

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt an der
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Univ.-Prof. Dr. Gabriele Multhoff)

Einfluss von Epothilon B und eines MDM2-Inhibitors auf das Zellüberleben und die Apoptose einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie in Kombination mit Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Caroline Hagedorn
aus München

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Eisinger

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Grundlagen	3
1.1.	Strahlenwirkung und Zelltod.....	3
1.2.	Zellüberlebenskurven	5
1.3.	Resistenzmechanismen und Strahlenempfindlichkeit.....	6
1.4.	Kombination von Strahlen- und Chemotherapie.....	7
2.	Epothilone	9
2.1.	Allgemeines.....	9
2.2.	Wirkung.....	9
2.3.	Pharmakokinetik.....	10
2.4.	Präklinische und klinische Studien	11
2.5.	Nebenwirkungen	12
3.	MDM2-Antagonisten	12
3.1.	Allgemeines.....	12
3.2.	Wirkung.....	13
3.3.	Präklinische Studien	14
3.4.	Nebenwirkungen	14
4.	Kopf-Hals-Tumoren.....	15
4.1.	Ätiologie und Epidemiologie	15
4.2.	Pathologie und Klinik.....	15
4.3.	Therapie.....	16
III.	MATERIAL UND METHODEN	17
1.	Material.....	17
1.1.	Zelllinie	17
1.2.	Geräte	17
1.3.	Verbrauchsmaterial	19
1.4.	Reagenzien	20
1.5.	Verwendete Substanzen	21

2.	Methoden.....	22
2.1.	Zellkultur	22
2.1.1.	Subkultivierung	22
2.1.2.	Kryokonservierung.....	22
2.2.	Koloniebildungssassay.....	23
2.2.1.	Ansatz.....	23
2.2.2.	Bestrahlung.....	23
2.2.3.	Fixierung und Färbung	24
2.2.4.	Auswertung	24
2.3.	Apoptose-Messung mittels Durchflusszytometrie	27
2.3.1.	Ansatz.....	28
2.3.2.	Bestrahlung.....	28
2.3.3.	Caspase-3 Färbung	28
2.3.4.	Messung	29
2.4.	Statistische Methoden	31
IV.	ERGEBNISSE	32
1.	Radiosensitivität Zelllinie FaDu.....	32
2.	Zytotoxizität der verwendeten Substanzen.....	33
2.1.	Zytotoxizität von Ixabepilon	33
2.2.	Zytotoxizität von PNX 727	34
3.	Einfluss der Kombinationstherapie auf das Zellüberleben.....	35
3.1.	Einfluss von Ixabepilon und Bestrahlung	35
3.2.	Contourdarstellung Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung	37
3.2.1.	Dreidimensionales Modell Ixabepilon und Bestrahlung	38
3.3.	Einfluss von PNX 727 und Bestrahlung	39
3.3.1.	Contourdarstellung PNX 727 und Bestrahlung.....	41
3.3.2.	Dreidimensionales Modell PNX 727 und Bestrahlung	42
4.	Ergebnisse Apoptose-Messung.....	43
4.1.	Zeitreihe mit Bestrahlung.....	43
4.2.	Apoptose-Messung Ixabepilon und Bestrahlung	44
4.3.	Apoptose-Messung PNX 727 und Bestrahlung	46
V.	DISKUSSION	48

1.	Diskussion der angewandten Methoden.....	48
2.	Diskussion der Ergebnisse	49
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	55
VII.	SUMMARY.....	56
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	57
IX.	ANHANG	65
X.	DANKSAGUNG	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grad Celsius
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
Gy	Gray, Energiedosis ionisierender Strahlung, 1 Gy = 1 J/kg
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IC 50	halbmaximale wachstumsinhibierende Konzentration
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

kV	Kilovolt
Leu	Leucin
m ²	Quadratmeter
MDM2	Murine double minute 2
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µM	micromolar (10^{-6})
nM	nanomolar (10^{-9})
p53	Protein 53
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Plating efficiency (Plattierungseffizienz)
Phe	Phenylalanin
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SF	Surviving fraction (Überlebensfraktion)
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
Trp	Tryptophan

I. EINLEITUNG

Kopf-Hals-Tumoren stehen an fünfter Stelle aller Krebserkrankungen weltweit (Reiter et al., 2009). Durch die Kombination von Strahlentherapie, Chemotherapie und Chirurgie stehen verschiedene Ansätze und Möglichkeiten der Therapie zur Verfügung. Jedoch handelt es sich bei Kopf-Hals-Tumoren meist um besonders schnellwachsende, häufig rezidivierende und funktionell sensibel gelegene Tumoren, was eine radikale chirurgische Entfernung unter Beachtung der Erhaltung von Sprech- und Schluckfähigkeit sowie kosmetischen Aspekten erschwert. Aus diesem Grund ist häufig die simultane Radiochemotherapie für fortgeschrittene Tumoren das Mittel der Wahl. Die Kombination von Bestrahlung mit chemotherapeutisch wirksamen Substanzen ist seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand der experimentellen und klinischen Forschung. Bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren sind als Chemotherapeutika vor allem Cisplatin und 5-Fluorouracil im Einsatz (Dietl et al., 2007; Marur und Forastiere, 2008), und auch Vertreter aus der Gruppe der Taxane finden in Kombination mit Bestrahlung Verwendung (Leonard et al., 1996; Hsiao et al., 2009). Es besteht dennoch weiterhin Bedarf an neuen Substanzen, insbesondere im Hinblick auf Resistenzbildung, Nebenwirkungen und Verbesserung der Strahlenwirkung. Hier stellen Epothilone, die den gleichen Wirkmechanismus wie Taxane besitzen, eine mögliche Alternative dar, weshalb in dieser Arbeit unter anderem der Einfluss von Epothilon B auf eine Kopf-Hals-Tumorzelllinie untersucht wurde. Insgesamt stehen individualisierte und zielgerichtete Therapien mit multimodalen Behandlungskonzepten immer mehr im Fokus der präklinischen onkologischen Forschung, um dem einzelnen Patienten die optimale Behandlung zu ermöglichen. Der Tumorsuppressor p53 besitzt wichtige Funktionen in der Tumorgenese und hat somit bedeutende Auswirkungen in Bezug auf Therapie und Prognose (Dahm-Daphi, 2000; Nylander et al., 2000; Cheok et al., 2011). Mutationen im p53-Gen treten häufig bei Malignomen auf und gehen mit einer zumeist schlechten Prognose einher (Lane et al., 2010). Auch Kopf-Hals-Tumoren weisen häufig p53-Mutationen auf (Reiss et al., 1992; Somers et al., 1992), weshalb die Behandlung derartiger Tumoren eine große Herausforderung in der Onkologie darstellt. Vielversprechende Daten ergaben sich aus der Blockierung der p53-Bindung an das Onkogen MDM2, mittels sogenannter MDM2-Inhibitoren. Da

diese in vorangegangenen Untersuchungen auch bei p53-mutierten Zelllinien verschiedener Tumorentitäten Wirkung zeigten (Zhang et al., 2004; Vassilev, 2007; Supiot et al., 2008), ergab sich für die vorliegende Arbeit die Fragestellung, einen neu entwickelten MDM2-Inhibitor an einer p53-mutierten Kopf-Hals-Tumorzelllinie in Kombination mit Bestrahlung zu testen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Grundlagen

1.1. Strahlenwirkung und Zelltod

In der Strahlentherapie unterscheidet man zwischen partikulärer und elektromagnetischer Strahlung sowie zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung. Bei den direkten Effekten der Bestrahlung wird die ionisierende Wirkung der Strahlung unmittelbar auf biologisches Material wie beispielsweise die DNA übertragen. Der indirekte Strahleffekt beruht auf der Interaktion von Elektronen mit Mediatoren, wie der Radiolyse von Wasser. Es kommt hierbei durch die Entstehung von freien Radikalen zu DNA-Strangbrüchen. Indirekt ionisierende Strahlung, wie Röntgen- und Gammastrahlung, wird zumeist in der Radioonkologie zur Behandlung von Tumorerkrankungen verwendet (Sauer, 2001). Die Wirkung von ionisierender Strahlung auf Zellen beruht vor allem auf einer Schädigung der DNA. Es kann zu Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen, Veränderungen in der Basenabfolge, DNA-Quervernetzungen (Cross-links) und sogenannten Mehrfachereignissen (Bulky Lesions) kommen (Sauer, 2001; Iliakis et al., 2003). Strahleninduzierte DNA-Schäden führen, sofern keine Reparatur der Zelle möglich ist, letztendlich zum Zelltod. Meist handelt es sich hierbei um den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt (Kerr et al., 1972). Apoptose kann zum Einen über den intrinsischen (mitochondrialen) und zum Anderen über den extrinsischen Weg eingeleitet werden. Beim intrinsischen Weg wird durch Signale des Tumorsuppressors p53 über die Proteine Bax, Puma und Noxa eine Schädigung der Mitochondrien erreicht. Dadurch werden proapoptotische Substanzen (u.a. Cytochrom C) freigesetzt, die gemeinsam mit der Procaspsase 9 einen Apoptosom-Komplex bilden. Dieser Komplex führt zu einer Aktivierung der Initiatorcaspsase 9, die ihrerseits wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspsase 3 führt (Belka et al., 2003). Caspasen sind intrazelluläre Proteasen, die im aktiven Zentrum Cystein enthalten. Sie spalten Proteine hinter der Aminosäure Aspartat, wodurch sich auch ihr Name erklärt (Cystein-Aspartat-specific-protease). Man unterscheidet zwischen Effektorcaspasen, die morphologische Veränderungen während der Zerstörung der Zelle einleiten, und Initiatorcaspasen, die zur Vermittlung der

auslösenden Signale mit den Effektorcaspasen dienen. Der Effektorcaspase 3 kommt eine besondere Bedeutung als Schlüsselmediator für beide Apoptosewege zu (Kumar, 2007).

In einer p53-unabhängigen Form kann ein weiterer Zelltodmechanismus, die mitotische Katastrophe, aktiviert werden. Es kommt in diesem Fall zum Absterben der Zelle durch Störung in der Mitosephase. Auslösend für die mitotische Katastrophe können verschiedene DNA-schädigende Faktoren, unter anderem auch die ionisierende Bestrahlung von Zellen, sein (Eriksson und Stigbrand, 2010). Im Zusammenhang mit der mitotischen Katastrophe steht, als eine weitere Form des reproduktiven Zelltodes, die Ausbildung von Mikrokernen. Diese, auch als Mikronuklei bezeichneten, zytoplasmatischen Chromatinfragmente entstehen in Zellen nach Strahleneinwirkung. Die vermutlich passive Bildung von Mikronuklei kommt durch Chromosomenfragmente zustande, welche, nach Abschluss der Mitose außerhalb des Kerns, frei im Zytoplasma liegen (Belka et al., 2003).

Von der Apoptose abzugrenzen ist die Nekrose, die mit Gewebsuntergang, Autodigestion, Anschwellen des Zellkörpers und Zerstörung der Zellorganellen einhergeht. Ein nekrotischer Zelluntergang geht im Gegensatz zur Apoptose mit einer Entzündungsreaktion einher (Belka et al., 2003). Als eine Art vorzeitige Alterung von Zellen kann die Seneszenz beschrieben werden. Hierbei kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest der Zelle, in welchem die seneszenten Zellen zwar vital erhalten bleiben, sich jedoch nicht weiter teilen können (Eriksson und Stigbrand, 2010). Morphologisch fallen diese Zellen durch eine deutliche Größenzunahme, abgeflachte Form und hohe Granularität auf. Ihre erhaltene metabolische Aktivität lässt diese Zellen als sogenannte „Feederzellen“ zur Unterstützung anderer Tumorzellen dienen (Belka et al., 2003). Die Seneszenz von Tumorzellen kann sowohl durch Behandlung mit Chemotherapie, als auch durch Bestrahlung eingeleitet werden (Roninson et al., 2001; Eriksson und Stigbrand, 2010).

1.2. Zellüberlebenskurven

Wenn Zellen nach DNA-Schädigung, beispielsweise durch Bestrahlung, die Fähigkeit zur Reproduktion und zur Koloniebildung behalten, wird dies als klonogenes Überleben bezeichnet. Der Verlust dieser Fähigkeit kann zum Zelltod führen, überlebende Tumorzellen sind häufig in der Lage, Rezidive zu bilden (Belka et al., 2003). Das Koloniebildungsverhalten von Tumorzellen kann im Koloniebildungstest untersucht werden (Puck und Marcus, 1956). Hierzu wird eine bestimmte Anzahl von Zellen ausgesät, behandelt und nach einer bestimmten Inkubationszeit fixiert und angefärbt. Jede gebildete Kolonie, die aus mindestens 50 Zellen besteht, wird ausgezählt. Die Anwachsraten der Zellen (Plattierungseffizienz, Plating Efficiency) ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgezählten Kolonien zu den ausgesäten Zellen. Die Überlebensrate (Surviving Fraction) errechnet sich aus der Anzahl der behandelten ausgezählten Kolonien, dividiert durch die Anzahl der unbehandelten ausgezählten Kolonien. In Zellüberlebenskurven kann die Überlebensfraktion (Surviving Fraction) in Abhängigkeit zur Strahlendosis aufgetragen werden. Die logarithmische Darstellung ergibt meist eine charakteristische Schulterkurve, wobei die Schulter - als Maß für die Reparaturfähigkeit - bei strahlenresistenten Zelllinien ausgeprägter als bei strahlensensiblen ist (Sauer, 2001; Baumann und Krause, 2003).

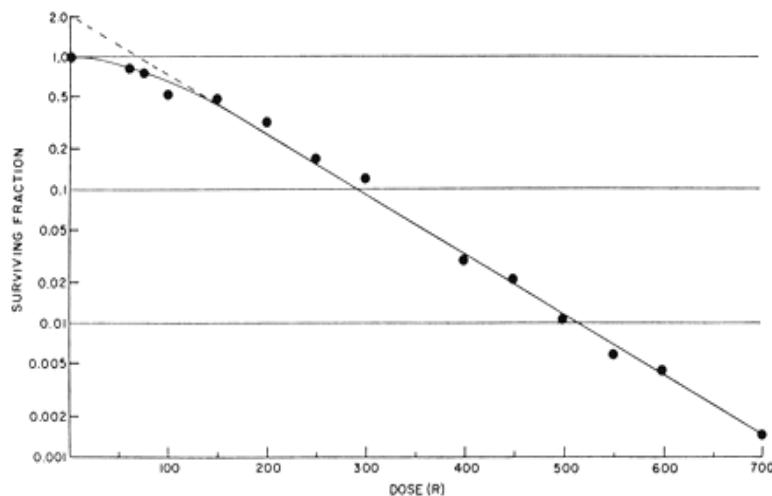


Abbildung 1: Zellüberlebenskurve für humane HeLa-Tumorzellen nach Bestrahlung (aus Puck und Markus, 1956)

1.3. Resistenzmechanismen und Strahlenempfindlichkeit

Die Effizienz einer Strahlentherapie ist von einer Reihe von Faktoren, unter anderem den sogenannten 4 Rs der Strahlentherapie, gekennzeichnet. Das erste R bezieht sich auf die Reparaturkapazität von DNA-Schäden durch Tumorzellen. Eine hohe Reparaturkapazität geht mit einer schlechten klinischen Prognose nach Strahlentherapie einher. Davon zu unterscheiden ist die Erholung (Recovery), welche eine Verringerung des Gewebeschadens am gesunden Normalgewebe durch Strahlung bei fraktionierter Radiotherapie bezeichnet (Baumann et al., 2003). Als Repopulierung, das zweite R, wird die Kapazität der Tumorzellen definiert, sich nach Strahlentherapie wieder zu regenerieren. Eine hohe Repopulationskapazität stellt einen wesentlichen Resistenzmechanismus von Tumorzellen unter Radiotherapie dar (Trott, 1982). Der Sauerstoffgehalt in Tumorzellen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung. Reoxygenierung, das dritte R, bedeutet, dass ehemals hypoxische Tumoreale nach Bestrahlung ihre Sauerstoffversorgung normalisieren. Man unterscheidet zwischen akuter (perfusionslimitierter) und chronischer (diffusionslimitierter) Hypoxie, wobei die verschiedenen Formen gleichzeitig in ein und demselben Tumor vorherrschen können (Vaupel und Mayer 2007). Hypoxische Tumoren, darunter auch häufig Kopf-Hals-Tumoren, verhalten sich deutlich strahlenresistenter als normoxische (Baumann et al., 2003; Vaupel und Mayer, 2007; Vaupel, 2008).

Die Phasen des Zellzyklus lassen sich in eine Mitosephase (Teilungsphase) und eine Intermitosephase gliedern. In dieser differenziert man wiederum zwischen der G1-Phase (präsynthetisch), der S-Phase (Synthese der DNA) und der G2-Phase (postsynthetisch) (Howard und Pelc, 1953; Sauer, 2001). Die Strahlensensibilität von Zellen hängt maßgeblich von den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus ab. So ist die G2/M-Phase die strahlensensibelste Phase des Zellzyklus. Zellen, die sich in der S-Phase befinden, verhalten sich strahlenresistent (Sauer, 2001; Iliakis et al., 2003). Die Veränderung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus stellt einen wichtigen Aspekt in der Strahlentherapie dar. Zellen, die sich in der strahlensensiblen G2/M-Phase des Zellzyklus befinden, sind leichter durch Bestrahlung abzutöten als solche, die sich in der resistenten Phase befinden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass während einer Strahlentherapie Verschiebungen

im Zellzyklus (Redistribution, viertes R) entstehen können. Somit kann es zu einer Veränderung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen während der Behandlung kommen (Baumann et al., 2003).

1.4. Kombination von Strahlen- und Chemotherapie

Es gibt verschiedene Ansätze und Möglichkeiten zur Wirkungssteigerung der Strahlentherapie. Neben einer Fraktionierung der Strahlendosis kann eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika die Effizienz der Strahlenwirkung positiv beeinflussen. In der Radiochemotherapie sind unterschiedliche Kombinationsprotokolle gebräuchlich. Die simultane Radiochemotherapie, bei der Bestrahlung und Chemotherapie gleichzeitig angewandt werden, verkürzt die Behandlungsdauer, kann zu einer verbesserten Vernichtung von Tumorzellen und somit zu einer möglicherweise dauerhaften Tumorkontrolle führen (Molls und Andratschke, 2003). Ziel einer kombinierten Radiochemotherapie sollte zudem stets sein, Toxizität und Nebenwirkungen möglichst nicht zu verstärken. Bei der Interaktion von Substanzen in Kombination mit Bestrahlung können folgende Effekte beobachtet werden (Steel und Peckham, 1979; Fu, 1985) :

Additiver Effekt (Addition der Einzelwirkungen von Strahlung und Substanz)

Subadditiver Effekt (Gesamtwirkung kleiner als Einzelwirkungen)

Supraadditiver Effekt (Gesamtwirkung größer als Einzelwirkungen)

Zur Auswertung von Kombinationseffekten können verschiedene Modelle zum Einsatz kommen (Tallarida, 2006; Zhao et al., 2010). Die isobolographische Darstellung wurde ursprünglich bereits 1928 von Loewe beschrieben (Loewe, 1928). 1979 führten Peckham und Steel den Begriff des „Envelope of Additivity“ ein (Steel und Peckham, 1979). Hier wird der Kombinationseffekt zweier Therapien, wie beispielsweise Bestrahlung und Chemotherapie, und deren unterschiedliche Wirkweisen beschrieben.

