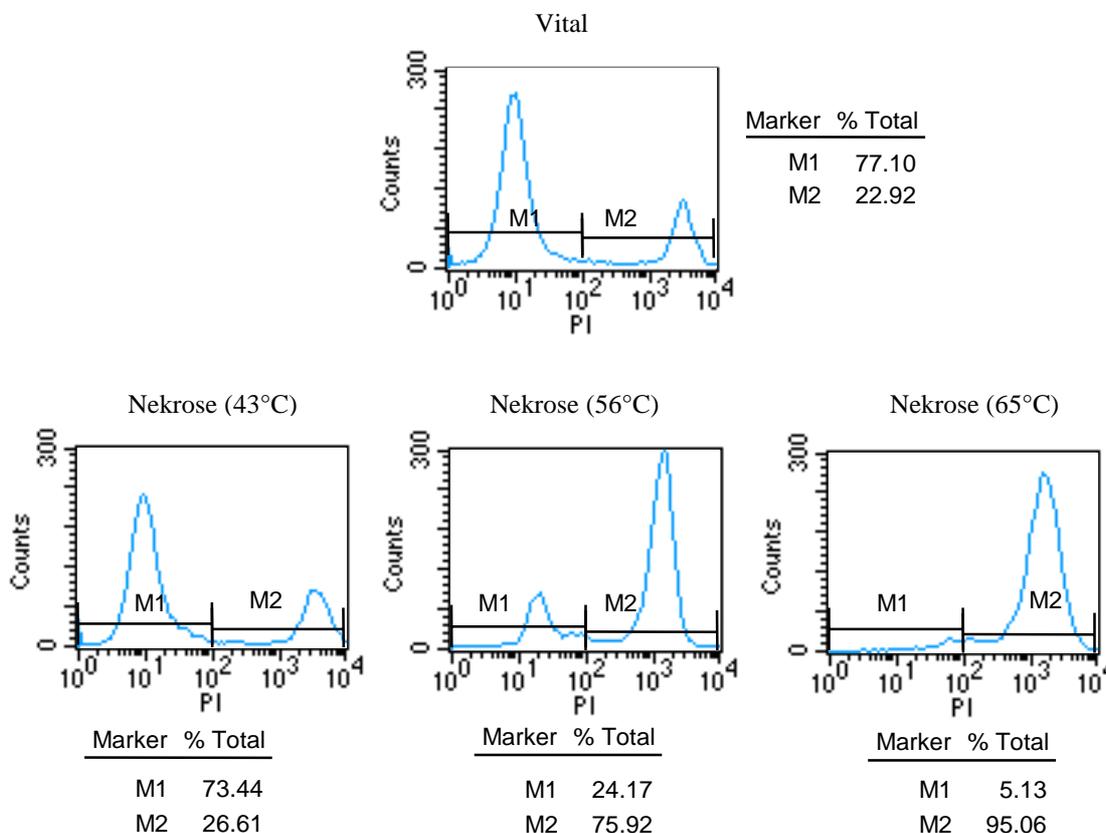


Abbildung 19: Nekroseinduktion bei Jurkat-Zellen durch Hitzebehandlung (15 min bei 43, 56, 65°C); Durchflusszytometrische Analyse nach PI-Färbung; M1: vitale Zellen; M2: nekrotische Zellen

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Bei allen verwendeten Zellpopulationen konnte eine Nekroseinduktion auf die gleiche Art und Weise erzielt werden. Es wurde stets die Inkubation bei 65 °C für 15 min gewählt um möglichst hohe Nekroseraten zu erzielen.

4.6.2 Anteil nekrotischer Populationen in vitalen und Apoptose-induzierten Zellkulturen

An dieser Stelle soll bemerkt werden, dass sich in einer als vital betrachteten Zelllinie neben einem gewissen Prozentsatz an apoptotischen Zellen auch nekrotische Zellen befinden. Im Rahmen eines natürlichen Zellwachstums kommen grundsätzlich diese drei Zellzustände nebeneinander vor. Deshalb können wir in einer Kontrollpopulation nie von 100 % vitalen Zellen ausgehen. Ebenso können wir nicht annehmen, dass durch einen Reiz der Apoptoseinduktion nur Apoptose ausgelöst wird. Einerseits gilt, dass je nach Zellstatus nur ein bestimmter Anteil der Zellpopulation durch diesen Reiz stimuliert wird und andererseits, dass wiederum auch nur ein bestimmter Prozentsatz davon in Apoptose übergeht. Bei jeder Apoptoseinduktion werden gleichzeitig auch nekrotische Vorgänge eingeleitet, so dass auch nie eine 100 %-ige Apoptose erreicht werden kann. Den Anteil bereits vorhandener oder unbewusst induzierter nekrotischer Zellen kann man leicht den Abbildungen entnehmen.

4.7 Vergleich der durchflusszytometrischen Markierungsverfahren

Alle drei hier verwendeten durchflusszytometrischen Markierungsverfahren unter Verwendung von Annexin, TUNEL-Assay und hypotoner fluorochromer Lösung sind etablierte, standardisierte Methoden, die vielfach in der Literatur aufgeführt sind. Bei richtiger Handhabung ergaben sich ungefähr gleichwertige Messwerte für Apoptose- und Nekroseraten, allerdings konnten einige Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren entdeckt werden.

Bei Verwendung des TUNEL-Assays, stellte sich heraus, dass dieser sehr arbeits- und zeitintensiv ist, da er über mehrere Schritte der Fixierung, Permeabilisierung und Markierung verfügt. Für die anstehenden Kinetikversuche mit mehreren Proben pro Versuch erwies er sich deshalb als zu aufwendig in der Durchführung. Zudem ist es notwendig, eine große Zellzahl einzusetzen, da es bei den zahlreichen Teilschritten zu einem unspezifischen Zellverlust kommt. Außerdem markiert dieses Verfahren nicht nur DNA-Fragmente apoptotischer Zellen, sondern auch die sich in der Synthesephase befindlichen vitalen Zellen.

Der ANNEXIN-Test ist demgegenüber eine schnellere und billigere Methode mit einer zudem einfacheren Handhabung. Er dient zur Identifizierung von apoptotischen Zellen in der Frühphase. Die Markierungszeit beträgt nur 15 min. Es besteht die Möglichkeit zur Doppelfärbung, um eine Abgrenzung von den nekrotischen Zellen zu erzielen. Aufgrund dieser Vorteile wurde dieses Verfahren bei der FACS-Analyse den anderen genannten Methoden vorgezogen.

Die Inkubation im hypotonem fluorochromen Puffer erwies sich als einfachste und schnellste Methode zur durchflusszytometrischen Analyse. Sie misst apoptotische Populationen in der Spätphase. Mit dieser Methode konnten ähnliche Ergebnisse wie mit der Annexinmethode erzielt werden, allerdings nicht immer reproduzierbar.

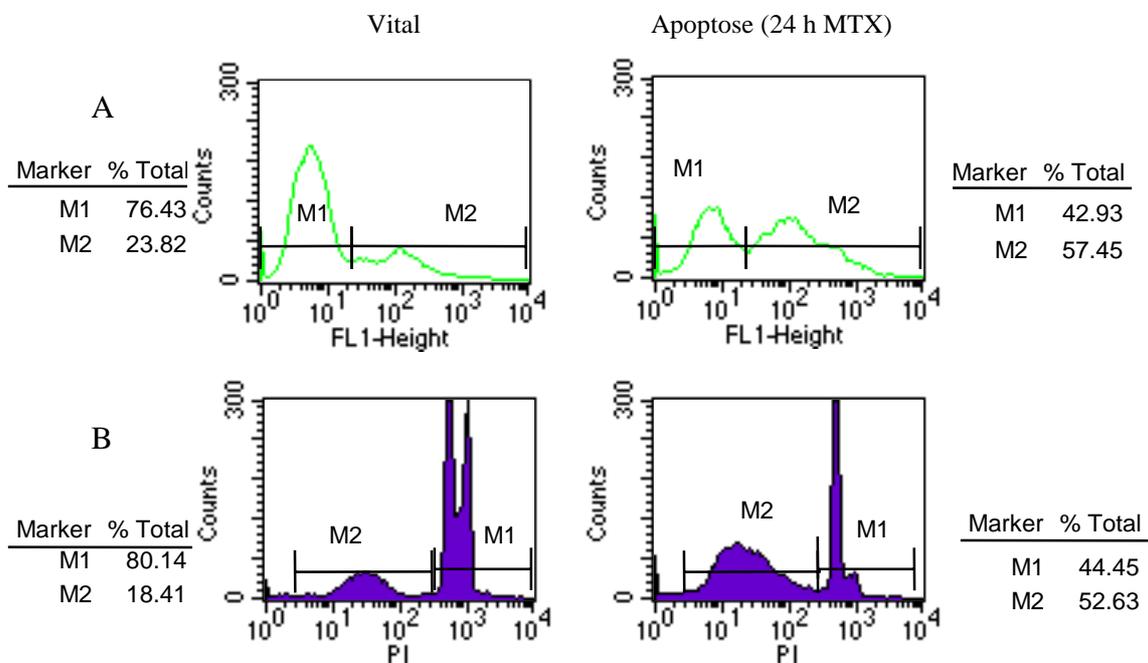


Abbildung 20: Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen durch MTX (24 h); Vergleich der beiden Fluoreszenzmarkierungsverfahren Annexin (FL1) (A) und hypotoner fluorochromer Puffer (B)

M1 vitale Zellen; M2 Annexin-positive (A) bzw. apoptotische Zellen (B)

(Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

Bei direktem Vergleich beider zuletzt erwähnter Markierungsverfahren ergaben sich, wie unter Abbildung 20 dargestellt, quantitativ annähernd gleich hohe Apoptoseraten. Bei diesem Versuch wurden in Jurkat-Zellen durch eine 24-stündige MTX-Behandlung Apoptose induziert. Bei der Analyse nach der Annexinmethode ergaben sich ca. 33 % Annexin-positive Zellen, die zum größten Teil apoptotischen Zellen entsprechen. Nach der Inkubation in hypotonem Puffer konnten ca. 35 % apoptotische Zellen ermittelt werden. Da

beide Methoden unterschiedliche Phänomene der Apoptose messen, können kleinere Abweichungen in Kauf genommen werden. Da sich diese beiden Methoden in Bezug auf die Beurteilung des Apoptoseausmaßes ergänzen, wurden bei den folgenden Versuchen auch weiterhin beide Messverfahren angewendet. Die Variabilität der Ergebnisse nach Markierung der Zellen in hypotonem fluorochromen Puffer führte dazu, dieses Verfahren als zusätzlichen Bestätigungstest der induzierten Apoptose und Nekrose heranzuziehen und die eigentliche Quantifizierung mit der Annexin-Markierung durchzuführen.

Die folgende Tabelle zeigt einen Ausschnitt aus den durchgeführten Versuchen und die durch diese beiden unterschiedlichen durchflusszytometrischen Markierungsverfahren erzielten Apoptoseraten bei gleichem Versuchsaufbau.

Zelllinien:	Apoptoseinduktion:	Apoptoseraten in %	
		AX	HP
Jurkat	MTX	33,3	33,6
Jurkat	MTX	15,2	14,4
Jurkat	HYT	12	12,5
Jurkat	HYT	19,5	20,8
Jurkat	MTX	30,1	25,3
Jurkat	MTX	28,3	24
Jurkat	HYT	26	28,5
Jurkat	HYT	28,6	27,2
		(TA 29,8)	
Jurkat	HYT	42,4	23
HMEC		16,6	12,2
GHD-1	HYT	32	17
FaDu	HYT	21	17
Jurkat		41,4	29,5
HMEC	HYT	25	30
HMEC	Fas	12	25
Hlac78	HYT	32,6	36,5

Tabelle 2: Vergleich der gemessenen Apoptoseraten durch die drei durchflusszytometrischen Verfahren:

TA TUNEL-Assay, **AX** Annexin-Test, **HP** hypotoner Puffer

MTX Methotrexat, **HYT** Hyperthermie, **Fas** Fas-Antikörper

Zum Vergleich der durchflusszytometrischen Messverfahren wurde auch zusätzlich eine Messung nach dem Prinzip des TUNEL-Assays durchgeführt. Wie nachfolgend gezeigt wird, kamen alle drei verwendeten Methoden zu übereinstimmenden Ergebnissen von 26 - 29 % in Bezug auf die Apoptoserate.

Die flusszytometrischen Analysen zeigen differentielle Membranstabilitäten bei apoptotischen und nekrotischen Zellen auf. Sie liefern zusätzliche Informationen über die Zellgröße, die Granularität und den DNA-Gehalt. Die hier *in vitro* durch das geeignetste Verfahren, der Hyperthermie, induzierten apoptotischen und nekrotischen zellulären

Zustände konnten nach flusszytometrischen Analysen nach den aus der Literatur bekannten Kriterien eindeutig Apoptose oder Nekrose zugeordnet werden. Die hiermit etablierten Versuchsabläufe wurden im Folgenden parallel zu den durchflusszytometrischen Analysen magnetresonanzspektroskopischen Versuchen unterzogen und die Ergebnisse miteinander verglichen.

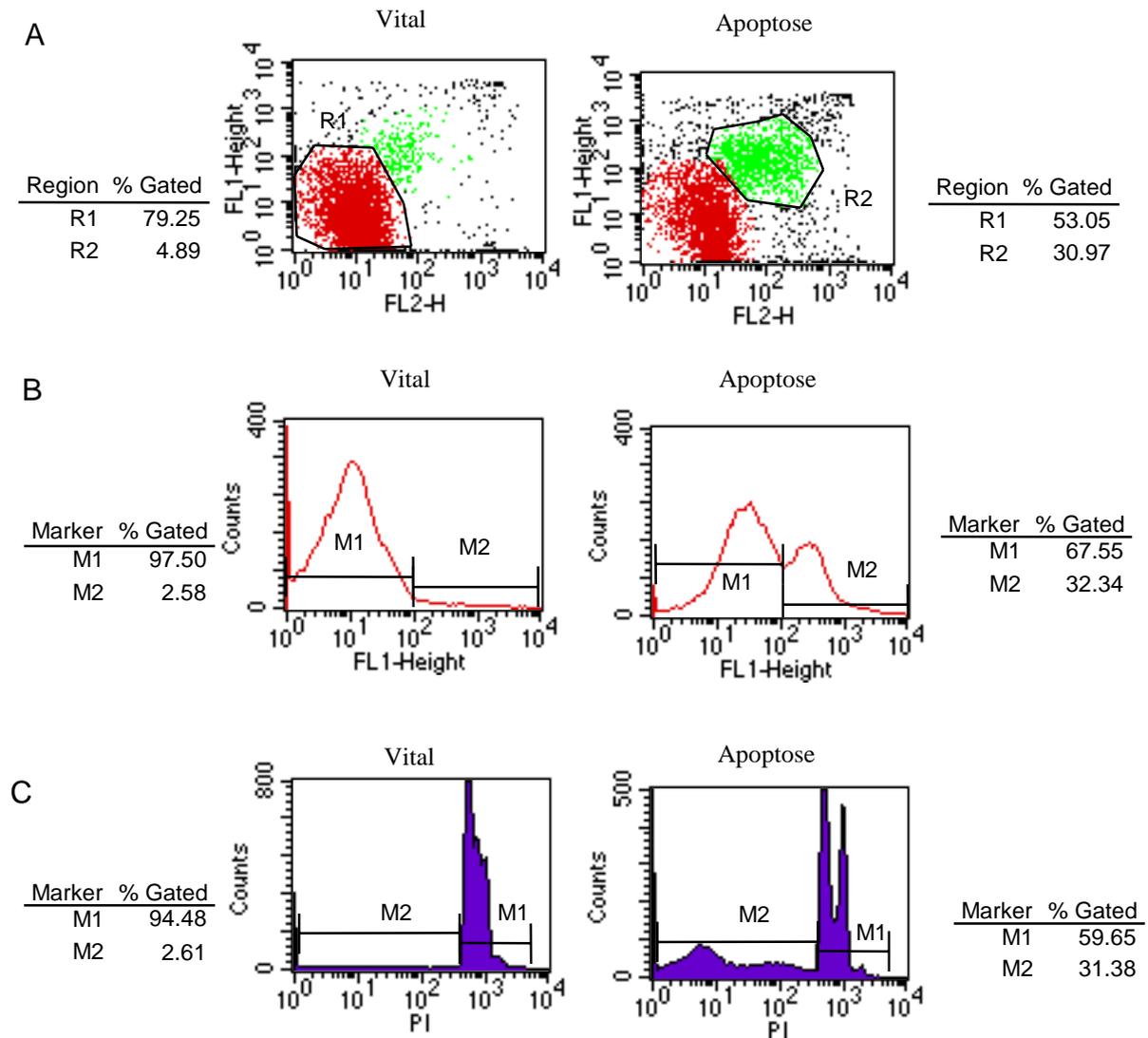


Abbildung 21: Apoptoseinduktion durch Hyperthermie (90 min bei 43 °C) bei Jurkat-Zellen, Vergleich der drei Markierungsverfahren:

(A) Annexin (FL1), Doppelfärbung mit PI (FL2); R1 vitale Zellen, R2 apoptotische Zellen;

(B) TUNEL-Assay; M1 TUNEL negative Zellen, M2 TUNEL positive Zellen

(C) Hypotoner Puffer; M1 vitale Zellen, M2 apoptotische Zellen

(Dot-Plot- und Histogrammdarstellung, Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg)

4.8 Magnetresonanzspektroskopie

Die Ergebnisse aus den vorausgehenden Kapiteln zeigen, dass mit den etablierten *in vitro*-Modellen und Analyseverfahren die verschiedenen Zellzustände vital, apoptotisch und nekrotisch durchaus eindeutig nachweisbar sind. Damit können diese Zellmodelle für die weiterführenden magnetresonanzspektroskopischen Untersuchungen herangezogen werden.

Als *in vitro*-Modell für eine Apoptoseinduktion durch eine hypertherme Behandlung, wie beispielsweise regionale Hochfrequenz-Hyperthermie oder Laser-unterstützte Hyperthermie, wurden Zelllinien nach einer Hyperthermiebehandlung im Wasserbad (43°C für 30–90 min) parallel zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen auch ¹H-MR-spektroskopischen Messungen unterzogen. Zur Nekroseinduktion waren höhere Temperaturen erforderlich (65°C für 15 min). Ähnlich den durchflusszytometrisch erarbeiteten Unterscheidungsmerkmalen der drei Zellzustände, sollten im nächsten Schritt spektroskopisch sichtbare und charakteristische Veränderungen der molekularen Strukturen der Membran oder des Energiehaushaltes nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Proben mit einem 11,5 Tesla AMX-500 BRUKER-System spektroskopisch untersucht.

