

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Zytostatika-induzierte Proliferation von Tumorzellen**

Eva Maria Boeckeler geb. Baader

aus

Darmstadt

2018

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. I. Jeremias betreut und von Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 02.08.2018

***Eva Boeckeler***

Dissertation eingereicht am:	02.08.2018
1. Gutachterin / 1. Gutachter:	Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar
2. Gutachterin / 2. Gutachter:	Frau Prof. Dr. I. Jeremias
Mündliche Prüfung am:	19.10.2018

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

## Veröffentlichungen

<b>I</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1	Wirkung und Einteilung der Zytostatika.....	1
1.1	Anwendung und Wirkungsweise von Zytostatika.....	1
1.2	Einteilung nach Wirkungsmechanismus .....	2
1.3	Zelltodinduktion durch Zytostatika .....	6
1.4	Apoptotische Wirkung von TRAIL .....	7
1.5	Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation .....	10
2	Konzipierung von in vitro-Versuchen mit Zytostatika .....	12
2.1	Pharmakokinetik: Das Schicksal des Pharmakons im Körper .....	12
2.2	Pharmakodynamik: Wirkung des Pharmakons im Tumor .....	14
2.3	Korrelation pharmakokinetischer Parameter mit der Effektivität von Zytostatika .....	15
2.4	Beeinflussung der Pharmakokinetik der Zytostatika in vivo .....	16
2.5	Der richtige Einsatz von Zytostatika in vitro .....	17
3	Förderung des Tumorwachstums durch Zytostatika .....	19
3.1	Dexamethason fördert das Wachstum in verschiedenen Zelltypen. ....	19
3.2	Doxorubicin fördert das Wachstum in verschiedenen Zelltypen. ....	23
4	Zielsetzung der Arbeit.....	24
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
1	Reagentien .....	25
1.1	Zytostatische Substanzen.....	25
1.2	Lösungen und Reagentien für die Zellkultivierung .....	26
1.3	Inhibitoren.....	26
1.4	Puffer und sonstige Reagentien .....	27
2	Kultivierung eukaryontischer Zellen (Zellkultur) .....	28

---

2.1	Zelllinien .....	28
2.2	Primäre leukämische Blasten .....	30
2.3	Aussäen für Proliferationsexperimente .....	30
2.4	Zytostatika-Konzentrationen für Proliferationsexperimente .....	30
2.5	Einfrieren und Auftauen .....	32
3	Methoden zur Apoptosemessung .....	32
3.1	FSC-SSC-Analyse (Survival-Test).....	32
3.2	Nicoletti-Assay .....	34
3.3	Annexin V-Färbung.....	35
4	Methoden zur Proliferationsmessung .....	35
4.1	Lichtmikroskopische Methoden .....	35
4.2	Mischtest .....	38
4.3	ATP-Test .....	39
4.4	WST-1-Test .....	40
4.5	Zellzyklus-Analyse mittels BrdU-Einbau .....	40
5	Western Blot .....	42
5.1	Zell-Lysierung .....	42
5.2	Auftrennung im SDS-PAGE-Gel .....	43
5.3	Übertragung auf Membran und Entwicklung.....	45
6	Statistik .....	47
<b>III</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
1	Zytostatika bewirkten vermehrte Zellproliferation in Tumor-Zelllinien. ....	48
1.1	TRAIL vermittelte Proliferation auf Tumorzellen. ....	48
1.2	Dexamethason vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen. ....	51
1.3	Der proliferationsfördernde Effekt zytostatischer Substanzen trat auch bei anderen Zelllinien auf. ....	60
2	Zytostatika verursachten sowohl Zellproliferation als auch Apoptose. ....	70

---

2.1	Epirubicin vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.....	70
3	Zytostatika induzierten die Proliferation von primären Tumorzellen.....	80
3.1	Übersicht der Zytostatika und Messmethoden.....	80
3.2	Zytostatika reduzierten die Apoptoserate von primären Tumorzellen und wirkten tumorerhaltend. ....	83
3.3	Zytostatika verursachten in 28,4% der Proben vermehrte Zellproliferation von primären Tumorzellen.....	87
4	Umwandlung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in Apoptose.....	91
4.1	Übersicht der sensitivierenden Agentien .....	91
4.2	Der Bcl-xL-Inhibitor DCPE erhöhte die Epirubicin-induzierte Apoptoserate.....	93
4.3	Die Inkubation mit Glucose-freiem Medium erhöhte die Epirubicin-induzierte Apoptoserate. ....	95
4.4	Die Inhibition von p38-MAPK führte zur Erhöhung der Epirubicin-induzierten Apoptoserate. ....	96
5	Inhibierung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in MCF-7-Zellen .....	98
5.1	Übersicht der Inhibitoren und ihrer zellulären Angriffspunkte .....	98
5.2	Kriterien der Versuchsdurchführung und Auswertbarkeit.....	100
5.3	Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Epirubicin- und Dexamethason-vermittelte Proliferation. ....	100
6	Mechanismus der Zytostatika-vermittelten Proliferation .....	103
6.1	Mechanismus der TRAIL-vermittelten Proliferation .....	103
6.2	Rolle des p38MAPK Signalwegs für Zytostatika-vermittelte Proliferation .....	107
6.3	Dexamethason aktivierte die p38-MAPK in MCF-7-Zellen.....	107
<b>IV</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
1	Methodik der Proliferationsmessung in Zellkulturen .....	110
2	Zytostatika-vermittelte Zellproliferation in Tumor-Zelllinien und primären Tumorzellen.....	113

---

3	Apoptose-Resistenz im proximalen Signalweg als Voraussetzung für TRAIL-induzierte Proliferation .....	115
4	Umwandlung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in Apoptose .....	117
5	Mechanismus und Inhibition der Zytostatika-induzierten Proliferation .....	119
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>123</b>
	<b>Summary</b> .....	125
<b>VI</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>127</b>
<b>VII</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>130</b>
<b>VIII</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>131</b>
<b>IX</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>133</b>
<b>X</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>143</b>
1	Ergebnisse der getesteten Kombinationen .....	143
2	Zusammenstellung der positiv getesteten Kombinationen.....	149
<b>XI</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>151</b>
<b>XII</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>152</b>

## Veröffentlichungen

**Baader E**, Toloczko A, Fuchs U, Schmid I, Beltinger C, Ehrhardt H, Debatin KM, Jeremias I. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects. *Cancer Res* 2005;65(17):7888-7895.

Anzahl Zitationen: 83

Gündisch S, **Boeckeler E**, Behrends U, Amtmann E, Ehrhardt H, Jeremias I. Glucocorticoids augment survival and proliferation in tumor cells. *Anticancer Res* 2012;32(19):4251-61.

Anzahl Zitationen: 26

# **I Einleitung**

Die Analyse der Wirkung zytostatischer Stoffe auf Tumorzellen ist Gegenstand dieser Studie. In der Einleitung erfolgt eine Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen der verschiedenen Substanzklassen mit Fokussierung auf die pro-apoptotische Wirkung von Zytostatika. Es werden Zusammenhänge zwischen Apoptose und Zellproliferation aufgedeckt und erste Hinweise auf eine pro-proliferative Wirkung von Zytostatika gezeigt. Besondere Wichtigkeit wurde in dieser Arbeit der richtigen Konzipierung der vitro-Experimente unter Beachtung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Wirkstoffe beigemessen.

## **1 Wirkung und Einteilung der Zytostatika**

Die Bekämpfung bösartiger Tumore erfolgt durch in der Chemotherapie eingesetzte zytostatische Substanzen, die je nach chemischer Struktur auf unterschiedliche Weise intrazelluläre Stoffwechsel-Signalwege blockieren. TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), ein Mitglied der TNF-Familie, sowie klassische Zytostatika induzieren die Apoptose als programmierten Zelltod, der nach einem bestimmten Mechanismus in der Zelle abläuft. Pro-apoptotische Abläufe können jedoch durch die Verschaltung von Signalwegen in Vorgänge umgewandelt werden, die das Zellwachstum fördern.

Neben den klassischen Zytostatika werden in der Tumorthherapie zunehmend weitere Onkologika, wie monoklonale Antikörper, Kinasehemmer und Onkologika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, wie z.B. Hormonantagonisten, eingesetzt.

Die folgende Beschreibung der zytostatischen Substanzen bezieht sich auf die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe.

### **1.1 Anwendung und Wirkungsweise von Zytostatika**

Statistisch gesehen entwickelt jeder dritte Europäer im Laufe seines Lebens Krebs. In Deutschland erkranken jährlich etwa 395.000 Menschen an einem malignen Tumor. Die Tendenz ist eindeutig steigend. Obwohl maligne Tumore zumeist eine Erkrankung des höheren Lebensalters darstellen, sind auch Kinder betroffen: Rund 1800 Kinder erkranken in Deutschland jährlich bis zu ihrem 15. Lebensjahr an Krebs. Am häufigsten werden in dieser Altersgruppe Leukämien, Tumoren des Gehirns und des Rückenmarks

sowie Lymphknotenkrebs diagnostiziert. Durch die ständige Verbesserung der Therapie-Schemata haben sich die Überlebenschancen insbesondere für Kinder in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert, so dass bei einigen Tumorerkrankungen eine Heilungsrate von über 90% erzielt werden kann (1,2).

Ein maligner Tumor kann durch verschiedene Behandlungsmethoden vernichtet oder in seinem Wachstum gehemmt werden. Es gelingt bisher jedoch nicht, die entartete Tumorzelle wieder in eine normale Zelle zurück zu verwandeln.

Die heutigen Behandlungsmöglichkeiten der meisten soliden Tumore umfassen neben der operativen Entfernung die Bestrahlung und Chemotherapie. Insbesondere der Chemotherapie mit Zytostatika kommt bei der Bekämpfung von chemosensiblen Tumoren, wie Keimzelltumoren, Sarkomen oder akuten lymphatischen Leukämien eine wichtige Bedeutung zu.

Zytostatika werden vorzugsweise kombiniert eingesetzt, was als konsekutive oder gleichzeitige Kombinationstherapie bezeichnet wird. Dies hat zum Ziel, Resistenzentwicklungen zu verzögern und eine Wirkungssteigerung ohne Erhöhung der Toxizität zu erreichen (3).

Zytostatika stellen eine chemisch heterogene Gruppe zytotoxischer Substanzen auf natürlicher oder synthetischer Basis dar. Sie verhindern oder verzögern die Zellteilung funktionell aktiver Zellen durch Beeinflussung ihres Stoffwechsels.

Zytostatika können nur an proliferierenden Zellen wirksam werden, nicht an Zellen in der Ruhephase des Zellzyklus. Die therapeutische Anwendung klassischer Zytostatika beruht daher darauf, dass sich Tumorzellen in einer gesteigerten, der physiologischen Wachstumskontrolle entzogenen Zellteilungsrate befinden (4).

Neben der Erforschung neuer Angriffspunkte im Tumor und der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es ein wichtiger Aspekt der onkologischen Forschung, die Anwendung der bewährten Zytostatika hinsichtlich Effektivität und Verträglichkeit weiter zu optimieren.

## **1.2 Einteilung nach Wirkungsmechanismus**

Zytostatika können nach ihren Angriffspunkten während der Zellteilung klassifiziert werden. Tabelle 1 (modifiziert nach (3)) ordnet die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen in Substanzgruppen ein und nennt den jeweiligen Wirkmechanismus.

Zytostatikum	Substanzgruppe	Wirkmechanismus
Methotrexat 6-Thioguanin Cytarabin 5-Fluorouracil	Antimetabolite	Hemmung der Purinsynthese
Cyclophosphamid Melphalan Cisplatin Dacarbazin	Alkylantien	Interkalation der DNA
Topotecan Etoposid	Topoisomerase- Hemmstoffe	Hemmung der DNA-Replikation
Asparaginase Tamoxifen	Enzyme und Hormonantagonisten	Abbau wichtiger Substanzen und Hemmung des hormonabhängigen Wachstums
Dexamethason Prednisolon	Glucocorticoide	Bindung an Glucocorticoid- Rezeptor und Regulation von Apoptose-Genen
Vincristin	Mitosehemstoffe	Hemmung der Mikrotubuli- Funktion
Doxorubicin Epirubicin	Zytostatisch wirksame Antibiotika	Interkalation der DNA Hemmung der DNA-Replikation Bildung freier Radikale Bindung an Zellmembran
Interferon-gamma	Immunmodulatoren	Stimulation des RNA-Abbaus Hemmung der Translation
UO 126	MEK-Inhibitoren	Hemmung der Proliferation

**Tabelle 1 Einteilung der verwendeten Zytostatika nach Substanzgruppen und Wirkmechanismus**

Zytostatika greifen je nach Substanzklasse in verschiedene zelluläre Vorgänge der Zellteilung und Vermehrung ein. Auf der Ebene der Nukleinsäure-Synthese wirken Cytarabin, 5-Fluorouracil, 6-Thioguanin und Methotrexat. Während Cytarabin über die Hemmung der DNA-Polymerase die Neusynthese verhindert, wirken 5-Fluorouracil,

6-Thioguanin und Methotrexat über eine Störung der Pyrimidine und Purine als Bausteine der Nukleinsäuren.

Die Inaktivierung der Nukleinsäuren erfolgt durch alkylierende Substanzen (Cyclophosphamid, Melphalan, Cisplatin, Dacarbazin), durch Hemmung der Topoisomerasen (Topotecan und Etoposid) und durch DNA-Interkalation mit der Bildung radikalinduzierter Strangbrüche (Doxorubicin und Epirubicin).

Auf der RNA-Ebene greifen 5-Fluorouracil und Interferon-Gamma ein: 5-Fluorouracil schädigt die RNA irreparabel durch den Einbau falscher Metabolite; Interferon-gamma stimuliert den RNA-Abbau und hemmt die Translation.

Viele Zytostatika üben ihre Wirkung durch eine Störung auf spezifische Proteine aus: Mitosehemmstoffe wie Vincristin blockieren die Zellteilung durch Bindung an das Protein, Asparaginase hydrolysiert die Aminosäure L-Asparagin. Die Wirkung der Glucocorticoide Dexamethason und Prednisolon sowie der Substanz UO126 verläuft wesentlich komplexer: Glucocorticoide greifen nach ihrer Bindung an Rezeptoren in die Regulation zelltod-spezifischer Gene ein. UO126 hemmt die Zellproliferation über eine Hemmung der MAP-Kinase MEK (5,6).

Neben der Zelltodinduktion durch klassische Zytostatika spielt seit einigen Jahren die immuntherapeutische Tumorbekämpfung mit humanisierten monoklonalen Antikörpern eine immer größere Rolle, z.B. Trastuzumab zur Behandlung von Patienten mit metastasierendem Mammakarzinom oder Alemtuzumab zur Behandlung von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) (119).

Abbildung 1 fasst die Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen zusammen.

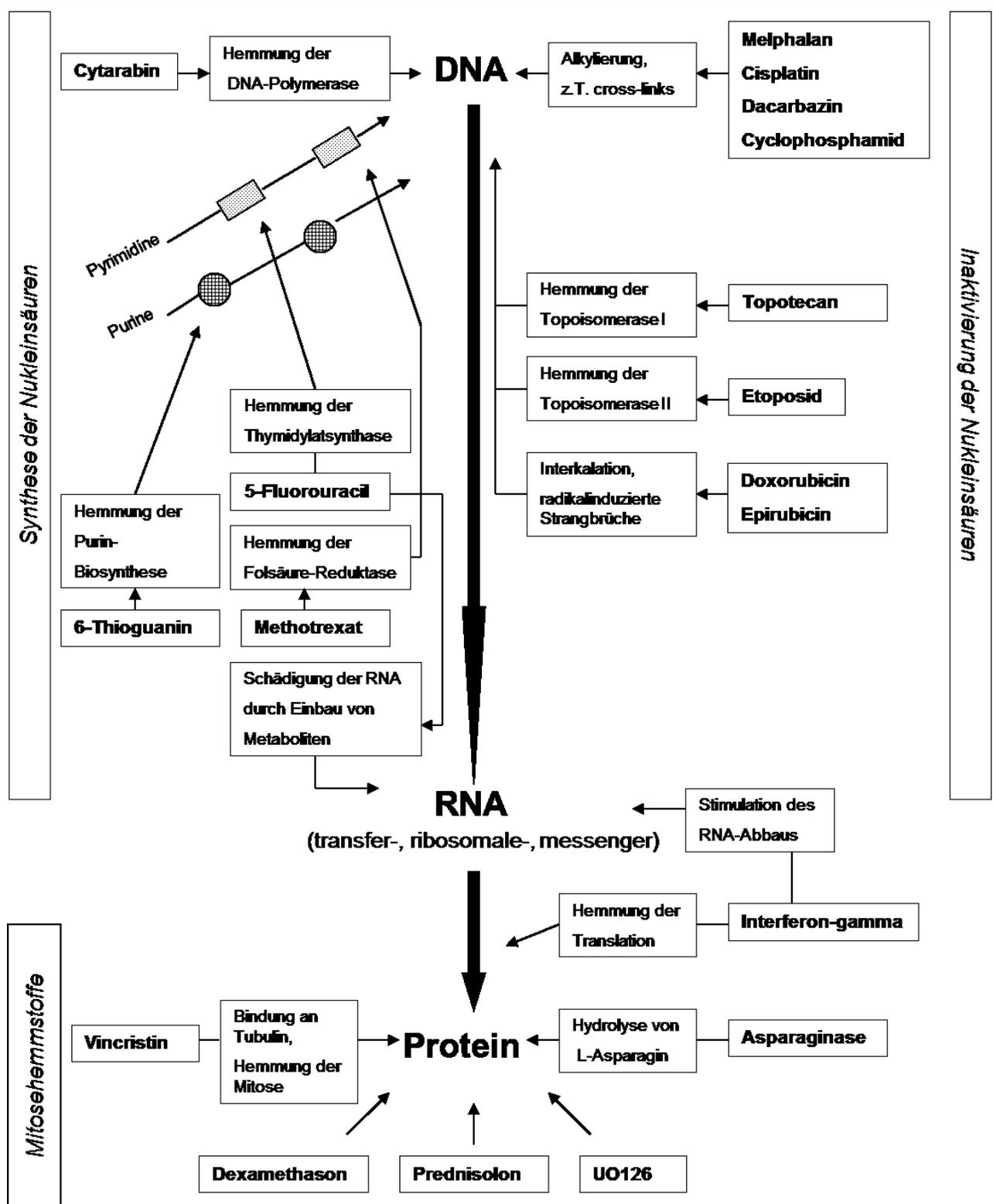


Abbildung 1 Zelluläre Angriffspunkte der verwendeten Zytostatika (modifiziert nach (7))

### 1.3 Zelltodinduktion durch Zytostatika

Über die oben genannten Mechanismen verhindern Zytostatika das Wachstum von Zellen oder führen zum Zelltod. Hierbei spielt die Induktion der Apoptose als programmierter Zelltod eine wichtige Rolle.

Morphologisch kommt es im Rahmen der Apoptose zu stark geschrumpften, kugelförmigen Zellen mit ausgestülpten Zellmembranen. Die Filamente des Zytoskeletts aggregieren, und der Zellkern fragmentiert. Durch Einwirkung einer Caspase-aktivierten DNase (CAD) entstehen DNA-Bruchstücke definierter Größe ( $n \times 200$  Basenpaare), die in der Gelelektrophorese das charakteristische Bild einer Leiter ergeben (DNA-Laddering). Die Zellfragmente bilden sogenannte Apoptosekörper (3).

Zwei verschiedene Wege der Apoptoseinduktion werden beschrieben, allerdings ist im Organismus vermutlich keine strenge Trennung vorhanden. Beim ersten Weg wird ein extrazelluläres Signal durch Todesrezeptoren (death receptors) ins Zellinnere vermittelt, indem Ligand-Rezeptor-Komplexe entstehen (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor und TNF1-Rezeptor). Über die Bindung an Adapterproteine und anschließende Aktivierung von Proteasen (Caspasen) wird der programmierte Zelltod eingeleitet (8).

Zytostatika können Zelltod dadurch auslösen, dass sie die Todesrezeptoren oder deren Liganden hochregulieren (9).

Ein zweiter Apoptoseweg, der durch zellulären Stress wie die Einwirkung von Zytostatika oder Bestrahlung initiiert werden kann, beginnt unabhängig von den Todesrezeptoren mit einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, das dann seinerseits Caspasen aktiviert. Proapoptotische Proteine (z.B. Bax, Bak) bilden eine Pore in der Mitochondrienmembran und lösen somit die Cytochrom-C-Freisetzung aus. Andererseits existieren antiapoptotische Proteine (z.B. Bcl-2), welche die Aktivität der proapoptotischen Proteine hemmen (3,10).

Versuche mit Caspase-Inhibitoren konnten zeigen, dass der Zytostatika-induzierte Zelltod häufig auf der Aktivierung der Caspase-abhängigen Apoptose-Signalwege beruht. Hierbei spielt der Zelltyp und die Konzentration des Zytostatikums eine entscheidende Rolle (9).

Dies sind die verschiedenen Ebenen, auf denen eine Apoptose-Induktion durch Zytostatika erfolgen kann:

- Todesrezeptoren
- Caspase-Signalkaskade
  - von den Mitochondrien aufwärts
  - von den Mitochondrien abwärts
- Fas und p53
- JNK/SAPK und NF-κB
- Ceramid-Signalweg

Die Hochregulation der Todesrezeptoren sowie die Beeinflussung der Caspase-Signalkaskade wurden bereits oben erwähnt. Zytostatika (z.B. MTX und Doxorubicin) können die Expression von Fas induzieren und die Tumorzelle somit gegenüber Fas-vermittelter Apoptose sensitivieren. Die Fas-vermittelte Apoptose ist eng mit der Apoptose-Induktion durch das Tumorsuppressorgen p53 verknüpft (11).

Über die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies und den Ceramid-Signalweg vermögen Zytostatika außerdem das System der JNK/SAPK sowie den Transkriptionsfaktor NF-κB zu aktivieren. Ceramide entstehen als Zerfallsprodukte von Sphingomyelin infolge von zytotoxischem Stress und sind evolutionär hoch konservierte sekundäre Botenstoffe. Ceramid-induzierte Apoptose ist abhängig von der Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien und kann durch die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-xL (antiapoptotisch wirksam) verhindert werden (12).

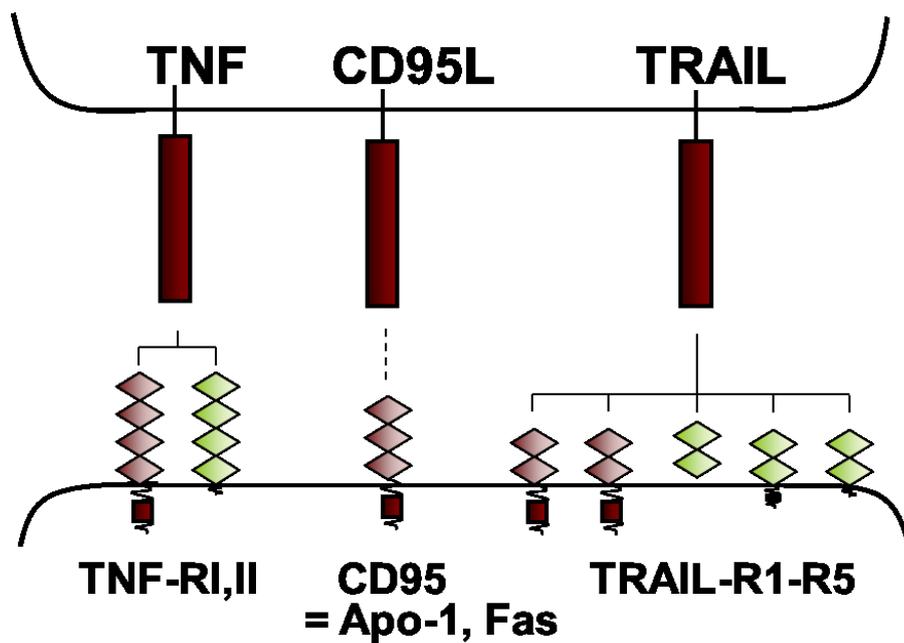
Untersuchungen zur Wirkung von Liganden aus der TNF-Familie haben jedoch auch gezeigt, dass die Aktivierung von Todesrezeptoren ein erhöhtes Überleben oder sogar eine Proliferation der Tumorzelle bewirken kann.

#### **1.4 Apoptotische Wirkung von TRAIL**

Das Zytokin TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF)- related apoptosis-inducing ligand) wurde 1995 aufgrund seiner hohen Homologie zu den Todesliganden TNF und CD95L identifiziert. Es ist somit ein Mitglied der TNF-Familie, das die physiologischen Funktionen der Verhinderung von Tumoren und der Eindämmung von Virusinfektionen erfüllt. Als neuartiges Zytostatikum hat TRAIL klinische Bedeutung, da es in Tumorzellen verschiedenen Ursprungs Apoptose zu induzieren vermag. In Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen erscheint die pro-apoptotische Wirkung von

TRAIL besonders effektiv zu sein. Da TRAIL normale Zellen nicht schädigt und sich auch im Tierversuch als untoxisch erwiesen hat, könnten TRAIL selbst oder gegen die Apoptose-induzierenden TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 gerichtete Antikörper wichtige Zytostatika der Zukunft werden (16,120).

Der humane monoklonale Antikörper Mapatumumab (HGS-ETR1) bindet als Agonist an den TRAIL-Rezeptor 1, zeigte an isolierten Tumorzellen Apoptoseinduktion und hat bereits klinische Studien durchlaufen (119).

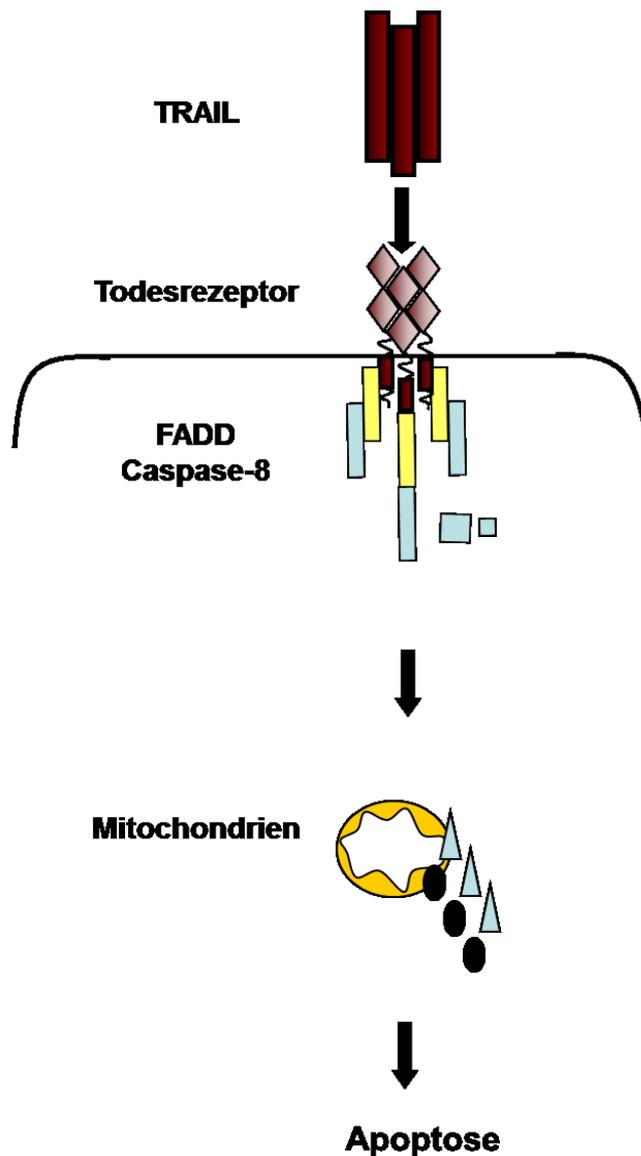


**Abbildung 2** TRAIL ist ein Todesligand.

TRAIL bindet analog zu TNF und CD95L an Rezeptoren, die sich in ihrer intrazellulären Domäne unterscheiden.

Die intrazelluläre Signalkaskade von TRAIL beruht auf der Reaktion des aktivierten TRAIL-Rezeptors mit dem Protein FADD (Fas-associated polypeptide with death domain). Zusammen mit Caspase-8 (cysteine aspartyl-specific protease 8) erfolgt die Ausbildung des sogenannten DISC (death-inducing signaling complex).

Trail-induzierte Apoptose kann verhindert werden, indem statt Caspase-8 das Protein FLIP (FLICE-inhibitory protein) an FADD bindet.



**Abbildung 3 Modell des intrazellulären Apoptose-Signalwegs von TRAIL (Erklärung im Text)**

Aktivierte Caspase-8 führt entweder in einer Signalkaskade zur Bildung weiterer aktiver Caspasen (Typ-I-Zellen) oder zur Aktivierung der Mitochondrien (Typ-II-Zellen), wobei die Apoptose-Induktion meist über den Caspase-Signalweg erfolgt.

In Tumorzellen kann die Apoptose-Induktion durch die TRAIL-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B abgeschwächt werden, was zum Überleben und vermehrten Wachstum der Zellen führt (16,17,18,19,20,13).

TRAIL vermittelt nicht nur Apoptose über seine Bindung an spezifische Todesrezeptoren: Untersuchungen unseres Labors haben ergeben, dass TRAIL in leukämischen Patientenproben das Überleben und sogar die Proliferation fördert, wenn diese resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose geworden sind.

In über 20% von 18 getesteten Zelllinien und 53 Patientenproben treten Proliferationseffekte auf, was durch die Co-Stimulation von Zytostatika nicht verhindert werden kann. Die TRAIL-vermittelte Proliferation beruht auf Defekten in der Rezeptor-nahen Signalübertragung der Apoptose, dem Verlust der Caspase-8 und der Dysfunktionalität des Adaptermoleküls FADD (13,14). Die Daten zu pro-proliferierenden Effekten von TRAIL wurden in unserem Labor zuerst erhoben und publiziert und stellen die wichtigsten Vorarbeiten zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zu etablierten Zytostatika dar.

### **1.5 Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation**

Intrazelluläre Signalwege, die zum apoptotischen Zelltod führen, sind oft an mehreren Schaltstellen mit Signalkaskaden der Zellproliferation verbunden. In der Zellbiologie wird unter Proliferation das Zell- und Gewebewachstum durch Vermehrung der Zellanzahl verstanden.

An erster Stelle seien hier einige Regulatoren des Zellzyklus genannt, die sowohl die Zellteilung als auch den programmierten Zelltod auslösen: c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- $\kappa$ B, CDK, Cycline und CKI (15).

Abbildung 2 fasst die wichtigsten Signalwege zusammen, die zu Proliferation oder Apoptose führen können.

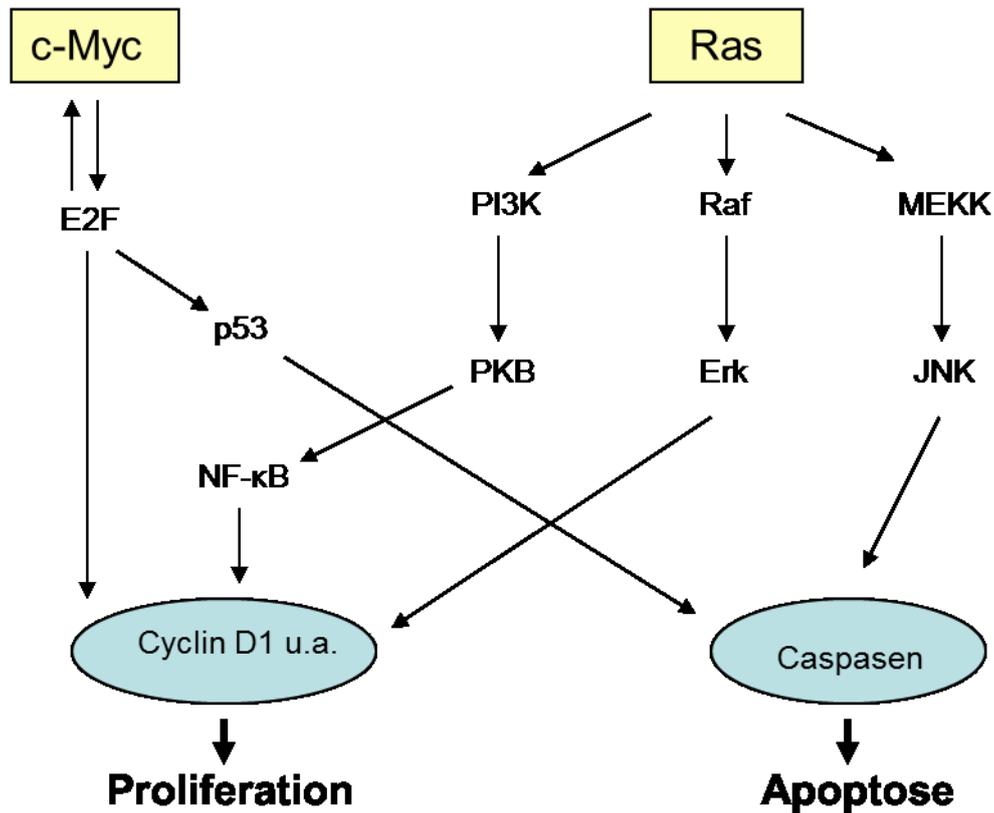


Abbildung 4 Verknüpfung von Proliferation und Apoptose (Erklärung im Text)

Wichtige Schaltstellen sind der nukleäre Transkriptionsfaktor c-Myc sowie das Membran-gekoppelte G-Protein Ras. Über Aktivierung des weiteren Transkriptionsfaktors E2F werden entweder Cycline freigesetzt und somit der Proliferationsweg eingeschlagen, oder die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 führt zur Caspase-induzierten Apoptose. Ras verursacht die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen, wovon JNK pro-apoptotisch wirkt und PKB sowie Erk die Proliferation begünstigen.

Ob jedoch der Proliferations- oder Apoptoseweg eingeschlagen wird, hängt von weiteren Faktoren wie dem Zelltyp, der Kultivierung und der genetischen Disposition ab. Mehrere Signale verschiedener, miteinander verknüpfter Signalwege bestimmen die zelluläre Antwort auf spezifische Stimuli.

Diese Zusammenhänge führen zur nahe liegenden Vermutung, dass Substanzen, die zur Apoptose-Induktion in der Lage sind, unter gewissen Bedingungen auch das Zellwachstum stimulieren können.

## 2 Konzipierung von in vitro-Versuchen mit Zytostatika

Das Zellkulturmodell stellt die Reduktion eines komplexen, interaktiven Systems auf einige isolierte grundlegende Prozesse dar. Es darf daher in seiner Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Patienten nicht überschätzt werden (21).

Die Entwicklung von Testsystemen, die die körpereigenen Vorgänge möglichst präzise nachstellen, wird als In vitro/ in vivo-Modelling bezeichnet.

Hauptziel des In vitro/ in vivo-Modelling ist die Entwicklung von Screening-Techniken in einem sehr frühen Stadium der Wirkstoff-Forschung (22).

Solche Techniken sollten idealerweise für einen hohen Umsatz an Experimenten geeignet sein, wodurch folgende Anforderungen entstehen:

- ✓ schnell
- ✓ einfach in der Anwendung
- ✓ relativ preisgünstig
- ✓ geringer Verbrauch an Substanzen
- ✓ Lieferung übertragbarer Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde zusätzlich besonderen Wert darauf gelegt, bei der Entwicklung „realistischer“ Zellkulturmodelle die pharmakokinetischen Aspekte der Arzneistoff-Applikation zu berücksichtigen.

### 2.1 Pharmakokinetik: Das Schicksal des Pharmakons im Körper

Im Rahmen der klinischen Pharmakokinetik werden die Konzentrationsänderungen des betreffenden Pharmakons in Abhängigkeit von der Zeit erfasst.

Die 1953 von dem deutschen Kinderarzt Dost erstmals erwähnte Pharmakokinetik beschreibt die zeitabhängige Verteilung der Wirkstoffe und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten, Geweben und Exkreten (23).

Die Verteilung eines Wirkstoffes im Körper kann mit dem LADME-Modell dargestellt werden:

Liberation → Absorption → Distribution → Metabolismus → Exkretion

Unter Liberation versteht man die Freigabe des Wirkstoffes aus der Arzneizubereitung nach der Applikation. Sie stellt somit die Überführung des Wirkstoffes in eine resorptionsfähige Form dar.

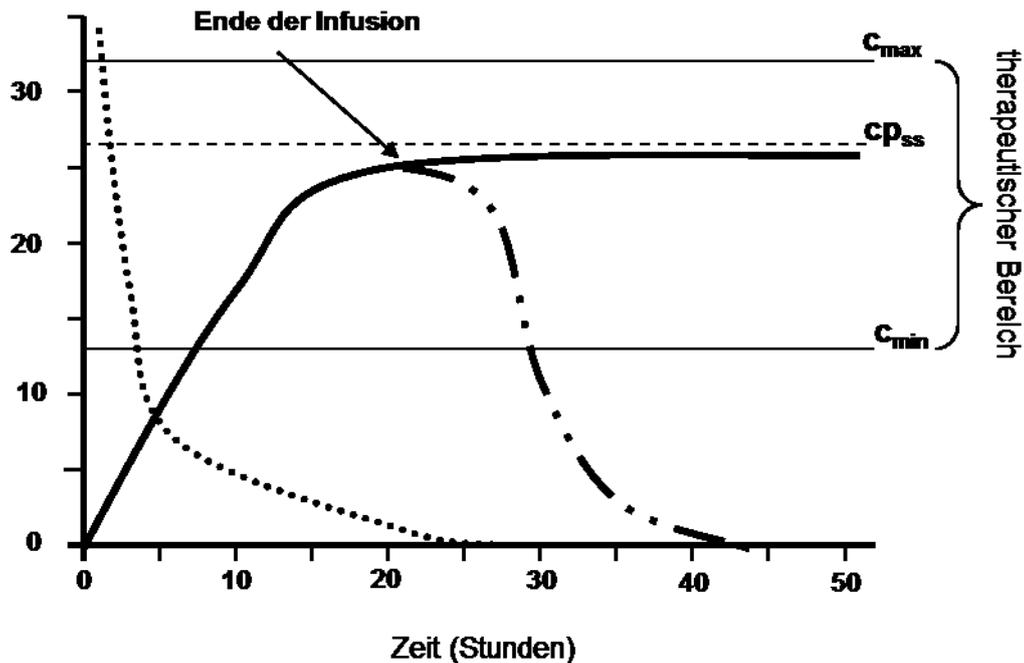
Es folgt die Absorption oder Resorption, d.h. die Aufnahme des Wirkstoffes durch biologische Membranen (z.B. Magen-Darm-Schleimhaut) in die Blutbahn.

Distribution ist die Wirkstoff-Verteilung zwischen dem Blutkreislauf und anderen Kompartimenten, z.B. Tumorgewebe oder Organe.

Durch biochemische, enzymkatalysierte Reaktionen werden lipophile Wirkstoffe in besser wasserlösliche Stoffe verwandelt, was den Vorgang der Metabolisierung oder Biotransformation darstellt. In der Eliminationshalbwertszeit  $T_{1/2}$  fällt die Serum- oder Plasmakonzentration einer Substanz auf die Hälfte ab.

Exkretion ist schließlich die Ausscheidung sowohl von unverändertem Wirkstoff als auch von Metaboliten des Wirkstoffs. Als Ausscheidungsorgane dienen neben Niere, Galle und Darm auch Lunge, Haut oder Speichel. Im Wesentlichen ist die Substanz nach ca. fünf Halbwertszeiten ausgeschieden.

Abbildung 5 stellt den typischen Konzentrationsverlauf eines Wirkstoffs im Blut nach verschiedenen intravenösen Applikationsarten dar. Hierbei wird angestrebt, die Wirkstoff-Konzentration so lange wie möglich im therapeutischen Bereich zu halten, d.h. in der bezüglich der Wirkung effektivsten Wirkstoff-Konzentration. Bei Dauerinfusionen kommt es nach dem Anstieg der Kurve zur Einstellung auf eine konstante Konzentration („steady-state-concentration“ =  $c_{p_{ss}}$ ), die durch einen Ausgleich zwischen Resorption des Wirkstoffs und seiner Distribution und Metabolisierung gekennzeichnet ist. Bei einer i.v.-Injektion wird nach der schnellen Anflutung des Wirkstoffs im Blut nur kurz der therapeutische Bereich durchlaufen, bevor die minimal wirksame Konzentration ( $c_{min}$ ) unterschritten ist und der Wirkstoff bis zur endgültigen Elimination relativ lange im suboptimalen Bereich verbleibt.



**Abbildung 5 Konzentrationsverlauf eines Wirkstoffs im Blutplasma nach intravenöser Applikation**

Der Konzentrationsverlauf bei i.v.-Injektion (gepunktete Linie), einer eintägigen Infusion (unterbrochenen Linie) und einer Dauerinfusion über mehrere Tage (durchgehende Linie) wird gezeigt. Der therapeutische Bereich (Erklärung im Text) befindet sich zwischen der minimal ( $c_{\min}$ ) und der maximal ( $c_{\max}$ ) wirksamen Wirkstoff-Konzentration. Oberhalb des therapeutischen Bereichs beginnt die toxisch wirksame Konzentration des Wirkstoffs.

Nur die genaue Analyse der Vorgänge von Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination erlaubt die optimale Dosierung zur Erzielung der maximalen pharmakodynamischen Wirkung bei möglichst geringen Nebenwirkungen (7).

## 2.2 Pharmakodynamik: Wirkung des Pharmakons im Tumor

Die Pharmakodynamik beschreibt die mechanistischen Vorgänge der Arzneistoff-Wirkung.

Das Ziel einer rationalen Wirkstoff-Therapie ist die Korrelation von pharmakokinetischen Parametern mit der pharmakodynamischen Effektivität des Wirkstoffs.

Im Gegensatz zu anderen Pharmaka z.B. aus dem internistischen Bereich wirken Zytostatika meist nicht an spezifischen Rezeptoren: die Zielmoleküle der Zytostatika liegen praktisch immer intrazellulär und werden irreversibel kovalent gebunden. Die

Chemosensitivität eines Tumors wird also von seiner intrazellulären Kinetik bestimmt (24).

Die extrazelluläre Konzentration eines Zytostatikums muss nicht unbedingt die intrazellulären Verhältnisse widerspiegeln. Zudem kommt den biochemischen Resistenzmechanismen eine große Bedeutung zu (7).

Hieraus resultiert eine unzureichende Korrelation zwischen der pharmakodynamischen Wirkung einerseits und den pharmakokinetischen Parametern andererseits.