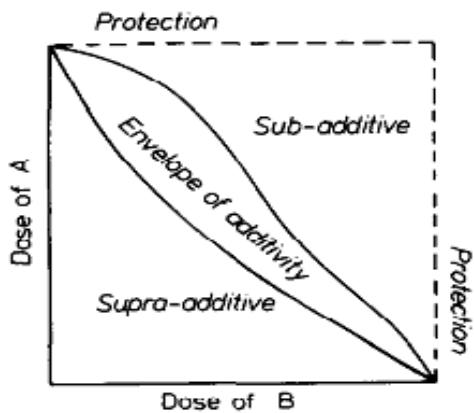


Abbildung 2: Envelope of Additivity (aus Steel und Peckham, 1997)

Die vorhergehende Darstellung zeigt den sogenannten „Envelope of Additivity“, welcher durch zwei Linien begrenzt ist. Die obere Kurve ergibt sich, wenn die beiden Therapien unabhängig voneinander wirken. Die untere Kurve beschreibt den Fall, dass die beiden Therapien den genau gleichen Wirkmechanismus besitzen. Datenpunkte, die innerhalb des „Envelope of Additivity“ liegen, gelten als additiv, darunter liegende als supraadditiv und oberhalb liegende als subadditiv (Steel und Peckham, 1979; Tallarida, 2006). Eine weitere Möglichkeit, Kombinationseffekte zu beschreiben, stellen sogenannte Contourplots dar. In diesen erfolgt die Darstellung des Zellüberlebens anhand von Höhenlinien, aus denen die Effekte der Substanzen abgelesen werden können. Sowohl in der linearen, als auch in der logarithmischen Darstellung von Zellüberlebenskurven kann zudem auch eine Tendenz bezüglich Additivität, Subadditivität oder Supraadditivität von Kombinationswirkungen beschrieben werden.

2. Epothilone

2.1. Allgemeines

Epothilone stellen eine Klasse von Zytostatika dar, deren Wirkstoff aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurde (Reichenbach und Höfle, 2008). Der Name Epothilon setzt sich aus den Struktureinheiten Epoxid, Thiazol und Keton zusammen (Höfle, 1996; Schinzer und Limberg, 2000). Man unterscheidet zwischen Epothilonen A bis F, wobei die Epothilone B eine zusätzliche Methylgruppe tragen. Ixabepilone gehören als semisynthetische Epothilone zur Gruppe der Epothilone B (Lee und Swain, 2008; Hunt, 2009).

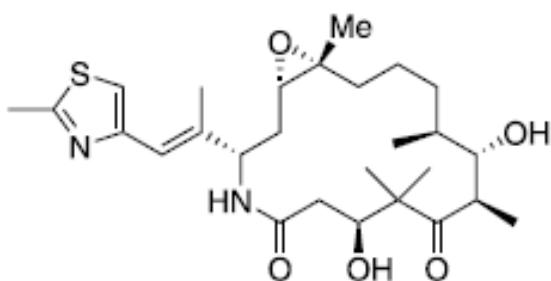


Abbildung 3: Strukturformel Ixabepilon (aus Hunt, 2009)

Die Anwendung von Epothilonen stellt eine mögliche Alternative in der kombinierten Radiochemotherapie dar, da der Einsatz des hierbei oft verwendeten Zytostatikums Paclitaxel häufig durch Taxan-resistente Tumoren sowie durch eine dosislimitierende Toxizität, insbesondere Myelosuppression, Neuropathien und gastrointestinale Nebenwirkungen, eingeschränkt ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass Epothilone im Gegensatz zu Paclitaxel gut wasserlöslich sind. Des Weiteren können sie mit relativ einfacherem technischen Aufwand über Synthese oder durch bakterielle Fermentation in großen Mengen hergestellt werden. Es hat sich zudem gezeigt, dass Epothilone in Multidrug-resistanten Tumoren wirken können (Bollag et al., 1995; Lee et al., 2009).

2.2. Wirkung

Die pharmakologische Wirkung von Epothilonen beruht auf der Stabilisierung von Mikrotubuli in Tumorzellen. Dieser Wirkmechanismus wurde bislang nur bei Vertretern der Stoffklasse der Taxane nachgewiesen.

Sowohl Taxane als auch Epothilone binden an Mikrotubuli-Heterodimere. Jedes dieser Mikrotubuli-Dimere besteht aus zwei Proteinuntereinheiten, dem α - und β -Tubulin (Bollag et al., 1995). Mikrotubuli sind Hauptbestandteile der mitotischen Zellspindel und haben somit eine zentrale Bedeutung in der Zellteilung. Des Weiteren sind sie an verschiedenen Zellfunktionen, wie dem intrazellulären Transport, dem Aufbau des Spindelapparates sowie des Zytoskeletts der Zelle beteiligt (Wilson et al., 1999). Epothilone binden an das β -Tubulin der Mikrotubuli, hierbei wird das Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht durch Verringerung der Dissoziationsgeschwindigkeit beeinflusst. Es werden zahlreiche kurze Mikrotubuli gebildet, die Polymerisation wird stimuliert, mitotische Spindeln werden nicht korrekt ausgebildet, und somit kann keine Zellteilung mehr stattfinden (Bollag et al., 1995; Wilson et al., 1999; Lee und Swain, 2008; Lee et al., 2009). Es kommt zu einem mitotischen Arrest in der G2/M Phase, die Phase des Zellzyklus, in der Zellen die größte Radiosensitivität aufweisen. Die Zelle wird in dieser Phase des Zellzyklus arretiert und der Zelltod wird eingeleitet (Bollag et al., 1995; Schinzer und Limberg, 2000). Der Effekt der Epothilone weicht grundlegend vom Wirkmechanismus der Vinca-Alkaloide (z.B. Vincristin, Vinblastin) ab. Vinca-Alkaloide binden ebenfalls an die β -Untereinheit des Tubulins und hemmen auf diese Weise die Polymerisation von Tubulin. Somit kommt es zu einer verminderten Neubildung von Mikrotubuli (Wilson et al., 1999).

2.3. Pharmakokinetik

Bei einer Dosierung von 15 bis 57 mg/m² Ixabepilon liegt eine lineare Pharmakokinetik mit einer Eliminationshalbwertszeit von 52 Stunden vor. Die *in-vitro* beobachtete Bindung an humane Serumproteine lag bei 67% bis 77%, die Plasmaproteinbindung bei 79,4% (Lee et al., 2008). Die Metabolisierung von Ixabepilon findet oxidativ auf dem Cytochrom P-450 3A4 Weg in der Leber statt (Goel et al., 2008; Lee et al., 2008). Die Elimination von metabolisiertem Ixabepilon erfolgt zu 52,2% über den Fäces und zu 25,1% über den Urin (Steinberg, 2008).

2.4. Präklinische und klinische Studien

Die Wirksamkeit von Epothilonen *in-vitro* und *in-vivo* wurde in verschiedenen vorangegangenen Studien getestet. Hierbei ergab sich unter anderem eine Empfindlichkeit von humanen Lungen-, Kolon-, Mamma-, Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinomzelllinien bereits bei niedrigen Ixabepilon-Dosierungen ab 1 nM (Kim et al., 2003; Lee et al., 2008; Steinberg, 2008; Lee et al., 2009). Subnanomolare Konzentrationen von Patupilon (Epothilon B) erzielten allein und in Kombination mit Bestrahlung einen deutlichen antiproliferativen Effekt gegenüber Taxol-resistenten Kolonkarzinom-Zelllinien (Hofstetter et al., 2005). Die IC₅₀-Dosis von Ixabepilon *in-vitro* beträgt je nach Zelllinie 1,4 bis 34,5 nM (Lee und Swain, 2008; Lee et al., 2009; Hunt, 2009).

Verschiedene *in-vivo* Studien weisen auf eine klinische Wirksamkeit von Ixabepilon gegenüber Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom, Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom sowie urothelialen Tumoren hin (Steinberg, 2008). Klinische Phase-II-Studien zeigten ein Ansprechen von nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom, Blasenkarzinom und Nierenzellkarzinom auf Ixabepilon (Steinberg, 2008). Die Neurotoxizität, die häufig als Nebenwirkung bei Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen auftritt, limitierte jedoch in vielen Fällen den Einsatz und erfordert eine Dosisreduktion von Ixabepilon (Larkin und Kaye, 2007; Dreicer et al., 2007; Steinberg, 2008; Yardley, 2009). In einer weiteren Phase-II-Studie kam Ixabepilon bei Patienten mit metastasiertem oder rezidivierendem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zum Einsatz (Burtness et al., 2008). Obwohl in dieser Studie eine antitumorale Wirkung von Ixabepilon gegenüber Kopf-Hals-Tumoren gezeigt werden konnte, ergab sich eine deutliche Neurotoxizität, die durch eine frühere Behandlung mit Paclitaxel verstärkt wurde. Ixabepilon könnte jedoch bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren Anwendung finden, die noch keine vorhergehende Behandlung mit Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen wie Paclitaxel erhalten haben (Burtness et al., 2008).

In den USA ist Ixabepilon (Ixempra®, Hersteller Bristol-Myers Squibb) seit 2007 zugelassen für Patientinnen mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs in Kombination mit Capecitabine oder als Monotherapie bei Patientinnen, die auf eine vorausgegangene Therapie mit Taxanen, Capecitabine und Anthrazyklinen nicht angesprochen haben und wenn eine weitere Anthrazyklintherapie nicht angezeigt ist (Hunt, 2009).

2.5. Nebenwirkungen

Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen von Ixabepilon sind Neutropenie (85%), periphere Neuropathie (64%), Anorexie (30%) sowie gastrointestinale Störungen in Form von Nausea (50%), Diarrhoe (38%) und Vomitus (37%) (Steinberg, 2008; Yardley, 2009).

3. MDM2-Antagonisten

3.1. Allgemeines

Der Tumorsuppressor p53 besitzt eine zentrale Bedeutung für die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus und für die Induktion der Apoptose. Da p53 Schädigungen und Mutationen der Zelle registriert, wird es häufig auch als „Genomwächter“ bezeichnet. Die wesentlichen Aufgaben von p53 sind Apoptoseinduktion, DNA-Reparatur sowie Regulation und Kontrolle der Zellzyklusprogression (Dahm-Daphi, 2000; Belka et al., 2003). Über die Hälfte aller Tumoren weisen eine Mutation im p53-Gen auf (Nylander et al., 2000; Rothweiler et al., 2008; Lu und El-Deiry, 2009), bei Kopf-Hals-Tumoren stellt dies die häufigste Mutation dar (Somers et al., 1992).

Der natürliche Gegenspieler von p53 ist das Onkogen MDM2. MDM2 (Murine Double Minute 2) ist eine E3 Ubiquitin-Ligase und wurde erstmals in einer mutierten Mauszelllinie entdeckt, wo es sich in gepaarten, azentrischen Chromatinkörperchen („Double Minutes“) befand (Cahilly-Snyder et al., 1987). MDM2 und p53 stehen über einen autoregulatorischen Feedback-Mechanismus in enger Verbindung. p53 wird unter physiologischen Bedingungen von MDM2 kontrolliert und reguliert (Momand et al., 2000). Die p53-Bindungstelle besteht aus nur 3 Aminosäuren (Phe19, Trp23 und Leu26), die in einer hydrophoben Tasche auf der Oberfläche von MDM2 inserieren (Vassilev, 2007). Durch die Bindung von p53 an MDM2 kommt es zur Regulation der Expression von p53. Sobald die MDM2-Konzentration steigt, bindet und inaktiviert es p53, indem es p53 direkt blockiert, ubiquitiniert und über das Proteasom abbaut (Nylander et al., 2000; Chène, 2004; Hardcastle, 2007). Es schaltet die Funktion von p53 über das Schlüssel-Schloss-Prinzip aus. Somit halten sich p53 und MDM2 unter physiologischen Bedingungen in gesunden Zellen gegenseitig auf einem niedrigen Level (Vassilev et al., 2004; Vassilev, 2007; Impicciatore et al., 2010). Im

Gegensatz dazu kann in malignen Tumoren häufig eine Überexpression von MDM2 beobachtet werden (Chène, 2004; Liu et al., 2009).

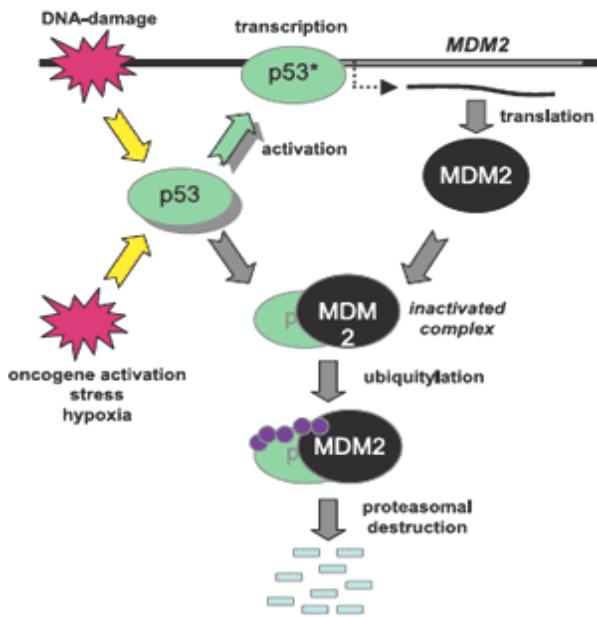


Abbildung 4: MDM2-p53-Interaktion (aus Hardcastle, 2007)

Eine spezifische Blockierung der Wechselwirkung zwischen MDM2 und p53 gilt als innovativer Therapieansatz zur Bekämpfung von Tumorzellen. Es existieren unterschiedliche Ansätze, um die onkogene Aktivität von MDM2 zu inhibieren (Vassilev, 2007; Wade und Wahl, 2009). Zwischenzeitlich befinden sich diverse MDM2-Antagonisten in der Entwicklungsphase.

3.2. Wirkung

Die Wirkungsweise der MDM2-Inhibition beruht auf einer Hemmung der Bindung zwischen p53 und MDM2. Nutlins (niedermolekulare Verbindungen) imitieren die Bindungsstelle von p53 und binden an die hydrophobe Tasche von MDM2 (Vassilev et al., 2004; Impicciatore et al., 2010). Dies führt zur Stabilisierung von p53 und einer Aktivierung des p53-basierten Apoptoseweges. Zusätzlich dazu kommt es zu einer Blockade des Zellzyklus in der G1- und G2-Phase (Vassilev et al., 2004). Eine andere kleinmolekulare Verbindung, das sogenannte RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) bindet direkt an p53 und kann auf diesem Weg die MDM2-p53 Interaktion

unterbrechen und die p53-Wirkung reaktivieren (Vassilev, 2007; Roh et al., 2011). Zudem soll eine Reihe von Substanzen mit Benzodiazepin-Gerüst als MDM2-Antagonisten agieren (Vassilev, 2007). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten MDM2-Inhibitor PXN 727 handelt es sich um ein Isoquinolin-Derivat. Andere Vertreter dieser Substanzgruppe zeigten bereits *in-vitro* eine erkennbare Wirksamkeit gegenüber verschiedener Tumorzelllinien (Rothweiler et al., 2008; Cheok et al., 2011).

3.3. Präklinische Studien

Eine Studie an verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien zeigte eine Sensibilisierung von p53-Wildtyp-Zelllinien gegenüber kleinmolekularen MDM2-Inhibitoren (Nutlins). Nutlin-3 bewirkte hier eine 8- bis 50-fache Steigerung des IC₅₀ Wertes in Kombination mit Cisplatin oder Etoposid im Vergleich zur Behandlung mit alleiniger Chemotherapie. Außerdem ermöglichte die Kombination mit Nutlin-3 eine Dosisreduktion der Chemotherapeutika (Barbieri, et al., 2006). In einer weiteren Studie wurden Prostatakarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status (p53-Wildtyp, -mutiert, -null) auf deren Radiosensibilisierung durch Nutlin-3 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen auf eine p53-unabhängige Radiosensitivierung hypoxischer Prostatakarzinomzellen hin (Supiot et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Arbeitsgruppe lediglich auf p53-Wildtyp-Zelllinien einen Effekt von Nutlins beobachten (Cao et al., 2006).

3.4. Nebenwirkungen

Bei *in-vivo*-Versuchen mit dem oral wirksamen MDM2-Inhibitor PXN 727 wurden bei einer Dosierung von 200mg/kg weder ein Gewichtsverlust der untersuchten SCID-Mäuse noch histopathologische Veränderungen in den Geweben nachgewiesen (Ross et al., 2009). Sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* Studien mit verschiedenen kleinmolekularen p53-reaktivierenden Substanzen ergaben eine geringe Toxizität gegenüber gesunden Geweben und keine genotoxischen Effekte (Roh et al., 2011). Eine genaue Evaluierung der Nebenwirkungen in klinischen Studien bleibt abzuwarten.

4. Kopf-Hals-Tumoren

4.1. Ätiologie und Epidemiologie

Kopf-Hals-Tumoren zählen zu den weltweit fünft-häufigsten Krebsarten (Reiter et al., 2009), sie stehen an fünfter Stelle der Krebsneuerkrankungen bei Männern und an fünfzehnter Stelle bei Frauen in Deutschland (Kaatsch et al., 2012). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 44% und für Frauen bei 59% (Kaatsch et al., 2012). Beim Hypopharynxkarzinom wird die 5-Jahres-Überlebensrate im Tumorstadium T1 und T2 zwischen 50% bis 60% und im Stadium T4 bei unter 30% angegeben (McMahon und Chen, 2003; Röper et al., 2009). Über 90% der Kopf-Hals-Tumoren stellen Plattenepithelkarzinome dar (Marur und Forastiere, 2008). Als prädisponierender Faktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gelten die Kombination aus chronischem Alkohol- und Nikotinkonsum (Somers et al., 1992; McMahon und Chen, 2003; Smith et al., 2010; Kaatsch et al., 2012), wobei der Alkohol hier als Lösungsmittel für kanzerogene Stoffe im Nikotin fungieren kann (Marur und Forastiere, 2008; Purdue, 2009). Des Weiteren wird das im asiatischen Raum verbreitete Kauen von Bethelnüssen als ein wesentlicher Faktor angesehen. Der Anteil an Kopf-Hals-Tumoren in Asien liegt bei über 20% (Hsiao et al., 2009; Huang et al., 2009). Verschiedene Noxen wie Nickel und Asbeststaub (Marur und Forastiere, 2008), sowie Infektionen mit dem humanen Papillomavirus (Hoffmann, 2009; Smith et al., 2010) können ebenfalls das Auftreten von Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich fördern.