Aus Voruntersuchungen mit Testlösungen von gesättigten und ungesättigten Membranlipidestern und Membranphospholipiden weiß man exemplarisch, wie die aus diesen aufgebauten Membranstrukturen, und die dadurch bestimmte Membranfluidität, sich in ¹H-MR-Spektren widerspiegeln. Der typische Aufbau eines Phospholipids lässt sich in folgende Bestandteile untergliedern: Cholinkopf, Phosphoglycerinrumpf und Kohlenwasserstoffketten mit =CH- und -CH₂- Kettenglieder und einer -CH₃ Endgruppe. Dabei lassen sich den Kohlenwasserstoffkettengliedern entsprechend ihrer Position zu den ungesättigten Doppelbindungen ebenso wie den Cholinköpfen bestimmte spektrale Bereiche zuordnen (Abbildung 22). Gesättigte Lipide zeigen neben einer hohen Methylen-(CH₂)-Resonanz auch einen hohen Methylen (CH₂) / Methyl (CH₃) -Quotienten und eine breite Cholinresonanz (Cho). Ungesättigte Lipide dagegen zeichnen sich durch ein spektrales Muster aus, bei dem die Methylenresonanz reduziert und die Resonanzen in den entsprechenden Lipidbereichen (>5 ppm) erhöht sind. Außerdem findet man schmale, erhöhte Cholinresonanz vor (Abbildung 23). Die zu beachtenden Resonanzmuster finden sich u.a. bei 0,9 ppm für Methyl, bei 1,3 ppm für Methylen und bei 3,2 ppm für Cholin.

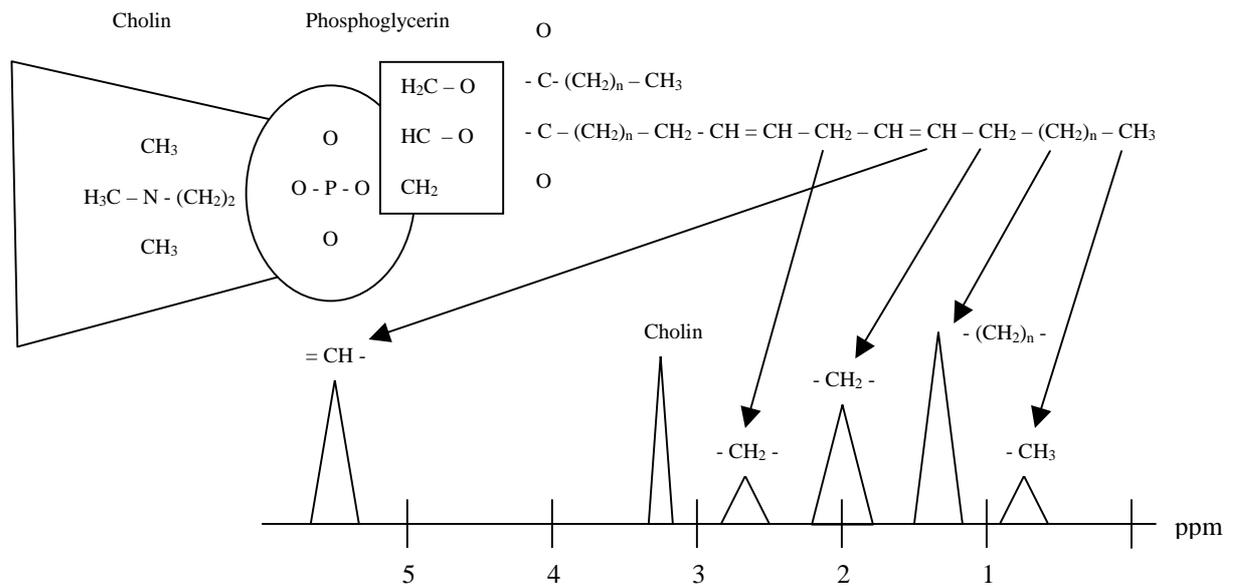


Abbildung 22

Typischer Aufbau eines Membranphospholipids aus Cholin, Phosphoglycerin und Kohlenwasserstoffketten mit =CH-, -CH₂- Gliedern und einer -CH₃ Endgruppe. Die einzelnen Lipidkomponenten ergeben im ¹H-MRS spezifische Resonanzmuster.

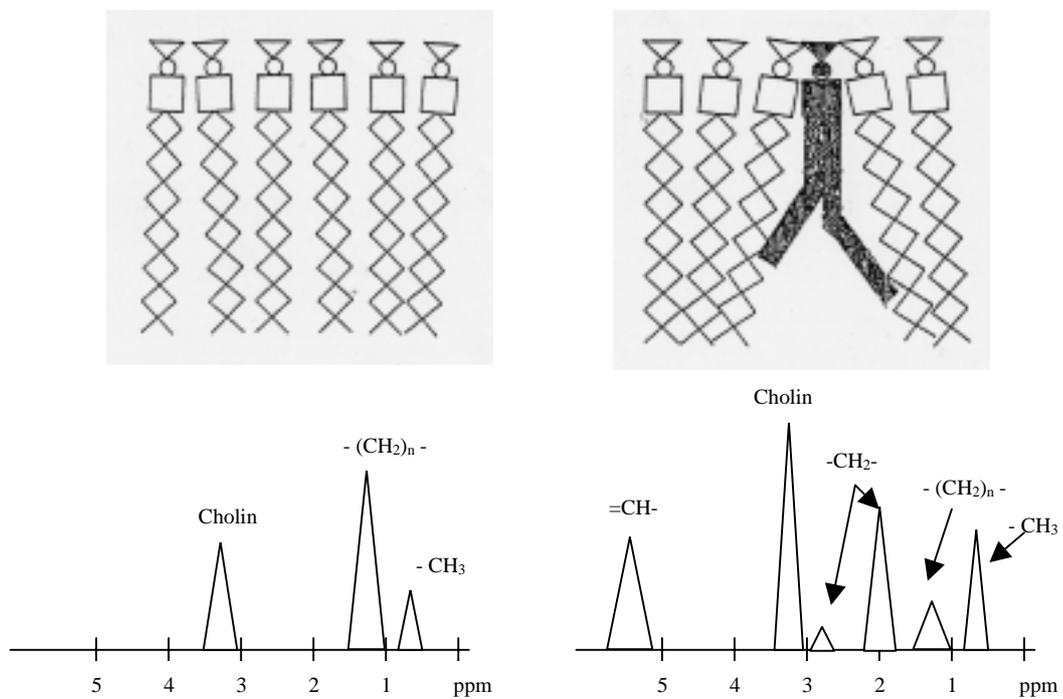


Abbildung 23

MR-spektroskopische Modelldarstellung von gesättigten (links) und ungesättigten (rechts) Fettsäuren mit ihren typischen Resonanzmustern.

Aus der Intensitätsverteilung lässt sich auf diese Weise zwar nicht die zugrundeliegende Lipidstruktur ermitteln, jedoch die Anzahl der ungesättigten Doppelbindungen einer Fettsäure in einer Lösung abschätzen. Dies gilt auch für ein Gemisch von Phospholipiden, die sich in Lösung zu einer Doppelschichtmatrix analog einer biologischen Zellmembran anordnen. Je höher der Anteil an ungesättigten Bindungen im Lipidgemisch, desto höher ist auch die Fluidität der Membran. Veränderungen der Membranfluidität lassen sich aus der Linienbreite der Cholinresonanz ablesen. Grundsätzlich gilt, je höher die Mobilität, desto geringer ist die Breite einer Resonanz eines Metabolits im MR-Spektrum. Für die Cholinresonanzen ließ sich zeigen, dass sie um so höher und schmaler sind, je größer der Anteil an ungesättigten Lipiden beträgt. Das bedeutet wiederum, dass die Fluidität einer Membran umso größer ist je höher der Gesamtanteil an ungesättigten Bindungen in dieser Membran ist. Somit lässt sich aus den Linienbreiten der Lipidresonanzen die Membranfluidität und aus ihrer spektralen Lage sowie Intensitätsverteilung der mittlere Sättigungsgrad und die mittlere Kettenlänge der Lipide der Zellmembran abschätzen.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die einzelnen Zelllinien entsprechend ihrer molekularen Membranstrukturen individuell unterschiedlich ausgeprägte spektroskopische Resonanzen, die im Folgenden exemplarisch an der Jurkat-Zelllinie besprochen werden sollen.

4.8.1 Spektroskopische Analyse der Lymphomzelllinie Jurkat

Bei den Jurkat-Zellen wurden durch Hyperthermie-Behandlung (90 min bei 43°C, anschließend 48 h im Brutschrank) Apoptose und Nekrose (15 min bei 65 °C, anschließend 48 h im Brutschrank bei 37 °C) induziert. Parallel zu den durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen nach Annexin-Färbung und Inkubation in hypotonem Puffer wurden die Zellpopulationen MR-spektroskopischen Messungen unterzogen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die unterschiedlichen Spektren der drei Zellzustände vital, apoptotisch und nekrotisch.

Vorher soll noch erwähnt werden, dass die gleichen Proben auch einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen wurden. Die erzielte Apoptoserate nach Annexin-PI-Doppelfärbung und nach Inkubation in hypotoner fluorochromer Lösung betrug circa 24-28 %, die Nekroserate circa 80 % (nicht gezeigt).

Die in den spektroskopischen Messungen gezeigten Unterschiede deuten auf starke Veränderungen der molekularen Strukturen der Zellen während der einzelnen Zellzustände hin: Die Spektren vitaler Zellen zeichnen sich durch einen hohen CH_2/CH_3 -Quotienten und

niedriger Cholinresonanz aus. Dies ist deutbar als Zeichen einer intakten und stabilen Zellmembran aus langen gesättigten Lipidketten. Die zu erwartende geringe Fluidität wird durch den niedrigen Anteil an ungesättigten Bindungen und durch die niedrige Cholinresonanz bestätigt.

Nekrotische Zellen dagegen zeigen einen niedrigen CH_2/CH_3 -Quotienten, geringe Anteile im ungesättigten Bereich und je nach Schädigungsart unterschiedlich ausgeprägte Cholinresonanzen. Bei Methotrexatapplikation ergibt sich eine hohe Cholinresonanz. Dieser Befund entspricht einer sich auflösenden Membran mit Abbau der Lipidkettenlänge und mobilen Cholinköpfen. Bei einer Wärmekrose, wie in diesem Beispiel, findet man eine Cholinresonanz geringer Intensität. Möglicherweise wird die erhöhte Mobilität der Membranlipidkomponenten wie des Cholins kompensiert durch Abnahme der Beweglichkeit in der Membran aufgrund der Wärmekoagulation von Membranproteinen. Auch ließ in diesem Rahmen eine erhöhte Laktatresonanz feststellen.

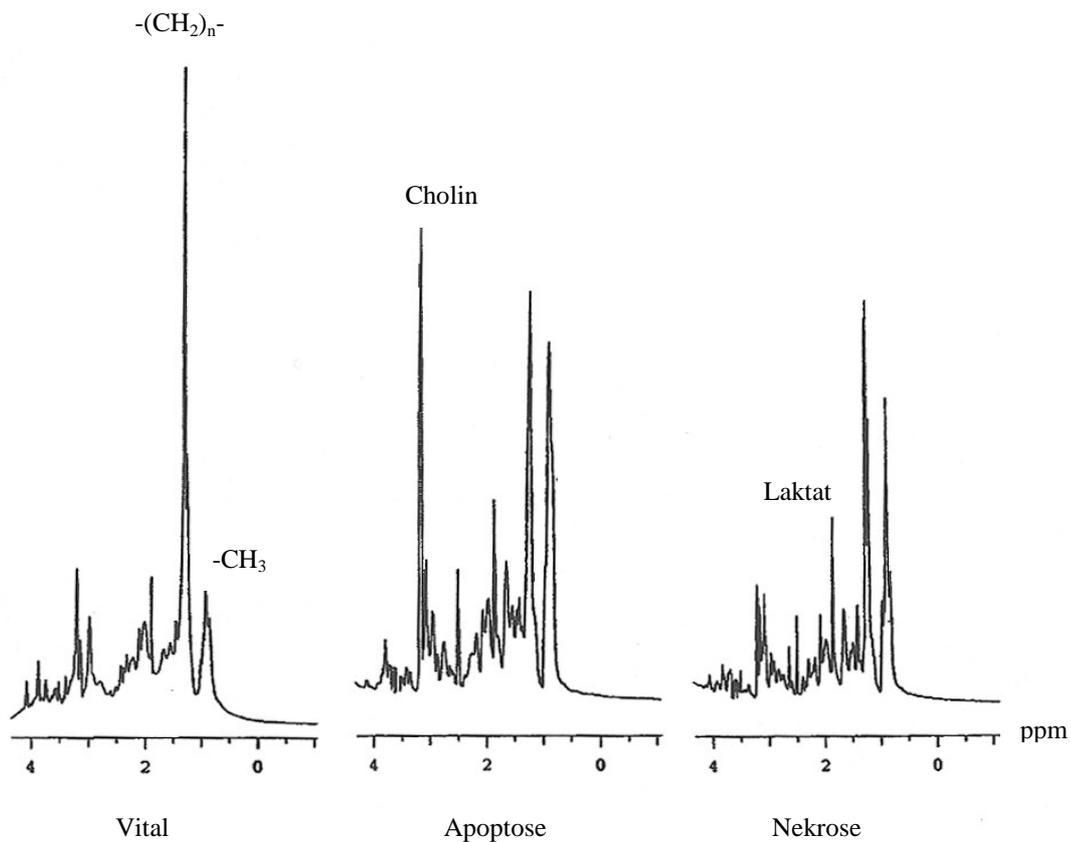


Abbildung 24: Darstellung der drei Zellzustände vital, apoptotisch (90 min bei 43°C) und nekrotisch (15 min bei 65°C) mittels ^1H -MR-Spektroskopie bei Jurkat-Zellen

Apoptotische Zellen sind durch einen ebenfalls niedrigen CH_2/CH_3 -Quotienten und einer hohen Cholinresonanz charakterisiert. Dies entspricht entweder einem Abbau der Lipidmatrix mit Verringerung der Kettenlänge, und/oder einer Zunahme der ungesättigten Verbindungen. Die hohe Cholinresonanz befürwortet am ehesten die Zunahme der Resonanzen im ungesättigten Bereich und deutet verstärkt auf eine erhöhte Membranfluidität hin. Die apoptotische Membran ist also nicht durch Auflösung charakterisiert, sondern durch einen Umbau der Membranlipidmatrix mit erhöhter Membranfluidität.

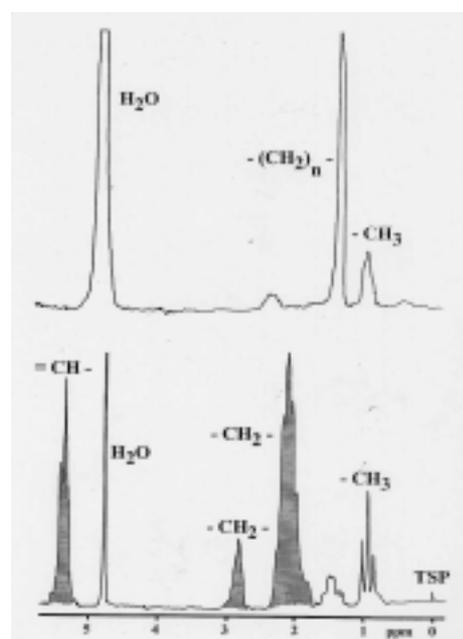
Dass es sich dabei tatsächlich um eine Zunahme der ungesättigten Membranlipide handelt zeigt sich deutlich in der nächsten Abbildung. Dargestellt sind hier die unterschiedlichen Resonanzmuster einer gesättigten und einer ungesättigten Säure im Vergleich. Man kann deutlich die Zunahme der $=\text{CH}-$ und $-\text{CH}_2-$ Kettenglieder und den Abfall der Methylresonanz als Zeichen einer ungesättigten Säure (hier Octadecatetraenoic acid) erkennen. Gleichartige Veränderungen gelten auch beispielsweise für eine aus vielen einzelnen Fettsäuren bestehende Zellmembran. Bei apoptotischem Zerfall und dadurch erhöhter Membranfluidität kann man genau diese o.g. Phänomene feststellen und als charakteristisch kennzeichnen. Der deutliche Unterschied zu gesättigten Fettsäuren, wie sie bei der Nekrose vorkommen, ist ersichtlich. Somit lassen sich diese beiden Zelldegenerationszustände anhand ihres Gehaltes an gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren eindeutig unterschieden. Bei den exemplarisch unter Abbildung 24 gezeigten Resonanzen konnten diese Unterschiede nicht verdeutlicht werden, da sich aufgrund einer starken Wasserresonanz die fraglichen Resonanzbereiche nicht eindeutig darstellen ließen.

Abbildung 25:

Unterschiedliche ^1H -MR Spektren einer ungesättigten (oben) und gesättigten (unten) Fettsäure im Vergleich

oben: decanoic acid (C10:0)

unten: octadecatetraenoic acid (C18:4)



4.8.2 Spektroskopische Analyse der Endothelzelllinie HMEC

Im Rahmen einer sanften Tumorbekämpfung, d.h. einer apoptotischen Elimination soliden Tumorgewebes, erwartet man sich größere Erfolgsaussichten, wenn es gelingen würde die Schädigungsreize zusätzlich gezielt in den vaskulären Endothelzellen des Tumors zu applizieren. Eine dort induzierte Apoptose würde primär die Mikrozirkulation des Tumors und seiner möglichen Rezidive und Metastasen zerstören. Mit diesen Hintergedanken wurden die Apoptose- und Nekroseversuche auch an der Endothelzelllinie HMEC durchgeführt. Zur Apoptoseinduktion wurde erneut die Hyperthermie gewählt. Die Zellen wurden 90 min bei 43 °C mit anschließender Aufbewahrung für 48 h im Brutschrank behandelt. Die Nekroseinduktion wurde durch Inkubation der Zellen bei 65 °C für 15 min erreicht. Sie wurden vor der Analyse für 48 h im Brutschrank verwahrt. Auch hier lassen sich Unterschiede in den Spektren der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen aufweisen (Abbildung 26).