### **2.3 Korrelation pharmakokinetischer Parameter mit der Effektivität von Zytostatika**

Die Wirkmöglichkeit eines Zytostatikums lässt sich durch Bestimmung der Konzentrationen über den gesamten Zeitraum seiner Anwesenheit im Körper erfassen. Bei grafischer Darstellung gegen die Zeit umfährt die Linie des Konzentrationsverlaufs eine Fläche, die der Gesamteinwirkung proportional ist. Diese Fläche wird als AUC („area under the concentration time curve“) bezeichnet und stellt ein Maß für die Einwirkung von Pharmaka dar. Die AUC ist demnach das pharmakologische Korrelat für die Dosisintensität, die als verabreichte Dosis pro Zeit in  $\text{mg/ m}^2/\text{Woche}$  angegeben wird.

Auch wenn die AUC wage Voraussagen über die Stärke der Wirkungen und Nebenwirkungen machen kann, besteht nur eine lose Korrelation zwischen AUC und Wirkung (25).

So kann der Einfluss der AUC durch individuelle Patientenfaktoren (Allgemeinzustand, Leber- und Nierenfunktion, Empfindlichkeit des Tumors gegenüber der Substanz) überdeckt werden. Für die meisten Zytostatika gibt es noch keine pharmakokinetischen Untersuchungen, die die AUC nicht nur mit Wirkungen und Nebenwirkungen, sondern auch mit anderen Patientencharakteristika in Verknüpfung bringen.

Untersuchungen mit Methotrexat und Etoposid konnten zeigen, dass nicht nur der Absolutwert der AUC, sondern insbesondere die Form von entscheidender Bedeutung ist.

Da onkologische Patienten häufig unter Funktionseinschränkungen von Leber und Niere sowie anderen Begleiterkrankungen leiden, kann es zu einer starken Variabilität der AUC kommen. Dies betrifft sowohl verschiedene Applikationen an einem Patient

(Intravariabilität) als auch den Vergleich einer Applikation an mehreren Patienten (Intervariabilität) (7).

Nur für ausgewählte Zytostatika bei bestimmten Tumorarten ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Parametern und dem therapeutischen Ansprechen bzw. der Ausprägung der Nebenwirkungen.

Die AUC als Maß für die Gesamt-Einwirkung des Pharmakons scheint hierbei besonders aussagekräftig zu sein, wenn die Effektivität des Pharmakons vorausgesagt werden soll. Bei der Verwendung von Zellkulturmodellen lässt sich diese pharmakokinetische Größe jedoch aufgrund des komplexen Zusammenhanges zwischen Dosis und zeitlicher Einwirkung nur unzureichend imitieren.

In dieser Arbeit dient daher die maximal erreichbare Konzentration des Zytostatikums im Plasma, die Peak-Plasma-Konzentration (ppc: peak plasma concentration) als Maßstab für die maximale Einwirkung. Erfolgt die Applikation des Zytostatikums als Dauerinfusion, wird die Peak-Plasma-Konzentration häufig als konstante Plasma-Konzentration (css: concentration in steady state) definiert, die nach einer bestimmten Infusionsdauer gemessen werden kann.

## **2.4 Beeinflussung der Pharmakokinetik der Zytostatika in vivo**

Im Rahmen der klinischen Pharmakokinetik werden die Konzentrationsänderungen des betreffenden Pharmakons in Abhängigkeit von der Zeit erfasst.

Es ist im Allgemeinen nicht möglich, aufgrund der Dosis eines Medikamentes dessen Wirkung vorauszusagen- zu viele individuelle Faktoren des Patienten beeinflussen die Plasma- und Gewebkonzentration der verabreichten Substanz (24).

Kaum eine andere Wirkstoffklasse verhält sich so vielfältig wie Zytostatika. Dies trifft sowohl auf die Variabilität der Substanzen als auch auf die individuelle Wirkung im Patienten zu.

Abbildung 6 (modifiziert nach (7)) zeigt eine Übersicht der Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Vorgängen und dem pharmakodynamischen Effekt speziell für Zytostatika.

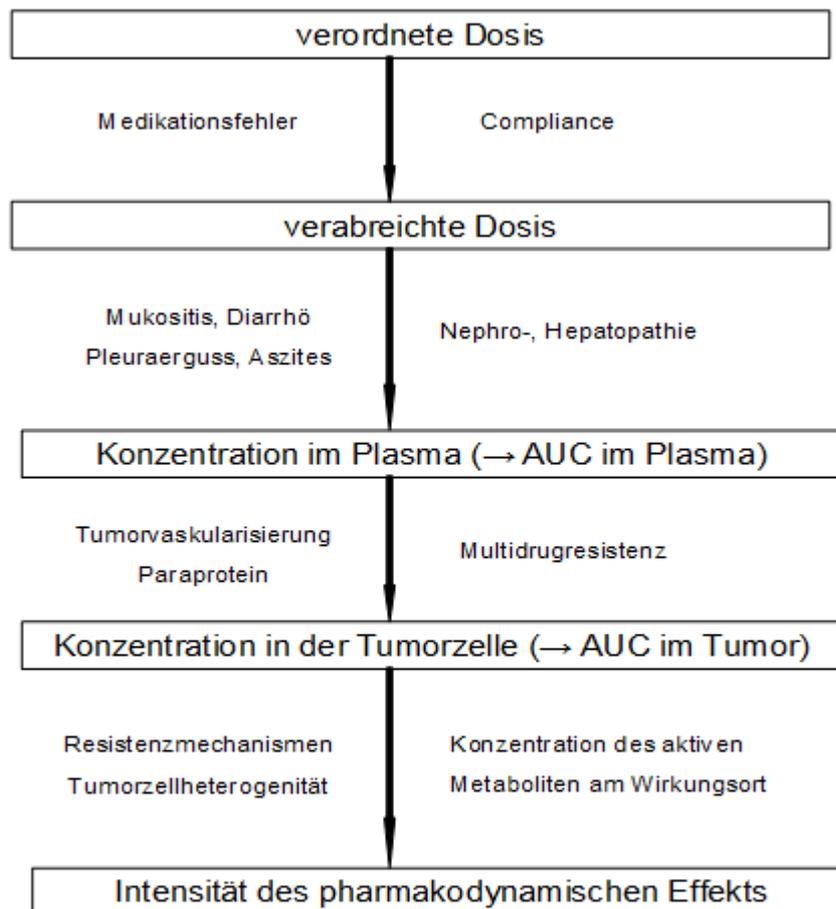


Abbildung 6 Pharmakokinetik der Zytostatika und individuelle Störfaktoren

## 2.5 Der richtige Einsatz von Zytostatika in vitro

Der Zellkulturversuch ist im Gegensatz zum Organismus nicht als offenes Mehrkompartiment-System anzusehen.

Wie oben erläutert, ist es schwierig, das je nach Substanz und Patient sehr variable Schicksal der Zytostatika im Körper durch den Zellkulturversuch zu imitieren.

Beim Inkubieren der Zellkultur mit der entsprechenden Peak-Plasma-Konzentration muss berücksichtigt werden, dass die Zytostatika einer gewissen in vitro-Pharmakokinetik unterworfen sind (26).

Folgende Aspekte sollten bei der Versuchs-Konzipierung beachtet werden:

- physikalisch-chemische Instabilität der Substanzen
- Zelllinien-abhängige Metabolisierungsvorgänge
- unphysiologische Phänomene (Adsorption an Oberflächen, Isomerisierung)
- Entstehung zytotoxischer Substanzen

Zytostatikum	Veränderung in vitro
<b>Asparaginase</b>	Veränderung des Kultur-Mediums durch Aminosäureabbau
<b>Cyclophosphamid</b>	aktive Form sehr instabil; Konzentration sinkt in 6h auf 10% ab
<b>Doxorubicin</b> <b>Epirubicin</b>	Temperatur- und Lichtempfindlichkeit
<b>Etoposid</b>	Isomerisierung von trans- in cis-Form zu 50% in 96h
<b>Taxol</b>	Adsorption an Plastik- und Glas-Oberflächen

**Tabelle 2 In vitro-Veränderungen von Zytostatika**

Unter Berücksichtigung der in Tabelle 2 gezeigten Veränderungen können im Zellkulturmodell folgende Punkte bei der Zytostatika-Inkubation modifiziert werden:

- Die **Konzentration** des Zytostatikums sollte sich nach den in der Literatur angegebenen ppc-Werten richten; der Konzentrationsbereich kann auf ca. 5-200% des ppc-Werts variiert werden (27). Liegen keine Angaben zur ppc vor oder sind diese zu unterschiedlich, kann auf selber im Zelltoxizitätsversuch ermittelte IC (inhibition concentration)– Werte zurückgegriffen werden.
- Die schnelle Metabolisierung des Zytostatikums z.B. nach einer Bolus-Gabe kann in der Zellkultur durch **Auswaschen** der Substanz mittels teilweisem Medium-Wechsel imitiert werden.

- C. Bei langer Halbwertszeit oder niedriger in vitro-Stabilität des Zytostatikums empfiehlt sich (bei längerer Versuchsdauer) die **wiederholte Gabe** z.B. alle 24 Stunden.

Da Zellkultur-Modelle trotz aller Bemühungen nicht der Komplexität der Stoffwechselforgänge im Körper entsprechen, müssen alle in vitro-Ergebnisse im Tierversuch verifiziert werden. Für die Zellkultur bleibt nur die bestmögliche Annäherung.

### **3 Förderung des Tumorwachstums durch Zytostatika**

Hinweise auf eine tumorschützende oder gar tumorvermehrnde Wirkung zytostatischer Substanzen in der Literatur sind selten. Für das Glucocorticoid Dexamethason sind von 1984 bis heute einige Studien zur Proliferationsförderung auf Tumorzelllinien und primären Zellen veröffentlicht, die jedoch nicht weiterverfolgt wurden. Für das Zytostatikum Doxorubicin ist eine wachstumsfördernde Wirkung auf wenigen humanen sowie murinen Tumorzelllinien sowie auf einer leukämischen Zelllinie beschrieben.

#### **3.1 Dexamethason fördert das Wachstum in verschiedenen Zelltypen.**

Glucocorticoide wie Dexamethason sind häufig eingesetzte Medikamente während der Antitumor-Therapie.

Das synthetische Glucocorticoid Dexamethason besitzt eine duale Zelltyp-spezifische Funktion in der Regulation des Zelltods: In Lymphozyten, leukämischen Zellen und Myelomzellen ist es in der Lage, Apoptose zu induzieren und wird daher als zytostatisch wirksame Substanz angewendet (28).

In der Therapie gegen solide Tumore wird Dexamethason aufgrund seiner Unwirksamkeit nicht eingesetzt, ist jedoch eine wichtige Comedikation zur Bekämpfung der Chemotherapie –bedingten Nebenwirkungen wie Übelkeit und Ödeme (29).

Die Anwendung von Glucocorticoiden bei soliden Tumoren wird in Frage gestellt, da diese die Effektivität der zytostatischen Therapie verhindern können (30).

Speziell für Dexamethason wird beschrieben, dass es in bestimmten Zelltypen die durch unterschiedliche Stimuli angeregte Apoptose reduziert (31).

Dies gilt sowohl für epitheliale Mamma-Zellen als auch für die Mammatumor-Zelllinie MCF-7, in der Dexamethason den TNF- $\alpha$ -vermittelten Zelltod zu verhindern vermag. In den Epithelzellen wird der antiapoptotische Effekt unabhängig von der Aktivierung des PI3-Akt-Signalweges direkt über die Glucocorticoid-Rezeptoren vermittelt (32,33).

Neben den zelltyp- und konzentrationsabhängigen Effekten von Dexamethason auf die Zelltod-Induktion gibt es zahlreiche Hinweise auf eine proliferationsfördernde Wirkung.

Unsere Arbeitsgruppe ging diesen Hinweisen in einem Screening mit 17 Zelllinien nach und zeigte, dass in 9 Zelllinien sowie im Maus-Modell proliferationsfördernde Wirkung von Dexamethason auftrat. Dexamethason und Prednisolon steigerten das Wachstum in 21 von 65 Glucocorticoid-resistenten Proben von primären Leukämiezellen. Die Dexamethason-induzierte Proliferation wurde über den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt, wobei eine Aktivierung von B/AKT und p38MAPK stattfand (117).

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der proliferationsfördernden Wirkung von Dexamethason auf verschiedene Zelltypen in vitro und in vivo.

Bereits 1984 veröffentlichten Freshney et al. eine Untersuchung zur Wirkung von Dexamethason auf humane Gliom-Zelllinien: Das Glucocorticoid stimulierte die in vitro-Proliferation bei niedriger Zelldichte und förderte die Tumorzell-Differenzierung (37).

Das Ergebnis konnte für weitere Gliom-Zelllinien, neuroepitheliale Zelllinien und eine Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie beschrieben werden (37- 42).

Auch für nicht entartete Epithelzellen und Bindegewebszellen sowie für aus Patientenproben gewonnene Zellen und in Tierversuchen wurde der Proliferationseffekt bestätigt.

Wie Inhibitionsversuche gezeigt haben, scheint der Mechanismus der Proliferation Glucocorticoid-Rezeptor-vermittelt zu sein, z.B. durch die Hochregulation des Rezeptors. In Lungen-Adenokarzinom-Zellen und normalen Zellen des Atemwegs-Epithels beobachteten Al-Wadei et al. eine Aktivierung von PKA sowie eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts und der phospho-Erk1/2 (42).

Zelltyp	Effekt	Mechanismus	Literatur
<i>Epithelzellen</i>			
Human dermal microvascular endothelial cells (HDMC)	konzentrationsabhängige Proliferation nach 4-6 Tagen	Keine ICAM-1-Induktion	U. Hettmannsberger, 1993 (34)
human lens epithelial cells	Proliferation bei 0,1 µM, Apoptose bei höheren Konzentrationen		Petersen A, 2008 (35)
<i>Bindegewebszellen</i>			
BPV-1-transformierte Fibroblasten C127	Proliferation durch hohe Konzentrationen, Morphologie verändert	Dexa-induzierte Transkription bestimmter Onkogene (v-H-ras, v-mos, v-fes)	M K. O'Banion, 1992 (36)
<i>Humane Tumorzelllinien</i>			
Human glioma cell lines	Proliferation bei niedriger Zelldichte, Induktion der Tumorzell-Differenzierung	(Zell-Zell-Interaktion moduliert)	R. I. Freshney, 1984 (37)
Glioblastoma cell line HU 197	150% Proliferation nach 5 Tagen	Spezifischer Rezeptor-vermittelter Effekt	C. Zibera, 1992 (38)
Humane Glioma Zelllinien	Proliferation bei 2 von 8 Zelllinien	hohe Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte, Antagonisierung durch RU38486	C. H. Langeveld, 1992 (39)
Glioma U87MG	Proliferation in 4 Tagen	Inhibition durch	J. Pinski, 1993 (40)

			Antagonist RU 486; Wirkung von Dexamethason über Glucocorticoid-Rezeptoren	
Neuroepitheliale Tumorzelllinien (KNS42, T98G, A172, U251MG)	KNS42, T98G zeigen Proliferation bei niedrigen Konzentrationen	Glucocorticoid-Rezeptor-Expression und Translokation des Rezeptors in Nukleus; dadurch Modulation der Proliferation		A. Kawamura, 1998 (41)
NCI-H322 (PAC: pulmonary adenocarcinoma)	Proliferation von 1 pM bis 100 µM in 48 Stunden	PKA-abhängig (Inhibition durch PKA-Inhibitor H89),		H.A. Al-Wadei, 2005 (42)
HPL1D (SAEC's: small airway epithelial cells)		Erhöhung von intrazell. cAMP, Erhöhung von P-Erk1/2, Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB		
<i>Primäre Zellen (Patientenproben)</i>				
Culture AIDS-KS cells from patients	Proliferation in vitro in max. 6 Tagen	Synergismus mit Oncostatin M (KS-Zytokin); Zytokin-abhängige Proliferation, Hochregulation der Glucocorticoid-Rezeptor-Expression		W.-X. Guo, 1995 (43)
Primäre Zellen von Meningioma-Patienten (gutartiger Tumor der	3/8 der Proben zeigen Proliferation unter Dexamethason			T. H. Jones, 1997 (44)

Gehirnhäute)			
Gewebe von humanem Pankreas-Adenocarcinom		Aktivierung der Ras/JNK und AP-1	Liu et al. , 2017 (121)
<i>In vivo (Tierversuch)</i>			
SC115 (androgen-abhängiger Maustumor),	Stimulation der Tumorproliferation in hohen Dosen (100 µM/Maus),  Proliferation auch in vitro		Y. Omukai, 1987 (45)
HT-29 (Kolon-Karzinom)	Erhöhung der metastasierenden Kolonien in der Leber,  Proliferation im Serum	β-Globin-mRNA-Erhöhung	Y. Yoshida, 2006 (46)

**Tabelle 3      Auftreten von Dexamethason-induzierter Proliferation**

### 3.2 Doxorubicin fördert das Wachstum in verschiedenen Zelltypen.

Wie oben erwähnt ist die zytostatische Wirkung von Dexamethason Zelltyp-abhängig, da es in erster Linie glucocorticoide Wirkungen hat.

Doch gibt es Hinweise auf die proliferative Wirkung anderer Zytostatika?

1989 wurden erstmals Proliferationseffekte von Doxorubicin (syn. Adriamycin) beschrieben: Subtoxische Doxorubicin-Konzentrationen in serum-reduziertem Medium fördern das Wachstum von 2 murinen Zelllinien und 2 humanen Tumorzelllinien (HL-60 und A431). Die Zunahme der Zellzahl beträgt durchschnittlich 33% im Vergleich zum Kontrollwachstum (47).

Der erste mechanistische Erklärungsversuch folgte 1996 von Yang et al. Doxorubicin stimuliert das Wachstum der humanen leukämischen Zelllinie CCRF-CEM in subtoxischen Konzentrationen über die Entstehung von Wasserstoffperoxid-Radikalen (48).

## **4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Häufigkeit und erste Signalmechanismen zu identifizieren, mit denen Zytostatika in Tumorzellen in vitro vermehrte Proliferation auslösen.

Zytostatika werden während der Chemotherapie eingesetzt, um Tumorzellen zu beseitigen, indem sie Zelltod auslösen und Proliferation verhindern. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Studien unserer Gruppe zur neuen Substanz TRAIL, die zeigten, dass TRAIL sowohl Apoptose, als auch Proliferation, in Tumorzellen auslöst. Dies deutete auf eine komplexe Verknüpfung von Apoptose- und Proliferations-Signalwegen hin.

Daraus entstand die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegende Hypothese, dass parallel zu TRAIL auch konventionelle, in der Klinik eingesetzte Zytostatika eine Proliferations-fördernde Wirkung auf Tumorzellen ausüben könnten.

Um diese Hypothese zu erhärten, wurde ausführlich getestet, auf welchen Tumorzelllinien welche Zytostatika in vitro Proliferation auslösen. Zusätzlich wurden umfangreiche Arbeiten mit primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie durchgeführt. Erste Arbeiten zu beteiligten Signalwegen wiesen auf eine mögliche Rolle von Kinasen für die Zytostatika-vermittelte Proliferation hin.

---

## II Material und Methoden

### 1 Reagentien

#### 1.1 Zytostatische Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Asparaginase	Sigma, Deisenhofen
Cisplatin	Alexis, Grünberg
Cytosinarabinosid	Sigma, Deisenhofen
akt. Cyclophosphamid	Uni Düsseldorf
Dacarbazin	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Doxorubicin	Sigma, Deisenhofen
Epirubicin	LKT Laboratories, St. Paul, USA
Etoposid	Calbiochem, Schwalbach
5-Fluorouracil	Sigma, Deisenhofen
IFN-gamma	Biomol, Hamburg
Melphalan	Biomol, Hamburg
Methotrexat	Calbiochem, Schwalbach
Prednisolon	Sigma, Deisenhofen
6-Thioguanin	Sigma, Deisenhofen
Tamoxifen	Calbiochem, Schwalbach
Topotecan	Sigma, Deisenhofen
TRAIL	Biomol, Hamburg
UO126	Calbiochem, Schwalbach
Vincristin	Calbiochem, Schwalbach

## 1.2 Lösungen und Reagentien für die Zellkultivierung

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
CFDA-SE	Molecular Probes, Karlsruhe
DMEM	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Deisenhofen
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Insulin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Selenium	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
$\alpha$ -Thioglycerol	Sigma, Deisenhofen
Transferin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe

## 1.3 Inhibitoren

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Actinomycin D	Calbiochem, Schwalbach
BH3I-2'	Calbiochem, Schwalbach
Cycloheximid	Calbiochem, Schwalbach
Cyclosporin A	Calbiochem, Schwalbach
2-Deoxyglucose	Sigma, Deisenhofen
2,3-DCPE	Biomol, Hamburg
ERK-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach

---

JNK-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach
SN50	Calbiochem, Schwalbach
6-Amino-4-(4-phenoxyphenyl)= ethylamino)quinazolin	Calbiochem, Schwalbach
p38-MAPK-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach
Norleu	Sigma, Deisenhofen
Pentoxifyllin	Calbiochem, Schwalbach
PKC-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach
SP600125	Calbiochem, Schwalbach
Wortmannin	Sigma, Deisenhofen

#### 1.4 Puffer und sonstige Reagentien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dithioerythrit	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Polyacrylamid	Biozym, Hessisch Oldendorf
PMSF	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenamin	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

## 2 Kultivierung eukaryontischer Zellen (Zellkultur)

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 Humane leukämische JURKAT -und CEM-T-Zelllinien

Alle humanen Jurkat T- Zelllinien wurden schwimmend in L-Glutamin-haltigem (2 mM) RPMI 1640- Medium kultiviert, das 2 mM L-Glutamin sowie 10% fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Dieses wurde vor Zugabe zum Medium durch Hitze inaktiviert.

Verwendet wurden JURKAT-T-Zelllinien (Dr. Ehrhardt, München), die wie in (13) beschrieben durch langfristige wiederholte Gabe des Zytostatikums Resistenzen gegen eines der folgenden Zytostatika entwickelt haben: Cyclophosphamid, Cytosinarabinosid, Dexamethason, Methotrexat, 6-Thioguanin und TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand).

Alle humanen CEM-T-Zelllinien wurden ebenso kultiviert und durch die oben beschriebene Methode gegen folgende Zytostatika resistent gemacht: Cyclophosphamid, Cytosinarabinosid, Dexamethason, Doxorubicin, 6-Thioguanin und TRAIL.

Weiterhin kamen JURKAT-Bcl-2-Zellen zum Einsatz, die durch stabile Transfektion eine Überexpression von Bcl-2 zeigten (49). JURKAT w/o Casp-8 waren durch den Verlust von Caspase-8 charakterisiert (50) und JURKAT-FADD-DN durch das dysfunktionale Zytokin FADD (51).

#### 2.1.2 Carcinom-Zelllinien

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der getesteten Carcinom-Zelllinien und beschreibt ihre Herkunft und Kultivierung.

Zelllinie	Art des Carcinoms	Kultivierung
A34	Niere	RPMI 1640
CADO	Ewing-Sarkom	DMEM
CALU-6	Lunge	RPMI 1640
HeLa	Zervix	DMEM

---

HT29	Kolon	RPMI 1640
KELLY	Neuroblastom	RPMI 1640
MCF-7	Brust	RPMI 1640
MCF-7 +/- Caspase-3	Brust	RPMI 1640
MDA-MB	Brust	DMEM
SHEP	Neuroblastom	RPMI 1640
SHEP-Bcl-2	Neuroblastom	RPMI 1640
SHEP-FADD-DN	Neuroblastom	RPMI 1640
SHEP-FLIP	Neuroblastom	RPMI 1640
Sy5y	Neuroblastom	RPMI 1640
U373	Glioblastom	RPMI 1640

**Tabelle 4      Übersicht der verwendeten Carcinom-Zelllinien**

Alle adhärenenten Carcinom-Zelllinien wurden mit 2 mM L-Glutamin und 10% fötalem Kälberserum (hitze-inaktiviert) kultiviert.

Die Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7 ist charakterisiert durch den Verlust von Caspase-3, welches in den ebenfalls getesteten MCF-7 +/- Caspase-3-Zellen rekonstituiert wurde.

Weitere derivative Zelllinien kamen bei der mechanistischen Untersuchung der Zytostatika-induzierten Proliferation zum Einsatz: SHEP-Bcl-2 wurden von Armstrong et al. (49) beschrieben, SHEP-FADD-DN von Fulda et al. und FLIP überexprimierende SHEP-Zellen kamen bei Beltinger et al. zum Einsatz (Daten nicht veröffentlicht).

## **2.2 Primäre leukämische Blasten**

Die untersuchten 74 Proben primärer leukämischer Zellen stammen von Kindern, die im Zeitraum 2003-2006 aufgrund akuter lymphatischer oder myeloischer Leukämie in der Kinder-Universitätsklinik der Ludwig-Maximilian-Universität in München zur Behandlung waren. Die Punktion des Knochenmarks fand vor Beginn der Chemotherapie statt, woraufhin die Zellen mittels Fikoll-Isopaque-Puffer (Amersham, Uppsala, Schweden) isoliert und möglichst direkt (d.h. innerhalb einer Stunde) mit den Substanzen stimuliert wurden.

## **2.3 Aussäen für Proliferationsexperimente**

Die Zelldichte der JURKAT- und CEM-T-Zelllinien in den Kulturflaschen wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt, die Zellen mit Medium auf eine Dichte von  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen/ ml verdünnt und ca. 1-2 Stunden vor der Stimulation in 96- oder 24-well-Platten ausgesät.

Zum Ernten der adhärent wachsenden Carcinom-Zelllinien wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation bei 37°C mit Trypsin (0,025%) und EDTA (10 mM) abgelöst, zentrifugiert (180 x g, 10 Min., Raumtemperatur) und in vorgewärmtem Medium suspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl und gegebenenfalls eine Vitalitätskontrolle erfolgten mittels Eosinfärbung (0,4% Eosin) in einer Neubauer-Zählkammer.

Nach Einstellen der Zellkonzentration auf  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ ml konnten die Zellen am Tag vor Versuchsbeginn in 24-well-Platten eingesät werden. Direkt vor der Stimulation der Zellen wurde das Medium entfernt, mit angewärmtem PBS gespült und frisches Medium eingefüllt.

Primäre Tumorzellen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, angereichert mit 20% FCS, 1mM Natriumpyruvat, 50 µM α-Thioglycerol, 2 mM Glutamin, 6 mg/l Insulin, 3 mg/l Transferin, 4 µg/l Selenium, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Gentamycin.

## **2.4 Zytostatika-Konzentrationen für Proliferationsexperimente**

Um die Stimulationsexperimente mit Zytostatika möglichst dem Verlauf der Zytostatika-Konzentration im Blutplasma des Patienten anzugleichen, wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, der von der maximalen Plasmakonzentration bis zu

Bereichen unterhalb der minimal therapeutisch wirksamen Konzentration liegt (vgl. Einleitung).

Da das „pharmakokinetische Monitoring“, d.h. die Kontrolle des Konzentrationsverlaufs des Zytostatikums im Plasma, nicht routinemäßig bei allen Therapieprotokollen durchgeführt wird, dienen die in Tabelle 5 gezeigten Maximal-Konzentrationen (ppc) als Anhaltspunkte für die Planung der in vitro-Versuche. Aufgrund der individuellen Unterschiede der Patienten und der unterschiedlichen Applikationsarten sind starke Schwankungen der Plasmakonzentrationen zu erwarten (52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68).

Lagen nur Literaturangaben zu speziellen Dosierungen vor (z.B. Hochdosis-Therapien) oder hatte das Zytostatikum in der ermittelten maximalen Plasma-Konzentration eine Zelltod-induzierende Wirkung auf die entsprechende Zelllinie, wurde die Konzentration in Zehnerpotenz-Schritten reduziert, bis keine apoptotische Wirkung mehr auftrat.

<b>Zytostatikum</b>	<b>Konzentration</b>	<b>ppc</b>	<b>Literatur</b>
Ara-C (Cytosinarabinosid)	0,2 µM - 1 µM	200 µM	Estlin EJ et al., 2001 (52)
Asparaginase	0,1 U/ml	1,4 U/ml	Graham ML et al., 1998 (53)
Cisplatin	33 µM	10 µM	Dominici C et al., 1989 (54)
Cyclophosphamid	0,1-10 µM	11 mM	Anderson LW et al., 1996 (55)
Dacarbazin	2,7 - 27 µM	800 µM	Adkins DR et al., 1993 (56)
Dexamethason	10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-3</sup> M	1 µM	Charles B et al., 1993 (57)
Doxorubicin	0,1-0,001 µM	2,8 µM	Estlin EJ, 2000 (58)
Epirubicin	0,17 nM	7 µM	Danesi R et al., 2002 (59)
Etoposid	1 - 500 µM	50 µM	Estlin EJ et al., 2001 (52)
5-Fluorouracil	10-100 µM	5 µM	Urien S et al., 2003 (60)
IFN gamma	1 U/ml - 1000 U/ml	10 U/ml	Turner PK et al., 2004 (61)
Melphalan	1 µM	6 µM	Boros L et al., 1990 (62)
Methotrexat	0,01 µM	1,7 mM	Glantz MJ et al., 1998 (63)

Prednisolon	$10^{-4}$ - $10^{-6}$ M	3 $\mu$ M	Petersen KB et a., 2003 (64)
6-Thioguanin	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	Lowe EC et al., 2001 (65)
Tamoxifen	0,1 $\mu$ M	3,5 $\mu$ M	El-Yazigi A et al., 1997 (66)
Topotecan	10 nM	7 nM	Frangoul H et al., 1999 (67)
Vincristin	1 nM	2,4 $\mu$ M	Embree L et al., 1998 (68)
UO126	1-10 $\mu$ M		

**Tabelle 5 Maximale Plasmakonzentrationen von Zytostatika (ppc= peak plasma concentration)**

## 2.5 Einfrieren und Auftauen

Um eine ausreichende Anzahl an Zellproben der verschiedenen Zelllinien vorrätig zu haben, wurden die Zellen für langzeitige Verwahrung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach Abzentrifugieren (180 x g, 10 Min., Raumtemperatur) der abgelösten Zellen, Resuspendieren und Bestimmen der Zellzahl wurde auf eine Zellkonzentration von 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ ml eingestellt. Nach wiederholtem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellen in DMSO und das Abfüllen jeweils einen Milliliters in Kryovials.

Um Zellbruch zu verhindern, durften die Vials erst für 24 Stunden bei -20°C und dann für 5 Tage bei -80°C gelagert werden, bevor sie für die langfristige Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium suspendiert und sofort anschließend zentrifugiert (s. oben), um das DMSO so schnell wie möglich zu entfernen. Nach der Zugabe von frischem Medium wuchsen die Zellen für mindestens eine Woche an, bevor ein Experiment durchgeführt werden konnte.

## 3 Methoden zur Apoptosemessung

### 3.1 FSC-SSC-Analyse (Survival-Test)

Die hier erläuterte Zellviabilitätsmessung beruht auf der morphologischen Charakterisierung der Zelle mittels Durchflusszytometrie.

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird, wobei die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität korreliert.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird.

Die Analyse des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (= FSC-SSC-Analyse) ermöglicht die Abtrennung intakter Zellen von apoptotischen oder nekrotischen Zellfraktionen aufgrund Größe und Granulierung: Typisch für die Apoptose, einer Form des programmierten Zelltods, ist ein Schrumpfen der Zelle, das Abschnüren sogenannter apoptotischer Körper und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke. Dagegen kommt es bei der Nekrose zum Anschwellen der Zelle, wobei deren Plasmamembran schließlich zerstört wird.

Es ist zu beachten, dass die oben beschriebene Methode nur für die Analyse der Jurkat- und Cem-T-Zellen sowie der primären leukämischen Blasten Verwendung fand, da diese Art von Zellen eine sehr glatte Oberfläche aufweist, die das Licht nur geringfügig streut. Hierdurch kann der Unterschied zu den stark granulierten abgestorbenen Zellen besonders deutlich dargestellt werden.

Die durch das Stimulans verursachte **spezifische Apoptose** wurde wie folgt berechnet:  
(absolute Apoptose der stimulierten Zellen – absolute Apoptose der unstimulierten Zellen) / (100 - absolute Apoptose der unstimulierten Zellen) x 100

Ausgehend von der spezifischen Apoptose kann errechnet werden, wie das Stimulans das **Überleben** der Zellen durch eine Reduktion der Apoptoserate fördert („specific survival“):

$$1 - (\text{spezifische Apoptose} / 100)$$

Das „**fractional product**“ (FP) beschreibt den Synergismus bzw. Antagonismus der Apoptoserate bei Co-Stimulationen mit zwei Substanzen:

(specific survival der 1. Substanz x specific survival der 2. Substanz) – specific survival der 1. und 2. Substanz zusammen

Positive Werte bedeuten synergistische Effekte der Substanzen bei der Apoptoseinduktion.

### 3.2 Nicoletti-Assay

Die durch Endonukleasen verursachte charakteristische DNA-Fragmentierung kann zur einfachen und schnellen Quantifizierung der Apoptose herangezogen werden.

Laut Nicoletti et al. (69) erfolgt die Permeabilisierung der Zelle mittels eines hypotonischen Puffers, der Propidiumiodid zum Anfärben der DNA enthält. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt im Durchflusszytometer.

Das Histogramm unbehandelter Kontrollzellen nach Anfärben mit Propidiumiodid zeigt eine Proportionalität zwischen der Intensität der Fluoreszenz und dem DNA-Gehalt. Es resultiert ein Peak in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase (2n DNA) und ansteigende Fluoreszenzwerte in der G<sub>2</sub>/M-Phase aufgrund des verdoppelten DNA-Gehalts (4n DNA). Die hypodiploide (< 2n DNA) Region links des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Peaks wird den apoptotischen Zellen zugeordnet und als sub-G<sub>1</sub>-Fraktion bezeichnet.

Nach Stimulation der schwimmenden oder adhärennten Zellen wurden die Zellen gegebenenfalls durch Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert (600 x g, 10 min) und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Nach anschließendem Versetzen mit 500 µl Nicoletti-Puffer (s. unten) über Nacht bei 4°C erfolgte die Zugabe von 50 µg/ml Propidiumiodid und direkt im Anschluss die Messung im Durchflusszytometer.

#### **Nicoletti –Puffer:**

Natriumcitrat	0,1 % (m/V)
Triton X-100	0,1 % (m/V)
PBS	ad 1000 ml

### **3.3 Annexin V-Färbung**

Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert und kann Annexin V binden. Durch Markierung von Zellen mit FITC-Annexin V kann frühe Apoptose in lebenden, nicht fixierten Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Durch die Kombination einer FITC-AnnexinV- Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung gelingt die Abgrenzung nekrotischer Zellen, da Propidiumiodid (PI) nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische und spät-apoptotische Zellen, eindringt. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische und spät-apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv.

Nach dem Pelletieren von  $10^6$  Zellen wurden 50  $\mu$ l Puffer (Tutofusin®, Baxter, Unterschleißheim) und 1  $\mu$ l FITC-Annexin V (Becton Dickinson, Heidelberg) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils mindestens 500  $\mu$ l Puffer und nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer die Messung im Fluoreszenz-1-Kanal des FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg).

## **4 Methoden zur Proliferationsmessung**

### **4.1 Lichtmikroskopische Methoden**

#### **4.1.1 Zellzahlbestimmung in der Zählkammer**

Für Suspensionszellen, u.a. auch für die primären leukämischen Blasten, eignet sich die manuelle Bestimmung der Zellkonzentration in der Neubauer-Zählkammer. Zu beachten ist hierbei die gleichmäßige Resuspendierung der Zellen vor Einbringen in die Zählkammer. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit Durchlicht.

Da ein Eckquadrat der Zählkammer einem Volumen von 0,1  $\mu$ l entspricht, wurde der Mittelwert der Eckquadrate mit 10 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro Mikroliter zu erhalten.

Die Proliferation wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellkonz. nach Stimulation zum Zeitpunkt } t_1 - \text{Zellkonz. am Start des Versuchs } t_0}{\text{Zellkonz. der Kontrolle zum Zeitpunkt } t_1 - \text{Zellkonz. am Start des Versuchs } t_0} * 100$$

#### 4.1.2 Manuelle Zählung neu gebildeter Kolonien

Da die Kolonienbildung bei Suspensionszellen sehr unterschiedlich in Form und Größe abläuft, wurde für die Quantifizierung die manuelle Bestimmung unter dem Lichtmikroskop gewählt. Zu beachten ist hierbei, dass die Zellkulturplatten möglichst wenig bewegt und auf keinen Fall geschüttelt werden dürfen, um die Abtrennung von Zellagglomeraten bzw. die Vereinzelung der Zellen zu vermeiden.

Zur statistischen Absicherung fand die Zählung doppelt und von zwei verschiedenen Personen statt. Die Proliferation wurde nach folgender Formel berechnet:

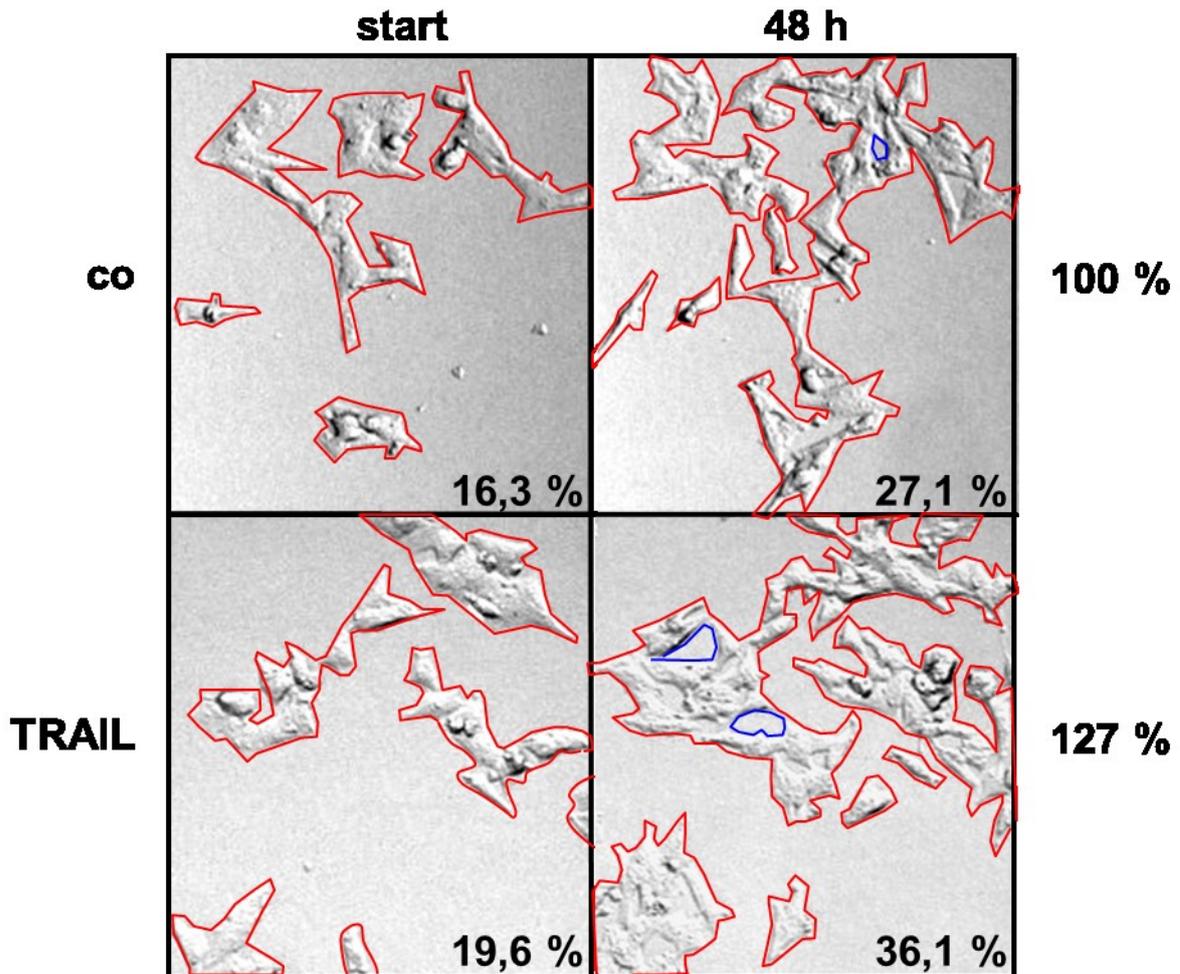
$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien nach Stimulation}}{\text{Anzahl der Kolonien in der Kontrolle}} * 100$$

#### 4.1.3 Cellscreen

Der Cellscreen (Roche Innovatis, Mannheim, Deutschland) stellt ein System zur automatisierten Analyse von Zellwachstums-Vorgängen dar, indem lichtmikroskopische Digital-Aufnahmen der gleichen Zellen zu verschiedenen Versuchszeitpunkten gespeichert und mittels Software analysiert wurden.

Beim hierbei verwendeten PA-Modul erfolgte die genaue Markierung der volumenmäßigen Zunahme der Zellfläche von adhärennten Carcinom-Zellen (z.B. MCF-7). Die quantitative Angabe der Zellproliferation wurde als Wachstumskurve und prozentuale Veränderung der Zellfläche angegeben. Mit Hilfe von Standardkurven für die entsprechenden Zelllinien konnte die Zellkonzentration ermittelt werden.

Abbildung 7 zeigt die im PA-Modul vorgenommene Erkennung und Markierung der Zellausbreitung in einem bestimmten Ausschnitt eines Wells. Aufgrund des hohen Datenaufkommens wurde nicht die gesamte Fläche eines Wells fotografiert, so dass die Bildausschnitte etwa 50 % der Well-Fläche abdecken. Beim Einsatz von 96-well-Platten wurden 6 Bildausschnitte pro Well ausgewählt, bei 24-well-Platten mindestens 15, um auch bei inhomogenem Wachstum eine repräsentative Darstellung der Proliferation zu erhalten.



**Abbildung 7** Prozessierung adhärenter Zellen im Cellscreen-PA-Modul (Bildquelle: Innovatis AG, Bielefeld)

Adhärenente Zellen wurden nach ihrer Anheftung zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Die Einstellung der Bildausschnitte pro Well erfolgte durch den Anwender, die Markierung der Zellflächen mittels Software. Die beiden oberen Bilder sind von unstimulierten, die beiden unteren Bilder von TRAIL-stimulierten KELLY-Zellen aufgenommen worden.

Ausgehend von den gewählten Bildausschnitten lieferte das Cellscreen-PA-Modul eine quantitative Aussage über den Prozentsatz der mit Zellen bedeckten Well-Fläche als „% of well area“. Zur Umrechnung in die Zelldichte wurden Eichkurven der entsprechenden Zelllinien ermittelt, wobei für MCF-7 der Faktor 1,3 betrug.