4.2. Pathologie und Klinik

Kopf-Hals-Tumoren werden entsprechend ihrer Lokalisation in Tumoren des Rachens, der Mundhöhle, des Kehlkopfes, der Nase und der Nasennebenhöhlen eingeteilt. Die Tumoren des Rachens lassen sich wiederum in Oropharynx-, Hypopharynx- und Nasopharynxkarzinome unterteilen. Der Hypopharynx stellt den Teil des Rachens zwischen der Epiglottis und dem Oesophagusbildung dar, er wird auch als Schlundrachen bezeichnet. Das Hypopharynxkarzinom tritt meist (>65%) im Sinus piriformis beidseits der Plica aryepiglottica auf (Marur und Forastiere, 2008; Röper et al., 2009). Aufgrund der guten lymphatischen Versorgung dieses tributären Gebietes wird häufig eine frühe Metastasierung in

regionale Lymphknoten beobachtet. Eine Fernmetastasierung erfolgt meist in die Lunge (53,5%), seltener treten Knochen- oder Lebermetastasen auf (Dietl et al., 2007).

4.3. Therapie

Der Therapieansatz von Kopf-Hals-Tumoren ist abhängig von dem Tumorstadium und der Lokalisation des Tumors. Aufgrund der unspezifischen Symptome (Schluckbeschwerden, Heiserkeit) und des schnellen Tumorwachstums wird die Diagnose oft erst in einem relativ späten Stadium gestellt (Marur und Forastiere, 2008). Anatomisch ist eine radikale Tumorresektion im Kopf-Hals-Bereich aufgrund funktioneller und kosmetischer Aspekte häufig nicht möglich (Dietl et al., 2007). Karzinome in frühen Tumorstadien (Stadium 1) ohne Befall der Lymphknoten haben gute Heilungschancen durch alleinige chirurgische Behandlung oder Radiotherapie (Gil und Fliss, 2009). Patienten mit infiltrativ wachsenden Tumoren und Lymphknotenbefall profitieren zumeist nur von kombinierten Therapien, bestehend aus Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie. Patienten mit inoperablen Tumoren werden mit simultaner Radiochemotherapie behandelt (Marur und Forastiere, 2008; Gil und Fliss, 2009). Aufgrund der Komplexität in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren sind ein interdisziplinärer Therapieansatz sowie die Weiterentwicklung zielgerichteter und individualisierter Behandlungsmöglichkeiten von großer Bedeutung.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Zelllinie

Die humane Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu wurde 1968 aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines 56-jährigen männlichen Patienten aus Kalkutta (Indien) isoliert. Es handelte sich um einen Primärtumor, Tumorgrad 2 (Ragnan, 1972). 1974 wurde diese Zelllinie in die American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland USA) aufgenommen. Die Zelllinie besitzt die Eigenschaften eines schlecht differenzierten, unverhornten Plattenepithelkarzinoms. Die Verdopplungszeit *in-vivo* beträgt 72 bis 94 Stunden bei einer Volumenverdopplung von 100 bis 400 mm³ (Petersen und Baumann, 1998). Aufgrund von Punktmutationen in den Codons 248 und 273 liegt der Tumorsuppressor p53 in dieser Zelllinie mutiert vor (Reiss et al., 1992; Somers et al., 1992).

1.2. Geräte

<i>Absaugvorrichtung:</i>	Vakuum-Pumpe	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
<i>Bestrahlungsgerät:</i>	RT 100; 10 bis 100 kV	Philips GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Brutschrank:</i>	Heraeus BBD 6220; 230 V; 2,4 A; 1,2 kW;	Thermo Fisher scientific, Rochester, USA
<i>Durchflusszytometer:</i>	FACSCalibur™	Becton Dickinson, San Jose, USA
<i>Elispot-Reader:</i>	Bioreader	BIO-SYS GmbH, Karben, Deutschland
<i>Kryo-Einfrierbehälter:</i>	Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA

<i>Mikroskop:</i>	Axiovert 135, Seriennr. 78506	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
<i>Multipette:</i>	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Neubauer-Zählkammer:</i>	Tiefe 0,1 mm; Fläche 0,0025 mm ²	Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland
<i>Pipettierhilfe:</i>	Stripettor Costar	Corning Incorporated, Arizona, USA
<i>Sterilbank:</i>	Hera safe , Typ KS 18, Working Volume 1800x780x627mm	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
<i>Wasserbad :</i>	22 l	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
<i>Zentrifuge:</i>	Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo scientific, Waltham, USA

1.3. Verbrauchsmaterial

<i>Kombitips:</i>	Kombitips plus: 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Kryoröhrchen:</i>	1 ml	Nalgene, Rochester, USA
<i>Pipetten:</i>	Einwegpipetten: 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipettenspitzen:</i>	Sarstedt Pipettenspitzen : 10 µl; 200 µl; 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<i>Sterilfilter:</i>	0,2 µm Filter, 500 ml	Nalgene, Rochester, USA
<i>Zellkulturplatten:</i>	12-Well-Platten, 96-Well- Platten; pyrogenfrei, Zellkultur-behandelt	Corning Incorporated, Arizona, USA
<i>Zellkulturfaschen:</i>	T 25 (Anwuchsfläche 25 cm ²), 2 µm Vent Cap T 75 (Anwuchsfläche 75 cm ²), 2 µm Vent Cap	Corning Incorporated, Arizona, USA
<i>Zentrifugen- Röhrchen:</i>	Polypropylene Conical Tubes; 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

1.4. Reagenzien

<i>Aminosäuren:</i>	Non essential Amino Acids	PAA Cell culture company laboratories, Pasching, Österreich
<i>Apoptose Kit:</i>	FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD Pharmingen, San Jose, USA
<i>Desinfektionsmittel:</i>	Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
<i>DMEM:</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium, GCO 41966, Inclusive 4,5 g/l Glucose, L-Glutamine, Pyruvat	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>DMSO:</i>	Dimethyl-Sulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>DPBS :</i>	Dulbecco's phosphate buffered saline, 14190, ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	Invitrogen Corporation , Carlsbad, USA
<i>FCS:</i>	fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min	PAA Cell culture company laboratories, Pasching, Austria
<i>Hepes-Puffer:</i>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonsäure GIBCO 15630	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>Kristallviolett:</i>	0,25% wässrig, Methylrosaniliumchlorid	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
<i>Methanol:</i>	99,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

<i>Pen/Strep:</i>	10.000 Units/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>Trypanblau:</i>	Tetranatrium-3,3'-(3,3'-dimethyl[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[5-amino-4-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonat] 0,1% in PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Trypsin/EDTA:</i>	0,05 / 0,02% in PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

1.5. Verwendete Substanzen

<i>Ixabepilon</i> (Ixempra®):	Lyophilisat in Cremophor gelöst, 2 mg/ml, Stocklösung von 3,944 mM , Aufbewahrung bei -20°C in 50 µl Aliquots	Bristol-Myers Squibb, New York, USA
<i>MDM2-Inhibitor</i> (PXN 727):	Pulver in DMSO gelöst, Stocklösung von 10 mM, Aufbewahrung bei 4°C in 50 µl Aliquots	Priaxon AG, München, Deutschland

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Subkultivierung

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert und unter dem Mikroskop auf Wachstumszunahme, Adhärenz, Konfluenz sowie auf eventuelle Besiedelung mit Mikroorganismen überprüft. Nach Entfernung des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde 1,5 ml Trypsin zugegeben, gleichmäßig verteilt und die Zellen für eine Dauer von 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden unter dem Mikroskop kontrolliert und anschließend 4,5 ml Medium hinzugefügt, um die enzymatische Wirkung des Trypsins zu unterbrechen. Die Zellsuspension wurde gründlich resuspendiert, um die Zellen zu vereinzen. 20 µl dieser Einzelzellsuspension wurden daraufhin mit 20 µl Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. In eine T75-Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm² wurden konstant 1,5 x 10⁶ Zellen eingesät und mit Medium bis zu einem Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Nachdem die optimale Verteilung der Zellen unter dem Mikroskop geprüft worden ist, wurden die Zellen bis zur nächsten Passage im Brutschrank inkubiert.

2.1.2. Kryokonservierung

Um Zellen für die Langzeitlagerung einzufrieren, wurden sie trypsiniert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in Einfriermedium (Pen/Strep-freies DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurden 1 x 10⁶ Zellen (aufgenommen in 1 ml Einfriermedium) eingefroren. Diese wurden sofort in einen vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter gegeben und mit einer Geschwindigkeit von 1°C/min auf -80°C herunter gekühlt. Nach 48 Stunden erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen der Zellen wurde das jeweilige Kryoröhrchen im Wasserbad bei

einer Temperatur von 37°C aufgewärmt, 1 ml Medium zu den aufgetauten Zellen gegeben und resuspensiert. Die Zellsuspension wurde zu weiteren 9 ml Medium hinzugefügt und bei 1000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 7 ml Medium resuspensiert, das Gemisch in eine T25-Zellkulturflasche überführt und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei ein Teil des verbrauchten Mediums belassen wurde, um ein verbessertes Anwachsen aufgrund der vorhandenen Wachstumsfaktoren zu bewirken.

2.2. Koloniebildungssassay

Im Koloniebildungssassay wird die Fähigkeit klonogener Tumorzellen zur Koloniebildung untersucht. Diese Methode kann zur Bestimmung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber verschiedener Substanzen und Bestrahlung angewendet werden. Es wurde eine definierte Zellzahl ausgesät, bestrahlt und mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen wurden die gebildeten Kolonien gefärbt und gezählt.

2.2.1. Ansatz

Als Vorversuchsreihe wurden Koloniebildungstests zur Zellzahlbestimmung in 12-Well-Platten durchgeführt. Diese Vorversuche bildeten die Grundlage für die Untersuchungen zur Koloniebildung von Tumorzellen unter Einfluss von Ixabepilon sowie des MDM2-Inhibitors PXN 727 in Kombination mit Bestrahlung.

Für die Zelllinie FaDu wurden nach Anfertigung einer schrittweisen Verdünnungsreihe 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 und 8000 Zellen ausgesät. Die Inkubationsdauer betrug 12 Tage, wobei eine Koloniegröße bestehend aus mindestens 50 Zellen angestrebt wurde. Aus den Vorversuchen ergab sich für die Zelllinie FaDu eine optimale Zellzahl von 1000 Zellen für 0 und 2 Gy, 2000 Zellen bei 4 Gy, 4000 Zellen bei 6 Gy und 8000 Zellen bei 8 Gy Strahlendosis.

2.2.2. Bestrahlung

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen mit 2,

4, 6, und 8 Gy bestrahlt. Zur Bestrahlung wurde das Gerät RT100 der Firma Philips verwendet, welches Spannungen zwischen 10 und 100 kV erzeugt. Für die folgenden Untersuchungen kam ein Kupfer-Filter mit 70 kV Spannung zum Einsatz. Die aktuelle Dosimetrie ergab einen Wert von 1,064 Minuten für eine Strahlendosis von 1 Gy. Die zu bestrahlenden Zellen wurden beginnend mit der höchsten Dosis von 8 Gy, nacheinander in absteigenden Strahlendosen bestrahlt und anschließend wieder im Brutschrank inkubiert.

Eine Stunde vor der Bestrahlung wurden die gewünschten Konzentrationen der Substanzen zugegeben. Diese entsprachen 0,5 nM, 1 nM und 2 nM für Ixabepilon sowie 1 µM, 2,5 µM und 5 µM für PXN 727. Die Konzentrationen wurden in einer Verdünnungsreihe mit PBS für jeden Versuch frisch hergestellt. Von den unterschiedlichen Konzentrationen wurden jeweils 100 µl pro Well zugefügt. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert, bis nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

2.2.3. Fixierung und Färbung

Um die Anzahl der gebildeten Kolonien zu bestimmen, wurden die Zellen nach der Inkubationszeit von 12 Tagen fixiert und gefärbt. Nach Entfernung des verbrauchten Mediums aus den 12-Well-Platten wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Fixation der Zellen mit 1 ml kaltem Methanol (-20°C) pro Well für 5 Minuten vorgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 1 ml Kristallviolett (0,1%) für 4 Minuten.

2.2.4. Auswertung

Die Auswertung der Anzahl gebildeter Kolonien kann entweder manuell unter dem Mikroskop oder mittels einer computergestützten Auswertung anhand eines Elispot Readers erfolgen.

Die fixierten und gefärbten Koloniebildungstests wurden am Elispot Reader „Bioreader“ mittels des Programms „Bioreader DE“ ausgewertet. Vor jeder Messung wurde die im Computer installierte Kamera mittels sogenannter Eichplatten kalibriert. Als Eichplatten dienten gefärbte 12-Well-Platten der Zelllinie FaDu, deren Kolonien 50 Zellen oder mehr umfassten. Diese Eichplatten

wurden mit Hilfe des Computers maschinell in einem interaktiven Modus ausgewertet, hierbei konnten Schärfe und Ausrichtung der Kamera optimiert werden. Diese Einstellungen wurden dann für die Zelllinie zum Messen der jeweiligen 12-Well-Platte verwendet.

Die Plattierungseffizienz der Zellen (Plating Efficiency) ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgezählten Kolonien zu den ausgesäten Zellen. Die Überlebensrate (Surviving Fraction) errechnet sich aus der Anzahl der behandelten ausgezählten Kolonien dividiert durch die Anzahl der unbehandelten ausgezählten Kolonien.

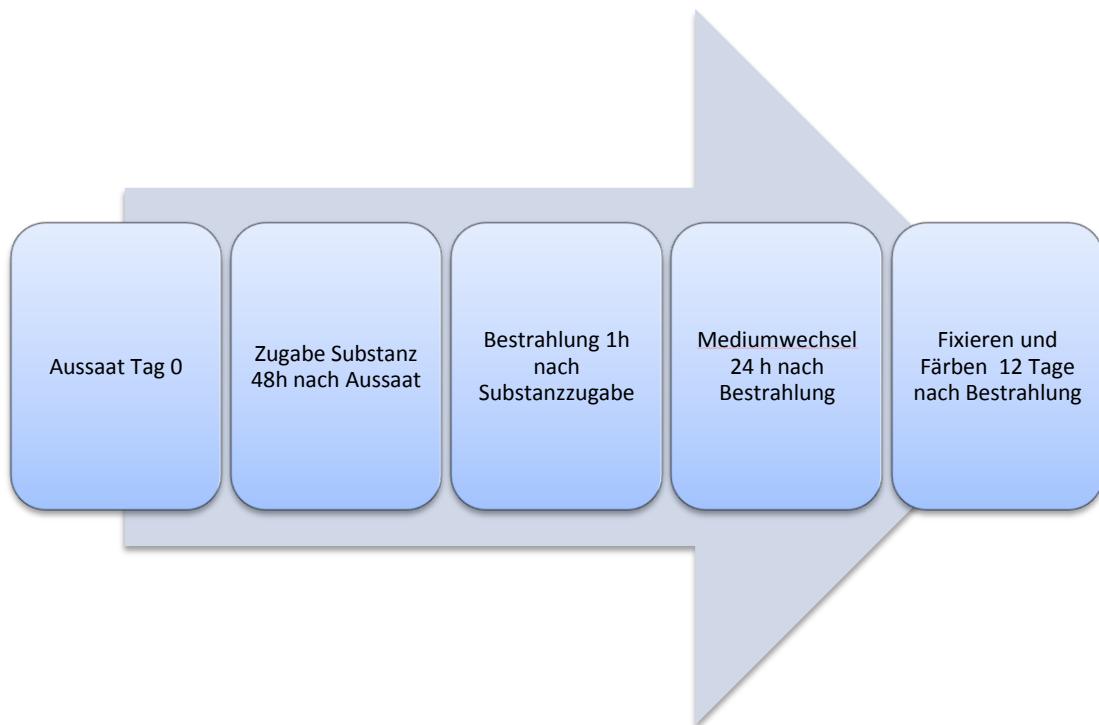


Abbildung 5: Versuchsaufbau Koloniebildungstest

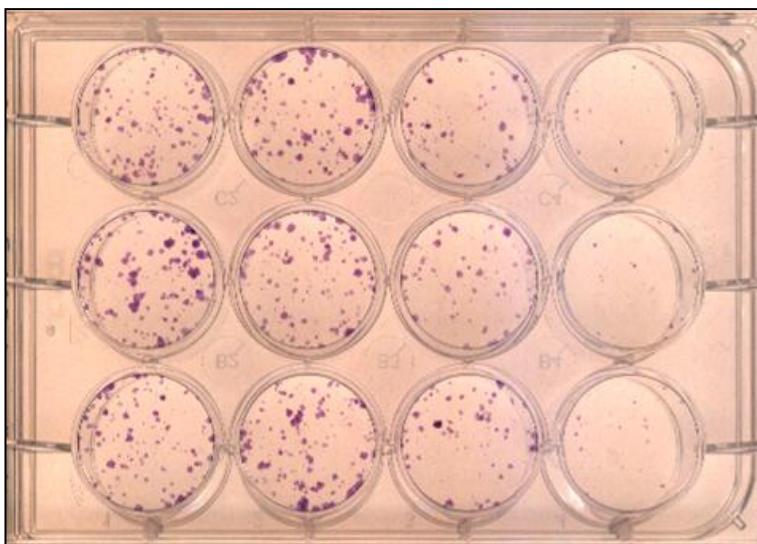


Abbildung 6: Beispiel einer gefärbten 12-Well-Platte für den Koloniebildungstest mit Ixabepilon

Eine definierte Anzahl von Zellen der humanen Tumorzelllinie FaDu wurde in aufsteigender Konzentration mit Ixabepilon behandelt (von links nach rechts: 0 nM, 0,5 nM, 1 nM und 2 nM Ixabepilon). Nach 12 Tagen erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen.

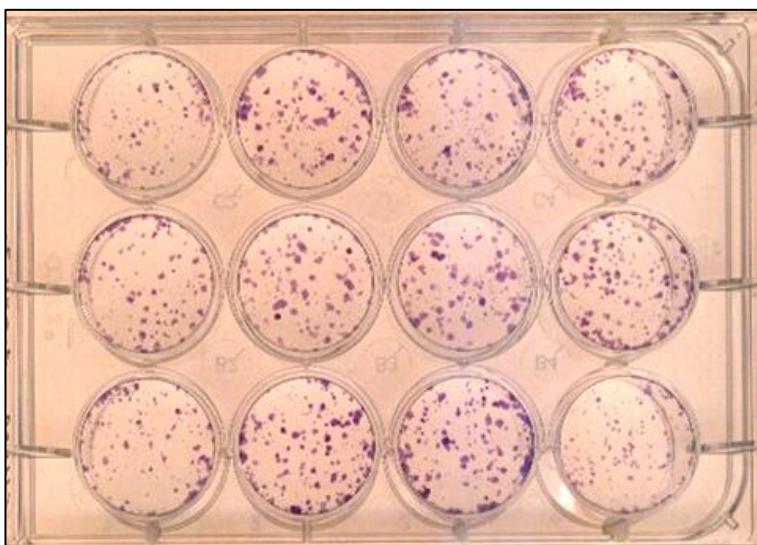


Abbildung 7: Beispiel einer gefärbten 12-Well-Platte für den Koloniebildungstest mit PXN 727

Eine definierte Anzahl von Zellen der humanen Tumorzelllinie FaDu wurde in aufsteigender Konzentration mit dem MDM2-Inhibitor PXN 727 behandelt (von links nach rechts: 0 µM, 1 µM, 2,5 µM und 5 µM PXN 727). Nach 12 Tagen erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen.