Es ergeben sich einige Gemeinsamkeiten aber auch Differenzen zu den weiter oben beschriebenen spektroskopischen Analysen. Die Methylresonanzen blieben wie erwartet konstant. Die Intensitäten der Methylenresonanzen verhielten sich unterschiedlich. Bei den apoptotischen Zellen war eine Erhöhung, bei den nekrotischen Zellen dagegen eine Erniedrigung aufzufinden. Der Cholinpeak, der bei der vitalen Zellpopulation schon sehr klein ausgebildet ist, verschwand nahezu bei den beiden anderen Zellzuständen. Wie schon bei den anderen Versuchen wurden auch hier die gleichen Zellproben durchflusszytometrischen Untersuchungen zugeführt. Bei der Analyse fanden sich bereits ein großer Teil der vitalen Zellen im apoptotischen Zustand. Somit konnten durch die Wärmebehandlung bei 43 °C in diesem Fall lediglich circa 10-15 % der Zellen in Apoptose getrieben werden. Die Wärmebehandlung bei 65 °C zur Nekroseinduktion erzielte eine Apoptoseinduktion von circa 20 %. Der induzierte Nekroseanteil betrug nur circa 30-40 % (hier nicht dargestellt). Wie man aus diesen Ergebnissen erkennen kann, lassen sich die Endothelzellen unter der gleichen Vorbehandlung nur in geringeren Maßen in Apoptose als auch in Nekrose treiben. Um höhere Werte zu erlangen müssten hier die Ausgangsbedingungen geändert bzw. die ausgeübten Reize verstärkt werden.

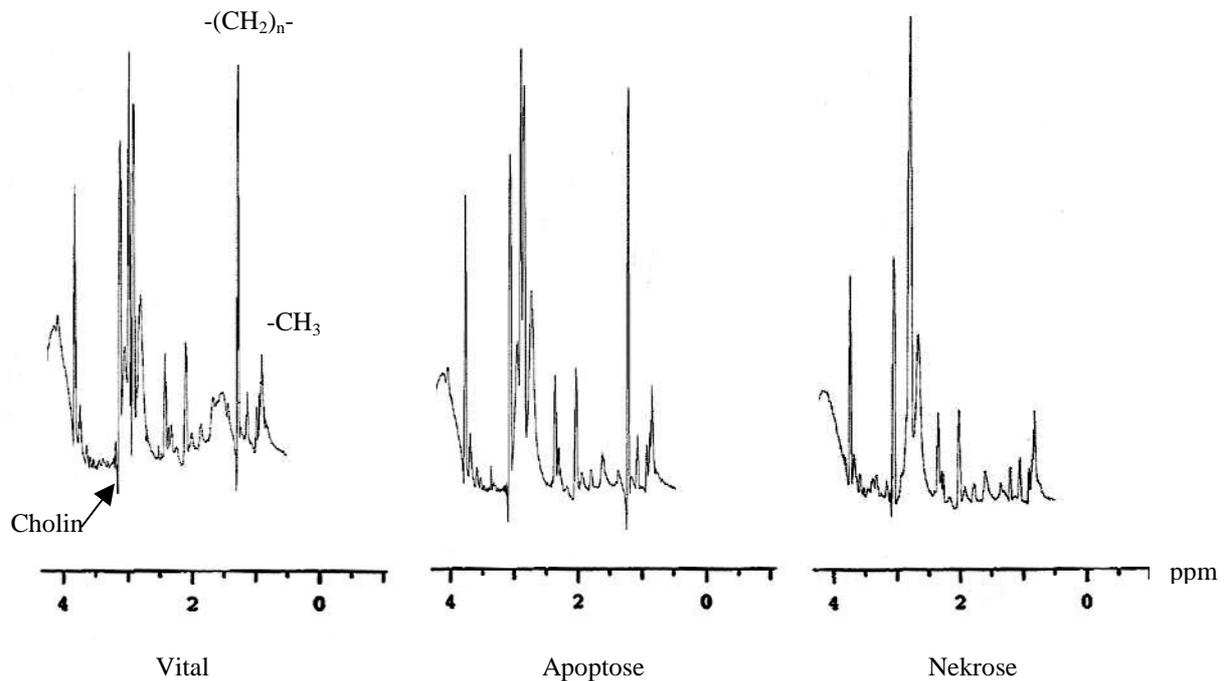


Abbildung 26: Darstellung der drei Zellzustände vital, apoptotisch und nekrotisch mittels ^1HMR -Spektroskopie bei HMEC Endothelzellen

4.8.3 Spektroskopische Analyse der HNO-Zelllinie FaDu

Exemplarisch für die in dieser Arbeit verwendeten HNO-Zelllinien werden im Folgenden die Ergebnisse der Analyse von FaDu-Zellen erläutert. Hier diente die Hyperthermie-Behandlung zur Apoptoseinduktion. Die Zellproben wurden zunächst 90 min bei 43 °C erhitzt und anschließend für 48 h im Brutschrank inkubiert. Die Nekroseinduktion wurde durch Inkubation der Zellen bei 65 °C für 15 min mit anschließender Aufbewahrung im Brutschrank für 48 h eingeleitet. Auch bei dieser Zelllinie ergaben sich unterschiedliche Spektren der drei Zellzustände, die nachfolgend abgebildet sind (Abbildung 27).

Die Methyl- und Methylenresonanzen verhielten sich ähnlich wie bei der Analyse der Jurkat-zelllinie. Die Methylresonanzen blieben bei allen drei Zellzuständen nahezu unverändert. Die Methylenresonanzen dagegen veränderten sich auf unterschiedliche Weise. Es kam zu einem starken Abfall der Intensität während der Apoptose und bei der Nekrose. Ein ähnliches Veränderungsmuster ließ sich für die Intensitäten des Cholinpeaks beschreiben. Es fiel auf, dass er während der Apoptose leicht anstieg. Im Gegensatz dazu, blieb die Cholinresonanz bei der Nekrose nahezu gleich bis leicht vermindert. Insgesamt war bei der

Nekrose eine Auflösung der Zellmembran, bei der Apoptose dagegen ein Umbau zu erhöhter Mobilität hin erkennbar. Auch hier ist parallel zur Spektroskopie eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt worden. Die erzielten Apoptose- bzw. Nekroseraten betragen 25-30 % bzw. 60-70 % (hier nicht gezeigt).

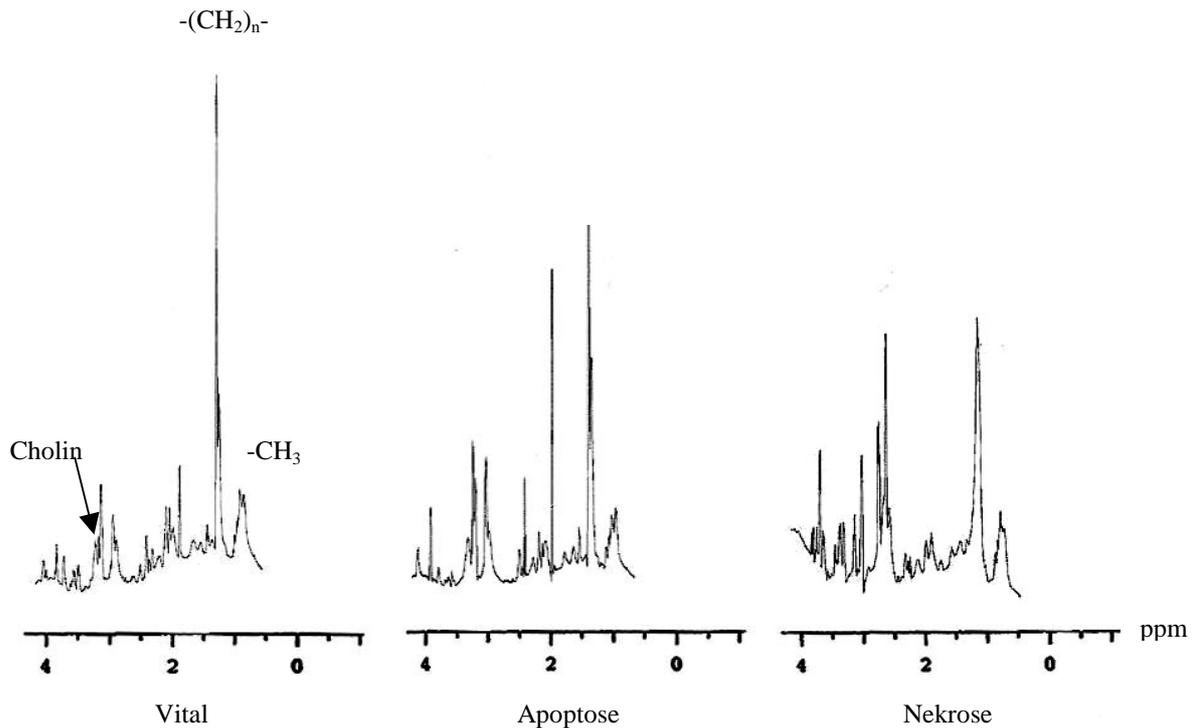


Abbildung 27: Darstellung der drei Zellzustände vital, apoptotisch (Hyperthermie) und nekrotisch mittels ^1H MR-Spektroskopie bei FaDu-Zellen

4.8.4 Zusammenfassung

In nachfolgender Tabelle sind die bei der Auswertung der magnetresonanzspektroskopischen Ergebnisse verwendeten Parameter und ihre charakteristischen Veränderungen während der Zellzustände vital, apoptotisch und nekrotisch dargestellt. Anhand dieser gezeigten Ergebnisse lassen sich spektrale Muster aufgrund ihrer unterschiedlichen Resonanzverteilung eindeutig zuordnen.

<i>Parameter</i>	<i>Vital</i>	<i>Apoptose</i>	<i>Nekrose</i>
CH ₂ /CH ₃	>> 1	~ 1	≥ 1
Doppelbindung		↑↑	
Cholin		↑	↑↓
Laktat			↑↑
Resonanzbreite		↓	↑↓

Tabelle 3 : Zusammenfassende Darstellung der charakteristischen Veränderungen einzelner mittels ¹H-MRS gemessener Parameter während der Zellzustände Vital, Nekrose und Apoptose

Die spektralen Resonanzmuster lassen sich so deuten, dass Membranen apoptotischer Zellen aufgrund von Konformationsänderungen der Lipidmatrix eine Erhöhung der Fluidität aufweisen, nekrotisch geschädigte Zellen und ihre Membranen dagegen einen Auflösungsprozess erleiden. Zusammengefasst erkennt man, dass sich molekularpathologische Veränderungen zeigen, die flusszytometrisch gar nicht oder schwer unterscheidbar sind, magnetresonanzspektroskopisch jedoch klar differenziert werden können. Damit wäre die Möglichkeit gegeben durch spektroskopische online Darstellung der Molekularpathologien der verschiedenen Zellzerstörungsmechanismen, die Wirkung therapeutischer Reize zu steuern und eventuell in die gewünschte Richtung der Apoptose zu lenken.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der Analyse des apoptotischen und nekrotischen Zelluntergangs in der Onkologie

Die Onkologie beschäftigt sich mit der Entstehung und Behandlung von Tumoren und tumorbedingten Erkrankungen. Hierbei stehen vor allem die frühe Erkennung der Erkrankung und die Optimierung der zur Verfügung stehenden Therapieformen im Vordergrund. Ein „Tumor“ bezeichnet im allgemeinen eine Geschwulst, d.h. eine örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens. Im engeren Sinne bedeutet das eine gewebliche Neubildung in Form eines spontanen, verschiedengradig entdifferenzierten, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe⁹⁶. In der Regel ist dieses Wachstum mit einem unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden, was zu ihrer Klassifikation dient. So zeichnen sich benigne Tumoren mit differenzierten Zellen durch langsames, lokal verdrängendes Wachstum aus. Maligne Tumorzellen dagegen sind durch ihre Kernpolymorphie und Zellatypie mit infiltrierendem und meist raschem und destruierendem Wachstum und konsekutiver Metastasierung gekennzeichnet. Neben dem Wachstum spielt auch der Zelluntergang eine große Rolle. Hierbei lassen sich zwei wichtige Formen unterscheiden, die Nekrose und die Apoptose. Die Nekrose lässt sich als eine durch pathologische Zellschädigung ausgelöste, irreversible Zellzerstörung deuten. Die Apoptose dagegen ist ein Phänomen, das sowohl physiologisch (Embryologie, Differenzierung von Lymphozyten etc.)⁴⁰⁻⁴⁴ als auch pathologisch (durch mutagenisierende Schädigung etc.) vorkommen kann. Als Apoptose-Induktoren gelten u.a. mutagene Schädigungsreize⁴⁶, Chemotherapeutika^{47, 48}, Hyperthermie^{50, 51}, Hormone⁴¹ bzw. Rezeptor-Liganden⁶³⁻⁶⁹. Ein entscheidender Unterschied zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelluntergang liegt darin, dass bei der zuletzt genannten Form des Zelluntergangs keine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe ausgelöst wird. Somit stellt der apoptotische Zelluntergang eine für das umliegende Gewebe schonendere Art und Weise des Zelltods dar.

Untersuchungen konnten zeigen, dass tumoröses Gewebe dazu neigt, neben erhöhten Nekroseraten auch hohe Apoptoseraten aufzuweisen, möglicherweise zur Regulation der durch die Karzinogenese gesteigerten Proliferationsraten der Zellen. Die Einwirkung bestimmter stimulierender Faktoren, wie des Tumor Nekrose Faktors α (TNF- α), oder zytotoxischer T-Lymphozyten oder die Nähe von ischämischen Nekroseherden, können

erhöhte Apoptose- und Nekroseinduktionen bei Tumoren bewirken⁴¹. Die Größenzunahme von Tumoren ist u.a. als Folge von ungesteuertem Wachstum durch verminderte Apoptose erklärbar. Dies könnte auch den Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 erklären, dessen Mutationsformen einen der häufigsten genetischen Defekte bei Tumoren darstellen. Bestimmte Mechanismen der Apoptoseinduktion, wie Hyperthermie^{47, 52} oder Bestrahlung⁸², funktionieren nur im Beisein von intaktem p53, was einen der möglichen Zusammenhänge zwischen Apoptose, Nekrose und Tumorgewebe erklären könnte.

Der apoptotische Zelluntergang, lässt sich beispielsweise bei der Tumorbekämpfung nutzen, indem versucht wird entartetes Gewebe durch induzierte Apoptose, dem schonenderen Zelluntergang, zu zerstören. Es gibt aber auch weitere Anwendungen der Zelltodforschung im Bereich der klinischen Onkologie, die auf Nachweis von apoptotischen Zellen basieren. Beispielsweise spielt die Bestimmung der vorliegenden Apoptoserate in Tumoren vor Beginn der Therapie bei einigen Tumorarten eine große Rolle⁹⁷. Das Wissen über die Proliferationsrate und die zusätzliche Information über die Sterberate der Zellen ermöglicht eine viel genauere Aussage zur Prognose, bzw. ist eine große Hilfe bei der Wahl der optimalen Therapieform zur Bekämpfung des Tumorleidens.

Weiterhin ermöglicht die Analyse der Apoptoserate während der laufenden Therapie eine frühzeitige Beurteilung der Effektivität des angewandten Verfahrens, noch bevor sich andere klinische Parameter messbar verändern. Beispielsweise konnten mit dieser Methode die Effektivität unterschiedlicher Medikamente bei der Behandlung von verschiedenen Formen der Leukämie⁹⁰ aufgedeckt werden. Zwar ist eine Apoptoseinduktion zur Therapie der Leukämie nicht zwingend erforderlich, aber man fand heraus, dass die durch bestimmte Medikamente, wie beispielsweise Taxol, induzierte Apoptoserate sehr gut mit einer positiven klinischen Antwort im Sinne einer Remission korreliert⁹⁷.

Als ein anderes Anwendungsgebiet der Apoptosemessung wäre die prognostische Beurteilung einer Infektion mit HIV zu nennen. Hierbei werden spontane bzw. induzierte Apoptoseraten bei Lymphozyten während einer HIV-Infektion⁹⁷ gemessen, um so das Stadium dieser Krankheit erkennen und verfolgen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vorrangig die Zusammenhänge von Apoptose und Nekrose in Tumorzellen aus dem Kopf-Hals-Bereich genauer betrachtet werden. Dazu gehörte zunächst die Induzierbarkeit von apoptotischen bzw. nekrotischen Vorgängen bei Plattenepithelkarzinomen aus diesem Bereich und ihre Quantifizierung.

5.2 Induzierbarkeit der Apoptose und Nekrose

Die Apoptose- bzw. Nekroseinduzierbarkeit sollte an den Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs *FaDu* (Pharynxkarzinom), *GHD-1* (Hypopharynxkarzinom), *HLaC 78* (Larynxkarzinom) und *PCI-1* (Hypopharynxkarzinom) verifiziert werden. Zusätzlich wurden die Lymphomzelllinien *BL 41* (B-Zell-Lymphom) und *Jurkat* (T-Zell-Lymphom) und die Endothelzelllinie *HMEC* (Human Endothelial Cells) untersucht.

5.2.1 Apoptoseinduktion

Wie bereits weiter oben erwähnt, bezeichnet die Apoptose einen Vorgang des Zelluntergangs, der sowohl physiologisch, aber auch durch pathologisch induzierte Reize ausgelöst werden kann. Da unterschiedliche Zellen auch verschieden auf die auf sie ausgeübten Apoptosereize reagieren, mussten für die vorliegende Arbeit die oben genannten Zellsysteme erst auf ihre Apoptose-Induzierbarkeit getestet werden. Das heißt, dass zunächst aus den verschiedenen Induktionsverfahren für Apoptose die geeignetste für die zur Verfügung stehenden Zelllinien gefunden werden musste.

Aus diesem Grund wurden aus den in der Literatur zahlreich beschriebenen Apoptoseinduktionsverfahren spezifische Methoden ausgewählt und erprobt: Reduktion des Serumgehalts im Kulturmedium, Methotrexat- (MTX), Hyperthermie- und Antikörperbehandlung (CD 95).

5.2.1.1 Serumreduktion

Die Reduktion des Serumanteils des Kulturmediums ist eine einfache Methode zur Apoptoseinduktion. In der Literatur sind Apoptoseeinleitungen durch eine Reduktion des Serumanteils von 10 % auf 1 % bei B-Zell-Lymphom Zelllinien (BL) beschrieben. Dive und Mitarbeiter wiesen unter Gebrauch dieser Methode nach 48-stündiger Inkubation in serumreduziertem Medium einen Apoptoseanteil von bis zu 14 % nach⁹⁸. Als Nachweisverfahren verwendeten sie neben der DNA-Gelelektrophorese die Beurteilung von Größen- und Granularitätsveränderungen der Zellen und die einfache Anfärbung mit Propidiumiodid zur durchflusszytometrischen Analyse.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Serumreduktion bei den Lymphomzelllinien BL 41 und Jurkat erprobt. Die durchflusszytometrischen Messungen mittels TUNEL-Assay konnten bereits nach 1-2 Stunden Inkubationszeit in reduziertem Medium bei der Linie BL 41 Apoptoseraten von bis zu 30 % nachweisen. Messungen mittels Annexin-Anfärbung oder nach Inkubation in hypotonem Puffer ergaben sich bei diesen Zellen Apoptoseraten von 14-

30 %, was sich mit den Angaben aus der Literatur deckt. Ähnlich verhielt es sich für die Lymphomzelllinie Jurkat, die sich wie in der Literatur beschrieben mittels Serumreduktion in Apoptose treiben ließen⁹⁹. Da für die nachfolgend geplanten MRS-Untersuchungen höhere Apoptoseraten erforderlich waren, wurden eine Reihe weiterer Apoptoseinduktionsverfahren ausgetestet.

