

Modulation der Strahlen- und Chemosensitivität menschlicher Tumorzellen durch Interferon

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**vorgelegt von
Eva Jöst
Geb. in Heidelberg**

Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS PANKREASKARZINOM	1
1.1.1 Entstehung des Pankreaskarzinoms.....	1
1.1.2 Stadieneinteilung und Therapie des Pankreaskarzinoms	2
1.2 DAS MALIGNNE MELANOM.....	4
1.2.1 Ursprung des malignen Melanoms und seiner Resistenzmerkmale	4
1.2.2 Stadieneinteilung und Therapie des malignen Melanoms	5
1.3 INTERFERONE	8
1.3.1 Einfluss von Interferonen auf die Genexpression	8
1.3.2 Interferone in der Therapie	9
1.3.2.1 Einfluss von Interferon auf die Behandlung des Pankreaskarzinoms (klinische Studien)	11
1.3.2.2 Einfluss von Interferon auf die Behandlung des malignen Melanoms (klinische Studien).....	12
1.4 INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN	13
1.4.1 DNA-Schäden durch chemotherapeutisch wirksame alkylierende Agenzien.....	13
1.4.1.1 TMZ und DTIC	13
1.4.2 Ionisierende Strahlung (IR).....	14
1.4.2.1 DNA-Schäden hervorgerufen durch ionisierende Strahlung.....	15
1.5 REPARATUR VON DNA-SCHÄDEN.....	16
1.5.1 N-Alkylierungen.....	16
1.5.1.1 Reparatur durch ABH2 und ABH3.....	16
1.5.1.2 Reparatur durch die Basenexzisionsreparatur (BER).....	17
1.5.2 Reparatur und Prozessierung von Läsionen an der O ⁶ Position des Guanins	18
1.5.2.1 Reparatur von Alkylierungen an der Position O ⁶ des Guanins durch MGMT	18
1.5.2.2 Prozessierung von O ⁶ MeG und Entstehung einer Punktmutation.....	19
1.5.2.3 Reparatur der Punktmutation durch die Fehlpaarungs-Reparatur	20
1.5.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	21
1.6 VON DER ERKENNUNG DES DNA-SCHADENS ZUR INDUKTION VON APOPTOSE	22
1.7 APOPTOSE	24
1.7.1 Intrinsische mitochondrial vermittelte Apoptose	27
1.7.2 Extrinsische Rezeptor vermittelte Apoptose.....	29
1.8 DER ZELLZYKLUS	30
1.8.1 Regulation des Zellzyklus.....	31
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	34
2 MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 MATERIAL.....	35
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel	35
2.1.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits	36
2.1.3 Interferone	37
2.1.4 Zytostatika	37
2.1.5 Software.....	37
2.1.6 Medien und Komponenten für Zellkultur	37
2.1.7 Antikörper.....	37
2.1.8 Puffer und Stammlösungen.....	38
2.1.9 Vektoren.....	39
2.1.10 Primer.....	39
2.1.11 Zelllinien.....	40
2.2 METHODEN	40
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur	40
2.2.2 Behandlung von Zellen mit Interferon.....	41
2.2.3 Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung.....	41
2.2.4 Behandlung von Zellen mit Zytostatika und deren Zubereitung	41
2.2.5 Erstellen einer Wachstumskurve.....	41
2.2.6 Bestimmung des Zellüberlebens durch den Koloniebildungstest.....	42
2.2.7 Bestimmung des Zelltods am Durchflusszytometer.....	42
2.2.7.1 Bestimmung der SubG1 Fraktion und der Zellzyklusverteilung.....	42
2.2.7.2 Annexin V / Propidium-jodid Doppelfärbung	42
2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA	43
2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.10 Synthese von Nukleinsäure in vitro.....	43
2.2.10.1 Synthese von cDNA	43
2.2.10.2 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	43
2.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten I.....	44
2.2.12 Herstellung von Gesamtzellextrakten II.....	44
2.2.13 Herstellung fraktionierter Zellextrakte	44
2.2.14 Proteinbestimmung nach Bradford.....	45
2.2.15 Western-Blot-Analyse	45
2.2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.2.15.2 Western-Blot-Transfer	45
2.2.15.3 Detektion von Proteinen mittels Antikörpern	46
2.2.16 Immunfluoreszenz (γ H2AX-Foci).....	46
