

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Prof. Dr. Thomas Wiegel

Der Einfluss von Rapamycin auf strahlenbiologische
Reaktionen von Glioblastomzellen in vitro

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Wolf Hornung
geboren in Esslingen am Neckar

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Erwin Röttinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Hemmer

Tag der Promotion: 18.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Zellkulturbedingungen	4
2.2 Populationszählung	5
2.3 Rapamycin	5
2.4 Ermittlung der Inhibiting concentration 50% (IC ₅₀) von Rapamycin	5
2.5 Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin, statistische Auswertung (t-Test)	6
2.6 Koloniebildungsversuche	8
2.7 Zellzyklusreaktionen	9
2.8 Anteil vitaler Zellen	10
2.9 Zellkernmorphologie	10
3. Ergebnisse	11
3.1 IC ₅₀ -Konzentration von Rapamycin	11
3.2 Populationszählung: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin	12
3.3 Koloniebildungstests: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin	13
3.4 Zellzyklusreaktionen	16
3.5 Anteil vitaler Zellen	19
3.6 Zellkernmorphologie	21
4. Diskussion	25
4.1 IC ₅₀ -Konzentration von Rapamycin	25
4.2 Populationszählung und Koloniebildungstests: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin	26
4.3 Zellzyklusreaktionen	27
4.4 Anteil vitaler Zellen	31
4.5 Zellkernmorphologie	32
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis	35
Anhang	41

Abkürzungsverzeichnis

ATM/ATR	... engl. ataxia teleangiectasia mutated / ATM- and Rad3-related
B-CLL	... Chronisch lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe
CHO	... Chinesische Hamster-Ovarzellen
CSF	... engl. colony-stimulating-factor
DAPI	... Diamidino-phenyl-indol
DMSO	... Dimethylsulfoxid
DNA	... Desoxyribonukleinsäure
EDTA	... Ethylen-Diamin-tetra-Essigsäure
EGF	... engl. epidermal-growth-factor
EGFR	... engl. epidermal-growth-factor receptor
fsc	... engl. forward-scatter, Streulicht nach vorne bei der Durchflusszytometrie
Gy	... Maßeinheit Gray
IC ₅₀	... engl. inhibiting concentration 50%, bei Verwendung dieser Konzentration wird das Wachstum (hier: der Zellen) um 50% gehemmt
IGF	... engl. insulin-like-growth-factor
IL	... Abkürzung für Interleukin
kDa	... Maßeinheit Dalton * 10 ³
mRNA	... Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	... mammalian target of Rapamycin (auch MTOR genannt)
nm	... Maßeinheit Nanometer
PE	... engl. plating-efficiency, Plattierungseffizienz bei Koloniebildungstests
PI/FDA	... Propidium-Jodid/ Fluorescein-Diacetat
PI3K	... Phosphatidylinositol-3-Kinase
ssc	... engl. side-scatter, Streulicht zur Seite bei der Durchflusszytometrie
WHO	... engl. World Health Organisation

1. Einleitung

Gliome sind die am häufigsten vorkommenden primären Hirntumore. Hochmaligne Formen wie das anaplastische Astrozytom (WHO Grad III) und Glioblastome (WHO Grad IV) machen dabei die Mehrzahl aller Fälle aus. Diese Patienten haben trotz bestmöglicher Therapie bei Vorliegen eines anaplastischen Astrozytoms nur eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30% [25] und bestenfalls 3% [54] bei einem Glioblastoma multiforme. Kurative Therapien sind selbst bei niedrig gradigen Astrozytomen meist nicht möglich.

Therapeutisch etabliert haben sich variable Kombinationen von Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie. Vorteile eines operativen Vorgehens sind vor allem die Reduktion der Tumormasse mit Verbesserung der neurologischen Symptomatik und die Entfernung des nekrotischen Tumorkerns, der häufig schlecht auf eine systemische Therapie oder Strahlentherapie anspricht [19].

Zur Therapie des Glioblastoms wird zur Zeit die Kombination von Strahlentherapie und systemischer Therapie mit Temozolomid empfohlen. Die Indikation für eine Operation wird aufgrund individueller Faktoren wie Resektabilität, Tumorausdehnung und Alter des Patienten gestellt. Aufgrund der besseren Langzeitverträglichkeit wurde die postoperative Ganzhirnbestrahlung von der Involved-Field-Bestrahlung (z.B. 60 Gy über 6 Wochen) abgelöst [15] [45].

Durch Kenntnis der schrittweisen Entwicklung sekundärer Glioblastome aus niedrig gradigen Astrozytomen oder der Entstehung primärer Glioblastome und der zu Grunde liegenden Mutationen ergeben sich zum Teil neue medikamentöse Angriffspunkte [17].

Bereits mehr als die Hälfte aller niedrig gradigen Astrozytome zeigen inaktivierende Mutationen des TP53 Gens [32], das für den Tumorsuppressor p53 kodiert. Üblicherweise wird auch die Überexpression von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren beobachtet [21]. Zwar sind die individuellen Mutationen häufig verschieden, sie zeigen aber meist gemeinsame Effekte wie ein gesteigertes Zellüberleben und eine gesteigerte Zellproliferation [29].

Eine der Substanzen, die sehr spezifisch auf eine dieser Veränderungen, nämlich die erhöhte Zyklusaktivität, zielt, ist Rapamycin [4] [9] [12] [36] [40] [41]. Der Vorteil

seiner spezifischen Wirkung ist eine geringe systemische Toxizität.

Rapamycin, auch Sirolimus genannt, ist ein natürliches Antibiotikum, produziert von *Streptomyces hygroscopicus*. Es wurde in den 1970er Jahren in einer Bodenprobe von der Osterinsel Rapa Nui entdeckt [52]. Rapamycin, ein makrozyklisches Lacton, sollte ursprünglich als fungizides Arzneimittel gegen *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus* verwendet werden [51] [44]. Bindet Rapamycin an FKBP12 (FK506 binding Protein, FK506 = Tacrolimus, Immunsuppressivum, wie Rapamycin aus einer *Streptomyces*-Art isoliert) hemmt es mTOR (mammalian target of rapamycin) [10] [23]. mTOR, eine Serin/Threonin-Kinase von 289 kDa, kann neben verschiedenen anderen Kinasen (Proteinkinase B, BRCA1, GSK3, BAD) von der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) reguliert werden. Die PI3K ist ein zentrales Element im Hinblick auf die Wachstumsregulation der Zelle und bei Glioblastomen und anderen malignen Erkrankungen häufig fehlreguliert und überaktiv. PI3K katalysiert die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dabei entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, welches u.a. von der Protein-Kinase B (PKB) als Anker genutzt wird. Dabei setzt sich eine Transduktionskaskade in Gang, die letztendlich auch die Hemmung verschiedener Apoptose auslösender Effektorproteine bewirkt. Diese antiapoptotische Wirkung kann eine Rolle bei Zelltransformation und Tumorprogression von Hirntumoren, Brustkrebs, Ovarialkarzinomen und Nierenkarzinomen spielen [31] [35]. Die Aktivierung von PI3K wird hauptsächlich von Wachstumsfaktoren und Cytokinen wie Interleukinen (IL1, IL2, IL3, IL4, IL6), insulin-like-growth-factor (IGF), epidermal-growth-factor (EGF) und colony-stimulating-factor (CSF) vermittelt.

Die Folgen einer Aktivierung von mTOR sind je nach Zelllinie und Studie recht unterschiedlich. Relative Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin auf verschiedenste maligne Zelllinien eine Wachstumshemmung ausübt [10]. Dabei wird meist ein mehr oder weniger ausgeprägter G1-Arrest ohne oder mit Apoptoseinduktion [6] beschrieben. Dieser G1-Arrest wird wahrscheinlich unabhängig von p53 oder ATM erreicht [30] [33].

Insgesamt lassen sich Ergebnisse anderer Studien leider nur schlecht untereinander und auf eigene Arbeiten übertragen, da schon zwischen verschiedenen Glioblastomzelllinien deutliche Unterschiede in den Reaktionen auf Rapamycin festgestellt wurden.

Außer einer indirekten Zyklussuppression über den PI3K-Signalweg wurden auch direkte Wechselwirkungen mit den Zellzyklusregulatoren Zyklin D, A, cdk und kip1 sowie eine metabolische Blockade auf Translationsniveau durch Rapamycin beobachtet: Die Hemmung von mTOR kann eine PI3K (p110) induzierte Expression von Cyclin D inhibieren, solange kein starker exogener Wachstumsstimulus (z.B. EGF) besteht [48] und vermindert die Elimination von cyclin-dependant kinase inhibitor P27. Außerdem vermindert mTOR die Aktivität von cyclin-A-dependant kinase in exponentiell wachsenden Zellen. Damit reduziert die Hemmung von mTOR durch Rapamycin den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus [34] oder ermöglicht sogar einen G1-Phase-Block.

Für mTOR konnte außerdem die Fähigkeit gezeigt werden, Nährstoffangebote, speziell die an Kohlenstoff und Stickstoff, zu detektieren. Über diesen Mechanismus soll mTOR einen Einfluss auf den Energiemetabolismus der Zelle nehmen können. So hat eine Hemmung von mTOR einen Zustand der Zelle zur Folge, der einem physiologischen Hungerzustand nahe kommt. Bleibt ein Signal von mTOR aus, wird die ribosomale Biosynthese eingestellt und es kommt zu Autophagie [11].

Trotz des deutlichen Fortschritts, den die Strahlentherapie im Umgang mit Glioblastomen bei ihrer Einführung darstellte [53], gelten Glioblastome als eine der strahlenresistentesten Tumorarten.

Exemplarisch soll hier bei A7-Glioblastomzellen untersucht werden, welche Auswirkungen eine kombinierte Behandlung mit Bestrahlung und der Gabe von Rapamycin in vitro hat. Denkbar sind Wechselwirkungen aufgrund des durch Rapamycin hervorgerufenen G1-Arrests. Da p53 für einen G1-Arrest mit anschließender Apoptose wesentlich ist, bei Glioblastomen aber häufig inaktiv ist, könnte ein unabhängig davon hervorgerufener G1-Arrest verbunden mit einer proapoptotischen Signalwirkung eine Synergie mit der Bestrahlung zeigen. Bei Chinesischen-Hamster-Ovar-Zellen zum Beispiel konnte bei G1-lastigen Zellzyklusverteilungen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit beobachtet werden [2]. Auch klassische Experimente mit synchronisierten Hela-Zellen zeigen eine verstärkte Strahlenempfindlichkeit vor Eintritt in die S-Phase [49]. Ein Rapamycin-induzierter Prä-S-Phase-Arrest könnte demnach strahlensensibilisierend wirken.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturbedingungen

Die Anzucht der Glioblastomzelllinie A7 [16] erfolgte in belüfteten Zellkulturflaschen (Grundfläche 25 cm²) mit RPMI-Medium (RPMI 1640, 16% fetales Kälberserum, 0,11 g/l Pyruvat). Bei exponentiellem Wachstum wird eine Dichte von rund zwei Millionen Zellen pro Flasche erreicht. Die Zellen wachsen als Monolayer am Boden der Kulturflasche. Die Kulturflaschen werden bis zum nächsten Passagezeitpunkt (üblicherweise 3 bis 4 Tage) oder einer anderen Verwendung im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Bei Erreichen subkonfluenter Bedingungen fand die Aussaat der Zellen in eine neue Kulturflasche wie folgt statt:

Nach mikroskopischer Kontrolle (Kontaminationskontrolle, morphologische Beurteilung der Zellen, Konfluenzgrad) wurde das verbrauchte Medium aus der Kulturflasche abgegossen und die noch adhärenen Zellen mit 5 ml steriler Trypsinlösung (PBS, 0,25% Trypsin, 1 mM EDTA) gespült. Bei fünfminütiger Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche und wurden durch Zugabe von 5 ml frischem Medium und durch wiederholtes Aufziehen mit einer 5-ml-Pipette zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. 1 ml dieser Suspension wurde mit 4 ml DAPI-Färbelösung (Diamidino-phenyl-indol, ein DNA-Fluorochrom) gemischt.

Die Zellzahl in einem 200 µl Teilvolumen der gefärbten Suspension wurde daraufhin durchflusszytometrisch bestimmt.

Die für die Zielflasche benötigte Zellzahl wurde in mit 10 ml Medium vorbereitete Kulturflaschen überführt. Durch diese Passage wird sichergestellt, dass sich die Zellen bis zur nächsten Verwendung in exponentiellem Wachstum befinden.

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen im Laminar-Air-Flow statt. Wurde bei der mikroskopischen Kontrolle eine Kontamination in der Zellkultur festgestellt oder vermutet, wurde sie verworfen. Antibiotische Zusätze wurden nicht verwendet.

2.2 Populationszählung

Analog der oben beschriebenen Technik wurde die Populationszählung bei folgenden Versuchen verwendet: Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Rapamycin (2.4), von ionisierender Strahlung und kombinierter Behandlung mit Strahlung und Zytostatikum (2.5).

Nach Spülen der Kulturflaschen mit Trypsinlösung, Inkubation im Brutschrank und Vereinzelung der Zellen durch wiederholtes Aufziehen mit einer 5 ml Pipette wurde eine Probe der Zellsuspension im Verhältnis 1:4 mit DAPI gemischt und durchflusszytometrisch die Zellzahl bestimmt.

Je nach Versuchsansatz wurden die Ergebnisse der Zellzählungen der behandelten Zellen der Zellzahl einer entsprechenden unbehandelten Kontrolle gegenübergestellt und damit die Überlebensfraktion ermittelt. Als Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehung diente die Vervielfachung der Zellen, die aus dem Verhältnis ihrer Aussaat- zur Enddichte bestimmt wurde. Sowohl bei bestrahlten wie bei kombiniert behandelten Kulturen wurden die Überlebensdaten mit dem Wert des jeweiligen 0 Gy Experiments normiert. Damit ist ein direkter Vergleich der beiden Dosiswirkungsbeziehungen möglich.