5.2.1.2 Methotrexatbehandlung

Medikamentös induzierte Apoptose ist in der Literatur eine weit verbreitete Methode zur Apoptosemessung. Die meisten Autoren verwenden Glucocorticoide wie Dexamethason^{90, 92, 100-103} und Methylprednisolon^{98, 104}, Alkylantien wie Cisplatin⁹⁸, Proteinkinase und Topoisomerasehemmer wie Staurosporine¹⁰⁵, Camptothecin^{100, 104, 105}, Etoposide¹⁰⁰ und Olomoucine¹⁰⁶. Die dabei induzierten Apoptoseraten betragen meistens 30-40 %, im höchsten Fall 70 % bei durch Dexamethason induzierter Apoptose an Thymozyten, nachgewiesen durch Inkubation in hypotonem fluorochromen Puffer⁹².

Wir verwendeten im Rahmen dieser Arbeit den Folsäure-Antimetaboliten Methotrexat (MTX). Dieses Zytostatikum wird u.a. häufig erfolgreich bei der Chemotherapie von Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich (SCCHN) eingesetzt¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Als Modellsystem wurde die Lymphomzelllinie Jurkat mit MTX behandelt und durchflusszytometrischen Analysen unterzogen. Mit dieser Induktionsmethode konnten Apoptosewerte von bis zu 40 % erzielt werden, was im Bereich der in der Literatur gezeigten Werte liegt.

Da Silva et al. konnten die Apoptoseinduktion bei MTX behandelten Jurkat-Zellen durch die Beobachtung verschiedener Apoptose-typischer Strukturveränderungen, wie Chromatinkondensation, nukleäre Fragmentierung und Bildung von Apoptosekörperchen nachweisen¹¹⁰. Nachforschungen über den Wirkungsmechanismus ergaben einen Zusammenhang zwischen chemotherapeutisch (v.a. MTX) erzielter und CD 95-assistierter Apoptoseinduktion. Die MTX-induzierte Apoptose scheint zwar Fas-unabhängig eingeleitet zu werden, benutzt aber im weiteren Verlauf den gleichen Apoptose-Pfad wie das CD 95-System^{111, 112}.

Mit dem Ziel noch höhere Apoptoseraten für die bevorstehenden MRS-Versuche erzielen zu können, wurden die unten aufgeführten Induktionsverfahren getestet.

5.2.1.3 Antikörper-induzierte Apoptose

Auch hier wurde im Modellversuch die T-Lymphomzelllinie Jurkat verwendet, die bekanntermaßen den Fas-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Zellen wurden in unserem Versuchsaufbau circa 30 min mit Anti-CD 95 inkubiert, anschließend 6 h im Brutschrank aufbewahrt und dann durchflusszytometrischen Analysen unterzogen. Durch den von uns verwendeten anti-CD 95 Antikörper (Pharmingen, clone DX2) konnten bis zu 21 % Annexin-positive Jurkat-Zellen generiert werden, ein im Vergleich zur Literatur niedriger Wert. Der niedrigere Prozentsatz könnte an einer nicht-optimalen Auswahl des Antikörpers, an mangelnder Antikörper-Konzentration oder an zu geringen Inkubationszeiten liegen, obwohl alle Versuche stets in Form von Kinetiken aufgebaut wurden, um alle Parameter optimieren zu können. Koester et al. konnten mit einem ähnlichen Versuchsaufbau unter Verwendung des Antikörpers anti-CD 95 (7C11, Coulter Corporation, Miami, Florida) bis zu 70 % Annexinpositive Jurkat-Zellen nachweisen¹⁰². Die Inkubationszeit mit dem Antikörper der Konzentration 1,0 µg/ml pro 1×10^6 Zellen in 1 ml serumfreiem Medium betrug bei dieser Arbeitsgruppe bis zu 18 Stunden. Berthou et al. verwendeten zur Apoptoseeinleitung epidermale Keratinozyten, die den Fas-Liganden an ihrer Oberfläche vorweisen. Diese sollten im Rahmen der Studie die erwünschte Antigen-Antikörper-Reaktion an Jurkat-Zellen auslösen¹¹³. Hierfür wurden ca. $1,5 \times 10^6$ Keratinozyten mit ca. 5×10^5 Jurkat-Zellen bis zu 18 h inkubiert und analysiert. Diese Arbeitsgruppe konnten eine Rate an Annexin-positiven Zellen von circa 60 % erzielen. Hierbei muss beachtet werden, dass der wahre Anteil an apoptotischen Zellen stets niedriger als die Anzahl der Annexin-positiven Zellen ist. Die wahre Apoptoserate wurde in diesem Fall nicht bestimmt.

Bei den uns zur Verfügung stehenden HNO-Zelllinien, konnten wir analog zur Literatur^{114, 115}, den Nachweis über die Expressierung des Fas-Rezeptors an der Zelloberfläche erbringen und auf diesem Wege Apoptose induzieren. Der Anteil an Annexin-positiven Zellen betrug je nach Zelllinie zwischen ca. 15-28 %.

5.2.1.4 Hyperthermie

Im Hinblick auf unser Ziel, apoptotische und nekrotische Vorgänge mittels hyperthermer Behandlung, wie beispielsweise regionale Hochfrequenz Hyperthermie oder Laser-unterstützte Hyperthermie, erzielen und diese Therapieverfahren online mittels MRS optimieren zu können, haben wir uns im weiteren Vorgehen auf die Apoptose-Induktionsmethode der Hyperthermie im Zellmodell konzentriert. Ein Wärmereiz von circa

42-44 °C durch Inkubation der Zellen in einem Wasserbad über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten ist in der Lage den Vorgang der Apoptose einzuleiten⁵⁴. In der Literatur werden verschiedene Zellsysteme wie promyelotische Leukämiezellen⁹⁷ oder Mastrozytomzellen¹⁰⁵ in diesem Zusammenhang beschrieben. Bei der zuletzt genannten Zellart konnten Apoptoseraten in Höhe von 13 % mittels Inkubation in hypotoner fluorochromer Lösung ermittelt werden.

In unseren Versuchen konnten Hyperthermie-behandelte Jurkat-Zellen (90 Minuten bei 43°C) nach Inkubation in hypotonem Puffer zu einem Prozentsatz von bis zu 25 % in Apoptose getrieben werden. Bei Hyperthermie-Versuchen der HNO-Zelllinien konnten je nach Zelltyp unterschiedliche Ergebnisse ermittelt werden. Die Linien FaDu und GHD-1 reagierten mit der größten Apoptoserate auf den ausgeübten Reiz und zeigten nach Annexinmarkierung einen Prozentsatz von > 60 % an Annexin-positiven Zellen.

5.2.2 Nekroseinduktion

Im Rahmen dieser Arbeit ist nicht nur die Detektion der Apoptose im Vergleich zu vitalen Zellen, sondern auch das Erkennen und Differenzieren von nekrotischen Zellpopulationen wichtig. Die Nekrose, ein weiterer Vorgang des Zellabsterbens, wird durch pathologische Reize wie beispielsweise ionisierende Strahlen, Toxine, Hypoxidosen, lange und starke Hitzeeinwirkung, bakterielle oder virale Infektionen in einem Zellverband ausgelöst. Voraussetzung hierfür ist die Überschreitung eines sogenannten „point of no return“, so dass die Zelle keine Kompensationsmöglichkeiten für den schädigenden Reiz aufbringen kann. Hier wurde versucht mittels Hitzeeinwirkung nekrotische Vorgänge zu induzieren.

Die durchgeführten Versuche mit allen verfügbaren Zelllinien ergaben, dass eine 15 minütige Inkubation bei 65 °C bereits für die Nekroseinduktion ausreicht. Die dabei erzielten Nekroseraten betragen > 90 %. Die Auswertung erfolgte jeweils durchflusszytometrisch mittels Annexin-PI-Doppelfärbung oder einfacher PI-Anfärbung.

An dieser Stelle soll noch ein Mal erwähnt werden, dass es sich bei den verwendeten Kulturen um lebende Zellen handelt, die je nach ihrem Zellstatus unterschiedlich auf die ausgeübten Reize reagieren. Selbst bei den zur Kontrolle herangezogenen Proben kommen apoptotische und nekrotische Teilpopulationen vor. Bei Ausübung eines ausgewählten Apoptose-Reizes lässt sich immer nur ein bestimmter, empfänglicher Anteil der Gesamtpopulation in die gewünschte Richtung lenken. Dies erklärt die erzielten Apoptoseraten von circa 20-40 %. Weiterhin muss man sich vor Augen führen, dass bei der Apoptoseinduktion auch ein gewisser Anteil der Zellen in den nekrotischen Zustand

überführt wird. Anhand von Abbildungen, die eine Annexin-PI-Doppelfärbung zeigen, lassen sich diese Veränderungen gut nachvollziehen.

5.3 Durchflusszytometrische Methoden zur Charakterisierung der *in vitro* induzierten Apoptose bzw. Nekrose

Die Durchflusszytometrie ist mittlerweile zum Mittel der Wahl bei der Analyse von Apoptose an unterschiedlichen Zellsystemen geworden^{97, 104}. Sie bietet im Vergleich zu konventionellen Methoden wie beispielsweise der Gelelektrophorese zahlreiche Vorteile. Durchflusszytometrische Verfahren ermöglichen die Isolierung und Identifikation von zellulären Subpopulationen und erlauben eine gleichzeitige Beurteilung mehrerer Zellparameter¹⁰⁰. Daher sind sie besonders gut zur Differenzierung von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen geeignet, welche sich morphologisch und aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz-Bindungseigenschaften voneinander abgrenzen. Zusätzlich können in den gemessenen Zellpopulationen einzelne Zellen quantitativ analysiert werden¹⁰⁰. Kombiniert man die multiparametrischen Analysen der Durchflusszytometrie mit immunhistochemischen Detektionsmethoden, hat man die Möglichkeit einer präzisen Beurteilung der am Apoptoseprozess beteiligten Komponenten und ihrer Interaktionen. Anhand des DNA-Gehalts oder Apoptose-typischer Proteine kann man die unterschiedlichen Apoptosestadien einer Zelle charakterisieren, die mitwirkenden regulatorischen Gene beurteilen, die Wirkung von zytotoxischen Drogen bestimmen oder die Auswirkung ihrer Modifikationen untersuchen. In der Literatur werden eine Vielzahl von durchflusszytometrischen Markierungsmethoden beschrieben, die in ihrer Spezifität und Sensibilität stark abweichen können^{90-92, 97, 98, 100-106, 113, 116}. Die verschiedenen Methoden betrachten Veränderungen der Zellgröße, der Granularität, der Zellorganellen, der Plasmamembranstruktur und des DNA-Gehaltes während des Apoptosevorganges im Vergleich zur Nekrose oder zu vitalen Zellen.

Im Folgenden sollen die gängigsten Markierungsverfahren aus der Literatur zusammengefasst und mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen verglichen werden.

Die Anwendung unterschiedlicher durchflusszytometrischer Analyseverfahren erklärt sich daraus, dass die mit den einzelnen Markierungsverfahren erfassten Veränderungen der Zelleigenschaften in Abhängigkeit vom Fortschreiten des apoptotischen Zustandes der Zellen, dem Zelltyp und der Apoptose-Induktionsmethode stark variieren können. Somit ergibt sich kein allgemein gültiger Leitfaden in bezug auf die Anwendung des

Induktionsverfahrens, der Induktionsdauer oder der Markierungsverfahren. Vielmehr erfordert diese starke Variabilität viele Vorversuche, um ein geeignetes Zellsystem mit passendem Induktions- und Messverfahren etablieren zu können. Auch in der vorliegenden Arbeit mussten verschiedene Apoptose-Induktionsmethoden und -Nachweisverfahren ausprobiert werden, um ein geeignetes Apoptosesystem für die anschließenden MR-spektroskopischen Messungen zu etablieren.

5.3.1 Lichtstreuung

Morphologische Veränderungen apoptotischer und nekrotischer Zellen lassen sich mit einfachen Methoden, d.h. auch ohne Anwendung eines speziellen Markierungsverfahrens, durchflusszytometrisch darstellen. Hierbei wird das unterschiedliche Lichtstreuungsverhalten einzelner Zellen beim Passieren des Laserstrahls analysiert, genauer die Intensitäten des Vorwärts (FSC)- und des Seitwärtsstreulichtes (SSC). Bei der Auftragung dieser Parameter gegeneinander, was der Darstellung der Zellgröße (FSC) gegen die Zellgranularität (SSC) entspricht, lassen sich für Apoptose und Nekrose typische Charakteristika aufzeigen. Diese morphologische Unterscheidungsform der Vitalitätszustände wird in vielfältigen Apoptosesystemen in der Literatur beschrieben. Darunter befinden sich u.a. Apoptosemessungen bei mit Methylprednisolon bzw. Dexamethason behandelten Thymozyten^{90, 100, 104}, bei in reduziertem Medium kultivierten, bestrahlten oder IL-2 supprimierten Lymphomzellen^{98, 99, 101} oder bei Cisplatin-behandelten Ovarialzellen⁴⁷ und Hepatomzellen⁹⁸.

Apoptotische Zellen werden hierbei stets durch eine Abnahme ihrer Zellgröße und einer gleichzeitigen Zunahme der zellulären Granularität charakterisiert^{97, 98, 101}. Dies entspricht den Stadien der Zellschrumpfung mit Chromatinkondensation, oder DNA-Fragmentation bzw. dem Zerfall in sogenannte „Apoptose-Körperchen“⁴¹. Es wird auch eine Abnahme beider Parameter in späteren Phasen der Apoptose in bestimmten Zellsystemen beschrieben⁹⁷.

Lichtstreuungsanalysen nekrotischer Populationen hingegen werden in der Literatur durch einen Anstieg der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung bei beginnender Nekrose und anschließend einem starken Abfall beider Parameter charakterisiert⁹⁷. Dies entspricht der Beobachtung des Anschwellens der nekrotischen Zelle bis hin zur Ruptur ihrer Zellmembran mit anschließendem Verlust des Zellinhaltes.

In der vorliegenden Arbeit wurde obligatorisch bei allen Messungen eine Beurteilung der Zellen anhand der Lichtstreuungsverhältnisse durchgeführt. Hier exemplarisch dargestellt

zeigen apoptotische Zellen sowohl bei den Lymphom- als auch bei den HNO-Zelllinien wie erwartet eine deutliche Abnahme der Zellgröße und eine leicht ansteigende bis gleichbleibend niedrige Granularität. Nekrotische Zellen dagegen sind stets durch einen Anstieg beider Parameter, sowohl der Zellgröße als auch der Granularität, gekennzeichnet. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen in der Literatur. Das bedeutet, dass wir in der Lage waren, in zellulären Modellen gezielt Apoptose und Nekrose zu induzieren und zu untersuchen.

Diese durchflusszytometrische Beurteilung der Vitalitätszustände der Zellen lässt sich schnell und einfach durchführen. Allerdings sind die beobachteten Streulichtveränderungen nicht spezifisch genug für eine Differenzierung. Auch mechanisch zerstörte Zellen, isolierte Zellkerne und sogar nekrotische Zellen zeigen zum Teil verminderte Streueigenschaften und können fälschlicherweise als apoptotische Zellen detektiert werden⁹⁷. Deshalb sollte dieses Verfahren mit anderen, beispielsweise spezifische Zelloberflächenmoleküle nachweisenden Methoden kombiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Beurteilung der unterschiedlichen Streueffekte auch stets nur als Bestätigung apoptotischer bzw. nekrotischer Zellzustände zusätzlich zu anderen Fluoreszenz-Markierungsverfahren gesehen. Sie wurde in Kombination mit dem TUNEL-Assay, dem Annexin-Test und der Markierung mit PI in hypotonem fluorochromen Puffer eingesetzt, um deren Testspezifität zu erhöhen und eine Vergleichsmöglichkeit der unterschiedlichen Methoden zu erhalten.

5.3.2 TUNEL-Assay

Eine zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von Apoptose-Vorgängen in der Literatur weit verbreitete Methode ist der TUNEL-Assay. Das Testprinzip beruht auf der *in vitro* Markierung der 3'-OH Enden von DNA-Fragmenten, die während der Apoptose durch den Abbau von hochmolekularer genomischer DNA durch Endonukleasen entstehen⁸⁹. Apoptose-induzierte Zellen werden hierbei fixiert. Die freien 3'-OH Enden werden mit Hilfe des Enzyms Terminale-desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) mit Nukleotiden markiert, die direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein gekoppelt sind. Markierte DNA kann so flusszytometrisch analysiert werden. Bei manchen Verfahren wird DNA mit Biotin-gekoppelten Nukleotiden markiert. Eine Quantifizierung erfolgt dann über Farbreaktionen mit anschließender lichtmikroskopischer Auswertung.

Durch die TUNEL-Markierung konnten beispielsweise Gavrieli und Mitarbeiter in histologisch untersuchten Gewebeschnitten des Dünndarms apoptotisches Gewebe, das sich

an den Zottenspitzen der Darmschleimhaut befand, detektieren⁹⁰. Die Darmschleimhaut gehört bekanntermaßen zu den proliferationsfreudigen Gewebetypen, was den hohen Anteil an apoptotischen Zellen erklärt. Zur Quantifizierung des Apoptoseanteils wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Hierfür verwendeten Gavrieli et al. Dexamethason-behandelte Thymozyten, die sowohl durch die TUNEL-Methode als auch durch DNA-Gelelektrophorese beurteilt wurden. Das Ergebnis zeigte im TUNEL-Test eine zu Beginn 10 %-ige und nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden einen kontinuierlichen Anstieg auf eine 40 %-ige Apoptoserate. Berthou und Mitarbeiter konnten mit der TUNEL-Methode bei mit Keratinozyten behandelten Jurkat-Zellen Apoptoseraten von bis zu 70 % erzielen¹¹³. Auch Koester et al. arbeiteten mit Jurkat-Zellen, induzierten Apoptose jedoch mit anti-CD 95 Antikörper und konnten mit der TUNEL-Markierung Apoptoseraten von bis zu 94 % nach einer Inkubation von 18 Stunden erreichen¹⁰².