2.2.16.1 Vorbereitung der Deckgläser und Ansetzen des Versuchs.....	46
2.2.16.2 Antikörper- und DAPI Färbung	46
2.2.16.3 Versiegelung der Proben und Auswertung	47
2.2.17 Messung der O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität (MGMT-Aktivitäts-Test).....	47
2.2.18 Stabile Transfektionen	47
2.2.18.1 Stabile Transfektion von MGMT in Säugerzellen	47
2.2.18.2 Stabile Transfektion von DN-FADD und Caspase-8 siRNA in Säugerzellen.....	48
2.2.19 Bestimmung der DNA-Synthese durch BrdU-ELISA	48
2.2.20 Neutrale Einzelzellelektrophorese (neutraler Komet Test).....	48
2.2.21 Das linearquadratische Modell	49
2.2.22 Arbeiten mit peripheren Blutzellen.....	49
2.2.22.1 Aufreinigung von Lymphozyten.....	49
2.2.22.2 Herstellung des Lymphozytenmediums (500 ml)	50
2.2.22.3 Bestimmung der Lymphozytenanzahl durch Trypan-Blau-Färbung.....	50
3 ERGEBNISSE	51
3.1 UNTERSUCHUNG DER RADIO- UND CHEMOSENSIBILISIERENDEN EIGENSCHAFTEN VON TYP-I INTERFERONEN IN PANKREASKARZINOM-ZELLINIEN	51
3.1.1 Radiosensibilisierung von Pankreaskarzinom-Zelllinien durch Typ-I Interferone.....	51
3.1.1.1 Intrinsische Radiosensitivität der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	51
3.1.1.2 Zytotoxische Wirkung von Typ-I Interferonen auf zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	53
3.1.1.3 Kombinationswirkung von Typ-I Interferonen und ionisierender Strahlung auf Pankreaskarzinom-Zelllinien	56
3.1.2 Untersuchung zellulärer Mechanismen, welche eine Bedeutung für den radiosensibilisierenden Effekt der Interferone in Pankreaskarzinom-Zelllinien haben könnten	58
3.1.2.1 Einfluss von Interferon- β auf die Überlebenskurven der vier ausgewählten Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung	59
3.1.2.2 Typ-I Interferon Rezeptor Status der Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Panc-1, Capan-1 und Capan-2.....	61
3.1.2.3 Einfluss von Interferon- β auf den Zellzyklus	62
3.1.2.3.1 Einfluss von Interferon- β auf die Proliferation der Pankreaskarzinom-Zelllinien	62
3.1.2.3.2 Einfluss von Interferon- β auf die verschiedenen Zellzyklusphasen.....	63
3.1.2.3.3 Einfluss von Interferon- β auf die Expression Zellzyklus-regulierender Gene.....	64
3.1.2.4 Einfluss von Interferon- β auf die Doppelstrangbruch-Induktion und Reparatur	65
3.1.2.4.1 Einfluss von Interferon- β auf die γ H2AX Foci Bildung und Abnahme.....	66
3.1.2.4.2 Einfluss von Interferon- β auf die Doppelstrangbruch-Reparatur, gemessen durch den neutralen Komet-Test.....	67
3.1.2.4.3 Einfluss von Interferon- β auf die Expression der HR-Proteine Rad51 und Rad52.....	68
3.1.2.5 Einfluss von Interferon- β auf die Apoptoserate nach Bestrahlung	69
3.1.3 Chemosensibilisierung der Pankreaskarzinom-Zelllinien durch Interferon- β	71
3.1.3.1 Auswirkungen einer Interferon- β Behandlung auf das p53 Expressions-Niveau in Pankreaskarzinom-Zelllinien	71
3.1.3.2 MGMT-Status und dessen Beeinflussung durch Interferon- β in Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	72
3.1.3.3 Einfluss von Interferon- β auf die Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung in vier Pankreaskarzinom-Zelllinien	73
3.2 UNTERSUCHUNG DER CHEMOSENSIBILISIERENDEN EIGENSCHAFTEN VON INTERFERON- β IN MALIGNEN MELANOMZELLINIEN	75
3.2.1 Charakterisierung der malignen Melanomzelllinien D05 und D14 hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber alleiniger Temozolomid- und Interferon-Behandlung	75
3.2.1.1 Wirkung von Temozolomid auf die Melanomzelllinien D05 und D14.....	75
3.2.1.2 Untersuchungen zum apoptotischen Signalweg nach Temozolomid-Behandlung in malignen Melanomzellen	76
3.2.1.3 Aktivität des Reparaturproteins MGMT in den Melanomzelllinien D05 und D14.....	77
3.2.1.4 Typ-I Interferon Rezeptor Status der Melanomzelllinien D05 und D14.....	77