2.3 Rapamycin

Rapamycin, ein von *Streptomyces hygroscopicus* produziertes natürliches Antibiotikum, liegt in Reinform als wasserunlösliches weißes Pulver vor. Sein Molekulargewicht beträgt 914,2 g/mol. Gute Löslichkeit zeigt es in organischen Lösungsmitteln wie Methanol und DMSO (Dimethylsulfoxid). Die hier verwendete Stammlösung enthielt eine Konzentration von 100 µmol/l Rapamycin in DMSO und wurde bei -80°C in 1 ml-Aliquots gelagert. Rapamycin wurde von Alexis Corporation (Schweiz) bezogen.

2.4 Ermittlung der IC₅₀ von Rapamycin

Zur Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Rapamycin wurden A7 in einer

Verdünnungsreihe mit Dosen von 16 pM bis 200 nM kontinuierlich inkubiert. Nach 7-tägigem Wachstum wurde die Vervielfachungsfähigkeit durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Experimente zu möglichen Wechselwirkungen mit ionisierender Strahlung wurde die IC_{50} von Rapamycin verwendet, also die Dosis, bei der die Vervielfachung auf 50% abgesenkt wird.

2.5 Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin, statistische Auswertung (t-Test)

Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und ionisierender Strahlung wurden A7d-Zellen mit bzw. ohne simultane Rapamycin-Behandlung bestrahlt. Die Rapamycin-Konzentration entsprach der IC_{50} von 0.05 nM. 6000 – 35000 Zellen wurden mit einem Varian Clinac[®]600C Linearbeschleuniger mit einer Dosis von 0 – 7 Gy bestrahlt (6 MV Photonen, ca. 2 Gy/min, 1,5 cm Plexiglasplatte für Aufbaueffekt, Dosishomogenität $\pm 2\%$ im Bestrahlungsfeld). Bei Zusatz von Rapamycin wurde die Aussaat auf 9000 - 45000 Zellen erhöht.

Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung den Zellkulturen zugesetzt und verblieb bis zum Auswertezeitpunkt (8 Tage). Bei allen Experimenten fand die Aussaat der Zellen kurzfristig vor Bestrahlung statt, so dass die Zellen sich während der Bestrahlung noch in Suspension befanden. Adhärenz und Proliferation traten während der Probenverarbeitung nicht auf. Vom Zeitpunkt der Aussaat bis zum Abschluss der Bestrahlung aller Zellkulturen und Inkubationsbeginn wurden alle Kulturflaschen auf ca. 10°C gekühlt, um DNA-Reparaturvorgänge während der Bestrahlung auszuschließen. Nach achttägiger Inkubation, entsprechend 7 - 8 Generationen bei unbehandelten Zellen, wurde in den Kulturen die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde wie bei der Passage vorgegangen.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung wurde graphisch dargestellt. Die Überlebenskurven wurden mit dem linear-quadratischen Modell approximiert.

Das linear-quadratische Modell beschreibt die Überlebensfraktion durch die Beziehung $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ (SF ...Überlebensfraktion). Die so erhaltene Überlebenskurve setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Der lineare Term αD beschreibt die Wirkung der direkt erzeugten Doppelstrangbrüche. Der quadratische Term βD^2 quantifiziert den Einfluss der synergistischen Einzelstrangbrüche, die

zeitgleich und räumlich hinreichend dicht auftreten, um sich als Doppelstrangbruch auszuwirken. (D ...Strahlendosis, α, β ...Konstanten, die die Neigung der Kurve beschreiben. α überwiegt im Anfangsbereich der Kurve, β dominiert im höheren Dosisbereich). Zur Bestimmung von α und β wurde innerhalb des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft EXCEL ein Iterationsverfahren angewendet, das die Abweichung zwischen Messwert und Vorhersagewert minimiert. Für jeden Datenpunkt ist der relative Fehler $D_{rel} = \frac{|Beobachtungswert - Vorhersagewert|}{Vorhersagewert}$. Das Produkt $\sum D_{rel} \times s_{D_{rel}}$ wurde durch iterative Anpassung der Deskriptoren α und β minimiert (D_{rel} ...relativer Fehler, $s_{D_{rel}}$...Standardabweichung des relativen Fehlers) [1].

Zur statistischen Auswertung der Daten aus Populationszählungen und Koloniebildungstests wurde der Einstichproben-t-Test verwendet [42].

Hierzu wurden die mittleren Inaktivierungsdosen der Überlebenskurven bei Bestrahlung und kombinierter Behandlung ermittelt und mittels zweiseitigem t-Test miteinander verglichen. Die mittlere Inaktivierungsdosis entspricht der Fläche unter der Überlebenskurve bei linearer Darstellung und erlaubt so den Vergleich unterschiedlicher Kurvenverläufe. Ausgehend vom linear-quadratischen Modell und der sog. „12-Punkt-Formel“ nach Gauss ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der mittleren Inaktivierungsdosis D [14]:

$$D = 2 \times \sum_{j=0}^{11} \frac{W_j}{(1 + X_j)^2} \times \exp \left[-\alpha \times \left(\frac{2}{1 + X_j} - 1 \right) - \beta \times \left(\frac{2}{1 + X_j} - 1 \right)^2 \right]$$

Alpha und Beta entsprechen den Werten der linear-quadratischen Approximierung (siehe oben) der jeweiligen Überlebenskurve, deren mittlere Inaktivierungsdosis berechnet werden soll.

Koeffizienten der „12-Punkt-Formel“ nach Gauss:

X ₀	0,1252334085	W ₀	0,2491470458
X ₁	0,3678314989	W ₁	0,2334925365
X ₂	0,5873179542	W ₂	0,2031674267
X ₃	0,7699026741	W ₃	0,1600781285
X ₄	0,9041172563	W ₄	0,1069393259
X ₅	0,9815606342	W ₅	0,0471753363
X ₆	-0,1252334085	W ₆	0,2491470458
X ₇	-0,3678314989	W ₇	0,2334925365
X ₈	-0,5873179542	W ₈	0,2031674267
X ₉	-0,7699026741	W ₉	0,1600783285
X ₁₀	-0,9041172563	W ₁₀	0,1069393259
X ₁₁	-0,9815606342	W ₁₁	0,0471753363

Die Berechnung wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL (Microsoft) durchgeführt.

2.6 Koloniebildungsversuche

Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und ionisierender Strahlung wurden A7-Zellen analog Kapitel 2.5 mit bzw. ohne simultane Rapamycin-Behandlung bestrahlt. Die Einwirkzeit von Rapamycin vor Bestrahlung wurde dabei variiert: Eine Versuchsreihe fand mit einer Einwirkzeit von 30 Minuten statt, bei einer anderen Versuchsreihe wurde Rapamycin den Zellkulturen 8 Stunden vor Bestrahlung zugesetzt. Bei beiden Varianten verblieb Rapamycin über die gesamte Versuchsdauer von 8 Tagen im Medium. Im Unterschied zur obengenannten Methode der Populationszählung wurden zwischen 200 und 7500, bei Zugabe von Rapamycin bis 15000 Zellen ausgesät. Jeder Versuch wurde als Doppelansatz durchgeführt. Unter Rapamycinbehandlung wurden die Zellkulturen außerdem nur bis zu einer Maximaldosis von 6 Gy bestrahlt, da bei 7 Gy eine zu hohe Zellabsterberate vorlag, um die entstehenden Kolonien vor dem Hintergrund

des Zelldetritus zuverlässig identifizieren zu können. Nach Ablauf der Wachstumszeit von 8 Tagen wurden die Zellkulturen mit demineralisiertem Wasser gewaschen und 60 Minuten mit Kristallviolettlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen und Trocknen der Kulturflaschen wurden die gefärbten Kolonien manuell unter Lupenvergrößerung ausgezählt. Als zu zählende Kolonie wurden Kolonien definiert, die in etwa die selbe Größe und Zellzahl hatten, wie die Kolonien der Kontrollgruppe. In Zweifelsfällen wurden Kolonien unter dem Durchlichtmikroskop von der Zählung ausgeschlossen, falls diese aus weniger als 100 Zellen bestanden.

Jede Kulturflasche wurde 3 mal ausgezählt und zur Auswertung der Mittelwert der Zählungen verwendet. Nach Mittelwertbildung der Doppelansätze wurden aus den Ergebnissen, wie in 2.2 beschrieben, Zellüberlebenskurven erstellt und mit dem linear-quadratischen Modell approximiert. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit einem Einstichproben-t-Test (2.2).

2.7 Zellzyklusreaktionen

Zur Darstellung der Zellzyklusreaktionen unter Bestrahlung und Behandlung mit Rapamycin wurde wie folgt vorgegangen:

Vier Behandlungsformen wurden auf ihre Wirkung auf die Zellzyklusverteilung hin untersucht: Eine unbehandelte Kontrolle, eine mit 5 Gy bestrahlte Zellkultur, eine mit Rapamycin (IC_{50}) versetzte Zellkultur und eine kombiniert behandelte Zellkultur. Die Messzeitpunkte lagen bei 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung und Zugabe von Rapamycin.

Um die Zellen unter asynchron exponentiellem Wachstum zu behandeln, wurden sie zwei Tage vor dem Experiment ausgesät. Am Behandlungstag wurde das Medium gewechselt und ggf. mit Rapamycin versetzt, und/oder die Zellkulturen mit 5 Gy bestrahlt. Dabei wurde auf 37°C vorgewärmtes Medium verwendet und durch Abdichten mit Parafilm der CO_2 -Gehalt stabilisiert, um die Zellen unter physiologischen Bedingungen zu bestrahlen.

Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, wie in 2.2 beschrieben. Messung und Auswertung der Histogramme erfolgten mit einem Partec CCA Durchflusszytometer. Die Anteile

von Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase wurden dabei differenziert.

2.8 Anteil vitaler Zellen

Der Anteil vitaler, apoptotischer und toter Zellen in der Zellkultur wurde 0 - 4, 7 und 8 Tage nach alleiniger Bestrahlung (5 Gy), nach Zugabe von Rapamycin (IC_{50}) sowie nach kombinierter Behandlung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Partec PAS III Durchflusszytometers durchgeführt.

Dazu wurden die Zellsuspensionen mit PI/FDA (Propidium-Jodid: Endkonzentration 2 $\mu\text{g/ml}$; Fluorescein-Diacetat: Endkonzentration 10 nM,) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Argonlaser, 488 nm Anregungswellenlänge für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzen). Dabei liegt folgendes Färbekonzept zu Grunde: Lebende Zellen zeigen eine hohe Vorwärts- und geringe Seitwärts-Streulicht-Intensität. Apoptotische Zellen schrumpfen und erhöhen dabei ihre Granularität. Dadurch vermindert sich das Vorwärts-Streulicht-Signal, während das Seitwärts-Streulicht zunimmt.

Mechanismus der PI/FDA-Färbung: Lebende Zellen metabolisieren farbloses FDA zu freiem Fluorescein (vermehrte Grünfluoreszenz bei 520 nm) und schließen PI aus (geringe Rotfluoreszenz bei 620 nm). Apoptotische und tote Zellen verstoffwechseln FDA nicht (geringe Grünfluoreszenz 520 nm), PI dringt in die permeabilisierten Zellen ein und färbt die DNA (vermehrte Rotfluoreszenz 620 nm).

2.9 Zellkernmorphologie

Zur Darstellung der morphologischen Veränderungen nach Bestrahlung bzw. Rapamycin-Behandlung wurden A7-Zellen 8 Tage nach Exposition durchlicht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht: Subkonfluente Kulturen wurden mit phosphatgepufferter 3,7% Formaldehydlösung fixiert. Zur Auswertung wurde überschüssige Formaldehydlösung entfernt, die Zellen mit demineralisiertem Wasser gespült und anschließend mit DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 IC₅₀- Konzentration von Rapamycin

Folgendes Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse zur Ermittlung der IC₅₀-Konzentration von Rapamycin:

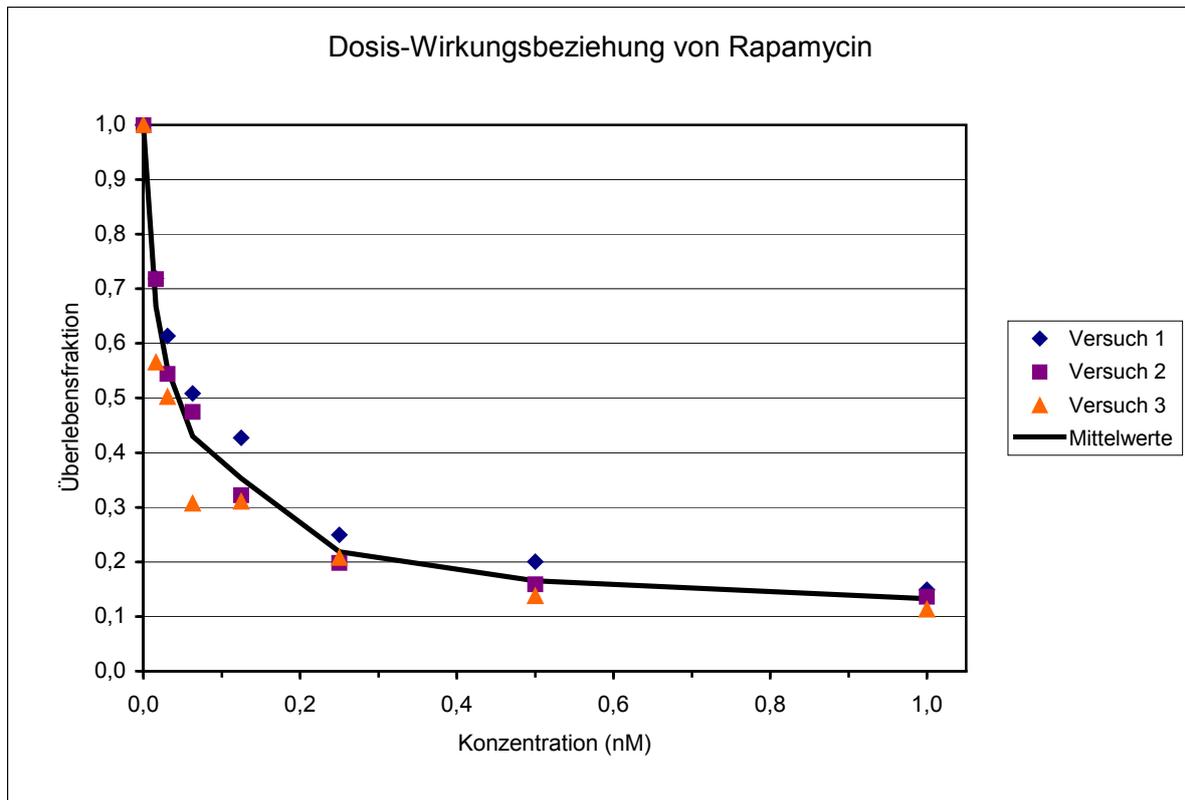


Abbildung 1: Dosis-Wirkungsbeziehung von Rapamycin bei A7-Glioblastomzellen zur Ermittlung der IC₅₀-Konzentration. Darstellung der Werte aus 3 Experimenten (Punkte) und Mittelwerte (Kurve). Die IC₅₀ wurde daraufhin auf 0,05 nM festgelegt.