2.3. Apoptose-Messung mittels Durchflusszytometrie

Um ein Maß für die Schädigung der Tumorzellen durch Bestrahlung, Substanzeinwirkung oder der Kombination aus beiden festzustellen, wurde die Apoptoserate der Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Beim „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) werden die Zellen mit einem fluoreszenzgekoppelten (beispielsweise FITC, Fluoreszeinisothiocyanat) Antikörper markiert. Nach spezifischer Bindung des Antikörpers an die Zellen wird die Fluoreszenz, sowie die Lichtstreuung mit einem Laser im Durchflusszytometer erfasst.

Einzelzellen in Suspension werden hierbei durch eine feine Kapillare gesaugt und in einer Quarzküvette an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Die physikalischen und molekularen Eigenschaften (Zellgröße, Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit) der Zellen senden charakteristische Lichtsignale aus. Es können die Parameter Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und drei unterschiedliche Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3) gemessen werden. Der Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, Anregungswellenlänge) misst das durch die Zelle abgelenkte Licht, welches sich proportional zur Zellgröße verhält. Als Maß für die Zellgranularität wird durch den Side Scatter (Seitwärtsstreulicht, Anregungswellenlänge) im 90° Winkel zum an kommenden Licht die Lichtbrechung und Reflektion der Zellen gemessen. Die Fluoreszenzsignale (FL1, FL2, FL3) werden ebenfalls im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Sie verhalten sich proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Die Wellenlänge der Fluoreszenz ist vom verwendeten Fluorochrom abhängig. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) liegt die Absorption bei 488 nm und die Emission bei 525 nm (Rothe, 2007).

Die Auswertung der Daten kann in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen (Dot Plots) dargestellt werden. Beim Histogramm wird auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse die Zellzahl aufgetragen. In einem Punktwolkendiagramm wird jede gemessene Zelle als ein Punkt dargestellt. (Rothe, 2007).

2.3.1. Ansatz

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Milliliter in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.3.2. Bestrahlung

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen mit 5 und 10 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bereits für den Koloniebildungsassay beschrieben. Eine Stunde vor der Bestrahlung wurden die gewünschten Konzentrationen der Substanzen zugegeben. Diese entsprachen 0,2 nM und 2 nM für Ixabepilon sowie 2,5 μ M und 5 μ M für PXN 727. Die Konzentrationen wurden in einer Verdünnungsreihe mit PBS für jeden Versuch frisch hergestellt.

2.3.3. Caspase-3 Färbung

24, 48 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung wurde die Apoptoserate mittels Caspase-3 Assay durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Caspase-3 stellt als Schlüssel-Protease einen wichtigen Marker für Apoptose dar. In diesem Assay wird die Menge an aktiver Caspase-3 als Apoptosemarker in den Zellen bestimmt.

Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und nicht verworfen, um bei der Messung alle Zellen zu erfassen. Die Zellen wurden mit jeweils 2 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls nicht verworfen wurde. Nach einer Inkubation mit 0,5 ml Trypsin für vier Minuten zur Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 4°C 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml gekühltem PBS resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer Zählkammer wurde die gewünschte Anzahl von 2×10^5 Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l Cytofix-Cytoperm-Lösung aufgenommen. Diese Lösung dient der gleichzeitigen Fixierung mit Paraformaldehyd und Permeabilisierung der Zellen durch Saponin. Im Anschluss daran wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der

Inkubation wurden die Zellen zweimal mit jeweils 100 µl Perm/Wash Lösung gewaschen. Dieser Puffer enthält fetales Kälberserum, Saponin und Sodium-Azid. Die Saponin-bedingte Zellpermeabilisierung ist ein reversibler Prozess, weshalb die Versuchsdurchführung nach dessen Zugabe nicht mehr unterbrochen werden darf. Die Zellen wurden in 20 µl Perm/Wash Lösung plus 4 µl FITC Active Caspase-3-Antikörper resuspensiert. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis im Dunkeln, um eine Bindung des Antikörpers zu erreichen, ohne dass der fluoreszierende Farbstoff ausbleicht. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml Perm-Wash Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert und in FACS-Röhrchen zur Messung überführt.

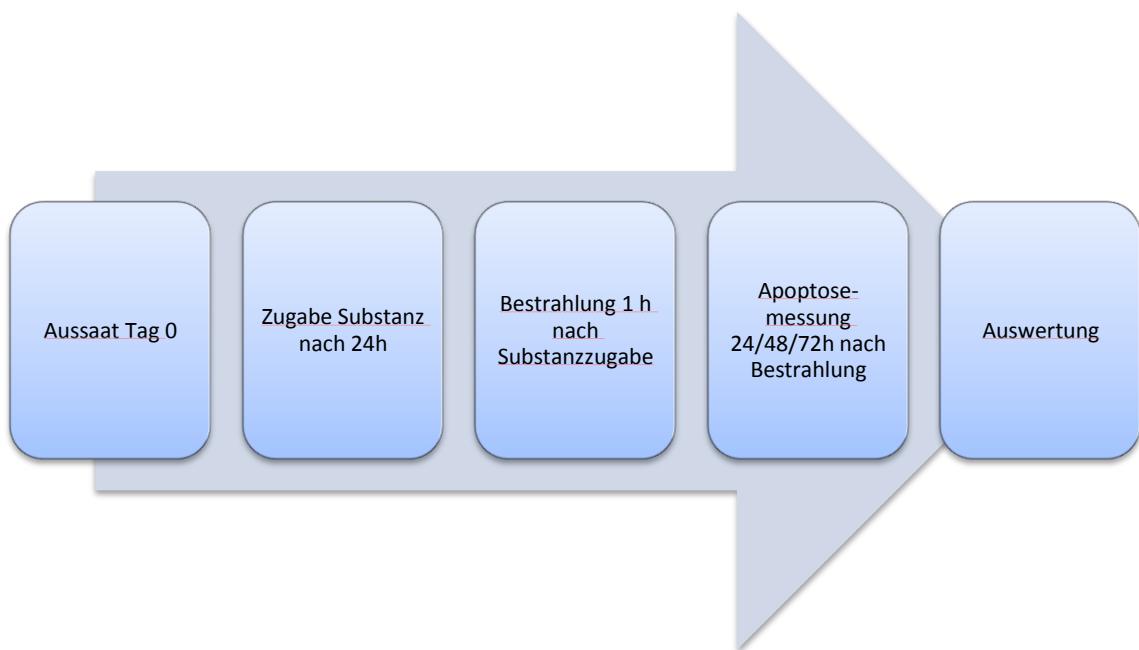


Abbildung 8: Versuchsaufbau Apoptosemessung

2.3.4. Messung

Die vorbereiteten Proben wurden unmittelbar vor der Messung auf dem Vortex gut durchmischt. Die Messung wurde stets mit einer unbehandelten Nullkontrolle begonnen und anhand dieser die zu messenden Parameter Zellgröße, Zellgranularität und Fluoreszenz eingestellt, wodurch die anschließend gemessenen, behandelten Proben verglichen werden konnten.

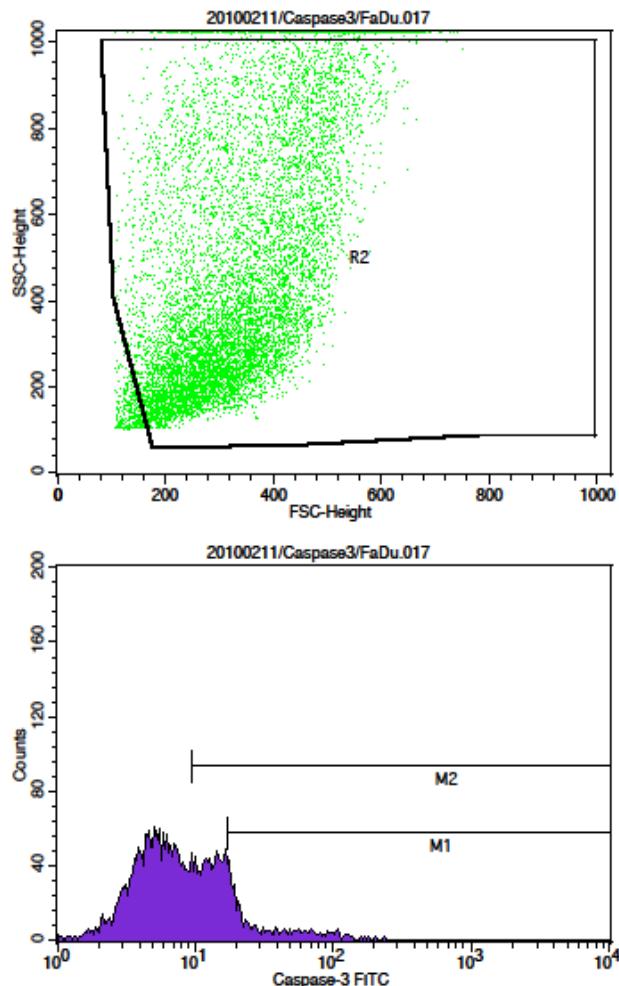


Abbildung 9: Beispiel für eine Auswertung der Apoptosemessung anhand Caspase-3-Aktivität

Durchflusszytometrische Messung der Caspase-3-Aktivität am Beispiel einer Behandlung der Zellen mit 2 nM Ixabepilon in Kombination mit 5 Gy Bestrahlung. Der Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht) misst das durch die Zelle abgelenkte Licht. Der Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht) stellt die Zellgranularität dar, beide Kriterien sind im grünen Punktwolkendiagramm dargestellt. Die Fluoreszenzintensität (FITC-Färbung) ist im darunterliegenden Histogramm (blau) veranschaulicht, wobei auf der x-Achse die Fluoreszenz-Intensität und auf der y-Achse die Zellzahl (Counts) dargestellt ist. Die eingefügten Marker M1 und M2 werden anhand der unbehandelten Kontrolle festgelegt.

2.4. Statistische Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mindestens dreimal jeweils unabhängig voneinander wiederholt. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung der jeweiligen Endergebnisse wurden prozentual beschrieben. Die Ergebnisse des Koloniebildungstests wurden in Form von Zellüberlebenskurven dargestellt. Für die Apoptosemessung wurde die Darstellungsweise in Balkendiagrammen gewählt. Für die Regressionsmodelle wurde keine feste funktionale Form des Einflusses angenommen, sondern dieser wurde anhand flexibler B-Spline-Funktionen aus den Daten abgeschätzt. Zur statistischen Berechnung wurde der Student's t-Test verwendet. P-Werte <0,05 wurden als signifikant betrachtet.

IV. ERGEBNISSE

1. Radiosensitivität Zelllinie FaDu

Die Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu wurde mit steigenden Strahlendosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray jeweils 48 Stunden nach Aussaat bestrahlt, und das Zellüberleben (Überlebensfraktion) gegen die Strahlendosis (Gy) logarithmisch in einer Dosis-Effekt-Kurve aufgetragen. Die Überlebensfraktion (Survival Fraction) definiert sich aus der Anzahl der behandelten ausgezählten Kolonien, dividiert durch die Anzahl der unbehandelten ausgezählten Kolonien. Das Zellüberleben verringerte sich auf 58,9% bei einer Strahlendosis von 2 Gy und auf 37,2% bei einer Bestrahlung mit 4 Gy. Wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt, reduzierte sich das Zellüberleben auf 6,3%. Bei einer Bestrahlung der Zellen mit 8 Gy war ein klonogenes Überleben von nur noch 1,4% zu verzeichnen.

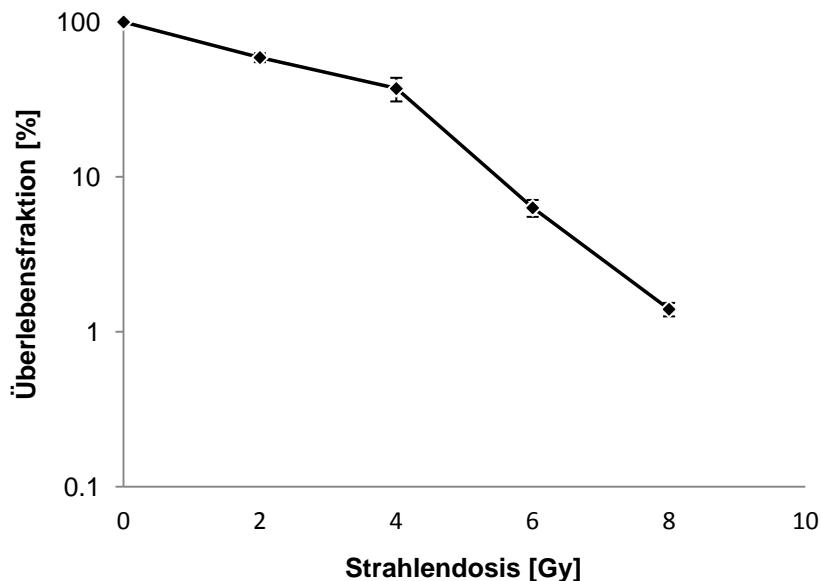


Abbildung 10: Zellüberlebenskurve von FaDu Zellen *in-vitro*

Die Überlebensfraktion (y-Achse) wurde logarithmisch in Abhängigkeit zur Strahlendosis (x-Achse) aufgetragen. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

2. Zytotoxizität der verwendeten Substanzen

2.1. Zytotoxizität von Ixabepilon

Um die Wirkung der steigenden Konzentration (0 bis 2,5 nM) von Ixabepilon auf die Überlebensfraktion der Zelllinie FaDu zu ermitteln, wurden die Zellen 48 Stunden nach Aussaat mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz behandelt. Das Zellüberleben im hierzu durchgeführten Koloniebildungstest lag für die niedrigste Konzentration von 0,5 nM Ixabepilon nahezu unverändert gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 100% Zellüberleben. Das klonogene Zellüberleben sank bei einer Dosierung von 1 nM Ixabepilon auf 73,3% und bei einer Dosierung von 2 nM auf 26,7%.

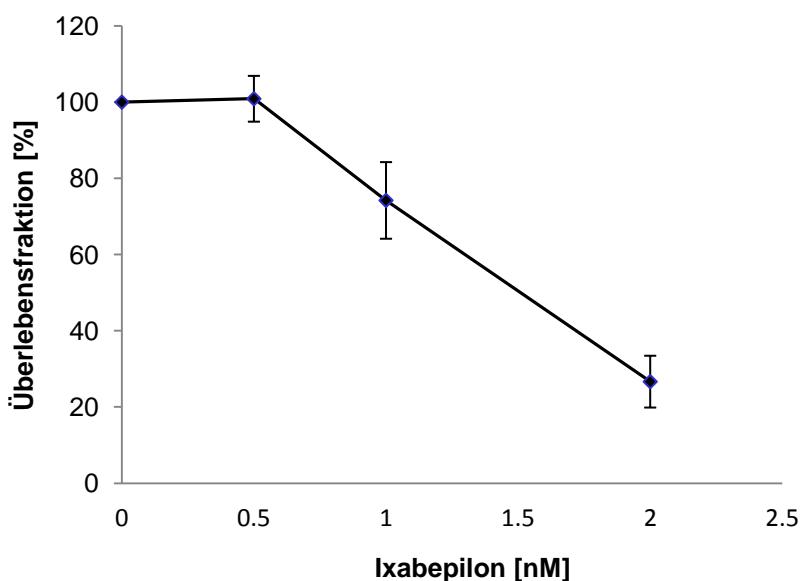


Abbildung 11: Zytotoxizität von Ixabepilon auf die Zelllinie FaDu

Einfluss von Ixabepilon in steigenden Konzentrationen von 0,5 bis 2 nM auf das Zellüberleben der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

2.2. Zytotoxizität von PXN 727

Ebenso wurde die Zytotoxizität der steigenden Konzentration (0 bis 5 μM) des MDM2-Inhibitors PXN 727 auf die Überlebensfraktion der Zelllinie FaDu im Koloniebildungstest untersucht. Das Zellüberleben von 100% bei der unbehandelten Kontrolle sank im Vergleich nur geringfügig auf 95,8% bei einer Zugabe von 1 μM des MDM2-Inhibitors PXN 727. Bei einer Konzentration von 2,5 μM ergab sich ein Zellüberleben von 94,9%, welches geringgradig auf 97,3% bei Zugabe von 5 μM der Substanz anstieg. Somit ließ sich kaum ein Einfluss des MDM2-Inhibitors PXN 727 auf die Zelllinie FaDu feststellen.

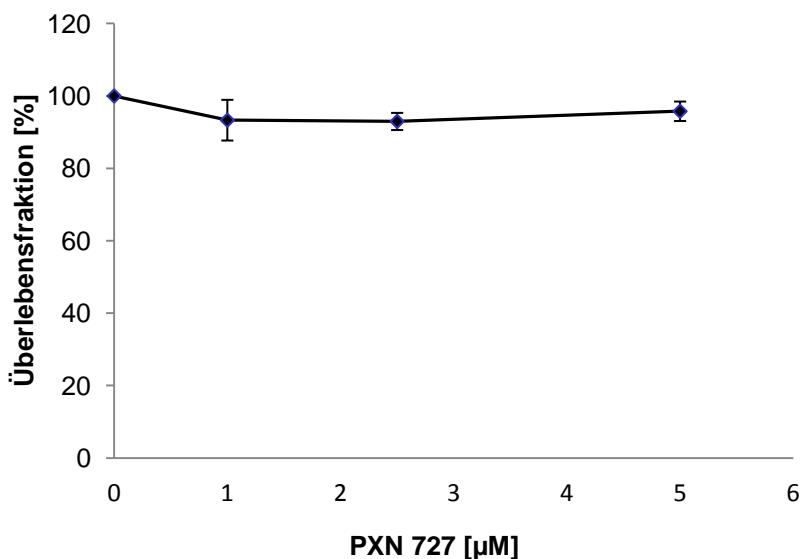


Abbildung 12: Zytotoxizität von PXN 727 auf die Zelllinie FaDu

Einfluss des MDM2-Inhibitors PNX 727 in steigenden Konzentrationen von 0 bis 5 μM auf das Zellüberleben der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

3. Einfluss der Kombinationstherapie auf das Zellüberleben

3.1. Einfluss von Ixabepilon und Bestrahlung

Die im Koloniebildungstest untersuchte Kombination aus verschiedenen Bestrahlungsdosen von 0 bis 8 Gy mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ixabepilon im Bereich von 0 bis 2 nM wurde 48 Stunden nach Aussaat der Zelllinie FaDu durchgeführt. Nach 12-tägiger Inkubation der Kolonien war hier bereits ohne Bestrahlung ein alleiniger Effekt von 1 nM Ixabepilon als Abfall der Überlebensfraktion von 100% auf 73,3% zu erkennen. Dieser verringerte sich bei einer Dosierung von 2 nM signifikant ($p = 0,008$) auf 26,3%. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,5 nM Ixabepilon hingegen ließ sich kein Effekt erkennen. Das Zellüberleben lag hier wie bei der unbehandelten Kontrolle bei 100%. Mit zunehmenden Bestrahlungsdosen sank auch das Zellüberleben weiter auf bis zu 16,9% bei 2 Gy in Kombination mit 2 nM Ixabepilon sowie auf 4,3% bei 4 Gy und 2 nM Ixabepilon. Ein signifikant ($p = 0,006$) vermindertes Zellüberleben von 1,6% war in der Kombination von 6 Gy und 2 nM der Substanz Ixabepilon zu beobachten. Bei einer Strahlendosis von 8 Gy lag das Zellüberleben in Kombination mit 2 nM bei nur 0,5%.