Inhaltsverzeichnis

3.2.1.5 Einfluss von Typ-I Interferonen auf das Überleben der Melanomzelllinien D05 und D14	78
3.2.1.6 Einfluss von Typ I Interferonen auf die Proliferation der Melanomzelllinien	79
3.2.2 <i>Sensibilisierung der malignen Melanomzelllinien D05 und D14 gegenüber Temozolomid durch Interferon-β</i>	80
3.2.2.1 Bestimmung der durch Temozolomid-induzierten Apoptose der Zelllinien D05 und D14 vorbehandelt mit Interferon- α oder- β	80
3.2.2.2 Der durch eine Kombination von Temozolomid und Interferon- β hervorgerufenen Zelltod in Melanomzellen ist bedingt durch Apoptose.....	81
3.2.2.3 Kombinationsbehandlung von Melanomzellen mit Temozolomid und Interferon- β bewirkt eine Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7	83
3.2.2.4 Zeitlicher Verlauf der Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung bzw. nach Kombinationsbehandlung bestehend aus Temozolomid und Interferon- β	84
3.2.3 <i>Einfluss von Interferon-β auf die Behandlung nicht-maligner Zellen mit Temozolomid und auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin oder ionisierender Strahlung</i>	86
3.2.3.1 Kombinationswirkung von Temozolomid und Interferon- β auf humane Lymphozyten.....	86
3.2.3.2 Auswirkung von Interferon- β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin und ionisierender Strahlung.....	88
3.2.4 <i>Identifizierung der Läsion, von welcher der sensibilisierenden Effekt des Interferon-β gegenüber Temozolomid ausgeht</i>	90
3.2.4.1 Auswirkung von Interferon- β auf die Zelltodrate nach Behandlung mit dem alkylierenden Agenz Methylmethansulphonat (MMS)	91
3.2.4.2 Einfluss von Interferon- β auf die Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung in MGMT überexprimierenden Melanomzellen	92
3.2.5 <i>Einfluss von Interferon-β auf die Prozessierung des Temozolomid-induzierten DNA-Schadens O^6MeG und die darauf folgende Apoptose-Induktion</i>	94
3.2.5.1 Einfluss von Interferon- β auf die Reparatur und Prozessierung der durch Temozolomid hervorgerufenen Läsionen	94
3.2.5.1.1 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die MGMT Expression	94
3.2.5.1.2 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Fehlpaarungs- Reparatur-Proteine	95
3.2.5.1.3 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die Expression der Proteine der homologen Rekombination	96
3.2.5.2 Einfluss von Interferon- β auf die Anzahl der durch Temozolomid entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche	97
3.2.5.3 Einfluss von Interferon- β auf die Apoptose auslösenden Signalkaskaden.....	98
3.2.5.3.1 Interferon- β hat in der Zelllinie D14, nicht aber in der Zelllinie D05, einen Einfluss auf den intrinsischen Apoptoseweg.....	98
3.2.5.3.2 Interferon- β führt zu einer verstärkten Expression der Pro-Caspase-8, beeinflusst jedoch nicht die Expression des Fas-Rezeptors	100
3.2.6 <i>Verifizierung der Ergebnisse durch eine weitere p53-Wildtyp Melanomzelllinie (A375) und eine weitere p53-mutierte Melanomzelllinie (RPMI 7951)</i>	102
3.2.7 <i>Untersuchungen zur Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose in malignen Melanomzelllinien durch eine Interferon-β induzierte verstärkte Expression der Pro-Caspase-8</i>	104
3.2.7.1 Einfluss von Interferon- β auf die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose.....	105
3.2.7.2 Stabile Transfektion der Zelllinien D05 und A375 mit DN-FADD und deren Auswirkungen auf die Interferon- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber Temozolomid	108
3.2.7.3 Auswirkungen der Interferon- β induzierten verstärkten Expression der Pro-Caspase-8 auf die TRAIL vermittelte Apoptose	113
3.2.7.4 Stabile Transfektion der Zelllinie A375 mit einem Caspase-8 siRNA codierenden Vektor und deren Auswirkungen auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber Temozolomid.....	115
4. DISKUSSION	117
4.1 RADIO- UND CHEMOSENSIBILISIERENDE EIGENSCHAFTEN VON TYP-I INTERFERONEN IN PANKREASKARZINOM- ZELLLINIEN	117
4.1.1 <i>Die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität in ihrer intrinsischen Radiosensitivität</i>	117
4.1.2 <i>Die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität gegenüber einer Behandlung mit Typ-I Interferonen</i>	118
4.1.3 <i>Eine radiosensibilisierende Wirkung durch Typ-I Interferone ist nur in drei von zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien zu beobachten</i>	119
4.1.4 <i>Betrachtung der Wirkungsweise von Interferon-β auf eine Behandlung der Pankreaskarzinom-Zelllinien mit ionisierender Strahlung</i>	120
4.1.5 <i>Der radiosensibilisierende Effekt von Interferon-β ist nicht durch einer Veränderung des Zellzyklus bedingt</i>	122