In der vorliegenden Arbeit wurden BL 41-Zellen mit der TUNEL-Methode auf apoptotische Zellvorgänge untersucht. Die zu untersuchenden Zellen wurden vor der Messung durch Reduktion des Serumgehalts ihres Kulturmediums von 10 % auf 1 % in Apoptose getrieben. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte Zellpopulationen mitgeführt und zum gleichen Zeitpunkt den Analysen unterzogen. Die Apoptoseraten, die wir mit diesem Versuchsaufbau erzielten, betragen im Mittel ca. 30 %, was vergleichbar ist mit parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen mit dem Annexin-Test oder der Markierung in hypotoner fluorochromer Lösung.

Die erzielten Apoptoseraten in unseren Messungen müssen daran denken lassen, dass eventuell unsere Apoptoseinduktionsmethode mit Reduktion des Serumanteils keinen ausreichend hohen Apoptosereiz bei der ausgewählten Zellpopulation ausgelöst hat. Dive und Mitarbeiter berichten unter Benutzung des gleichen Induktionsverfahrens über Apoptoseraten von etwa 14 %, allerdings nach fluoreszenzmikroskopischer Beurteilung⁹⁸.

Versuche mit anderen Zellpopulationen wie z.B. Jurkat-Zellen und gleichem Versuchsaufbau zeigten ebenfalls keine höheren Apoptoseraten. Auch durch die Anwendung einer anderen Induktionsmethode wie die Hyperthermie-Behandlung bei 43°C für 90 Minuten ließ sich die mit TUNEL-Assay ermittelte Apoptoserate nicht erheblich steigern. Im Vergleich zu den anderen beiden Apoptosedetektionsverfahren ergaben sich annähernd gleiche Werte von ca. 26-29 % Apoptose.

Wie bereits Kerr et al.^{39, 41} beschrieben haben, ist der Vorgang der Apoptose nur von sehr kurzer Dauer, einige Minuten bis Stunden. Da sich die einzelnen Zellen einer Population im allgemeinen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befinden, wird nicht bei allen

Zellen zur gleichen Zeit Apoptose ausgelöst. Somit befindet sich immer nur ein Teil der Population in dem gewünschten apoptotischen Zustand. Das erklärt die Schwierigkeit, einen möglichst großen Anteil an apoptotischen Zellen während einer durchflusszytometrischen Analyse zu erhalten. Die jeweilige Messung erfasst ja nur einen bestimmten Zeitpunkt des apoptotischen Ablaufs innerhalb der Zellpopulation. Um den idealen Zeitpunkt für die Analyse zu bestimmen, wurden stets alle Versuche in Form von Kinetiken aufgebaut. Es wurden apoptotische Messungen nach unterschiedlich langen Inkubationsdauern durchgeführt. Dabei konnte in einigen Zellreihen anfangs eine Zunahme der Apoptoseraten registriert werden. Leider reagierten nicht alle verwendeten Zellpopulationen auf die gleiche Art und Weise. Es kann daher angenommen werden, dass sich das gemessene apoptotische Fenster eventuell in einem Fließgleichgewicht befindet. Das bedeutet, dass Zellen, die vollständig zugrunde gehen, zu „apoptotischen Bodies“ werden, völlig aus dem Messfenster verschwinden und gleichzeitig wieder neue apoptotische Zellen mit der Messung erfasst werden. Hohe Prozentsätze an apoptotischen Zellen müssen daher immer hinterfragt werden, ob sie beispielsweise um den Anteil an miterfassten vitalen oder nekrotischen Zellen korrigierten Ergebnissen entsprechen, wie wir es in unseren Versuchen immer durchgeführt haben.

Der TUNEL-Assay, der die DNA-Bruchstücke, die während der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose entstehen, markieren kann, stellt im Grunde eine einfache Nachweisform der Apoptose dar. Einerseits ist dieser Test auf jeden Fall bestimmten Methoden, wie beispielsweise der Gelelektrophorese überlegen, wie auch Gavrieli et al.⁹⁰ bei ihren Untersuchungen zeigen konnten: Bei gelelektrophoretischen Kontrollen von apoptotischen Thymozyten konnten erst nach einer Inkubation von 3 Stunden apoptotische Merkmale wie das Leitersystem gesehen werden. Im Gegensatz dazu konnte mittels TUNEL-Assay bereits bei der Ausgangspopulation eine 10 %-ige Apoptoserate nachgewiesen werden, die kontinuierlich anstieg. Andererseits birgt diese Methode auch Nachteile, da sie beispielsweise eine große Anzahl an Zellen für einen Test erfordert. Die Durchführung besteht aus vielen Einzelschritten, die Ursprung möglicher Fehlerquellen und Zellverluste sind. Außerdem ist diese Methode nicht spezifisch für Apoptose, da sie beispielsweise auch vitale Zellen markiert, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden und deshalb ebenfalls markierbare DNA-Fragmente aufweisen. Demnach sind, um den tatsächlichen Apoptoseanteil einer Zellpopulation herauszufinden, zusätzliche Bestätigungstests erforderlich. In der Literatur sind darüber hinaus atypische Apoptosevorgänge beschrieben, die nicht unbedingt eine DNA-Fragmentierung aufweisen^{97, 105, 106}. Dies schließt eine

Anwendung des TUNEL-Tests aus. Aus diesen Gründen kommen in der vorliegenden Arbeit weitere Nachweismethoden zur Unterscheidung und Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellvorgängen zur Anwendung.

5.3.3 ANNEXIN-V-Fluos

Ein weiteres in der Literatur oft erprobtes Markierungsverfahren zur durchflusszytometrischen Analyse der Apoptose ist der Annexin-Test. Diese Methode benutzt den für einen frühen Apoptosevorgang typischen Transfer des Lipoproteins Phosphatidylserin von der Innenseite der zytoplasmatischen Membran auf die Außenseite. Annexin-V, ein Ca^{2+} abhängiges Protein, zeigt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin und kann somit zum Nachweis von apoptotischen Zellen verwendet werden⁹¹. Allerdings muss beachtet werden, dass auch nekrotische Zellen aufgrund ihres Verlustes der Membranintegrität Annexin binden können. Deshalb ist hier zur Differenzierung der Annexin-positiven Zellen eine weitere Anfärbung mit DNA-Farbstoffen, wie Propidiumiodid (PI), erforderlich. PI kann bekanntermaßen nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen durchdringen und nur dann zu einer positiven Reaktion führen. Eine simultane Anwendung beider Markierungsverfahren erlaubt so eine einfache Unterscheidung der Vitalitätszustände.

Veränderungen der Membranzusammensetzung scheinen ein universales Phänomen der Apoptose darzustellen und sind somit bei den meisten Zelltypen von Säugern, Pflanzen oder Insekten zu beobachten¹⁰³. In *in vivo* Versuchen an Mäusen konnten nach Injektion des Annexin-V-Proteins apoptotische Zellen in den nachfolgend histologisch untersuchten Gewebeschnitten, beispielsweise des Thymus, nachgewiesen werden¹⁰³. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die markierten apoptotischen Zellen nicht über das ganze Gewebe verteilt waren, sondern nur in kleineren Gruppen auftraten. *In vitro* wurden bereits Annexin-V-gekoppelte Messungen des Apoptosevorgangs u.a. an B-Lymphozyten⁹¹, peripheren Neutrophilen⁹¹ und an Ratten-Thymozyten¹⁰³ beschrieben. Letztere Arbeitsgruppe konnte beispielsweise mittels Dexamethason-Behandlung eine Apoptoserate von 44 % erreichen. Vermes und Mitarbeiter⁹¹ konnten an der humanen Leukämie-Zelllinie HSB-2 durch Bestrahlung oder Dexamethason-Behandlung Apoptosewerte von max. 25 % erzielen. Bei den Versuchen von Koester und Mitarbeitern¹⁰² wurden bis zu 80 % der mit dem anti-CD 95-Antikörper behandelten Jurkat Zellen in Apoptose getrieben, wobei bereits die Kontrollpopulationen eine Apoptoserate von bis zu 14 % aufwiesen. In anderen Versuchen,

wie von Berthou et al.¹¹³, zeigten die gleichen Zellen nach Kontakt mit Keratinozyten einen Apoptoseanteil von 60 %.

In der vorliegenden Arbeit wurde das durchflusszytometrische Markierungsverfahren mit Annexin-V-Fluos zunächst an den in der Literatur oft verwendeten Lymphom-Zelllinien BL 41 und Jurkat erprobt. Die Zelllinie BL 41 wurde in diesem Fall durch Serumreduktion in Apoptose getrieben, wobei ca. 14 % der Zellen Annexin-positiv waren. Bei der Jurkat-Linie wurde für die Versuche auf verschiedene Weisen Apoptose induziert, sowohl durch MTX Zusatz, als auch durch Aktivierung des Fas-Systems und durch Hyperthermie Behandlung. In allen Fällen konnten bei der Analyse nach Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI mit der Literatur vergleichbare Apoptoseraten von ca. 21-35 % erzielt werden. Im Vergleich der Testverfahren TUNEL und Annexin konnte festgestellt werden, dass durch die Annexin-Methode mit PI-Doppelfärbung differenzierter und vor allem zeitlich früher als der TUNEL-Assay apoptotische Zellpopulationen detektiert werden¹⁰³.

Aus der Literatur sind bislang keine Daten zu Apoptoseinduktion durch Hyperthermie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse veröffentlicht. Unser Ziel war es daher, die Apoptoseinduzierbarkeit und Quantifizierung bei HNO-Zelllinien zu erproben. Hierbei wurden die zur Verfügung stehenden adhärennten HNO-Zelllinien nach einer hyperthermischen Behandlung dem Annexin-Test unterzogen. Die einzelnen Zelltypen zeigten demnach unterschiedlich hohe Apoptoseraten. Nach Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI konnten bei den Zelllinien FaDu und GHD-1 maximale Apoptoseraten von bis zu ca. 29 % nachgewiesen werden. HLaC 78 beispielsweise reagierten mit Apoptoseraten von ca. 12-15 %. Gründe hierfür können sein, dass die verschiedenen HNO-Zelllinien unterschiedlich auf den gleichen Apoptosereiz reagieren. Dies kann sich äußern in unterschiedlichen Reaktionskinetiken mit verschiedenen Reaktionsmaxima der einzelnen Zelllinien, oder beispielsweise in einer mangelnden Phosphatidylexpression an der Zelloberfläche.

In der nächsten Versuchsreihe wurden die gleichen Zellpopulationen durch Aktivierung des Fas-Systems (CD 95) in Apoptose getrieben. Wie in der Literatur berichtet^{114, 115}, konnten auch wir die Expression von Fas-Rezeptoren bei SCCHN nachweisen. Wie bereits bei den Hyperthermie-Versuchen fiel auch hier auf, dass die einzelnen HNO-Zelllinien unterschiedlich auf den gleichen Apoptosereiz reagieren. Die Linien PCI-1, FaDu und GHD-1 zeigten die größte Resonanzen mit Annexin-positiven Zellen von bis zu 28 %.

Zu beachten ist die Tatsache, dass adhärenente Zellen, die vor den jeweiligen Versuchen aus ihrem Zellverband gelöst werden müssen, meistens schon auf das dabei verwendete Enzym, wie beispielsweise Trypsin, oder auf die angewandten physikalischen Maßnahmen zur Zellablösung mit Einleitung von apoptotischen Vorgängen reagieren. Das bedeutet, dass in solchen Fällen falsch positive Ergebnisse durch einen zu hohen apoptotischen Anteil, oder aber falsch negative Ergebnisse, durch beispielsweise zu starkes Trypsinieren erzielt werden können. In solchen Fällen muss die Messung der Apoptoseraten bzw. die Markierung der Zellen mit Annexin unter besonderer Behandlung der Zelllinien erfolgen, wie van Engeland und Mitarbeiter nachweisen konnten¹⁰⁶. Apoptoseuntersuchungen mit HNO-Zelllinien liefern sicherlich gute Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeit in der Zukunft um neue Methoden der Tumorbekämpfung gerade im Kopf-Hals-Bereich ermitteln zu können.

5.3.4 Inkubation in hypotoner fluorochromer Lösung

In der Literatur findet sich eine von Nicoletti et al.⁹² entwickelte, einfache und schnelle Methode der Apoptosedetektion, die zudem auch Rückschlüsse auf die Zellzykluspezifität der Apoptose zulässt. Diese misst vor allem apoptotische Populationen in der Spätphase der Apoptose. Bei dieser Methode wird der DNA-Gehalt der Zellen durch Inkubation der Zellen in einem hypotonem Puffer unter gleichzeitiger Anwesenheit von Fluorochromen bestimmt. Die Zellproben werden hierfür über Nacht in einer hypotonen Lösung mit PI-Zusatz inkubiert. Dies führt zur Permeabilisierung der Zellmembran und während dem Ausgleich der osmotischen Druckunterschiede, zur Aufnahme von Flüssigkeit in die Zelle. Dadurch wird nach erfolgter Permeabilisierung der Zellkernmembran die vorhandene DNA angefärbt und kann so durchflusszytometrisch analysiert werden. Die dabei angefärbte DNA ergibt bei der Analyse von vitalen Zellen einen diploiden Peak. Apoptotische Zellen dagegen weisen aufgrund der DNA-Fragmentierung und des daraus resultierenden DNA-Verlustes durch die permeabilisierte Membran eine geringere DNA-Menge pro Zelle auf, die durchflusszytometrisch durch einen zusätzlichen hypoploiden Peak repräsentiert ist. Bei nekrotischen Zellpopulationen fehlen diese spezifischen Peaks aufgrund einer totalen DNA-Degradation durch nekrotische Abbauprozesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die durch Annexin-Markierung gemessenen Apoptoseraten bei BL 41- und Jurkat-Zellen mit den durch die Markierung in hypotoner fluorochromer Puffer-Lösung erzielten Apoptoseraten verglichen. Zahlreiche Vergleichsversuche bei der durch Serumreduktion induzierten Apoptose bei BL 41 und durch MTX oder Hyperthermie induzierten Apoptose bei Jurkat-Zellen kamen zu

übereinstimmenden Messergebnissen zwischen beiden Markierungsverfahren. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, entspricht die Apoptoserate im Mittel den aus der Literatur bekannten Werten bei ähnlichem Versuchsaufbau. Beispielsweise konnten Vermes und Mitarbeiter mit dieser Methode, sowie nach Annexin-Markierung, Apoptoseraten von 25 % an der humanen Leukämie-Zelllinie HSB-2 nachweisen⁹¹.

Die von Nicoletti verwendeten Maus-Thymozyten ließen sich nach entsprechender Dexamethason-Behandlung zu 70 % in Apoptose treiben⁹². Allerdings muss beachtet werden, dass der hypoploide Peak nicht nur apoptotische DNA repräsentieren kann, sondern beispielsweise auch DNA aus mechanisch verletzten Zellen oder aus Zellen mit einer anderen Chromatinstruktur, die eine Anfärbung durch Fluorochrome erschwert anzeigt⁹⁷. So konnten Mariani et al. zeigen, dass auch Zellsysteme existieren, vor allem aus der hämopoetischen Zellreihe, die keine DNA-Fragmentierung während der Apoptose aufweisen¹¹⁷. In diesen Fällen ist weder die Nachweismethode mit Hilfe des hypotonen Puffers noch die DNA-Gelelektrophorese geeignet, die induzierte Apoptose aufzuzeigen, wobei die morphologischen Veränderungen eindeutig auf apoptotische Veränderungen hinweisen.

In den meisten hier vorliegenden Versuchen wurden beide Verfahren (Annexin und Inkubation in hypotonem fluorochromem Puffer) im Vergleich angewandt, da sich beide Methoden in bezug auf die Beurteilung des Apoptoseausmaßes ergänzen. Da diese Detektionsverfahren jeweils unterschiedliche Phänomene der Apoptose beurteilen, die in unterschiedlichen Stadien der Apoptose auftreten, konnten kleinere Unterschiede in den Messergebnissen in Kauf genommen werden

5.3.5 Vitalitätstest durch Anfärbung mit Farbstoffen

Neben der Beurteilung der Phospholipidzusammensetzung von Zellmembranen durch den Annexin-Test oder des DNA-Gehaltes durch Inkubation in hypotonem fluorochromem Puffer zur Apoptosemessung, existieren auch andere Verfahren zur Vitalitätsüberprüfung. Es gibt Verfahren, die die Tatsache nutzen, dass bei absterbenden Zellen im Gegensatz zu vitalen Zellen veränderte Membranintegritäten vorliegen.

Aufgrund ihrer intakten Zellmembranen nehmen vitale Zellen bestimmte Farbstoffe, wie Trypanblau oder Propidiumiodid, nicht in das Zellinnere auf. Deshalb ermöglichen kurze Inkubationszeiten mit diesen Farbstoffen eine lichtmikroskopische Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen. Trypanblau färbt dabei das Zytoplasma von toten Zellen blau an, vitale Zellen bleiben ungefärbt. PI, ein DNA-Farbstoff, kann ebenfalls nur durch permeabilisierte

Membranen in tote Zellen eindringen und führt dort zu einer Markierung der Nukleinsäuren. Durchflusszytometrische Analysen lassen aufgrund der Färbung auf den Vitalitätszustand schließen. Der PI-Exklusionstest ist praktisch ein durchflusszytometrisches Equivalent der Trypanblau-Anfärbung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Trypanblau-Anfärbung bei der Kultivierung der einzelnen Zelllinien verwendet, um deren Vitalitätszustand zu Beginn der Experimente zu überprüfen. Eine Anfärbung mit dem DNA-Farbstoff PI wurde zur Beurteilung der induzierten Nekrose, aber auch in Kombination mit der Annexin-V-Fluos-Methode zur Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen herangezogen. Dies zeigte, dass ein bestimmter, wenn auch geringer Prozentsatz der Ausgangszellpopulation, bereits vor Experimentenbeginn apoptotisch bzw. nekrotisch war. Somit wurde eine Korrektur der induzierten Apoptose- bzw. Nekroseraten um den Anteil vor Versuchsanfang nötig.

In der Literatur lassen sich zahlreiche Versuche finden, die diese oben erwähnten Methoden anwenden^{97, 98, 100-102, 105}. Sie werden meistens in Kombination mit anderen Detektionsverfahren verwendet.