Die Cellscreen-Analyse adhärenter Zellen stellt somit eine nichtinvasive Methode zur Proliferationsmessung dar. Vorversuche haben jedoch ergeben, dass bestimmte Kriterien erfüllt sein müssen, um ein reproduzierbares Proliferationsverhalten bzw. verlässliche Messdaten zu erhalten: Eine Zellbedeckung von unter 10% sowie über

30% der Wellfläche führt zur Einschränkung des Spontanwachstums. Ebenfalls wichtig für die Präzision der Zellerkennung ist das über dem Zellteppich stehende Volumen an Medium, d.h. bei 96-well-Platten 200 µl, bei 24-well Platten 1000 µl.

Die Methode wurde weiter validiert, indem Versuchsreihen mit verschiedenen Zellkonzentrationen ausgesät und nach Anheften der Zellen im Cellscreen gemessen wurden. So konnte die Präzision der Messung ermittelt bzw. optimiert werden.

Proliferation bedeutet in dieser Arbeit das durch das Stimulans verursachte zusätzliche Wachstum im Vergleich zum Spontanwachstum unstimulierter Zellen. Die Berechnung der Proliferationswerte erfolgte nach folgender Formel:

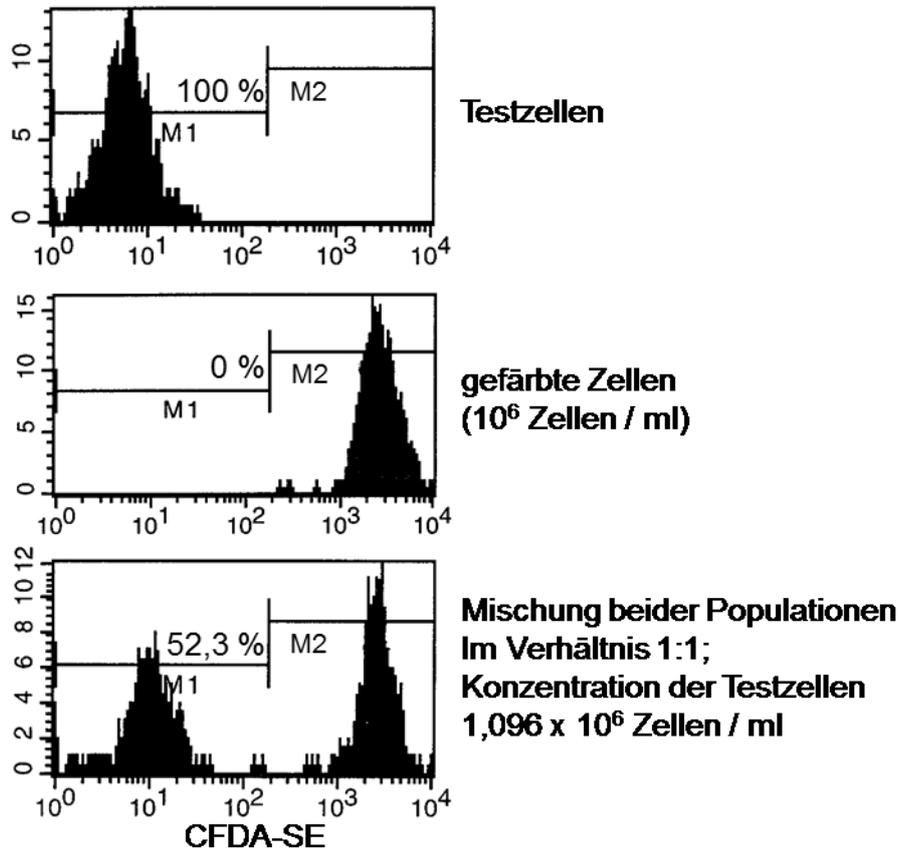
$$\frac{\text{Zelldichte nach Stimualtion zum Zeitpunkt } t_1 - \text{Zelldichte am Start des Versuchs } t_0}{\text{Zelldichte der Kontrolle zum Zeitpunkt } t_1 - \text{Zelldichte am Start des Versuchs } t_0} * 100$$

#### 4.2 Mischtest

Der Mischtest (Concetest) stellt eine sensitive Methode zur Bestimmung der Zellzahl mittels internem Standard im Durchflußzytometer dar, die von mir zur Messung von Proliferationsversuchen etabliert wurde.

Die Zellen wurden nach dem Stimulationsexperiment aus der 96-well-Platte geerntet (Suspensionszellen) bzw. durch Trypsin (Life Technologies) in der 24-well-Platte abgelöst. Während ständiger Suspendierung der Zellen auf einer Schüttelplatte erfolgte die genaue Einstellung von „Kalibratorzellen“, d.h. Kontrollzellen der gleichen Zelllinie, auf exakt  $10^6$  Zellen/ml bei Suspensionszellen bzw.  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml bei adhärenenten Zellen. Diese wurden mit 0,25 µmol/L CFDA-SE gefärbt und im Volumenverhältnis 1:1 sowie 1:2 gemischt (jeweils Doppelwerte). Die Ermittlung des Prozentsatzes der ungefärbten lebenden Zellen erfolgte mittels FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) im Fluoreszenz-1-Kanal (s. Abbildung 8). Aus den Prozentzahlen konnte die Zellkonzentration abgeleitet werden:

$$\frac{\text{Prozentsatz der ungefärbten Zellen}}{100 - \text{Prozentsatz der ungefärbten Zellen}} * \text{Prozentsatz der gefärbten Zellen}$$



**Abbildung 8** Histogramme bei Durchführung des Mischtests im Durchflusszytometer

Histogramm oben: stimulierte Zellen, Histogramm Mitte: gefärbte Zellen mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml. Zur Abgrenzung der beiden Populationen wurde die Mitte zwischen beiden Peakflächen markiert. Das Histogramm unten zeigt die Mischung beider Populationen im Verhältnis 1:1; die Konzentration der stimulierten Zellen betrug  $1,096 \times 10^6$  Zellen/ml.

### 4.3 ATP-Test

Zur Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes fand der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) Anwendung. Der Test basiert auf der Umsetzung von Luziferin in Oxyluziferin in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff. Bei dieser Luziferase-katalysierten Reaktion kommt es zu Emission von Licht nach folgender Gleichung:



Rekombinante Firefly-Luziferase

Nach Stimulation der Zellen in 96-Well-Platten wurde pro Well 100  $\mu$ l des Substrates (nach Auflösen in 10 ml PBS, Aliquotierung in 1 ml- Vials und Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) zugesetzt, das außer dem Lysis-Puffer zur Permeabilisierung der Zellen noch lyophilisiertes Luziferase-Enzym enthält.

Die Messung der Fluoreszenz am ELISA-Lesegerät erfolgte innerhalb von 2 Stunden. War dies nicht möglich, konnten die mit dem Substrat versetzten Platten laut Hersteller für 3 Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

Die Durchführung vieler Parallelmessungen hatte zum Ziel, die hohe Messwert-Varianz innerhalb einer Versuchsreihe sowie zwischen mehreren Versuchen auszugleichen.

#### **4.4 WST-1-Test**

Beim WST-1-Cell Proliferation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim und Penzberg, Deutschland) wird das Tetrazolium-Salz WST-1 durch das zur Atmungskette des Mitochondriums gehörende Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System gespalten. Das Spaltprodukt, eine Formazan-Verbindung, entsteht nur in metabolisch aktiven Zellen und hat ein Absorptionsmaximum bei 420-480 nm.

Abhängig von der Zelllinie wurde 1-24h vor der Messung das Reagenz zugegeben (1/10 des Medium-Volumens im Well). Zur Anwendung kamen hierbei fast ausschließlich 96-Well-Platten, die 100  $\mu$ l Zytostatika-haltiges Medium enthielten.

Die Absorptionsmessung wurde bei 450 nm im ELISA-Lesegerät vorgenommen.

#### **4.5 Zellzyklus-Analyse mittels BrdU-Einbau**

Bromodeoxyuridin (BrdU) ist ein Analogon von Thymidin, das in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und somit einen Marker für die Menge an replizierter DNA darstellt. Um diesen Vorgang zu messen, müssen eine Entwindung der DNA-Helix (durch Einwirkung von Säure, Base oder Enzymen) und die Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU stattfinden. In Kombination mit einer Anfärbung der Gesamt-DNA mittels 7-Amino-Aktinomycin (7-AAD) gelang die durchflusszytometrische Einteilung der Zellen in die jeweilige Zellzyklus-Phase ( $G_1/G_0$ -,  $G_2/M$ - oder S-Phase).

Zur Anwendung kam das FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, San Diego, USA), das Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) als Fluorochrom zur Markierung des anti-BrdU-

Antikörpers verwendet. Zur Herstellung einer 1mM-BrdU-Lösung für die in vitro-Markierung wurden 31 µl des BrdU-Konzentrates (10 mg/ml, Lagerung bei -80°C) mit 1 ml DPBS-Puffer verdünnt.

### **DPBS-Puffer (pH 7,2-7,4)**

KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	8,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,16 g
Wasser	ad 1000,0 g

In 6-Well-Platten wurden 3-5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 5 ml Medium ausgesäht und nach der Stimulation für 2 Stunden mit 50 µl BrdU-Lösung (1 mM) versetzt. Nach der Ablösung der Zellen mit Trypsin und anschließender Pelletierung erfolgten zwei Waschschrte mit PBS, bevor pro Pellet 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer zugegeben wurden. Dieser diente der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und musste 20 Minuten bei Raumtemperatur einwirken.

Nach einmaligem Waschen mit saponinhaltigem Puffer(1:10 mit Wasser verdünnt) wurde zur Verstärkung des Permeabilisierungs-Effektes 100 µl Cytoperm-Plus-Puffer zugegeben und für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen.

Erneutes Waschen, nochmals Zugabe von 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur und einmal Waschen schlossen die Permeabilisierung der Zellmembran ab.

Pro Probe wurden 20 µl DNase-Lösung (1 mg/ml) mit 46 µl DPBS verdünnt und diese 66 µl DNase-Lösung (300 µg/ml) für 1 Stunde bei 37°C einwirken gelassen. Für eine gleichmäßige und vollständige Entwindung der DNA war bei diesem Schritt das regelmäßige Durchmischen der Probe zu beachten

Nach Auswaschen der DNase-Lösung wurden 50 µl Waschpuffer und 0,8 µl des FITC-konjugierten anti-BrdU-Antikörpers zugesetzt und für 20 Minuten (Raumtemperatur) inkubiert. Es schloss sich das erneute Waschen des Pellets und die abschließende Färbung mit 15 µl 7-AAD in 500 µl DPBS (plus 3% BSA) an, bevor direkt im

Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Pharmingen, San Diego, USA) gemessen oder die Probe über Nacht bei 4°C gelagert wurde.

Fluoreszenzsignale des Gesamt-DNA-Markers 7-AAD wurden im linearen Modus, die von FITC ausgehenden Signale im logarithmischen Modus aufgenommen. Zur genauen Einstellung des Histogramms sowie Kompensationen muss auf das Benutzer-Manual hingewiesen werden.

## 5 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht die Übertragung (engl. Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran und den anschließenden Nachweis dieser Proteine über unterschiedliche Reaktionen. Die zu analysierenden Proteine stammen aus den lysierten Zellen des Stimulationsversuches. Nach der Auftrennung entsprechend ihrer Größe im Elektrophorese-Gel findet die Übertragung auf die Membran und die Visualisierung mittels Immunodetektion, d.h. Bindung von Antikörpern, statt.

### 5.1 Zell-Lysierung

Adhärente Zellen wurden in 6-Well-Platten (pro Well 2 ml einer Zelllösung der Konzentration  $0,05 \times 10^6$ /ml) mit dem Stimulans inkubiert (Doppelwerte), einmal mit 2 ml PBS (s. unten) gewaschen und mit 100 µl SDS-Sample-Puffer (s. unten) lysiert. Die Proben wurden direkt anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt und die Zellen anschließend durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer Eppendorf-Pipette von der Kulturplatte abgelöst und somit komplett lysiert. Die Denaturierung der Enzyme erfolgte durch 5-minütiges Aufkochen bei 95°C. Die entsprechend präparierten Proben konnten bei -80°C langfristig gelagert werden.

#### 10 x PBS-Puffer

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

**1 x SDS Sample Puffer**

Tris-HCl ( pH 6,8 bei 25°C)	62,5 mM
SDS (Natriumdodecylsulfat)	2% (m/V)
Glycerol	10% (m/V)
DTT (Dithiothreitol)	50 mM
Bromphenolblau oder Phenolrot	0,01% (m/V)

**5.2 Auftrennung im SDS-PAGE-Gel**

SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, einer analytischen Methode der Biochemie zur Trennung von Stoffgemischen im elektrischen Feld. SDS als anionisches Tensid überdeckt die Eigenladungen der Proteine, so dass diese eine konstante Ladungsverteilung aufweisen.

Es wurde die diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE-Methode nach Laemmli (70) angewendet. Die Zugabe von SDS im Überschuss führt zur Aufbrechung von Wasserstoffbrücken, was zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine führt. Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid (PAA) geladen, das in geeignete Elektrolyten eingelegt ist. Infolge der angelegten elektrischen Spannung fand eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel statt, wobei das Gel eine Art Siebwirkung ausübte. Kleine Proteine wanderten relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten wurden und dadurch langsamer durch das Gel wanderten. Am Ende des Vorganges waren alle Proteine nach Größe sortiert und konnten durch weitere Verfahren (Färbungen oder immunologische Nachweise) sichtbar gemacht werden. Die zusätzliche Ladung eines Größenmarkers, der aus einer Mischung von Proteinen bekannter Größe besteht, ermöglichte die Abschätzung der Größe der Proteine in den analysierten Proben.

Bei der diskontinuierlichen Methode gibt es ein Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine und ein Trenngel zur eigentlichen Auftrennung. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt.

### **Sammelgel**

PAA-Lösung 30%	1,7 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1 ml
SDS 10%	100 µl
H <sub>2</sub> O	7,0 ml
TEMED	20 µl
APS (10%)	100 µl

### **Trenngel**

PAA-Lösung 30%	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,75 ml
SDS 10%	150 µl
H <sub>2</sub> O	6,1 ml
TEMED	15 µl
APS (10%)	75 µl

### **Elektrophorese-Laufpuffer**

Tris-Base	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Die Elektrophorese fand in einer an ein Spannungsgerät (Power Supply, Bio-Rad, München) angeschlossenen Elektrophoresekammer statt. Nach der Konzentrierung der

Proteine bei 40 V (bis zum Einlaufen ins Sammelgel) wurde die Spannung für die Auftrennung auf 150 V erhöht.

### 5.3 Übertragung auf Membran und Entwicklung

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Millipore, Schwalbach) transferriert und mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden geschah durch Chemilumineszenz-Verfahren; Chemilumineszenz ist die durch chemische Reaktionen bewirkte Aussendung von Licht ohne wesentliche Temperaturerhöhung.

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgte in einer horizontalen Blot-Kammer (Bio-Rad, München). Die Nitrozellulose wurde zuvor in Blotpuffer (s. unten) getränkt und in folgender Reihenfolge mit dem Gel verpackt:

Kathode

Filterpapier (Whatman, angefeuchtet mit Blotpuffer)

Gel

Nitrozellulose-Membran

Filterpapier (Whatman, angefeuchtet mit Blotpuffer)

Anode

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 150-200 mA während 90 Minuten.

<b>5 x Blotpuffer</b>			<b>1 x Blotpuffer</b>		
Tris-Base	15,2 g		5 x Blotpuffer		200 ml
Glycin	72,9 g		Methanol		200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		H <sub>2</sub> O		ad 1000 ml

Durch das Blocken der Membran mit 5% Milchpulver-haltigem TBS-T-Puffer (s. unten) wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei leichtem horizontalem Schwenken bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T wurde mit der ersten Antikörperlösung

in der entsprechenden Konzentration (s. Tab.) inkubiert, und zwar entweder für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Nach 3 mindestens zehnminütigen Waschschritten wurde der zweite Antikörper zugegeben (s. Tab.) und für entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C einwirken gelassen. Es schloss sich das wiederholte Waschen nach der obigen Vorgehensweise an. Zur endgültigen Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran nun mit dem ECL-SuperSignal West Femto (Perbio Science, Bonn) behandelt, bis die Banden auf dem Röntgenfilm (GE Healthcare, München) gut sichtbar waren (10 Sekunden bis 5 Minuten). Die Entwicklung des Films erfolgte mittels einer AGFA CP1000- Entwicklungsmaschine (AGFA, Köln).

### TBS-T-Puffer

Tris Base	3 g
NaCl	11,1 g
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α-Tubulin	1:3000	Cell signaling, Frankfurt
Akt	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
Akt, phosphoryliert	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
Bcl-2		
Caspase-8 mAb		M Peter
Erk	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
Erk, phosphoryliert	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
FADD		
FADD-DN		
Flip long		Pharmingen, San Diego
Kinasen, phosphoryliert	1:1000	PAN, Aidenbach
MEK	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
MEK, phosphoryliert	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
p38-MAPK	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
p38-MAPK, phosphoryliert	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
SAPK/JNK	1:1000	Cell signaling, Frankfurt
SAPK/JNK, phosphoryliert	1:1000	Cell signaling, Frankfurt

---

sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
goat anti rabbit : HRP	1:5000	Pierce/ Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

---

**Tabelle 6** Primäre und sekundäre Antikörper

## 6 Statistik

Wenn in der Versuchsbeschreibung nicht anders angegeben, wurden Experimente mindestens dreimal ausgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Mittlerer Standardfehler, engl. standard error of the mean) angegeben. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde die SigmaStat Statistical Software (Version 1.0) verwendet und der paired t-test oder one-way repeated measure ANOVA durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen und in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet.

## **III Ergebnisse**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Zytostatika auf Tumorzellen verschiedener Herkunft Zellproliferation verursachen. Zytostatika konnten das Wachstum sowohl von Tumorzelllinien als auch von primären Tumorzellen fördern. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde für Epirubicin und Dexamethason auf der Mamma-CA-Zelllinie MCF-7 untersucht. Durch Epirubicin erfolgte eine Aktivierung der proliferationsfördernden Kinasen, durch Dexamethason speziell eine Aktivierung der p38-MAPK.

Die Ergebnisse sind mittlerweile publiziert und zitiert. Arbeiten, die ich beigetragen habe, werden nachfolgend beschrieben.

### **1 Zytostatika bewirkten vermehrte Zellproliferation in Tumor-Zelllinien.**

Bisherige Studien von Zytostatika verschiedenener Wirkmechanismen konzentrierten sich auf Untersuchungen zur Apoptose-Induktion oder zur Zytostatika-Resistenz der Tumore. In diesem Kapitel werden Kombinationen von zytostatischen Substanzen und Tumor-Zelllinien gezeigt, in denen eine spezifische Zellproliferation um mindestens 120% im Vergleich zu Kontrollzellen auftrat.

#### **1.1 TRAIL vermittelte Proliferation auf Tumorzellen.**

Arbeiten meiner Gruppe hatten unerwarteter Weise gezeigt, dass das neue Zytostatikum TRAIL nicht nur Apoptose, sondern auch Proliferation in Tumorzellen auslöst (13). Die Wirkung von TRAIL auf verschiedenen Tumorentitäten war dabei genau quantifiziert worden (13, 14). Die funktionellen Daten waren größtenteils von anderen Mitgliedern des Labors erhoben worden, sind ausführlich publiziert und werden hier nur summarisch mit aufgenommen. Meine Aufgabe bestand darin, den Signalweg der TRAIL-vermittelten Proliferation aufzuklären; die Signalwegsdaten sind in Kapitel 6.1 dargestellt.

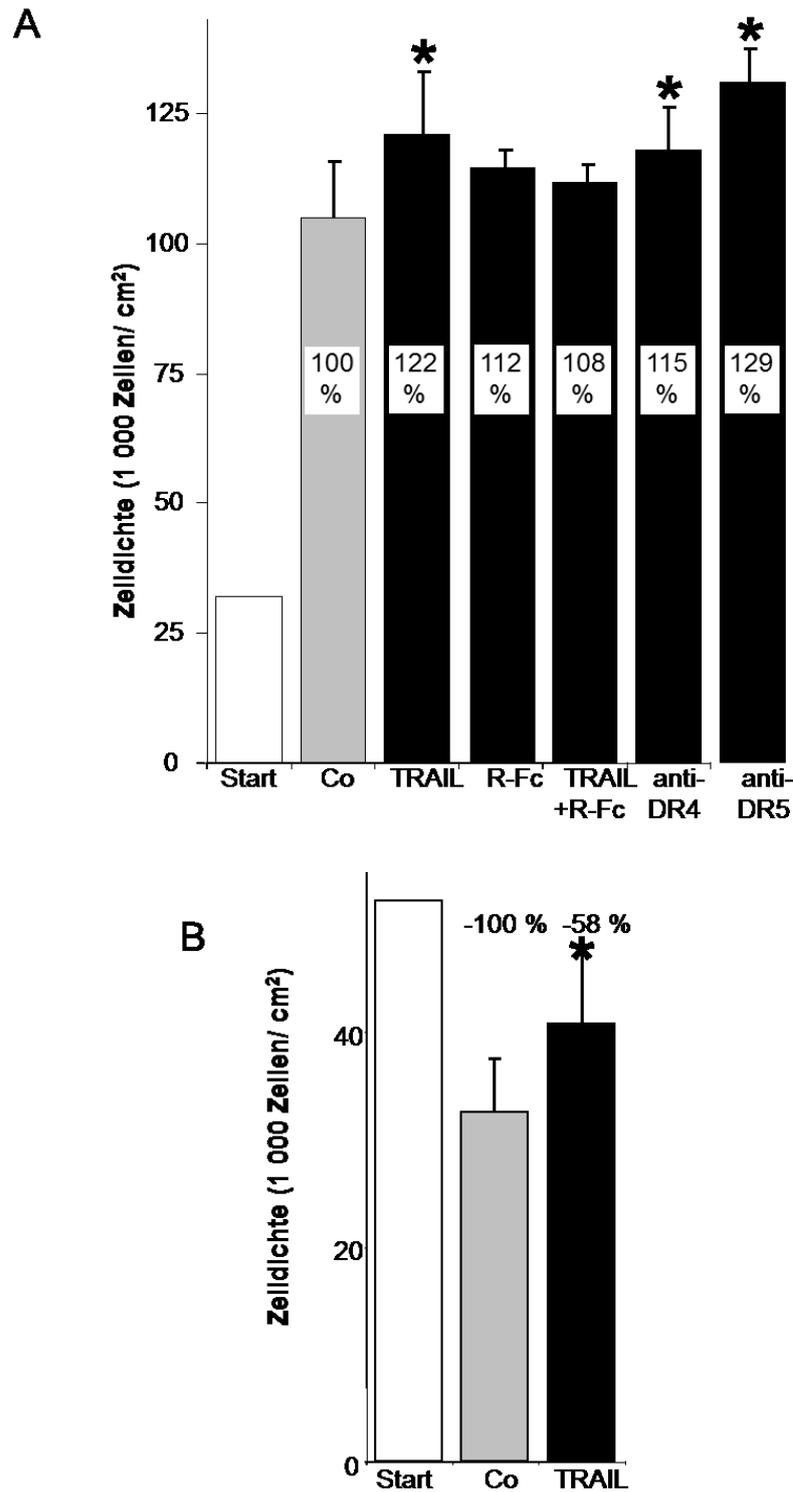
##### **1.1.1 TRAIL vermittelte Proliferation in KELLY-Neuroblastom-Zellen.**

TRAIL vermittelt nicht nur die Apoptose-Induktion in Tumorzellen, sondern kann auch in bestimmten Fällen das Überleben und sogar das Wachstum von Tumorzellen fördern

(13,14). Die Neuroblastom-Zelllinie KELLY zeigte nach Inkubation mit TRAIL eine signifikante Zellproliferation von 122%, die durch die dysfunktionelle Variante TRAIL-R2-Fc nicht hervorgerufen werden konnte. Die Liganden anti-DR4 und anti-DR5, die an zwei TRAIL-Rezeptoren binden, konnten ebenfalls eine signifikante Proliferation von 115 bzw. 129% bewirken. Dies zeigt, dass auch weitere TRAIL-Rezeptor-Agonisten proliferationsfördernde Effekte haben könnten.

Um die Proliferation auch auf Grundlage des Zellmetabolismus zu untersuchen, wurde der ATP-Gehalt von unstimulierten Zellen gegenüber TRAIL-stimulierten Zellen gemessen. Hier fand sich ebenfalls eine Erhöhung um 123% (Daten nicht gezeigt).

Wurden die Zellen in reinem PBS kultiviert, übte TRAIL einen schützenden Effekt aus, da im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle 58% weniger Zellen abgestorben sind.



**Abbildung 9 TRAIL vermittelte Proliferation in KELLY-Neuroblastom-Zellen.**

KELLY-Zellen wurden mit 40 ng/ml TRAIL inkubiert und nach 48 Stunden per Mischtest (Concetest) gemessen. In A wurde 1 µg/ml anti-DR4 und anti-DR5 und 10 µg/ml TRAIL-R2-Fc eingesetzt. In B wurden die Zellen während des Experiments in PBS kultiviert, um die Apoptose der Kontrollzellen zu induzieren.

Es wurde auch bestätigt, dass die Wirkung von TRAIL nicht auf kurze Zeit beschränkt war: TRAIL beschleunigte das Zellwachstum kontinuierlich über mehrere Tage, was zu einer Reduzierung der Verdopplungszeit von 24 auf 19 Stunden bzw. zu einer Verdopplung der Zellzahl innerhalb von 6 Tagen führte (Daten nicht gezeigt).

Neuartige zytostatische Substanzen werden normalerweise in Kombination mit anderen, bereits etablierten Zytostatika eingesetzt. So kann optimalerweise die apoptotische Wirkung der „klassischen“ Substanzen verstärkt und somit eine Dosisreduktion der meist nebenwirkungsreichen Zytostatika erzielt werden.

Zytotoxische Wirkstoffe, die mehr als 10% spezifische Apoptose in Zellen verursachten, konnten die TRAIL-vermittelte Proliferation inhibieren. War jedoch die Zelllinie gegen die apoptotische Wirkung eines Zytostatikums bei seiner Plasma-Peak-Konzentration resistent, konnte TRAIL beispielsweise in Anwesenheit des Zytostatikums Dacarbazin (27  $\mu\text{mol/L}$ ) Proliferation induzieren (Daten nicht gezeigt).

## **1.2 Dexamethason vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.**

Dexamethason (DEXA) führt zur Apoptose-Induktion in leukämischen Tumorzellen und ist ein verbreitetes Co-Medikament zur Eindämmung unerwünschter Wirkungen anderer Chemotherapeutika (29). Die Mammacarcinom-Zelllinie MCF-7 wird durch den Verlust von Caspase-3 als besonders Apoptose-resistent beschrieben und bietet sich daher für Proliferationsversuche an. Es wird gezeigt, wie DEXA die Proliferation von MCF-7-Zellen anregte und welche Auswirkungen auf die mitochondriale Aktivität sowie den Zellzyklus gemessen werden konnten.

### **1.2.1 MCF-7-Zellen waren resistent gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose.**

Tumorzellen der Gruppe P zeigen keine messbare Apoptose-Induktion, d.h. sie sind resistent gegenüber dem jeweiligen Zytostatikum. DEXA erfüllt diese Bedingung auf den MCF-7-Zellen für die Konzentrationen, die in vivo erreicht werden können (Daten nicht gezeigt). Die gewählte maximale Konzentration ( $10^{-4}$  M Dexamethason) lag um den Faktor 10 über den in Drug-monitoring-Studien ermittelten Plasmaspiegel-Werten (57,71).

Durch die Senkung der Zytostatika-Konzentrationen um jeweils eine Zehnerpotenz soll das Absinken der Wirkstoff-Konzentration im Plasma nach Beendigung der Applikation imitiert werden.

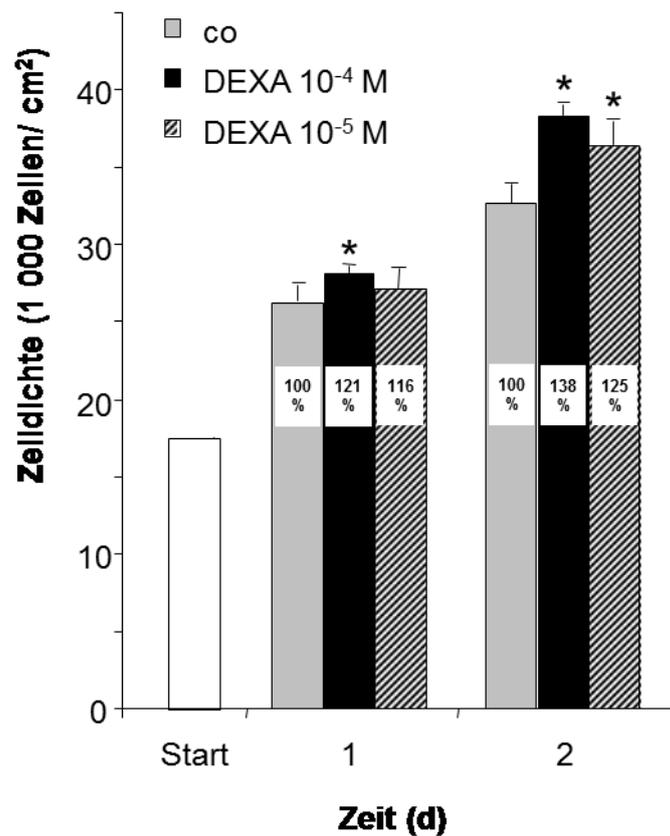
Höhere Konzentrationen konnten aus zellkulturtechnischen Gründen nicht verwendet werden. Hier wäre zur Verbesserung der Löslichkeit von DEXA die Verwendung von DMSO nötig gewesen, was jedoch das Spontanwachstum der Zellen zu stark beeinträchtigte.

Die verwendeten MCF-7-Zellen besaßen annähernd Resistenz gegenüber höchsten DEXA-Konzentrationen: Selbst die Maximal-Konzentration von  $10^{-4}$  M beeinflusste das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle kaum. Die Inkubation mit  $10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  M DEXA führte nach 48 Stunden zu einem Anstieg der Zellzahl auf 110% im Vergleich zur Kontrolle.

Die Vorversuche zeigten die Resistenz der Zellen in für die Therapie relevanten Dosierungen. Dies war zu erwarten, denn DEXA wird nicht als Zytostatikum bei der Chemotherapie des Mamma-Carcinoms eingesetzt, sondern nur als Co-Medikation in geringer Dosierung. Gerade hier ist jedoch die Untersuchung der Wirkung niedriger DEXA-Konzentrationen wichtig, wie sie in den folgenden Versuchen verwendet werden.

#### **1.2.2 Dexamethason bewirkte einen Anstieg der Zellzahl innerhalb von 48 Stunden.**

Nachdem die Resistenz der MCF-7-Zellen gegenüber DEXA-induzierter Apoptose abgeklärt wurde, konnten die Versuchszahl erhöht und die Messmethoden erweitert werden.



**Abbildung 10 Dexamethason vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.**

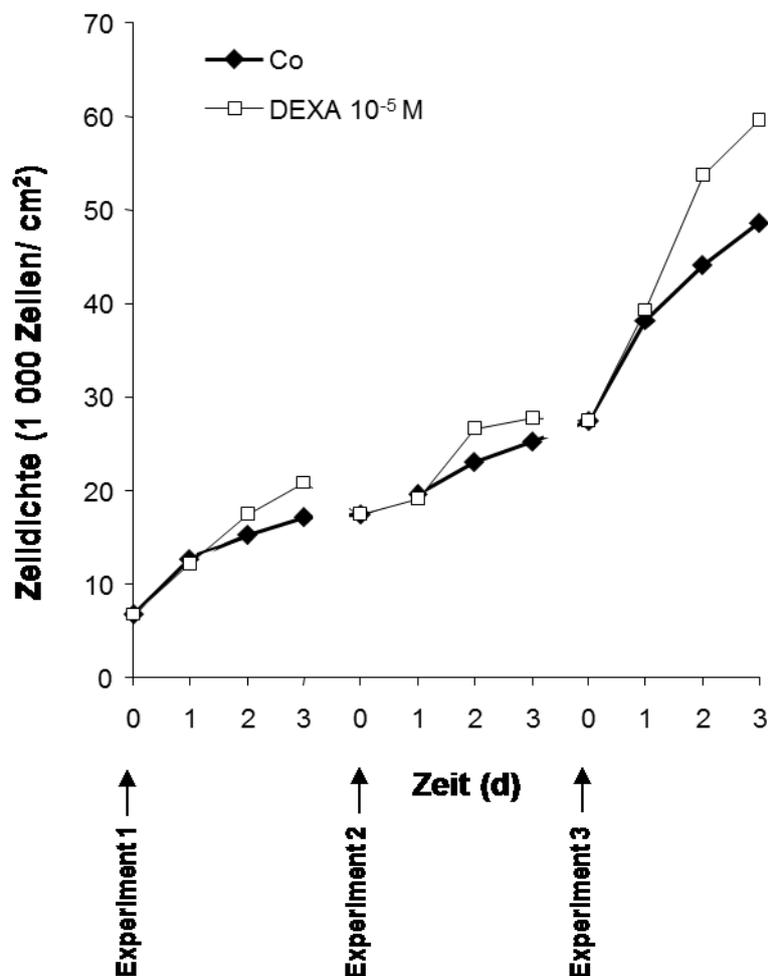
MCF-7-Zellen wurden mit  $10^{-4}$  M DEXA (n=19) und  $10^{-5}$  M DEXA (n=11) ohne FCS inkubiert. Die Zelldichte wurde nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen ermittelt (s. „Material und Methoden“). Die Prozentzahl der Proliferation wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben berechnet und beschreibt den **kumulativen Anstieg der Zelldichte** im Vergleich zur Kontrolle beim Start des Experiments.

$10^{-4}$  M DEXA im Medium bewirkten bereits nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg der Zellzahl um 121%. Der Effekt stieg weiter nach 48 Stunden: Die statistisch signifikante Proliferation erhöhte sich bei  $10^{-4}$  M DEXA auf 138% und bei  $10^{-5}$  M DEXA auf 125%. Dies entsprach einer Verkürzung der Zell-Verdopplungszeit von 52 Stunden bei den unbehandelten Zellen auf 44 bzw. 46 Stunden bei den DEXA-behandelten Zellen.

Der Kurzzeit-Versuch verdeutlichte, dass Therapie-relevante Konzentrationen von DEXA zu einer statistisch signifikanten Proliferationsförderung von MCF-7-Zellen führten.

### **1.2.3 Die Dexamethason-vermittelte Proliferation war ein konstanter Effekt über mehrere Zelldichten.**

DEXA führte nach 24 und 48 Stunden statistisch signifikant zu einem Anstieg der Zellzahl. Als nächster Aspekt wurde untersucht, ob es sich um einen konstanten Effekt handelte oder ob sich die MCF-7-Zellen nach kurzer Zeit biochemisch bzw. genetisch so veränderten, dass die Proliferation unterdrückt werden konnte. Um die Konstanz des Proliferationseffektes zu beweisen, sind in Abbildung 11 drei direkt aufeinanderfolgende Experimente mit DEXA dargestellt.



**Abbildung 11 Dexamethason vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen in aufeinanderfolgenden Experimenten.**

MCF-7-Zellen wurden mit  $10^{-5}$  M DEXA in FCS-freiem Medium stimuliert und die Zelldichte nach 0, 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Diese Zellen wurden einen Tag später nochmals mit DEXA stimuliert und die gleichen Messungen vorgenommen. Die Ausgangs-Zelldichte des 2. Experiments entsprach hierbei der Zelldichte zum Ende des 1. Experiments. Eine repräsentative Versuchsreihe wird dargestellt.

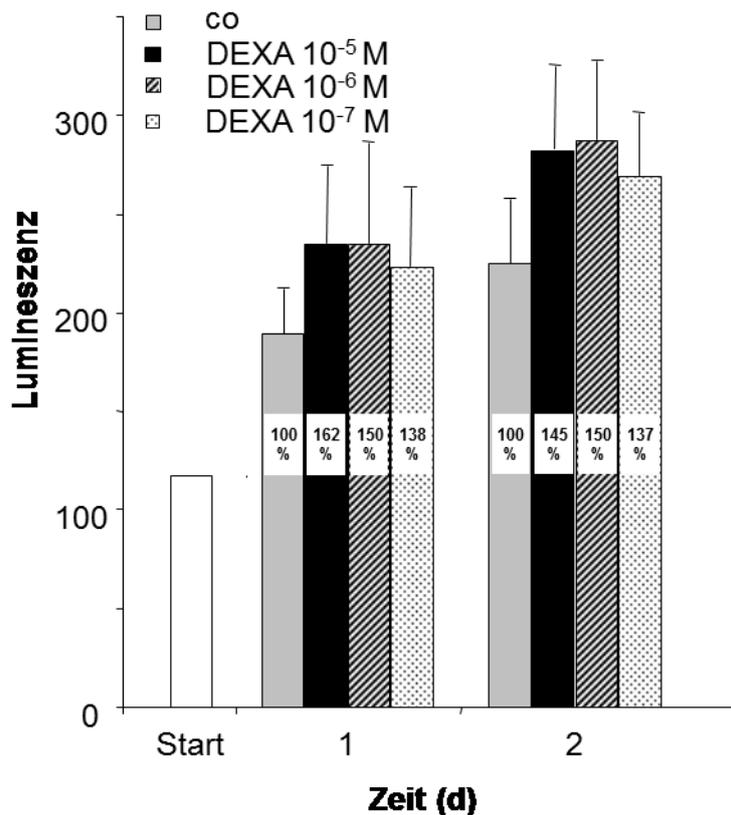
Da bei jedem der drei Versuche eine Proliferation von bis zu 159% gemessen wurde, konnte die DEXA-vermittelte Proliferation als konstanter Effekt gezeigt werden, der von der Zelldichte unabhängig ist.

In der dargestellten Versuchsreihe bestätigten sich nochmals die Ergebnisse aus 2.1.2, da bei jedem Experiment der Anstieg der Zellzahl im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden am höchsten war.

Im Langzeitversuch über mehr als 72 Stunden hat DEXA allerdings keine anhaltende oder gar ansteigende proliferative Wirkung gezeigt, obwohl DEXA alle 48 Stunden neu zugegeben und das Zellmedium ebenfalls erneuert wurde. Dies deutete auf ein Wirkmaximum nach 48 Stunden hin.

#### **1.2.4 Dexamethason steigerte die mitochondriale Aktivität.**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Anstieg der Zelldichte auf eine Steigerung der mitochondrialen Aktivität in den MCF-7-Zellen zurückzuführen war. Als Messgröße für die mitochondriale Aktivität wurde der zelluläre Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) verwendet, da die Mitochondrien ein wichtiger Synthesort dieses energieliefernden Nukleotids sind. So konnte auch untersucht werden, ob bei sehr geringen DEXA-Konzentrationen ( $10^{-7}$  M) eventuell eine Aktivierung der Mitochondrien ohne messbare Proliferation auftrat.



**Abbildung 12 Dexamethason erhöhte den ATP-Gehalt in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden in 3 unabhängigen Experimenten mit  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M DEXA ohne FCS inkubiert. Der zelluläre ATP-Gehalt wurde nach 24 und nach 48 Stunden mittels CellTiter-Glo®-Luminescent-Cell viability assay gemessen (s. „Material und Methoden“).

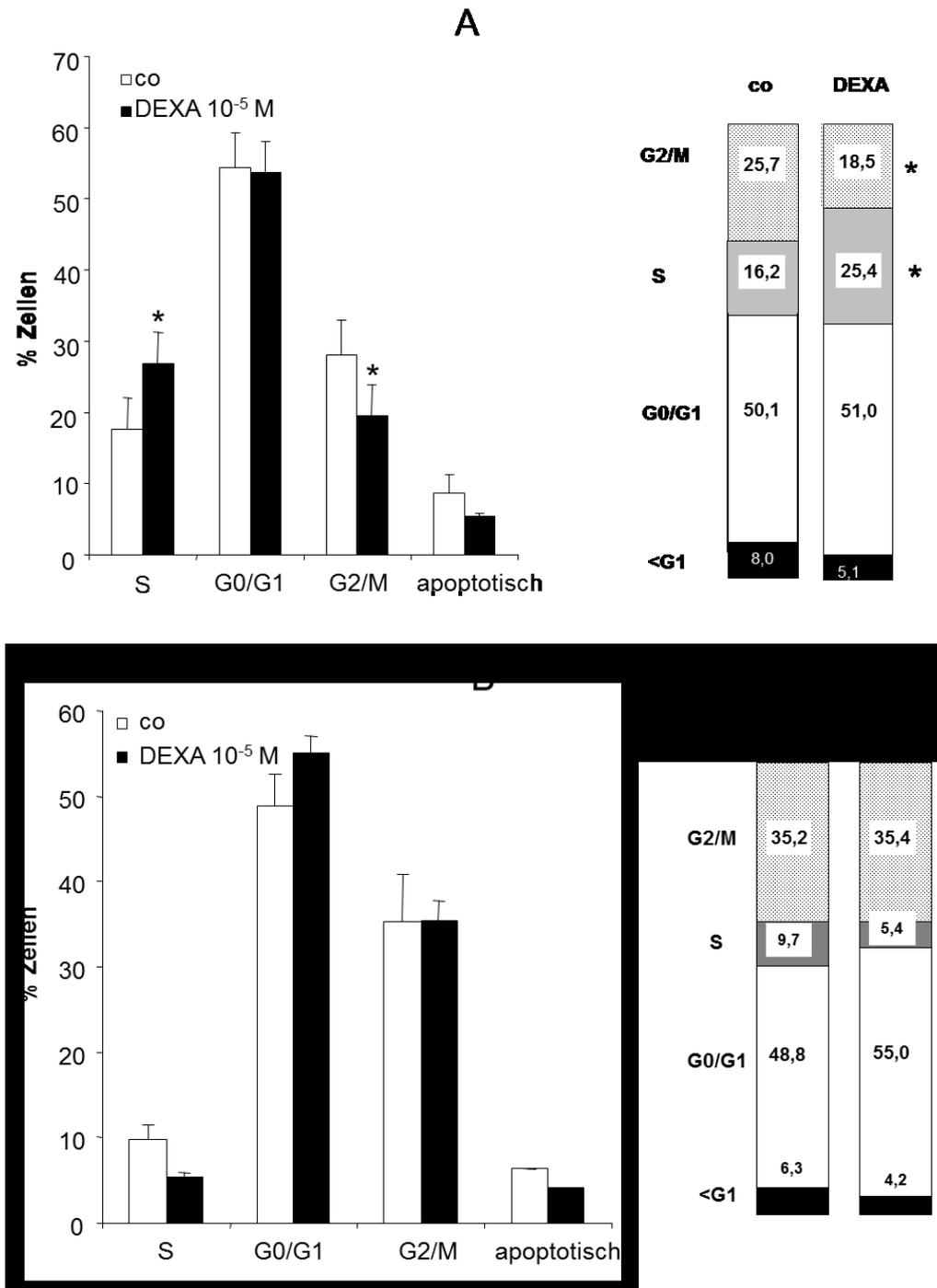
Die Stimulation mit allen 3 Dexamethason-Konzentrationen führte zu einer Steigerung des zellulären ATP-Gehalts nach 24 und 48 Stunden zwischen 137% und 162% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Für die Konzentration von  $10^{-5}$  M DEXA fand sich eine maximale ATP-Erhöhung bereits nach 24 Stunden (162%), wobei dieser Wert nach 48 Stunden nur noch 145% betrug. Das bedeutet, dass in den ersten 24 Stunden nach Stimulation eine Aktivierung der Mitochondrien stattfand, die dann innerhalb der zweiten 24 Stunden in einer messbaren Zellproliferation resultierte.