Inhaltsverzeichnis

4.1.6 Eine Interferon- β Vorbehandlung zeigte in den Zelllinien Su8686 und Panc-1 keine Auswirkungen auf die Reparatur der durch Bestrahlung induzierten DNA-Doppelstrangbrüche.....	123
4.1.7 Interferon- β erhöht die Apoptoserate nach Bestrahlung.....	124
4.1.8 Interferon- β sensibilisiert die Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 nicht gegenüber einer Behandlung mit Temozolomid	125
4.2 CHEMOSENSIBILISIERENDE EIGENSCHAFTEN VON TYP-I INTERFERONEN IN MALIGNEN MELANOMZELLINIEN	127
4.2.1 In den untersuchten Melanomzelllinien D05 und D14 spielt der p53-Status keine Rolle für die Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber Temozolomid	127
4.2.2 Interferone hemmen die Proliferation der Melanomzelllinien D05 und D14, wobei Interferon- β einen deutlich stärkeren Effekt hervorruft als Interferon- α	128
4.2.3 Typ-I Interferone sensibilisieren maligne Melanomzelllinien gegenüber TMZ.....	129
4.2.4 In nicht malignen Zellen wird die Toxizität von Temozolomid nicht durch Interferon- β verstärkt..	131
4.2.5 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β ist gegenüber Fotemustin und ionisierender Strahlung deutlich schwächer ausgeprägt	132
4.2.6 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β gegenüber Temozolomid geht von der Läsion O ⁶ MeG aus	133
4.2.7 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β gegenüber Temozolomid wird nicht durch eine Beeinflussung der DNA-Reparatur vermittelt.....	134
4.2.8 Der sensibilisierende Effekt des Interferon- β gegenüber Temozolomid könnte in der p53-mutierten Zelllinie D14, nicht aber in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 durch eine Verstärkung des mitochondrial-vermittelten Apoptoseweges ablaufen.....	136
4.2.9 Interferon- β bewirkt in den p53-Wildtyp Melanomzelllinien D05, aber auch in der p53-mutierten Zelllinie D14 eine verstärkte Expression der Pro-Caspase-8	137
4.2.10 Der in D05 und D14 beobachtete Interferon-Effekt konnte in weiteren Melanomzellen bestätigt werden	139
4.2.11 p53-Wildtyp Melanomzellen weisen einen Defekt in der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose auf, welcher durch eine 24-stündige Interferon- β Vorinkubation überwunden werden kann	140
4.2.12 Interferon- β sensibilisiert Melanomzellen ebenfalls gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose.....	142
4.2.13 Die verstärkte Expression der Pro-Caspase-8 durch Interferon- β ist essentiell für die Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose in p53-Wildtyp Melanomzellen.....	143
4.2.14 Schematische Darstellung der Ergebnisse.....	144
5 ZUSAMMENFASSUNG	145
6 LITERATURVERZEICHNIS	147
7 ANHANG.....	163
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	163
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	167
7.3 TABELLENVERZEICHNIS	169
7.4 VERÖFFENTLICHUNGEN	169
7.5 KONGRESSTEILNAHME	170
7.5.1 Posterpräsentationen.....	170
7.5.2 Vorträge.....	170
7.6 LEBENS LAUF	171