Entsprechend den hier gezeigten drei Versuchen wurde die IC₅₀ - Konzentration auf 0,05 nM Rapamycin festgelegt. Zwischen 1 nM und 200 nM zeigte sich in der Überlebensfraktion keine Abhängigkeit von der Konzentration an Rapamycin. In diesem Dosisbereich zeigte sich durchflusszytometrisch eine resistente Population in der Größenordnung von 10%.

3.2 Populationszählung: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin

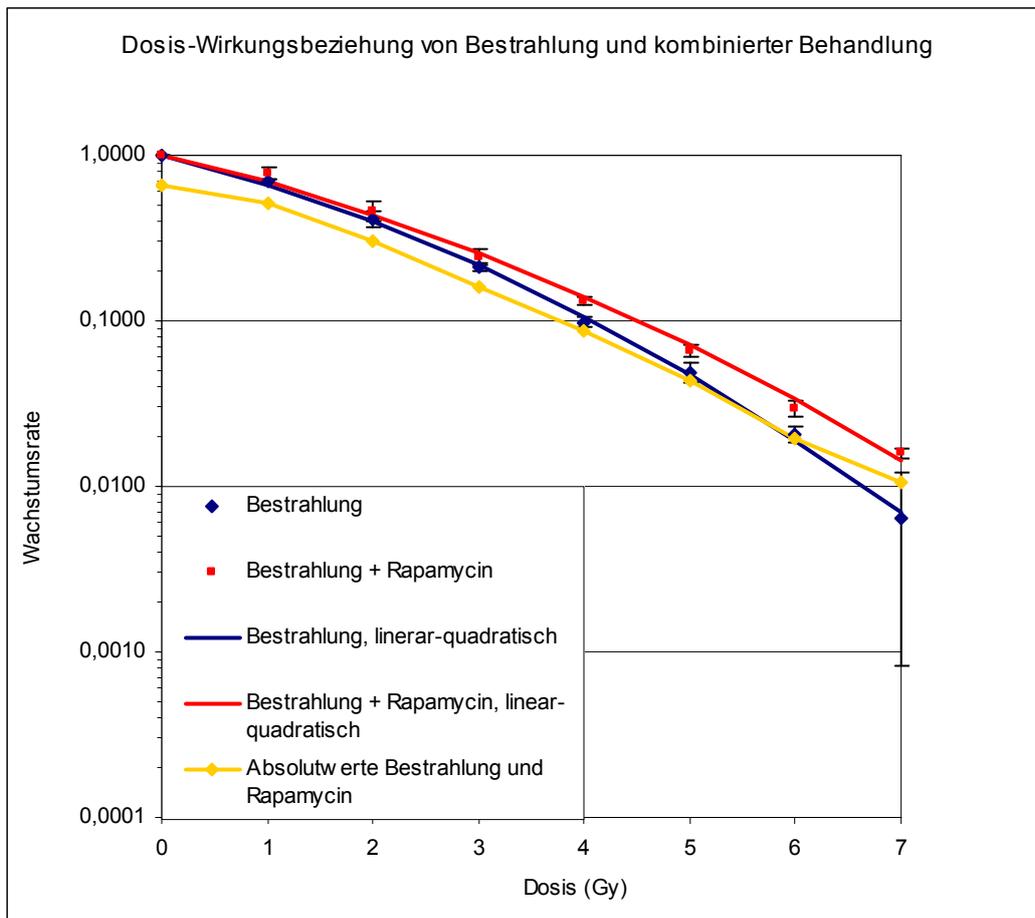


Abbildung 2: Dosis-Wirkungsbeziehung (Populationszählung, 3 Wiederholungen) bestrahlter A7-Glioblastomzellen (0-7 Gy, blau) mit (IC_{50} , Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt, rot) und ohne simultane Behandlung mit Rapamycin. Nach linear-quadratischem Modell approximierte Werte (durchgezogene Kurven) und Messwerte mit Standardabweichung (Punkte). Ebenfalls sind die nicht normierten Absolutwerte der kombinierten Behandlung dargestellt (gelbe Kurve). Berechnete Konstanten des linear-quadratischen Modells:

	Bestrahlung	Bestrahlung + Rapamycin
α	0,358	0,335
β	0,05	0,039
$\frac{\alpha}{\beta}$	7,16	8,59

Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und ionisierender Strahlung wurden A7-Glioblastomzellen mit bzw. ohne simultane Rapamycin-Behandlung bestrahlt und mittels Populationszählung ausgewertet (Abbildung 2). Die mittlere Inaktivierungsdosis lag bei Bestrahlung im Mittel bei 1,9 Gy, bei kombinierter Behandlung bei 2,15 Gy.

3.3 Koloniebildungstests: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin

3.3.1 Gabe von Rapamycin ohne Vorinkubation

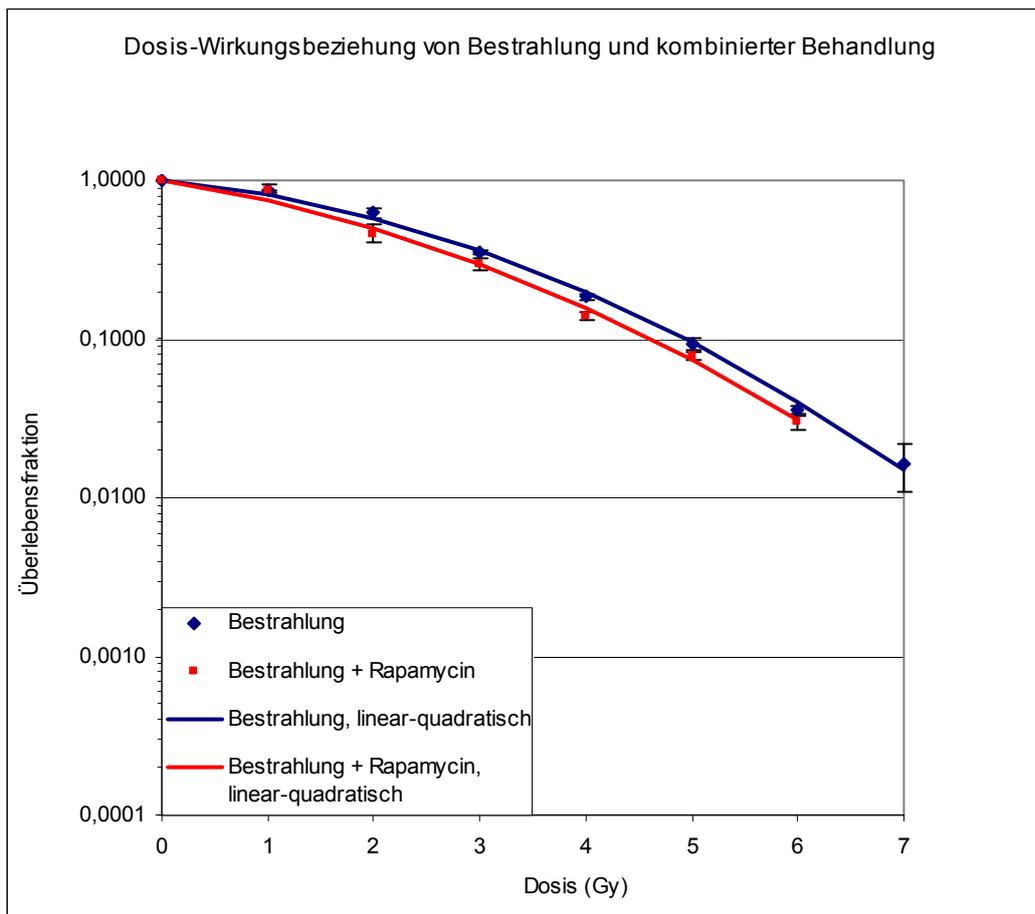


Abbildung 3: Dosis-Wirkungsbeziehung (Koloniebildungstests, 5 Wiederholungen) von A7-Glioblastomzellen nach alleiniger Bestrahlung (0-7 Gy, blau) und simultaner Gabe von Rapamycin (IC_{50} , 0-6 Gy, Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt, rot). Nach linear-quadratischem Modell approximierte Werte (durchgezogene Kurven) und Messwerte mit Standardabweichung (Punkte). Die Plattierungseffizienz (PE) lag bei der unbehandelten Kontrolle bei 0,44 (Standardabweichung $s = 0,14$). Rapamycin reduzierte die PE auf 67% ($s = 0,07$) der unbehandelten Kontrolle.

Berechnete Konstanten des linear-quadratischen Modells:

	Bestrahlung	Bestrahlung + Rapamycin
α	0,143	0,230
β	0,065	0,058
$\frac{\alpha}{\beta}$	0,62	3,97

Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und ionisierender Strahlung wurden A7-Glioblastomzellen mit bzw. ohne simultane Rapamycin-Behandlung bestrahlt und mittels Koloniebildungstests ausgewertet (Abbildung 3). Die mittlere Inaktivierungsdosis lag bei Bestrahlung im Mittel bei 2,64 Gy, bei kombinierter Behandlung bei 2,33 Gy.

Zur statistischen Auswertung der Daten aus Populationszählungen (3.2) und Koloniebildungstests (3.3.1) wurde der Einstichproben-t-Test verwendet.

Hierbei ergab sich, dass bei der verwendeten Normierung die kombinierte Behandlung mit Rapamycin sich nicht signifikant auf die Überlebensrate unter Bestrahlung auswirkt:

Populationszählung: $t_{pop}=2,978 < t=5,84$ (Freiheitsgrade $FG=2$ bei $n=3$ Versuchen, Standardabweichung $s=0,139$, Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$)

Koloniebildungstest: $t_{kol}=2,200 < t=4,264$ (Freiheitsgrade $FG=4$ bei $n=5$ Versuchen, Standardabweichung $s=0,310$, Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$)

Die isolierte Wirksamkeit von Rapamycin konnte in Populationszählungen wie auch mit Hilfe von Koloniebildungstests gezeigt werden. Dabei drückte sich die Toxizität von Rapamycin ($[c]=IC_{50}$) in einer Reduktion der Überlebensfraktion auf ca. 0,5 aus. In Koloniebildungstests reduzierte sich die Plattierungseffizienz (PE, plating-efficiency) der unbehandelten Kontrolle unter Rapamycin um etwa 33%.

3.3.2 Vorinkubation mit Rapamycin

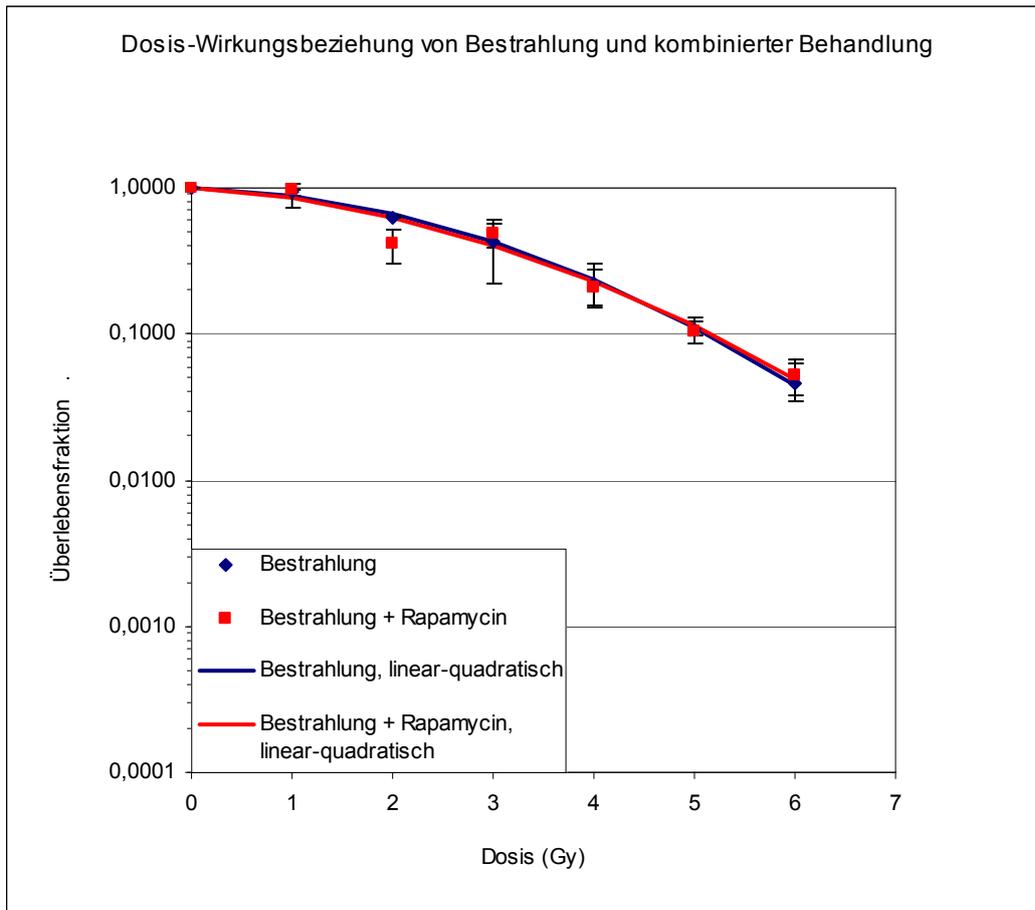


Abbildung 4: Dosis-Wirkungsbeziehung (Koloniebildungstests, 3 Wiederholungen) von A7-Glioblastomzellen nach alleiniger Bestrahlung (0-6 Gy, rot) und kombinierter Behandlung mit achtstündiger Vorinkubation mit Rapamycin (IC_{50} , 0-6 Gy, Rapamycin verblieb während der gesamten Versuchsdauer im Medium, blau). Nach linear-quadratischem Modell approximierte Werte (durchgezogene Kurven) und Messwerte mit Standardabweichung (Punkte). Die Plattierungseffizienz (PE) lag bei der unbehandelten Kontrolle bei 0,38 (Standardabweichung $s = 0,07$). Rapamycin reduzierte die PE auf 52% ($s = 0,04$) der unbehandelten Kontrolle.