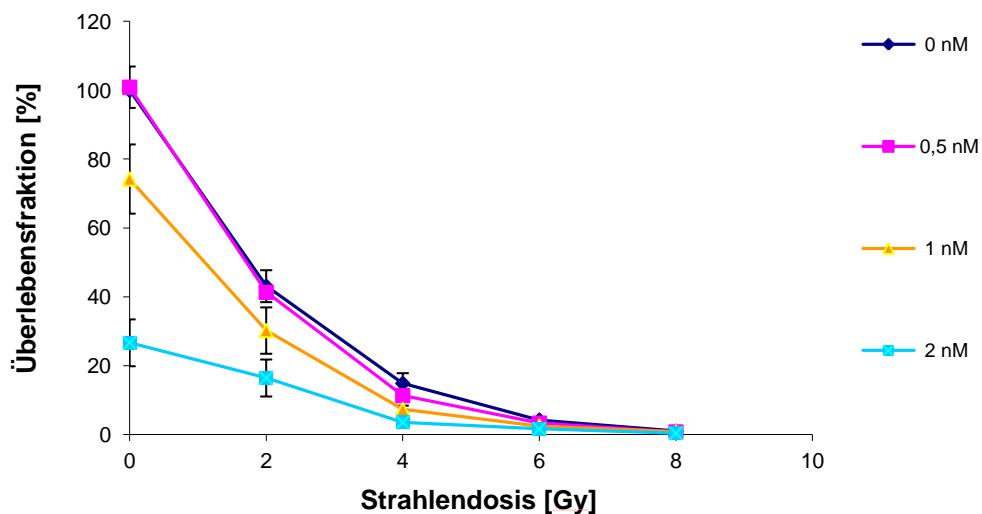


Abbildung 13: Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung, lineare Darstellung

Zellüberlebenskurven der untersuchten Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Ixabepilon (0,5 bis 2 nM) in Kombination mit aufsteigenden Strahlendosen (2 bis 8 Gy). Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

In der nachfolgenden logarithmischen Darstellung des Kombinationseffektes von Bestrahlung und Ixabepilon wurden die Überlebensfraktionen für jede Ixabepilon-Konzentration auf 100% normiert. Die Dosis-Effekt-Kurven lagen hier weitestgehend beieinander.

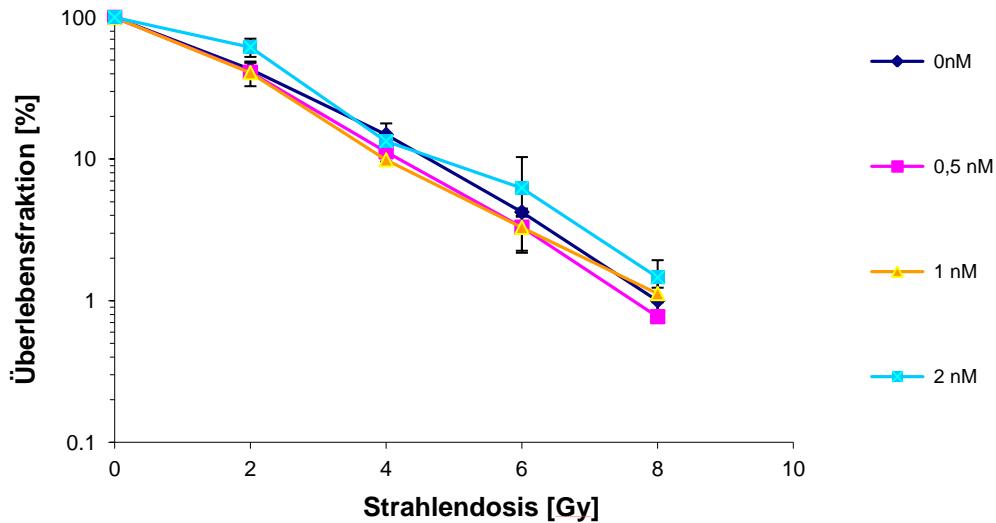


Abbildung 14: Logarithmische Darstellung der Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung

Zellüberlebenskurven der Zelllinie FaDu nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Ixabepilon (0,5 nM bis 2 nM) in Kombination mit Bestrahlung (2 Gy bis 8 Gy). Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Die Überlebensfraktionen (y-Achse) sind dabei logarithmisch dargestellt.

3.2. Contourdarstellung Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung

In der folgenden Abbildung wird der Kurvenverlauf des Zellüberlebens durch Höhenlinien dargestellt. Der Verlauf der Contourlinien gibt in diesem Modell Anhaltspunkte für die Art des Kombinationseffektes, so wäre bei einem additiven Effekt zu erwarten, dass die Kurven weitestgehend linear verlaufen. Es ist zu erkennen, dass bei der Kombination einer Strahlendosis von 2 Gy und einer Substanzzugabe von 1 nM Ixabepilon das Zellüberleben bei etwa 30% lag.

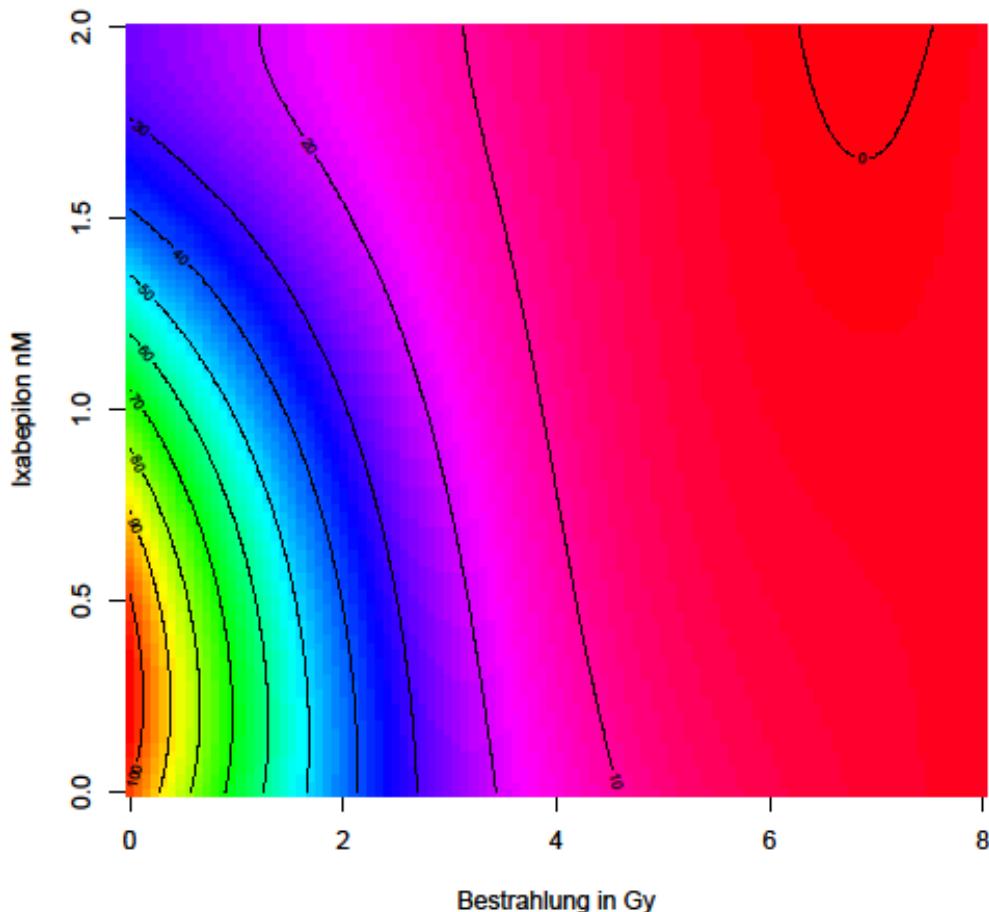


Abbildung 15: Darstellung der Kombinationswirkung von Bestrahlung und Ixabepilon im Contourmodell auf die Zelllinie FaDu

Die in der Abbildung dargestellten Linien entsprechen dem Zellüberleben in %.

3.2.1. Dreidimensionales Modell Ixabepilon und Bestrahlung

Zur weiteren Veranschaulichung des Kombinationseffektes von Bestrahlung und Ixabepilon auf das Zellüberleben wurde ein Regressionsmodell mit diesen beiden Einflussgrößen sowie deren Interaktion und dem Zellüberleben als Zielgröße an die Daten angepasst. Das aus diesem Modell vorhergesagte Zellüberleben ist in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis sowie der Ixabepilonkonzentration dreidimensional dargestellt.

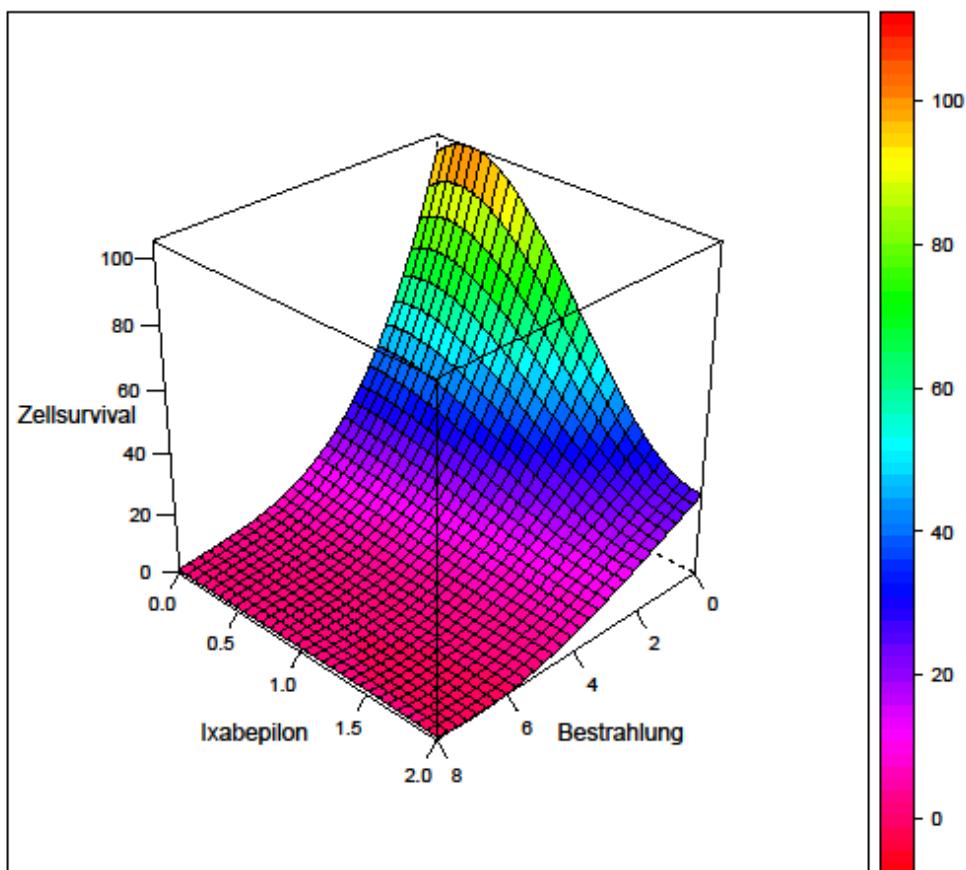


Abbildung 16: Darstellung des Zellüberlebens in Abhängigkeit von Bestrahlung und Ixabepilon-Konzentration im dreidimensionalen Modell

3.3. Einfluss von PXN 727 und Bestrahlung

Bei der p53-mutierten Zelllinie FaDu war im Koloniebildungssassay nahezu kein Effekt des MDM2-Inhibitors PXN 727 erkennbar. Die Überlebensfraktionen lagen zwischen 100% und 92,9% für die unbestrahlten Zellen mit alleiniger Behandlung verschiedener Konzentrationen des MDM2-Inhibitors PXN 727 in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 5 μM . Die Überlebenskurven lagen alle dicht beieinander. Unter Bestrahlungsdosens von 2 und 4 Gy war ein leichter Anstieg der Überlebensfraktion mit steigender Konzentration der Substanz zu verzeichnen. Bei einer Strahlendosis von 2 Gy lag das Zellüberleben bei 58,9% für die Nullkontrolle. In Kombination mit 2,5 μM PXN 727 war ein verbessertes Zellüberleben von 67,0% sowie 63,9% bei einer Konzentration von 5 μM der Substanz zu verzeichnen. Des Weiteren war bei einer Bestrahlung mit 4 Gy ein Anstieg der Zellüberlebensfraktion von 37,2% (Nullkontrolle) auf 44,6% in Kombination mit 5 μM PXN 727 zu beobachten. Die Bestrahlung mit 6 und 8 Gy ließ die Überlebensfraktion auf Werte zwischen 6,3% (6 Gy ohne Substanzzugabe) und 0,4% (8 Gy in Kombination mit 5 μM PNX 727) sinken.

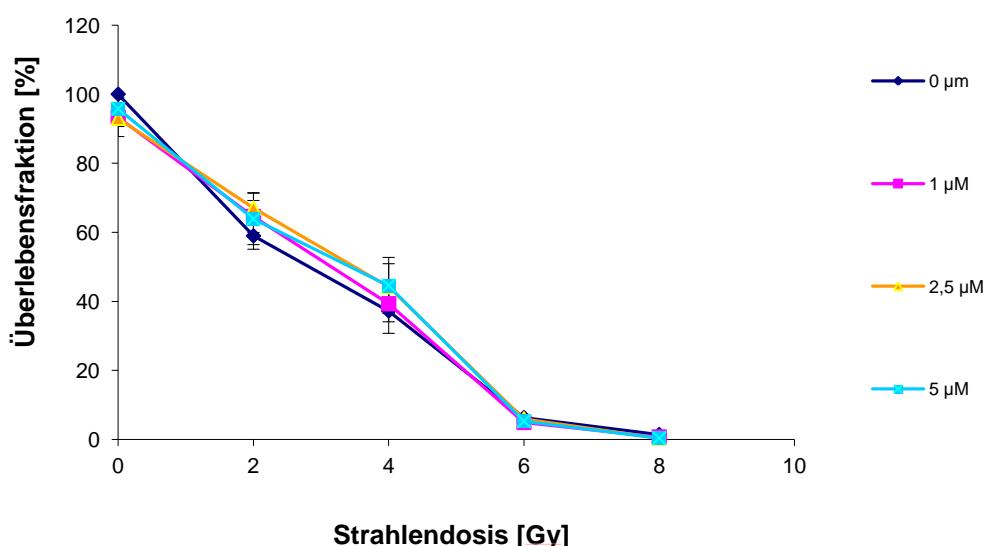


Abbildung 17: Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für den MDM2-Inhibitor PNX 727 in Kombination mit Bestrahlung, lineare Darstellung

Zellüberlebenskurven der Zelllinie FaDu nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von PXN 727 (1 μM bis 5 μM) in Kombination mit aufsteigenden Bestrahlungsdosens (2 bis 8 Gy). Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

In der nachfolgenden Darstellung wurden die Kurven bezogen auf die auf 100% normierte unbestrahlte Kontrolle logarithmisch aufgetragen. Die Kurven lagen ebenfalls dicht beieinander, was darauf hindeutet, dass der MDM2-Inhibitor PNX 727 keinen Einfluss auf die Zelllinie FaDu besitzt.

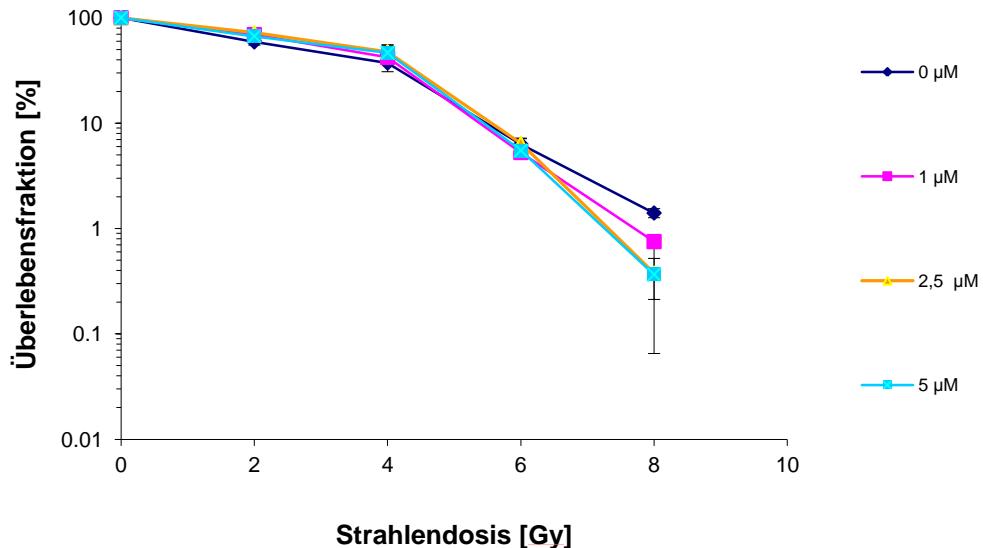


Abbildung 18: Logarithmische Darstellung der Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für PNX 727 in Kombination mit Bestrahlung

Zellüberlebenskurven der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von PNX 727 (1 µM bis 5 µM) in Kombination mit aufsteigenden Bestrahlungsdosen (2 bis 8 Gy). Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Die Überlebensfraktionen (y-Achse) sind logarithmisch dargestellt.

3.3.1. Contourdarstellung PXN 727 und Bestrahlung

Der nahezu senkrechte Verlauf der Höhenlinien im Countourplot zeigt, dass kein Zusammenhang zwischen dem Zellüberleben und der Zugabe der Substanz PXN 727 bestand. Der beobachtete Zelltod kam demnach allein durch die Bestrahlung zustande. Das Wachstum der Zelllinie FaDu blieb durch den MDM2-Inhibitor PXN 727 unbeeinflusst.