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Der Pankreas ist ein Drüsenorgan und liegt im Oberbauch zwischen Magen, Milz, Leber und den großen Blutgefäßen im Bauchraum (Aorta und untere Hohlvene). Er ist über Ausführungsgänge mit dem Zwölffingerdarm verbunden, in den er Verdauungssäfte abgibt, welche im exokrinen Gewebe des Pankreas produziert werden. Weiterhin produzieren die Langerhans'schen Inseln, welche der Pankreas beinhaltet, Hormone, die den Blutzuckerspiegel regulieren. Diese werden als endokrines Drüsengewebe bezeichnet. Der Pankreas besteht aus einem Pankreaskopf, Pankreaskörper mit Pankreasgang (pancreatic duct) und dem Pankreasschwanz. Für jeden dieser Bereiche ist die Entstehung von Tumoren beschrieben. 95 % der Pankreastumore entspringen dem exokrinen Gewebe und nur 5 % dem endokrinen. Die häufigste Form des Pankreaskrebs ist ein duktales Adenokarzinom des Pankreas. In Europa sterben jährlich 40 000 Menschen an Pankreaskrebs, in USA sind es 30 000 (Parkin et al. 2001). Die Zahl der Erkrankungen nimmt mit steigendem Alter zu. Somit kann das Alter als ein Hauptrisikofaktor angesehen werden. Weiterhin gilt Zigarettenrauch als ein Hauptrisikofaktor, aber auch verschiedene Erbkrankheiten, wie zum Beispiel chronische Bauchspeicheldrüsenentzündung, Ataxia-Telangiectasia, ein erblich bedingtes erhöhtes Brustkrebsrisiko und das Peutz-Jeghers Syndrom werden mit einem erhöhten Pankreaskrebs-Risiko in Verbindung gebracht. Die durchschnittliche Überlebensrate nach Diagnose eines metastasierenden Pankreaskarzinoms liegt bei 4 – 6 Monaten (Ma et al. 2005; Schmidt et al. 2007) mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 1 – 3 % (Bramhall et al. 1995; Ma et al. 2005).

1.1.1 Entstehung des Pankreaskarzinoms

Wie viele andere maligne Erkrankungen entsteht das Pankreaskarzinom durch eine Anhäufung von Mutationen in Oncogenen, Tumorsuppressorgenen und in Genen, welche für die genomische Stabilität verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass die Mutationen in den verschiedenen Genen zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms entstehen. Eine der ersten genetischen Veränderungen ist die Mutation des K-ras Onkogens. Da mehr als 85 % aller Pankreaskarzinome eine Mutation im K-ras Onkogen aufweisen und diese Mutation schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms entsteht, gilt sie als ein früher diagnostischer

Einleitung

Marker (Uehara et al. 1999; Wenger et al. 1999). Als nächste genetische Veränderungen treten Mutationen in dem Tumorsuppressorgen p16 auf. Dieses ist in 95 % aller Pankreaskarzinome inaktiviert (Caldas et al. 1994; Schutte et al. 1997). Zu einem sehr späten Zeitpunkt in der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms treten inaktivierende Mutation in den Tumorsuppressorgenen p53 und MADH4 mit einer Häufigkeit von 76 bzw. 55 % auf (Li et al. 2004).

1.1.2 Stadieneinteilung und Therapie des Pankreaskarzinoms

Patienten, bei denen ein Pankreaskarzinom diagnostiziert wurde, lassen sich in verschiedene Stadien einteilen, nach denen sich die Therapie richtet. Die Einteilung erfolgt nach den TNM-Klassifizierungen, die für viele Tumore gültig sind. Hierbei gibt T Auskunft über die Ausdehnung des Primärtumors. N beschreibt, ob bereits regionale Lymphknotenmetastasen vorhanden sind und M macht Angaben darüber, ob Fernmetastasen vorliegen. Die Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms ist in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

Tabelle 1-1: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms

(Exocrine pancreas. In: American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 157-164.)

Stadium	Ausdehnung des Primärtumors (T)	Regionale Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	Carcinoma in situ	Nein	Keine
IA	Tumor auf Pankreas beschränkt; ≤ 2 cm Durchmesser	Nein	Keine
IB	Tumor auf Pankreas beschränkt; > 2 cm Durchmesser	Nein	Keine
IIA	Tumorausdehnung über Pankreas hinaus in den Zwölffingerdarm, den Gallengang oder Bindegewebe des Pankreas	Nein	Keine
IIB	Jede bisher genannte Ausdehnung	Ja	Keine
III	Tumorausdehnung über Pankreas hinaus in Magen, Milz, Kolon oder benachbarte große Gefäße	Ja / Nein	Keine
IV	Jede Ausdehnung	Ja / Nein	vorhanden