Berechnete Konstanten des linear-quadratischen Modells:

	Bestrahlung	Bestrahlung + Rapamycin
α	0,057	0,093
β	0,077	0,069
$\frac{\alpha}{\beta}$	0,74	1,35

Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und ionisierender Strahlung wurden A7-Glioblastomzellen mit bzw. ohne simultane Rapamycin-Behandlung bestrahlt und mittels Koloniebildungstests ausgewertet

(Abbildung 4). Um den Zellzyklusreaktionen unter Rapamycinbehandlung Rechnung zu tragen (siehe 3.4, Abbildung 8), wurde im Gegensatz zu 3.3.1 Rapamycin 8 Stunden vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt. Die mittlere Inaktivierungsdosis lag im Mittel bei Bestrahlung bei 2,85 Gy, bei kombinierter Behandlung bei 2,79 Gy.

3.4 Zellzyklusreaktionen

Die Zellzyklusreaktionen von A7-Glioblastomzellen unter Bestrahlung (5 Gy), nach Rapamycin-Gabe und nach kombinierter Behandlung wurden durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 5 zeigt zusammenfassend die auffälligsten Zellzyklusverteilungen einer unbehandelten, einer bestrahlten und einer mit Rapamycin behandelten Zellkultur. Bei der mit Rapamycin behandelten Zellkultur zeigt sich eine prominente G1-Phase, entsprechend einem G1-Arrest. Ein G2-Arrest tritt bei Bestrahlung auf. Eine Zellzyklusverteilung kombiniert behandelter Zellen ist in dieser Darstellung nicht gezeigt, da eine Momentaufnahme je nach Untersuchungszeitpunkt entweder dem Bild bestrahlter oder Rapamycin behandelter Zellen gleicht (vergleiche Abbildung 9).

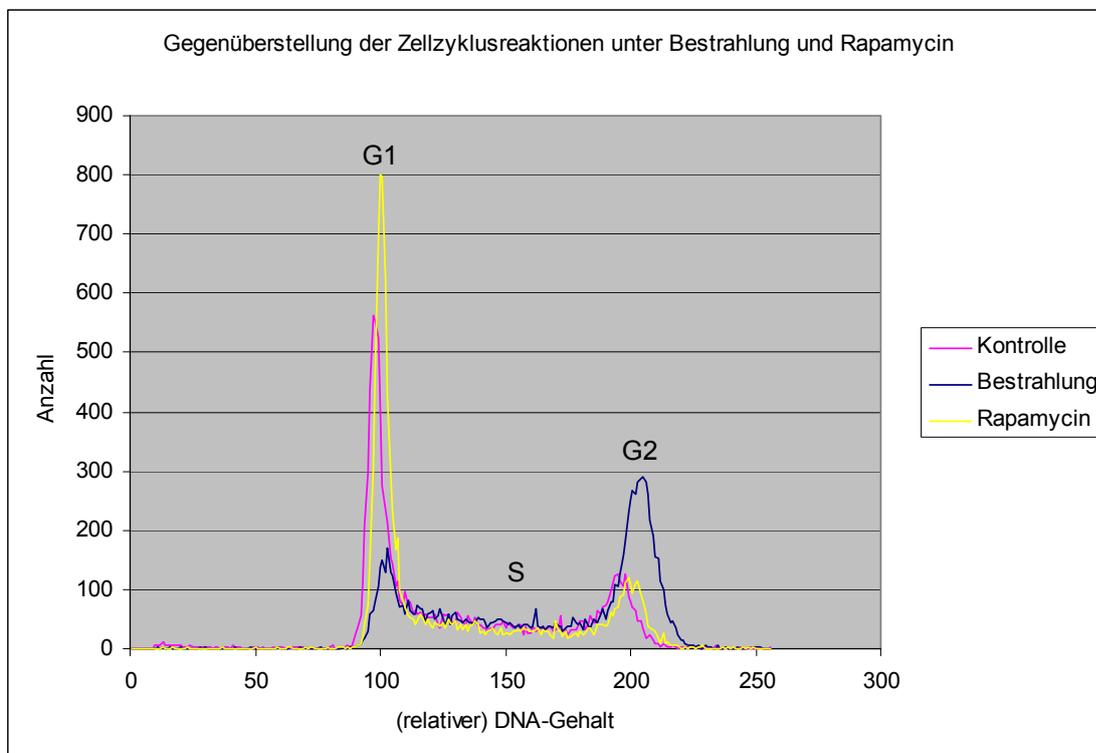


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Zellzyklusverteilung unbehandelter A7-Glioblastomzellen (Kontrolle, rosa) im Vergleich zu einer bestrahlten (5 Gy, blau) und einer mit Rapamycin (IC_{50} , gelb) behandelten Zellkultur. G1-, S- und G2-Phase sind beschriftet. Rapamycin-Behandlung: G1-Arrest. Bestrahlung: G2-Arrest.

Die Abbildungen 7 bis 9 zeigen die Zellzyklusverteilungen 0 - 48 Stunden nach Bestrahlung (5 Gy), Rapamycin (IC_{50}) und kombinierter Behandlung (Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt). Abbildung 6 zeigt im Vergleich dazu die Zellzyklusverteilung einer unbehandelten Kontrolle.

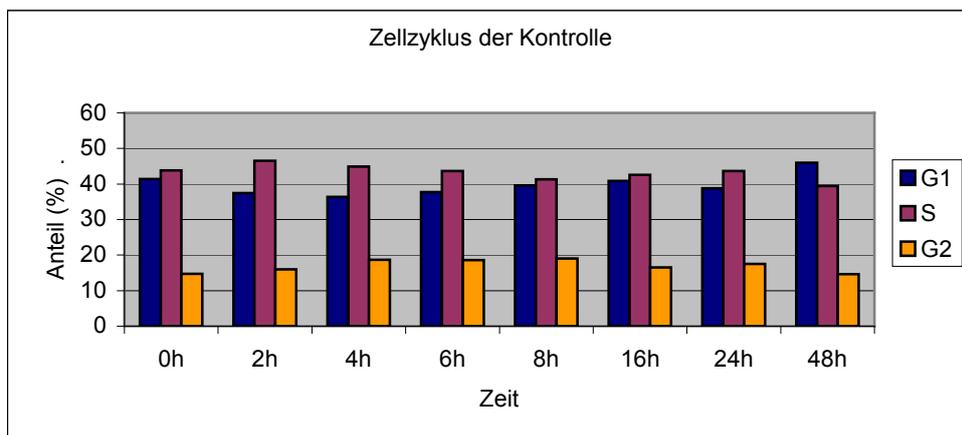


Abbildung 6: Anteile der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus unbehandelter A7 Glioblastomzellen.

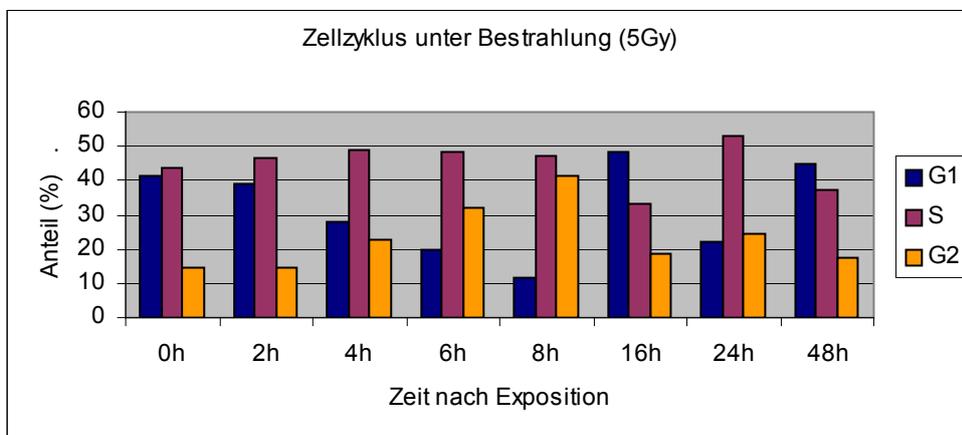


Abbildung 7: Anteile der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus einer mit 5 Gy bestrahlten Zellkultur 0 bis 48 Stunden nach Behandlung.

Unter Bestrahlung lässt sich nach 4 Stunden ein beginnender G2-Arrest erkennen: Hierbei reduziert sich der Anteil der G1-Zellen nach 8 Stunden von etwa 41% auf 12%, während der Anteil der G2-Zellen von 15% auf 42% steigt. Nach 16 Stunden tritt eine weitgehende Normalisierung der Werte ein. Der erhöhte Anteil von Zellen in der S-Phase nach 24 Stunden lässt sich durch eine Synchronisation während des

vorangegangenen Arrests erklären. Dabei wechseln nach 16 Stunden viele Zellen gleichzeitig von der G2-Phase und kurzer Mitose-Phase erneut in die G1-Phase und nachfolgend in die S-Phase.

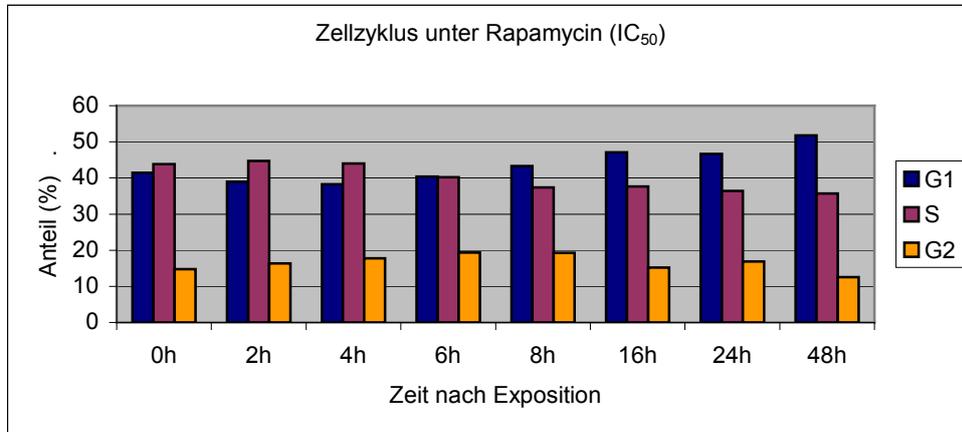


Abbildung 8: Anteile der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus einer mit Rapamycin behandelten Zellkultur 0 bis 48 Stunden nach Behandlung.

Unter alleiniger Rapamycin-Behandlung kann nach 8 Stunden ein Anstieg der G1-Fraktion um bis zu 10% gegenüber dem Ausgangszustand beobachtet werden.

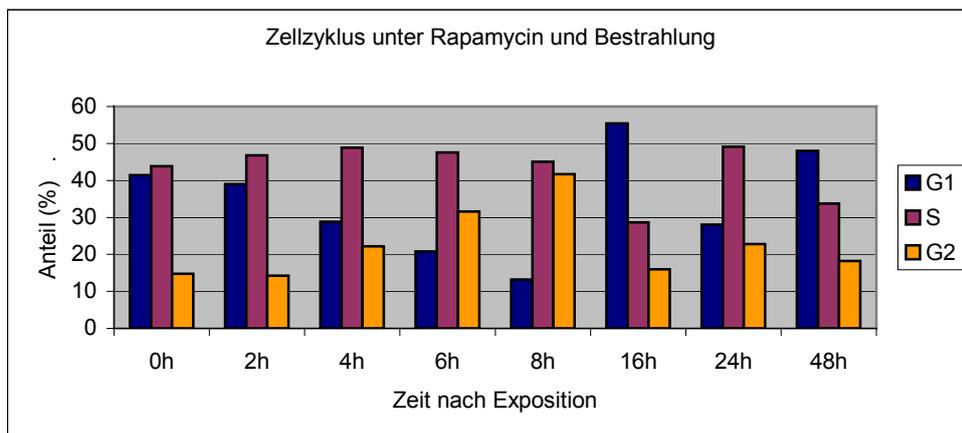


Abbildung 9: Anteile der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus einer mit 5 Gy bestrahlten und mit Rapamycin behandelten Zellkultur 0 bis 48 Stunden nach Behandlung (Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt).

Die Zellzyklusverteilung unter kombinierter Behandlung zeigt keine relevanten Unterschiede im Vergleich zur Verteilung bei alleiniger Bestrahlung. Lediglich der G1-Anteil ist nach 16 Stunden im Vergleich zwischen 3% und 7% erhöht.