Auch bei den beiden niedrigeren Konzentrationen erfolgte eine konstante Stimulation der zellulären ATP-Produktion, obwohl hier keine statistisch signifikante DEXA-induzierte Proliferation ermittelt werden konnte. Es ließ sich demnach keine direkte Proportionalität zwischen dem Anstieg der Zelldichte und der Steigerung des zellulären ATP-Gehalts feststellen.

### **1.2.5 Dexamethason wirkte auf den Zellzyklus: Dexamethason induzierte vermehrten Übertritt in die S-Phase.**

Trotz Messung der Zelldichte sowie mitochondrialer Aktivität der Zellen in den vorangegangenen Abschnitten konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der proliferationsfördernde Effekt von Dexamethason zumindest teilweise auf eine Volumenvergrößerung der MCF-7-Zellen zurückzuführen war. Um zu untersuchen, ob eine Verschiebung zugunsten der S-Phase im Zellzyklus stattgefunden hat, wurde eine BrdU-Färbung der stimulierten Zellen durchgeführt und diese am FACS ausgewertet.

Die Zellzyklus-Analyse kann Hinweise auf die Umregulierung bestimmter Botenstoffe geben, die an der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt sind (72).



**Abbildung 13 Dexamethason erhöhte den Anteil von S-Phase-Zellen und reduzierte die G2/M-Phase in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden in 3 unabhängigen Experimenten mit DEXA 10<sup>-5</sup> M- haltigem Medium ohne FCS stimuliert. Zur Analyse des Zellzyklus wurde nach 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) die BrdU-FACS-Färbung durchgeführt (s. „Material und Methoden“).

DEXA bewirkte in MCF-7-Zellen nach 24 Stunden einen statistisch signifikanten Anstieg der in der S-Phase befindlichen Zellen von 16,2% auf 25,4%, während der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase von 25,7% auf 18,5% absank.

Nach 48 Stunden waren insgesamt deutlich weniger Zellen in der S-Phase zu finden, wobei der Anteil mit 5,4% bei den stimulierten Zellen niedriger lag als in der Kontrolle mit 9,7%. Hier induzierte DEXA eine leichte Erhöhung der in der G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase befindlichen Zellen von 48,8% auf 55%.

Auffallend war der sehr geringe Anteil der nach 48 Stunden in der S-Phase befindlichen Zellen. Dies konnte am FCS-Entzug liegen, wodurch die Zellen aufgrund des Nährstoffmangels in der Zellteilung gedrosselt wurden.

Die DEXA-vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen konnte somit auf eine prozentuale Zunahme der S-Phase-Zellen sowie eine Abnahme der apoptotischen Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden zurückgeführt werden.

### **1.3 Der proliferationsfördernde Effekt zytostatischer Substanzen trat auch bei anderen Zelllinien auf.**

Neben der innovativen Substanz TRAIL konnte mit Dexamethason ein seit Jahrzehnten etabliertes und verbreitet eingesetztes Pharmakon gefunden werden, das in vitro die Tumorpheriferation fördert. Um die Häufigkeit des Phänomens einschätzen zu können, wurden die Untersuchungen auf insgesamt 21 Tumorzelllinien und 19 zytostatische Substanzen ausgeweitet.

#### **1.3.1 Ein Zytostatika-Screening auf 21 Tumorzelllinien zeigte in 5% der Kombinationen Proliferationseffekte.**

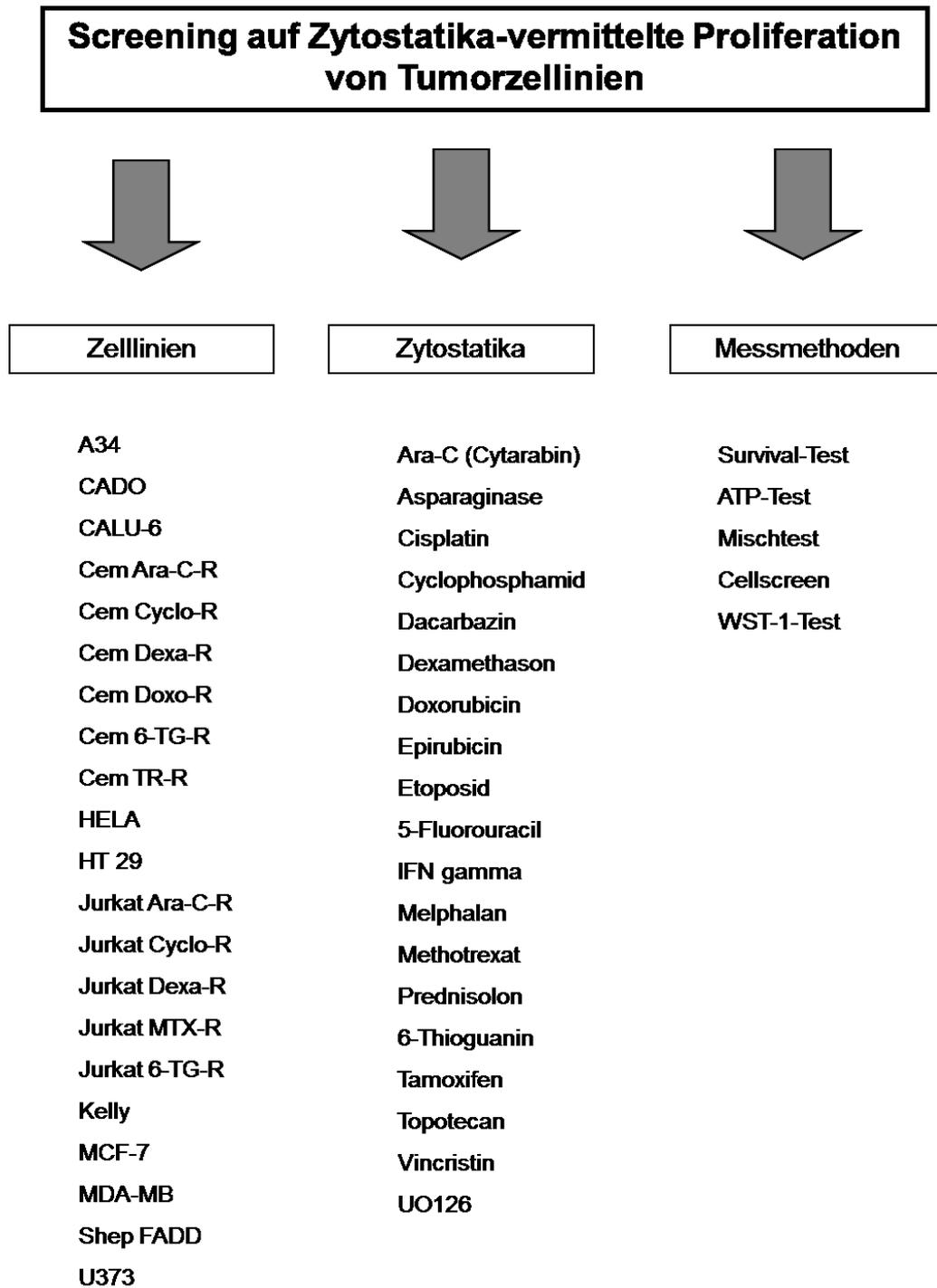
In dieser Arbeit wird ein breit gefächertes Zelllinien-Screening beschrieben, das die Auswirkungen von Zytostatika in verschiedenen Konzentrationsbereichen auf die vermehrte Proliferation von Tumorzelllinien analysierte. Proliferation wurde hierbei definiert als das vermehrte Wachstum der Tumorzellen (als Zunahme der Zellzahl) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen der gleichen Zelllinie.

Die Auswahl an Zelllinien umfasste sowohl schwimmende T-Zell-Carcinom-Linien (CEM und JURKAT) als auch mehrere adhärenente Zelllinien, an denen bis zu 19 zytostatische Substanzen unterschiedlicher Wirkmechanismen getestet wurden. Hierbei fand die Zusammenstellung der Test-Kombinationen nicht nur Therapie-spezifisch statt, d.h.

möglichst alle Zelllinien wurden mit allen Zytostatika stimuliert. Dies war zwar für die Therapie des jeweiligen Carcinoms nicht relevant, konnte aber bei positiven Kombinationen Rückschlüsse auf mechanistische Zusammenhänge der Zytostatika-induzierten Proliferation geben.

Die jeweilige Dosierung wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben für jede Substanz festgelegt und richtete sich nach den maximalen Plasmaspiegel-Werten, die im Patienten während einer Hochdosistherapie gemessen wurden.

Eine Übersicht zu den getesteten Zelllinien, Zytostatika sowie angewendeten Messmethoden gibt Abbildung 14. Die Wirkmechanismen der Zytostatika sowie die verwendeten Konzentrationen sind im Kapitel „Material und Methoden“ detailliert beschrieben.



**Abbildung 14** Screening auf Zytostatika-vermittelte Proliferation von Tumorzelllinien

Es sind alle verwendeten Zelllinien, Zytostatika und Messmethoden gezeigt. Zu genaueren Konzentrationsangaben wird auf „Material und Methoden“ verwiesen. Alle untersuchten Kombinationen von Zytostatika und Zelllinie wurden sowohl in Medium ohne FCS als auch in Medium mit 1% FCS durchgeführt.

Die Tabelle im Anhang X-1 zeigt detailliert alle getesteten Kombinationen, den negativen, positiven oder noch nicht sicher nachweisbaren Ausgang der Proliferationstests sowie eine abschließende Bewertung, ob in der jeweiligen Kombination ein Proliferationsphänomen zu beobachten war.

Die Kriterien zur Festlegung einer Zytostatika-vermittelten Proliferation wurden wie folgt bestimmt: „Positiv“ bedeutet, dass die Proliferation in einem der gemessenen Zeitintervalle aufgetreten ist. Dies ist unabhängig vom kumulativen Wachstum zum Endpunkt des Experiments, d.h. ob am Ende die Gesamt-Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle angestiegen ist. Entweder musste der ATP- und/oder Misch-Test sowie zusätzlich die Cellscreen-Messung positive Ergebnisse liefern. Wurde nur der Cellscreen zur Messung herangezogen, mussten 3 aufeinanderfolgende, identisch durchgeführte Experimente die Proliferation zeigen. Fehlte die Kontinuität des Effekts in der Cellscreen-Messung oder zeigte nur der ATP-, Misch- oder Survival-Test positive Werte, wurde die betreffende Kombination als „nicht sicher nachweisbar“ eingestuft.

In 8 der 153 untersuchten Kombinationen aus 19 Wirkstoffen und 21 Zelllinien trat Zytostatika-vermittelte Proliferation auf; dies entspricht einer Proliferationsquote von 5,2%.

7 von 153 Kombinationen (4,6%) wurden als „nicht sicher nachweisbar“ nach den oben genannten Kriterien eingestuft; bei 26 Kombinationen (24%) trat mindestens ein positiver Proliferationstest auf.

Die Tabelle im Anhang X-2 listet die Kombinationen auf, bei denen mindestens eine Messmethode positive Proliferationswerte geliefert hat. Außerdem sind hier die jeweiligen Zytostatika-Konzentrationen eingefügt, mit denen die Zellen inkubiert wurden.

Eine Zusammenfassung des durchgeführten Screenings liefert Tabelle 7. Die Aussage über proliferationsfördernde Effekte einer Substanz in der jeweiligen Kombination wurde ausschließlich aufgrund der oben beschriebenen Messmethoden bestimmt und nach den oben erläuterten Kriterien angenommen.

Zelllinie	Art des Carcinoms	Besonderheit	Wachstum	getestete Substanzen	Proliferation
JURKAT DEXA-R	T-Zelle	Dexamethason-resistent	Susp.	1	nein
CEM DEXA-R	T-Zelle	Dexamethason-resistent	Susp.	1	nein
CEM Ara-C-R	T-Zelle	Cytosin-Arabinosid-resistent	Susp.	1	nein
JURKAT Ara-C-R	T-Zelle	Cytosin-Arabinosid-resistent	Susp.	1	nein
JURKAT MTX-R	T-Zelle	Methotrexat-resistent	Susp.	1	nein
CEM Doxo-R	T-Zelle	Doxorubicin-resistent	Susp.	1	nein
JURKAT Cyclo-R	T-Zelle	Cyclophosphamid-resistent	Susp.	1	nein
CEM Cyclo-R	T-Zelle	Cyclophosphamid-resistent	Susp.	1	nein
JURKAT 6-TG-R	T-Zelle	6-Thioguanin-resistent	Susp.	1	nein
CEM 6-TG-R	T-Zelle	6-Thioguanin-resistent	Susp.	1	nein
CEM TR-R	T-Zelle	TRAIL-resistent	Susp.	1	nein
CADO	Ewing-Sarkom		adh.	17	nein
MCF-7	Brust	Verlust von Caspase-3	adh.	19	Epirubicin, Dexamethason,, UO126
MDA-MB	Brust		adh.	18	nein
KELLY	Neuroblastom		adh.	18	UO126
SHEP FADD	Neuroblastom	Überexpression von FADD	adh.	17	nein
HELA	Zervix		adh.	17	nein
HT 29	Kolon		adh.	17	nein
U373	Glioblastom		adh.	17	nein
CALU-6	Lunge		adh.	17	Dexamethason, Prednisolon, Etoposid
A34	Niere		adh.	2	Epirubicin

Tabelle 7 Zusammenfassung der auf Zytostatika-stimulierte Proliferation getesteten Zelllinien

Während bei den schwimmenden Zelllinien keine Proliferation nach Zytostatika-Stimulation gemessen werden konnte, schien die Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7 die proliferationsfreudigste der getesteten adhärennten Zelllinien zu sein: Subtoxische Konzentrationen der beiden für die Mamma-Carcinom-Therapie relevanten Wirkstoffe Epirubicin und Tamoxifen induzierten vermehrtes Wachstum der Tumorzelllinie. Das allgemein zur Minderung der Zytostatika-Nebenwirkungen eingesetzte Glucocorticoid Dexamethason sowie der neue Wirkstoff UO126 verursachten ebenfalls Proliferation.

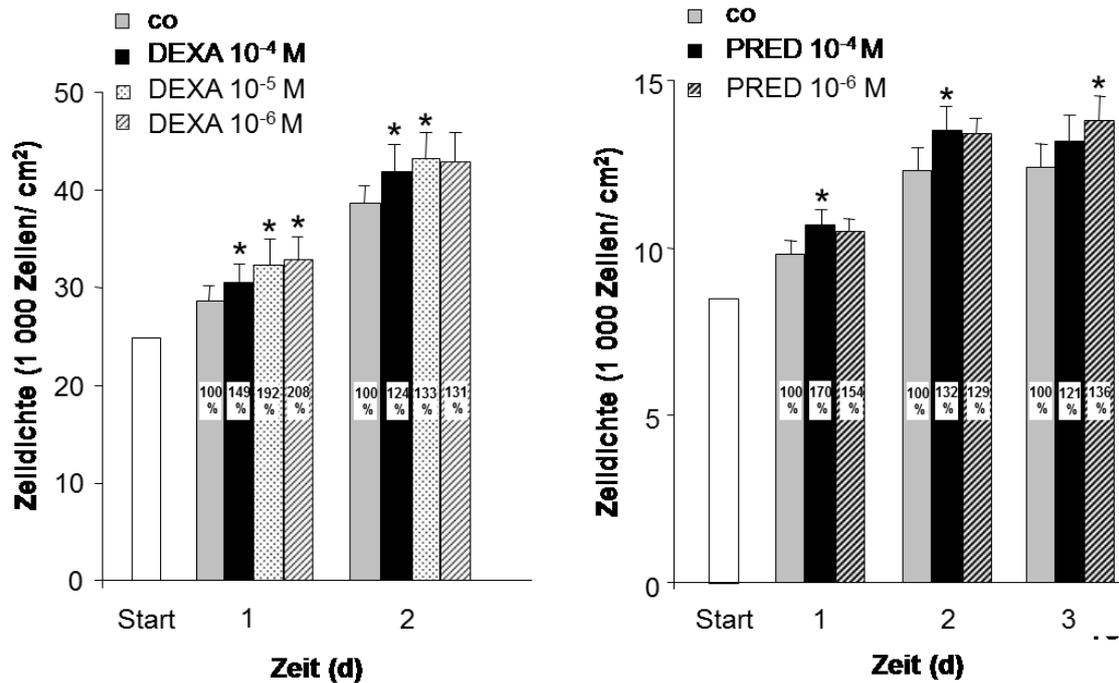
Auch bewirkte UO126 auf der Neuroblastom-Zelllinie KELLY vermehrtes Wachstum sowie Epirubicin auf MCF-7-Zellen und auf der Nierencarcinom-Zelllinie A34.

Etoposid ist ein wichtiger Bestandteil der klassischen Chemotherapie beim Lungencarcinom. Die hiervon abgeleitete Zelllinie CALU-6 proliferierte nach Inkubation mit niedrigen Konzentrationen an Etoposid sowie den beiden Glucocorticoiden Dexamethason und Prednisolon.

Der Rest dieses Kapitels wird Zellen der P-Gruppe beschreiben, d.h. die Zelllinien zeigen gegenüber dem jeweiligen Zytostatikum Apoptose-Resistenz.

#### **1.3.2 Dexamethason und Prednisolon induzierten Proliferation in CALU-6-Zellen.**

CALU-6-Zellen stellen ein Modell des Lungencarcinoms dar. Glucocorticoide wie Dexamethason und Prednisolon (PRED) sind häufig verwendete Wirkstoffe zur Reduzierung der Nebenwirkungen einer Chemo- oder Strahlentherapie (29). Abbildung 15 zeigt die Wirkung von DEXA und PRED auf CALU-6-Zellen unter Serumentzugs-Bedingungen.



**Abbildung 15 DEXA und PRED induzierten Proliferation in CALU-6-Zellen.**

Zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 Stunden nach Stimulation von CALU-6-Zellen mit  $10^{-4}$  M (n=10),  $10^{-5}$  M (n=6) und  $10^{-6}$  M (n=5) DEXA bzw. mit  $10^{-4}$  M (n=11) und  $10^{-6}$  M (n=8) PRED wurde die Zelldichte mittels Cellscreen gemessen. Alle Experimente wurden mit FCS-freiem Medium durchgeführt.

Alle 3 eingesetzten Dexamethason-Konzentrationen ( $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M) zeigten nach 24 Stunden Inkubationszeit statistisch signifikante Proliferationswerte von 149%, 192% und 208%. Dies entsprach einer Verkürzung der Verdopplungszeit von 42 Stunden in der Kontrolle auf bis zu 36 Stunden. Hierbei ergab sich ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Wirkstoff-Konzentration und Ausmaß der Proliferation.

Nach 48 Stunden wurden statistisch signifikante Proliferationswerte von 124% bis 133% gemessen. Diese Werte liegen somit unter denen der ersten 24 Stunden, wobei sich die 3 verschiedenen Konzentrationen angeglichen haben. Die wiederholte Zugabe des Wirkstoffs nach 24 Stunden hatte keinen Einfluss auf die Proliferationswerte, die nach weiteren 24 Stunden ermittelt wurden. Insgesamt verlangsamte sich das Wachstum der Zellen nach den ersten 24 Stunden: Während sich unbehandelte CALU-6-Zellen nach 62 Stunden verdoppelt haben, bewirkte die DEXA-Inkubation eine Verkürzung dieser Zeitspanne auf durchschnittlich 55 Stunden.

Für das Glucocorticoid Prednisolon fanden sich signifikante Proliferationswerte für die beiden Konzentrationen  $10^{-4}\text{M}$  und  $10^{-6}\text{M}$ . Wie bei der Stimulation mit Dexamethason wurden die stärksten Effekte mit 170% bzw. 154% Proliferation innerhalb der ersten 24 Stunden erzielt. Am zweiten und dritten Tag betrug die gemessene kumulative Zunahme der Zelldichte nur 121% bis 136%.

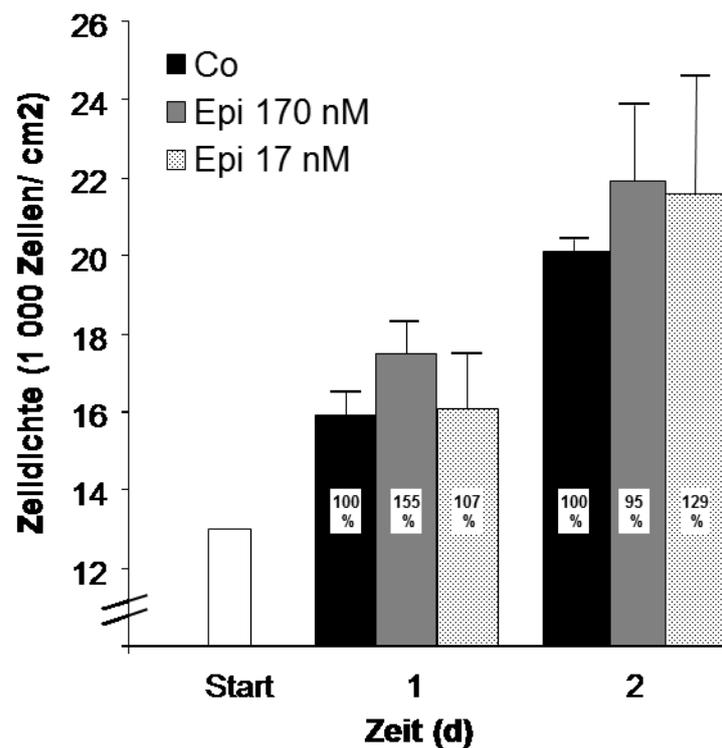
In Bezug auf den proliferationsfördernden Effekt der beiden untersuchten Glucocorticoide DEXA und PRED wurde eine verstärkte Wirkung in den ersten 24 Stunden nach Stimulation festgestellt, welche sich im weiteren Verlauf des Experiments für alle eingesetzten Konzentrationen etwas abgeschwächt hat.

Die von Al-Wadei (42) beschriebene Proliferationsförderung durch DEXA auf einer anderen Lungencarcinom-Zelllinie konnte für CALU-6-Zellen somit bestätigt werden.

Da inhalativ und peroral applizierte Glucocorticoide zur Standardtherapie des Asthma bronchiale gehören, ist der oben dargestellte Zusammenhang zwischen niedrig dosierten Glucocorticoiden als Langzeittherapie und Proliferation einer Lungencarcinom-Zelllinie für weitere Untersuchungen und Studien besonders interessant.

#### **1.3.3 Epirubicin vermittelte Proliferation in A34-Zellen.**

Epirubicin hat im Screening auf zwei Zelllinien Proliferation verursacht (MCF-7 und A34), wobei A34-Zellen dem P-Phänotyp angehörten. Die eingesetzten Epirubicin-Konzentrationen waren mit 170nM und 17 nM recht hoch und zeigen die Apoptoseresistenz der Zelllinie.



**Abbildung 16 Epirubicin vermittelte in zwei Konzentrationen Proliferation in A34-Zellen.**

A34-Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 170 nM bzw. 17 nM Epirubicin stimuliert und die Zelldichte nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen gemessen. Die Experimente wurden ohne FCS durchgeführt.

Epirubicin (EPI) führte zu Proliferation auf A34-Zellen: Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium mit 170 nM EPI wurden 155% Proliferation gemessen, wobei sich der Effekt nach weiteren 24 Stunden auf Kontrollniveau abschwächte. 17 nM EPI vermittelte nur in den zweiten 24 Stunden nach Stimulation eine Proliferation von 129%. Insgesamt war die Wirkung von EPI auf A34-Zellen eher unregelmäßig und weniger durchgängig als bei den bisher beschriebenen Zelllinien.

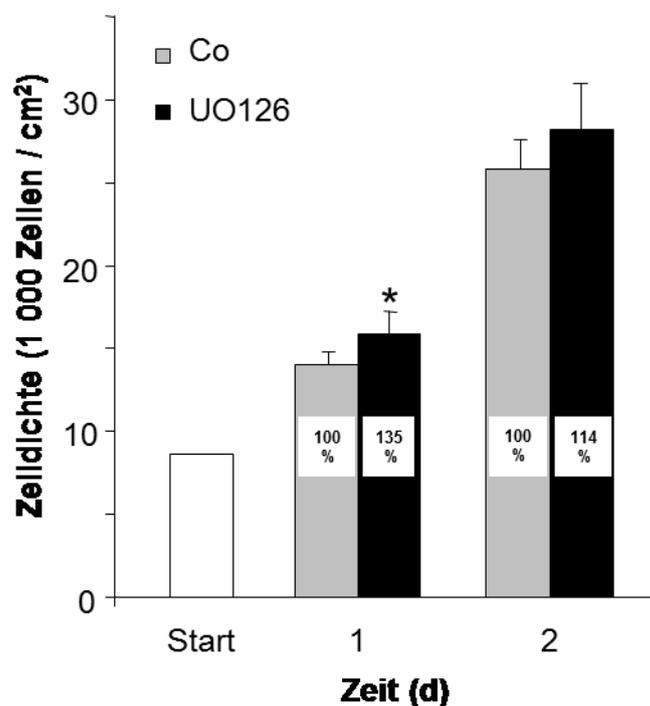
#### **1.3.4 Der MEK-Inhibitor UO126 induzierte vermehrte Proliferation in Kelly-Zellen.**

Dexamethason, Prednisolon und Epirubicin sind seit langem etablierte Wirkstoffe vieler Chemotherapien. Im Screening wurde mit UO126 eine Substanz mit völlig neuem Wirkmechanismus als proliferativ wirkend eingestuft, obwohl sie eigentlich in ihrer Wirkungsweise einen pro-proliferativen Signalweg inhibiert.

Als Inhibitor der MEK (mitogen/ extrazellulär Signal-regulierte Kinase) stellte die Substanz UO126 einen neuen Ansatz in der onkologischen Therapie dar, weil hier

direkt in die Proliferationsregulierung der Zelle eingegriffen werden konnte. Der MEK/ERK-Signalweg ist wichtig für die Übertragung extrazellulärer Stimuli und kann über weitere Mediatoren die Zellvermehrung und -differenzierung anregen. In der Literatur ist eine Reduzierung des Zellwachstums durch MEK-Inhibition in MCF-7-Zellen beschrieben. In Glioblastom-Zellen kommt es bei der Kombination von UO126 mit Zytostatika zu synergistischen Effekte in Bezug auf die Apoptose-Induktion; es wäre daher eine vielversprechende Substanz für den Einsatz in der Polychemotherapie (73,74).

Abbildung 17 zeigt die Wirkung von UO126 auf die Neuroblastom-Zelllinie KELLY.



**Abbildung 17 Der MEK-Inhibitor UO126 vermittelte Proliferation in KELLY-Zellen.**

KELLY-Zellen wurden in vier unabhängigen Experimenten mit dem MEK-Inhibitor UO126 (3  $\mu$ M) stimuliert und die Zelldichte nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen gemessen. Die Experimente wurden mit 10% FCS durchgeführt.

Die Inkubation der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 3  $\mu$ M UO126 führte zu statistisch signifikanter Proliferation von 135% innerhalb der ersten 24 Stunden. Dies entsprach einer Verkürzung der Verdopplungszeit von 30 Stunden in der Kontrolle auf 26 Stunden in der stimulierten Zellfraktion.

Am zweiten Tag schwächte sich der Proliferationseffekt auf 114% ab.

Somit erschien es möglich, durch die Blockade des MEK/ERK-Signalweges Zellproliferation zu induzieren.

## **2 Zytostatika verursachten sowohl Zellproliferation als auch Apoptose.**

Die im Folgenden beschriebenen Zellen zeigten keine Apoptose-Resistenz. Bei Zytostatika-Stimulation liefen sowohl Apoptose- als auch Proliferationsvorgänge parallel oder kurz hintereinander ab. Dies führte entweder zur Zytostatika-vermittelten Proliferation, die nur bei bestimmten nicht-apoptotischen Konzentrationen auftrat (Epirubicin auf MCF-7). Oder die gleiche Zytostatika-Konzentration induzierte erst Proliferation und wurde dann in Apoptose umgewandelt (Etoposid auf CALU-6).

Die folgende Einteilung der Zytostatika-Wirkungen wurde erstmals nach umfangreichen Proliferationsuntersuchungen mit TRAIL auf primären Leukämiezellen vorgenommen und konnte auch auf Versuche mit Zelllinien übertragen werden (14).

In der Gruppe A induzierte das Zytostatikum Apoptose in den stimulierten Tumorzellen (mehr als 10% spezifische Apoptose, s. Material und Methoden), in der Gruppe P ausschließlich Proliferationsvorgänge (mehr als 120% spezifische Proliferation). Die Gruppe AP stellt eine Mischform der ersten beiden Phänotypen dar, in der sowohl Apoptose als auch Proliferation gemessen wurde. Hierzu gehörten die in diesem Kapitel beschriebenen Kombinationen.

In der Gruppe O kam es unter Zytostatika-Inkubation zu keinen Veränderungen der Zellzahl oder Zellvitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### **2.1 Epirubicin vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.**

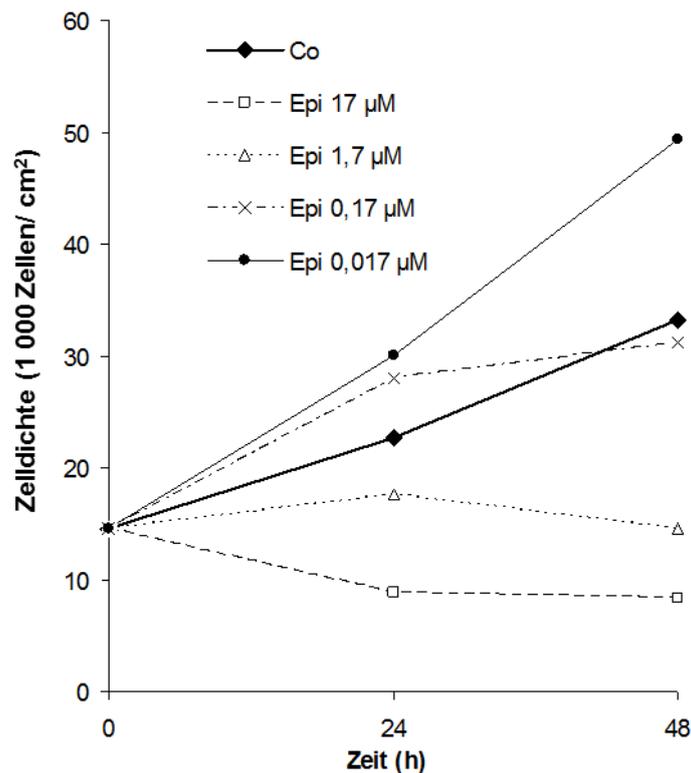
Epirubicin, ein Epimer von Doxorubicin, gehört zu den Standard-Zytostatika der Chemotherapie beim Mammacarcinom. In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die sich mit der Apoptose-Induktion durch Epirubicin auf der Mammacarcinom-Zelllinie MCF-7 sowie mit dem Phänomen der Resistenzentwicklung bzw. deren Umgehung beschäftigen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Epirubicin das Zellwachstum von MCF-7 beschleunigen konnte und welche intrazellulären Vorgänge hierbei abliefen.

### **2.1.1 Epirubicin bewirkte einen Anstieg der Zellzahl im Kurzzeit- und Langzeitexperiment.**

Analog zur Vorgehensweise bei der Dexamethason-induzierten Proliferation auf MCF-7 wurden zuerst Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um zu ermitteln, bei welchen Konzentrationen die Apoptose-Induktion durch Epirubicin einsetzte. Da im Screening (s. 1.2.1) ausschließlich Kurzzeitversuche durchgeführt wurden, beschränkte sich der Zeitraum eines Experiments hier ebenfalls auf 48 Stunden.

Die maximale Konzentration von 17  $\mu\text{M}$  Epirubicin lag doppelt so hoch als der Plasmaspiegel bei Epirubicin-Hochdosistherapie (vgl. Material und Methoden, 2.4).

In Abbildung 18 ist die Wirkung von 4 Epirubicin-Konzentrationen auf das Wachstum der MCF-7 über 48 Stunden gezeigt.



**Abbildung 18 Epirubicin verlangsamt in hohen Konzentrationen das Wachstum von MCF-7-Zellen.**

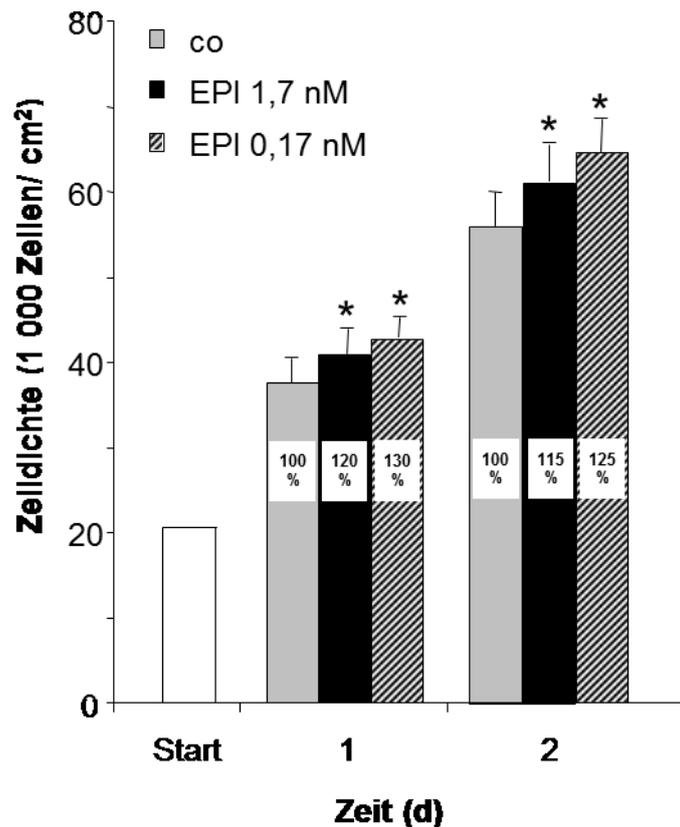
MCF-7-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von EPI bei 1% FCS stimuliert. Die Zelldichte wurde nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen gemessen (s. „Material und Methoden“). Um den direkten Vergleich der Wachstumskurven zu ermöglichen, wurden in jedem Experiment die Werte für die Zelldichte in den verschiedenen Wells auf einen einheitlichen Ausgangswert justiert, d.h. alle Werte mit einem Faktor multipliziert. Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

Epirubicin hatte in Konzentrationen von 17 µM und 1,7 µM einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation: Die Zellzahl reduzierte sich bei 17 µM innerhalb von 48 Stunden auf 56% der Ausgangs-Zellzahl. Wurde EPI um eine Zehnerpotenz niedriger dosiert (1,7 µM), blieb die Zellzahl nach 48 Stunden im Vergleich zur Ausgangs-Zellzahl unverändert. Die beiden niedrigeren Konzentrationen von EPI (0,17 µM und 0,017 µM) zeigten proliferationsfördernde Effekte: Während 0,17 µM EPI im Medium zum gleichen Anstieg der Zellzahl führte wie in der Kontrolle, steigerte sich die Zellzahl unter 0,017 µM auf 148% der Kontroll-Zellzahl.

Die Vorversuche zeigten, dass MCF-7-Zellen nicht resistent gegenüber der wachstumsvermindernden Wirkung von Epirubicin waren; und zwar in

Konzentrationsbereichen, die klinisch relevanten Plasma-Peak-Spiegeln entsprechen. Dies gibt Hinweise darauf, dass MCF-7 bei EPI-Stimulation vermutlich als AP-Phänotyp einzuordnen sein wird.

Um quantitative Aussagen über das Ausmaß der EPI-induzierten Proliferation treffen zu können, wurde die Versuchszahl bei 2 niedrigen Konzentrationen erhöht (Abbildung 19).



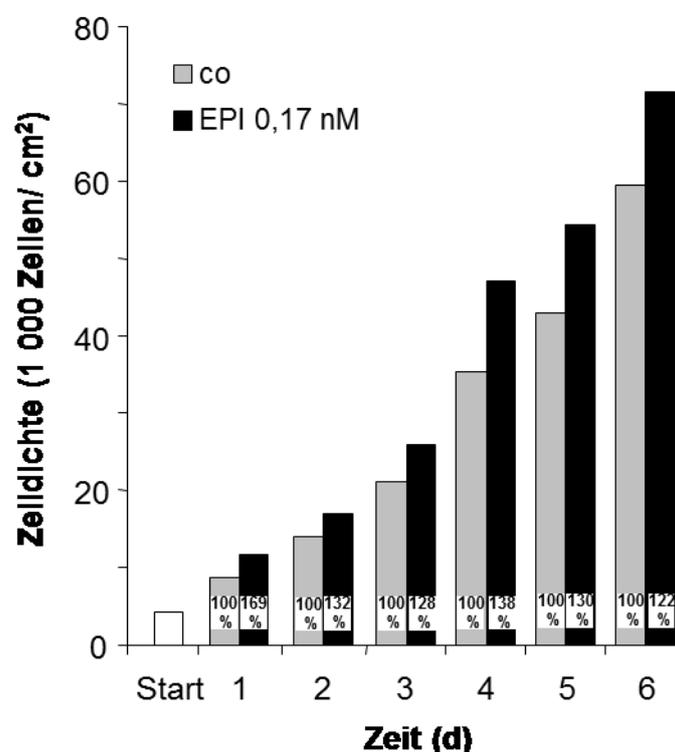
**Abbildung 19 Epirubicin vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden mit 1,7 nM EPI (n=19) und 0,17 nM EPI (n=14) plus 1% FCS inkubiert. Die Zelldichte wurde nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen ermittelt (s. „Material und Methoden“). Die Prozentzahl der Proliferation wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben berechnet und beschreibt den kumulativen Anstieg der Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle beim Start des Experiments. \*: P < 0,05 verglichen mit Kontrolle unter Anwendung des paired t-test (s. „Material und Methoden“).

EPI führte in niedrigen Konzentrationen, die den Plasmaspiegeln während der Eliminationsphase des Pharmakons entsprachen, zu statistisch signifikanter Proliferation der Tumorzellen. Die Werte lagen nach den ersten 24 Stunden (120% bzw. 130%) höher als nach 48 Stunden (115% bzw. 125%). Diese

Proliferationsförderung entsprach einer Verkürzung der Verdopplungszeit von 36 Stunden in der Kontrolle auf 33 bzw. 31 Stunden bei den EPI-behandelten Zellen.

Dieser Effekt sollte nun im Langzeitexperiment geprüft werden, da Proliferationseffekte im Kurzzeitversuch durch die apoptotische Wirkung anderer Zytostatika ausgeglichen werden könnten. Für die klinische Relevanz spielt daher die Konstanz des Effektes eine entscheidende Rolle, da je nach Zytostatikum und Dosierung über mehrere Tage oder Wochen niedrige Konzentrationen der angewendeten Substanz im Organismus verbleiben können.



**Abbildung 20 Epirubicin vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen über 6 Tage.**

MCF-7-Zellen wurden mit 0,17 nM EPI in 1%-FCS-hatigem Serum über 6 Tage inkubiert. Die Zugabe von EPI wurde am Tag 3 und Tag 5 wiederholt und die Zelldichte jeden Tag mittels Cellscreen gemessen. Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

Die Inkubation mit 0,17 nM EPI-haltigem Medium bewirkte im dargestellten Experiment einen maximalen Proliferationsanstieg von 169% nach 24 Stunden, der bis zum Versuchsende nach 6 Tagen auf Werte zwischen 122% und 138% abfiel.

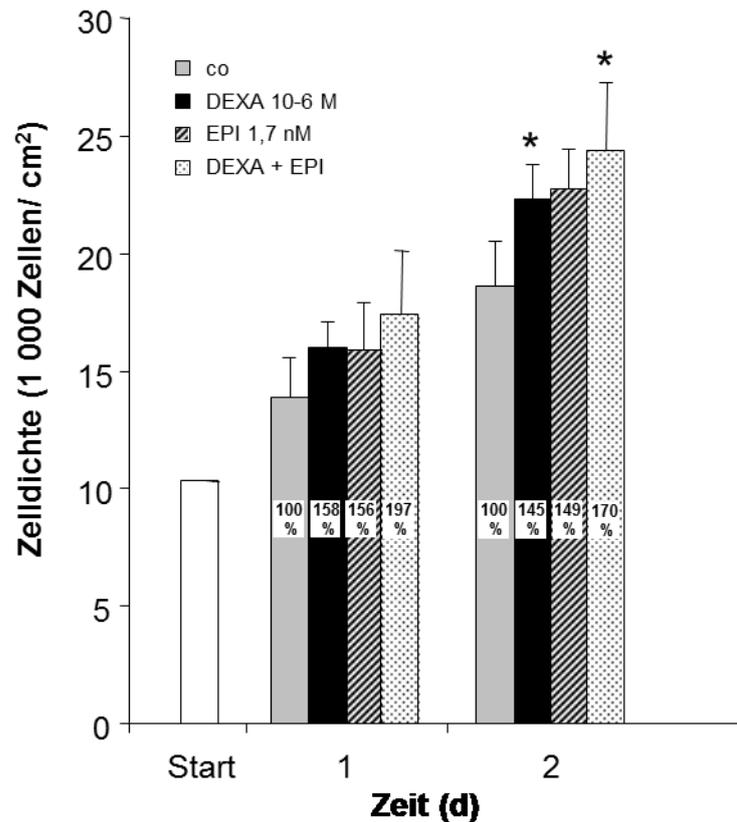
Bei der EPI-vermittelten Proliferation handelte es sich im Zellkulturversuch mit MCF-7 um einen konstanten Effekt, der im Langzeitversuch verifiziert werden konnte.

Epi wirkte in Konzentrationen im Bereich der Plasma-Peak-Spiegel wachstumshemmend auf MCF-7-Zellen, induzierte jedoch in niedrigeren Konzentrationen Zellproliferation im Kurzzeit- und Langzeitversuch. Die MCF-7 konnten in diesem Zusammenhang dem AP-Phänotyp zugeordnet werden, da Epirubicin je nach Konzentration sowohl Apoptose als auch Proliferation induzierte.