Darüber hinaus gibt es Apoptosedetektionsmethoden, die die Funktion von Zellorganellen, wie Mitochondrien oder Lysosomen, bei verschiedenen Vitalitätszuständen der Zellen beurteilen. So lässt sich beispielsweise durch Inkubation mit dem Fluorochrom Acridinorange (AO) die Funktion der Lysosomen überprüfen^{97, 98}. Lysosomen vitaler aber auch früh-apoptotischer Zellen sind über ihre aktive Protonenpumpe in der Lage diesen Farbstoff aufzunehmen und einzuschließen. Dagegen können tote Zellen bei einer geringeren extrazellulären Konzentration des Farbstoffes nur sehr wenig von diesem aufnehmen¹⁰⁴.

Dieser Test ist besonders geeignet bei Zellen, die einen hohen Gehalt an Lysosomen aufweisen, wie z.B. Makrophagen, Monocyten usw. Die Zellen lassen sich nach der Anfärbung sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch beurteilen.

Eine genaue Differenzierung von apoptotischen und vitalen Zellen, die sich in der Synthesephase befinden, ist durch diese Nachweismethode allerdings nicht möglich. In dieser Arbeit wurde die Acridin-Orange-Färbung deshalb nur zum mikroskopischen Nachweis der morphologischen Veränderungen von apoptotischen Zellen eingesetzt.

5.4 Gelelektrophorese

Als eine weitere Nachweismethode der Apoptose gilt die DNA-Gelelektrophorese. Sie basiert auf der Sichtbarmachung von circa 200 bp großen DNA-Fragmenten, die sich nach Größe getrennt in Form einer Strickleiter auf dem Agarosegel darstellen lassen. Die

Fragmente entstehen typischerweise während des Vorgangs der Apoptose durch Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen.

Bei zahlreichen Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-gelelektrophoretische Analysen bei der Zelllinie Jurkat durchgeführt. Zur Apoptoseinduktion wurden Methotrexat oder Hyperthermie-Behandlung herangezogen. Unsere elektrophoretischen Analysen konnten keine für die Apoptose typischen Leitersysteme detektieren, obwohl parallel durchgeführte durchflusszytometrische Analysen nach Annexin-Markierung oder Inkubation in hypotonem Puffer einen Apoptoseanteil von 20-30 % nachweisen konnten.

Viele Autoren benutzen diese Methode zum Nachweis der Apoptose, da sie als einfach durchführbar und hinreichend spezifisch gilt^{90-92, 97, 100, 102, 104, 105}. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass es auch, wie schon weiter oben erwähnt, Apoptosesysteme gibt, die keine DNA-Fragmentierung aufweisen^{97, 105, 106, 117}. Außerdem ist anzunehmen, dass eine DNA-Fragmentierung nur während einer kurzen Phase des ganzen apoptotischen Prozesses zu beobachten ist. Das erklärt die Schwierigkeiten, über die auch andere Autoren beim gelelektrophoretischen Nachweis der Apoptose berichten¹¹⁸. Ein weiterer Nachteil ist die mangelnde Quantifizierbarkeit der gemessenen Apoptose. Vergleiche mit der Literatur ergaben, dass die dort verwendeten Apoptosesysteme in parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen Apoptoseraten von > 50 % aufweisen. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass ein hoher Anteil von apoptotischen Zellen vorhanden sein muss, um genügend DNA zur Fragment-Darstellung extrahieren zu können. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Nachweis der Apoptose durch Gelelektrophorese verzichtet.

5.5 Charakterisierung der Zellzustände mittels ¹H-MRS

Ziel kurativer Tumortherapien ist es, eine Elimination aller Tumorzellen aus dem Körper des Patienten zu erreichen. Dies gelingt in einfacheren Fällen durch eine Resektion des Primärtumors. Falls eine kurative Resektion nicht möglich ist, müssen andere Therapieformen, wie Strahlen- oder Chemotherapie hinzugezogen werden. Dieses Therapiekonzept erfordert allerdings häufig eine so hohe Intensität der zellschädigenden Reize, dass letztendlich nicht nur die nekrotische Zerstörung des Tumorgewebes erreicht wird, sondern auch gesundes umliegendes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird. Neuere Therapieansätze versuchen daher sich von einer radikalen nekrotischen Zellzerstörung zu distanzieren und favorisieren die Induktion des apoptotischen Zelluntergangs. Bei diesem physiologischen Vorgang wird der Zelltod ohne begleitende entzündliche Reaktion

eingeleitet und die geschädigten Zellen werden auf schonende Art und Weise mittels Phagozytose aus dem Gewebeverband eliminiert. Um das biologische Prinzip der Apoptose als „sanften“ Zelltod des umliegenden Gewebes für die Therapie von Tumoren nutzen zu können, muss es möglich sein, die molekularen Veränderungen während einer Therapiesitzung erkennen, und sie zielgerichtet simultan steuern zu können. Um eine solche Regelung im Zellmodell oder am Patienten zu erlangen, müssen Marker für die apoptotische und nekrotische Zelldegeneration vorhanden sein, die eindeutig und ohne Verzögerung erkennbar sind.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Parameter wie Kettenlänge und Sättigungsgrad der Membranlipide, ebenso wie die Fluidität von Zellmembranen, biologisch notwendige Regelgrößen zur Steuerung sowohl der normalen als auch der pathologischen Zellfunktionen darstellen^{119, 120}. Diese Parameter lassen sich mit unterschiedlichen klassischen Methoden beurteilen, wie beispielsweise durch histologische Untersuchungen, gaschromatographische Massenspektrometrie, Fluoreszenzpolarisation oder Elektrosinresonanz. Diese bisher nur sehr aufwendig gewonnenen Kenntnisse über die Zellfunktion, können auch mittels Magnetresonanztomographie erhoben werden, mit dem Vorteil die Zellen während der Beurteilung nicht präparieren oder sogar destruieren zu müssen. Im Gegensatz zu den klassischen Untersuchungsmethoden ist nicht nur eine Momentaufnahme der Vorgänge, sondern eine kontinuierliche Beurteilung möglich.

Daher wurde parallel zu den etablierten zellbiologischen Untersuchungen eine online Analyse der Zelluntergangsprozesse mittels der nicht invasiven ¹H-MRSpektroskopie durchgeführt. Da diese Untersuchungsform die simultane Registrierung vieler molekularer Parameter ermöglicht, sind auf diese Weise sind nicht nur Prozesse der intrazellulären Energetik, sondern auch Veränderungen der Zellmembranstrukturen während einer einzigen Analyse erfassbar. Wegen der Möglichkeit des online Monitorings wären damit auch therapeutisch induzierte Veränderungen im Verlauf einer Apoptose oder Nekrose erkennbar und damit auch zeitgleich modifizierbar, z.B. durch Steuerung in Richtung der erwünschten Apoptose. Das bedeutet, dass noch während der Applikation eine Optimierung der Therapie erfolgen kann.

5.5.1 Beurteilung der Malignität mittels ¹H-MRS

Mit Hilfe der Elektrosinresonanz und Fluoreszenzpolarisation wurde gefunden, dass mit zunehmender Malignität d.h. mit abnehmendem Differenzierungsgrad^{121, 122} und

zunehmendem Metastasierungspotential¹²³⁻¹²⁷ des Tumors die Membranfluidität ansteigt. Damit ist zu erwarten, dass mittels der MRS die Malignität ebenfalls beurteilbar ist¹²⁰. Schon 1986 stellten Fossel et al.¹²⁸ die Hypothese auf, dass eine Tumordiagnose durch die ¹H-MR spektroskopische Analyse von speziellen Plasmalipoproteinresonanzen zu stellen wäre. Diese Aussage wurde jahrelang sehr kontrovers diskutiert und gab den Anstoß für viele weitere Untersuchungen in diese Richtung. Bereits frühe MRS-Untersuchungen an transformierten Membranen von Tumorzellen zeigten typische Veränderungen der Membranlipidresonanzen, die als eine Zunahme der Beweglichkeit der Lipide in der Membran gedeutet werden konnten¹²⁹. In neueren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass eine Abnahme des Sättigungsgrades der Lipidketten Ursache dieser Veränderungen ist. Auch der Cholinpeak bei invasiven Tumoren zeigte Veränderungen, die mit einer Zunahme der Beweglichkeit der Lipide in der malignen Membran gedeutet werden können¹³⁰. Speck et al. sprachen von einem Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen Cholinpeaks und des Malignitätsgrades eines Tumors¹³¹. Gerade bei SCCHN konnte eine erhöhte Cholin / Kreatin - Relation festgestellt werden^{132, 133}. ³¹P-MR spektroskopische Messungen an Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs ergaben ebenfalls deutliche Unterschiede im Vergleich zu gesundem Gewebe im Sinne einer Membranauflösung mit Erhöhung des Anteils an mobilen Phospholipiden bei Malignomen^{134, 135}.

5.5.2 Beurteilung der apoptotischen und nekrotischen Degeneration mittels ¹H-MRS

Die Membranfluidität stellt einen entscheidenden Parameter für therapeutische Prozesse dar. So wird die Aktivität membrangebundener Rezeptoren¹³⁶, Enzyme¹³⁷, Transport-¹³⁸ und Zytoskelettproteine¹³⁹ über die Membranfluidität reguliert. Das bedeutet, dass Störungen der Transportvorgänge und pharmakologische Wirkungen an der veränderten Fluidität erkennbar sind oder durch sie beeinflusst werden können. Durch Bestimmung der Fluidität kann die Sensitivität für Zytostatika bestimmt und ggf. erhöht werden^{140, 141}.

Ebenso wie bei der Karzinogenese zeigen sich auch bei der Tumorregression, die über Proliferationsinhibition, Apoptose oder Nekrose ablaufen kann, charakteristische Veränderungen des Membranlipidprofils^{142, 143} aufgrund der Veränderungen der Konformation von Membranlipidketten^{142, 144}. Die Weichenstellung zur Apoptose ist dabei an einer frühzeitig zellspezifisch auftretenden Fluiditätsveränderung erkennbar¹⁴⁵, wobei die Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus, in denen bestimmte Membranlipidkonstellationen bestehen¹⁴⁶, besonders Apoptose-sensibel gegenüber

spezifischen Reizen, wie beispielsweise Wärme¹⁴⁷ oder intrazellulären Energiestörungen sind¹⁴⁸. Der dann durchlaufene metabolische Weg ist dabei nicht streng vorgegeben, sondern sowohl morphologisch als auch molekular variabel¹⁴⁹. So kann in verschiedenen Zellarten, je nach Anteil an freien ungesättigten Membranlipidradikalen entweder Apoptose oder Nekrose entstehen^{150, 151}.

5.5.3 ¹H-MRS Ergebnisse bezüglich Apoptose und Nekrose *in vitro*

Proliferation und Degeneration von Tumorzellen sind mit der ¹H-MRS - Analyse der intrazellulären Energetik nicht-invasiv quantifizierbar¹⁵². Engelmann et al.¹⁵³ konnten bereits ³¹P- und ¹³C-MR spektroskopische Differenzen zwischen den Zellzuständen Apoptose und Nekrose dokumentieren. Die durch Ischämie, Strahlungseffekte u.a. induzierte Apoptose zeigt in der Frühphase einen charakteristischen Verlauf von Phosphatverbindungen, Laktat sowie Kreatin^{154, 155}, ferner Modifikationen in glykolytischen Prozessen¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Später auftretende Marker der Apoptose sind Veränderungen der Choline der Membranlipide^{158, 159}. Vogl und Mitarbeiter konnten an oberflächlich gelegenen Tumoren eine gute Korrelation der ermittelten Konzentrationen an anorganischem Phosphat mit dem Auftreten nekrotischer Bezirke feststellen¹⁶⁰. Insbesondere die CH₂-Methylengruppen der Membranlipide zeigen charakteristische Unterschiede im Verlauf der durch verschiedene Reize in verschiedenen Zelllinien induzierten Apoptose und Nekrose^{161, 162}. Blankenberg et al.^{163, 164} konnten zeigen, dass der Vorgang der Apoptose in der ¹H-MRS Analyse mit einem bis zu fünffachen Anstieg der Resonanz bei ca. 1,3 ppm assoziiert ist, unabhängig von den Apoptoseinduzierenden Reizen. Diese Resonanz repräsentiert die Methylen Protonen (-CH₂-) von mobilen Fettsäuren innerhalb des Plasmamembran-Bilayers. Der Anstieg steht im Zusammenhang mit Veränderungen der Plasmamembranfluidität im Sinne einer Umstrukturierung. Der Methylrest (-CH₃) bleibt dabei unverändert. Eine Abnahme der Mikroviskosität der Plasmamembran könnte eine ausreichende Zunahme der Mobilität dieser Protonen verursachen und damit dem gemessenen Anstieg der Methylenresonanzen in der ¹H-MRS erklären. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen unserer Versuche. In der Regel konnten wir anhand der Methylenresonanzen nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden. Charakteristisch für apoptotische Zellen ist dennoch, in Übereinstimmung mit dem weiter oben erwähnten, eine Zunahme der ungesättigten Fettsäuren, sichtbar allerdings an anderen typischen Resonanzorten. Aus dem Quotienten der beiden Werte CH₂/CH₃ ließ sich in unseren Experimenten zwischen vitalen und degenerativen Zellen unterscheiden. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtet in diesem

Zusammenhang auch von einem Abfall der Cholinresonanz mit beginnender Apoptose, wobei die Ursache noch nicht geklärt ist. Für den Verlust wird sowohl eine progressive Degradation des Cholins, als auch eine während der Apoptose verminderte Anzahl an zytosolischen Cholin-enthaltenden Molekülen diskutiert. Andere Autoren¹⁶⁵ berichten von ähnlichen Phänomenen was die Apoptose angeht. Im Gegensatz dazu zeigen nekrotische Zellen keinen Anstieg oder sogar Abnahme der CH₂-Resonanz und einen schnellen Abfall des Cholins. Im Rahmen der nekrotischen Auflösung der Zellmembran lassen sich diese Beobachtungen gut erklären. Dabei werden die Phospholipide und deren Cholin-köpfe letztendlich zu Phosphat und CH₃-Methylresten abgebaut. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir ein unterschiedliches Verhalten der Cholinresonanz während der Nekrose feststellen entsprechend der verschiedenen Induktionsverfahren, die eingesetzt wurden. Dieses Phänomen ist am ehesten auf die unterschiedlich eingeschlagenen Wege der Zellzerstörung mit dem Ziel der Nekrose zurückzuführen. Hakumäki und Mitarbeiter¹⁶⁶ sprechen dagegen in ihrer Arbeit von einer, im Vergleich zum Wassergehalt gleichbleibenden Cholinresonanz während des Apoptosevorgangs und können Veränderungen des Methyl/Methylen-peaks nicht nachvollziehen. Unterschiede im Versuchsaufbau oder aber andere, nicht apoptotische Ursachen der Methyl/Methylenresonanzänderungen werden dafür verantwortlich gemacht. Von besonderer Bedeutung für unsere Fragestellung sind Ergebnisse, die zeigen, dass antineoplastische Substanzen in verschiedenen Zielzellen andere Effekte zeigen und entweder Apoptose, Nekrose oder Proliferationsstopp auslösen können¹⁶³.

5.5.4 ¹H-MRS Ergebnisse bezüglich Apoptose und Nekrose *in vivo*

Nekrotische und apoptotische Degenerationsprozesse, erkennbar an der Veränderung der intrazellulären Energetik sowie der gesättigten und ungesättigten Membranlipide konnten auch schon *in vivo* direkt an Patienten mit transplantierten Organen¹⁶⁷, neurodegenerativen Erkrankungen¹⁶⁸ oder mit einer Demenz vom Alzheimer-Typ¹⁶⁹ und im Verlauf von Radio- und Chemotherapien an Tumoren^{120, 154, 170, 171} gefunden werden. Auch bei Gentherapien waren MR-spektroskopisch apoptotische Veränderungen im Lipidbereich nachweisbar¹⁷². Ebenso waren Differenzierungen *in vivo* von nekrotischen Gehirntumoren und Abszessen¹⁷³, sowie Rezidiven und Nekrosen¹⁷⁴ möglich.

Die einschlägigen Arbeiten in der Literatur zeigen, dass mittels der MRS-Analyse der Membranstrukturen bzw. der Fluidität und der Energetik signifikante Marker der Zellfunktion und Dysfunktion gewonnen werden können, insbesondere für die im Rahmen

dieses Projekts zu untersuchende nekrotische und apoptotische Degeneration maligner und nicht maligner Zellen. Allerdings ist das eigentliche Potential der MRS, nämlich die online Analyse der molekularen Dynamik der oben erwähnten zellulären Dysfunktionen, nur beschränkt eingesetzt worden¹⁶³. Weitergehende Untersuchungen im Sinne der u.a. Therapiesimulation liegen derzeit in der Literatur nicht vor. Das Ziel des vorliegenden Projekts ist es, gerade die Nicht-Invasivität der MRS für eine online-Analyse der molekularen Dynamik bei zellulären Degenerationsprozessen einzusetzen, so dass eine Steuerung der Therapie in Richtung des apoptotischen Stoffwechselweges hin zunächst in einem *in vitro* Modell und später eventuell direkt am Patienten möglich ist.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen des Zelluntergangs spielen zwei wichtige Prozesse eine entscheidende Rolle, die Apoptose und die Nekrose. Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose die natürliche Form des Zelluntergangs, und dient u.a. der Selbstelimination von nicht-brauchbaren Zellen. Sie kann sowohl als physiologischer als auch pathologischer Vorgang vorkommen und stellt eine für das benachbarte gesunde Gewebe schonende Art und Weise des Zellsterbens dar, da während der apoptotischen Zerstörung im Vergleich zum nekrotischen Abbau keine Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe ausgelöst werden. Die Nekrose dagegen lässt sich stets als pathologischer, irreversibler Prozess deuten, der von starken Mitreaktionen der Nachbarschaft begleitet ist. Das Ziel einer Tumortherapie ist es immer, durch die Ausübung bestimmter Schädigungsreize eine Zerstörung möglichst vieler Tumorzellen zu erreichen. Für die chemische, thermische oder strahlentherapeutische Tumorzerstörung sind oftmals derart hohe Intensitäten des Schädigungsreizes erforderlich, dass letztendlich ein nekrotischer Zelluntergang induziert wird und damit auch gesundes Gewebe zu Schaden kommt. Alternative Therapieansätze versuchen daher, eine selektive Tumorelimination über den Weg der Apoptose zu induzieren, für eine möglichst belastungsarme, aber trotzdem noch wirkungsvolle Tumorzerstörung. Noch höhere Erfolgsraten könnten durch eine adäquate Kontrolle der induzierten Therapiewirkung erreicht werden. Hierfür steht neben den herkömmlichen Verfahren auch die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie zur Verfügung, die es erlaubt, während der Zelldegeneration Veränderungen im Energiemetabolismus und der Zellmembran auf molekularer Ebene zu beobachten. Außerdem ist sie ein nicht-invasives „online“-Verfahren, das simultan zur erfolgten Therapie und ohne Strahlenbelastung ausgeübt werden kann. Somit lässt sich die Effektivität der Therapie rechtzeitig überprüfen und gegebenenfalls optimieren.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Meßsystem etabliert, das eine durchflusszytometrische Differenzierung von apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellzuständen ermöglicht. Dieses Zellsystem diente im Folgenden als Grundlage für vergleichende magnetresonanzspektroskopische Analysen. Es wurden verschiedene Apoptose- und Nekroseinduktionsverfahren ausgetestet, wie beispielsweise Serumreduktion, Zytostatika- (MTX), Antikörper- (CD 95) oder Wärmebehandlung. Als Modell einer Apoptoseinduktion mittels Hyperthermie, wie sie beispielsweise bei einer Laserunterstützten- oder Hochfrequenz-Hyperthermie-Therapie vorkommt, wurde der Wärmebehandlung der Vorzug gegeben, und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten

Lymphom-, HNO- und Endothelzelllinien im Wasserbad behandelt. Zur Apoptoseinduktion wurden sie bei 43°C für 90 Minuten und zur Nekroseinduktion bei 65°C für 15 Minuten inkubiert, und anschließend durchflusszytometrischen Analysen zugeführt. Hierfür wurden verschiedene, in der Literatur etablierte Detektionsverfahren angewendet. Darunter befanden sich Methoden wie die DNA-Gelelektrophorese, Propidiumiodidfärbung, TUNEL-Assay, Markierung mit Annexin-V-Fluos und Inkubation in hypotonem fluorochromen Puffer.