3.5 Anteil vitaler Zellen

Um den Anteil vitaler Zellen nach Bestrahlung, Rapamycin-Gabe und kombinierter Behandlung zu ermitteln, wurden Zellkulturen 0 bis 8 Tage nach Behandlung durchflusszytometrisch untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die durchflusszytometrische Darstellung einer unbehandelten Zellkultur (Abbildung 10 und 11) sowie einer bestrahlten Zellkultur (Abbildung 12 und 13). Die Behandlung mit Rapamycin und die kombinierte Behandlung sind in diesem Zusammenhang nicht dargestellt, da sie entweder der unbehandelten Kontrolle (Rapamycin) oder der isolierten Bestrahlung (kombinierte Behandlung) gleichen.

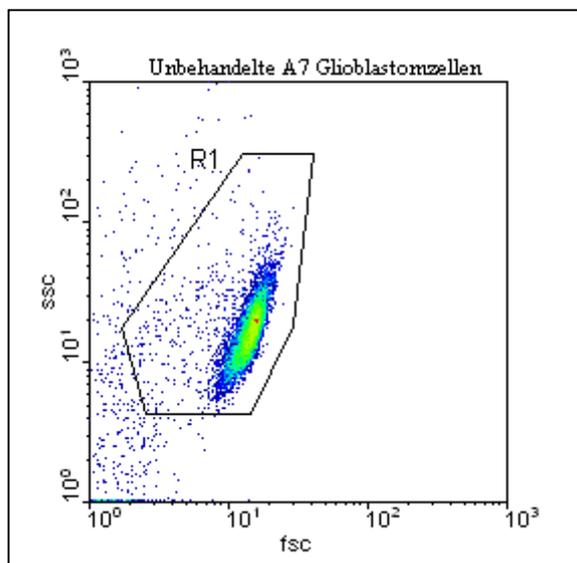


Abbildung 10

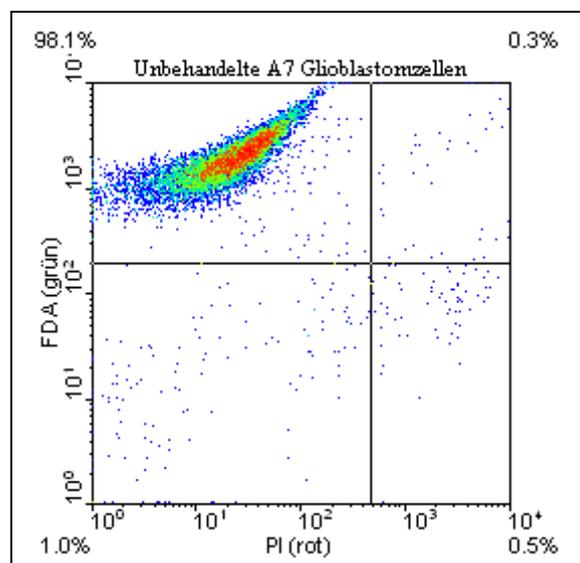


Abbildung 11

Abbildungen 10 und 11: Durchflusszytometrische Darstellung unbehandelter A7-Glioblastomzellen. Farbspektrum von Blau über Grün, Gelb nach Rot: Zunehmende Anzahl der pro Koordinate gezählten Zellen.

ssc...Vorwärtsstreuung, fsc...Seitwärtsstreuung, R1...Region (Abbildung 10)

FDA...Fluorescein-Diacetat (grüner Farbstoff), PI...Propidium-Jodid (roter Farbstoff), an den Ecken der Quadranten sind die prozentualen Anteile der jeweils enthaltenen Zellen angegeben (Abbildung 11)

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die durchflusszytometrische Darstellung unbehandelter A7-Glioblastomzellen. In der Streulichtdarstellung (Abbildung 10) liegen lebende und morphologisch noch intakte apoptotische Zellen innerhalb der Region R1. Zelltrümmer und Artefakte (zum Beispiel Luftblasen) liegen außerhalb. In der Fluoreszenzdarstellung (Abbildung 11) werden nur Zellen aus der Region R1 gezeigt, um Störsignale auszuschließen. Die Quadrantenmarkierung teilt die

dargestellten Zellen in vitale (links oben, etwa 98%), apoptotische (rechts unten, unter 1%) und sekundär nekrotische Zellen (links unten, 1%) ein. Dem Quadranten rechts oben kann kein biologisches Korrelat zugeordnet werden (starke Rot- und zugleich Grünfluoreszenz schließen sich aus).

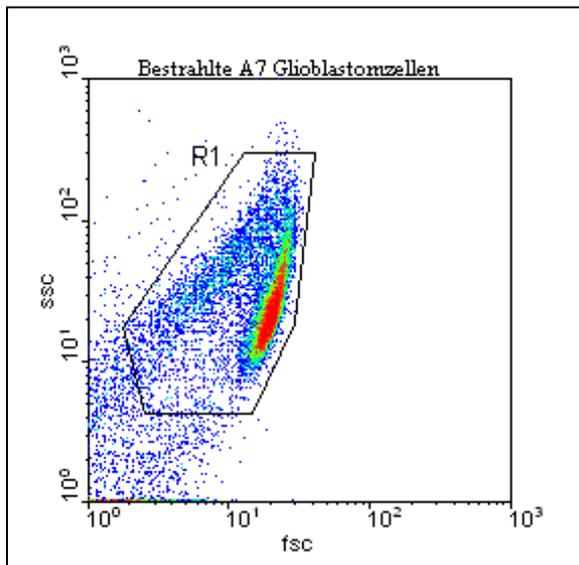


Abbildung 12

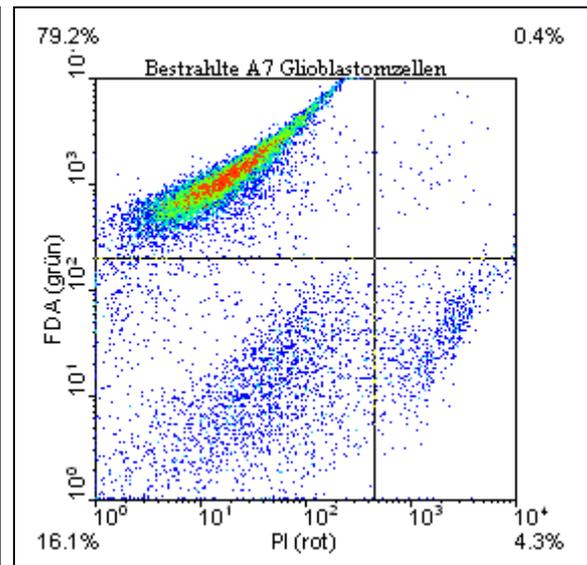


Abbildung 13

Abbildungen 12 und 13: Durchflusszytometrische Darstellung bestrahlter A7-Glioblastomzellen (5 Gy). Farbspektrum von Blau über Grün, Gelb nach Rot: Zunehmende Anzahl der pro Koordinate gezählten Zellen.

ssc...Vorwärtsstreulicht, fsc...Seitwärtsstreulicht, R1...Region (Abbildung 12)

FDA...Fluorescein-Diacetat (grüner Farbstoff), PI...Propidium-Jodid (roter Farbstoff), an den Ecken der Quadranten sind die prozentualen Anteile der jeweils enthaltenen Zellen angegeben (Abbildung 13).

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die durchflusszytometrische Darstellung bestrahlter A7-Glioblastomzellen. Die Auswertung und graphische Darstellung entsprechen dabei den Abbildungen 10 und 11. Der Anteil vitaler Zellen liegt etwa bei 79% (links oben), der Anteil apoptotischer Zellen bei 4% (rechts unten) und der sekundär nekrotischer Zellen etwa bei 16% (links unten).

Ausgehend von den oben dargestellten Einzelergebnissen zeigt Abbildung 14 den zeitlichen Verlauf aller vier Behandlungsformen (Kontrolle, Bestrahlung, Rapamycin - und kombinierte Behandlung).

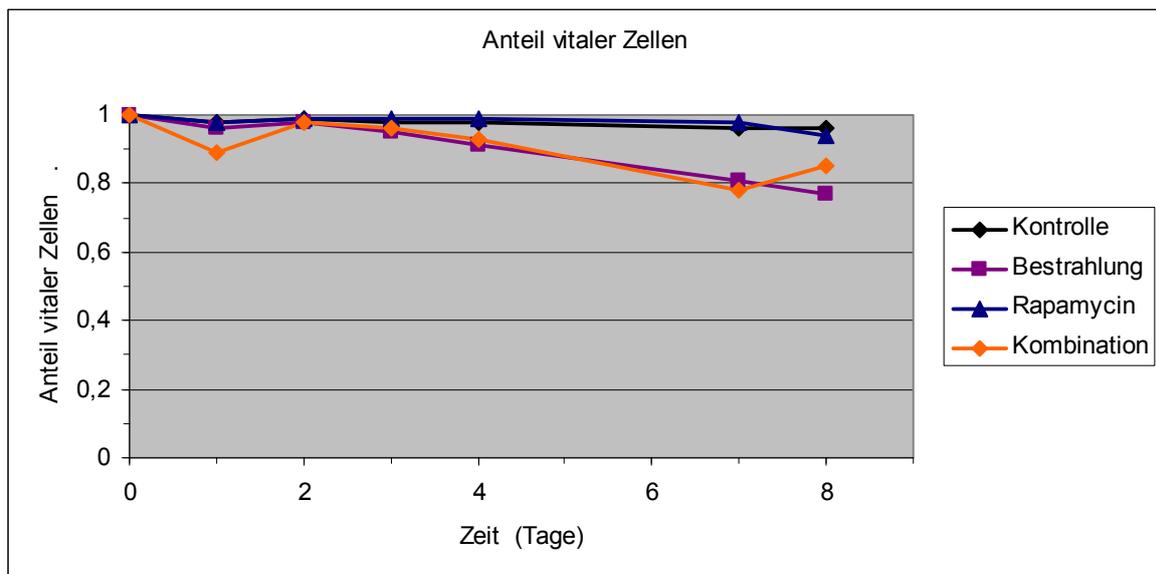


Abbildung 14: Anteile vitaler Zellen einer Kontrollpopulation (Kontrolle, schwarz), nach Bestrahlung (5 Gy, lila), Rapamycin (IC_{50} , blau) und kombinierter Behandlung (Rapamycin wurde nicht länger als 30 Minuten vor Bestrahlung dem Medium zugesetzt, orange) 0 bis 8 Tage nach Behandlung.

Der Anteil vitaler Zellen einer unbehandelten Kontrolle (vital im Sinne der durchflusszytometrischen Messung, linker oberer Quadrant der Abbildungen 11 und 13) und der mit Rapamycin behandelten Zellkultur unterschied sich kaum und lag zwischen 94% und 99%.

Bis auf einen deutlichen Abfall unter kombinierter Behandlung nach dem ersten Tag verliefen die Kurven von Bestrahlung und Kombinationsbehandlung gleich. Sie erreichten nach 8 Tagen einen Wert um 80% Anteil vitaler Zellen.

3.6 Zellkernmorphologie

Zur Darstellung der morphologischen Veränderungen nach Bestrahlung bzw. Rapamycin-Behandlung wurden A7-Zellen 8 Tage nach Exposition durchlicht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

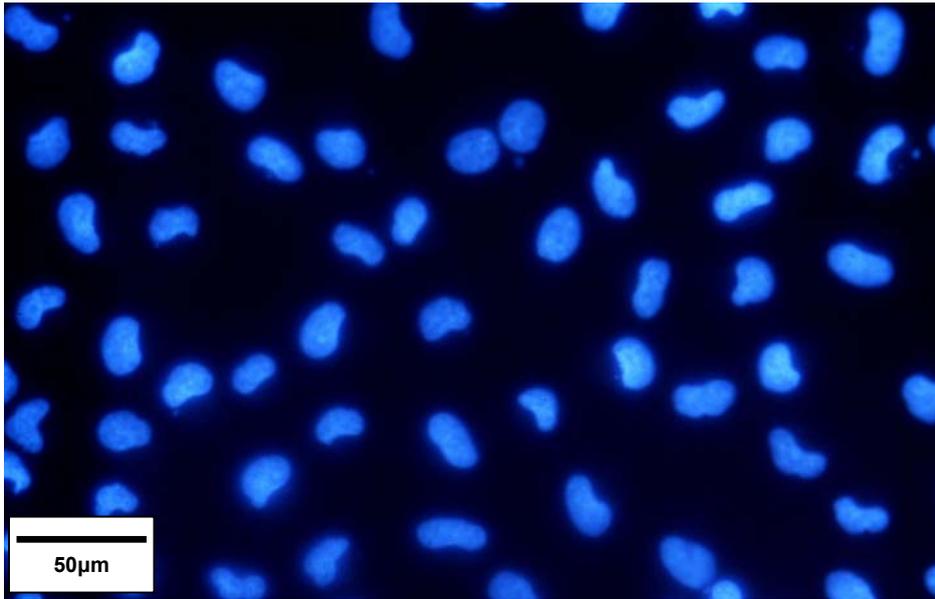


Abbildung 15: Zellkernmorphologie unbehandelter A7-Glioblastomzellen.
Maßstab: 50 µm

Abbildung 15 zeigt die Zellkernmorphologie unbehandelter A7-Glioblastomzellen. Diese zeichnet sich durch überwiegend homogen gefärbte Kerne mit glatter Berandung aus. Zusätzlich sind einzelne spontan auftretende apoptotische Kerne zu erkennen (Kernausschlüsse).