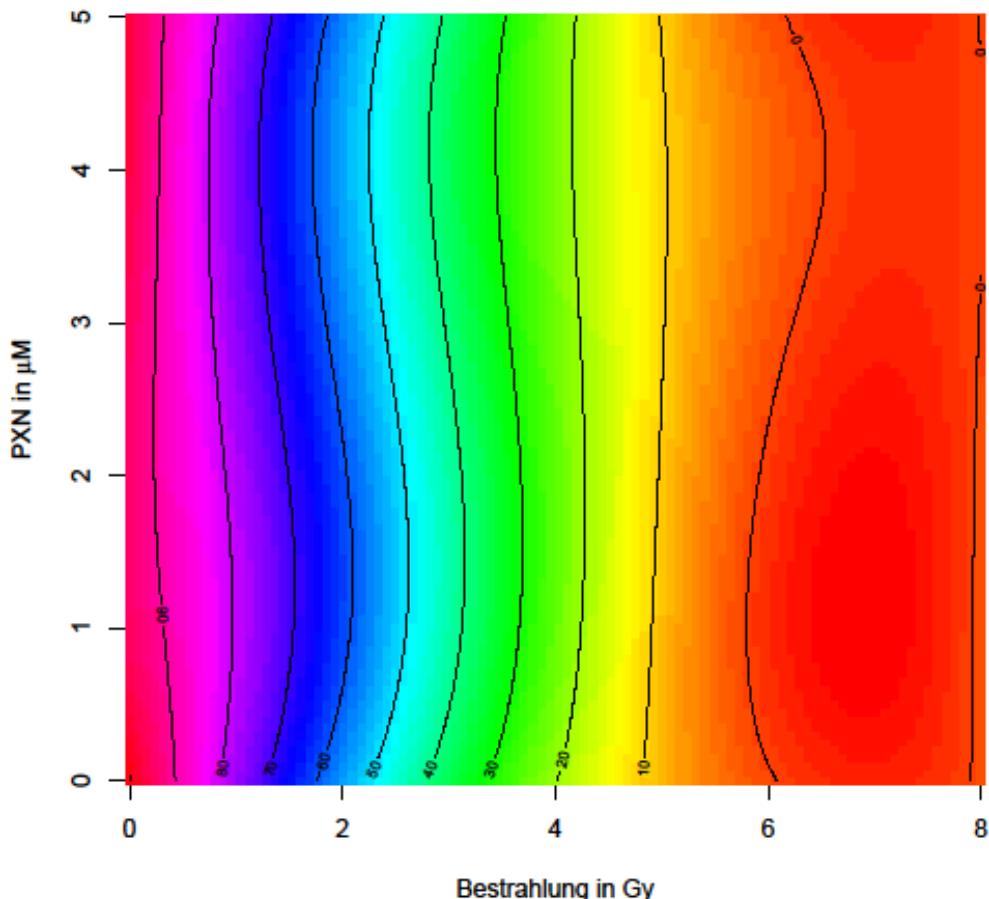


Abbildung 19: Contourplot für die Kombinationswirkung von Bestrahlung und PXN 727 (MDM2-Inhibitor)

Die in der Abbildung dargestellten Linien entsprechen dem Zellüberleben in %.

3.3.2. Dreidimensionales Modell PXN 727 und Bestrahlung

Auch in der dreidimensionalen Darstellung zeigt sich, dass die Zugabe der Substanz PXN 727 keinen Einfluss auf das Zellüberleben ausübt. Der beobachtete Zelltod war lediglich auf die Strahlenbehandlung zurückzuführen.

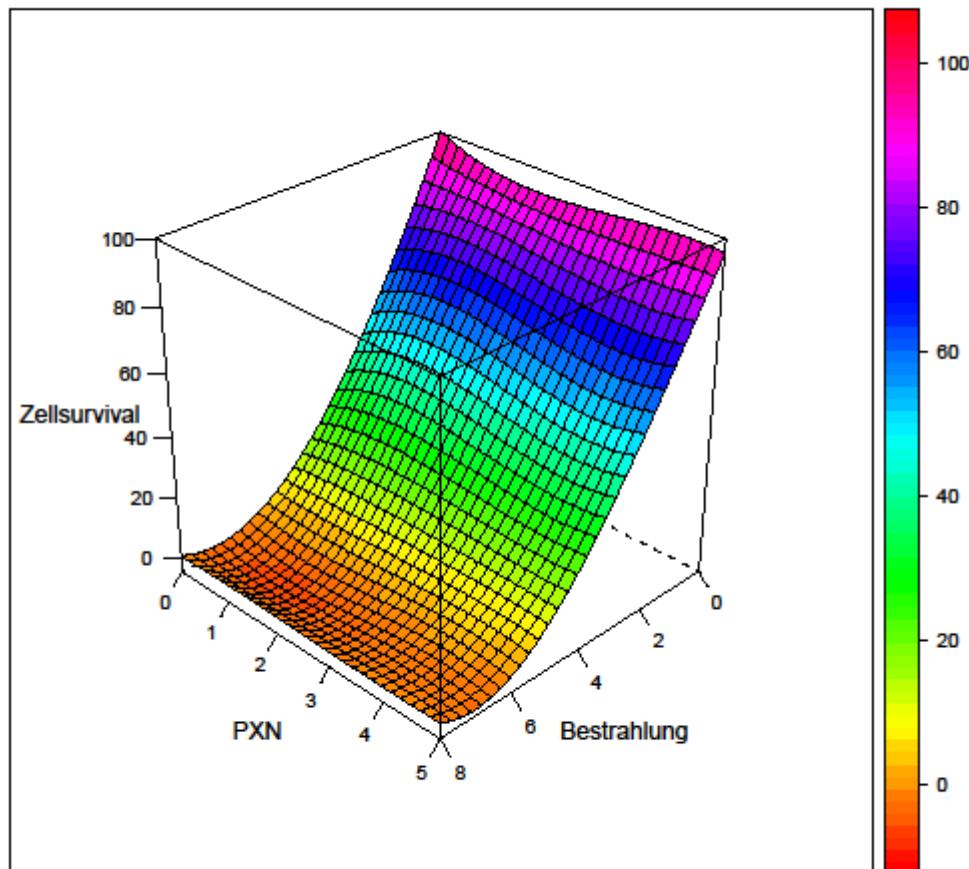


Abbildung 20: Dreidimensionale Darstellung zur Kombinationswirkung von PXN 727 (MDM2-Inhibitor) und Bestrahlung

4. Ergebnisse Apoptose-Messung

4.1. Zeitreihe mit Bestrahlung

Die Zellapoptose wurde mit Hilfe des FITC Caspase-3 Antikörpers jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 5 und 10 Gy bestimmt. Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate wurde sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden beobachtet. 48 Stunden nach Bestrahlung ergab sich eine Steigerung der Apoptoserate von 5,0% (Nullkontrolle) auf 21,9% bei 5 Gy und 45,3% bei 10 Gy ($p = 0,001$). 72 Stunden nach Bestrahlung betrug die Steigerung von 4,9% (Nullkontrolle) auf 25,3% bei 5 Gy und 53,9% bei 10 Gy ($p = 0,0004$). Aufgrund dieser signifikanten Unterschiede wurden die Untersuchungszeitpunkte 48 und 72 Stunden für die Kombinationstherapie gewählt.

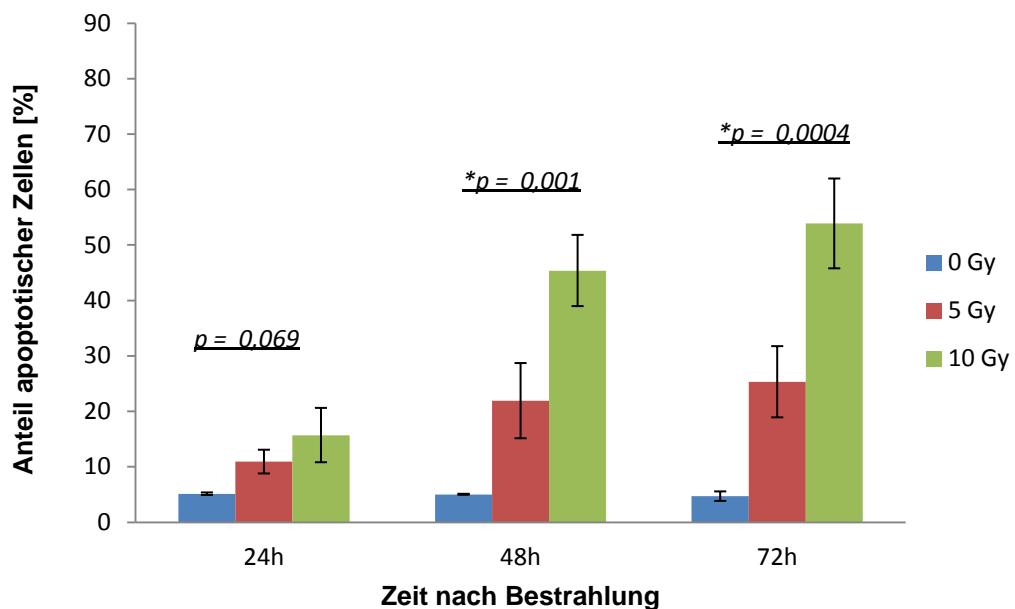


Abbildung 21: Apoptoserate der Zelllinie FaDu nach Bestrahlung

Anteil apoptotischer FaDu-Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 5 und 10 Gray. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung mit Caspase-3 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Mit * markierte Daten zeigen einen signifikanten Unterschied, $p < 0,05$.

4.2. Apoptose-Messung Ixabepilon und Bestrahlung

Die Effekte der Kombination von Bestrahlung und Ixabepilon auf die Apoptose wurden ebenfalls anhand der Caspase-3 positiven Zellen bestimmt. Sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden war ein alleiniger Effekt von Ixabepilon auf die Apoptose erkennbar. 48 Stunden nach Bestrahlung lag die Apoptose-Rate der FaDu-Zellen mit 10,0% deutlich höher ($p = 0,056$) als die der Null-Kontrolle mit 5,1%. Eine signifikante Steigerung ($p = 0,005$) der Apoptose-Rate nach 72 Stunden zeigte sich durch die alleinige Behandlung mit 2 nM Ixabepilon auf 19% gegenüber der Nullkontrolle (3,9%).

In Kombination mit Bestrahlung kam es bei der Zelllinie FaDu bei niedriger Konzentration von 0,2 nM Ixabepilon tendenziell eher zu einer Abnahme der Apoptoserate. Der Anteil apoptotischer Zellen lag hier nach 48 stündiger Inkubationszeit bei 16,0% in Kombination mit 5 Gy im Vergleich zu 18,7% bei alleiniger Bestrahlung mit 5 Gy. In Kombination mit 10 Gy lag die Apoptoserate mit 31,3% unterhalb dem durch alleinige Bestrahlung hervorgerufenen Effekt von 33,1%. Bei der Behandlung mit 2 nM Ixabepilon blieb die Apoptoserate nahezu unverändert.

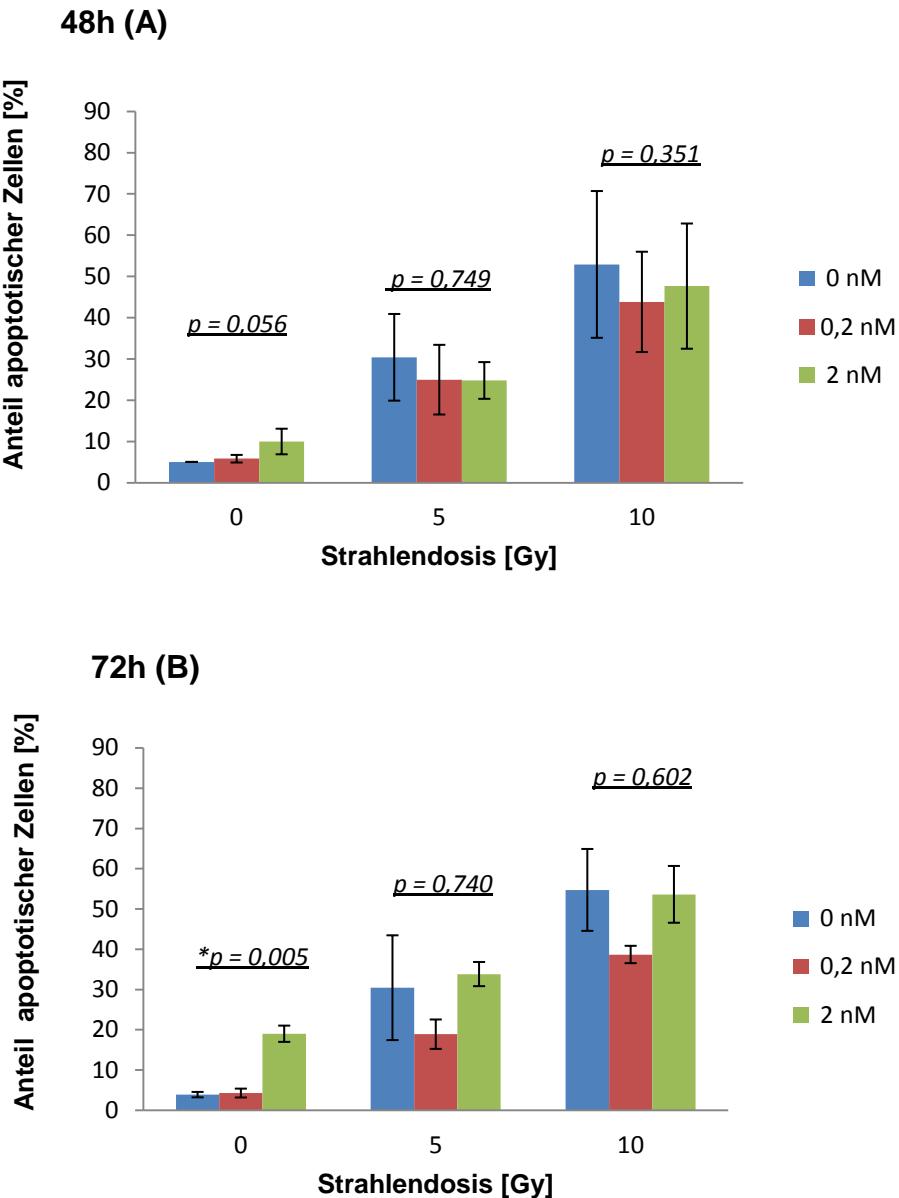


Abbildung 22: Apoptosemessung der Zelllinie FaDu anhand Caspase-3, 48h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung in Kombination mit Ixabepilon

Anteil apoptotischer FaDu-Zellen nach Behandlung mit Ixabepilon (0,2 nM und 2 nM) und anschließender Bestrahlung mit 5 und 10 Gy. Die Zellen wurden jeweils 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung mit Caspase-3 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Mit * markierte Daten zeigen einen signifikanten Unterschied, $p < 0,05$.

4.3. Apoptose-Messung PXN 727 und Bestrahlung

Der MDM2-Inhibitor PXN 727 hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Apoptoserate der p53- mutierten Zelllinie FaDu.

In Kombination mit Bestrahlung war ein Abfall der Apoptoserate zu beobachten, der nach 48 Stunden Inkubationszeit deutlicher ausgeprägt war als nach 72 Stunden. 48 Stunden nach Zugabe von 2,5 µM PXN 727 betrug die Apoptoserate 14% in Kombination mit 5 Gy und 26,8% in Kombination mit 10 Gy im Vergleich zu 19,5% und 37,2% bei alleiniger Bestrahlung. Bei der Zugabe von 5 µM des MDM2-Inhibitors PXN 727 veränderte sich die Apoptoserate kaum gegenüber der Konzentration von 2,5 µM.

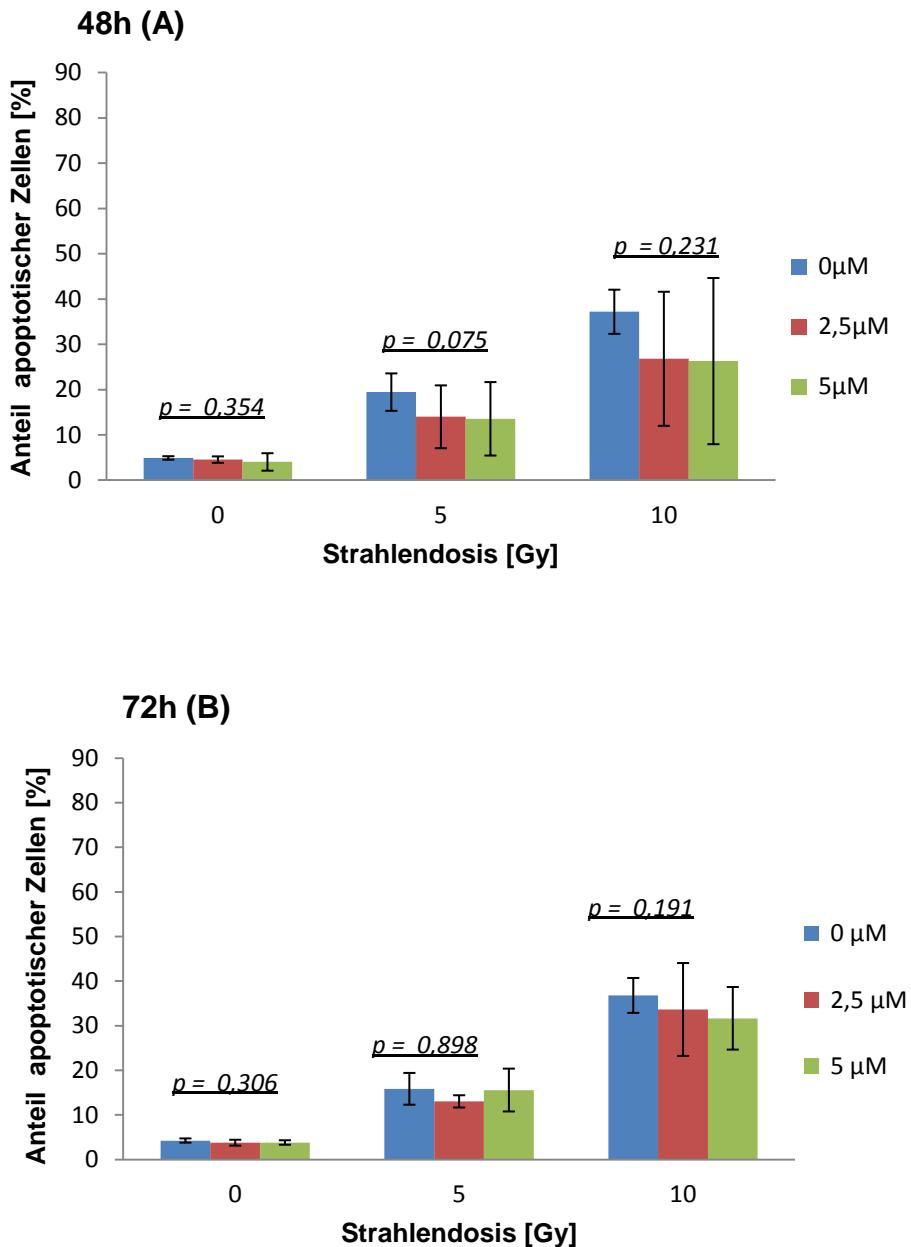


Abbildung 23: Apoptosemessung anhand Caspase-3, 48 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung in Kombination mit PXN 727 (MDM2-Inhibitor)

Anteil apoptotischer FaDu-Zellen nach Behandlung mit PXN 727 (2,5 μM und 5 μM) und anschließender Bestrahlung mit 5 und 10 Gy. Die Zellen wurden jeweils 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung mit Caspase-3 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Aus jeweils 3 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

V. DISKUSSION

1. Diskussion der angewandten Methoden

Trotz der mittlerweile vielfältigen Behandlungs- und Diagnosemöglichkeiten für Kopf-Hals-Tumoren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Hypopharynxkarzinomen in fortgeschrittenen Stadien bei weniger als 30% (Röper et al., 2009). Meist wird die Diagnose aufgrund der relativ unspezifischen Symptome erst in späteren Erkrankungsstadien gestellt. Aus diesem Grund ergibt sich die Notwendigkeit, potentiell wirksame Substanzen zu untersuchen, die in Kombination mit Bestrahlung eine Verbesserung der Tumorkontrolle und somit des Überlebens der Patienten ermöglichen. Die Verwendung von Zellkulturen für *in-vitro* Experimente dient hierbei nach wie vor als wichtiges Modell in der präklinischen Forschung, um Informationen für anschließende *in-vivo* Untersuchungen zu erlangen und richtungsweisende Erkenntnisse zu erhalten. Bei der verwendeten Zelllinie FaDu handelt es sich um eine seit 1979 etablierte Kopf-Hals-Tumor Zelllinie (Ragnan, 1972), die in zahlreichen Laboren weltweit Verwendung findet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Methoden sind standardisiert. Die Dosierungen der Substanzen Ixabepilon (Kim et al., 2003; Lee und Swain, 2008; Hunt, 2009) und PNX 727 (Vassilev, 2007; Rothweiler et al., 2008; Supiot et al., 2008) wurden, wie in der aktuellen Literatur beschrieben, gewählt und durch eigene Vorversuche verifiziert. Die Substanzen wurden jeweils eine Stunde vor Bestrahlung zugegeben, dieses Verfahren orientierte sich an der Vorgehensweise der simultanen Radiochemotherapie. Die Bestrahlungsdosen von 0, 2, 4, 6, und 8 Gy für die Koloniebildungssassays, sowie 0, 5 und 10 Gy für die Apoptose-Messung wurden ebenfalls in Anlehnung an die Literatur gewählt (Kim et al., 2003; Supiot et al., 2008). Die Verwendung der hohen Strahlendosen von 8 Gy im Koloniebildungstest und 10 Gy in der Apoptosemessung wurde gewählt, um deutliche Effekte und eine Unterscheidbarkeit der verschiedenen Untersuchungspunkte darzustellen. Der vorgenommene Mediumwechsel nach 24 Stunden im Koloniebildungstest diente dazu, die Wirkung der Substanz an einem definierten Zeitpunkt abzustoppen.