Der nekrotische Zelluntergang war bei allen Zellpopulationen annähernd auf die gleiche Art und Weise auszulösen und lag bei > 90 %. Die Lymphomzelllinie Jurkat und die HNO-Zelllinien FaDu, PCI-1 und GHD-1 wiesen die höchsten induzierbaren Apoptoseraten auf mit Werten von ca. 30-40 %. Die Endothelzellen HMEC ließen sich am wenigsten in den Zustand der Apoptose treiben. Sowohl die Lymphom- als auch die HNO-Zelllinien zeigten durchflusszytometrisch eindeutig nachweisbare Charakteristika der unterschiedlichen Zellstadien. Untersucht wurden Veränderungen der Zellgranularität und -größe, des DNA-Gehalts und der Zellmembranstruktur durch die weiter oben genannten Detektionsverfahren.

Parallel dazu durchgeführte ¹H-MRS Messungen ergaben je nach Zellstatus ebenfalls charakteristische Resonanzmuster. Zusammengefasst sind diese Muster so zu deuten, dass Membranen nekrotisch geschädigter Zellen einen Auflösungsprozess erleiden während Membranen apoptotischer Zellen aufgrund von Konformationsänderungen der Lipidmatrix eine Erhöhung der Fluidität aufweisen. Wesentliches Ergebnis dabei ist, dass sich molekularpathologische Veränderungen zeigen, die flusszytometrisch gar nicht oder schwer unterscheidbar sind, magnetresonanzspektroskopisch jedoch klar differenziert werden können. Durch spektroskopische online-Darstellung der Molekularpathologien der verschiedenen Zellerstörungsmechanismen wäre die Möglichkeit gegeben, die Wirkung therapeutischer Reize zu steuern und auf den gewünschten apoptotischen Weg zu lenken und damit eine für den Patienten schonendere Tumorbekämpfung zu erreichen.

Ein Fortschritt im Sinne der Senkung der Tumor-bedingten Mortalität ist in jedem Fall erstrebenswert. Neben einer verfeinerten Diagnostik zur Früherkennung oder Etablierung neuer Therapieverfahren, ist die Fortführung der Forschung auch auf molekularer Ebene wünschenswert. Nur durch weiterführende Erforschung der Zusammenhänge bei der Tumorgenese und Tumorabwehr lassen sich neue Wege im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes entwickeln.

7. Literaturverzeichnis

1. Parkin DM, Lara E, Muir CS
Estimates of the worldwide frequency of 16 major cancers
Int J Cancer 1988, 41, 184-197
2. Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Hölzel D
Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs
Laryngorhinootologie (in press)
3. Vernham GA und Crowter JA
Head and neck carcinoma-stage at presentation
Clin Otolaryngol 1994, 19, 120-124
4. Hrsg. E. Grundmann
Einführung in die Allgemeine Pathologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994⁹
5. Khuri FR, Kim ES, Lee JJ, Winn RJ, Benner SE, Lippman SM, Fu KK, Cooper JS, Vokes EE, Chamberlain RM, Williams B, Pajak TF, Goepfert H, Hong WK
The impact of smoking status, disease stage, and index tumor site on second primary tumor incidence and tumor recurrence in the head and neck retinoid chemoprevention trial
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001, 10(8), 823-829
6. Haagedoorn, Oldhoff, Bender, Clarke, Sleifer
Basiswissen Onkologie
Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden, 1996
7. Slaughter DL, Southwick HW, Smejkal W
„Field cancerisation” in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin
Cancer (Phila.) 1953, 6, 963-968
8. Strong MS, Incze J, Vaughan CW
Field cancerization in the aerodigestive tract - ist etiology, manifestation and significance
J Otolaryngol 1984, 13, 1-6
9. Field JK
Genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck
Anticancer Res 1996, 16, 2421-2432
10. Williams ME, Gaffey MJ, Weiss LM, Wiczynnski SP, Schuurin E, Levine PA
Chromosome 11Q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993, 119, 1238-1243

11. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zatterstrom UK, Kjellen E, Mertens F, Willen R, Mandahl N, Heim S, Mitelman F
Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck
Cancer 1995, 76, 853-859
12. Spurr NK, Solomon E, Jansson M, Sheer D, Goodfellow PN, Bodmer WF, Vennstrom B
Chromosomal localisation of the human homologues to the oncogenes *erbA* and *B*
EMBO J 1984, 3, 159-163
13. Adamson R, Jones AS, Field JK
Loss of heterozygosity studies on chromosome 17 in head and neck cancer using microsatellite markers
Oncogene 1994, 9, 2077-2082
14. Issing WJ, Wustrow TP, Heppt WJ
Oncogenes related to head and neck cancer
Anticancer Res 1993, 13, 2541-2551
15. Levine AJ
p53, the cellular gatekeeper for growth and division
Cell 1997, 88, 323-331
16. Wustrow TP, Mahnke CG
Causes of immunosuppression in squamous cell carcinoma of the head and neck
Anticancer Res 1996, 16, 2433-2468
17. Young MR, Wright MA, Lozano Y, Matthews JP, Benefield J, Prechel MM
Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer
Int J Cancer 1996, 67, 333-338
18. Zeidler R, Csanady M, Gires O, Lang S, Schmitt B, Wollenberg B
Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1
FASEB J 2000,14(5), 661-668
19. Zbaren P und Lehmann W
Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1987, 113, 762-764
20. Sloopweg PJ, Bolle CW, Koole R, Hordijk GJ
Cause of death in squamous cell carcinoma of the head and neck. An autopsy study on 31 patients
J Craniomaxillofac Surg 1992, 20, 225-227
21. Stupp R, Weichselbaum RR, Vokes EE
Combined modality therapy of head and neck cancer
Semin Oncol 1994, 21, 349-358

22. Wollenberg B, Ollesch A, Maag K, Funke I, Wilmes E
Micrometastases in bone marrow of patients with cancers in the head and neck area
Laryngorhinootologie 1994, 73, 88-93
23. Pantel K, Gath H, Heissler E
Staging of head and neck cancer
N Engl J Med 1995c, 332, 1788-1790
24. Kastenbauer E, Wustrow TPU, Holtmann S
Kopf- und Halsmalignome, Schriftenreihe des Tumorzentrums München, 1994, 2. Auflage
25. Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, Frassica DA, DeSanto LW, O'Fallon WM, Hoverman VR
Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994, 120, 1370-1374
26. Alvi A and Johnson JT
Extracapsular spread in the clinically negative neck (N0): implications and outcome
Otolaryngol Head Neck Surg 1996, 114, 65-70
27. De Bree R, Roos JC, Quak JJ, Den Hollander W, Snow GB, Van Dongen GA
Clinical screening of monoclonal antibodies 323 A3, cSF-25 and K928 for suitability of targeting tumours in the upper aerodigestive and respiratory tract
Nucl Med Commun 1994, 15, 613-627
28. De Bree R, Roos JC, Plaizier MA, Quak JJ, Van Kamp GJ, Den Hollander W, Snow GB, Van Dongen GA
Selection of monoclonal antibody E48, IgG or U36 IgG for adjuvant radioimmunotherapy in head and neck cancer patients
Br J Cancer 1997, 75, 1049-1060
29. Wollenberg B
Immunologische Ansätze zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)
Laryngo Rhino Otol. 77 1998, 631-634
30. Lang S, Zeidler R, Pauli C, Andratschke M, Wollenberg B
IL-2 gene therapy in ENT carcinomas
Laryngorhinootologie 2001, 80(4), 191-195
31. Lang S, Zeidler R, Mayer A, Reiman V, Wollenberg B, Kastenbauer E
Targeting head and neck cancer by GM-CSF-mediated gene therapy in vitro
Anticancer Res 1999, 19(6B), 5335-5339
32. Castro DJ, Saxton R, Lufkin R
Interstitial photoablative laser therapy guided by magnetic resonance imaging for the treatment of deep tumors
Semin Surg Oncol 1992, 8, 233-241

33. Paiva MB, Blachwell KE, Saxton RE, Calcaterra TC
Palliative laser therapy for recurrent head and neck cancer: a phase II clinical study
The Laryngoscope 1998, 108, 1277-1283
34. Blackwell KE, Castro DJ, Saxton RE, Ennevor S, Schiller V, Lufkin RB, Grant E
Real-time intraoperative ultrasonography as a monitoring technique for Nd:Yag-laser
palliation of unresectable head and neck tumors: initial experience
The Laryngoscope 1993, 103, 559-564
35. Vogl TJ, Mack MG, Müller P, Philipp C, Juergens M, Knöbber D, Roggan A, Wust P,
Jahnke V, Felix R
MR-gesteuerte laserinduzierte Thermotherapie bei Tumoren in der Kopf-Hals-Region:
Erste klinische Ergebnisse
Fortschr. Röntgenstr. 1995, 163, 505-514
36. Bockmühl U, Knöbber D, Vogl T, Mack M
Einsatz der MR-gesteuerten laser-induzierten Thermotherapie (LITT) bei
Plattenepithelkarzinomrezidiven im Kopf-Hals-Bereich
Laryngo Rhino Otol. 1996, 75, 597-601
37. Wust P, Stahl H, Dieckmann K, Scheller S, Löffel J, Riess H, Bier J, Jahnke V, Felix
R
Local hyperthermia of N2/N3 cervical lymph node metastases: correlation of
technical/thermal parameters and response
Int J Rad Oncol Biol Phys 1996, 34(3), 635-646
38. Wust P, Felix R, Riess H, Schlag P
Fortschritt durch Hyperthermie?
Target FORUM 2/96, S. 4-17
Herausgeber: Gaedicke, Herrmann, Manger
AGAMEDE Verlag für Medizin & Gesundheit GmbH, Köln
39. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue
kinetics
Br J Cancer 1972, 26, 239-257
40. Manger B, Herrmann M, Lorenz HM, Kalden JR
Apoptose der programmierte Zelltod
Target FORUM 1/95, S. 6-11
Herausgeber: Gaedicke, Herrmann, Manger
AGAMEDE Verlag für Medizin & Gesundheit GmbH, Köln
41. Kerr JFR., Winterford CM, Harmon BV
Apoptosis Its Significance in Cancer and Cancer Therapy
Cancer April 15, 1994, Volume 73, No. 8, S. 2013-2026
42. Glücksmann A
Cell death in normal vertebrate ontogeny
Biol Rev Camb Philos Soc 1951, 26, 59-86

43. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS
Apoptosis and programmed cell death in immunity
Annu Rev Immunol 1992, 10, 267-293
44. Abastado JP
Apoptosis: function and regulation of cell death
Res. Immunol. 1996, 147, S. 443-456
45. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G
Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor
Nature, 4 Feb 1999, Vol. 397, 441- 446
46. Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelsteen DJ, Orrenius S
Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis [Review]
Toxicol. Lett. 1995, 83, 149-153
47. Barry MA, Behnke CA, Eastman A
Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia
Biochem Pharmacol 1990, 40, 2353-2362
48. Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR
The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle
Anticancer Res 1992, 12, 773-780
49. Hoffmann TK, Leenen K, Hafner D, Balz V, Gerharz CD, Grund A, Ballo H, Hauser U, Bier H
Antitumor activity of protein kinase C inhibitors and cisplatin in human head and neck squamous cell carcinoma lines
Anticancer Drugs 2002, 13(1), 93-100
50. Ehlers EM, Kuhnel W, Wiedemann GJ
Hyperthermia and mafosfamide in a human-derived malignant pleural mesothelioma cell line
J Cancer Res Clin Oncol 2002, 128(2), 65-72
51. Prescott DM, Charles HC; SOSTMAN HD, Dodge RK, Thrall DE, Page RL, Tucker JA, Harrelson JM, Leopold KA, Oleson JR, Dewhirst MW
Therapy Monitoring in human and canine soft tissue sarcomas using Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy
Int J Rad Oncol Biol Phys 1993, 28, 415-423
52. Cregan SP, Boreham DR, Walker PR, Brown DL, Mitchel RE
Modification of radiation-induced apoptosis in radiation- or hyperthermia-adapted human lymphocytes
Biochem Cell Biol 1994, 72(11-12), 475-482

53. Ota I, Ohnishi K, Takahashi A, Yane K, Kanata H, Miyahara H, Ohnishi T, Hosoi H
Transfection with mutant p53 gene inhibits heat-induced apoptosis in a head and neck cell line of human squamous cell carcinoma
Int J Rad Oncol Biol Phys 2000, 47(2), 495-501
54. Seo YR, Smith ML, Han SS, Fairbairn DW, O'Neill KL, Ryu JC
Mild hyperthermia-induced apoptosis is dependent on p53 in human lymphoid cells
Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1999, 104(3), 285-292
55. Zolzer F, Streffer C
Quiescence in S-phase and G1 arrest induced by irradiation and/or hyperthermia in six human tumour cell lines of different p53 status
Int J Rad Biol 2000, 76(5), 717-725
56. Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J
Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells
Cancer Res 1999, 59(14), 3404-3410
57. Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J
Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis
J Biol Chem 2000, 275(28), 21094-21098
58. Boreham DR, Dolling JA, Maves SR, Miller S, Morrison DP, Mitchel RE
Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes
Biochem Cell Biol 1997, 75(4), 393-397
59. Wang JH, Yao MZ, Gu JF, Sun LY, Shen YF, Liu XY
Blocking HSF1 by dominant-negative mutant to sensitize tumor cells to hyperthermia
Biochem Biophys Res Commun 2002, 290(5), 1454-1461
60. Alnemri ES, Fernandes TF, Haldar S, Croce CM, Litwack G
Involvement of bcl-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias
Cancer Res 1992, 52, 491-495
61. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH
Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis
Science 1989, 245(4915), 301-305
62. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M
A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor
J Exp med 1989, 169(5), 1747-1756
63. Krammer PH
CD95 (APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis: Live and Let Die
Advances in Immunology, Vol. 71, 163-210

64. Gamen S, Anel A, Lasierra P, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ, Pineiro A, Naval J
Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3
activation in a Fas-independent way.
FEBS Lett 1997, 417(3), 360-364
65. Hueber A, Durka S, Weller M
CD95-mediated apoptosis: no variation in cellular sensitivity during cell cycle
progression.
FEBS Lett 1998, 432(3), 155-157
66. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM,
Krammer PH, Peter ME
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways
The EMBO Journal 1998, Vol. 17 No. 6 pp, 1675-1687
67. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR
Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses
Immunol. Today 1995, 16, 569-574
68. Liu CC, Walsh CM, Young JD
Perforin: structure and function
Immunol. Today 1995, 16, 194-201
69. Smyth MJ, Trapani JA
Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis
Immunol. Today 1995, 16, 202-206
70. Green DR, Bissonnette RP, Cotter TG
Apoptosis and Cancer 3
Important Advances in Oncology 1994, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, S. 37-
50
71. Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL
Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell
cycle arrest and accelerates apoptosis
Oncogene 1991, 6, 1915-1922
72. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI
Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes
Nature 1992, 359, 554-556
73. Hockenbery DM, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ
Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death
Nature 1990, 348, 334-336
74. Korsmeyer SJ
Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death
Blood 1992, 80, 879-86

75. Vaux DL, Cory S, Adams JM
Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells
Nature 1988, 335, 440-442
76. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR
Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2
Nature 1992, 359, 552-554
77. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E
The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 7742-7746
78. Vaux DL, Aguila HL, Weissmann IL
Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing
Int Immunol 1992, 4, 821-824
79. Wilson GD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Saunders MI, Dische S
BCL-2 Expression Correlates with Favourable Outcome in Head and Neck Cancer Treated by Accelerated Radiotherapy
Anticancer Research 1996, 16, 2403-2408
80. Shaw, P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J
Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 4495-4499
81. Oren M
p53: the ultimate tumor suppressor gene?
FASEB J 1992, 6, 3169-3176
82. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M
Wild-type p53 induce apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6
Nature 1991, 352, 345-347
83. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J
Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 4495-4499
84. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CJ, Butel JS, Bradley A
Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours
Nature 1992, 356, 215-221
85. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH
Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways
Nature 1993, 362, 849-852

86. Chang EH, Jang YJ, Hao Z, Murphy G, Rait A, Fee WE Jr, Sussman HH, Ryan P, Chiang Y, Pirollo KF
Restoration of the G1 checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild-type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997, 123(5), 507-512
87. Debbas M, White E
Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B genes
Develop. 1993, 7, 546-554
88. Lavieille JP, Lubin R, Soussi T, Reyt E, Brambilla C, Riva C
Analysis of p53 Antibody Response in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
Anticancer Research 1996, 16, 2385-2388
89. Compton MM
A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome
Cancer Metastasis Rev 1992, 11(2), 105-119
90. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA
Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labelling of Nuclear DNA Fragmentation
The J of Cell Biology 1992, 113, 493-501
91. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C
A novel assay for apoptosis detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V
J of Immunol Methods 1995, 181, 39-51
92. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry
J of Immunol Methods, 1991, 139, 271-279
93. Jang SH, Wientjes MG, Au JL
Enhancement of paclitaxel delivery to solid tumors by apoptosis-inducing pretreatment: effect of treatment schedule
J Pharmacol Exp Ther 2001, 296(3), 1035-1042
94. Scher RL, Saito W, Dodge RK, Richtmeier WJ, Fine RL
Fenretinide-induced apoptosis of human head and neck squamous carcinoma cell lines
Otolaryngol Head Neck Surg 1998, 118(4), 464-471
95. Seol JG, Park WH, Kim ES, Jung CW, Hyun JM, Lee YY, Kim BK
Potential role of caspase-3 and -9 in arsenic trioxide-mediated apoptosis in PCI-1 head and neck cancer cells
Int J Oncol 2001, 18(2), 249-255