### **2.1.2 Die kombinierte Stimulation mit Dexamethason und Epirubicin führte zum Anstieg der Zellzahl.**

In der Polychemotherapie kommt es zur Kombination mehrerer Zytostatika.

Dexamethason ist ein verbreiteter Wirkstoff zur Komedikation, um unerwünschte Wirkungen der Zytostatika zu reduzieren (29). Es lag also nahe, eine kombinierte Stimulation von Epirubicin und Dexamethason zu testen, d.h. den AP-Phänotyp mit dem P-Phänotyp (siehe oben) auf synergistische oder antagonistische Effekte zu untersuchen.



**Abbildung 21 Zytostatika-vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen unter kombinierter Einwirkung von DEXA und EPI**

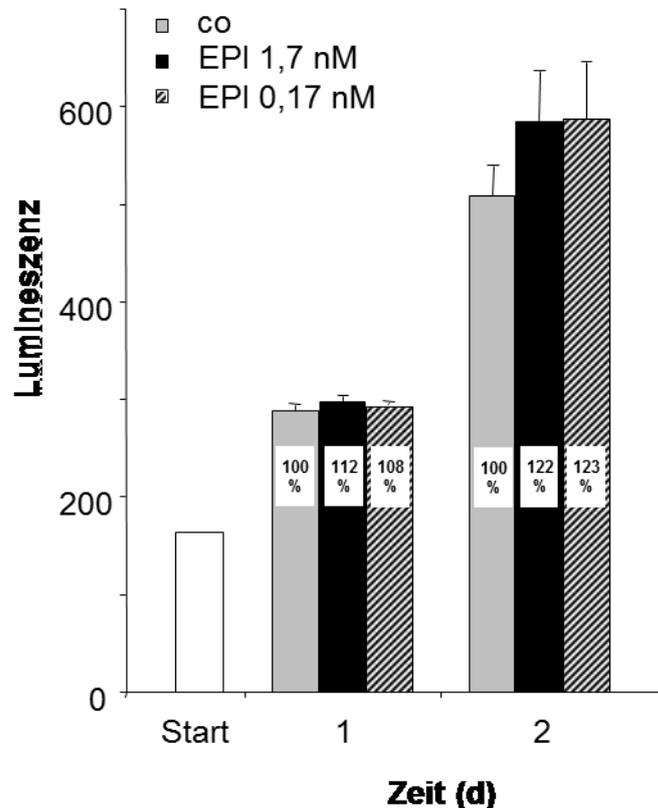
MCF-7-Zellen wurden in 4 unabhängigen Experimenten mit  $10^{-6}$  M DEXA alleine, 1,7 nM EPI alleine und DEXA und EPI zusammen stimuliert und die Zelldichte nach 0, 24 und 48 Stunden mittels Cellscreen gemessen. \*:  $P < 0,05$  verglichen mit Kontrolle unter Anwendung des paired t-test (s. „Material und Methoden“).

Die Kombination von DEXA und EPI induzierte nach 48 Stunden eine statistisch signifikante Proliferation von 170%, während die beiden Substanzen alleine die Zellzahl jeweils nur auf 145% bzw. 149% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhten. Die pro-proliferative Wirkung der beiden Substanzen zeigte einen synergistischen Effekt auf die Proliferationswerte.

### 2.1.3 Epirubicin steigerte die mitochondriale Aktivität.

Eine Steigerung der Zellteilungsrate führt zur Bereitstellung von mehr Energie in Form von intrazellulärem ATP, was durch eine erhöhte mitochondriale Aktivität erreicht wird. Analog den Versuchen Mit DEXA und MCF-7 (vgl. 1.2) wurde als Messgröße für die

mitochondriale Aktivität in den folgenden Experimenten der zelluläre Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) verwendet.



**Abbildung 22 Epirubicin erhöhte den ATP-Gehalt in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden in 4 unabhängigen Experimenten mit EPI 1,7 nM und 0,17 nM in 1%-FCS-haltigem Medium inkubiert. Der zelluläre ATP-Gehalt wurde nach 24 und nach 48 Stunden mittels CellTiter-Glo®-Luminescent-Cell viability assay gemessen (s. „Material und Methoden“).

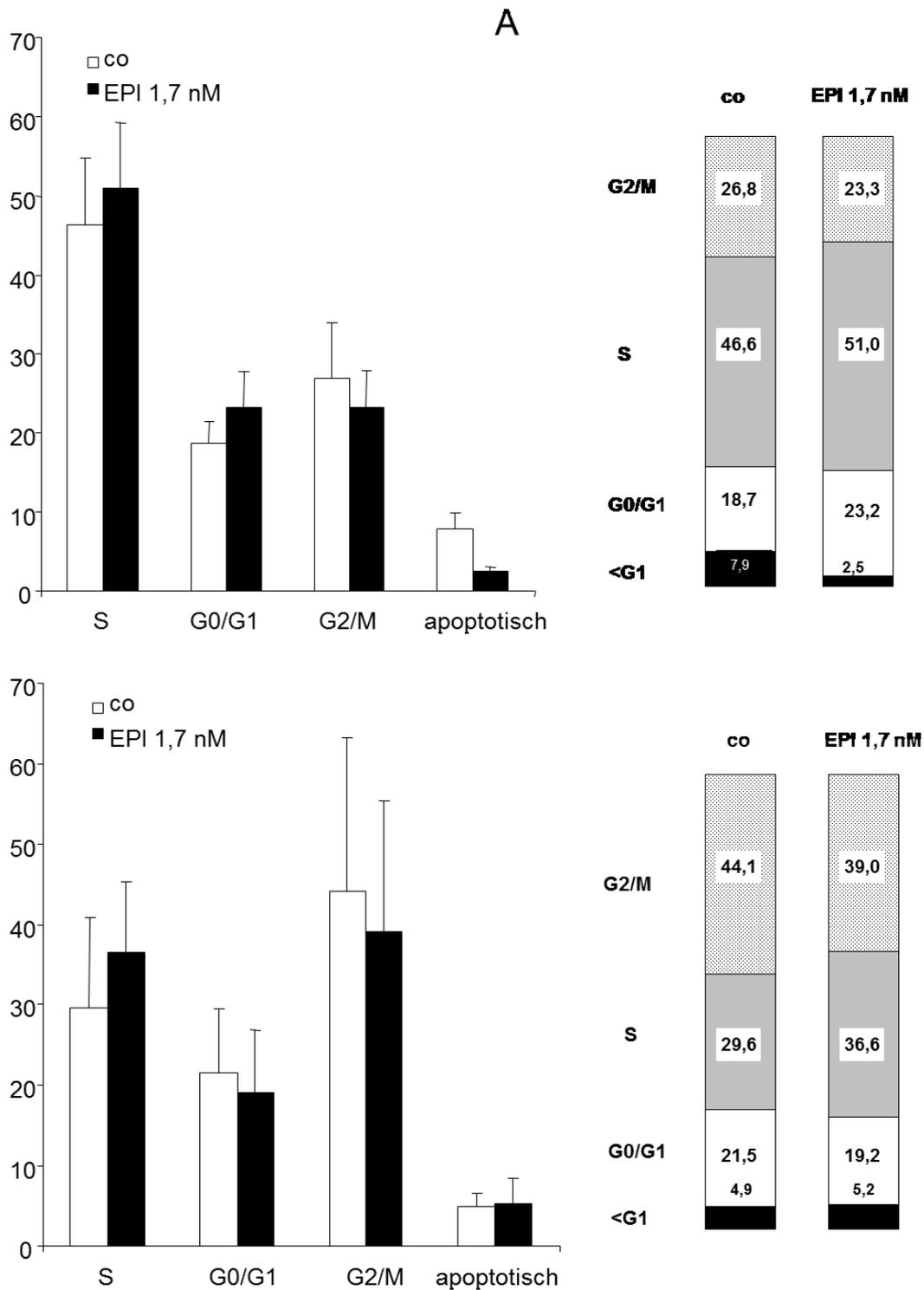
Die Stimulation mit EPI wirkte sich nur nach 48 Stunden auf den ATP-Gehalt der Zellen aus. Hier lagen die Werte mit 122% (17 nM EPI) und 123% (1,7 nM EPI) insgesamt unter den DEXA-induzierten Steigerungen der ATP-Synthese (vgl. 1.2).

Dies entsprach den Messungen im Kurzzeitversuch (vgl. 2.1.1), da hier ebenfalls nach 48 Stunden die höchsten Proliferationswerte gemessen wurden.

#### **2.1.4 Epirubicin wirkte auf den Zellzyklus: Epirubicin induzierte vermehrten Übertritt in die S-Phase.**

Für weitere Informationen über intrazelluläre Vorgänge nach der Stimulation mit proliferativ wirkenden EPI-Konzentrationen wurde eine BrdU-Färbung der stimulierten

Zellen durchgeführt und am FACS ausgewertet. So konnte untersucht werden, ob eine Verschiebung im Zellzyklus zugunsten der S-Phase stattgefunden hat, wie dies für DEXA auf MCF-7 gemessen wurde (vgl. 1.2).



**Abbildung 23 EPI erhöhte den Anteil von S-Phase-Zellen in MCF-7-Zellen über 48 Stunden.**

MCF-7-Zellen wurden in 3 (24h) bzw. 2 (48h) unabhängigen Experimenten mit EPI 1,7 nM stimuliert. Zur Analyse des Zellzyklus wurde nach 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) die BrdU-FACS-Färbung durchgeführt (s. „Material und Methoden“).

Nach 24-stündiger sowie 48-stündiger Inkubation mit 17 nM EPI stieg der Anteil der in der S-Phase befindlichen MCF-7-Zellen an: Nach 24 Stunden von 46,6% (Kontrolle) auf 51% und nach 48 Stunden von 29,6 (Kontrolle) auf 36,6%. Für die G<sub>2</sub>/M-Phase und G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase nahmen die Werte jeweils leicht ab.

Auffällig war ebenfalls der protektive Einfluss von EPI innerhalb der ersten 24 Stunden bezüglich des Anteils der apoptotischen Zellen (Sub-G<sub>1</sub>-Phase): Während die unstimulierte Zellpopulation einen Anteil von 7,9% aufwies, reduzierte die Einwirkung von EPI diesen Anteil auf 2,5%.

Der proliferationsfördernde Einfluss von EPI kam demnach durch eine kontinuierliche Zunahme der in der S-Phase befindlichen MCF-7-Zellen über die ersten 48 Stunden sowie die anfängliche Abnahme apoptotischer Zellen zustande.

### **3 Zytostatika induzierten die Proliferation von primären Tumorzellen.**

Zelllinien können sich bei längerer Kultivierung verändern und so zu Artefakten in den Messreihen führen. Um das zu umgehen, wurden primäre leukämische Tumorzellen von Patienten auf Zytostatika-Wirkungen analysiert. 74 Proben wurden mit bis zu 11 Zytostatika inkubiert und mittels verschiedener Messmethoden untersucht. Bei 21 der 74 Proben (28%) traten Proliferationseffekte durch mindestens ein Zytostatikum auf. Die Zytostatika-induzierte Proliferation war demnach nicht nur auf Zelllinien beschränkt, sondern trat noch häufiger in kultivierten primären Tumorzellen auf.

#### **3.1 Übersicht der Zytostatika und Messmethoden**

Parallel zum Screening auf Zytostatika-vermittelte Proliferation in Tumorzelllinien wurden 74 Proben von primären leukämischen Zellen auf die Apoptose-vermindernde- sowie proliferationsfördernde Wirkung von Zytostatika untersucht. Die Herkunft und Gewinnung der primären Tumorzellen sowie die praktische Versuchsdurchführung ist in „Material und Methoden“ ausführlich geschildert. Im Gegensatz zu aus soliden Tumoren gewonnenen primären Zellen bestehen primäre leukämische aus über 90% Tumorzellen und enthalten in ihrer Population nur wenige normale Zellen.

Tabelle 8 zeigt die eingesetzten 11 Zytostatika und deren Konzentrationen. Da es sich bei den Patientenproben um leukämische Zellen handelt, fiel die Wahl der Substanzen

in erster Linie auf Zytostatika der zum Zeitpunkt der Versuchsreihen aktuellen Chemotherapie-Schemata. Daneben wurden auch weitere Zytostatika verwendet, die im Screening der Tumor-Zelllinien Proliferation verursacht haben, wie z.B. Epirubicin. Die Vorgehensweise zur Auswahl der Zytostatika-Konzentrationen ist in „Material und Methoden“ beschrieben.

<b>Zytostatikum</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Konzentration</b>
Cytosin-Arabinosid	Ara-C	10 $\mu$ M
Asparaginase	Asp	1 U/ml
Cyclophosphamid, akt.	Cyclo	0,1 $\mu$ M 0,3 $\mu$ M 1 $\mu$ M
Dexamethason	Dexa	10-5 M
Doxorubicin	Doxo	0,5 $\mu$ M
Epirubicin	Epi	28 nM
Methotrexat	MTX	10 $\mu$ M 30 $\mu$ M
Prednisolon	Pred	10-4 M
6-Thioguanin	6-TG	1 $\mu$ M
Vincristin	VCR	3 nM 10 nM 30 nM
Etoposid	VP-16	0,3 $\mu$ M 3 $\mu$ M

**Tabelle 8** Für die Stimulation primärer Tumorzellen eingesetzte Zytostatika

Aufgrund des variablen Wachstumsverhaltens der primären Zellen in Kultur wurden verschiedene Messmethoden angewendet. Für jede Patientenprobe wurden Apoptosemessungen mittels FACS-Analyse durchgeführt. Hiermit konnten erste Rückschlüsse auf apoptotische oder tumorerhaltende Effekte der Zytostatika erhalten werden (sogenannter „survival-Effekt“).

Da exakte Methoden zur Proliferationsmessung wie Mischtest und ATP-Test durch die geringe Größe und hohe Agglomerierungstendenz der primären Zellen auf Schwierigkeiten stießen, diente als grundlegender Anhaltspunkt zur Feststellung der Proliferation die Koloniebildung. Diese ist als synergistischer Effekt aus

Zellagglomeration und echter Zellproliferation durch Zellteilung anzusehen (vgl. „Material und Methoden“).

Da sich die leukämischen Patientenzellen nur in Suspension kultivieren ließen, war eine Proliferationsmessung mittels Cellscreen analog der MCF-7-Zellen unmöglich.

Auch aufgrund des kleinen Durchmessers der primären Leukämiezellen im Vergleich zu den größeren leukämischen Zelllinien hat die automatische Zellzählung zu technischen Problemen geführt und sich als zu ungenau erwiesen.

Der Cellscreen diente als automatisiertes Hochleistungsmikroskop mit eingebauter Digitalkamera und wurde zur Abscannung der Probenplatten und anschließender Messung der Kolonien eingesetzt.

Tabelle 9 zeigt die verwendeten Messmethoden, die je nach dem zur Verfügung stehenden Volumen der jeweiligen Patientenprobe durchgeführt wurden.

Pat.-Nr.	Kol. gezählt	Kol. Foto	Konz. gezählt	Mischtest	FSC	ATP
67	x		x	x		
69	x		x	x	x	
73	x		x	x	x	
74	x		x	x	x	
80					x	
81	x		x	x	x	
82	x		x	x	x	
92			x		x	
93			x	x	x	
96	x		x	x	x	
106	x		x	x		
111	x	x			x	x
114	x	x		x	x	x
119	x	x		x	x	x
121		x			x	
124	x	x			x	
128					x	
129	x				x	
131	x	x			x	x
133		x			x	
136a	x	x			x	
136b	x	x			x	
139	x				x	
140	x				x	

**Tabelle 9** Übersicht der bei den primären Zellproben eingesetzten Messmethoden

---

### **3.2 Zytostatika reduzierten die Apoptoserate von primären Tumorzellen und wirkten tumorerhaltend.**

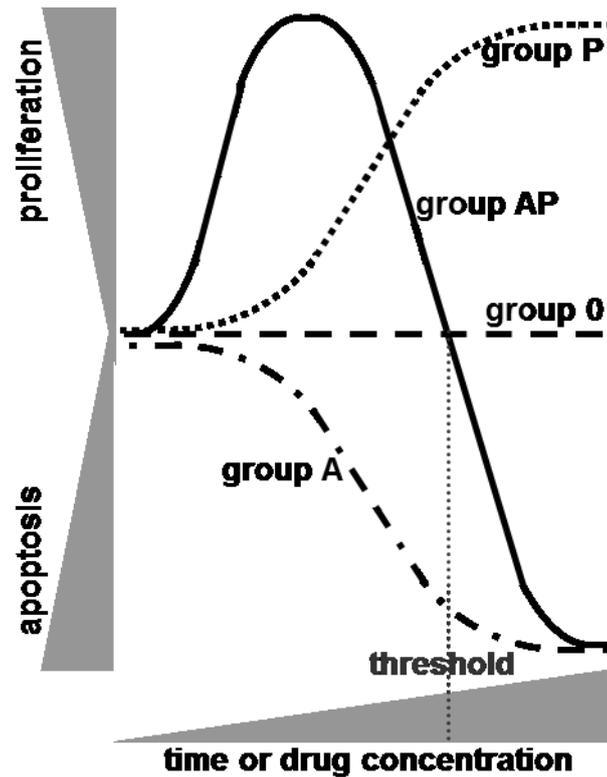
Alle 74 Patientenproben wurden mittels FACS-Analyse auf die Apoptoserate nach 24 bis 48 Stunden untersucht. Zytostatika beeinflussten die Apoptoserate von primären Tumorzellen auf unterschiedliche Weise, weswegen die Reaktion in Gruppen eingeteilt wurde (vgl. Kap.2):

Proben wurden in die Gruppe A eingeteilt, wenn ein spezifisches Survival (s. Material und Methoden) von weniger als 0,9 auftrat, d.h. in den Zellen fand Apoptoseinduktion durch das Zytostatikum statt.

Proben wurden der Gruppe 0 zugeteilt, wenn sich die Zellen nahezu indifferent gegenüber der Zytostatika-Einwirkung verhielten; die Werte für das spezifische Survival lagen hier zwischen 0,9 bis 1,1.

Proben wurden der Gruppe P zugeordnet, wenn dieser Wert über 1,1 lag. Hier erfolgte eine Reduzierung der Apoptoserate gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen. In diese Gruppe wurden Substanzen eingeordnet, die eine tumorerhaltende oder sogar tumorvermehrnde Wirkung ausübten. Bei diesen Proben wurde eine Zählung der Kolonien durchgeführt, wobei eine Kolonienzunahme um mindestens 110% im Vergleich zu den Kontrollzellen als Proliferationseffekt galt. Proben wurden der Gruppe AP zugeordnet, wenn nach oder auch während der Proliferation Apoptose auftrat. Da die primären Zellen bereits nach kurzer Kultivierungszeit eine hohe Spontanapoptose aufwiesen, war diese Gruppe kaum von der Gruppe P abzugrenzen und wurde dieser bei der hier beschriebenen Klassifizierung zugerechnet.

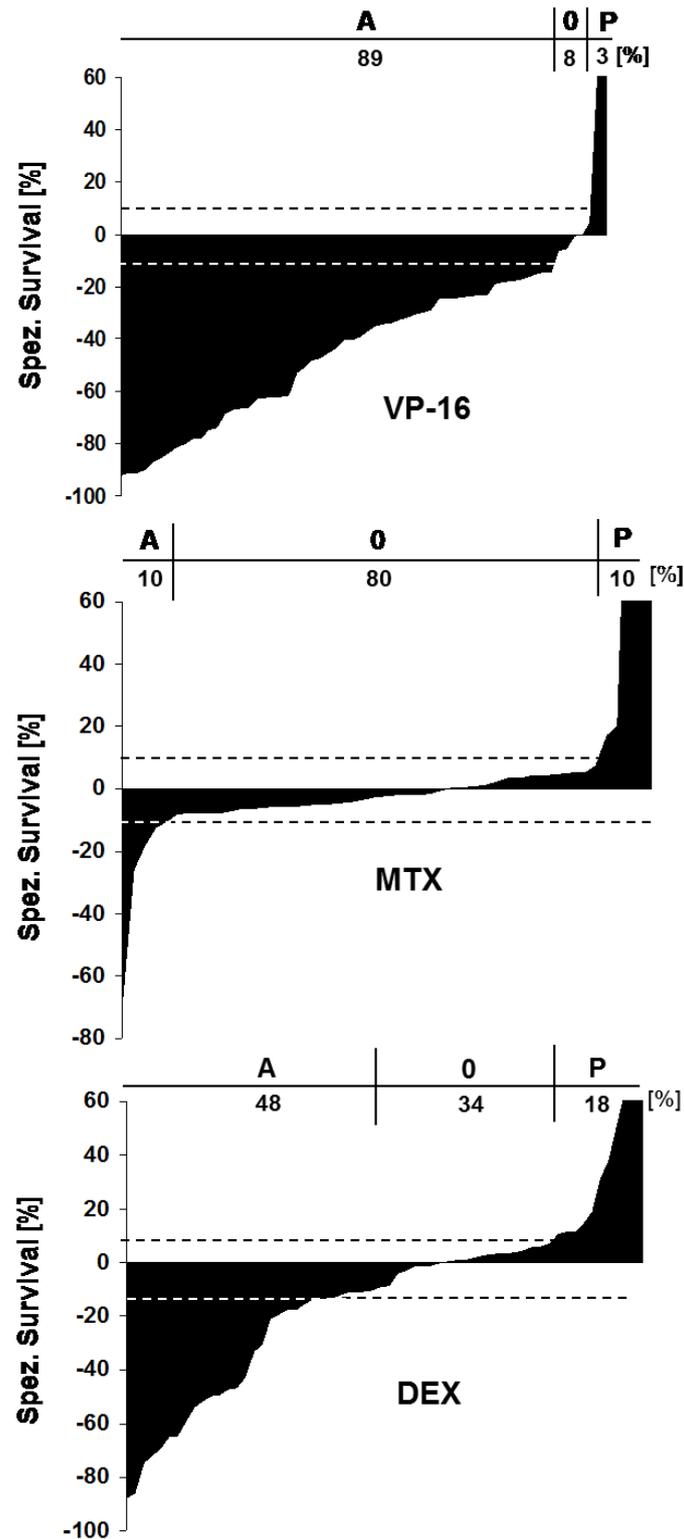
Abbildung 24 verdeutlicht die oben beschriebene Gruppeneinteilung von Tumorzellen aufgrund ihres Wachstums nach Zytostatika-Stimulation.



**Abbildung 24 Gruppeneinteilung von Tumorzellen gemäß ihrer Reaktion auf Zytostatika**

Zytostatika verursachten Apoptose auf Zellen der Gruppe A, zeigten keinen Einfluß auf das Wachstum von Zellen der Gruppe 0, induzierten Proliferation ohne oder mit anschließender Apoptose in Zellen der Gruppe P bzw. AP.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Stimulation von 74 primären Proben mit 3 ausgewählten Zytostatika.



**Abbildung 25 Apoptoseinduktion durch Zytostatika in primären Tumorzellen**

Primäre Tumorzellen wurden mit dem jeweiligen Zytostatikum stimuliert (VP-16 3  $\mu\text{M}$  und  $n=62$ , MTX 30  $\mu\text{M}$  und  $n=49$ , Dex  $10^{-5}$  M und  $n=62$ ) und nach 24 und/ oder 48 Stunden die Apoptoserate durch FSC-SSC-Messung ermittelt. Das „spezifische survival“ wurde wie in „Material und Methoden“ berechnet.

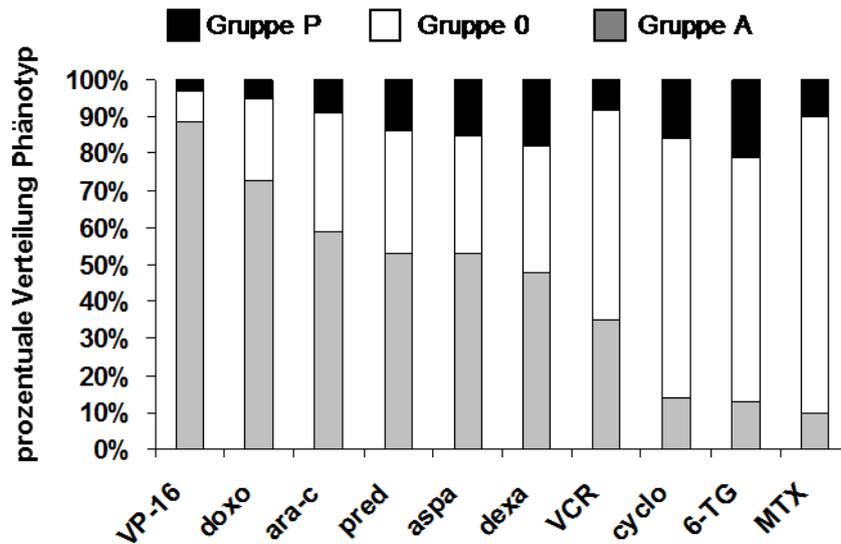
Während bei Etoposid (VP-16) die Apoptose-Induktion in 89% der Proben im Vordergrund stand, ließ MTX in 80% der Proben das Zellwachstum unbeeinflusst und Dexamethason zeigte mit 18% den höchsten Anteil an anti-apoptotischer und tumorerhaltender Wirkung. Diese war umso erstaunlicher, weil primäre Patientenzellen typischerweise eine hohe Spontanapoptose aufwiesen.

Um zu untersuchen, ob es sich um einen Glucocorticoid-spezifischen Effekt handelt, wurde das spezifische Survival von Dexamethason gegen das von Prednisolon aufgetragen (Daten nicht gezeigt).

Die Werte des spezifischen survival von DEXA ( $10^{-5}$  M) wurden gegen die Werte des spezifischen survival von PRED ( $10^{-4}$  M) aufgetragen. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient  $r = 0,9$ ,  $p < 0,001$  (Pearson Product Moment Correlation).

Die Induktion der Apoptose als auch des vermehrten Überlebens korrelierten eng bei den beiden Substanzen. Somit konnte eine völlig neue, tumorschützende Funktion von Glucocorticoiden auf primären Tumorzellen beschrieben werden.

Abbildung 26 zeigt die Gruppenverteilung für alle eingesetzten Substanzen.



**Abbildung 26 Häufigkeit der Gruppen A, 0 und P in primären Tumorzellen**

Primäre Tumorzellen wurden mit dem jeweiligen Zytostatikum stimuliert und nach 24 und/ oder 48 Stunden die Apoptoserate durch FSC-SSC-Messung ermittelt. Zur Definition der Gruppen wird auf den Text verwiesen. Abkürzungen: VP-16 = Etoposid (n=62), doxo = Doxorubicin (n=37), ara-c = Cytosinarabinosid (n=37), pred = Prednisolon (n=55), aspa = Asparaginase (n=60), dexta = Dexamethason (n=62), VCR = Vincristin (n=37), cyclo = aktiviertes Cyclophosphamid (n=57), 6-TG = 6-Thioguanin (n=62), MTX = Methotrexat (n=49). Die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 9 angegeben. Zur Erläuterung der Gruppenbezeichnungen (A,O,P) sei auf den Text verwiesen.

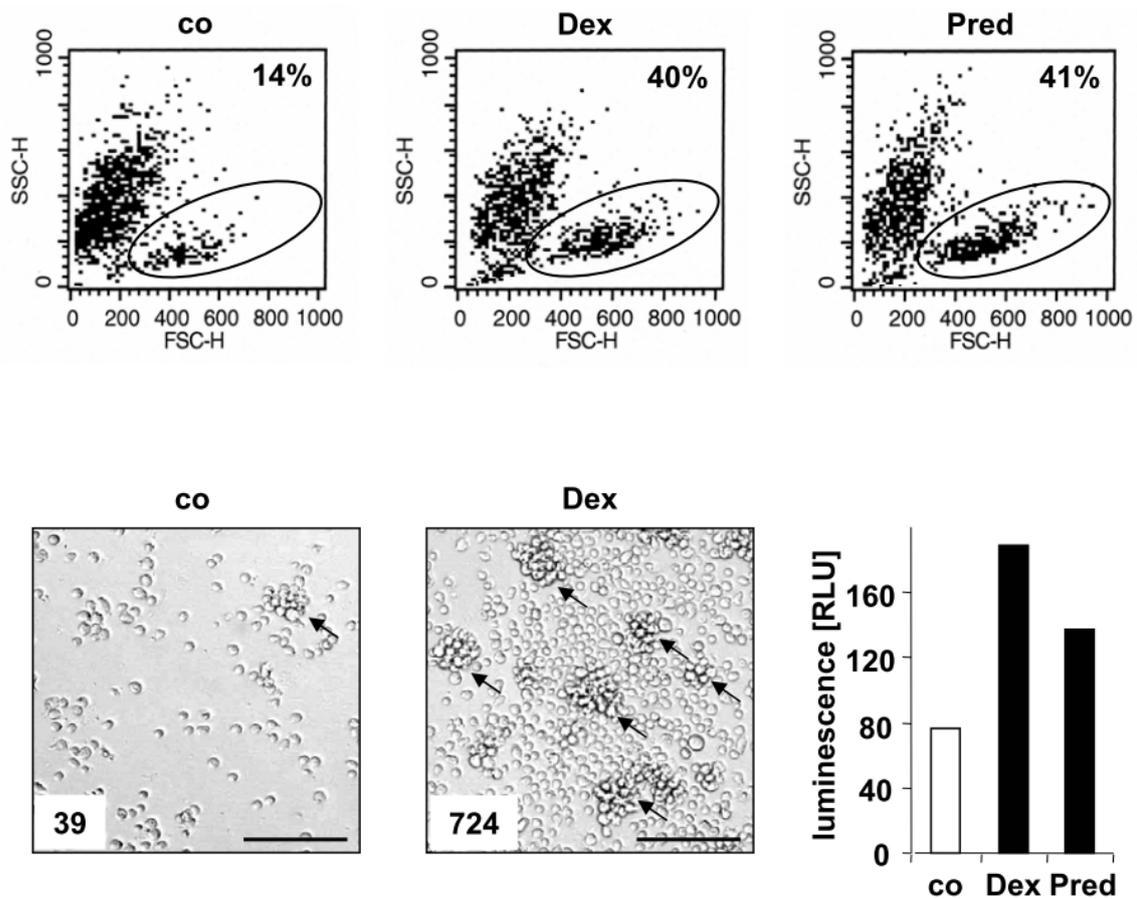
Während Etoposid und Doxorubicin zu den am stärksten Apoptose induzierenden Substanzen gehörten, fand sich bei Methotrexat und Cyclophosphamid ein großer Anteil an Proben, die durch die Zytostatika-Stimulation weitgehend unbeeinflusst blieben. Auffallend war der relativ hohe Anteil (21% bzw. 18%) an Gruppe P-Proben nach Inkubation mit 6-Thioguanin und Dexamethason. Hier könnte ein Hinweis auf eine Proliferationsinduktion durch diese Substanzen liegen.

### **3.3 Zytostatika verursachten in 28,4% der Proben vermehrte Zellproliferation von primären Tumorzellen.**

Wie bereits erwähnt unterlagen die primären Tumorzellen einer hohen spontanen Apoptoserate der Kontrollzellen, so dass für verschiedene Messungen zu mehreren Zeitpunkten meist keine Zeit blieb. Die Patientenproben mussten nach mindestens 24 Stunden in die Kategorien „nicht-proliferierend“ und „proliferierend“ eingestuft werden, um die richtige Messtechnik anzuwenden. Dies war im Fall einer Kolonienbildung der

Tumorzellen am einfachsten. Positive Werte des spezifischen Survival (P-Phänotyp) zeigten zwar den anti-apoptotischen, jedoch noch nicht den proliferativen Effekt des Zytostatikums. Bedingung für die Einstufung als echt proliferierende Probe waren Proliferationswerte von mindestens 110% (s. „Material und Methoden“) bei mindestens einer der in Tabelle 9 genannten Messmethoden.

Abbildung 27 zeigt beispielhaft die FSC-SSC-Daten und die Kolonienbildung einer proliferierenden Patientenprobe (cALL).



**Abbildung 27 Dexamethason förderte das Überleben und das Wachstum primärer leukämischer Zellen.**

Die obere Bilderreihe zeigt die Original-FACScan-Daten 48 Stunden nach Stimulation mit DEXA bzw. PRED. Die untere Bilderreihe zeigt die lichtmikroskopischen Bilder (links) und die ATP-Messung (rechts) nach 24 Stunden. Die Pfeile markieren die Kolonien, die Zahlen in den Fotos sind die Anzahl der (verblindet) gezählten Kolonien in einem Well mit 105 ausgesäten Zellen.

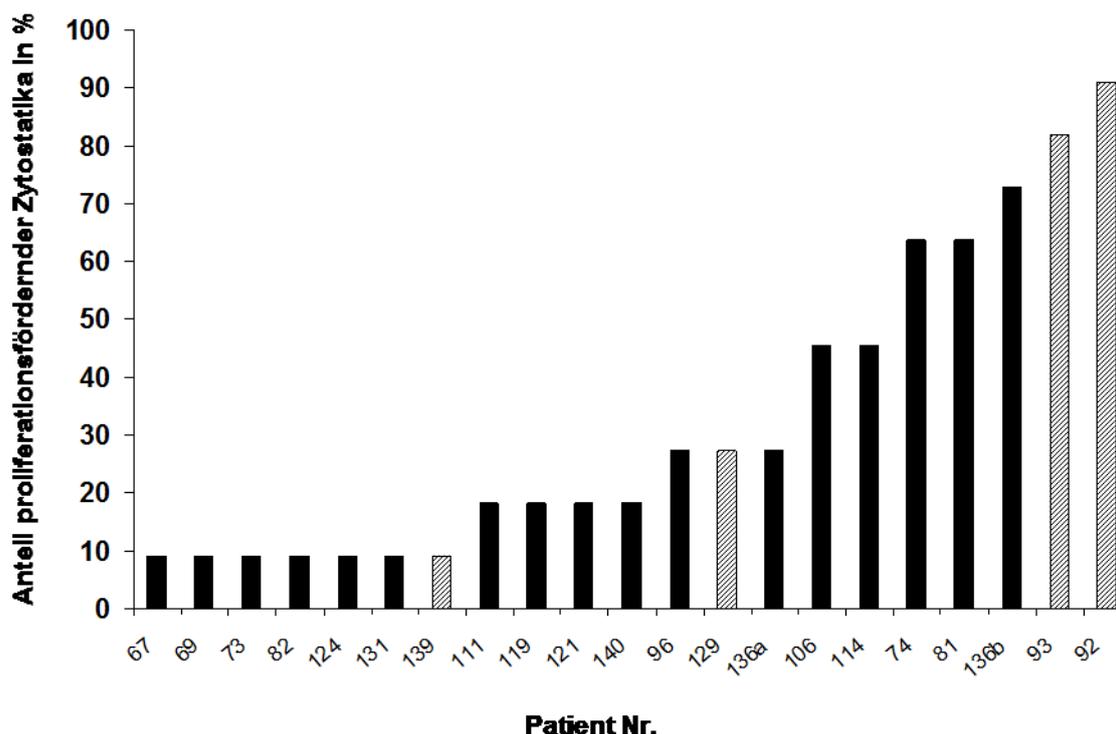
Die Apoptosemessung im FACS ergab 14% überlebende Zellen in der Kontrolle, während durch die Glucocorticoid-Zugabe dieser Anteil auf 40% bzw 41% gesteigert

werden konnte, was auf eine starke anti-apoptotische Wirkung von Dexamethason und Prednisolon hinwies.

Während die primären Leukämiezellen praktisch kein Spontanwachstum aufwiesen, führte DEXA zur Neubildung einer hohen Anzahl großer Zellkolonien. In dieser Probe konnte sogar nachgewiesen werden, dass die starke Kolonienbildung von einer messbaren Erhöhung des intrazellulären ATP-Gehaltes begleitet wurde.

Auch wenn es sich bei Abbildung 27 als Einzelfall um eine außergewöhnlich stark proliferierende Patientenprobe handelt, konnte doch eindrucksvoll gezeigt werden, dass das Phänomen der DEXA-induzierten Proliferation nicht auf solide Tumorzelllinien wie MCF-7 beschränkt blieb, sondern auch in hämatopoietischen Zellen auftrat.

Außer in der eben gezeigten, konnte in weiteren 20 (insgesamt 21) von 74 getesteten Patientenproben nach Stimulation mit Zytostatika Proliferation gemessen werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28 Primäre Zellen von 21 Patientenproben (entspricht 28,4%) proliferierten auf Zytostatika.**

Dargestellt sind 21 proliferierende Patientenproben, geordnet nach der Häufigkeit der Proliferation induzierenden Zytostatika. Pro Patientenprobe ist der Prozentanteil der proliferationsfördernden Zytostatika in Bezug auf alle 11 getesteten Substanzen gezeigt. Bei Patientenproben mit schraffiertem Balken trat in der unbehandelten Kontrolle keine Kolonienbildung auf; bei Patientenproben mit schwarzem Balken wurde Kolonienbildung in der Kontrolle beobachtet.

In 4 der 21 proliferierenden Proben (Nr. 139, 129, 93, 92) wurde in der unbehandelten Kontrollprobe keine spontane Kolonienbildung beobachtet. Auffallend war die starke Proliferation in den Proben 93 und 92, die durch 10 bzw. 9 verschiedene Substanzen hervorgerufen wurde.

Während die Proliferationseffekte meist nach 24 Stunden auftraten, wurde in Probe 131 der Effekt erst nach 48 Stunden gemessen.

Die Proben 136a und 136b stammten vom gleichen Patienten, wodurch erstmals die Kontinuität des Proliferationseffektes gemessen und gezeigt werden konnte, wenn auch aus technischen Gründen die Anzahl der proliferations-vermittelnden Substanzen abwich.

Zur Untersuchung subtoxischer Zytostatika-Konzentrationen wurde ab Patient 131 ergänzend mit einem Hundertstel der maximalen Plasma-Konzentration stimuliert, was bei den Proben 136a und 136b zu Proliferation führte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Zytostatika-induzierte Überleben und die Proliferation nicht nur bei soliden Tumor-Zelllinien auftraten, sondern in primären Leukämiezellen ein prozentual noch häufigeres Phänomen darstellten, das besonders Glucocorticoide, aber auch andere Substanzen betraf.

## **4 Umwandlung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in Apoptose**

Bisher wurde gezeigt, dass Epirubicin auf MCF-7-Zellen in niedrigen Konzentrationen Proliferation und in hohen Konzentrationen Apoptose auslöst, also einen AP-Phänotyp hervorruft. Darauf aufbauend fragten wir nun, wie man dieses Gleichgewicht in Richtung zur Apoptose verschieben könnte. Hierzu wurden Substanzen eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie einen bestimmten Proliferations-Signalweg in der Zelle blockieren. So wurden Substanzen ermittelt, die MCF-7-Zellen für Epirubicin-induzierte Apoptose sensitivierten.

### **4.1 Übersicht der sensitivierenden Agentien**

Von den verwendeten Agentien (Tabelle 10) ist bekannt, dass sie in hohen Konzentrationen unterschiedliche Punkte der Proliferations-Signalwege blockieren und somit das reguläre Wachstum der Zelle inhibieren.

Um einer einfachen technischen Durchführbarkeit willen wurde dabei Epirubicin in einer Konzentration eingesetzt, die bereits alleine eine gewisse Apoptose-Induktion bewirkte. Für jede Kombination wurden mindestens zwei Versuche über 3 bis 5 Tage durchgeführt und die Apoptoserate mittels Nicoletti- oder Annexin-V-Färbung ermittelt (vgl. „Material und Methoden“). Da Dexamethason keine Apoptose auf MCF-7 induzieren konnte (P-Phänotyp), wurde die Versuchsreihe nur mit Epirubicin durchgeführt.

Trat in einer Kombination aus Zytostatikum und Sensitivierungs-Agens eine signifikante Erhöhung (Fractional Product  $> 0,1$ , vgl. „Material und Methoden“) der Apoptoserate auf, dürfte auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen der proliferationsfördernden

Wirkung des Zytostatikums und dem Angriffspunkt des Sensitivierungs-Agens geschlossen werden.

Dieser Hinweis musste durch direkte Inhibitions-Versuche mit proliferationsfördernden Konzentrationen der Zytostatika verifiziert werden.

<b>Name der Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Wirkmechanismus</b>
Ara-C	10-100 µM	DNA-Polymerase-Hemmung
5-FU	100 µM	Thymidylatsynthese-Hemmung
Doxorubicin	100-1000 ng/ml	DNA-Interkalation
MTX	0,1-1 µM	Folsäure-Reduktase-Hemmung
Daunorubicin	100 ng/ml	DNA-Interkalation
Asparaginase	1 U/ml	L-Asparagin-Hydrolyse
Pentoxifyllin	2 mM	G2-Checkpoint-Hemmung
2-Deoxyglucose	5 mM	Hemmung des Glucose-Metabolismus
Norleu	6-12 µM	NF-κB-Hemmung
SN50	1 µM	NF-κB-Hemmung
6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline UO126	1 µM	NF-κB-Hemmung
SP600125	0,1-10 µM	MAPK-Hemmung
Wortmannin	1-8 µM	JNK-Hemmung
Actinomycin D	1-10 µM	PI3K-Hemmung
Cycloheximide	1-10 ng/ml	Proteasom-Hemmung
Cyclosporin A	2-500 ng/ml	Proteasom-Hemmung
PKC-Inh.	0,5-5 µM	Proteasom-Hemmung
BH31-2'	4 µM	PKC-Hemmung
DCPE	5-20 µM	Bcl-XI-Hemmung
p38-MAPK-Inhibitor	20-80 µM	Bcl-XI-Hemmung
	1-3 µM	p38-MAPK-Hemmung

**Tabelle 10**    **Verwendete subtoxische Konzentrationen und Wirkmechanismen der sensitivierenden Agentien, die mit Epirubicin und Dexamethason kombiniert wurden**

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich wird, blockieren die für Apoptose sensitivierenden Agentien mehr oder weniger spezifisch verschiedene Signalwege, die am spontanen Zellwachstum beteiligt sind. Zu den weniger spezifisch wirkenden Substanzen zählen

---

die durch unterschiedliche Mechanismen antiproliferativ wirkenden Zytostatika (s. Einleitung) sowie das Glucosederivat 2-Deoxyglucose. Sehr spezifisch greift Pentoxifyllin in den Zellzyklus und somit in die Zellvermehrung ein; alle anderen genannten Agentien blockieren direkt Wachstumsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B) oder die Mediatoren der eng verknüpften Apoptose- und Proliferationswege (z.B. MAPK, Bcl-XI).