Während der gesamten Versuchsdurchführung wurde auf einen stets gleichbleibenden Ablauf aller Versuchsschritte geachtet, um eine größtmögliche Reproduzierbarkeit zu erreichen. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Der „Colony forming assay“ gilt seit langem als zuverlässige und aussagekräftige Methode, um die Fähigkeiten von Zellkulturen zur Koloniebildung zu untersuchen (Puck und Marcus, 1956). Beim klassischen Koloniebildungstest werden dazu die bereits bestrahlten Zellkulturen ausplattiert (delayed plating), was einen erhöhten Material- und Zeitaufwand mit sich bringt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variation der Methode mit der direkten Bestrahlung der ausgesäten Zellkulturen angewandt (pre-plating). Die Zellzahl der ausgesäten Zellen wurde in Vorversuchen ausführlich getestet, um eine optimale Anzahl an ausplattierten Zellen für die jeweilige Strahlendosis zu erhalten. Es wurde im Vorfeld versucht, mit einer gleichbleibenden Zellzahl für alle Bestrahlungsdosen von 0 bis 8 Gy zu arbeiten. Dieses Verfahren hat sich jedoch weder als durchführbar noch als sinnvoll erwiesen, da bei höheren Bestrahlungsdosen ab 4 Gy keine Kolonien mehr vorhanden waren. Die Auswertung der Ergebnisse mit dem Gerät Bioreader hat Vorteile gegenüber der manuellen Auswertung unter dem Mikroskop, da bei der automatisierten Auswertung ein standardisiertes, bei jeder Messung erneut durch Eichplatten genormtes Vorgehen gewährleistet ist.

2. Diskussion der Ergebnisse

Die Plattierungseffizienz für die Zelllinie FaDu lag in den eigenen Untersuchungen bei 8,3% bis 9,9% für die unbehandelten Kontrollen. Diese vergleichsweise niedrig erscheinende „Plating Efficiency“ könnte durch die Tatsache zustande gekommen sein, dass die Zelllinie FaDu sehr gründlich resuspensiert werden musste, um eine größtmögliche Vereinzelung der Zellen zu erzielen und somit einer Verklumpung der Zellen im Koloniebildungstest vorzubeugen. Bei dieser Vorgehensweise ist vermutlich ein Teil der Zellen geschädigt worden.

Ixabepilon erzeugt in der Zelllinie FaDu eine Zunahme der Apoptose. Dieser Effekt ist nach 72 Stunden deutlicher ausgeprägt als nach 48 Stunden. In Kombination mit Bestrahlung ist bei Verwendung niedriger Ixabepilon-Konzentrationen dagegen tendenziell eher eine Abnahme der Apoptoserate zu

beobachten. Noch deutlicher scheint dieser Effekt bei der Verwendung des MDM2-Inhibitors PNX 727 in Kombination mit Bestrahlung, wobei hier erkennbar ist, dass die Substanz allein keine Wirkung auf die Zelllinie FaDu ausübt. Entgegen Beschreibungen in der Literatur, wo auch p53-mutierte Zelllinien auf eine Behandlung mit MDM2-Inhibitoren angesprochen haben (Zhang et al., 2004; Vassilev, 2007; Supiot et al., 2008), konnten wir diese Beobachtung experimentell nicht bestätigen. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen sind hier übereinstimmend in beiden verwendeten Methoden. Sowohl beim Koloniebildungstest als auch in der Apoptose-Messung ist keine Wirkung des MDM2-Inhibitors PNX 727 alleine erkennbar. Ebenfalls keinen Effekt eines MDM2-Inhibitors auf p53-mutierte Zellen konnten Cao und Mitarbeiter nachweisen (Cao et al., 2006). Eine MDM2-Überexpression mit einer Störung des p53-MDM2-Verhältnisses konnte in bis zu 80% aller Tumoren nachgewiesen werden und kommt auch in Kopf-Hals-Tumorzellen vor (Schoelch et al., 1999; Valentin-Vega et al., 2007). Über eine Beziehung zwischen mutiertem p53-Status von Tumorzellen und einer MDM2-Überexpression existieren dagegen bisher keine eindeutigen Erkenntnisse (Onel und Cordon-Cardo, 2004; Valentin-Vega et al., 2007; Lu und El-Deiry, 2009). Es ist jedoch zu vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen MDM2-Überexpression und maligner Tumorentstehung besteht.

In der Literatur wird das Auftreten verschiedener Zelltodmechanismen diskutiert (Abend, 2003; Okada und Mak, 2004; Eriksson und Stigbrand, 2010). Die von uns beobachtete teilweise Abnahme der Apoptoserate könnte auf eine Interaktion unterschiedlicher Zelltodformen miteinander zurückzuführen sein. Ähnliche Beobachtungen machten Kasten-Pisula und Mitarbeiter, die ebenfalls eine Abnahme der Apoptoserate nach Zugabe einer antiproliferativ wirksamen Substanz in Kombination mit Bestrahlung (Kasten-Pisula et al., 2007) festgestellt haben.

Bestrahlung oder eine Behandlung mit Chemotherapeutika kann neben der Apoptose zur Seneszenz von Zellen, zur mitotischen Katastrophe und zur Ausbildung sogenannter Mikronuklei führen (Roninson et al., 2001; Belka et al., 2003; Okada und Mak, 2004). Möglicherweise hat ein „Shift im Zelltodmechanismus“ (Abend, 2003) stattgefunden, so dass die auf andere Weise ums Leben gekommenen Zellen in der Apoptosemessung anhand Caspase 3 nicht

erfasst werden konnten. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass der Abfall der Apoptoserate durch Zellen kompensiert wurde, die durch Seneszenz im Zellzyklus arretiert oder durch mitotische Katastrophe abgetötet wurden (Roninson et al., 2001). Gemäß dieser Theorie liegt die Vermutung nahe, dass jene Zellen, die durch alleinige Bestrahlung oder Substanzzugabe jeweils deutliche Apoptoseraten aufweisen, auch durch den Zelltodmechanismus der Apoptose zu Grunde gegangen sind. Erst in Kombination von Substanz und Bestrahlung ist dann ein Abfall der Apoptoserate erkennbar, was vermuten lässt, dass hier möglicherweise andere Zelltodmechanismen greifen. Folglich könnte beispielsweise ein Teil der Zellen nach Bestrahlung durch Apoptose abgetötet worden sein und ein anderer Teil nach Zugabe der jeweiligen Substanz durch Seneszenz in einen verlängerten Zellzyklus-Arrest getreten sein. Denkbar wäre auch, dass ein Teil der Zellen der mitotischen Katastrophe unterlaufen sind. Zeitlich gesehen ist die mitotische Katastrophe ein verzögerter Zelltodmechanismus, der zwei bis sechs Tage nach Bestrahlung auftreten kann (Roninson et al., 2001; Eriksson und Stigbrand, 2010). Die mitotische Katastrophe kann p53-unabhängig stattfinden, und laut Ianzini und Mitarbeitern kann eine p53-Inaktivierung sogar eine Förderung der mitotischen Katastrophe bewirken (Ianzini et al., 2009). Zudem scheint nach neueren Erkenntnissen die mitotische Katastrophe möglicherweise einen der Hauptzelltodmechanismen solider Tumoren unter Strahlentherapie darzustellen (Eriksson und Stigbrand, 2010). Im Verlauf der mitotischen Katastrophe treten die Tumorzellen zunächst in einen G2-Arrest. Während dieses Arrestes sind in manchen Zellen wiederum verzögerte apoptotische Wege mit einer Caspase-Aktivierung möglich (Belka et al., 2003). Aus diesen Überlegungen heraus ist ersichtlich, dass Übergangsformen der unterschiedlichen Zelltodmechanismen, wie mitotische Katastrophe, Seneszenz und Apoptose möglich sind und komplexe Zusammenhänge der unterschiedlichen Zelltodmechanismen vermuten lassen, zu deren Klärung es weiterführender Untersuchungen bedarf. Die Seneszenz stellt eine Form des verzögerten Zelltodes dar. Die Zellen treten hierbei in einen permanenten Zellzyklus-Arrest, ein Zustand, der häufig strahlungsinduziert auftritt (Belka et al., 2003; Eriksson und Stigbrand, 2010). Um vorliegende seneszente Zellen zu erfassen, könnte in einer möglichen Fortführung der vorliegenden Arbeit die Messung anhand eines β -Galaktosidase Markers (Eriksson und Stigbrand, 2010) dienen. Zu den Merkmalen der mitotischen Katastrophe zählen Veränderungen in der Anzahl der

vorhandenen Chromosomensätze (Aneuploidie, Polyploidie), welche durch wiederholt abortive Zellteilungen zustande kommen können. Morphologisch sind die betroffenen Zellen vergrößert und weisen einen vergrößerten Zellkern, ähnlich der Nekrose, auf. Zur Untersuchung der mitotischen Katastrophe können elektronenmikroskopische sowie durchflusszytometrische Methoden angewendet werden (Chen und Horwitz, 2002; Okada und Mak, 2004; Ianzini et al., 2009).

In den Untersuchungen des Koloniebildungstests ließ sich in Kombination mit Bestrahlung, je nach Konzentration der verwendeten Substanz, ein teilweise verbessertes Zellüberleben sowohl bei Verwendung des MDM2-Inhibitors als auch von Ixabepilon beobachten. Möglicherweise liegt hier ein scheinbar protektiver Effekt vor, welcher nach Behandlung mit niedrigen Chemotherapeutika-Konzentrationen in Kombination mit Bestrahlung auftreten könnte. Für dieses Phänomen der subadditiven Wirkung von Substanz und Bestrahlung wäre auch eine mögliche Wachstumsstimulation bestimmter Tumorzellen durch die Zugabe von Substanzen in niedrigen nanomolaren Dosen denkbar.

Des Weiteren ist eine zeitabhängige Komponente zu bedenken. Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt die Substanz zugegeben wird, befinden sich die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Epothilone bewirken einen G2/M Arrest (Bollag et al., 1995; Kim et al., 2003; Reichenbach und Höfle, 2008; Lee und Swain, 2008). Diese Tatsache kann positive Auswirkungen auf eine kombinierte Strahlentherapie haben, da die G2/M-Phase die strahlensensibelste Zellzyklusphase darstellt. In Bezug auf die klinische Relevanz dieser Überlegungen ist jedoch zu beachten, dass Tumorzellen sich *in-vivo* oftmals in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befinden, oder es während einer Behandlung zur Umverteilung kommen kann. Aus diesem Grund ist diesbezüglich die Übertragung von *in-vitro* auf *in-vivo* Experimente oder auf die klinische Anwendung unter Vorbehalt zu betrachten.

Bei der Verwendung niedriger Konzentrationen von Epothilonen konnte in einer Studie an einer Lungenkarzinom-Zellenlinie kein Zellzyklus-Arrest beobachtet werden (Chen und Horwitz, 2002). Stattdessen war in diesem Fall ein Auftreten anormaler Mitosevorgänge zu verzeichnen, und die Zellen traten im G1-Stadium in die Apoptose ein. Hieraus lässt sich ein konzentrationsabhängiger Bezug der verschiedenen Zelltodmechanismen durch mikrotubuli-stabilisierende

Substanzen vermuten. Andere Autoren stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls konzentrations- und zeitabhängige Einflüsse fest (Kim et al., 2003; Lee und Swain, 2008; Lee et al., 2009).

Unterschiedliche Kulturbedingungen und Einflüsse des Mikromilieus stellen generell einen wichtigen Aspekt der Strahlenwirkung auf Tumorzellen dar und spielen eine wesentliche Rolle bei *in-vitro* Untersuchungen. So kann unter anderem der Oxygenierungsstatus das Ansprechen von Tumorzellen auf Bestrahlung maßgeblich beeinflussen. Untersuchungen zu Taxanen, die in gleicher Weise wie Epothilone Mikrotubuli stabilisieren, legten eine Reoxygenierung von Tumorzellen als möglichen Mechanismus zur Verstärkung von Bestrahlung dar (Milas et al., 1995). Rohrer Bley und Mitarbeiter führten ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen eine Untersuchung an Lungenkarzinom-Zelllinien unter Bestrahlung in Kombination mit einem Epothilon B (Patupilon) durch (Rohrer Bley et al., 2009). In ihren Untersuchungen stellten sie fest, dass der zytotoxische Effekt des Epothilons sich hauptsächlich direkt auf das Zytoskelett der Tumorzellen auswirkt, und der antiangiogene Effekt durch die Hypoxie eher indirekt zustande kommt. Untersuchungen an hypoxischen Prostatakarzinomzelllinien (Supiot et al., 2008) haben gezeigt, dass kleinmolekulare MDM2-Inhibitoren (Nutlins) Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen, unabhängig vom p53-Status, radiosensitivieren können. Da es sich bei Kopf-Hals-Tumorzellen häufig um hypoxische Zellen handelt, wären weiterführende Untersuchungen unter Hypoxie mit beiden verwendeten Substanzen aufschlussreich, um einen Vergleich zwischen hypoxischen und normoxischen Zellkulturbedingungen zu erlangen.

Eine Wechselwirkung zwischen MDM2-Inhibition und Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. MDM2-Inhibitoren können demnach auf p53-Wildtyp Tumorzellen einen protektiven Effekt gegenüber Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen wie Taxanen und Epothilonen ausüben. Zellen mit p53-Wildtyp Status können somit durch MDM2-Inhibitoren vor mitotischen Spindelgiften geschützt werden. Tumorzellen mit p53-Mutation reagierten dagegen mit massiver Apoptose auf die kombinierte Behandlung (Carvajal et al., 2005; Tokalov und Abolmaali, 2010). Bemerkenswerterweise sind MDM2-Inhibitoren auch in der Lage, gesundes Gewebe vor Nebenwirkungen durch andere Chemotherapeutika wie Cisplatin und

Gemcitabin zu schützen (Lu und El-Deiry, 2009). Diese Befunde stellen ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet für MDM2-Inhibitoren dar.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit kein Effekt des MDM2-Inhibitors PXN 727 auf die Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu festgestellt werden, worauf sowohl die Ergebnisse des Koloniebildungstests als auch die der Apoptosemessung hinweisen.

Ixabepilon, als ein Vertreter der Gruppe der Epothilone, scheint in der Zelllinie FaDu in Konzentrationen von 1 und 2 nM eine antiproliferative Wirkung zu besitzen. Subnanomolare Konzentrationen von Ixabepilon lassen keinen Effekt erkennen. In Kombination mit Bestrahlung konnte eine weitere Abnahme des Zellüberlebens beobachtet werden, ein Umstand, welcher Hinweise auf eine mögliche additive Wirkung liefert.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Kopf-Hals-Tumor-Patienten liegt bei durchschnittlich 60%. Beim Auftreten von Hypopharynxkarzinomen reduziert sich dieser Wert auf unter 30%. Trotz der mittlerweile vielfältigen innovativen Therapie- und Diagnosemöglichkeiten stellt die individualisierte Behandlung dieser Tumoren eine große klinische Herausforderung dar.

Der Tumorsuppressor p53 ist seit 1973 im Fokus der Tumorforschung. Die Wiederherstellung der p53-Funktion in Tumorzellen durch eine Blockierung der Interaktion von MDM2 und p53 gilt als ein erfolgversprechender Therapieansatz. In der vorliegenden Arbeit wurde die p53-mutierte Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu mit dem MDM2-Inhibitor PXN 727 behandelt und dessen Wirkung anhand von Koloniebildungstests sowie Apoptosemessung untersucht. Ein Einfluss des MDM2-Inhibitors PXN 727 auf die Zelllinie FaDu ließ sich dabei weder im Koloniebildungstest noch in der Apoptosemessung erkennen. Auch in Kombination mit Bestrahlung zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Zellproliferation.

Epothilone, eine Stoffgruppe, die durch Stabilisierung von Mikrotubuli sehr ähnliche antineoplastische Eigenschaften wie Taxane besitzen, gelten ebenfalls als innovative Substanzen in der Tumortherapie. Ixabepilon, ein Vertreter der Epothilone, zeigte eine antiproliferative Wirkung auf die Zelllinie FaDu in Konzentrationen von 1 und 2 nM, wohingegen die Zelllinie bei niedrigeren Konzentrationen von 0,2 nM respektive 0,5 nM weitgehend unbeeinflusst blieb. In Kombination mit Bestrahlung ließ sich bei den niedrigen subnanomolaren Konzentrationen ein teilweise verbessertes Zellüberleben nachweisen, bei Konzentrationen von 1 und 2 nM Ixabepilon zeigte sich jedoch ein reduziertes Zellüberleben in Kombination mit Bestrahlung, was ein Anzeichen für einen additiven Effekt darstellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wären weitere Untersuchungen zur Klärung der beteiligten Zelltodmechanismen von Interesse, um das Verständnis für die Mechanismen kombinierter Radiochemotherapie sowohl mit Epothilonen als auch mit MDM2-Inhibitoren weiter zu entwickeln.

VII. SUMMARY

The five-year survival rate of head and neck cancer patients is on average 60%, in occurrence of a hypopharyngeal carcinoma even 30% or less. Despite recent innovative therapy and diagnostic options, there is a high medical need to improve therapeutic outcome and the question of effective and individualized treatment options remains.

The tumor suppressor p53 is in focus of research since 1973. The restoration of p53 function in tumor cells through blocking of interaction between MDM2 and p53 is considered to be a promising therapeutic approach. In the present thesis, the p53-mutated hypopharyngeal carcinoma cell line FaDu was treated with the MDM2 inhibitor PXN 727. An influence of the MDM2 inhibitor PXN 727 on the cell line FaDu was neither seen in the colony forming assay, nor in apoptosis measurement. Also in combination with radiation there was no significant influence on cell proliferation.