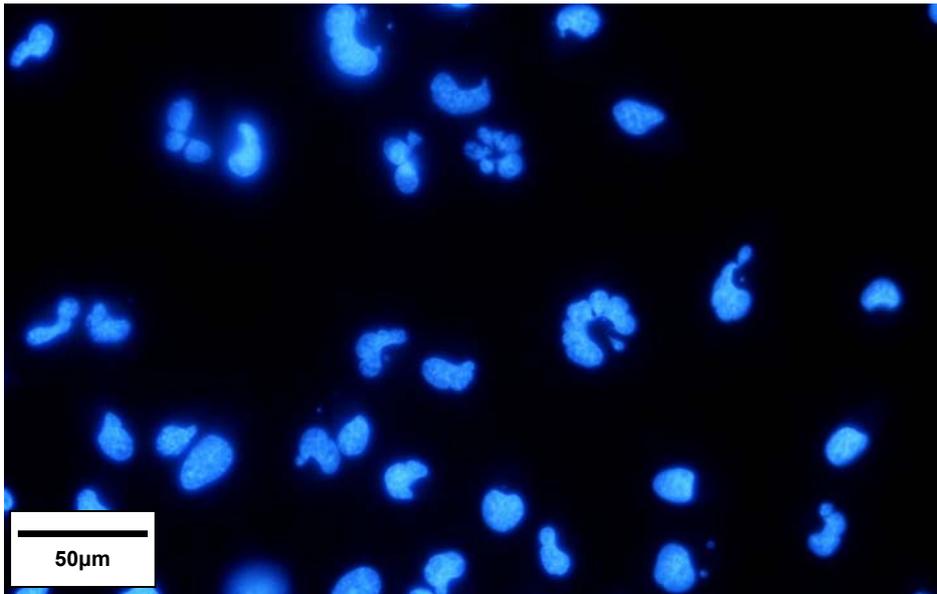


Abbildung 16: Zellkernmorphologie bestrahlter (5 Gy) A7-Glioblastomzellen. Maßstab: 50 μm .

Abbildung 16 zeigt die Zellkernmorphologie mit 5 Gy bestrahlter A7-Glioblastomzellen. Im Gegensatz zu Abbildung 14 sind hier zahlreiche apoptotische Kerne (gelappte, teils sequestrierte Kerne) erkennbar. Daneben liegen noch einzelne morphologisch nicht veränderte Kerne vor (glattrandig).

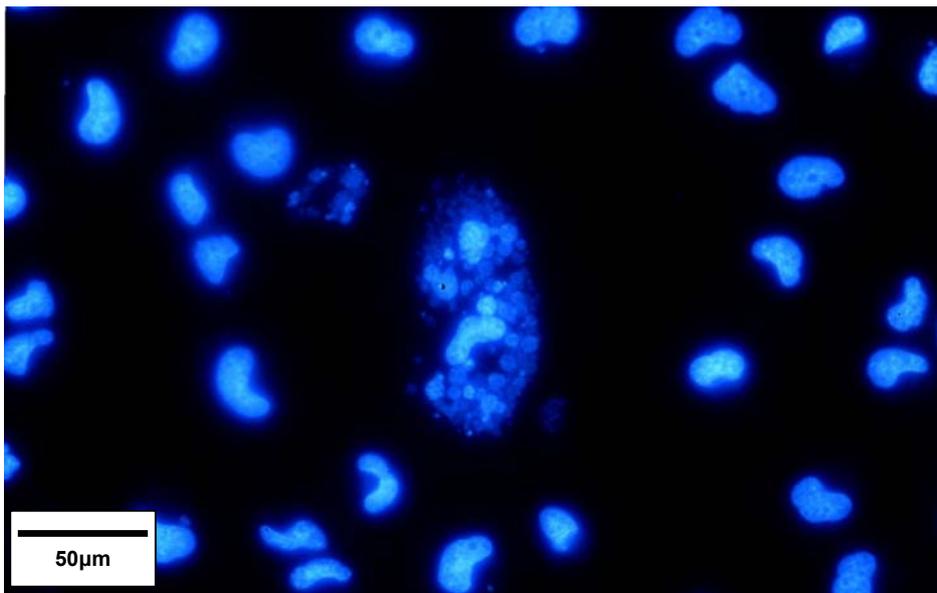


Abbildung 17: Zellkernmorphologie Rapamycin behandelter A7-Glioblastomzellen. Maßstab: 50 μm .

Abbildung 17 zeigt die Zellkernmorphologie Rapamycin-behandelter A7-Glioblastomzellen. Die meisten Kerne sind intakt. In der Bildmitte ist eine durch Endo- und Amitosen entstandene Riesenzelle gezeigt. Dieser Effekt war unter Rapamycin häufiger zu beobachten.

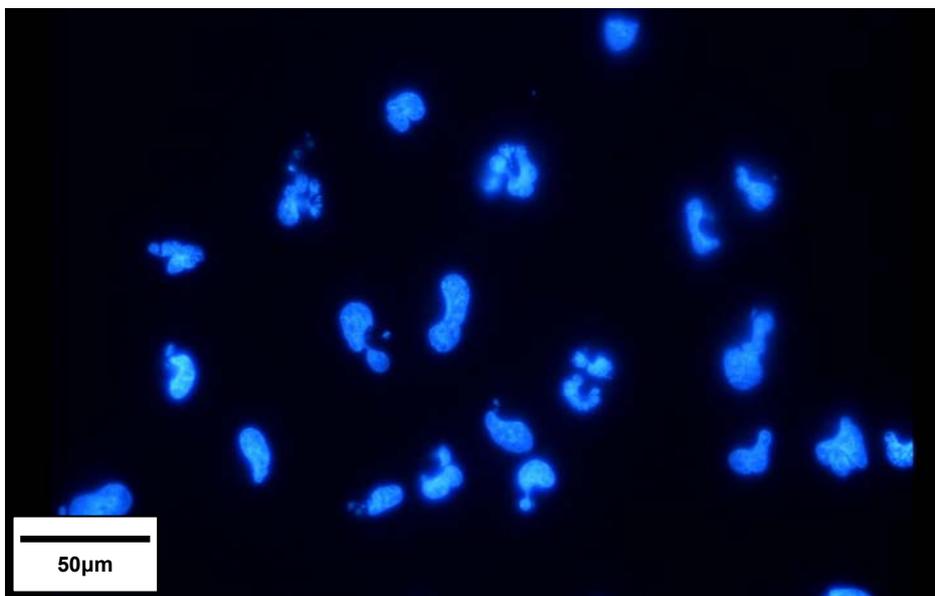


Abbildung 18: Zellkernmorphologie kombiniert behandelter A7-Glioblastomzellen. Maßstab: 50 μm.

Die Zellkernmorphologie kombiniert behandelter A7-Glioblastomzellen (Abbildung 18) entspricht weitgehend dem Bild bestrahlter Zellen: Es zeigen sich zahlreiche apoptotische Kerne sowie einzelne morphologisch nicht geschädigte Zellkerne.

4. Diskussion

4.1 IC₅₀-Konzentration von Rapamycin

Es konnte durchflusszytometrisch anhand des Populationswachstums gezeigt werden, dass bei A7-Glioblastomzellen die IC₅₀ von Rapamycin bei 0,05 nM lag.

Untersuchungen zweier Glioblastomzelllinien (SJ-G2, SJ-G3) auf ihre Rapamycin-sensibilität zeigten große Sensibilitätsunterschiede [22]: Während SJ-G2-Zellen mit einer IC₅₀ von 0,5 ng/ml (0,547 nM) sensibel auf Rapamycin reagierten, zeigten sich SJ-G3-Zellen bis zu einer Konzentration von 10000 ng/ml resistent gegenüber Rapamycin, es wurde dabei sogar eine zunehmende Überlebensrate bei steigender Rapamycinkonzentration beobachtet. In der selben Versuchsreihe wurden Rhabdomyosarkomzellen der Linie Rh30 über lange Zeit hohen Rapamycinkonzentrationen ausgesetzt. Dies führte zu einer um den Faktor 3700 resistenteren Population im Vergleich zur Ausgangszelllinie.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten A7-Glioblastomzellen mit einer IC₅₀ von 0,05 nM äußerst sensibel auf Rapamycin reagierten. Für Neuroblastomzelllinien sind IC₅₀ Werte von 1 nM bis über 600 nM dokumentiert (jeweils mit ähnlichen Inkubationszeiten wie bei A7 von 5 - 7 Tagen) [22]. Bei in vitro Experimenten zur Wachstumshemmung bei verschiedenen Glioblastomzelllinien (A172, SKMG-3, U87, U118) wurde eine Konzentration von 100 nM Rapamycin verwendet (3 Tage Inkubationszeit, keine Aussage zur IC₅₀) [13]. An anderer Stelle wird für die Glioblastomzelllinien U87 und U251 eine IC₅₀ von 4,8 µM bzw. 2,8 µM angegeben. Diese Werte sind jedoch nur bedingt vergleichbar mit den für A7 gefundenen Werten, da U87- und U251-Zellen nur 3 Tage mit Rapamycin inkubiert wurden [38]. Entsprechend den späteren Versuchen mit Bestrahlung und Kombinationsbehandlung mit Rapamycin wurde bei der Ermittlung der IC₅₀ von A7-Zellen eine Inkubationszeit von 7 Tagen verwendet. Die Zeitspanne, über die A7-Zellen Rapamycin ausgesetzt werden, scheint oberhalb von 12 - 24 Stunden keine nennenswerte Rolle mehr zu spielen. Untersuchungen konnten für Rapamycin unter Zellkulturbedingungen eine Halbwertszeit im Medium von etwa 12 Stunden zeigen. Wirkungen, die nach Ablauf dieser Zeit beobachtet werden konnten, wie zum Beispiel die Inhibition von p70^{S6k}, wurden durch eine verlängerte intrazelluläre Bindung von Rapamycin an FKBP12 erklärt [22].

4.2 Populationszählung und Koloniebildungstests: Dosis-Wirkungsbeziehung bei kombinierter Behandlung mit Strahlung und Rapamycin

Allgemein gelten Glioblastomzellen als eine der am wenigsten strahlensensiblen Tumorzellarten [14]. Ältere Untersuchungen konnten für A7-Glioblastomzellen eine mittlere Inaktivierungsdosis um 3 Gy zeigen (gemessen mittels Koloniebildungstests) [47]. Die mittlere Inaktivierungsdosis der hier untersuchten A7-Zellen lag bei Koloniebildungstests durchschnittlich bei 2,75 Gy, also auf einem ähnlichen Empfindlichkeitsniveau. Die durch Populationszählung gemessene mittlere Inaktivierungsdosis der hier verwendeten A7-Zellen lag bei 1,9 Gy.

Die Differenz der Werte bei Koloniebildungstests und Populationszählung geht auf einen systematischen Unterschied der Messmethoden zurück: Bei Koloniebildungstests werden nur Kolonien mit einer Mindestgröße, genauer mit einer Mindestzellzahl, üblicherweise 100, als vital bewertet. Im Niederdosisbereich kommt es dabei zu nicht detektierten Effekten, wenn die Zellzahl in einer Kolonie oberhalb der kritischen Grenze nur geringfügig reduziert ist. Der gleiche Effekt wird bei Zellzählungen sensibel erfasst, dies allerdings auch wenn eine lediglich zytostatische und nicht zytotoxische Wirkung zu Grunde liegt. In der Folge verlaufen die Dosiswirkungskurven bei Populationszählungen steiler als im Kolonietest. Die Fläche unter der Überlebenskurve, aus der die Inaktivierungsdosis hergeleitet ist, wird dabei deutlich reduziert. Methodisch hat die Populationszählung den Vorteil einer automatisierten Datenerhebung und dadurch einer vernachlässigbaren Untersucherabhängigkeit.

Die kombinierte Behandlung mit Rapamycin wirkte sich nicht signifikant auf die normierte Überlebensrate unter Bestrahlung aus. Dies konnte sowohl durch Populationszählung wie auch durch Koloniebildungstests gezeigt werden. Die Überlebenskurven der kombiniert behandelten Zellen lagen bei Populationszählung leicht oberhalb, bei Koloniebildungstests leicht unterhalb der nur bestrahlten Zellen. Beide Effekte sind im zweiseitigen t-Test nicht signifikant. Ein zweiseitiger Test wurde verwendet, da sowohl protektive als auch additive Effekte bei kombinierter Behandlung mit Bestrahlung und Rapamycin denkbar waren.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch andere Studien: Flowzytometrisch und in

Koloniebildungstests konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die Reaktion auf Bestrahlung bei U87-Glioblastomzellen in vitro nicht beeinflusst [13]. Bei diesen Versuchen kam es zu einem Rapamycin vermittelten G0/G1-Arrest ($67 \pm 4\%$ G1-Anteil ohne Rapamycin und $77 \pm 4\%$ mit Rapamycin), welcher sich aber in keiner Änderung der Reaktion auf Bestrahlung auswirkte. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Rapamycin Glioblastom-Xenografte in Mäusen für Bestrahlung sensibilisieren kann. Mögliche Ursache der Unterschiede zwischen den in vitro und in vivo Experimenten könnte, so die Autoren, eine Reaktion des Wirtsorganismus auf Rapamycin sein, die wiederum die Tumorzellen empfindlicher auf Bestrahlung reagieren ließe [13].

Bei MCF7-Mammakarzinomzellen blieb die Überlebensrate in Koloniebildungstests unter alleinigem Rapamycineinfluss unverändert. In Kombination mit Bestrahlung (3 Gy) konnte jedoch eine Erhöhung der Strahlensensitivität, ein veränderter mitochondrialer Stoffwechsel sowie die Induktion von Autophagie beobachtet werden [33].

Bei den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und DU145 hatte die kombinierte Behandlung mit Bestrahlung und der Gabe des Rapamycin-Derivates RAD001 einen synergistischen Effekt bei der Entstehung von Autophagie im Vergleich zu den isolierten Behandlungsformen [5].

4.3 Zellzyklusreaktionen

Bei bestrahlten A7-Glioblastomzellen (5 Gy) ließ sich nach 4 Stunden ein G2-Arrest erkennen, welcher nach 16 Stunden weitgehend überwunden wurde. Dieser Zellzyklusarrest ist eine physiologische Reaktion auf Bestrahlung. Um der Zelle Zeit für die Reparatur entstandener Schäden zu geben, kann der Zellzyklus am Übergang von G1-Phase zu S-Phase (G1-Arrest) und am Übergang von G2-Phase zur Mitose (G2-Arrest) angehalten werden.