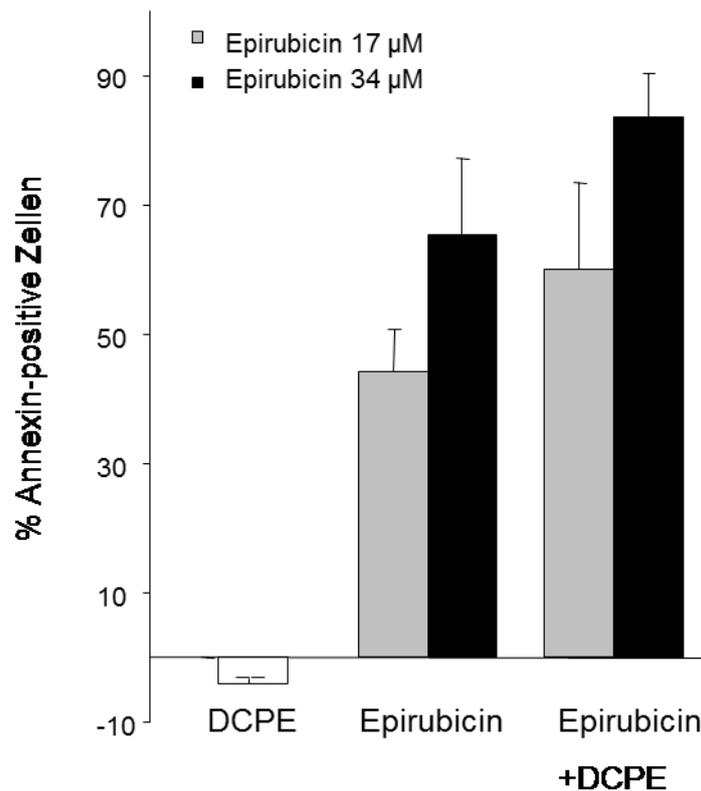
Im Folgenden werden die Kombinationen vorgestellt, in denen das für Apoptose sensitivierende Agens eine Steigerung der Zytostatika-vermittelten Apoptose bewirkt hat, so dass sich FP-Werte größer 0,1 ergaben und somit von einer synergistischen Wirkung der Stimuli ausgegangen wurde.

#### **4.2 Der Bcl-xL-Inhibitor DCPE erhöhte die Epirubicin-induzierte Apoptoserate.**

Die Inhibition von Bcl-xL, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, bewirkt eine Verstärkung der Apoptose von Tumorzellen, die diesen anti-apoptotischen Faktor häufig vermehrt produzieren (75,76).

Durch Bcl-xL-Inhibition konnte der Effekt zytostatischer Substanzen potenziert und hierdurch eine Verminderung der Dosierung bei der Chemotherapie erreicht werden.

Als Bcl-xL-inhibierende Substanz wurde 2,3-DCPE-Hydrochlorid (DCPE) verwendet, das in vielen Tumorzell-Linien mit einer  $IC_{50}$  zwischen 0,89 und 2,69 M Apoptose induziert, jedoch für normale Fibroblasten ungefährlich ist (77). In Bcl-xL-überexprimierenden Zellen verhindert DCPE die Proliferation, ohne jedoch Apoptose zu induzieren. Es verursacht einen Stillstand des Zellzyklus in der S-Phase sowie eine Hochregulation von p21 (78).



**Abbildung 29** Der Bcl-xL-Inhibitor DCPE steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.

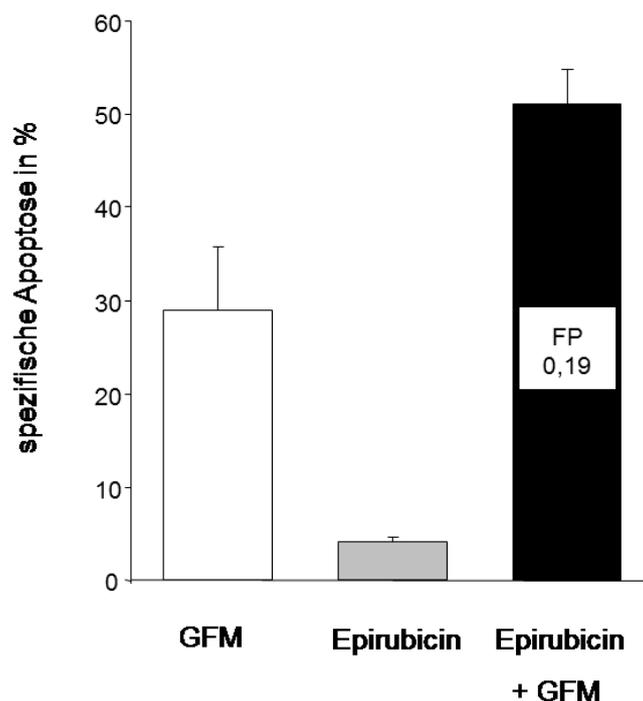
MCF-7-Zellen wurden für 48 Stunden in FCS-freiem Medium mit DCPE (80 µM) alleine, Epirubicin (17 bzw. 34 µM) alleine oder DCPE zusammen mit Epirubicin inkubiert. Den Anteil der Annexin-positiven Zellen ergab die FACS-Analyse dreier unabhängiger Experimente, woraus der FP-Wert berechnet wurde (vgl. „Material und Methoden“).

In Kapitel 2.1.1 wurden Wachstumskurven für verschiedene EPI-Konzentrationen gezeigt, in denen man die Verminderung der Zelldichte durch 17 µM EPI während der ersten 24 Stunden deutlich erkennt. Daher wurde für diesen Apoptose-Versuch eine EPI-Konzentration von mindestens 17 µM gewählt.

Während die 48-stündige Einwirkung von 17 bzw. 34 µM Epirubicin in serumfreiem Medium zu Apoptoseraten von 44,2% bzw. 65,3% führte, konnte dieser Effekt durch Zugabe des Bcl-xL-Inhibitors DCPE auf 59,9% bzw. 83,6% gesteigert werden. Die errechneten FP-Werte von 0,17 bzw. 0,2 wiesen auf eine deutliche synergistische Wirkung von DCPE hin.

### 4.3 Die Inkubation mit Glucose-freiem Medium erhöhte die Epirubicin-induzierte Apoptoserate.

Die Kultivierung von Zellen ohne Glucose-Zusatz führt bereits nach kurzer Zeit zu Störungen des Zellstoffwechsels aufgrund des Nährstoffmangels. Abbildung 30 zeigt die apoptotische Wirkung von Epirubicin unter Glucose-Entzug. Da eine relativ hohe Apoptoserate durch den Glucose-Entzug alleine zu erwarten war, wurde nur eine EPI-Konzentration ( $17\mu\text{M}$ ) für die Versuchsreihe verwendet (79).



**Abbildung 30** Glucose-freies Medium steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.

MCF-7-Zellen wurden für 48 Stunden in FCS- und Glucose-freiem Medium (GFM) ohne Epirubicin, in Glucose-haltigem Medium mit Epirubicin ( $17\mu\text{M}$ ) und in Glucose-freiem Medium mit Epirubicin ( $17\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Berechnung der spezifischen Apoptose erfolgte entsprechend des Anteils der DNA-Fragmentierung im Nicoletti-Test (vgl. „Material und Methoden“). Der angezeigte FP-Wert ergab sich aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die spezifische Apoptose lag nach 48 Stunden bei 28,9%, wohingegen  $17\mu\text{M}$  Epirubicin nur 4% spezifische Apoptose verursachte. Im Gegensatz zur Annexin-Färbung stellt der Nicoletti-Test eine Messung der späten Apoptose-Ereignisse dar (DNA-Fragmentierung, s. „Material und Methoden“), worin der niedrige Wert der spezifischen Apoptose nach 48 Stunden begründet ist. Die 48-stündige Inkubation von

Epirubicin in Medium, das weder FCS noch Glucose enthält, verursachte eine Erhöhung der spezifischen Apoptose auf 51,1%.

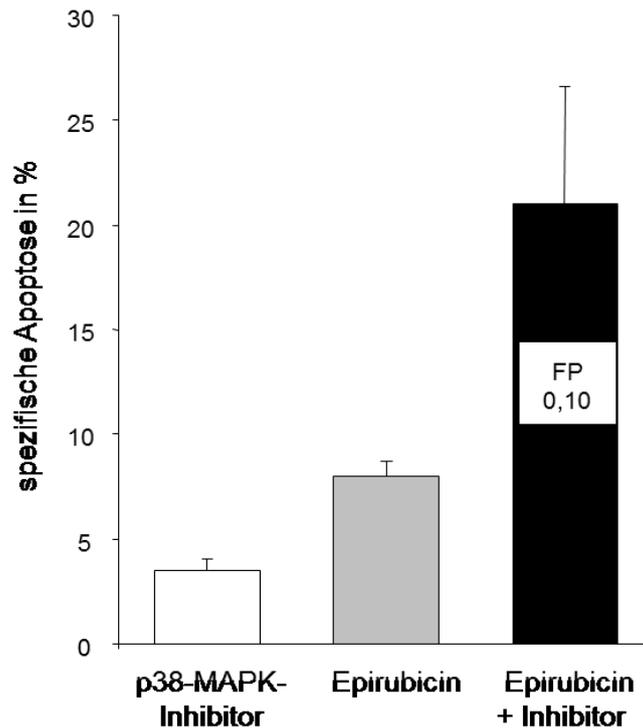
Glucose-Entzug erhöhte die Sensitivität der MCF-7 gegenüber EPI-induzierter Apoptose mit einem FP von 0,19.

Für Versuche zur Inhibition von Zellproliferation eignete sich das glucosefreie Medium jedoch nicht, da hier der Effekt des Glucose-Entzugs alleine schon zu einer hohen Apoptoserate führte, die einer Zytostatika-induzierten Proliferation entgegengewirkt hätte.

#### **4.4 Die Inhibition von p38-MAPK führte zur Erhöhung der Epirubicin-induzierten Apoptoserate.**

Die p38-Proteine sind Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK), die eine Vielzahl an biologischen Effekten bei der Steuerung von Proliferationsprozessen bewirken können. Aktivierung von p38 führt in manchen Fällen zur Apoptose-Steigerung, in anderen Fällen wirkt p38 antiapoptotisch (80).

Die Konzentration des Inhibitors wurde so gewählt, dass dieser bei alleiniger Inkubation keinen apoptosefördernden Effekt aufwies und die spezifische Apoptose unter 5% lag.



**Abbildung 31 Inhibition der p38-MAPK steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden für 48 Stunden ohne FCS mit dem p38MAPK-Inhibitor (1  $\mu$ M) alleine, Epirubicin (17  $\mu$ M) alleine oder dem Inhibitor und Epirubicin zusammen inkubiert. Die Messung der DNA-Fragmentierung erfolgte mittels Nicoletti-Test, woraus der FP-Wert aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet wurde.

Während Epirubicin alleine nach 48 Stunden 8% spezifische Apoptose in serumfreiem Medium bewirkte, erhöhte die Kombination mit dem p38-MAPK-Inhibitor die spezifische Apoptose auf 21%. Das FP lag mit 0,1 niedriger als bei der Inkubation mit EPI in glucosefreiem Medium. Die Inhibition des p38-MAPK-Signalweges führte somit zur Verstärkung der EPI-induzierten Apoptose.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Blockade von unterschiedlichen Proliferations-Signalwegen Epirubicin-induzierte Apoptose auf MCF-7 verstärkten. Die gezielte Blockierung von Proliferations-Signalwegen bewirkt also, dass Gruppe AP MCF-7-Tumorzellen für Apoptose-Induktion durch Epirubicin sensitiviert werden. Es muss weiter untersucht werden, ob die Blockierung von Proliferations-Signalwegen generell einen geeigneten Weg darstellt, um Gruppe AP-Tumorzellen für Apoptose-Induktion zu sensitivieren.

## 5 Inhibierung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in MCF-7-Zellen

Um erste Aufschlüsse über die intrazellulären Signalwege der Zytostatika-vermittelten Proliferation zu gewinnen, wurden Versuche zur Proliferations-Inhibierung mit Substanzen durchgeführt, die das Zellwachstum auf unterschiedliche Weise blockierten. Aufgrund der Konstanz des Effektes und der Reproduzierbarkeit der Messungen fanden für die Versuchsreihen MCF-7-Zellen Verwendung, die mit DEXA und EPI inkubiert wurden. Die proliferative Wirkung beider Wirkstoffe konnte durch eine Hemmung der p38-MAPK sowie durch eine Hemmung von NF- $\kappa$ B verhindert werden.

### 5.1 Übersicht der Inhibitoren und ihrer zellulären Angriffspunkte

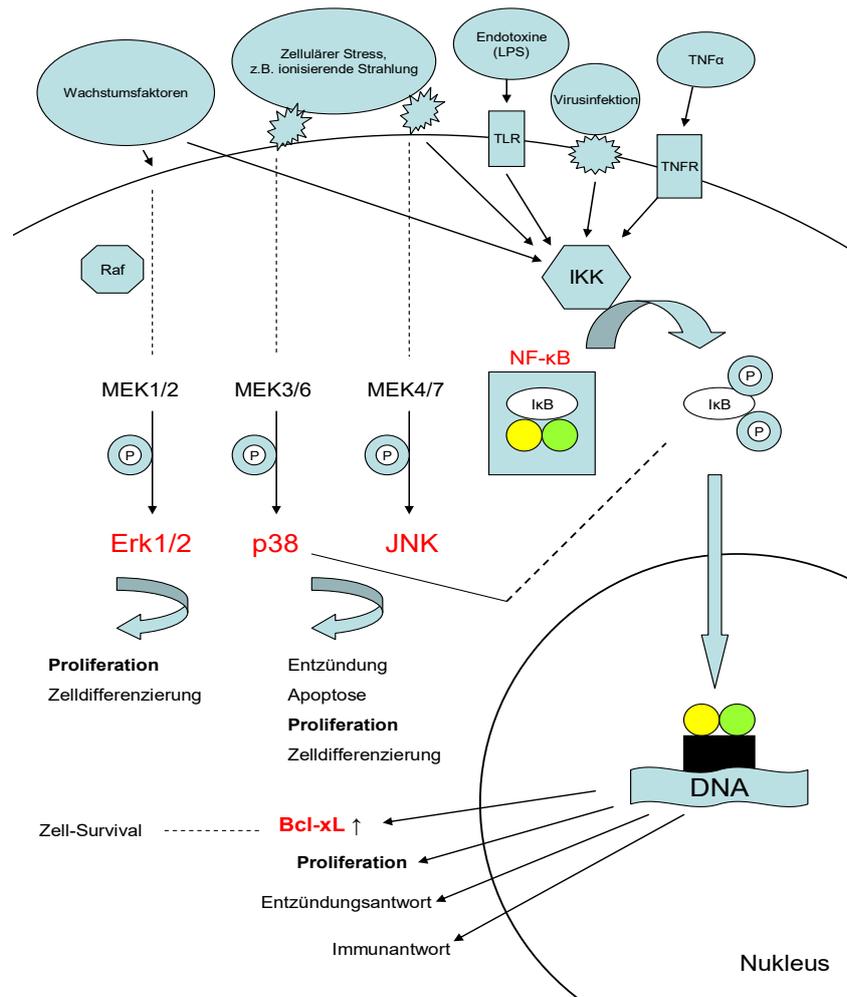
Im vorangegangenen Kapitel wurde beschrieben, wie die durch apoptotische Epirubicin-Konzentrationen verursachte Apoptose durch die Inhibierung von Bcl-xL und p38-MAPK sowie durch die Kultivierung in Glucose-freiem Medium erhöht werden konnte. Aufgrund dieser Sensitivierungsversuche wurden anschließend Experimente zur Proliferations-Hemmung durchgeführt. Hierbei fanden Inhibitoren in einer Konzentration Anwendung, die keinen Einfluss auf das Spontanwachstum der MCF-7-Zellen ausübten. Die Inkubation mit proliferationsfördernden Konzentrationen an EPI bzw. DEXA erfolgte bei verschiedenen FCS-Konzentrationen und die Ermittlung des Zellwachstums mittels Cellscreen.

Name der Substanz	Konzentration ( $\mu$ M)	Wirkmechanismus
2,3-DCPE	20-80	Inhibition von Bcl-xL
SN50	1	NF- $\kappa$ B-Inhibition
Quinazolin-Derivat	1	NF- $\kappa$ B-Inhibition
p38-MAPK-Inhibitor	1 und 3	Inhibition der p38-MAPK
ERK-Inhibitor	1 und 10	Inhibition der ERK
JNK-Inhibitor	0,1 und 1	Inhibition der JNK
UO126	0,1-10	Inhibition der MEK
Casp-3+/+ Zellen		Überexpression von Caspase3

**Tabelle 11** Verwendete subtoxische Konzentrationen und Wirkmechanismen der inhibitorischen Agentien, die mit Epirubicin und Dexamethason kombiniert wurden (Quinazolin-Derivat= 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazolin)

Als Inhibitoren wurden Substanzen ausgewählt, die an verschiedenen Regulationstellen für Proliferations- und Überlebensprogramme eingreifen, die sich überschneiden können und deren komplexe Zusammenhänge zum Teil noch nicht vollständig geklärt sind.

Abbildung 32 stellt die Zusammenhänge und Verschaltungen der Signalwege dar, in denen die eingesetzten Inhibitoren ihre Angriffspunkte besitzen.



**Abbildung 32 Signalwege der Zellproliferation**

Durch verschiedene externe Stimuli werden Signalwege aktiviert, die zur Bildung von Erk1/2, p38, JNK und NF- $\kappa$ B führen und somit Zellproliferation fördern. Zu näheren Erläuterungen wird auf den Text verwiesen (modifiziert nach 81,82,83).

Als essentieller Botenstoff für Zellproliferationsvorgänge ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B anzusehen, der bei der Immunantwort, entzündlichen Vorgängen sowie Stress-Stimuli aktiviert wird. Beim klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg erfolgt Aktivierung einer I $\kappa$ B-

Kinase, Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B-Komplexes und schließlich die Freisetzung von NF- $\kappa$ B. Nach der Translokation in den Nukleus erfolgt die Bindung an den Promoter von bis zu 150 Genen, wodurch u.a. die Produktion der anti-apoptotischen Substanz Bcl-xL angeregt wird.

Wachstumsfaktoren sowie äußere Einflüsse wie zellulärer Stress und ionisierende Strahlung können auch eine Aktivierung der verschiedenen MEK-Signalkaskaden anregen, was wiederum zur Aktivierung von wichtigen pro-proliferativen Botenstoffen wie Erk, p38 und JNK führt.

## 5.2 Kriterien der Versuchsdurchführung und Auswertbarkeit

Für die Auswertbarkeit der Inhibitionsversuche wurden folgende Kriterien festgelegt:

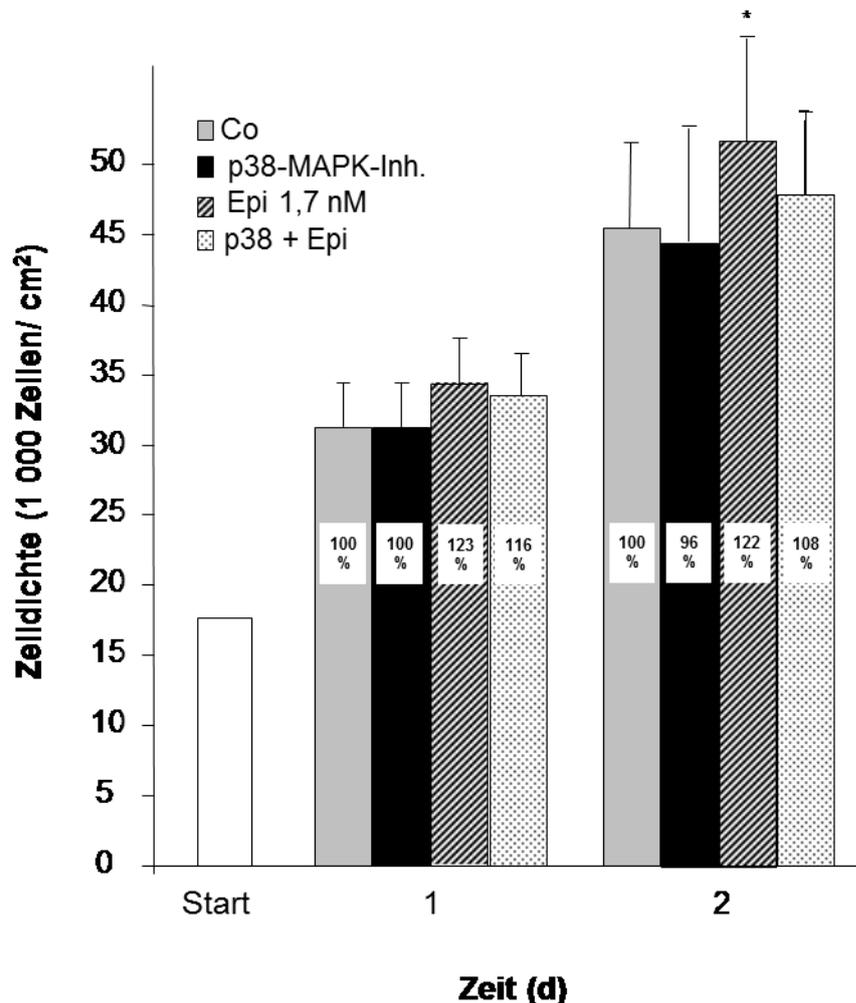
- (1) Die Bedeckung der Wells mit Zellen sollte mindestens 5% und maximal 40% betragen. Wie Vorversuche gezeigt haben, war bei einer Bedeckung mit mehr als 40% der Well-Fläche das Spontanwachstum bereits eingeschränkt.
- (2) Der Inhibitor durfte das Spontanwachstum nicht einschränken, d.h. die Proliferationsrate musste zwischen 80% und 120% liegen. Sollte der Inhibitor alleine in einzelnen Versuchen Proliferation vermitteln, musste der Wert unter 200% bleiben.
- (3) Das Zytostatikum musste mindestens 120% Proliferation verursachen, damit die eventuelle Verminderung der Proliferation gemessen werden konnte.
- (4) Die unbehandelten Kontroll-Zellen sollten zumindest innerhalb der ersten 24 Stunden wachsen, auch wenn der Versuch ohne FCS durchgeführt wurde.

Dass unter Einhaltung dieser festgelegten Auswertbarkeitskriterien nur 30% der durchgeführten Experimente ausgewertet werden konnten, zeigt die Empfindlichkeit von Proliferationsexperimenten gegenüber äußeren Faktoren und zellinternen Veränderungen.

## 5.3 Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Epirubicin- und Dexamethason-vermittelte Proliferation.

Die p38-MAPK beeinflusst hauptsächlich durch Stresssignale hervorgerufene Reaktionen der Zelle, zu denen auch die Zellproliferation gehört.

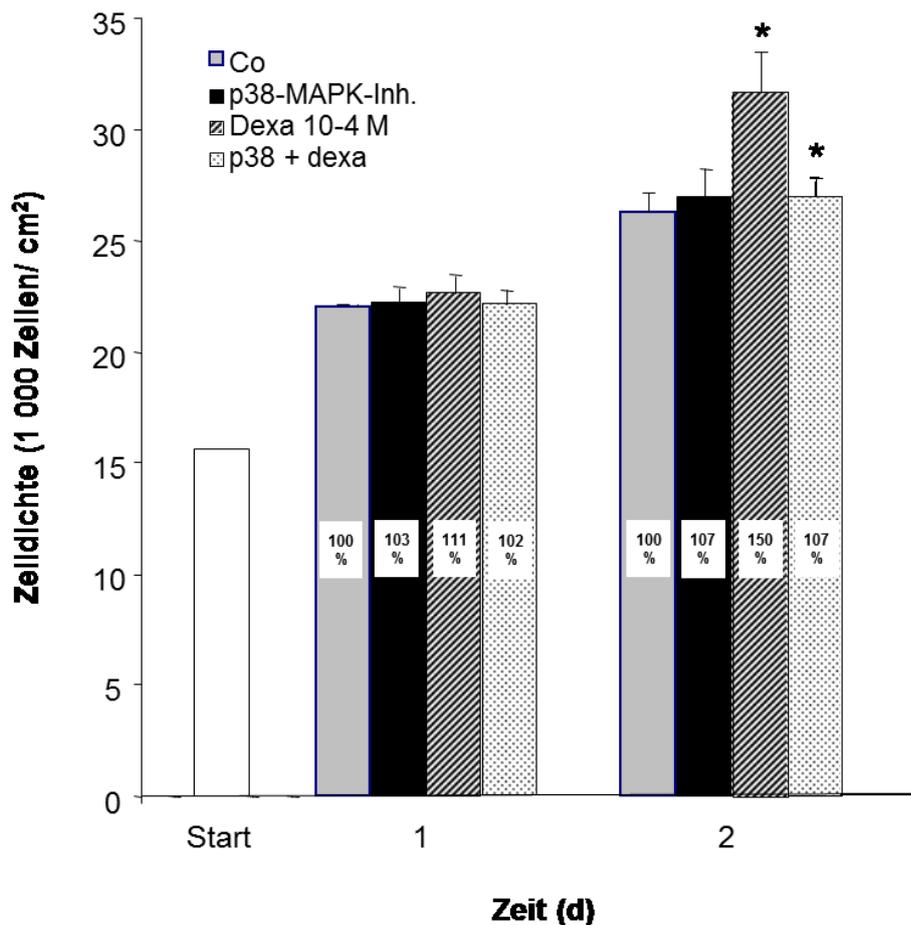
Unter Berücksichtigung der Kriterien zur Auswertbarkeit wurden Experimente mit Epirubicin und Dexamethason durchgeführt.



**Abbildung 33** Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Epirubicin-vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.

MCF-7-Zellen wurden über 48 Stunden (1% FCS) mit 3  $\mu$ M p38-MAPK-Inhibitor alleine, mit 1,7 nM Epirubicin alleine oder mit beiden Agentien zusammen inkubiert. Die Messung der Zellzunahme nach 24 und 48 Stunden erfolgte mittels Cellscreen und die Ermittlung der Proliferationsrate aus 5 unabhängigen Experimenten laut „Material und Methoden“. \*:  $P < 0,05$  verglichen mit Kontrolle unter Anwendung des paired t-test (s. „Material und Methoden“).

Die Inkubation mit 1,4 nM Epirubicin führte nach 24 Stunden zu 123% und nach 48 Stunden zu einer statistisch signifikanten Proliferation von 122%. Durch die Inhibition der p38-MAPK wurden diese Werte auf 116% nach 24 Stunden bzw. 108% nach 48 Stunden vermindert.



**Abbildung 34 Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Dexamethason-vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden ohne FCS über 48 Stunden mit 3  $\mu$ M p38-MAPK-Inhibitor alleine, mit 10<sup>-4</sup> M Dexamethason alleine oder mit beiden Agentien zusammen inkubiert. Die Messung der Zellzunahme nach 24 und 48 Stunden erfolgte mittels Cellscreen und die Ermittlung der Proliferationsrate aus 5 unabhängigen Experimenten laut „Material und Methoden“. \*: P < 0,05 verglichen mit Kontrolle unter Anwendung des paired t-test (s. „Material und Methoden“).

Während nach 24-stündiger DEXA-Einwirkung keine Proliferation über 120% gemessen wurde, trat nach 48 Stunden eine statistisch signifikante Proliferation von 150% für 10<sup>-4</sup> M Dexamethason auf. Die Inhibition der p38-MAPK bewirkte eine Reduzierung auf 107% Proliferation.

Sowohl bei Epirubicin als auch bei Dexamethason vermochte die Kombination mit dem p38-MAPK-Inhibitor die Zytostatika-vermittelte Proliferation zu verhindern oder signifikant zu reduzieren. Der Effekt trat bei beiden Substanzen nach 48 Stunden am deutlichsten auf.

---

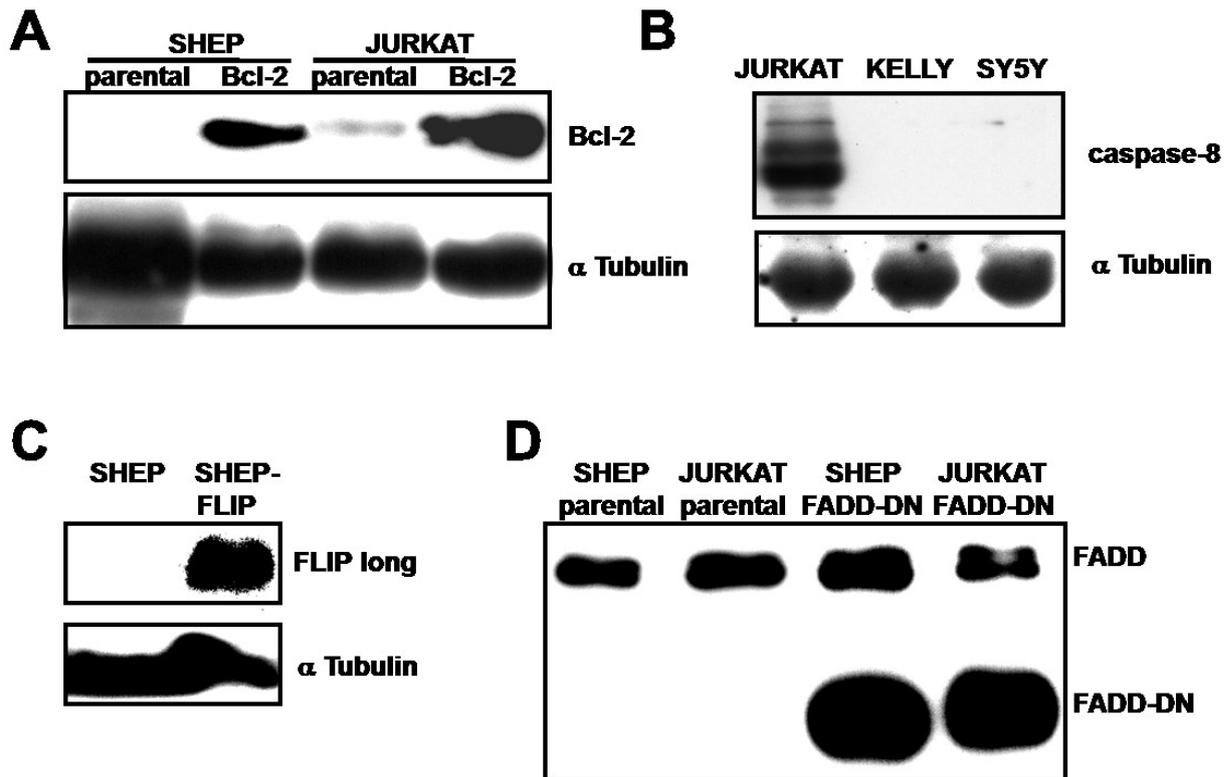
## 6 Mechanismus der Zytostatika-vermittelten Proliferation

Um den Mechanismus der Zytostatika-vermittelten Proliferation aufzudecken, wurde die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Botenstoffe nach Stimulation mit TRAIL, Dexamethason und Epirubicin im Western Blot und EMSA analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass EPI in MCF-7 die proliferationsfördernden Kinasen und DEXA speziell die p38-MAPK aktivierte.

### 6.1 Mechanismus der TRAIL-vermittelten Proliferation

TRAIL führt zu Proliferation mancher, aber nicht aller Tumorzellen. Die Fragestellung war nun, welche Signalschritte dafür verantwortlich waren, ob TRAIL Proliferation oder Apoptose vermittelt.

Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene transgene Tumorzellen eingesetzt, die durch Veränderung in einem definierten Signalprotein ihre Sensitivität für TRAIL-vermittelte Apoptose verloren hatten. Sowohl JURKAT als auch SHEP Zellen sind hochsensitiv für TRAIL-vermittelte Apoptose. Von beiden Zelllinien existieren derivative Zelllinien, denen ein bestimmtes Signalprotein fehlt bzw. dysfunktional vorliegt, so dass die Zelllinien ihre TRAIL-Sensitivität partiell oder komplett verloren. Es handelt sich dabei um JURKAT und SHEP, die infolge von Transfektion mit Bcl-2, FLIP oder dysfunktionalem FADD Apoptose-Defekte aufwiesen (JURKAT-Bcl-2, SHEP-Bcl-2, SHEP-FLIP, JURKAT-FADD-DN, SHEP-FADD-DN). Nach chemischer Mutagenese oder verlängerter TRAIL-Inkubation entstanden transgene Zelllinien (J-TR, CEM-TR), die durch den Verlust von Caspase-8 charakterisiert waren (JURKAT w/o Casp-8).



**Abbildung 35** Charakterisierung der transgenen Zelllinien

Western Blots wurden mit 10  $\mu$ g Zellprotein durchgeführt; die eingesetzten Antikörper sind in „Material und Methoden“ aufgeführt. Als Ladungskontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin.

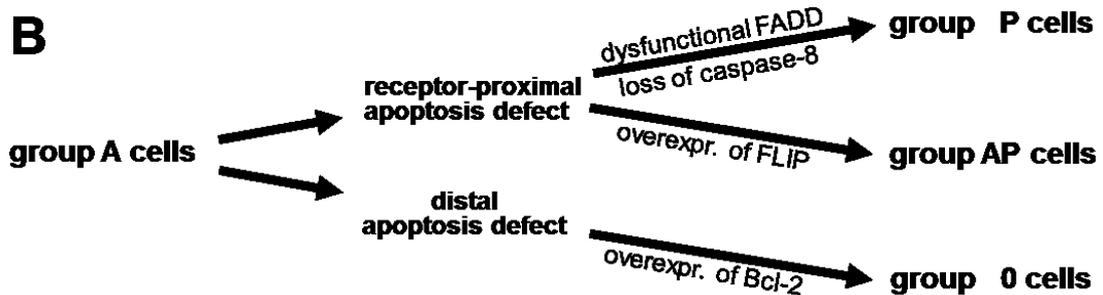
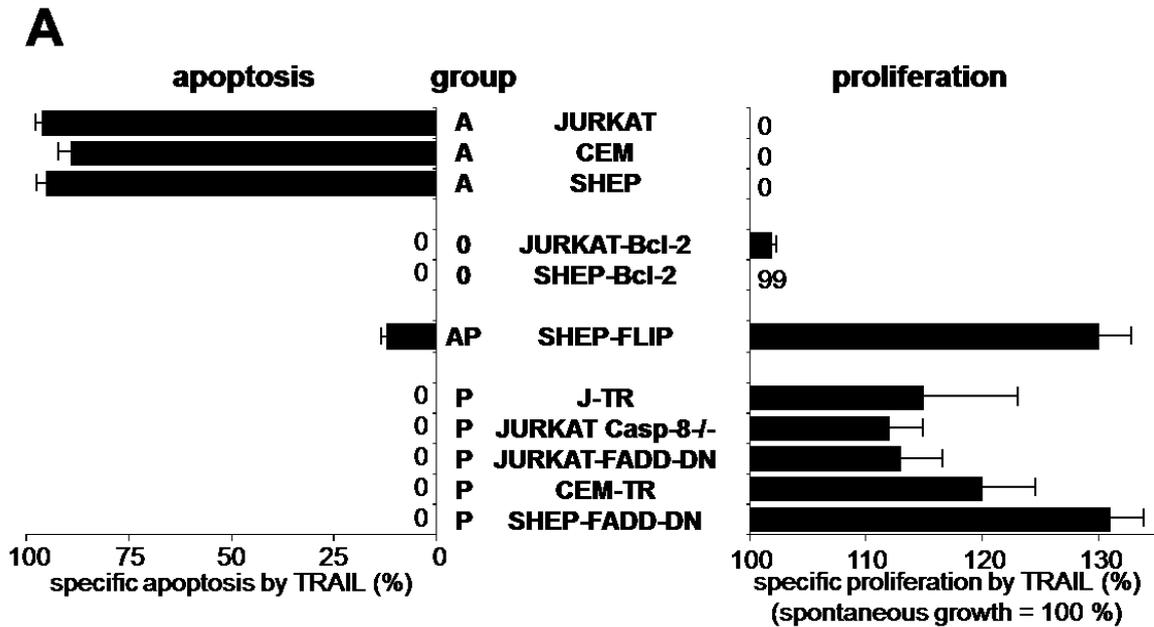
Alle Zelllinien wurden mit 40 ng/mL TRAIL während 24 Stunden inkubiert und die Apoptose-Messung bei JURKAT- und CEM-Zellen über FSC-SSC-Analyse und bei SHEP-Zellen über die DNA-Fragmentierung durchgeführt. Für Proliferationsmessungen fand der Mischtest Anwendung.

Beide Zelllinien mit Bcl-2-Überexpression zeigten keine Proliferation bei Co-Inkubation mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk und wurden somit der Gruppe O zugeteilt.

Der Verlust von funktionellem FADD durch FADD-DN-Überexpression, der Verlust von Caspase-8 sowie die Überexpression von FLIP führten zur Veränderung des DISC an den TRAIL-Rezeptoren. SHEP-FLIP-Zellen konnten der Gruppe AP zugeordnet werden und zeigten in Gegenwart von zVAD-fmk das Proliferationsverhalten der Gruppe P.

Alle anderen Tumorzelllinien mit Rezeptor-nahem Apoptosedefekt gehörten der Gruppe P an. Aber auch die nicht veränderten Zelllinien Kelly und Sy5y, denen die Caspase-8 fehlten, zeigten Proliferation durch TRAIL. Dies bedeutete, dass Veränderungen des

durch TRAIL induzierten Apoptose-Signalweges in der Nähe der TRAIL-Rezeptoren mit TRAIL-induzierter Proliferation einhergingen (14).



**Abbildung 36 Mechanismus der TRAIL-induzierten Proliferation**

A Die parenteralen Zelllinien der Gruppe A SHEP, JURKAT und CEM wurden mit Bcl-2, FLIP oder dysfunktionalem FADD (FADD-DN) transfiziert oder sie verloren Caspase-8 durch chemische Mutagenese (w/o Casp8) oder verlängerte TRAIL-Einwirkung (J-TR, CEM-TR). Parenterale und veränderte Zelllinien wurden über 24 Stunden mit 40 ng/mL TRAIL inkubiert. Bei JURKAT und CEM fand die Apoptose-Untersuchung mittels FSC-SSC-Messung statt, bei SHEP über die Fragmentierung der DNA mittels Nicoletti-Färbung. Proliferation wurde mittels Mischtest in mindestens fünf unabhängigen Versuchen gemessen und bei beiden Bcl-2-überexprimierenden Zelllinien in Anwesenheit von zVAD-fmk durchgeführt. Proliferation ist als spezifischer Effekt durch TRAIL im Vergleich zum Spontanwachstum der Kontrollzellen dargestellt.

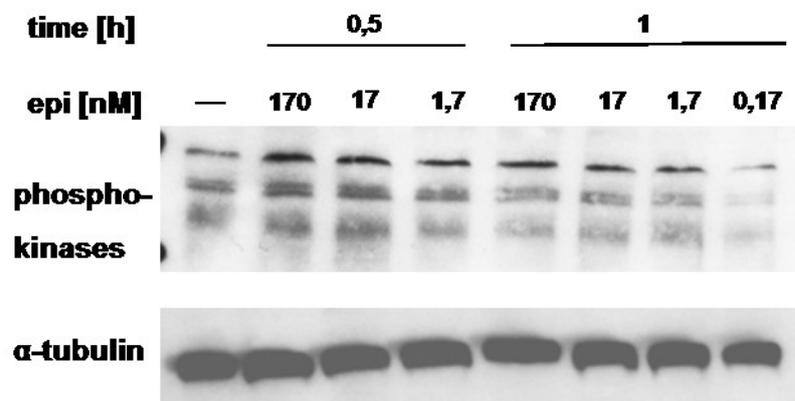
B Zusammengefasst vermittelt TRAIL dann Proliferation, wenn der Rezeptor-nahe, nicht aber der distale Apoptose-Weg blockiert ist (14).

## 6.2 Rolle des p38MAPK Signalwegs für Zytostatika-vermittelte Proliferation

### 6.2.1 Epirubicin steigerte die Phosphorylierung von Kinasen in MCF-7-Zellen.

Wie in Abbildung 32 gezeigt, können Wachstumsfaktoren sowie externe Stimuli wie zellulärer Stress und Strahleneinwirkung zu einer Phosphorylierung der MEK führen. Infolge einer Phosphorylierungskaskade werden weitere Kinasen aktiviert (ERK ½, p38, JNK), die die Zellproliferation in Gang setzen.

Da die Inhibitionsversuche in Kapitel 5 auf eine Beteiligung der p38-MAPK an der durch Epirubicin und Dexamethason induzierten Proliferation schließen ließen, wurde zuerst auf eine allgemeine Kinasen-Phosphorylierung durch eine der Substanzen untersucht.



**Abbildung 37 Epirubicin führte zur raschen Bildung von Phosphokinasen.**

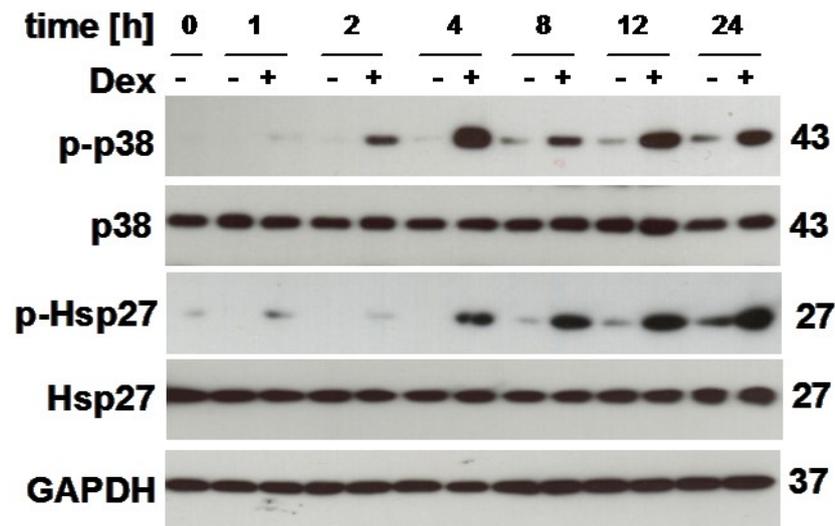
MCF-7-Zellen wurden für 0,5 bzw. für 1 Stunde mit Epirubicin inkubiert (170 nM, 17 nM, 1,7 nM, 0,17 nM), anschließend lysiert und für den Western Blot verwendet. Der Antikörper von PAN band spezifisch an phosphorylierten Kinasen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Dabei wurde gezeigt, dass Stimulation von MCF-7-Zellen mit EPI zu einer raschen Phosphorylierung verschiedener Proteine führte.

In Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass durch Epirubicin keine Aktivierung der Kinasen SAPK, JNK oder Erk stattfand (Daten nicht gezeigt).