96. Pschyrembel (1994)
Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage
Walter de Gruyter Verlag, Berlin
97. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Mukarami T, Traganos F
Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis)
Cytometry 1997, 27, 1-20
98. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Whyllie AH
Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry
Biochimica et Biophysica Acta 1992, 1133, 275-285
99. Kawanishi M
Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects Jurkat T cells from apoptosis induced by serum deprivation
Virology 1997, 228(2), 244-250
100. Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM
Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry
Acta Oncologica 1993, 32, 417-424
101. Ferlini C, Di Cesare S, Rainaldi G, Malorni W, Samoggia P, Biselli R, Fattorossi A
Flow Cytometric Analysis of the Early Phases of Apoptosis by Cellular and Nuclear techniques
Cytometry 1996, 24, 106-115
102. Koester SK, Roth P, Mikulka WR, Schlossman SF, Zhang C, Bolton WE
Monitoring Early Cellular Responses in Apoptosis Is Aided by the Mitochondrial Membrane Protein-Specific Monoclonal Antibody APO2.7
Cytometry 1997, 29, 306-312
103. Engeland van M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM
Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure
Cytometry 1998, 31, 1-9
104. Darzynkiewicz Z, Bruno S, del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F
Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry
Cytometry 1992, 13, 795-808
105. Zamai L, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M
Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptotic Cells in the Absence of Nucleosomal DNA Fragmentation
Cytometry 1996, 23, 303-311
106. Engeland van M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM
A Novel Assay To Measure Loss of Plasma Membrane Asymmetry During Apoptosis of Adherent Cells in Culture
Cytometry 1996, 24, 131-139

107. Rauchfuss A, Koch U
Therapy of advanced hypopharyngeal carcinoma
Strahlenther Onkol 1987, 163(8), 525-528
108. Helpap B, Koch U, Straehler-Pohl HJ, Frommhold H
Morphological and cell kinetic investigations on squamous cell carcinomas of the oropharynx under intraarterial therapy of methotrexat and irradiation
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg) 1981, 60(2), 77-80
109. Clark JR, Fallon BG, Dreyfuss AI, Norris CM Jr, Anderson JW, Ervin TJ, Anderson RF, Chaffey JT, Miller D, Frei E
Chemotherapeutic strategies in the multidisciplinary treatment of head and neck cancer
Semin Oncol 1988, 15(Suppl 3), 35-44
110. da Silva CP, de Oliveira CR, da Conceicao M, de Lima P
Apoptosis as a mechanism of cell death induced by different chemotherapeutic drugs in human leukemic T-lymphocytes
Biochem Pharmacol 1996, 51(10), 1331-1340
111. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM
Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells
Nat Med 1996, 2(5), 574-577
112. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH
Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions
Blood 1997, 90(3), 935-943
113. Berthou C, Michel L, Soulié A, Francette JL, Flageul B, Dubertret L, Sigaux F, Zhang Y, Sasportes M
Acquisition of Granzyme B and Fas Ligand Proteins by Human Keratinocytes Contributes to Epidermal Cell Defense
J Immunol 1997, 159(11), 5293-5300
114. Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL
Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinoma of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes
Cancer Res 1999, 59(20), 5356-5364
115. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H
Tumor-induced apoptosis of T lymphocytes: elucidation of intracellular apoptotic events
Blood 2000, 95(6), 2015-2023

116. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH
A New Method to Detect Apoptosis in paraffin Sections: In Situ End-labeling of Fragmented DNA
The J Histochemistry and Cytochemistry 1993, 41, 7-12
117. Mariani AR, Columbaro M, Zauli G, Zamai L, Luchetti F, Gobbi P, Ghibellini D, Falcieri E, Vitale M
Lineage-related susceptibility of human hemopoietic cell lines to apoptosis
Anat Rec 1999, 254(1), 1-6
118. Kristensen CA, Kristjansen PEG, Brünner N, Quistorff B, Spang-Thomsen M
Growth Inhibition in Response to Estrogen Withdrawal and Tamoxifen Therapy of Human Breast cancer Xenografts Evaluated by *in Vivo* ³¹P magnetic Resonance Spectroscopy, Creatine Kinase Activity, and Apoptotic Index
Cancer Res 1995, 55, 4146-4150
119. Hazel JR, McKinley SJ, Gerrits MF
Thermal acclimation of phase behavior in plasma membrane lipids of rainbow trout hepatocytes
Am J Physiol 1998, 275(3 Pt 2), R 861-869
120. Smirnov LP, Bogdan VV
The effect of host temperature on the fatty acid composition of the total and membrane lipids in the cestodes *Eubothrium crassum* and *Diphyllobothrium dendriticum*
Zh Evol Biokhim Fiziol 1995, 31(3), 264-269
121. Awad AB, Young AL, Fink CS
The effect of unsaturated fatty acids on membrane composition and signal transduction in HT-29 human colon cancer cells
Cancer Lett 1996, 108(1), 25-33
122. Freund G
Possible relationships of alcohol in membranes to cancer
Cancer Res 1979, 39(7 Pt 2), 2899-2901
123. Dibner MD, Ireland KA, Koerner LA, Dexter DL
Polar solvent-induced changes in membrane lipid lateral diffusion in human colon cancer cells
Cancer Res 1985, 45(10), 4998-5003
124. Nakazawa I, Iwaizumi M
A correlation between cancer metastases and the fluidity of cancer cell membrane
Tohoku J Exp Med 1982, 137(3), 325-328
125. Nakazawa I, Iwaizumi M
A role of the cancer cell membrane fluidity in the cancer metastases: an ESR study
Tohoku J Exp Med 1989, 157(3), 193-198

126. Sherbet GV
Membrane fluidity and cancer metastasis
Exp Cell Biol 1989, 57(4), 198-205
127. Yu X, Zhao X, Gao J
The effect of retinoid acid on cell membrane and metastatic ability of mouse forestomach carcinoma cells
Chung Hua Chung Liu Tsa Chih 1995, 17(3), 179-182
128. Fossel ET, Carr JM, McDonagh J
Detection of malignant tumors. Water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma
N Engl J Med 1986, 315(22), 1369-1376
129. Mountford CE, Grossman G, Reid G, Fox RM
Characterization of transformed cells and tumors by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Cancer Res 1982, 42(6), 2270-2276
130. Aboagye EO, Bhujwala ZM
Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells
Cancer Res 1999, 59(1), 80-84
131. Speck O, Thiel T, Hennig J
Grading and Therapy Monitoring of Astrocytomas with ^1H -Spectroscopy: Preliminary Study
Anticancer Res 1996, 16, 1581-1586
132. Mukherji SK, Schiro S, Castillo M, Kwock L, Muller KE, Blackstock W
Proton MR Spectroscopy of Squamous Cell Carcinoma of the Extracranial Head and Neck: In Vitro and In Vivo Studies
Am J Neuroradiol 1997, 18, 1057-1072
133. Reiman V, Wollenberg B, Zeidler R, Ertongur S, Dagdelen O, Jacob K, Lang S
In Vitro Proton MR-Spectroscopical-Markers of Malignancy in Head and Neck Carcinomas
MAGMA (in press)
134. Maldonado X, Alonso J, Giralt J, Cucurella MG, Del Campo JM, Rovira A, Felip E, Capellades J, Grivé E, rubio D, Gili J
31Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy in the assesment of Head and Neck Tumors
Int J Rad Oncol Biol Phys 1998, 40(2), 309-312
135. Reiman V
1H and 31P MR-spectroscopy of tumors in the head and neck region
Biomed Eng (Biomed Tech) 1989, 34(E), 161-162

136. Santini MT, Masella R, Cantafora A, Peterson SW
Changes in erythrocyte membrane lipid composition affect the transient decrease in membrane order which accompanies insulin receptor down-regulation
Experientia 1992, 48(1), 36-39
137. Mouritsen OG, Jorgensen K
Small-scale lipid-membrane structure: simulation versus experiment
Curr Opin Struct Biol 1997, 7(4), 518-527
138. Hsu BY, Wehrli SL, Yandrasitz JR, Fenstermacher EA, Palmieri MJ, Rea CT, McNamara PD, Bovee KC, Segal S
Renal brush border membrane lipid composition in Basenji dogs with spontaneous idiopathic Fanconi syndrome
Metabolism 1994, 43(9), 1073-1078
139. Isenberg G, Niggli V
Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids
Int Rev Cytol 1998, 178, 73-125
140. Bommel van T, Marsen T, Bojar H
Effects on high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells
Anticancer Res 1987, 7(6), 1217-1223
141. Wiseman H, Cannon M, Arnstein HR, Barlow DJ
The structural mimicry of membrane sterols by tamoxifen: evidence from cholesterol coefficients and molecular-modelling for its action as a membrane anti-oxidant and an anti-cancer agent
Biochim Biophys Acta 1992, 1138(3), 197-202
142. Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH
Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis
Biochemistry 1996, 35(28), 9187-9196
143. Kato H, Horino A, Taneichi M, Fukuchi N, Eto Y, Ushijima H, Komuro K, Uchida T
Macrophage Inhibition of Lymphocyte and Tumor Cell Growth Is Mediated by 25-Hydroxycholesterol in the Cell Membrane
Int Arch Allergy Immunol 1998, 117, 78-84
144. Watts JD, Gu M, Patterson SD, Aebersold R, Polverino AJ
On the complexities of ceramide changes in cells undergoing apoptosis: lack of evidence for a second messenger function in apoptotic induction
Cell Death Differ 1999, 6(2), 105-114
145. Marutaka M, Iwagaki H, Mizukawa K, Tanaka N, Orita K
Time-course of changes in the plasma-membrane lipid bilayer and cellular ultrastructure induced by tumour necrosis factor-alpha in K 562 and Daudi cells
J Int Med Res 1995, 23(4), 254-263

146. Hall JC, Hadley J, Doman T
Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation
J Androl 1991, 12(1), 76-87
147. YashRoy RC
13C-NMR studies of membrane lipid-protein interactions upon protein heat denaturation
J Biochem Biophys Methods 1991, 23(3), 259-261
148. Gabbita SP, Subramaniam R, Allouch F, Carney JM, Butterfield DA
Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation
Biochim Biophys Acta 1998, 1372(2), 163-173
149. Miller ML, Andringa A, Elliott J, Conwell K 2nd, Dixon K, Carty MP
The morphological and spectral phenotype of apoptosis in HeLa cells varies following exposure to UV-C and the addition of inhibitors of ICE an CPP32
Cell Prolif 1998, 31(1), 17-33
150. Buettner GR, Kelley EE, Burns CP
Membrane lipid free radicals produced from L1210 murine leukemia cells by photofrin photosensitization: an electron paramagnetic resonance spin trapping study
Cancer Res 1993, 53(16), 3670-3673
151. Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM
Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX
Br J Cancer 1996, 74(1), 22-29
152. Bhakoo KK, Bell JD
The application of NMR spectroscopy to the study of apoptosis
Cell Mol Biol Noisy le grand 1997, 43(5), 621-629
153. Engelmann J, Henke J, Willker W, Kutscher B, Nössner G, Engel J, Leibfritz D
Early Stage Monitoring of Miltefosine Induced Apoptosis in KB Cells by Multinuclear NMR Spectroscopy
Anticancer Res 1996, 16, 1429-1440
154. Sakurai H, Mitsuhashi N, Murata O, Kitamono Y, Saito Y, Hasegawa M, Akimoto T, Takahashi T, Nasu S, Niibe H
Early radiation effects in highly apoptotic murine lymphoma xenografts monitored by 31P magnetic resonance spectroscopy
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998, 41(5), 1157-1162
155. Reiman V
Change of molecular structure of the phosphate chain of nucleotides at hypoxic in vitro conditions
Pflüg Arch 1986, 406, R 36

156. Mehmet H; Yue X, Squir MV, Lorek A, Cady E, Penrice J, Sarraf C, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper C, et al.
Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult
Neurosci Lett 1994, 181(1-2), 121-125
157. Mehmet H; Yue X, Penrice J, Cady E, Wyatt JC, Sarraf C, Squier M, Edwards AD
Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia
Cell Death Differ 1998, 5(4), 321-329
158. Williams SN, Anthony ML, Brindle KM
Induction of apoptosis in two mammalian cell lines results in increased levels of fructose-1,6-bisphosphate and CDP-choline as determined by ³¹P MRS
Magn Reson Med 1998, 40(3), 411-420
159. Nunn AV, Barnard ML, Bhakoo K, Murray J, Chilvers EJ, Bell JD
Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis
FEBS Lett 1996, 392(3), 295-298
160. Vogl T, Peer F, Reiman V
In vivo ³¹P Magnetresonanz Spektroskopie und MRI bei Patienten mit oberflächlich gelegenen Tumoren
Fortschr Röntgenstr 1989, 150(1), 58-65
161. Le Moyec L, Tatoud R, Eugene M, Gauville C, Primot I, Charlemagne D, Calvo F
Cell and membrane lipid analysis by proton magnetic resonance spectroscopy in five breast cancer cell lines
Br J Cancer 1992, 66(4), 623-628
162. Mc Donagh J, Fossel ET, Kradin RL, Dubinett SM, Laposata M, Hallaq YA
Effects of tumor necrosis factor-alpha on peroxidation of plasma lipoprotein lipids in experimental animals and patients
Blood 1992, 80(12), 3217-3226
163. Blankenberg FG, Storrs RW, Naumovski L, Gorlaski T, Spielman D
Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Blood 1996, 87(1), 1951-1956
164. Blankenberg FG, Katsikis PD, Storrs RW, Beaulieu C, Spielman D, Chen JY, Naumovski L, Tait JF
Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Blood 1997, 89(10), 3778-3786
165. Bezabeh T, Mowat MR, Jarolim L, Greenberg AH, Smith IC
Distinction of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹H NMR spectroscopy
Cell Death Differ 2001, 8(3), 219-224

166. Hakumaki JM, Poptani H, Puumalainen AM, Loimas S, paljarvi LA, Yla-Herttuala S, Kauppinen RA
Quantitative ¹H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy in vivo: identification of apoptotic response
Cancer Res 1998, 58(17), 3791-3799
167. Heindel W, Kugel H, Wenzel F, Stippel D, Schmidt R, Lackner K
Localized ³¹P MR spectroscopy of the transplanted human kidney in situ shows altered metabolism in rejection and acute tubular necrosis
J Magn Reson Imaging 1997, 7(5), 858-864
168. Tracey I, Dunn JF, Parkes HG, Radda GK
An in vivo and in vitro H- magnetic resonance spectroscopy study of mdx mouse brain: abnormal development or neural necrosis?
J Neurol Sci 1996, 141(1-2), 13-18
169. Kwee IL, nakada T, Ellis WG
Elevation in relative levels of brain membrane unsaturated fatty acids in Alzheimer`s disease: high resolution proton spectroscopic studies of membrane lipid extracts
Magn Reson Med 1991, 21(1), 49-54
170. Kamada K, Houkin K, Abe H, Sawamura Y, Kashiwaba T
Differentiation of cerebral radiation necrosis from tumor recurrence by proton magnetic resonance spectroscopy
Neurol Med Chir Tokyo 1997, 37(3), 250-256
171. Kuesel AC, Briere KM, Halliday WC, Sutherland GR, Donnelly SM, Smith IC
Mobile lipid accumulation in necrotic tissue of high grade astrocytomas
Anticancer Res 1996, 16(3B), 1485-1489
172. Grand S, Lai ES, Esteve F, Rubin C, Hoffmann D, Remy C, Segebarth C
In vivo ¹H MRS of brain abscesses versus necrotic brain tumors
Neurology 1996, 47(3), 846-848
173. Taylor JS, Lagston JW, Reddik WE, Kingsley PB, Ogg RJ, Pui MH, Kun LE, Jenkins JJ 3rd, Chen G, Ochs JJ, Sanford RA, Heidemann RL
Clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy for differentiating recurrent or residual brain tumor from delayed cerebral necrosis
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996, 36(5), 1251-1261

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke am Klinikum Großhadern, an dessen Forschungslabor ich die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit erhielt.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Stephan Lang für die kompetente, umfangreiche Betreuung und für die Überlassung des interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich für seine allzeitige Diskussionsbereitschaft und wohlwollende Kritik bei der Niederschrift bedanken.

Ferner gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ing. Viktor Reiman, der durch seine reiche Erfahrung auf dem Gebiet der Magnetresonanztomographie entscheidend zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat. Durch seine Hilfe bei der Organisation und Durchführung der MRS-Messungen konnte diese Arbeit erst vervollständigt werden.

Weiterhin bin ich Frau Dr. rer. nat. Anna Mayer zu großem Dank verpflichtet, die mir während der gesamten Arbeitszeit im Forschungslabor stets hilfreich zur Seite stand und mich in vielen Fragen der Zellkultur und Durchflusszytometrie mit wertvollen Hinweisen beraten hat.

Außerdem danke ich natürlich den Damen und Herren aus dem HNO-Forschungslabor des Klinikums. Durch ihre Freundlichkeit und stete Hilfsbereitschaft wurde erst diese gute und kollegiale Zusammenarbeit möglich, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Herzlichen Dank.

München 2002

Suna Ertongur

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name, Vorname: Ertongur, Inci Suna
Geburtsdatum: 21.11.1975
Geburtsort: Ankara / Türkei
Geschlecht: weiblich
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/81-08/85 Grundschulen in München und Ankara
09/85-07/94 Gymnasium Neubiberg in München
07/94 Abitur

Studium:

10/94-10/97 Medizinstudium an der Universität Leipzig
09/96 Ärztliche Vorprüfung
08/97 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/97-05/01 Medizinstudium an der Ludwig Maximilians Universität München
04/00 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000/2001 Praktisches Jahr:
1. Innere Medizin, Nephrologie am Städtischen Krankenhaus München Harlaching
2. Chirurgie am Hôpital Pourtalès in Neuchâtel / Französische Schweiz
3. Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde am Royal Victoria Hospital und Montréal Children's Hospital des McGill University Health Centre in Montréal / Canada
05/01 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01.07.2001 Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke am Klinikum Großhadern der LMU in München Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der erlaubten Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und werden nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, Juni 2002

Suna Ertongur