Einleitung

Die einzig kurative Therapie eines Pankreaskarzinoms ist eine Operation. Jedoch kommt eine Operation nur für 10 – 15 % der Patienten in Frage (Sener et al. 1999), da die Diagnose eines Pankreaskarzinoms meist erst sehr spät erfolgt. Schuld daran ist das Fehlen bestimmter Symptome. Damit ein Tumor des Pankreas operabel ist, dürfen zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasen vorhanden sein. Außerdem darf der Tumor noch nicht in die umliegenden Gefäße eingewandert sein (Stadium I und II), da sonst eine vollständige Entfernung nicht gewährleistet wäre. Zählt ein Patient zu den 10 – 15 %, für die eine Operation in Frage kommt, wird der Tumor durch eine Operation vollständig entfernt, und wenn nötig auch Teile der umliegenden Organe wie z. B. Magen, Darm, Leber oder Milz. Eine Operation erhöht das durchschnittliche Überleben der Patienten von 4 – 6 Monate auf 10 – 18 Monate (Allema et al. 1995; Mosca et al. 1997; Sohn et al. 2000). In den meisten Fällen folgt einer Operation eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) / Folinsäure. Einer Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) zufolge, kann dadurch die durchschnittliche Überlebensrate von 14 Monaten, für die ausschließlich operierte Gruppe, auf 19,7 Monate gesteigert werden (Neoptolemos et al. 2001). In manchen Fällen wird zusätzlich zu einer Behandlung mit 5-FU eine Bestrahlung durchgeführt, der Nutzen dieser Kombination wird jedoch kontrovers diskutiert (Neoptolemos et al. 2001; Neoptolemos et al. 2004). Auch eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika oder Bestrahlung mit IFN- α wird in klinischen Studien geprüft (Nukui et al. 2000; Picozzi et al. 2003). Jedoch ist dieses Behandlungsschema auch mit einer erhöhten Toxizität verbunden. Ist der Tumor bereits in die umliegenden Gefäße eingedrungen (Stadium III) oder haben sich schon Fernmetastasen gebildet (Stadium IV), kann er nicht mehr operativ entfernt werden, und die Therapie erfolgt nur noch unter palliativen Gesichtspunkten. Dauerhafte Remissionen sind durch chemotherapeutische Maßnahmen in diesem Stadium nicht zu erwarten. In diesem Fall ist das Mittel erster Wahl das Cytidin-Analogum Gemcitabin. Auch eine Therapie mit 5-FU ist möglich, jedoch wird das durchschnittliche Überleben der Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom durch eine Therapie mit Gemcitabine auf 5,65 Monate erhöht, durch eine Therapie mit 5-FU nur auf 4,41 Monate (Burriss et al. 1997). Die sonst häufig in der Krebstherapie verwendeten Alkylantien spielen in der Therapie des Pankreaskarzinoms keine Rolle. Pankreaskarzinome weisen eine extrem hohe Resistenz gegenüber Alkylantien auf, was mit ihrem hohen Level des Reparaturenzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) in Verbindung gebracht werden kann (Kokkinakis et al. 1997).

Einleitung

1.2 Das maligne Melanom

Es gibt vier verschiedene Arten von Hautkrebs. Aktinische Keratosen, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom und das maligne Melanom. Das maligne Melanom, auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt, ist ein bösartiger Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht und für 90 % der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich ist. Er manifestiert sich überwiegend an der Haut, selten kommt es auch zu Melanomen am Auge, an den Hirnhäuten und Schleimhäuten. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich 10 - 12 von 100 000 Einwohnern. In den USA sind es 10 – 25 Fälle pro 100 000 Einwohner und die höchsten Zahlen an Neuerkrankungen wurden mit 50 – 60 Fälle pro 100 000 Einwohner in Australien beobachtet. In Bevölkerungen mit stärkerer Pigmentierung (Afrika, Asien) tritt das Melanom sehr selten auf und wenn, dann überwiegend an Schleimhäuten. Der Hauptrisikofaktor zur Entwicklung von Melanomen ist die ungeschützte Exposition zu Sonnenlicht, hier vor allem zu UV-B-Strahlung (Wiecker et al. 2003). 5 – 10 % der Melanome können auf polygene Erbfaktoren zurückgeführt werden (Greene et al. 1985). Die durchschnittliche Überlebensrate für einen Patienten mit einem metastasierenden malignen Melanom beträgt 4 – 6 Monate (Schuchter et al. 1992).