Zu einem G1-Arrest, zum Beispiel als Folge ionisierender Strahlung und der dabei entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche, kommt es durch Aktivierung von ATM/ATR (ataxia teleangiectasia mutated / ATM- and Rad3-related). ATM/ATR phosphorylieren und aktivieren ihrerseits den Transkriptionsfaktor p53. Zusätzlich wird die Ubiquitin-Ligase MDM2 gehemmt, welche im Steady-State den kontinuierlichen Abbau von p53 regelt. Damit kommt es zur Akkumulation von p53, das u.a. als

Transkriptionsfaktor für p21 dient, welches wiederum Cyclin E / Cdk2-Kinase hemmt. Cyclin E / Cdk2-Kinase sind Schlüsselfaktoren für den Transit von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Zusätzlich wird RB/E2F in seinem aktiven, wachstumshemmenden Zustand gehalten. Sowohl p53 wie auch RB sind in vielen malignen Zellen inaktiv, wodurch ein G1-Arrest schnell überwunden wird oder gar nicht entsteht.

Ein G2-Arrest kann sowohl eintreten, wenn es während der G2-Phase zu einer Schädigung der DNA kam, als auch bei Fortbestehen von Schäden aus der G1- und S-Phase. Im Gegensatz zu einem G1-Arrest kann eine Zelle einen G2-Arrest auch ohne funktionsfähiges p53 auslösen. Dabei führt ATM/ATR selbst zu einer Hemmung der Faktoren Cyclin B / Cdk1, die für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose notwendig sind [26]. Da die Regulation des G2-Arrests also unabhängig von den bei Tumorzellen häufig inaktiven Faktoren ist, können selbst auf solche Weise mutierte Zellen nach DNA-Schäden meist noch mit einer Unterbrechung des Zyklus im G2 reagieren.

Eine Ausnahme besteht bei Ataxia Teleangiectatica, bei der das ATM-Gen mutiert ist (häufig homozygoter kompletter funktioneller Ausfall des ATM Proteins) und ein G2-Arrest über ATM nicht mehr möglich ist. Es entstehen vermehrt Immundefekte und Neoplasien des lymphoretikulären Systems.

Bei alleiniger Rapamycin-Gabe konnte nach 8 Stunden ein Anstieg der G1-Fraktion um bis zu 10% gegenüber dem Ausgangszustand beobachtet werden. Ein solcher G0/G1-Arrest wurde regelmäßig nach Gabe von Rapamycin gefunden, oft jedoch deutlich ausgeprägter und schneller [13]. Auch das Rapamycin-Derivat RAD001 kann zu einem Anstieg des Anteils von G1-Zellen führen. Dabei konnte durchflusszytometrisch eine Proliferationshemmung ohne zytotoxische Effekte beobachtet werden [18] [13]. RAD001 inhibiert mTOR, dessen Zielproteine (ribosomale S6-Kinase, EGFR- und AKT-Phosphorylierung) daraufhin eine verminderte Aktivität zeigten. Die Zellzyklusveränderungen unter Rapamycin führte man unter anderem auf eine verringerte Stabilität und Konzentration von Cyclin D1, eine Hochregulation von p27^{kip1} sowie seine verstärkte Anlagerung an den Cyclin E-Cdk2-Komplex zurück. Außerdem werden eine Inhibition der p70-S6-Kinase, der Cyclin A abhängigen Kinase-Aktivität, der Cyclin E/Cdk2 Kinase-Aktivität sowie eine leichte Inhibition der Cyclin D3/Cdk4 Kinase-Aktivität beschrieben [27] [20].

Auch bei einer Myelom-Zelllinie trat unter Rapamycin ein G1-Arrest auf. Dabei wurde ebenfalls ein Anstieg von p27 sowie ein Abfall von Cyclin D2 und D3 gemessen [46]. Darüberhinaus traten Apoptosen auf, die aber bei B-CLL-Zellen nicht nachweisbar waren, obwohl auch diese Zellen einen Rapamycin abhängigen G1-Arrest zeigten [37] [7].

Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Rapamycin induziertem G1-Arrest und dem Tumorsuppressorgen p53 führten zu unterschiedlichen Ergebnissen:

RKO-Kolorektalkarzinomzellen mit variabler Expression von p53 zeigten unabhängig von ihrem individuellen p53-Status unter Rapamycin einen G1-Arrest. Bei anderen Zellen, die auf Rapamycin mit einem G1-Arrest reagierten (MCF7 Mammakarzinom und Epstein-Barr-Virus-immortalisierte humane B-Lymphozyten), hatte der Wirkstoff keinen Effekt auf die basale p53- und p21-Menge. Die Kinetik der zellulären Reaktionen von p53/p21(WAF1) unter Bestrahlung blieb von Rapamycin unbeeinflusst (MCF7 Mammakarzinom) [29]. In einer anderen Untersuchung konnte allerdings bei der selben Zelllinie nach kombinierter Bestrahlung und Rapamycin-Gabe eine stärkere Phosphorylierung von p53 festgestellt werden, als nach alleiniger Bestrahlung. Rapamycin allein induzierte keine Phosphorylierung von p53 [33]. Die humane lymphoblastische Zelllinie 0719b, die ein mutiertes ATM-Gen trägt, zeigte bei der selben Rapamycin-Konzentration einen G1-Arrest wie die ebenfalls lymphoblastische Zelllinie 0536 mit intaktem ATM-Gen.

Daraus wurde geschlossen, dass p53 und Rapamycin auf unterschiedlichem Weg zu einem G1-Arrest führen. Außerdem scheint ein Rapamycin-induzierter G1-Arrest unabhängig von einem funktionstüchtigen ATM aufzutreten [30].

Rapamycin führt bei Rhabdomyosarkomzellen (Rh1, Rh30) mit einem mutierten p53 zu einem G1-Arrest, ohne dabei die Zyklone zu beeinflussen. Allerdings wurde dieser G1-Arrest von manchen Zellen überwunden, die dann nach Durchlaufen der S-Phase apoptotisch wurden. Wurde den Zellen p53 transfiziert, kam es nach wie vor zu einem G1-Block unter Rapamycin, apoptotische Zellen konnten aber nicht mehr gefunden werden [24]. Daraus schlossen die Autoren auf einen vor Apoptose schützenden Einfluss von Rapamycin.

Einen weiteren Hinweis auf antiapoptotische Eigenschaften von Rapamycin geben Untersuchungen an Mausfibroblasten: Bei diesen Zellen führte ionisierende

Strahlung zu einer dosisabhängig vermehrten Expression von mTOR (mTOR mRNA) und zur Phosphorylierung von p53, bereits begleitet von einer erhöhten Kaspaseaktivität und DNA-Fragmentierung (apoptotische Prozesse). Die Gabe von Rapamycin verhinderte die Phosphorylierung von p53 und nachgeschaltete apoptotische Vorgänge [50].

Trotz der unterschiedlichen Aussagen über ihre zellulären Wechselwirkungen eröffnet die Beobachtung, dass Rapamycin und p53 auf unabhängigen Wegen zu einem G1-Arrest führen können, die Möglichkeit, dass Rapamycin die Wirkung ionisierender Strahlen im Sinne eines Sensitizers modifizieren kann. Dabei könnte Rapamycin ein unabhängiger „Ersatz“ für das meist mutierte p53 sein.

Die Zellzyklusreaktion von A7 bei kombinierter Behandlung unterschied sich kaum von der bei alleiniger Bestrahlung. Allerdings konnte im Vergleich zu nur bestrahlten Zellkulturen nach 16 Stunden ein etwas stärkerer Anstieg der G1-Fraktion beobachtet werden. Da bei alleiniger Rapamycin-Behandlung die Zyklusveränderungen erst nach rund 8 Stunden erkennbar werden, eine Reaktion auf Bestrahlung aber bereits nach 4 Stunden eintritt, wäre es möglich, dass die strahleninduzierte Zellzyklusreaktion die Rapamycin-induzierte weitgehend überdeckt. So kann nach Überwindung des strahleninduzierten G2-Arrests eine Synchronisation die Reaktion auf Rapamycin verfälschen.

Um die Auswirkung einer Rapamycin-bedingten Veränderung der Zellzyklus-Verteilung auf die Strahlensensibilität zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests mit einer 8-stündigen Vorinkubation mit Rapamycin durchgeführt. Das Verhältnis der Überlebensfraktionen von Bestrahlung und kombinierter Behandlung mit Rapamycin zeigte allerdings keinen nennenswerten Unterschied zu den Versuchen ohne Vorinkubation. Die relativ geringfügigen Verschiebungen im Zellzyklus nach Rapamycin-Behandlung veränderten bei A7 das klonogene Überleben nach Bestrahlung nicht. Bei Chinesischen Hamster Ovarzellen (CHO) ergab sich dagegen bei abnehmender Zyklusaktivität eine verminderte Strahlentoleranz [2]. Auch klassische Synchronisationsexperimente (Sinclair 1968) lassen eine Abhängigkeit der zellulären Strahlenempfindlichkeit von der Zyklusphase erwarten. Dabei wurde festgestellt, dass nur reparatur-unfähige Mitosezellen noch empfindlicher als G1-

Phase-Zellen sind. Ebenfalls konnte ein Empfindlichkeitsanstieg auf Bestrahlung vor Eintritt in die S-Phase gezeigt werden [49]. Da Rapamycin den Zellzyklus durch seine Wirkung auf Zyklin E an diesem Punkt arretieren kann, ist eine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit durch Rapamycin denkbar.

4.4 Anteil vitaler Zellen

Der Anteil vitaler Zellen unter alleiniger Bestrahlung (5 Gy) unterschied sich kaum von dem bei zusätzlicher Behandlung mit Rapamycin und sank auf etwa 80% nach 8 Tagen. Apoptosen kamen zu etwa 4% und sekundär nekrotische Zellen zu etwa 16% vor. Bei Tumorzellen ist allgemein eine relativ geringe Apoptoserate zu erwarten, da bei ihnen die komplexe Steuerung des „programmierten Zelltodes“ häufig gestört ist. Für einen ungestörten Ablauf der Reparatur von DNA-Schäden ist normalerweise das Tumorsuppressorgen p53 notwendig. Kommt es durch ionisierende Strahlung zu einer Schädigung der DNA, akkumuliert p53 in der Zelle und löst Reparaturvorgänge aus. Ist der Schaden für eine Reparatur zu groß, initiiert p53 pro-apoptotische Faktoren, die zum programmierten Selbstmord der Zelle führen [43]. Ohne ein funktionsfähiges p53 können diese Vorgänge nicht regulär ablaufen. Die Folge sind verminderte Apoptoseraten und eine bei Tumorzellen häufig beobachtete genetische Instabilität [8]. Bei A7-Glioblastomzellen konnte in vitro über einen Beobachtungszeitraum von etwa 1300 Zellgenerationen ein Absinken der mittleren Chromosomenzahlen von 105 auf 85 gezeigt werden [3]. Trotz dieser deutlichen Veränderung blieb die Überlebensrate bei Bestrahlung stabil. Bei Zellpopulationen mit großer Chromosomenzahl, bei A7 zusätzlich verbunden mit einer erheblichen Karyotyp-Heterogenität, sind variable Gendosis-Effekte denkbar, die eine uniforme und im Fall von Rapamycin komplex regulierte Synergie verhindern.

Der Anteil vitaler Zellen nach alleiniger Rapamycin-Behandlung war zu allen gemessenen Zeitpunkten ähnlich dem unbehandelten Zellen und lag zwischen 94% und 99%. Apoptosen und sekundär nekrotische Zellen fanden sich nur wenige. Bei U87-Glioblastomzellen wird lediglich eine reine Wachstumshemmung beschrieben [13]. Entsprechend dieser lediglich zytostatischen Wirkung von Rapamycin sei es dabei weder zu einer Apoptose-Induktion noch zu einer Verminderung der Klonogenität gekommen.

Durch Populationszählung konnte bei A7-Glioblastomzellen ebenfalls eine Wachstumshemmung gezeigt werden. Die unter Rapamycin auf etwa die Hälfte reduzierte Angehrate (plating efficiency) bei Koloniebildungstests zeigte im Gegensatz zu U87-Zellen jedoch auch einen zytotoxischen Effekt.

Rapamycin führte bei Myelomzellen neben einem G1-Arrest auch zu einer geringfügigen Zunahme von Apoptosen [37]. Bei B-CLL-Zellen hatte Rapamycin dagegen keinen Einfluss auf die Apoptoserate [7].

Untersuchungen zu Apoptose und Autophagie bei Glioblastomzellen und DKO MEF-Zellen zeigen, dass Rapamycin bzw. das Rapamycin-Derivat RAD001 einen anti-apoptotischen Effekt haben kann, dabei aber die Autophagie fördert [39] [28].

Bei A7 war unter Rapamycin eine antiapoptotische Wirkung allerdings nicht zu erkennen.

Insgesamt sind die Angaben über zusätzlich zu einem G1-Arrest auftretende Apoptosen uneinheitlich. Die Auswirkungen von Rapamycin auf die Induktion von Apoptosen und auf zytostatische oder zytotoxische Wirkungen lassen sich offenbar nicht von einer Zelllinie auf eine andere übertragen.

4.5 Zellkernmorphologie

Einerseits ähnelten sich die Morphologien bestrahlter und kombiniert behandelte Zellen weitgehend. Neben unveränderten Kernen (homogene Färbung, glatte Berandung) lagen bei beiden Behandlungsformen gehäuft apoptotische Kerne (gelappt, teils sequestriert) vor. Andererseits hatten auch unbehandelte und die Rapamycin-behandelten Zellen übereinstimmende Kernmorphologien (hauptsächlich glatt berandete homogene Kerne, wenige spontan apoptotische Kerne). Beide Beobachtungen decken sich mit den jeweiligen Daten aus den Untersuchungen über den Anteil vitaler Zellen bei den verschiedenen Behandlungsformen. Auch bei verschiedenen anderen Zelllinien wurde eine Proliferationshemmung durch Rapamycin ohne morphologische Veränderungen beobachtet [18] [38] [39].

Abschließend lässt sich sagen, dass Rapamycin bei A7 zwar deutliche zytotoxische und zytostatische Wirkung hat, dass aber keine synergen oder antagonistischen Effekte mit ionisierender Strahlung auftreten.