### 6.3 Dexamethason aktivierte die p38-MAPK in MCF-7-Zellen.

Die Inhibitionsversuche im Abschnitt 5.3 zeigten, dass die Dexa-vermittelte Proliferation auf MCF-7 besonders deutlich durch Inhibition der p-38-MAPK verhindert wurde. Daraufhin fanden die Western Blots direkt mit p38-Antikörpern und phospho-p38-Antikörpern statt.



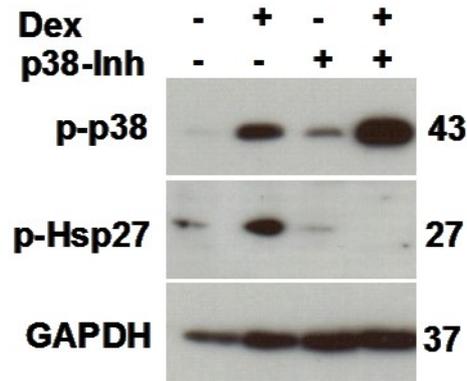
**Abbildung 38 Dexamethason aktivierte die p38-MAPK.**

MCF-7-Zellen wurden 1,2,4,8,12 und 24 Stunden mit Dexamethason ( $10^{-5}$  M) inkubiert und im Western Blot auf Bildung der aktivierten p38-MAPK (phospho-p38-MAPK) und auf phosphoryliertes Hsp27 untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von Sibylle Gündisch.

Die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der p38-MAPK setzte nach 2 Stunden Inkubation mit DEXA ein und hielt bis zu 24 Stunden nach der Stimulation an. Hsp27 ist ein klassisches downstream-target von p38-MAPK und wurde ebenfalls aktiviert, allerdings erst nach 4 Stunden.

Nun wurde ein Inhibitor eingesetzt, der die Aktivierung von p38MAPK selbst zulässt, aber ihr aktives Zentrum so verschließt, dass aktivierte p38MAPK nicht mehr in der Lage ist, Zielproteine zu phosphorylieren. Entsprechend inhibierte der Inhibitor die Phosphorylierung von Hsp27, nicht aber von p38MAPK (Abb. 39).

Zusammengenommen könnte der p38MAPK Signalweg also für die Weiterleitung des pro-proliferativen Signals von Zytostatika wie DEXA und EPI verantwortlich sein.



**Abbildung 39** p-38-MAPK-Inhibition verhinderte die Dexamethason-induzierte Aktivierung von Hsp27.

MCF-7-Zellen wurden 1 Stunde mit dem p38-Inhibitor vorinkubiert, dann für 4 Stunden mit Dexamethason (10<sup>-5</sup> M) stimuliert und mittels Western Blot auf Phosphorylierung untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von Sibylle Gündisch.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Zytostatika-vermittelte Proliferation vor allem dann gemessen wird, wenn in den Tumorzellen eine deutliche Apoptose-Resistenz vorliegt, für TRAIL notwendiger Weise im Rezeptor-nahen Teil des Signalweges. An Hand von DEXA und EPI konnte gezeigt werden, dass klassische Proliferations-Signalwege wie die p38MAPK das pro-proliferative Signal vermitteln, das diese Zytostatika in Tumorzellen auslösen.

## **IV Diskussion**

Zytostatika werden Tumorpatienten mit dem Ziel verabreicht, den Tumor zurückzudrängen und bestenfalls zu beseitigen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch eine weitere, unerwartete, gegensätzliche Wirkung zytostatischer Substanzen auf Tumorzellen: verlängertes Überleben und vermehrtes Wachstum.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit der Tumor-fördernden Wirkung von Zytostatika systematisch auf Tumor-Zelllinien und primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie erhoben. Zusätzlich wurden Signalwegs-Studien durchgeführt, die aufzeigen, wie Zytostatika-induzierter Proliferation in Zukunft entgegengewirkt werden kann.

### **1 Methodik der Proliferationsmessung in Zellkulturen**

Die Voraussetzung für die vorliegenden Arbeiten war, Zellzahlen exakt zu quantifizieren. Zellwachstum allgemein kann als Vergrößerung des Zellvolumens, als Zunahme der Zellzahl oder als eine Kombination beider Vorgänge definiert werden. Das Wachstum von Tumoren entsteht meist durch die exponentielle Zunahme der absoluten Zellzahl, was in dieser Arbeit als Zellproliferation bezeichnet wird.

Das Problem der hier beschriebenen Arbeiten war, dass geringe Unterschiede an Zellzahlen exakt und reproduzierbar gemessen werden mussten, denn schon gering erhöhte Proliferationsraten führen zu einer merklichen Vergrößerung des Tumors über die Zeit. Tritt die Zytostatika-induzierte Proliferation als konstantes Phänomen über einen längeren Zeitraum der Chemotherapie auf, bedeutet schon eine geringe Zellzunahme eine Verkürzung der Tumor-Verdopplungszeit.

Die Wachstumsrate (100% in der Kontrolle) wurde beispielsweise durch Epirubicin und Dexamethason im Kurzzeit-Experiment über 48 Stunden um 115% bis 138% erhöht (Abbildung 18,27). Wie aus der Grafik ersichtlich, waren am Ende jedes Experiments sehr geringe Unterschiede der absoluten Zellzahl zu messen, was beim Einsatz der meisten konventionellen Messtechniken wie MTT-Tests oder dem BrdU-Einbau zu Ungenauigkeiten innerhalb der Messreihen geführt hätte. Trotzdem können diese geringen Unterschiede klinisch wichtig sein.

Als Voraussetzung für exakte Proliferations-Versuche wurde in Vorarbeiten klar, dass sich die kultivierten Zellen in genau reproduzierbaren Wachstumsphasen befinden

müssen; dies ist hier wichtiger als bei Apoptose- oder Nekrose-Untersuchungen. Hier spielten biochemische und genetische Veränderungen je nach Dauer der Kultivierung eine Rolle. Unterschiedliches Wachstumsverhalten konnte von FCS-Wechseln, geringfügigen Veränderungen der Kulturbedingungen oder einer Änderung der Aussä-Dichte abhängig sein (84).

Die Messung der Proliferation war extrem störanfällig gegenüber technischen Problemen wie zu kaltes Zellmedium und der Zugabe von Antibiotika. Diese Faktoren beeinträchtigten die ohnehin schwierige Entwicklung ausreichend sensibler Messmethoden, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führten. Vor allem bei den Proben der primären leukämischen Zellen war die Anzahl der durchführbaren Messmethoden schon durch das geringe Volumen stark begrenzt. Gerade die primären Zellen waren schwierig zu kultivieren und wurden durch äußere Faktoren schnell in ihren normalen Wachstumsprozessen gehindert.

Als wichtige Basis für das in dieser Arbeit beschriebene Screening wurden Techniken der Zellkonzentrationsmessung verglichen und bewertet. Der sogenannte „Survival-Test“ beruhte auf der Messung von apoptotischen Zellpopulationen am Durchflusszytometer. Hierbei wurde keine direkte Aussage über eine Veränderung der Zellkonzentration getroffen, sondern lediglich eine eventuell verminderte Apoptoserate der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen gemessen. Die Methode war somit keine Proliferations- Messmethode, sondern lieferte Hinweise auf die tumorerhaltende Wirkung einer Substanz. Sie eignete sich für einen hohen Probendurchsatz, da sie preisgünstig und schnell durchführbar war.

Eine einfache und schnelle Screening-Methode auf Zellproliferation von Zelllinien stellten der ATP- und WST-1-Test dar. Die Tests bedurften nahezu keiner Etablierung und konnten vom Untersuchenden rasch erlernt werden. Als Limitierung dieser Methoden erwiesen sich die mangelnde Sensitivität und der hohe Materialverbrauch. Der Metabolismus der Zellen konnte durch die eingesetzten zytotoxischen Substanzen so verändert werden, dass falsche Messungen resultierten. Weiterhin schien die Mitochondrien-Aktivität oder auch die Konzentration primärer Tumorzellen zu gering zu sein, um reproduzierbare Messreihen zu erhalten. Daher gelang es nicht, diese Art von Tests für Proliferationsversuche mit schwimmenden und adhärenen Zelllinien und primären Tumorzellen zu etablieren.

---

Der Cellscreen ermöglichte auf nicht-invasive Art die lichtmikroskopische Analyse des Wachstumsverhaltens von Zellkulturen. Diese Methode der Proliferationsmessung eignete sich für einen hohen Proben-Durchsatz in Screenings und war sensitiv genug für andere Untersuchungen wie Dosis-Wirkungs-Kurven oder Wachstums-Inhibitionsversuche. Zu Beginn des Experiments sollten 15-20% der Fläche eines Wells mit Zellen bedeckt sein, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten.

Weil keine direkte Zellzählung erfolgte, konnte nicht zwischen einer Vergrößerung des Zellvolumens und einer Zunahme der Zellzahl unterschieden werden. Durch eine Überprüfung der Zellgröße in den Fotos wurde sichergestellt, dass die hier beschriebenen Proliferationsvorgänge auf einer Zellzahlvermehrung basierten. Außerdem konnte durch eine durchflusszytometrische Methode gezeigt werden, dass speziell die Zytostatika-induzierte Proliferation bei MCF-7 auf einer Zunahme der Zellzahl beruhte.

Die Cellscreen-basierte Analyse von Proliferationsversuchen eignete sich hervorragend für alle adhärennten Zelllinien, jedoch nicht für schwimmende Zellen, da hier die automatisierte Auswertung des Wachstums zu aufwendig war.

Interessant wäre auch die Untersuchung des Phänomens im 3D-Modell, das heißt an Zell-Sphäroiden, um zu untersuchen, welchen Einfluß der Zusammenschluss sehr vieler Zellen auf den Proliferationseffekt hat. Dieses Modell wurde von Lovitt et al. für Epirubicin und weitere Chemotherapeutika konstruiert und zeigte, dass sich das 3D-Modell in Bezug auf die Resistenzen gegenüber den Zytostatika wesentlich vom 2D-Modell der Zellkultivierung unterscheidet (118).

Da die auf dem Markt kommerziell erhältlichen Methoden unseren Ansprüchen an Genauigkeit für die Bestimmung von Zellzahlen schwimmender Kulturen nicht genügten, habe ich selbst eine neue Methode entwickelt, die es erlaubt, Zellzahlen von schwimmenden Zellen sehr exakt zu bestimmen. Der sogenannte Mischtest (Concetest) wurde von mir entwickelt und beruhte auf einer Zellkonzentrationsmessung am FACS (s. Material und Methoden). Die Methode musste lange eingeübt werden, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Für primäre Tumorzellen mit hoher Spontanapoptose besaß die Methode eine geringere Sensitivität. Sie eignete sich hervorragend für schwimmende Zelllinien, da eine Vereinzelung der Zellen die Voraussetzung für ein genaues Pipettieren der FACS-Proben darstellt. Für nahezu alle

schwimmenden Zelllinien sowie für mittels Trypsin gut vereinzelbare adhärenente Zellen war der Mischtest eine sehr exakte und preisgünstige Methode der Proliferationsmessung.

## **2 Zytostatika-vermittelte Zellproliferation in Tumor-Zelllinien und primären Tumorzellen**

Die wichtigste Aussage meiner Daten ist, dass klassische, weit verbreitet eingesetzte Zytostatika das Überleben von Tumorzellen fördern sowie das Zellwachstum anregen können. Hierzu wurde sowohl ein umfangreiches Screening auf Tumor-Zelllinien unterschiedlicher Herkunft sowie Untersuchungen mit primären leukämischen Zellen von 74 Patientenproben durchgeführt. Die ausgewählten Zytostatika gehörten unterschiedlichen chemischen Wirkstoffklassen und Wirkmechanismen an. Mein in Kapitel III1 und Kapitel III2 des Ergebnisteils beschriebenes Screening ist meines Wissens nach die erste systematische Untersuchung, wann und wie häufig Zytostatika Proliferation auf Tumorzellen auslösen. Die Untersuchungen schlossen Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft ein, d.h. sowohl hämatopoietische als auch solide Tumorzellen. Somit konnten erste wichtige Anhaltspunkte zur Häufigkeit des Phänomens gewonnen werden.

Der Effekt trat beinahe ausschließlich bei Einwirkung von sehr niedrigen Konzentrationen der Substanzen auf, was für den praktischen Einsatz der Chemotherapeutika von besonderer Bedeutung ist: Zytostatika besitzen meistens eine lange Halbwertszeit; gerade bei Langzeit-Infusionen unterliegen die Substanzen einer langfristigen Metabolisierung im Körper. Das heißt, die Tumorzellen sind weitaus länger einer geringen, nicht-apoptotischen Wirkstoff-Konzentration als einer hohen Plasma-Peak-Konzentration ausgesetzt, wie sie kurze Zeit nach Applikationsbeginn gemessen werden kann. Wenn die Tumorzellen bei Unterschreitung einer bestimmten Konzentrationsschwelle zur Proliferation angeregt werden, bedeutet dies, eine Reduzierung der Therapie-Effektivität und birgt gleichzeitig ein nicht vorhersehbares Risiko für den weiteren Krankheitsverlauf.

Die Klassifizierung in vier Gruppen, wie sie bei der Untersuchung der TRAIL-vermittelten Proliferation zum ersten Mal vorgenommen wurde (14), konnte für die mit Zytostatika gewonnenen Ergebnisse weitgehend beibehalten werden: Bei Apoptose-

---

Induktion wurden die Zellen in Gruppe A, bei Proliferationsinduktion in Gruppe P, bei keinem der beiden Effekte in Gruppe 0 und bei beiden Effekten in Gruppe AP eingeteilt.

In 5% der untersuchten Stimulationen trat der P- oder AP-Phänotyp auf: Zum P-Phänotyp gehörten besonders Dexamethason auf MCF-7-Zellen, aber auch Dexamethason und Prednisolon auf CALU-6-Zellen, Epirubicin auf A34-Zellen und der MEK-Inhibitor UO126 in Kelly-Zellen. Die Zellen waren durch eine komplette Resistenz gegenüber der pro-apoptotischen Wirkung des jeweiligen Zytostatikums charakterisiert. Zum AP-Phänotyp zählten MCF-7-Zellen nach Epirubicin-Stimulation und CALU-6-Zellen in Kombination mit Etoposid. Hier war besonders interessant, dass keine Resistenz der Zellen vorlag, sondern je nach Zeitpunkt, Wirkstoff- Konzentration oder Konstitution der Zelle der Apoptose- oder Proliferations-Signalweg vermehrt eingeschlagen wurde. Der Prozentsatz der als „proliferierend“ eingestuften Stimulationen könnte demnach noch höher liegen, weil beim AP-Phänotyp je nach dem Zeitpunkt der Messung bereits Apoptosevorgänge dominieren, obwohl auch Proliferation stattgefunden hat.

Auffällig war der hohe Prozentsatz von 28% der primären Tumorzellproben, bei denen mindestens ein Zytostatikum Proliferation der primären leukämischen Zellen induzieren konnte. Dies war umso erstaunlicher, weil die primären Zellen in vitro normalerweise eine hohe Spontanapoptose aufwiesen und allgemein sehr empfindlich auf Veränderungen der Kulturbedingungen reagierten. Vielleicht waren sie in dieser sensitiven Phase aber auch besonders anfällig auf das Einwirken der Zytostatika, was zu einer Umgehung der Apoptose-Signalwege und zur Proliferations-Induktion führte. Zytostatika erhöhten die Zellzahl der primären Tumorzellen durch einen anti-apoptotischen, tumorerhaltenden Effekt einerseits sowie durch eine direkte Anregung der Zellproliferation andererseits.

Die auf Dexamethason getesteten Proben von primären Leukämiezellen mussten zu 18% dem P-Phänotyp zugeordnet werden, was im Vergleich zu anderen Zytostatika einen hohen Prozentsatz darstellt. Im Gegensatz zu soliden Tumoren wirkt Dexamethason auf leukämische Zellen pro-apoptotisch (28). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Dexamethason-Wirkung von pro-apoptotisch nach anti-apoptotisch und pro-proliferativ umkehren kann.

In der Literatur finden sich einzelne Berichte über Dexamethason-induzierte Proliferation von Glioma-Zellen (37), Lungen-Adenocarcinomen (42) und Zellen des Kaposi's Sarkoms (43). Bisher sind nur einige Fälle von Dexamethason-induzierter Proliferation beschrieben, die jedoch nicht weiter systematisch untersucht wurden (s. Einleitung). In Sicht der Literatur und auf Grund der hier gefundenen Häufigkeiten kann man festhalten, dass Glukokortikoide zu den Zytostatika gehören, von denen am häufigsten Proliferationsinduktion in Tumorzellen nachgewiesen wurde.

Die proliferationsfördernde Wirkung von Chemotherapeutika stellt einen völlig neuen Aspekt bei der Beurteilung von Chemotherapien dar. Eine ausführliche Untersuchung mit Tumor-Zelllinien unterschiedlicher Herkunft sowie primären Zellen, wie sie in dieser Arbeit vorliegt, wurde jedoch bisher noch nicht durchgeführt. Die Frage ist, warum dieses Phänomen bisher nie systematisch untersucht wurde. Entweder war das Interesse für diese unerwünschte Wirkung nicht hoch genug oder es lag an den technischen Schwierigkeiten, Wachstumsvorgänge in vitro präzise messen zu können.

### **3 Apoptose-Resistenz im proximalen Signalweg als Voraussetzung für TRAIL-induzierte Proliferation**

Der Todesligand TRAIL sowie die agonistisch wirkenden anti-DR4- oder anti-DR5-Antikörper sind Gegenstand intensiver Forschung als neuartige Zytostatika, da sie in einer Vielzahl von malignen Tumorzellen Apoptose verursachen, ohne jedoch normale Zellen zu schädigen (16,122). Hier wurde zum ersten Mal die Zelltod-protective und proliferationsfördernde Eigenschaft von TRAIL auf Tumorzellen beschrieben, die Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose aufwiesen. Diese Funktion schien unabhängig von der TRAIL-Zubereitung, da verschiedene Varianten des TRAIL-Moleküls (z.B. monomeres und polymeres TRAIL) getestet wurden (13). Beide Antikörper (anti-DR4 und anti-DR5) vermochten die Zellproliferation anzuregen, obwohl beide nur schwache Agonisten in Bezug auf die Apoptose-Induktion waren und sogar die TRAIL-induzierte Apoptose verhinderten.

Die intrazelluläre Signalkaskade von TRAIL beruht auf der Reaktion des aktivierten TRAIL-Rezeptors mit dem Protein FADD (Fas-associated polypeptide with death domain). Zusammen mit Caspase-8 (cysteine aspartyl-specific protease 8) erfolgt die Ausbildung des sogenannten DISC (death-inducing signaling complex).

---

Trail-induzierte Apoptose kann verhindert werden, indem statt Caspase-8 das Protein FLIP (FLICE-inhibitory protein) an FADD bindet.

Aufgrund der verschiedenartigen TRAIL-Effekte wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Einteilung der Tumor-Zelllinien in vier Gruppen vorgenommen (14): TRAIL induzierte Apoptose in der A-Gruppe, hatte keinen Effekt auf die Zellen in der 0-Gruppe, induzierte Proliferation in der P-Gruppe und gleichzeitig Proliferation und Apoptose in der AP-Gruppe.

Die beschriebenen Klassifizierungen wurden aufgrund von Messungen nach 24 Stunden bei einer Inkubation mit einer mittleren TRAIL-Konzentration vorgenommen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass eine längere Inkubationszeit mit einer höheren TRAIL-Konzentration dazu führte, dass alle Zellen der Gruppe AP und einige Zellen der Gruppe 0 in die Apoptose-Gruppe (Gruppe A) übergingen. Einen echten Zugewinn der Zellanzahl zeigte nur die Gruppe P.

Das Auftreten der AP-Gruppe zeigte, dass durch Stimulation mit zytotoxischen Substanzen sowohl der Apoptose- als auch der Proliferations-Signalweg aktiviert werden konnten. Welcher Weg bevorzugt eingeschlagen wurde, hing von vielen exogenen Faktoren und von der Funktionsfähigkeit der zellinternen Signalmoleküle ab. Daher wurde der Mechanismus der TRAIL-vermittelten Proliferation an transgenen Zelllinien untersucht, die in verschiedenen Signalproteinen des TRAIL-induzierten Apoptoseweges so verändert waren, dass sie ihre Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose verloren hatten. So zeigten alle getesteten Zelllinien ohne funktionsfähige Caspase-8 TRAIL-vermittelte Proliferation. Auch der Verlust von funktionalem FADD sowie die Bindung von FLIP (fllice inhibitory protein) anstelle von Caspase-8 führten zur Blockade der TRAIL-induzierten Apoptose und somit zur Vermittlung von Proliferation.

Die verwendeten transgenen Zelllinien bewiesen, dass TRAIL nur dann Proliferation vermitteln kann, wenn der proximale (rezeptor-nahe) Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose blockiert ist.

## 4 Umwandlung der Zytostatika-vermittelten Proliferation in Apoptose

In der klinischen Situation ist ein vorrangiges Ziel, Zytostatika-induzierte Proliferation zu vermeiden. Eine mögliche Vorgangsweise zu diesem Ziel ist, bei partiell resistenten Zytostatika eine Sensitivierung für die Zelltodinduktion zu bewirken. In Kapitel 4 wurde dies für Epirubicin-induzierte Apoptose untersucht. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren oder Konditionen gewählt, die für Apoptose-Induktion sensitivieren können.

Als unspezifisches sensitivierendes Agens wurde Glucose-freies Medium verwendet, das in Zytostatika-resistenten MCF-7-Zellen zytotoxisch wirkte, indem eine Hochregulierung der MAPK stattfand (85). Glukose-freies Medium sensitivierte für Epirubicin-induzierte Apoptose.

Ein weiterer Ansatz war eine Blockade von Bcl-xL durch DCPE, welche die Sensitivität der MCF-7-Zellen gegenüber Epirubicin steigerte. Bcl-xL ist ein anti-apoptotisches Molekül, das auf eine Vielzahl von Stimuli gebildet wird und daher eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum und für Resistenzentwicklungen spielt. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-xL und dessen Analogons Bcl-2 speziell in Mamma Carcinom-Zellen mit einer schlechten Therapieprognose für die Patienten verbunden war (75,76). Die Auswirkung der Bcl-xL-Inhibition in Zelllinien wurde schon in der 90er Jahren für mehrere Zytostatika beschrieben. Die Verwendung des dominant negativen Inhibitors Bcl-Xs in MCF-7-Zellen erhöhte die Sensitivität der Zellen gegenüber Etoposid und Taxol, zwei wichtigen Substanzen der Mamma-CA-Therapie (88).

Die unterschiedliche Lokalisation sowohl von Bcl-xL als auch von Bcl-2 in der Kernhülle sowie in extranukleären Strukturen (Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum) zeigt, dass die Substanzen in mehrere Apoptose-Signalwege hineinspielen. Fiebig et al. untersuchten beide Mediatoren in Hinblick auf die Stärke ihres anti-apoptotischen Potentials und fanden heraus, dass Bcl-xL zehnmal wirksamer die Doxorubicin-induzierte Apoptose inhibieren konnte als Bcl-2. Für die hier beschriebenen Untersuchungen mit Epirubicin als Doxorubicin-Analogon spielte also gerade die Bcl-xL-Expression der Zelllinie eine große Rolle. Dies könnte auch einen Einfluß auf die Epirubicin-induzierte Proliferation haben (86). Mhawi konnte durch spezielle

---

elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass Bcl-xL direkt das Eindringen von Doxorubicin in die Zellorganellen verzögerte, wodurch die apoptotische Wirkung des Zytostatikums abgeschwächt wurde (87).

Während dieser Effekt und das Ausmaß der Sensitivierung durch Bcl-xL-Blockade wahrscheinlich erschien, erschien das Ergebnis der Sensitivierung durch p38-Blockade überraschender. Die p38-Proteine sind Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK), die eine Vielzahl an biologischen Effekten bei der Steuerung von Proliferationsprozessen bewirken können (90, 91, 92). Der jeweilige Effekt hängt nicht nur von den Stimuli, sondern auch vom Status der Zelle ab. Aktivierung von p38 führt in manchen Fällen zur Apoptose-Steigerung, in anderen Fällen wirkt p38 anti-apoptotisch. Ähnlich kontroverse Effekte werden in Bezug auf die Steuerung des Zellzyklus beschrieben (93, 94).

Mamma-CA-Zellen reagierten auf pro-inflammatorische Zytokine und zellulären Stress mit einer p38-Aktivierung. Es wurde beschrieben, dass über eine anschließende NF- $\kappa$ B-Erhöhung Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika entstanden. Die Inhibierung von p38 führte in diesem Fall zu einer Steigerung bzw. Wiederherstellung der Sensitivität der Tumorzelle gegenüber dem Zytostatikum (80, 89, 90).

Im Jahr 2004 fanden Weldon et al. eine sensitivierende Wirkung für TNF- $\alpha$  und TRAIL-induzierte Apoptose durch Blockade des p38-Signalweges. Sie verwendeten hierzu den biochemischen Inhibitor SB 203580 und die molekulare Inhibition mittels DI(dominant-inhibitorische)-p38-Transfektion (91). Die Wirkung von Zytostatika bzw. speziell Epirubicin auf die p38-MAPK-Kaskade wurde nur von Xiao et al. beschrieben, der die Chemoresistenz von MCF-7 durch eine Aktivierung von p38 begründete. In dieser Arbeit wurden zwar keine Epirubicin-resistenten MCF-7 eingesetzt, jedoch führte die Inhibition von p38 zu einer Steigerung der Sensitivität gegenüber Epirubicin. Das Ausmaß der Sensitivierung war mit einem Fractional Product von 0,1 jedoch geringer als bei den Versuchen mit Bcl-xL-Inhibition (92).

Die sensitivierende Wirkung der Blockade des p38-MAPK-Signalweges durch den Einsatz der Inhibitoren SB203580 und SB202190 wurde in den letzten Jahren immer wieder beschrieben (123, 124).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Zytostatika-induzierte Proliferation immer dann überwunden wurde, wenn es gelang, die Zellen für Zytostatika-induzierte

---

Apoptose zu re-sensitivieren. Unabhängig vom Signalweg, der die Sensitivierung ermöglichte, wurde Proliferation durch Apoptose-Induktion aufgehoben.

## **5 Mechanismus und Inhibition der Zytostatika-induzierten Proliferation**

Es gibt leider häufig Situationen, in denen Tumorzellen komplett resistent gegen Zytostatika-induzierte Apoptose sind und die Medikamente auch nicht in der Lage sind, das Tumorwachstum zu verhindern. Bei einer kompletten Resistenz und beispielsweise dem Fehlen eines wichtigen Signalmoleküls im Apoptose-Signalweg ist keine Sensitivierung für Apoptose möglich. Trotzdem sollte auch hier eine Proliferations-Induktion durch Zytostatika in Tumorzellen zum Wohle des Tumorpatienten verhindert werden. In einem weiteren Ansatz wurde versucht, die Signalwege zu identifizieren und zu inhibieren, die Zytostatika für die Induktion von Überleben und Wachstum aktivieren.

Zur Inhibition der Zytostatika-vermittelten Proliferation wurden in erster Linie Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) getestet (Tabelle 11). Signalwege der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) sind an der Regulation verschiedenster Zellvorgänge wie Genexpression, Mitose, Zelldifferenzierung, aber auch Proliferation und Apoptose beteiligt. Für Säugetierzellen werden je nach Aktivierungsmodus mehrere MAPK unterschieden: ERK1 und ERK2 werden als Antwort auf Wachstumsfaktoren aktiviert.

Es existieren drei verschiedene JNK, deren Signalkaskade nach zellulärem Stress (ionisierende Strahlung, Zytokin-Einwirkung) in Gang gesetzt wird. Gleiches gilt für die drei Isoformen der p38-MAPK.

Die  $\alpha$ -Isoform der p38-MAPK stimmt zu 50% mit ERK2 überein. Die Aktivität der p38-MAPK ist essentiell für die Steuerung einer normalen Immun- und Entzündungs-Antwort; u.a. können hierdurch Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und p53 aktiviert werden.

Für Mamma-Carcinom-Zelllinien ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK und p38 sowie gesteigerter Proliferation bzw. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen beschrieben worden. Auch zeigten Proben von Mamma-Carcinom-Patientinnen zu 20% eine phosphorylierte und damit aktive Form von p38.

Im Mausmodell konnte ebenfalls eine proliferationsfördernde Wirkung auf Tumorzellen (u.a. Mamma-CA-Zelllinien) durch die p38 MAPK gezeigt werden bzw. eine Proliferationshemmung durch p38-Inhibierung (125).

Andererseits ist p38 ebenfalls an Prozessen beteiligt, die der oben genannten proliferationsfördernden Wirkung widersprechen, wie z.B. Apoptose oder Wachstumsstillstand.

Ferner sind ERK3/4/5 beschrieben, auf die in diesem Zusammenhang jedoch nicht näher eingegangen werden soll (93, 81, 94).

Die Cystein-Proteinase Caspase-3 ist in den meisten Geweben Bestandteil des Apoptose-Signalwegs und wird durch Caspase-8 aktiviert. Da MCF-7-Zellen keine Caspase-3 exprimierten, war der Einsatz einer Caspase-3-überexprimierenden MCF-7-Zelllinie interessant. Somit konnte die normal ablaufende Apoptose-Signalkaskade nachgestellt werden. Friedrich et al. beschrieben eine Sensitivitäts-Steigerung von Caspase-3-transfizierten MCF-7 gegenüber 17  $\mu$ M Epirubicin nach 72 Stunden (95, 96).

Zwischen dem entsprechenden Stimulus und der Aktivierung der MAPK liefen in der Signalkaskade zwei weitere Aktivierungen infolge Phosphorylierung ab, bevor es zur direkten MAPK-Aktivierung und somit zur biologischen Antwort kam. Eine wichtige Vorstufe der MAPK war hierbei MEK, die zur Phosphorylierung von ERK führte. Der in Zellkulturen verwendete MEK-Inhibitor UO126 ist ein nichtkompetitiver Inhibitor der MEK1/2/5.

Die Epirubicin-induzierte Proliferation konnte im Kurzzeitversuch durch die Inhibition der p38-MAPK vollständig verhindert werden (Abbildung 33). Epirubicin führte zu einer allgemeinen Phosphorylierung und Aktivierung von Kinasen in MCF-7 (Abbildung 37). Die Funktion der p38-MAPK ist essentiell für Immun- und Entzündungs-Antworten, reguliert die Zytokin-Produktion und kann zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und p53 führen. Durch p38-Aktivierung können sowohl Apoptose- Vorgänge als gegenteilige Effekte wie Proliferation und Resistenzerscheinungen begründet werden.

Eine p38-Überexpression wird bei invasiven Mamma-Carcinomen beobachtet. Durch Transfektion von MCF-7-Zellen mit siRNA konnten Doganer et al. die Zellproliferation inhibieren (126). In in-vitro-Versuchen mit MCF-7-Zellen wurde für einige neuartige potentielle Anti-Tumor-Wirkstoffe eine Apoptose-Induktion über den Erk/p38-Signalweg beschrieben (97).

Speziell für Mamma-Carcinom-Zelllinien ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK und p38 sowie gesteigerter Proliferation bzw. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen beschrieben (93). Xiao et al. haben das Resistenzverhalten von MCF-7-Zellen gegenüber Epirubicin untersucht und herausgefunden, dass über Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges eine Überexpression von EGR-1 (early growth response gene 1) stattfand. Dadurch wurde über eine Erhöhung des P-Glycoprotein-Gehalts die Resistenz vermittelt (92).

Die Dexamethason-induzierte Proliferation konnte ebenfalls im Kurzzeitversuch durch die Inhibition der p38-MAPK vollständig verhindert werden (Abbildung 34). Im Western Blot wurde die Aktivierung der p-38-MAPK bzw. von Hsp 27, einem Bestandteil der p38-Signalkaskade, nachgewiesen. Inhibierung der p38-MAPK führte zur deutlichen Reduzierung von phosphoryliertem Hsp 27 (Abbildung 38 und Abbildung 39). Glucocorticoide üben auf leukämische Zellen einen pro-apoptotischen Effekt aus und werden deshalb als direktes Zytostatikum eingesetzt, während sie bei soliden Tumoren als adjuvante Medikation zur Abschwächung von unerwünschten Wirkungen der eigentlichen Zytostatika auf dem Therapieprotokoll stehen (29). Die Wirkung von Glucocorticoiden wird über den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) gesteuert, der an verschiedene zelluläre Signaltransduktionssysteme gekoppelt ist. Die MAPK-Superfamilie der Serin/Threonin-Kinasen (Erk, p38, JNK, Erk5) gilt als wichtiges Bindungsglied zur GR-Aktivierungskaskade. He et al. konnten nachweisen, dass Dexamethason auf Cem-Zellen, einer leukämischen Zelllinie, eine p38-Aktivierung bewirkt, wodurch die Expression des GR-Proteins hochreguliert und dessen Translokation in den Nukleus verstärkt wurde. In Cem-Zellen führte dies zu einer gesteigerten apoptotischen Wirkung von Dexamethason. Wurde die Wirkung von p38 durch einen Inhibitor geblockt, ging die Apoptoseinduktion durch Dexamethason zurück (98).

Für Zelllinien von soliden Tumoren wie z.B. MCF-7 wurde zwar keine Apoptoseinduktion durch Dexamethason beschrieben, jedoch war in dieser Arbeit eine Aktivierung der p38-MAPK feststellbar, die über eine Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors zur Proliferation führen könnte.

In humanen Glioma-Zelllinien konnte bei einem Viertel der eingesetzten Zelllinien Proliferation durch Dexamethason gemessen werden. Die Wirkung basierte auf einer Hochregulierung der Glucocorticoid-Rezeptoren. El Wadei et al. fanden als

---

Mechanismus für die Proliferation von Atemwegs-Epithelzelllinien unter anderem eine Erhöhung der phosphorylierten Kinase Erk1/2. Dies stimmt nicht mit unseren Untersuchungen an MCF-7-Zellen überein, da der Einsatz von Erk-Inhibitoren nicht zu einer Reduzierung der Dexamethason-induzierten Proliferation führte. Die Beteiligung der p38-MAPK-Signalkaskade stellt daher einen völlig neuen Erklärungsansatz dar (39, 40, 42).

Die Dexamethason-induzierte Proliferation konnte in vitro durch p38-MAPK-Inhibierung aufgehalten werden. Substanzen zur p38-MAPK-Blockade befinden sich in einer frühen klinischen Testphase (NCT00493818, NCT00419809, GlaxoSmithKline Clinical Trials). Die zukünftige Kombination von Dexamethason mit einem solchem Inhibitor in der Chemotherapie wäre demnach denkbar.

Unsere Daten legen nahe, dass Epirubicin-induzierte Proliferationsvorgänge über p38MAPK vermittelt werden. Zur mechanistischen Klärung dieser Frage wäre es in zukünftigen Arbeiten interessant, den p38MAPK Signalweg noch molekular zu inhibieren, beispielsweise durch Überexpression einer inaktiven Mutante von p38MAPK.

Zusammengenommen stellt das hier bearbeitete Thema der Zytostatika-induzierten Proliferation auf Tumorzellen ein bisher wenig bearbeitetes, klinisch hochrelevantes Thema dar, das laut den hier neu erhobenen Daten ein häufiges Phänomen, vor allem auch in primären Tumorzellen von Patienten darstellt. Neben der bereits in sehr vielen wissenschaftlichen Studien untersuchten Re-Sensitivierung resistenter Tumorzellen für die Therapie kann man dem unerwünschten Effekt der Zytostatika auf die Tumorzellen, der Induktion von Proliferation, entgegenwirken, indem Proliferationswege in den Tumorzellen, wie beispielsweise die p38-MAPK-Signalkaskade, gezielt in Tumorzellen inhibiert werden. Weitere Studien sind notwendig, um zu zeigen, wie Patienten mit Therapie-resistenten Tumoren am effektivsten vor der unerwünschten Wirkung von Zytostatika, der Induktion von Tumor-Proliferation, geschützt werden können.

## V Zusammenfassung

Chemotherapie mit Zytostatika ist essentieller Bestandteil der Behandlung fast aller maligner Tumore und wird mit dem Ziel gegeben, den Tumor oder zumindest das Tumorwachstum zu reduzieren. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ist ein Mitglied der TNF-Familie und gilt als potentiell neues Zytostatikum, weil es Apoptose, den programmierten Zelltod, in Tumorzellen induziert.

Vorarbeiten unserer Gruppe zeigten, dass TRAIL neben der Zelltodinduktion auch die gegenteilige Wirkung, nämlich Proliferation von Tumorzellen auslöst, was bei der Therapie von Tumorpatienten im höchsten Maße unerwünscht ist. Diese Studien veranlassten zu untersuchen, ob auch konventionelle Zytostatika beide gegenteiligen Wirkungen, Zelltod und Proliferation, auslösen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine häufige proliferationsfördernde Wirkung von Zytostatika nachgewiesen; diese wurde systematisch untersucht und zugrunde liegende Signalwegmechanismen aufgedeckt.

Ein Zytostatika-Screening mit 19 Zytostatika auf 21 Tumorzelllinien zeigte in 5% der Stimulationen Zytostatika-induzierte Proliferation. Dabei regen besonders niedrige Konzentrationen von Zytostatika Proliferation an, selbst wenn hohe Konzentrationen das Wachstum noch einschränken. In Untersuchungen an 74 primären Proben von Kindern mit akuter Leukämie induzierten Zytostatika sogar mit einer Häufigkeit von 28,4% unerwünschte, Tumor-erhaltende Effekte. Insgesamt führen Zytostatika also häufig zur ungewünschten Proliferation von Tumorzellen.

Um die Signalübermittlung der Zytostatika-induzierten Proliferation zu charakterisieren, wurden das Glucocorticoid Dexamethason und das Anthracyclin Epirubicin auf MCF-7-Zellen genauer untersucht. Zytostatika-induzierte Proliferation war mit einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität sowie einer Vermehrung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus assoziiert. Es kam zu einer Aktivierung von p38MAPK, so dass die Inhibition der p38MAPK- Aktivierung zur signifikanten Einschränkung der pro-proliferativen Aktivität von Dexamethason und Epirubicin führte. Die hier gezeigten mechanistischen Untersuchungen identifizierten den klassischen Proliferations-Signalweg unter Beteiligung von p38MAPK als Vermittler proproliferativer Signale, die Zytostatika in Tumorzellen auslösen.

Der Mechanismus der TRAIL-vermittelten Proliferation wurde an transgenen Tumorzellen untersucht, die in verschiedenen Signalproteinen des TRAIL-induzierten Apoptose Signalwegs molekular so verändert waren, dass sie ihre Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose verloren hatten. Diese Zelllinien zeigten, dass TRAIL dann Proliferation vermittelt, wenn der Rezeptor-nahe Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose blockiert ist, beispielsweise durch Verlust von funktionalem FADD.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte, häufige Tumor-erhaltende oder sogar Tumorfördernde Wirkung von Zytostatika ist in der Behandlung von Tumorpatienten in höchsten Maßen unerwünscht. Die Ergebnisse legen nahe, in klinischen Studien zu ermitteln, welche zusätzlichen Behandlungsmaßen Patienten am effektivsten vor Zytostatika-induzierter Proliferation schützen.

## Summary

Chemotherapy with cytostatic substances is an essential component of the treatment of almost all malignant tumours and is applied with the aim to reduce the tumour or at least the growth of the tumour. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) as a member of the TNF family is potential new cytostatic because of its ability to induce apoptosis in tumour cells.

Recent studies of our group showed that TRAIL beside from cell death induction also activated tumour cell proliferation as an opposite effect which is of course undesirable in the treatment of cancer patients. These studies led us feel obliged to investigate if conventional cytostatics also could induce both effects, cell death as well as proliferation.

In this study a frequent proliferation triggering effect of cytostatic substances was proved, systematically investigated and the mechanisms of signalling pathways were uncovered.

A screening with 19 cytostatics on 21 tumour cell lines showed in 5% of the stimulation experiments proliferation effects which were induced by cytostatics. In particular low concentrations of cytostatics caused proliferation even when high concentrations did reduce the cell growth. In studies on 74 primary cell samples from children with acute leukaemia cytostatics induced unwanted tumour protecting effects in even 28,4%. All in all cytostatic substances frequently induce proliferation of tumour cells.

To characterize the signalling pathways of the cytostatics-induced proliferation dexamethasone as a glucocorticoid and epirubicine as an anthracycline were investigated on MCF-7-cells. Proliferation caused by cytostatics were associated by an increase of mitochondrial activity as well as an increase of the cells remaining in s-phase of the cell cycle. It happened an activation of p38MAPK so that the inhibition of p38MAPK activation resulted in a significant reduction of the pro-proliferative activity of dexamethasone and epirubicine. Our studies on signalling pathways identified the classical proliferation-pathway with participation of p38MAPK as a mediator of pro-proliferative signals caused in tumour cells by cytostatic substances.

The mechanism of TRAIL-induced proliferation was investigated on transgenic tumour cells which were modified in the expression of different signalling proteins of the

TRAIL-induced apoptosis pathway so that they lost their sensitivity for TRAIL-induced apoptosis. These cell lines showed that TRAIL induces proliferation effects when the proximal signalling pathway is blocked, for example by loosing functional FADD.

The frequent tumour protecting or even tumour promoting effect of cytostatic substances showed in this study is greatly unwanted in the treatment of cancer patients. The results suggest to establish in clinical studies possibly additional treatments which are most effective to protect patients from cytostatics-induced proliferation.