1.2.1 Ursprung des malignen Melanoms und seiner Resistenzmerkmale

Das maligne Melanom entwickelt sich aus Melanozyten. Dermale Melanozyten gehen aus der Neuralleiste hervor. Dabei handelt es sich um eine Zellpopulation, die während der Embryogenese durch den Embryo wandert und als Vorläufer verschiedener Zelltypen dient, unter anderem der dermalen Melanozyten. Diese Fähigkeit zur Migration könnte während der Melanomentwicklung wiedererlangt werden und die frühe Tendenz zur Metastasierung erklären (Gupta et al. 2005). Die frühe Metastasierung im Vergleich zur Tumormasse ist ein Grund für die schlechte Prognose eines malignen Melanoms. Ein weiterer Faktor, welcher für die schlechte Prognose des malignen Melanoms verantwortlich gemacht werden kann, ist das schlechte Ansprechen der Tumore auf die angewandten Therapien. Die Ursache hierfür könnte aus der Funktion der Melanom-Vorläufer-Zellen, der Melanozyten erklärt werden. Diese dienen als Fotoprotektoren der Haut. Während andere primäre Zellen auf Strahlung mit Reparatur oder Zelltod reagieren, ist es die Aufgabe der Melanozyten nach UV-Bestrahlung Melanin zu produzieren und so die umliegenden Zellen vor der DNA-Schädigung durch UV-Licht zu schützen

Einleitung

(Matsumura and Ananthaswamy 2002). Melanozyten werden durch externe und interne Signale vor der Auslösung von Zelltod bewahrt. Als externe Größe spielt hier die Ausschüttung der Wachstumsfaktoren FGF und NGF von Fibroblasen bzw. Keratinozyten eine wesentliche Rolle (Zhai et al. 1996; Ruitter et al. 2002). Aber auch eine Heraufregulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl2 in Melanozyten trägt zu deren Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Stimuli bei. Demnach scheinen Tumore, welche aus diesen Zellen hervorgehen, generell über Resistenzmerkmale zu verfügen, welche die Therapie erschweren. Besonders relevant für das Ansprechen eines Tumors auf eine Therapie ist seine Fähigkeit, nach einem Stimulus Apoptose auszulösen. Diese Fähigkeit scheinen Melanome im Zuge der Onkogenese teilweise einzubüßen (Alanko et al. 1999). So scheinen Melanome gegenüber der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose resistent zu sein, obwohl sie den Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (Rivoltini et al. 1998; Thomas and Hersey 1998). Allgemein konnte in Melanomen die Heraufregulierung von antiapoptotischen und die Herunterregulierung von proapoptotischen Faktoren beobachtet werden (Soengas et al. 2001), was als Hauptursache für die Resistenz dieser Tumore gegenüber chemotherapeutischen Agenzien gilt (Grossman and Altieri 2001). In diesem Zusammenhang ist auch die geringe Rate an mutiertem p53 in diesen Tumoren interessant. Sie beträgt in Melanomen nur etwa 20 % (Zerp et al. 1999).

1.2.2 Stadieneinteilung und Therapie des malignen Melanoms

Patienten mit einem maligne Melanom lassen sich in verschiedene Stadien einteilen, welche die Grundlage für weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen sind, sowie für die Einschätzung der individuellen Prognose. Die TNM-Klassifizierung ist unter Berücksichtigung melanomspezifischer Faktoren (Tumordicke, Geschwürausbildung und Mikrometastasierung) auch für maligne Melanome anwendbar (Tabelle 1-2). T beschreibt die Einteilung des Primärtumors und bezieht sich bei malignen Melanomen auf die Tumordicke und die Geschwürausbildung. Die N-Klassifikation berücksichtigt, ob Mikro- oder Makrometastasen der regionalen Lymphknoten vorliegen und ob Satellitenmetastasen (bis 2 cm vom Primärtumor entfernt) oder In-transit-Metastasen (kutane oder subkutane Metastasen bis zur ersten Lymphknotenstation) vorliegen. Als Fernmetastasen gelten Metastasen jenseits der ersten Lymphknotenstation. Die M-Klassifikation berücksichtigt, welche Organe von Metastasen befallen sind.

Einleitung

Tabelle 1-2: Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach: (Balch et al. 2000; Balch et al. 2001a)

Stadium	Dicke des Primärtumors (mm) (T)	Geschwürsbildung	Regionale Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)	10-Jahres-Überlebensrate (%)
0	<i>In situ</i> Tumore	Nein	Keine	keine	Ca. 100
IA	≤ 1,0	Nein	Keine	keine	88 – 95
IB	≤ 1,0 oder 1,01 – 2,0	Ja	Keine	keine	79 – 83
		Nein			
IIA	1,01 – 2,0 oder 2,01 – 4,0	Ja	Keine	Keine	63 – 64
		Nein			
IIB	2,01 – 4,0 oder > 4,0	Ja	Keine	Keine	50 – 54
		Nein			
IIC	> 4,0	Ja	Keine	Keine	32
IIIA	Jede Tumordicke	Nein	Mikrometastasen	Keine	57 – 63
IIIB	Jede Tumordicke	Ja	Mikrometastasen	Keine	36 – 38
			Makrometastasen, Satelliten- u./o. in-transit Metastasen		39 – 47
IIIC	Jede Tumordicke	Ja	Makrometastasen, Satelliten- u./o. in-transit Metastasen	Keine	15 – 24
					18
IV	Jede Tumordicke	Ja / Nein	Mikrometastasen Makrometastasen Satelliten- u./o. in-transit Metastasen	Haut oder Lymphknoten	15
				Lunge	3
				Alle anderen Organe	6