5. Zusammenfassung

Fragestellung:

In dieser Arbeit wurden die Reaktionen der Glioblastomzelllinie A7 auf Bestrahlung und die kombinierte Gabe von Rapamycin untersucht. Ein häufiges Merkmal von malignen Zellen ist eine Mutation von p53. Da ein G1-Arrest von einem funktionsfähigen p53 abhängig ist, fehlt diesen Zellen meist die Fähigkeit, als Reaktion auf Bestrahlung und Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit einem G1-Arrest zu reagieren. Rapamycin vermittelt seine Wirkung über die Hemmung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR). Die Auswirkungen dieser Hemmung fallen je nach untersuchter Zelllinie recht unterschiedlich aus. Meist wird von einer nicht-zytotoxischen Wachstumshemmung und einem G1-Arrest berichtet. Da auch gezeigt werden konnte, dass Rapamycin auf einem p53-unabhängigen Weg zu einem G1-Arrest führen kann, wären veränderte Reaktionen auf Bestrahlung unter der gleichzeitigen Gabe von Rapamycin denkbar. Um dies zu klären, wurden Zellüberleben, Zellzyklus, das Vorkommen von Apoptosen und vitalen Zellen sowie morphologische Veränderungen nach Bestrahlung und Gabe von Rapamycin untersucht.

Material und Methoden:

Für die Untersuchungen wurde die Glioblastomzelllinie A7 verwendet.

Wurde dem Medium Rapamycin zugesetzt, entsprach die Rapamycin-Konzentration der Inhibiting concentration 50% (IC_{50}), hier 0.05 nM. Bei Bestrahlungsversuchen wurde eine variable Anzahl Zellen mit einem Linearbeschleuniger mit einer Dosis von 0 – 7 Gy bestrahlt (6 MV Photonen, ca. 2 Gy/min).

Die Reaktion auf Bestrahlung und Rapamycin wurde mittels Populationszählung, Koloniebildungstests, durchflusszytometrischer Untersuchungen auf Zellzyklusveränderungen und Zellüberleben sowie mikroskopischer Darstellung der Zellmorphologie untersucht. Die Ergebnisse aus Populationszählung und Koloniebildungstests wurden anschließend mit einem Einstichproben-t-Test (zweiseitig) auf ihre statistische Aussagekraft hin ausgewertet.

Ergebnisse:

Isoliert zeigten beide Behandlungsformen eine gute Wirkung auf A7-Zellen. Rapamycin wirkte in Koloniebildungstests mit einer Konzentration (IC_{50}) von 0,05 nM intensiv zytotoxisch auf A7-Glioblastomzellen, ohne dass durchflusszytometrisch

oder morphologisch eine erhöhte Rate an Apoptosen gezeigt werden konnte. Im Zellzyklus verursachte Rapamycin erwartungsgemäß einen G1-Arrest.

Die mittlere Inaktivierungsdosis bei alleiniger Bestrahlung lag im Koloniebildungstest bei rund 2,8 Gy. Dies entspricht dem unteren Bereich strahlentoleranter Zellen. Die mittels Populationszählung bestimmte mittlere Inaktivierungsdosis lag bei 1,9 Gy. Der deutliche Unterschied ist methodisch bedingt: Die primär zytostatische Wirkung von Rapamycin macht sich bei der Zellzahl deutlicher bemerkbar als auf Kolonie-Ebene. Strahleninduziert kam es neben einem G2-Arrest zu durchflusszytometrisch und morphologisch nachweisbaren Apoptosen.

Die Überlebensfraktion bei kombinierter Behandlung zeigte sowohl bei Populationszählungen als auch bei Koloniebildungstests einen rein additiven Effekt. Auch eine Vorinkubation mit Rapamycin erbrachte keine Änderung dieses additiven Effekts. Der durch Rapamycin ausgelöste G1-Arrest konnte bei Kombinationsbehandlung wahrscheinlich wegen der wesentlich stärkeren, strahleninduzierten Zyklusveränderungen (G2-Arrest) nicht mehr detektiert werden.

In der Literatur sind unterschiedliche Effekte von Rapamycin im Hinblick auf Apoptosen beschrieben. Dabei wird je nach Zelllinie von einer Apoptoseinduktion, dem Fehlen einer solchen oder sogar von einer antiapoptotischen Wirkung berichtet. Bei A7 konnte gezeigt werden, dass Rapamycin weder bei alleiniger Gabe noch in Kombination mit Bestrahlung einen Einfluss auf die Rate an Apoptosen hatte. Alternative Arten des Zelluntergangs sollten die zytotoxische Wirkung vermitteln, die Rapamycin in den Koloniebildungstests zeigte.

Schlussfolgerung:

Eine kombinierte Behandlung der Glioblastomzelllinie A7 mit Rapamycin und Bestrahlung zeigte keinen synergischen sondern lediglich einen rein additiven Effekt auf die Überlebensfraktion. Ursache hierfür ist möglicherweise das Ausbleiben der über den Zellzyklusarrest vermittelten pro-apoptotischen Wirkung von Rapamycin. Die potentiell strahlensensibilisierende (synerge) Aktivität von Rapamycin hinge dann vom individuellen Grad der Dysregulation von Zyklus und programmiertem Zelltod der untersuchten Zelllinien bzw. Tumoren ab.

6. Literaturverzeichnis

1. Bartkowiak D, Högner S, Nothdurft W, Röttinger EM:
Cell cycle and growth response of CHO cells to x-irradiation: Threshold-free repair at low doses,
Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2001, 50:221-227
2. Bartkowiak D, Nothdurft N, Röttinger EM:
Differential Proliferation Dependence of α and β Damage in X-irradiated Chinese Hamster Cells,
Strahlenther Onkol, 1999, 175:239-244
3. Bartkowiak D, Röttinger EM:
Stable radiobiological features in a genetically unstable glioblastoma cell line,
Int J Radiat Biol, 1997, 72:313-318
4. Bjornsti MA, Houghton PJ The TOR pathway:
A target for cancer therapy,
Nat Rev Cancer 2004, 4:335-348
5. Cao C, Subhawong T, Albert JM, Kim KW, Geng L, Sekhar KR, Gi YJ, Lu B:
Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells,
Cancer Res, 2006, 66:10040-10047
6. Castedo M, Ferri KF, Kroemer G:
Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic,
Cell Death Differ, 2002, 9:99-100
7. Decker T, Hipp S, Ringshausen I, Bogner C, Oelqner M, Schneller F, Peschel C:
Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and surviving,
Blood, 2003, 101:278-285
8. Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R:
Aneuploidy and cancer: From correlation to causation,
Contributions to Microbiology, 2006, 13:16-44
9. Dutcher JP:
Mammalian target of rapamycin inhibition,
Clin Cancer Res, 2004, 10:6382S-6387S
10. Edinger AL, Linardic CM, Chiang GG, Thompson CB, Abraham RT:
Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells,
Cancer Res, 2003, 63:8451-8460

11. Edinger AL, Thompson CB:
Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-
dependent nutrient uptake,
Mol Biol Cell, 2002, 13:2276–2288
12. Elsayed YA, Sausville EA:
Selected novel anticancer treatments targeting cell signaling proteins,
Oncologist, 2001, 6:517-537
13. Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN:
Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to
fractionated radiation therapy,
Cancer Res, 2002, 62:7291-7297
14. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP:
Mean Inactivation Dose: A useful concept for Intercomparison of Human Cell
Survival Curves
Radiation Research, 1984, 99:73-84
15. Fiveash JB, Spencer SA:
Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme,
Cancer J, 2003, 9:222–229
16. Gerweck LE, Kornblith, PL, Burlett P, Wang J and Sweigert S:
Radiation sensitivity of cultured human glioblastoma cells,
Radiology, 1977, 125:231-234
17. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA:
Targeting apoptosis pathways in cancer therapy,
CA Cancer J Clin, 2005, 55:178-194
18. Goudar RK, Shi Q, Hjelmeland MD, Keir ST, McLendon RE, Wikstrand CJ,
Reese ED, Conrad CA, Traxler P, Lane HA, Reardon DA, Cavenee WK,
Wang XF, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN:
Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular
endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of
rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition,
Mol Cancer Ther, 2005, 4:101-112
19. Grossman SA, Batara JF:
Current management of glioblastoma multiforme,
Semin Oncol, 2004, 31:635–644
20. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L,
Ferrari SJ:
Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin
D1 mRNA and protein stability,
Biol Chem, 1998, 273:14424-14429

21. Hermanson M, Funa K, Hartman M:
Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue:
Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of
autocrine and paracrine loops,
Cancer Res, 1992, 52:3213–3219
22. Hosoi H, Dilling MB, Liu LN, Danks MK, Shikata T, Sekulic A, Abraham RT,
Lawrence JC Jr, Houghton PJ:
Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells,
Mol Pharmacol, 1998, 54:815-824
23. Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS,
Abraham RT, Houghton PJ:
Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-
independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells,
Cancer Res, 1999, 59:886-894
24. Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ:
p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and
determine the cellular response to rapamycin,
Cancer Res, 2001, 61:3373-3381
25. Jaeckle KA, Ballman KV, Rao RD:
Current strategies in treatment of oligodendroglioma: Evolution of molecular
signatures of response,
J Clin Oncol, 2006, 24:1246 –1252
26. Kastan MB, Bartek J:
Cell-cycle checkpoints and cancer,
Nature, 2004, 432:316-323
27. Kawamata S, Sakaida H, Hori T, Maeda M, Uchiyama T:
The upregulation of p27Kip1 by rapamycin results in G1 arrest in exponentially
growing T-cell lines,
Blood, 1998, 91:561-569
28. Kim KW, Mutter RW, Cao C, Albert JM, Freeman M, Hallahan DE, Lu B:
Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and
mammalian target of rapamycin signalling,
J Biol Chem, 2006, 281:36883-36890
29. Louis DN:
Molecular pathology of malignant gliomas,
Annu Rev Pathol Mech Dis, 2006, 1:97–117
30. Metcalfe SM, Canman CE, Milner J, Morris RE, Goldman S, Kastan MB:
Rapamycin and p53 act on different pathways to induce G1 arrest in
mammalian cells,
Oncogene, 1997, 15:1635-1642

31. Neve RM, Holbro T, Hynes NE:
Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells,
Oncogene, 2002, 21:4567–4576
32. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C:
Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas,
Acta Neuropathol (Berl), 2004, 108:49–56
33. Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Lampen N, Yahalom J:
Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells,
Cancer Res, 2005, 65:11061-11070
34. Pene F, Claessens YE, Muller O:
Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma,
Oncogene, 2002, 21:6587–6597
35. Philp AJ, Campbell IG, Leet C:
The phosphatidylinositol 30-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors.
Cancer Res, 2001, 61:7426– 7429
36. Politi PM, Senderowicz AM:
First symposium of novel molecular targets for cancer therapy,
Oncologist, 2001, 6:207-212
37. Raje N, Kumar S, Hideshima T, Ishitsuka K, Chauhan D, Mitsiades C, Podar K, Le Gouill S, Richardson P, Munshi NC, Stirling DI, Antin JH, Anderson KC:
Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma,
Blood, 2004, 104:4188-4193
38. Rao RD, Mladek AC, Lamont JD, Goble JM, Erlichman C, James CD, Sarkaria JN:
Disruption of parallel and converging signaling pathways contributes to the synergistic antitumor effects of simultaneous mTOR and EGFR inhibition in GBM cells,
Neoplasia, 2005, 7:921-929
39. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC:
Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis,
Hum Mol Genet, 2006, 15:1209-1216
40. Reardon DA, Wen PY:
Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: Rationale and potential role of targeted agents,
Oncologist, 2006, 11:152-164

41. Ricci MS, Zong WX:
Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways,
Oncologist, 2006, 11:342-357
42. Sachs, L:
Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden,
7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, 1992, 210, 341-433
43. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R:
DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints,
cellular senescence and apoptosis,
J Zhejiang Univ Sci B, 2007, 8:377-397
44. Sehgal SN, Baker H, Vezina C:
Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation
and characterization,
J Antibiot (Tokyo), 1975, 28:727-732
45. Shapiro WR, Green SB, Burger PC:
Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy
regimens in postoperative treatment of malignant glioma: Brain Tumor
Cooperative Group Trial 8001
J Neurosurg, 1989, 71:1-9
46. Strömberg T, Dimberg A, Hammarberg A, Carlson K, Osterborg A, Nilsson K,
Jernberg-Wiklund H:
Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by
dexamethasone,
Blood, 2004, 103:3138-3147
47. Taghian A, Suit H, Pardo F, Gioioso D, Tomkinson K, DuBois W, Gerweck L:
In Vitro Intrinsic Radiation Sensitivity of Glioblastoma Multiforme,
Int J Radiation Oncology Biol Phys, 1992, 23:55-62
48. Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y:
Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through
mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3
fibroblasts,
Mol Cell Biol, 1999, 19:1346-1358
49. Terasima T, Tollmach LJ:
X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells,
Science, 1963, 140:490-492
50. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Sanders S, Dettin:
The PCPH oncoprotein antagonizes the proapoptotic role of the mammalian
target of rapamycin in the response of normal fibroblasts to ionizing radiatio,
Cancer Res, 2003, 63:6290-6298

51. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN:
Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle,
J Antibiot (Tokyo), 1975, 28:721–726
52. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E:
mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives,
Ann Oncol, 2005, 16:525-537
53. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE:
Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: a cooperative clinical trial,
J Neurosurg, 1978, 49:333–343
54. Wen PY, Kesari S, Drappatz J:
Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment.
Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6:733–754

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. E. Röttinger, ehemaliger Leiter der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Ulm und bei Herrn Dr. rer. nat. D. Bartkowiak, strahlenbiologisches Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Ulm, für die sehr geduldige und fundierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch allen medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten der Abteilung.

Sehr möchte ich mich auch bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und Hilfe während meines Studiums und der Zeit danach bedanken.

Ich hoffe, ich kann in Zukunft ein Stück davon zurückgeben.

Wolf Hornung