---

## VI Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zelluläre Angriffspunkte der verwendeten Zytostatika (modifiziert nach (7)).....	5
Abbildung 2	TRAIL ist ein Todesligand. ....	8
Abbildung 3	Modell des intrazellulären Apoptose-Signalwegs von TRAIL (Erklärung im Text).....	9
Abbildung 4	Verknüpfung von Proliferation und Apoptose (Erklärung im Text).....	11
Abbildung 5	Konzentrationsverlauf eines Wirkstoffs im Blutplasma nach intravenöser Applikation .....	14
Abbildung 6	Pharmakokinetik der Zytostatika und individuelle Störfaktoren .....	17
Abbildung 7	Prozessierung adhärenter Zellen im Cellscreen-PA-Modul (Bildquelle: Innovatis AG, Bielefeld) .....	37
Abbildung 8	Histogramme bei Durchführung des Mischtests im Durchflusszytometer.....	39
Abbildung 9	TRAIL vermittelte Proliferation in KELLY-Neuroblastom-Zellen. ....	50
Abbildung 10	Dexamethason vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen. ....	53
Abbildung 11	Dexamethason vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen in aufeinanderfolgenden Experimenten.....	55
Abbildung 12	Dexamethason erhöhte den ATP-Gehalt in MCF-7-Zellen.....	57
Abbildung 13	Dexamethason erhöhte den Anteil von S-Phase-Zellen und reduzierte die G2/M-Phase in MCF-7-Zellen.....	59
Abbildung 14	Screening auf Zytostatika-vermittelte Proliferation von Tumorzelllinien .....	62
Abbildung 15	DEXA und PRED induzierten Proliferation in CALU-6-Zellen.....	66
Abbildung 16	Epirubicin vermittelte in zwei Konzentrationen Proliferation in A34-Zellen. ....	68
Abbildung 17	Der MEK-Inhibitor UO126 vermittelte Proliferation in KELLY-Zellen. ...	69

---

Abbildung 18	Epirubicin verlangsamte in hohen Konzentrationen das Wachstum von MCF-7-Zellen.....	72
Abbildung 19	Epirubicin vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen. ....	73
Abbildung 20	Epirubicin vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen über 6 Tage. ....	74
Abbildung 21	Zytostatika-vermittelte Proliferation von MCF-7-Zellen unter kombinierter Einwirkung von DEXA und EPI .....	76
Abbildung 22	Epirubicin erhöhte den ATP-Gehalt in MCF-7-Zellen. ....	77
Abbildung 23	EPI erhöhte den Anteil von S-Phase-Zellen in MCF-7-Zellen über 48 Stunden.....	79
Abbildung 24	Gruppeneinteilung von Tumorzellen gemäß ihrer Reaktion auf Zytostatika .....	84
Abbildung 25	Apoptoseinduktion durch Zytostatika in primären Tumorzellen .....	85
Abbildung 26	Häufigkeit der Gruppen A, 0 und P in primären Tumorzellen .....	87
Abbildung 27	Dexamethason förderte das Überleben und das Wachstum primärer leukämischer Zellen.....	88
Abbildung 28	Primäre Zellen von 21 Patientenproben (entspricht 28,4%) proliferierten auf Zytostatika. ....	90
Abbildung 29	Der Bcl-xL-Inhibitor DCPE steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.....	94
Abbildung 30	Glucose-freies Medium steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.....	95
Abbildung 31	Inhibition der p38-MAPK steigerte die Epirubicin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.....	97
Abbildung 32	Signalwege der Zellproliferation .....	99
Abbildung 33	Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Epirubicin-vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.....	101
Abbildung 34	Inhibition der p38-MAPK verhinderte die Dexamethason-vermittelte Proliferation in MCF-7-Zellen.....	102
Abbildung 35	Charakterisierung der transgenen Zelllinien .....	104

---

Abbildung 36	Mechanismus der TRAIL-induzierten Proliferation .....	106
Abbildung 37	Epirubicin führte zur raschen Bildung von Phosphokinasen.....	107
Abbildung 38	Dexamethason aktivierte die p38-MAPK.....	108
Abbildung 39	p-38-MAPK-Inhibition verhinderte die Dexamethason-indizierte Aktivierung von Hsp27.....	109

---

**VII Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Einteilung der verwendeten Zytostatika nach Substanzgruppen und Wirkmechanismus .....	3
Tabelle 2	In vitro-Veränderungen von Zytostatika .....	18
Tabelle 3	Auftreten von Dexamethason-induzierter Proliferation .....	23
Tabelle 4	Übersicht der verwendeten Carcinom-Zelllinien .....	29
Tabelle 5	Maximale Plasmakonzentrationen von Zytostatika (ppc= peak plasma concentration) .....	32
Tabelle 6	Primäre und sekundäre Antikörper .....	47
Tabelle 7	Zusammenfassung der auf Zytostatika-stimulierte Proliferation getesteten Zelllinien .....	64
Tabelle 8	Für die Stimulation primärer Tumorzellen eingesetzte Zytostatika .....	81
Tabelle 9	Übersicht der bei den primären Zellproben eingesetzten Messmethoden .....	82
Tabelle 10	Verwendete subtoxische Konzentrationen und Wirkmechanismen der sensitivierenden Agentien, die mit Epirubicin und Dexamethason kombiniert wurden .....	92
Tabelle 11	Verwendete subtoxische Konzentrationen und Wirkmechanismen der inhibitorischen Agentien, die mit Epirubicin und Dexamethason kombiniert wurden .....	98

---

## VIII Abkürzungen

Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ANOVA	Analysis of variance between groups
Apo-1	apoptosis antigen 1
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparaginase
AUC	area under the concentration time curve
Bcl	B- cell lymphoma/leukemia
Bcl-2	B- cell lymphoma/leukemia protein 2
Bcl-xL	B- cell lymphoma/leukemia extra large
BrdU	Bromodeoxyuridin
Caspase-8	cysteine aspartyl-specific protease 8
CD95	cluster of differentiation 95
CDK	cyclin-dependent kinase
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitors
Cyclo	Cyclophosphamid, aktiviert
DCPE	2,3-Dichlorophenoxypropylaminoethanol-Hydrochlorid
DEXA	Dexamethason
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
ERK	extracellular-signal regulated kinase
EPI	Epirubicin
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FADD	Fas-associated polypeptide with death domain
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FLICE	FADD-like interleukin-1-converting enzyme
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FP	fractional product

---

FSC	Forward Scatter
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MTX	Methotrexat
c-Myc	Myelocytomatosis oncogene cellular homolog
NF-κB	nuclear factor κ B
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ppc	peak plasma concentration
PRED	Prednisolon
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Sideward scatter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
6-TG	6-Thioguanin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VCR	Vincristin
VP-16	Etoposid
WB	Western Blot
WST-1	(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat)

---

## IX Literaturverzeichnis

1. Mitteilung an die Presse – 2876. Tagung des Rates Beschäftigung, Sozialpolitik, Gesundheit und Verbraucherschutz. 9.–10. Juni 2008. Abgerufen am 21. Juli 2008 (PDF), S. 21.
2. Deutsche Apotheker Zeitung, 148.Jahrgang, Nr.44, S. 38.
3. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen- Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 8. Auflage 2001; S. 873 ff.
4. Burger A, Wachter H. Hunnius' pharmazeutisches Wörterbuch. Walter de Gruyter Berlin, 7. Auflage 1993; S. 1532 f.
5. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004;1:45-55.
6. Mattern J, Büchler MW, Herr I. Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Can Biol Ther* 2007; 6(9):1345-1354.
7. Scheulen ME. Antineoplastische Substanzen (aus: *Therapiekonzepte Onkologie* von Seeber und Schütte). Springer Verlag Heidelberg, 4. Auflage 2003.
8. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:592-603.
9. Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Path Onc Res* 2001;7(2):95-106.
10. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25:4798-4811.
11. Tamura T, Aoyama N, Saya H, et al. Induction of Fas-mediated apoptosis in p53-transfected human colon carcinoma cells. *Oncogene* 1995;11:1939-1946.
12. Herr I, Wilhelm D, Bohler T, et al. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 1997;16:6200-6208.
13. Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 2003;22:3842-3852.
14. **Baader E**, Toloczko A, Fuchs U, Schmid I, Beltinger C, Ehrhardt H, Debatin KM, Jeremias I. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects. *Cancer Res* 2005;65(17):7888-7895.

15. Vermeulen K, Bernemann ZN, van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell prolifer* 2003;36:165-175.
16. Kimberley FC, Screatton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004; 14:359-72.
17. Fulda S, Debatin KM. Modulation of TRAIL signalling for cancer therapy. *Vitam Horm* 2004; 67:275-90.
18. Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:333-9.
19. Peter ME. The TRAIL DISCUSSION: it is FADD and caspase-8! *Cell Death Differ* 2000; 7:759-60.
20. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, Herr I, Wirth T, Debatin KM. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 1998; 91:4624-31.
21. Wunderli-Allenpach H. Methodologies in cell culture (aus: Testa B et al. *Pharmakokinetic Optimization in Drug Research*). Helvetica Chimica Acta Zürich.
22. Balant LP, Gex-Fabry M. Modelling in Preclinical and clinical development (aus: Testa B et al. *Pharmakokinetic Optimization in Drug Research*). Helvetica Chimica Acta Zürich.
23. Bauer K, Frömmling KH, Führer C. *Pharmazeutische Technologie*. Gustav-Fischer-Verlag 1007; 5. Auflage.
24. Schmoll, Höffken, Possinger. *Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und intrazelluläre Kinetik* (aus: *Kompendium Internistische Onkologie, Teil 1*). Springer-Verlag 1999; 3. Auflage, S.721-805.
25. Schalhorn A, Heinemann V. Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie (aus: *Klinische Pharmakologie in der Onkologie*). Tumorzentrum München 2001; S. 131-139.
26. Wagner A, Hempel G, Gumbinger HG, Jürgens H, Boos J. Pharmacokinetics of anticancer drugs in vitro. Drug resistance in Leukemia and Lymphoma III 1999;397-407.
27. Kurbacher CM, Cree IA, Brenne U, Bruckner HW, Kurbacher JA, Mallmann P, Andreotti PE, Krebs D. Heterogeneity of in vitro chemosensitivity in perioperative breast cancer cells to mitoxantrone versus doxorubicin evaluated by a microplate ATP bioluminescence assay. *Breast Cancer Res Treat* 2006;41(2):161-170.
28. Frankfurt O and Rosen ST. (2004). *Curr Opin Oncol*, 16, 553-563.
29. Aapro MS. Corticosteroids as antiemetics. *Recent Results Cancer Res* 1988;108,102-111.

30. Herr I, Büchler MW, Mattern J. Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. *Results Probl Cell Differ* 2009; 49:191-218
31. Machuca C, Mendoza-Milla C, Cordova E, Mejia S, Covarrubias L, Ventura J, Zentella A. Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7-cells requires NF-kappaB and is independent from AKT. *BMC Cell Biol* 2006;7:9.
32. Pagliacci MC, Fumi G, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Cytostatic and cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha on MCF-7- human breast tumor cells are differently inhibited by glucocorticoid hormones. *Lymphokine Cytokine Res* 1993;12:439-447.
33. Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol* 2001;133:467-476.
34. Hettmannsberger U, Tenorio S, Orfanos CE, Detmar M. Corticosteroids induce proliferation but do not influence TNF- or IL-1 $\beta$ -induced ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 1993;285:347-351.
35. Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M. Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. *Mol Vis* 2008;14:1344-52.
36. O'Banion MK, Levenson RM, Brinckmann UG, Young DA. Glucocorticoid modulation of transformed cell proliferation is oncogene specific and correlates with effects on c-myc levels. *Mol Endocrinol* 1992;6(9):1371-1380.
37. Freshney RI. Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. *Expl Cell Biol* 1984;52:286-292.
38. Zibera C, Gibelli N, Butti G, Pedrazolli P, Carbone M, Magrassi L, d. Cuna GR. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res* 1992;12:1571-1574.
39. Langeveld CH, van Waas MP, Stoof JC, Sutanto W, de Kloet ER, Wolbers JG, Heimans JJ. Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone. *J Neuroscience Res* 1992;31:524-531.
40. Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J cl endocrinol metab* 1993;77(5):1388-1392.
41. Kawamura A, Tamaki N, Kokunai T. Effect of dexamethasone on cell proliferation of neuroepithelial tumor cell lines. *Neurol Med Chir* 1998;38:633-640.
42. Al-Wadei HA, Takahasi T, Schuller HM. PKA-dependent growth stimulation of cells derived from human pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelium by dexamethasone. *Eur J Can* 2005;41:2745-2753.

43. Guo WX, Antakly T. AIDS-related Kaposi's Sarcoma: Evidence for direct stimulatory effect of glucocorticoid on cell proliferation. *Am J Pathol* 1995;146(3):727-734.
44. Jones TH, Justice SK, Timperley WR, Royds JA. Effects of interleukin-1 and dexamethasone on interleukin-6 production and growth in human meningiomas. *J Pathol* 1997;183:460-468.
45. Omukai Y, Nakamura N, Hiraoka D, Nishizawa Y, Uchida N, Noguchi S, Sato B, Matsumoto K. Growth-stimulating effect of pharmacological doses of glucocorticoid on androgen-responsive Shionogi carcinoma 115 in vivo in mice and in cell culture. *Can Res* 1987;47(16):4329-4334.
46. Yoshida Y, Kishimoto T, Ishiguro H, Nagai Y, Koda K, Takiguchi N, Miyazaki M, Ishikura H. Dexamethasone modifies the susceptibility to serum cytotoxicity and increases the metastatic efficiency of a colon carcinoma cell line. *Exp Mol Pathol* 2006;81(1):77-84.
47. Vichi P, Tritton TR. Stimulation of growth in human and murine cells by adriamycin. *Cancer Res* 1989;49:2679-2682.
48. Yang M, Nazhat NB, Jiang X, Kelsey SM, Blake DR, Newland AC, Morris CJ. Adriamycin stimulates proliferation of human lymphoblastic leukaemic cells via a mechanism of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production. *Br J Haematology* 1996;95:339-344.
49. Armstrong RC, Aja T, Xiang J, et al. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem* 1996;271:16850-5.
50. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998;8:1001-8.
51. Fulda S, Strauss G, Meyer E, Debatin KM. Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death und doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* 2000;95:301-8.
52. Estlin EJ, Yule SM, Lewis SP. Consolidation therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside, epipodophyllotoxins and cyclophosphamide. *Cancer Treatment Reviews* 2001;27:339-350.
53. Graham ML, Asselin BL, Herndon JE, Casey JR, Chaffee S, Ciocci GH, Daeschner CW, Davis AR, Gold S, Halperin EC, Laughlin MJ, Martin PL, Olson JF, Kurtzberg J. Toxicity, pharmacology and feasibility of administration of PEG-L-asparaginase as consolidation therapy in patients undergoing bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1998;21:879-885.

54. Dominici C, Petrucci F, Caroli S, Alimonti A, Clerico A, Castello MA. A pharmacokinetic study of high-dose continuous infusion cisplatin in children with solid tumors. *J Clin Oncol* 1989;7(1):100-7.
55. Anderson LW, Chen TL, Colvin OM, Grochow LB, Collins JM, Kennedy MJ, Strong JM. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 1996;2:1481-1487.
56. Adkins DR, Irvin R, Kuhn J, Boldt DH, Roodman GD, Salzman D, Freytes C, Von Hoff DD, LeMaistre CF. A phase I clinical and pharmacological profile of dacarbazine with autologous bone marrow transplantation in patients with solid tumors. *Invest New Drugs.* 1993 May-Aug;11(2-3):169-79.
57. Charles B, Schild P, Steer P, Cartwright D, Donovan T. Pharmacokinetics of dexamethasone following single-dose intravenous administration to extremely low birth weight infants. *Dev. Pharmacol. Ther.* 1993;20(3-4): 205-210.
58. Estlin EJ. Review: The clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase, anthracyclines and cyclophosphamide in relation to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2000;10:780-790.
59. Danesi R, Innocenti F, Fogli S, Gennari A, Baldini E, Di Paolo A, Salvadori B, Bocci G, Conte PF, Del Tacca M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of combination chemotherapy with paclitaxel and epirubicin in breast cancer patients. *J Clin Pharmacol* 2002;53:508-518.
60. Urien S, Fumoleau P, Campone M, Kerbrat P, Bonneterre J, Fargeot P, Deporte-Fety R. Modelling of ftorafur and 5-fluorouracil pharmacokinetics following oral UFT administration. A population study in 30 patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52: 99-107.
61. Turner PK, Houghton JA, Petak I, Tillmann DM, Douglas L, Schwartzberg L, Billups CA, Panetta JC, Stewart CF. Interferon-gamma pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004;53(3): 253-60.
62. Boros L, Peng YM, Alberts DS, Asbury RF, Goodman TL, Penn TE, Hickox DE. Pharmacokinetics of very high-dose oral melphalan in cancer patients. *Am J Clin Oncol.* 1990;13(1):19-22.
63. Glantz MJ, Cole BF, Recht L, Akerley W, Mills P, Saris S, Hochberg-Calabresi P, Egorin MJ. High-dose intravenous methotrexate for patients with nonleukemic leptomeningeal cancer: is intrathecal chemotherapy necessary? *J Cli. Oncol* 1998;16(4):1561-1567.
64. Petersen KB, Jusko WJ, Rasmussen M, Schmiegelow K. Population pharmacokinetics of prednisolone in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2003;51:465-473.

65. Lowe EC, Kitchen BJ, Erdmann G, Stork LC, Bostrom BC, Hutchinson R, Holcenberg J, Reaman GH, Woods W, Franklin J, Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, Adamson PC. Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of thioguanine in children with acute lymphoblastic leukemia: a collaborative Pediatric Oncology Branch, NCI, and Children's Cancer Group study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:199-205.
66. El-Yazigi A, Legayada E. Direct liquid chromatographic micro-measurement of tamoxifen in plasma of cancer patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;691(2):457-462.
67. Frangoul H, Ames MM, Mosher RB, Reid JM, Krailo MD, Seibel NL, Shaw DW, Steinherz PG, Whitlock JA, Holcenberg JS. Phase I study of topotecan administered as a 21-day continuous infusion in children with recurrent solid tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Clin Cancer Res.*1999;5(12):3056-3962.
68. Embree L, Gelmon K, Tolcher A, Hudon N, Heggie J, Dedhar C, Logan P, Bally MB, Mayer LD. Pharmacokinetic behavior of vincristine sulfate following administration of vincristine sulfate liposome injection. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998;41:347-352.
69. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139(2):271-9.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
71. Brady ME, Sartiano GP, Rosenblum SL, Zaglama NE, Bauguess CT. The pharmacokinetics of single high doses of dexamethasone in cancer patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1987;32:593-596.
72. Jing N, Tweardy DJ. Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer drugs* 2005;16:601-607.
73. Ripple MO, Kalmadi S, Eastman A. Inhibition of either phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt or the mitogen/ extracellular-regulated kinase, MEK/ERK, signalling pathways suppress growth of breast cancer cell lines, but MEK/ERK signalling is critical for cell survival. *Breast Can Res Treat* 2005;93:177-188.
74. Edwards LA, Verreault M, Thiessen B, Dragowska WH, Hu Y, Yeung JH, Dedhar S, Bally MB. Combined inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways results in synergistic effects in glioblastoma cells. *Mol Can Ther* 2006;5(3):645-654.
75. Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R Jr, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ. Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4523-9.

76. Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(2):336-43.
77. Wu S, Zhu H, Gu J, Zhang L, Teraishi F, Davis JJ, Jacob DA, Fang B. Induction of apoptosis and down-regulation of Bcl-XL in cancer cells by a novel small molecule, 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl]amino]ethanol. *Cancer Res.* 2004;64(3):1110-1113.
78. Zhu H, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Jacob D, Fang B. Induction of S-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl] amino]ethanol in correlation with activation of ERK *Oncogene* 2004;23(29):4984-92.
79. Muñoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodóvar C, Palacios C, López-Rivas A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12759-68.
80. Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in Development and Cancer. *Cell Cycle* 2006;5(8):824-828.
81. Engelberg D. Stress-activated protein kinases- tumor suppressors or tumor initiators? *Sem Canc Biol* 2004;14:271-282.
82. Piva R et al. NF- $\kappa$ B: A stress-regulated switch for cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006;8(3,4):478-486.
83. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 2004;68(2):320-344.
84. Singh V, Singh SM. Effect of high cell density on the growth properties of tumor cells: a role in tumor cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Anticancer Drugs.* 2007;18(10):1123-32.
85. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273(9):5294-5299.
86. Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, Leber B, Andrews DW. Bcl-xL is quantitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer.* 2006;6:213.
87. Wang Z, Goulet R 3rd, Stanton KJ, Sadaria M, Nakshatri H. Differential effect of anti-apoptotic genes Bcl-xL and c-FLIP on sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to paclitaxel and docetaxel. *Anticancer Res.* 2005;25(3c):2367-79.
88. Sumantran VN, Ealovega MW, Nuñez G, Clarke MF, Wicha MS. Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1995;55(12):2507-10.

89. Luschen S, Scherer G, Ussat S, Ungefroren H, Adam-Klages S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces TNF-induced activation of NF-kappaB, elicits caspase activity, and enhances cytotoxicity. *Exp Cell Res* 2004;293(2):196-206.
90. Grethe S, Ares MP, Andersson T, Porn-Ares MI. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-xL. *Cell Res* 2004;298(2):632-642.
91. Weldon CB, Parker AP et al. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Int J Oncol* 2004;24(6):1473-80.
92. Xiao L, Hu JL, Cui W. Study of the relationship between early growth response gene 1 activity in p38 mitogen-activated protein kinase pathway and epirubicin resistance of human breast carcinoma cells. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2009;38(6):408-13.
93. Brown L, Benchimol S. The Involvement of MAPK Signaling Pathways in Determining the Cellular Response to p53 Activation: Cell Cycle Arrest or Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(7):3832-3840.
94. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993;268(20):14553-6.
95. Jänicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;117(1):219-21.
96. Friedrich K, Wieder T, von Haefen C, Radetzki S, Jänicke R, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel P. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 2001;20:2749-2760.
97. Zhou QM, Wang S, Zhang H, Lu YY, Wang XF, Motoo Y, Su SB. The combination of baicalin and baicalein enhances apoptosis via the ERK/p38 MAPK pathway in human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(12):648-58.
98. He L, Li D, Hou KZ, Liu YP. P38 mitogen-activated protein kinase mediates glucocorticoid receptor function induced by dexamethasone in acute lymphoblastic leukemia cells. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2007 ;45(9):687-91.
99. Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 2006;441(25):431-436.
100. Piva R et al. NF- $\kappa$ B: A stress-regulated switch for cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006;8(3,4):478-486.
101. Shishodia S et al. Nuclear factor- $\kappa$ B activation: A question of life and death. *Journal of Biochem and Mol Biol* 2002;35(1):28-40.
102. Mendoza-Milla C, Machuca Rodríguez C, Córdova Alarcón E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martínez Martínez E, Zentella Dehesa A. NF-kappaB

- activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett.* 2005;579(18):3947-52.
103. Weldon CB, Burow ME, Rolfe KW, Clayton JL, Jaffe BM, Beckman BS. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery* 2001;130(2):143-50.
  104. Gangadharan C, Thoh M, Manna SK. Inhibition of constitutive activity of nuclear transcription factor kappaB sensitizes doxorubicin-resistant cells to apoptosis. *J Cell Biochem* 2009;107(2):203-13.
  105. Avramis VI, Wiersma S, Krailo MD, Ramilo-Torno LV, Sharpe A, Liu-Mares W, Kowck R, Reaman GH, Sato JK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of fludarabine and cytosine arabinoside administered as loading boluses followed by continuous infusions after a phase I/II study in pediatric patients with relapsed leukemias. The children's cancer group. *Clin Cancer Res* 1998;4(1):45-52.
  106. Ozkaynak MF, Avramis VI, Carcich S, Ortega JA. Pharmacology of cytarabine given as a continuous infusion followed by mitoxantrone with and without amsacrine/etoposide as reinduction chemotherapy for relapsed or refractory pediatric acute myeloid leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1998;31(6):475-82.
  107. Appel IM. Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL. *Leukemia* 2003;17:2254-2256.
  108. Ahlke E, Nowak-Gottl U, Schulze-Westhoff P, Werber G, Borste H, Würthwein G, Jürgens H, Boos J. Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;96(4):675-81.
  109. Ackland SP, Ratain MJ, Vogelzang NJ, Choi KE, Ruane M, Sinkule JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of long-term continuous-infusion doxorubicin. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45(4):340-7.
  110. Piscitelli SC, Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with small cell lung cancer. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53(5):555-61.
  111. Frost BM, Eksborg S, Bjork O, Abrahamsson J, Behrendtz M, Casto A, Forestier E, Lonnerholm G. Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study. *Med Pediatr Oncol* 2002;38(5):329-37.
  112. Lunardi G, Vannozzi MO, Bighin C, Del Mastro L, Stevani I, Schettini G, Venturini M. Influence of trastuzumab on epirubicin pharmacokinetics in metastatic breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2003;14:1222-1226.
  113. Evans WE, Hutson PR, Stewart CF, Cairnes DA, Bowman WP, River G, Crom WR. Methotrexate cerebrospinal fluid and serum concentrations after intermediate-dose methotrexate infusion. *Clin Pharmacol Ther* 1983;33(3):301-307.

- 
114. Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, Ge J, Sather HN, Murphy RF, Ames MM, Waskerwitz MJ, Tubergen DG, Zimm S, Gilchrist GS, Bleyer WA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood* 1998;92(10):3569-3577.
  115. de Graaf SSN, Bloemhof H, Vendrig DEMM; Uges DRA. Vincristine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med and Ped Oncology* 1995;24:235-240.
  116. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Corry PM. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *Cell Sci* 1997;110(5):681-686.
  117. Gündisch S, **Boeckeler E**, Behrends U, Amtmann E, Ehrhardt H, Jeremias I. Glucocorticoids augment survival and proliferation in tumor cells. *Anticancer Res* 2012;32(19):4251-61.
  118. Lovitt CJ1, Shelper TB, Avery VM. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(5):951-9.
  119. Vollmar A, Dingermann T. Immunologie- Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1. Auflage 2005; S.347 f.
  120. Von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(6): 352-366.
  121. Liu L et al. Dexamethasone mediates pancreatic cancer progression by glucocorticoid receptor TGF ? and JNK/AP-1. *Cell Death Dis.* 2017; 8(10): e3064
  122. Yuan et al. Developing TRAIL/ TRAIL death-receptor-based cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 2018; doi:10.1007/s10555-018-9728-y
  123. Jianhua Z, Guanxun C, Jing L. Combination of intensity modulated radiotherapy followed treatment with p38 MAPK activation inhibitor inhibits the proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Saudi J Biol Sci.* 2018; 25(1): 10-14.
  124. Düzgün SA, Yerlikaya A, Zeren S, Bayhan Z, Okur E, Boyaci I. Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. *Cytotechnology* 2017; 69(4): 711-724.
  125. Gupta J, Nebrada AR. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J* 2015; 282 (10): 1841-1857.
  126. Doganer F, Turgut D, Günes HV, Degirmenci I, Bal C. The effects of p38 gene silencing on breast cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(5): 2923-7.

## X Anhang

### 1 Ergebnisse der getesteten Kombinationen

cell line	carcinoma	drug	survival	ATP test	conce-test	cellscreen	WST-1 test	proliferation	no	yes	?	
JURKAT Dexa-R	T cell	dexamethasone			neg			no				
CEM Dexa-R	T cell	dexamethasone			neg			no				
CEM Ara-C-R	T cell	cytosine arabinoside		neg	neg	<b>pos</b>		no				
JURKAT Ara-C-R	T cell	cytosine arabinoside		neg	neg	neg		no				
JURKAT MTX-R	T cell	methotrexate			neg			no				
CEM Doxo-R	T cell	doxorubicine			neg			no				
JURKAT Cyclo-R	T cell	cyclophosphamide			neg			no				
CEM Cyclo-R	T cell	cyclophosphamide			neg			no				
JURKAT 6-TG-R	T cell	6-thioguanine			neg			no				
CEM 6-TG-R	T cell	6-thioguanine			neg			no				
CEM TR-R	T cell	dexamethasone				<b>pos</b>		unsure				n=1, only at low dexa-conc.!!
									10		1	
CADO	Ewing sarcoma	ara-c	neg		neg			no				
CADO	Ewing sarcoma	asparaginase	neg	<b>pos</b>	neg			no				
CADO	Ewing sarcoma	cisplatin	neg					no				
CADO	Ewing sarcoma	cyclophosphamide	neg	neg				no				
CADO	Ewing sarcoma	dacarbazin						n.t.				
CADO	Ewing sarcoma	dexamethasone	<b>pos</b>	<b>pos</b>	neg	neg		no				
CADO	Ewing sarcoma	doxorubicine	neg	<b>pos</b>	neg	neg		no				
CADO	Ewing sarcoma	epirubicine	neg	neg				no				
CADO	Ewing sarcoma	etoposide	neg	neg	neg	neg		no				
CADO	Ewing sarcoma	5-fluorouracil		<b>pos</b>		neg		no				
CADO	Ewing sarcoma	IFN gamma						n.t.				
CADO	Ewing sarcoma	melphalane						n.t.				

X Anhang

CADO	Ewing sarcoma	methotrexate	neg	pos				unsure				not tested in cellscreen
CADO	Ewing sarcoma	prednisolone	neg	pos	pos	neg		no				
CADO	Ewing sarcoma	6-thioguanine	neg	neg				no				
CADO	Ewing sarcoma	topotecan						n.t.				
CADO	Ewing sarcoma	vincristine	neg	neg				no				
									12		1	
MCF-7	breast	ara-c	pos	neg	neg			no				
MCF-7	breast	asparaginase	neg					no				
MCF-7	breast	cisplatin	pos	pos	pos	neg		no				
MCF-7	breast	cyclophosphamide	neg		pos	neg	neg	no				
MCF-7	breast	dacarbazin						n.t.				
MCF-7	breast	dexamethasone	pos		pos	pos	neg	yes				
MCF-7	breast	doxorubicine	neg		neg			no				
MCF-7	breast	epirubicine	neg	pos	pos	pos	neg	yes				
MCF-7	breast	etoposide	pos	pos	pos	neg		unsure				only 1 cellscreen experiment 2004
MCF-7	breast	5-fluorouracil	neg		neg	neg		no				
MCF-7	breast	IFN gamma	pos	neg		neg		no				
MCF-7	breast	melphalane						n.t.				
MCF-7	breast	methotrexate	neg		neg	neg		no				
MCF-7	breast	prednisolone	neg	pos	pos	neg		no				
MCF-7	breast	6-thioguanine	neg	neg				no				
MCF-7	breast	tamoxifen		pos		pos	neg	unsure			1	
MCF-7	breast	topotecan						n.t.				
MCF-7	breast	vincristine	neg	neg		neg		no				
MCF-7	breast	UO126				pos		yes				
									11	3	1	
KELLY	neuroblastoma	ara-c	neg	neg				no				
KELLY	neuroblastoma	asparaginase	neg	neg				no				
KELLY	neuroblastoma	cisplatin	neg	neg				no				
KELLY	neuroblastoma	cyclophosphamide	neg	neg		neg		no				
KELLY	neuroblastoma	dacarbazin	neg	pos	neg			unsure				not tested in cellscreen!!

X Anhang

KELLY	neuroblastoma	dexamethasone	neg	neg	pos	neg		no			
KELLY	neuroblastoma	doxorubicine	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	epirubicine	neg	neg		neg		no			
KELLY	neuroblastoma	etoposide	neg	neg	neg	neg		no			
KELLY	neuroblastoma	5-fluorouracil	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	IFN gamma	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	melphalane	neg					no			
KELLY	neuroblastoma	methotrexate	neg					no			
KELLY	neuroblastoma	prednisolone	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	6-thioguanine	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	topotecan	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	vincristine	neg	neg				no			
KELLY	neuroblastoma	UO126					pos	yes			
									16	1	1
SHEP FADD	neuroblastoma	ara-c	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	asparaginase	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	cisplatin	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	cyclophosphamide	neg	neg	neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	dacarbazin	neg	pos	neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	dexamethasone	pos		neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	doxorubicine	neg	neg	neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	epirubicine	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	etoposide	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	5-fluorouracil	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	IFN gamma	neg	pos	neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	melphalane	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	methotrexate	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	prednisolone	neg	pos	neg			no			
SHEP FADD	neuroblastoma	6-thioguanine	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	topotecan	neg	neg				no			
SHEP FADD	neuroblastoma	vincristine	pos	pos				unsure			not tested in cellscreen!! cells not available
									16		1

X Anhang

HELA	cervix	ara-c	neg	neg				no			
HELA	cervix	asparaginase	neg	neg				no			
HELA	cervix	cisplatin	neg	neg				no			
HELA	cervix	cyclophosphamide	neg	neg				no			
HELA	cervix	dacarbazin	neg	neg				no			
HELA	cervix	dexamethasone	<b>pos</b>	neg				no			
HELA	cervix	doxorubicine	neg	neg				no			
HELA	cervix	epirubicine	neg	neg				no			
HELA	cervix	etoposide	neg	neg				no			
HELA	cervix	5-fluorouracil	neg	neg				no			
HELA	cervix	IFN gamma	neg	neg				no			
HELA	cervix	melphalane	neg					no			
HELA	cervix	methotrexate	neg	neg				no			
HELA	cervix	prednisolone	neg	neg				no			
HELA	cervix	6-thioguanine	neg	neg				no			
HELA	cervix	topotecan	neg	neg				no			
HELA	cervix	vincristine	neg	neg				no			
									17		
HT 29	colon	ara-c	neg	neg				no			
HT 29	colon	asparaginase	neg	neg				no			
HT 29	colon	cisplatin	neg	neg	neg			no			
HT 29	colon	cyclophosphamide	neg	neg	neg			no			
HT 29	colon	dacarbazin	neg	neg	<b>pos</b>			no			
HT 29	colon	dexamethasone	neg	neg	<b>pos</b>			no			
HT 29	colon	doxorubicine	neg	neg				no			
HT 29	colon	epirubicine	neg					no			
HT 29	colon	etoposide	neg	neg	neg			no			
HT 29	colon	5-fluorouracil	neg	neg				no			
HT 29	colon	IFN gamma	neg	neg				no			
HT 29	colon	melphalane	neg	neg				no			
HT 29	colon	methotrexate	neg	neg				no			
HT 29	colon	prednisolone	neg	neg				no			
HT 29	colon	6-thioguanine	neg	neg				no			

X Anhang

HT 29	colon	topotecan	neg					no				
HT 29	colon	vincristine	neg	neg				no				
									17			
U373	glioblastoma	ara-c	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	asparaginase		neg			neg	no				
U373	glioblastoma	cisplatin	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	cyclophosphamide	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	dacarbazin	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	dexamethasone	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	doxorubicine	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	epirubicine	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	etoposide	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	5-fluorouracil	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	IFN gamma	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	melphalane	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	methotrexate	neg					no				
U373	glioblastoma	prednisolone	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	6-thioguanine	neg	neg			neg	no				
U373	glioblastoma	topotecan	neg					no				
U373	glioblastoma	vincristine	neg	neg			neg	no				
									17			
CALU-6	lung	ara-c					neg	no				
CALU-6	lung	asparaginase					neg	no				
CALU-6	lung	cisplatin					neg	no				
CALU-6	lung	cyclophosphamide					neg	no				
CALU-6	lung	dacarbazin					neg	no				
CALU-6	lung	dexamethasone					<b>pos</b>	yes				
CALU-6	lung	doxorubicine					neg	no				
CALU-6	lung	epirubicine					neg	no				
CALU-6	lung	etoposide					<b>pos</b>	yes				
CALU-6	lung	5-fluorouracil					neg	no				
CALU-6	lung	IFN gamma						n.t.				
CALU-6	lung	melphalane						n.t.				

X Anhang

CALU-6	lung	methotrexate						n.t.				
CALU-6	lung	prednisolone					<b>pos</b>	yes				
CALU-6	lung	6-thioguanine					neg	no				
CALU-6	lung	topotecan					neg	no				
CALU-6	lung	vincristine					neg	no				
									11	3		
MDA-MB	breast	ara-c					neg	no				
MDA-MB	breast	asparaginase						n.t.				
MDA-MB	breast	cisplatin					neg	no				
MDA-MB	breast	cyclophosphamide					neg	no				
MDA-MB	breast	dacarbazin						n.t.				
MDA-MB	breast	dexamethasone					neg	no				
MDA-MB	breast	doxorubicine					neg	no				
MDA-MB	breast	epirubicine					neg	no				
MDA-MB	breast	etoposide					neg	no				
MDA-MB	breast	5-fluorouracil					<b>pos</b>	unsure				
MDA-MB	breast	IFN gamma						n.t.				
MDA-MB	breast	melphalane						n.t.				
MDA-MB	breast	methotrexate					neg	no				
MDA-MB	breast	prednisolone					neg	no				
MDA-MB	breast	6-thioguanine						n.t.				
MDA-MB	breast	tamoxifen					neg	no				
MDA-MB	breast	topotecan						n.t.				
MDA-MB	breast	vincristine						n.t.				
									10		1	
A34	renal	doxorubicine	<b>pos</b>				neg	no				
A34	renal	epirubicine					<b>pos</b>	yes	1	1		
									<b>138</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	
		<b>tests:</b>		112	99	40						<b>153 combinations tested</b>
		<b>pos.:</b>		10	16	8						<b>5,2% proliferation effect</b>
		<b>% pos.</b>		8,9	16,2	20						<b>21 cell lines tested</b>

## 2 Zusammenstellung der positiv getesteten Kombinationen

cell line	carcinoma	drug	drug conc.	survival	ATP test	conce-test	cellscreen	WST-1 test	proliferation	no	
CEM Ara-C-R	T cell	cytosine arabinoside	0,2 µM		neg	neg	pos		no		
CEM TR-R	T cell	dexamethasone	10 <sup>-8</sup> M				pos		unsure		n=1, only at low dexamethasone conc.!!
										2	
CADO	Ewing sarcoma	asparaginase	0,1 U/ml	neg	pos	neg			no		
CADO	Ewing sarcoma	dexamethasone	10 <sup>-3</sup> M	pos	pos	neg	neg		no		
CADO	Ewing sarcoma	doxorubicine	10 ng/ml	neg	pos	neg	neg		no		
CADO	Ewing sarcoma	5-fluorouracil	10 µM	neg	pos	neg	neg		no		
CADO	Ewing sarcoma	methotrexate	0,01 µM	neg	pos				unsure		not tested in cellscreen
CADO	Ewing sarcoma	prednisolone	10 <sup>-3</sup> M	neg	pos	pos	neg		no		
										6	
MCF-7	breast	ara-c	1 µM	pos	neg	neg			no		
MCF-7	breast	cisplatin	33 µM	pos	pos	pos	neg		no		
MCF-7	breast	cyclophosphamide	0,1-10 µM	neg		pos	neg	neg	no		
MCF-7	breast	dexamethasone	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-6</sup> M	pos		pos	pos	neg	yes		
MCF-7	breast	epirubicine	0,17 nM	neg	pos	pos	pos	neg	yes		
MCF-7	breast	etoposide	500 µM	pos	pos	pos	neg		unsure		only 1 cellscreen experiment 2004
MCF-7	breast	IFN gamma	1 U/ml	pos	neg		neg		no		
MCF-7	breast	prednisolone	10 <sup>-3</sup> M	neg	pos	pos	neg		no		
MCF-7	breast	tamoxifen	0,1 µM		pos		pos	neg	unsure		
MCF-7	breast	UO126	1-10 µM				pos		yes		
										10	
KELLY	neuroblastoma	dacarbazine	2,7 µM	neg	pos	neg			unsure		not tested in cellscreen!!

X Anhang

KELLY	neuroblastoma	dexamethasone	10 <sup>-6</sup> M	neg	neg	pos	neg		no		
KELLY	neuroblastoma	UO126	3 µM				pos		yes		
										3	
SHEP FADD	neuroblastoma	dacarbazin	2,7-27 µM	neg	pos	neg			no		
SHEP FADD	neuroblastoma	dexamethasone	10 <sup>-6</sup> M	pos		neg			no		
SHEP FADD	neuroblastoma	IFN gamma	1000 U/ml	neg	pos	neg			no		
SHEP FADD	neuroblastoma	prednisolone	10 <sup>-4</sup> M	neg	pos	neg			no		
SHEP FADD	neuroblastoma	vincristine	1,08 nM	pos	pos				unsure		not tested in cellscreen!! cells not available
										6	
HELA	cervix	dexamethasone	10 <sup>-3</sup> M	pos	neg				no		
										1	
HT 29	colon	dacarbazin	27 µM	neg	neg	pos			no		n=1, proliferation at day 3
HT 29	colon	dexamethasone	10 <sup>-4</sup> M	neg	neg	pos			no		n=1, proliferation at day 3
										2	
CALU-6	lung	dexamethasone	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-6</sup> M				pos		yes		
CALU-6	lung	etoposide	1-100 µM				pos		yes		
CALU-6	lung	prednisolone	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-6</sup> M				pos		yes		
										3	
MDA-MB	breast	5-fluorouracil	10-100 µM				pos		unsure		
										1	
A34	renal	doxorubicine	0,1-0,001 µM	pos			neg		no		
A34	renal	epirubicine	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-3</sup> µg/ml				pos		yes		
										2	
				10	16	8	14	0		26	von 153 Kombis mit mind. einem pos. Test entspricht 24%

## **XI Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Name: Eva Maria Boeckeler geb. Baader  
 Geburtsdatum: 09.12.1974  
 Geburtsort: Darmstadt  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Kinder: Felix (2006) und Julius (2010)

### Berufliche Tätigkeit:

seit 2007 Tätigkeit als Lehrkraft an der Berufsfachschule für pharmazeutisch-technische Assistenten in München  
 2008-2009 Teilnahme am „Pädagogischen Seminar für Lehrkräfte an der Berufs- und Berufsfachschule des Gesundheitswesens“, Akademie für Lehrerfortbildung und Personalführung  
 2003-2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis „Apoptose“ von PD Dr. Jeremias am Dr. von Haunerschen Kinderspital und am Hämatologikum des Helmholtz-Zentrums München  
 2000-2003 Riesenfeld-Apotheke, München

### Studium:

Mai 2000 Approbation zur Apothekerin  
 Mai 1999-April 2000 Praktikantin in der gentechnologischen Forschungsabteilung der Bayer AG in Leverkusen und in der Feilitzsch-Apotheke in München  
 1994-1999 Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und der Université de Bourgogne in Dijon (Frankreich)

### Schulbildung:

1994 Abitur am Gymnasium Edith-Stein-Schule in Darmstadt

## **XII Danksagung**

Meinen besonderen Dank möchte ich den nachstehenden Personen aussprechen, ohne die die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar möchte ich mich besonders für die außerordentliche Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu betreuen und nach vielen Jahren mit ihrer Unterstützung zum Abschluss zu bringen.

Des Weiteren gilt mein großer Dank meiner Betreuerin Prof. Dr. Irmela Jeremias für ihre unermüdliche Motivation über Jahre hinweg, ihren kompetenten Rat, ihre ermutigende Hilfe in zahlreichen Angelegenheiten und ihre immer professionelle und warmherzige Art!

Dankbar anerkennen will ich auch die stets hilfsbereite und geduldige Bereitschaft von Daniela Föttinger, Petra Berger und Liliana Mura, die mich professionell in die Techniken der Zellkultur und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden eingeführt haben, und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Auch danke ich Herrn Dr. Harald Ehrhardt, Agnieszka Toloczko und allen anderen damaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Apoptose“ im Kubus des Hainerschen Kinderspitals und am Helmholtz Zentrum für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und schöne Zeit.

Meiner Familie danke ich von Herzen für die Geduld, die sie für mich aufgebracht hat. Mein Mann Gregor hat mich immer darin bestärkt, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Mein besonderer Dank gilt ihm für seine unermüdliche Unterstützung und sein Verständnis!

Meine Eltern haben mir mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht und mich zu allen Zeiten unterstützt. Ihnen widme ich in Liebe und Dankbarkeit meine Doktorarbeit.