Epothilones, which exhibit very similar anti-neoplastic properties to taxanes, due to their stabilization of microtubules, are also considered to be innovative compounds in cancer therapy. In this work, Ixabepilone, a representative of the substance-group epothilones, showed antiproliferative effects in the FaDu cell line at concentrations of 1 and 2 nM, whereas at lower concentrations of 0.2 nM respectively 0.5 nM the cell viability remained unaffected. In combination with radiation, a partially enhanced cell survival could be observed at low dose concentrations of 0.5 nM Ixabepilone. At concentrations of 1 and 2 nM however, a reduced cell survival was observed in combination with radiation, which suggests an additive effect.

Based on these results, further investigations would be conceivable to clarify the different involved cell death mechanisms more detailed. It is necessary to improve the understanding of combined radiochemotherapy regimens in both epothilones and MDM2 inhibitors.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abend M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol*, 2003, 12: 927–941.

Barbieri E, Metha P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S, Shohet JM. MDM2 Inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 2358-2365.

Baumann M, Molls M, Zips D. Die "4 Rs" der Strahlentherapie und Prädiktion der Strahlenreaktion von Tumoren. In *Radioonkologie*, von Bamberg M, Molls M und Sack H, 268-275. München: Zuckschwerdt, 2003.

Baumann M, Krause M. Linear-quadratisches Modell und Fraktionierung. In *Radioonkologie*, von Bamberg M, Molls M und Sack H, 251-264. München: Zuckschwerdt, 2003.

Belka C, Abend M, Budach W. Mechanismen und Formen des Zelltods. In *Radioonkologie*, von Bamberg M, Molls M und Sack H, 237-249. München: Zuckschwerdt, 2003.

Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, Hensens O, Koupal L, Liesch J, Goetz M. Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action. *Cancer*, 1995, 55: 2325-2333.

Burtness BA, Manola J, Axelrod R, Argiris A, Forastiere AA. A randomized phase II study of ixabepilone (BMS-247550) given daily x 5 days every 3 week or weekly in patients with metastatic or recurrent squamous cell cancer of the head and neck. *Ann Oncol*, 2008, 19: 977-983.

Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. Molecular Analysis and Chromosomal Mapping of Amplified Genes isolated from a Transformed Mouse 3T3 Cell Line. *Somat Cell Mol Genet*, 1987, 13: 235-244.

Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, Kim L, Albert WK, Geng JM, Hallahan DE, Lu B. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 411-418.

- Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu BT, Heimbrook DC, Vassilev LT. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res*, 2005, 65: 1918-1924.
- Chen J, Horwitz S. Differential Mitotic Response to Microtubule-stabilizing and -destabilizing Drugs. *Cancer Res*, 2002, 62: 1935–1938.
- Chène P. Inhibition of the p53-MDM2 interaction: Targeting a Protein-Protein interface. *Mol Can Res*, 2004, 2: 20-28.
- Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8: 25–37.
- Dahm-Daphi J. p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlenther Onkol*, 2000, 176: 278-285.
- Dietl B, Marienhagen J, Schaefer C, Pohl F, Kölbl O. Häufigkeit und Topographie von Fernmetastasen bei Patienten mit HNO-Tumoren und ihre Konsequenzen für das prätherapeutische Staging. *Strahlenther Onkol*, 2007, 183: 138-143.
- Dreicer R, Li S, Manola J, Haas BN, Roth BC, Wilding G. Phase 2 Trial of Epothilone B Analog BMS-247550 (Ixabepilone) in Advanced Carcinoma of the Urothelium (E3800). *Cancer*, 2007, 4: 759-763.
- Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol*, 2010, 31: 363–372.
- Fu K. Biological Basis for the Interaction of Chemotherapeutic Agents and Radiation Therapy. *Cancer*, 1985, 55: 2123-2130.
- Gil Z, Fliss DM. Contemporary Management of Head and Neck Cancers. *Isr Med Assoc J*, 2009, 11: 296-300.
- Goel S, Cömezoglu SN, Perrin L, André F, Cohen M, Jayabalan D, Comprelli A, Ly VT, Iacono L, Xu C, Humphreys WG, Zhang D, Goldberg G, Horwitz SB, Mani S, McDaid H. The Effect of Ketoconazole on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ixabepilone: A First in Class Epothilone B Analogue in late-phase clinical development. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2701-2709.
- Hardcastle R. Inhibitors of the MDM2-p53 interaction as anticancer drugs. *Drugs Fut*, 2007, 32: 883-896.

Hoffmann M. Human papillomavirus and p53 polymorphism in codon 72 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol rep*, 2009, 21: 809-814.

Höfle G. Epothilon A und B - neuartige, 16-gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung. *Angewandte Chemie*, 1996, 108: 1671 - 1673.

Hofstetter B, Vuong V, Broggini-Tenzer A, Bodis S, Ciernik IF, Wartmann M, Folkers G, Pruschy M, Fabbro D. Patupilone acts as radiosensitizing agent in Multidrug-Resistant cancer cells in vitro an in vivo. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1588-1596.

Howard A, Pelc SR. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 1953, 6: 261-273.

Hsiao JR, Leu SF, Huang BM. Apoptotic mechanism of paclitaxel-induced cell death in human head and neck tumor cell lines. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38: 188-197.

Huang SF, Chen I, Liao CT, Wang HM, Liou SH, Hsieh LL. Combined effects of MDM2, SNP 309 and p53 mutation on oral squamous cell carcinomas associated with areca quid chewing. *Oral Oncol*, 2009, 45: 16-22.

Hunt JT. Discovery of Ixabepilone. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8: 275-281.

Ianzini F, Kosmacek EA, Nelson ES, Napoli E, Mackey M. Activation of Meiosis-Specific Genes is associated with Depolyplloidization of Human Tumor Cells following Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. *Cancer Res*, 2009, 69: 2296-2304.

Iliakis G, Daphi-Dahm J, Tamulevicius P. DNA-Reparatur, Zellzyklus und Checkpoint-Aktivierung. In *Radioonkologie*, von Bamberg M, Molls M und Sack H, 207-222. München: Zuckschwerdt, 2003.

Impicciatore G, Sancilio S, Miscia S, Di Pietro R. Nutlins and Ionizing Radiation in Cancer Therapy. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 1427-1442.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Bertz J, Hentschel S. Krebs in Deutschland, 8. Aufl., Herausgeber: Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, 2012.

- Kasten-Pisula U, Windhorst S, Dahm-Daphi J, Mayr G, Dikomey E. Radiosensitization of tumour cell lines by the polyphenol Gossypol results from depressed double-strand break repair and not from enhanced apoptosis. *Radiother Oncol*, 2007, 83: 296–303.
- Kellerer AM, Rossi HH. The theory of dual radiation action. *Current topics in radiation research*, 1974, 8: 85-158.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239-257.
- Kim JC, Kim JS, Saha D, Cao Q, Shyr Y, Choy H. Potential radiation-sensitizing effect of semisynthetic epothilone B in human lung cancer cells. *Radiother Oncol*, 2003, 68: 305–313.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Diff*, 2007, 14: 32–43.
- Lane DP, Cheok CF, Lain S. p53-based Cancer Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a001222.
- Larkin JM, Kaye SB. Potential clinical applications of epothilones: a review of phase 2 studies. *Ann Oncol*, 2007, 18: 28-34.
- Lee FY, Borzilleri R, Fairchild CR, Kamath A, Smykla R, Kramer R, Vite G. Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 63: 157-166.
- Lee FY, Smykla R, Johnston K, Menard K, McGlinchey K, Peterson RW, Wiebesiek A, Vite G, Fairchild CR, Kramer R. Preclinical efficacy spectrum and pharmacokinetics of ixabepilone. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63: 201-212.
- Lee JJ, Swain SM. The Epothilones: Translating from the Labatory to the Clinic. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1618-1624.
- Leonard CF, Chan DC, Chou TC, Kumar R, Bunn PA. Paclitaxel enhances in vivo Radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the Head and Neck. *Cancer Res*, 1996, 56: 5198-5204.

- Liu W, He L, Ramirez J, Ratain MJ. Interactions between MDM2 and TP53 genetic alterations, and their impact on response to MDM2 Inhibitors and other chemotherapeutic drugs in cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 7602-7607.
- Loewe S. Die quantitativen Probleme der Pharmakologie. *Ergebn Physiol*, 1928, 27: 47–187.
- Lu C, El-Deiry WS. Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity. *Apoptosis*, 2009, 14: 597-606.
- Marur S, Forastiere A. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83: 489-501.
- McMahon S, Chen YA. Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22: 21-24.
- Milas L, Hunter N, Mason KA, Millross C, Peters LJ. Tumor Reoxygenation as a mechanism of Taxol-induced enhancement of radioresponse. *Acta Oncol*, 1995, 34: 409-412.
- Molls M, Andratschke N. Verstärkung der Strahlenwirkung: Zytostatika, Sensitizer und biologisch zielgerichtete Therapeutika. In *Radioonkologie*, von Bamberg M, Molls M und Sack H, 280-298. München: Zuckschwerdt, 2003.
- Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2- master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, 2000, 242: 15-29.
- Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, 2000, 29: 413-425.
- Okada H, Mak WT. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature*, 2004, 4: 592-603.
- Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and Prognosis. *Mol Cancer Res*, 2004, 2: 1-8.
- Petersen C, Baumann M. Linear-Quadratic Analysis of Tumor Response to Fractionated Radiotherapy:a Study on Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Strahlenther Onkol*, 1998, 73: 197-205.
- Puck T, Marcus P. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.*, 1956, 103: 485–500.

Purdue MP. Type of Alcoholic Beverage and Risk of Head and Neck Cancer. *Am J Epidemiol*, 2009, 169: 132-142.

Ragnan SR. A new human cancer cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 1972, 29: 117-121.

Reichenbach H, Höfle G. Discovery and development of the epothilones : a novel class of antineoplastic drugs. *Drugs R D*, 2008, 1: 1-10.

Reiss M, Brash DE, Munoz-Antonia T, Simon JA, Ziegler A, Vellucci VF, Zhou ZL. Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncol Res*, 1992, 4: 349-357.

Reiter M, Harreus U, Matthias C, Hözel D. Epidemiologie. In *Manual Kopf-Hals-Malignome*, von Mast G, Zimmermann F, Ihrler S, Matthias C und Kolk A. München: Zuckschwerdt Verlag, 2009.

Roh JL, Kang SK, Minn I, Califano JA, Sidransky D, Koch WM. p53-reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2011, 47: 8-15.

Rohrer Bley C, Jochum W, Furmanova K, Vuong P, McSheehy V, Orlowski PMJ, Pruschy M. Role of the Microenvironment for Radiosensitization by Patupilone. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 1335-1342.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 2001, 4: 303-313.

Röper B, Matthias C, Panzer M, Zimmermann F. Malignome des Hypopharynx und oberen Ösophagus. In *Manual Kopf-Hals-Malignome*, von Mast G, Zimmermann F, Ihrler S, Matthias C und Kolk A. München: Zuckschwerdt Verlag, 2009.

Ross G, Kalinski C, Janczyk V, Skobeleva T, Holak N, Khazak V, Weber L. New Technologies for New Drugs: Design and Synthesis of Novel Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction. Priaxon, 2009.

Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, von Sack U, Tarnok A und Rothe G, 27-70. Basel: Karger,

2007.

Rothweiler U, Czarna A, Ciombor M, Kalinski J, Krajewski C, Khazak V, Ross G, Skobeleva N. Isoquinolin-one Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction. *ChemMedChem*, 2008; 1118-1128.

Sauer R. Strahlenbiologie. In *Radiologie*, von Kauffmann GW, Moser E und Sauer R, 7-57. München: Urban & Fischer, 2001.

Schinzer D, Limberg A. Epothilone: Neue Wirkstoffe gegen Krebs. *Magdeburger Wissenschaftsjournal*, 2000, 1: 23-29.

Schoelch ML, Le QT, Silverman S, Dekker A, Fu NP, Ziobor KK, McMillan BL, Regezi JA. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 1999, 35: 77-85.

Smith EM, Rubenstein L, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control*, 2010, 21: 1369-1378.

Somers KD, Memck AM, Lopez ME, Incognito SL, Schechter GL. Frequent p53 Mutations in Head and Neck Cancer. *Cancer Res*, 1992, 52: 5997-6000.

Steel, GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1979, 5: 85-91.

Steinberg M. Ixabepilone: a novel microtubule inhibitor for the treatment of locally advanced metastatic breast cancer. *Clin Ther*, 2008, 30: 1590-1617.

Supiot S, Hill RP, Bristow RG. Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 993-999.

Tallarida RJ. An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319: 1-7.

Tokalov SV, Abolmaali ND. Protection of p53 wild type cells from taxol by nutlin-3 in the combined lung cancer treatment. *Bio Med Central Cancer*, 2010, 23: 10-57.

Trott KR. Experimental Results and Clinical Implications of the Four R's in Fractionated Radiotherapy. *Radiat Environ Biophys*, 1982, 20: 159-170.

- Valentin-Vega YA, Barboza JA, Chau GP, El-Naggar AK, Lozzano G. High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. *Human Pathology*, 2007, 38: 1553-1562.
- Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 2007, 13: 23-31.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kammlott K, Lukacs U, Klein C, Fotouhi C, Kong N, Liu EA. In vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, 2004, 303: 844-848.
- Vaupel P. Hypoxia and Aggressive Tumor Phenotype: Implications for Therapy and Prognosis. *Oncologist*, 2008, 13: 21-26.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26: 225-239.
- Wade M, Wahl G. Targeting Mdm2 and Mdmx in Cancer Therapy: Better Living through Medicinal Chemistry? *Mol Cancer Res*, 2009, 1: 1-11.
- Wilson L, Panda D, Jordan MA. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the action of cellular regulators. *Cell Struct Funct*, 1999, 24: 329-335.
- Yardley DA. Proactive management of adverse events maintain the clinical benefit of Ixabepilone. *Oncologist*, 2009, 14: 448-455.
- Zhang Z, Wang H, Li G, Yu M, Bonner D, Agrawal JA, Zhang S, Prasad R. Radiosensitization by Antisense Anti-MDM2 Mixed Backbone Oligonucleotide in in vitro and in vivo Human Cancer Models. *Clin Can Res*, 2004, 10: 1263-1272.
- Zhao L, Au J, Wientjes G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Front Biosci*, 2010, 2: 241-249.

IX. ANHANG

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Zellüberlebenskurve für humane HeLa-Tumorzellen nach Bestrahlung (aus Puck und Markus, 1956).....</i>	5
<i>Abbildung 2: Envelope of Additivity (aus Steel und Peckham, 1997).....</i>	8
<i>Abbildung 3: Strukturformel Ixabepilon (aus Hunt, 2009).....</i>	9
<i>Abbildung 4: MDM2-p53-Interaktion (aus Hardcastle, 2007).....</i>	13
<i>Abbildung 5: Versuchsaufbau Koloniebildungstest.....</i>	25
<i>Abbildung 6: Beispiel einer gefärbten 12-Well-Platte für den Koloniebildungstest mit Ixabepilon.....</i>	26
<i>Abbildung 7: Beispiel einer gefärbten 12-Well-Platte für den Koloniebildungstest mit PNX 727</i>	26
<i>Abbildung 8: Versuchsaufbau Apoptosemessung</i>	29
<i>Abbildung 9: Beispiel für eine Auswertung der Apoptosemessung anhand Caspase-3-Aktivität</i>	30
<i>Abbildung 10: Zellüberlebenskurve von FaDu Zellen in-vitro.....</i>	32
<i>Abbildung 11: Zytotoxizität von Ixabepilon auf die Zelllinie FaDu</i>	33
<i>Abbildung 12: Zytotoxizität von PNX 727 auf die Zelllinie FaDu.....</i>	34
<i>Abbildung 13: Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung, lineare Darstellung</i>	35
<i>Abbildung 14: Logarithmische Darstellung der Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für Ixabepilon in Kombination mit Bestrahlung.....</i>	36
<i>Abbildung 15: Darstellung der Kombinationswirkung von Bestrahlung und Ixabepilon im Contourmodell auf die Zelllinie FaDu</i>	37
<i>Abbildung 16: Darstellung des Zellüberlebens in Abhängigkeit von Bestrahlung und Ixabepilon-Konzentration im dreidimensionalen Modell.....</i>	38
<i>Abbildung 17: Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für den MDM2-Inhibitor PNX 727 in Kombination mit Bestrahlung, lineare Darstellung</i>	39
<i>Abbildung 18: Logarithmische Darstellung der Zellüberlebenskurven im Koloniebildungstest für PNX 727 in Kombination mit Bestrahlung</i>	40
<i>Abbildung 19: Contourplot für die Kombinationswirkung von Bestrahlung und</i>	

<i>PXN 727 (MDM2-Inhibitor).....</i>	41
<i>Abbildung 20: Dreidimensionale Darstellung zur Kombinationswirkung von PXN 727 (MDM2-Inhibitor) und Bestrahlung.....</i>	42
<i>Abbildung 21: Apoptoserate der Zelllinie FaDu nach Bestrahlung</i>	43
<i>Abbildung 22: Apoptosemessung der Zelllinie FaDu anhand Caspase-3, 48 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung in Kombination mit Ixabepilon</i>	45
<i>Abbildung 23: Apoptosemessung anhand Caspase-3, 48 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung in Kombination mit PXN 727 (MDM2-Inhibitor).....</i>	47

X. DANKSAGUNG

Vielen Dank an Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung für Experimentelle Radioonkologie und Strahlenbiologie durchführen zu können, die interessanten Anregungen, sowie für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger möchte ich sehr herzlich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

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

Bei Herrn Dr. Khashayar Fakhrian möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Betreuung bedanken.

Großer Dank gilt Dr. Daniela Schilling für die hervorragende und engagierte wissenschaftliche Betreuung, die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit ebenso wie für die wertvollen Hilfestellungen zu jeder Zeit.

Außerdem möchte ich mich bei Ines Nachtigall und Armin Bareiß für die immer nette und hilfsbereite Unterstützung im Labor bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriele Multhoff möchte ich auch sehr herzlich für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit danken.

Einen herzlichen Dank an Herrn Bernhard Haller aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Meiner Mitdoktorandin Nathalie Lippmann danke ich ganz besonders für die nette Zusammenarbeit während der vielen Stunden im Labor, wodurch der experimentelle Teil der Arbeit eine wirklich schöne und unvergessene Zeit geworden ist.

Desweiteren vielen Dank an Leonie Türk und Stefanie Käck für die schnelle und unkomplizierte Einarbeitung in die Methoden.

Meiner Mutter, meinem Vater und meinen beiden Schwestern Sabine und Katharina möchte ich vielen Dank für ihre stete Unterstützung aussprechen. Einen ganz lieben Dank außerdem an Irene Hausinger und Bianka Schink für die aufmunternden Worte und das zuverlässige Korrekturlesen!

Zuletzt möchte ich mich ausdrücklich vor allem bei Benjamin für seinen unentwegten Rückhalt zu jeder Zeit bedanken.