Die Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach dem Stadium, in welches der Patient eingeteilt wurde. Hierbei entscheidet besonders die Dicke des Primärtumors über die Form der Therapie. Eine verdächtig pigmentierte Hautveränderung wird durch eine Operation vollständig entfernt. Handelt es sich um ein Melanom, wird der Tumordicke entsprechend in einem Sicherheitsabstand von 0,5 – 2 cm um den Primärtumor das Gewebe entfernt, um das Auftreten von Sattelitenmetastasen zu verhindern. In Stadium I ist die operative Entfernung des Melanoms ausreichend und führt zu einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 95 % (Gloster and Brodland 1996). Bei Patienten mit einer Tumordicke ≥ 2 mm (Stadium II) ist das Risiko Mikrometastasen auszubilden deutlich erhöht (Balch et al. 2001b). In diesem Fall, oder wenn bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden sind (Stadium III), wird eine adjuvante Therapie mit niedrig oder hoch dosiertem Interferon- α durchgeführt (Grob et al. 1998; Agarwala and Kirkwood 2002). Dadurch kann das rezidivfreie Überleben signifikant verlängert werden (Kirkwood et al. 2000; Kirkwood et al. 2001). Eine Chemotherapie wird erst im Stadium IV angewendet und erfolgt in erster Linie unter palliativen Gesichtspunkten. Dauerhafte Remissionen sind durch chemotherapeutische Maßnahmen in diesem Stadium nur selten. Die Chemotherapie

Einleitung

kann entweder als Mono- oder Polychemotherapie erfolgen. Das Mittel erster Wahl für eine Monotherapie ist das methylierende Agens Dacarbazin (DTIC) (Eggermont and Kirkwood 2004) mit einer Ansprechrate der Tumore von 12 % und einer durchschnittlichen Überlebensrate von 6,4 Monaten (Middleton et al. 2000). Alternativ hierzu wird in klinischen Studien immer häufiger das ebenfalls methylierende Agens Temozolomid (TMZ) eingesetzt, da es gegenüber DTIC einige Vorteile aufweist (Kaufmann et al. 2005). Erstens kann es oral verabreicht werden, zweitens benötigt es keine metabolische Aktivierung, drittens ist es liquorgängig und kann somit auch für die häufig auftretenden Hirnmetastasen eingesetzt werden und viertens besitzt TMZ eine hohe Bioverfügbarkeit. Trotz dieser Vorteile ist die Ansprechrate der Tumore auf eine Behandlung mit TMZ und die durchschnittliche Überlebenszeit mit 14 % bzw. 7,7 – 8,4 Monaten vergleichbar mit der von DTIC (Middleton et al. 2000). TMZ ist zur Zeit in Deutschland für die Behandlung des malignen Melanoms noch nicht zugelassen. Weiterhin wird für eine Monotherapie auch das chlorethylierende Agens Fotemustin (FM) verwendet, welches aber in Deutschland ebenfalls nicht zugelassen ist. In klinischen Studien konnte die Ansprechrate der Tumore durch eine Kombination von Chemotherapie und IFN- α oder IFN- β erhöht werden (Nagatani et al. 1995; Richtig et al. 2004; Kaufmann et al. 2005). Die Ursache hierfür ist jedoch noch nicht vollkommen bekannt. Ebenso kann eine Kombination der Chemotherapeutika untereinander die Ansprechraten der Tumore erhöhen, jedoch erhöhen sich dadurch auch die Nebenwirkungen, ohne das Gesamtüberleben zu beeinflussen.

Eine Strahlentherapie primärer maligner Melanome wird nur angestrebt, wenn eine Operation unmöglich ist. Auch eine Bestrahlung von Lymphknotenmetastasen findet nur statt, wenn eine Operation nicht durchgeführt werden kann. Sind bereits Fernmetastasen vorhanden, findet auch eine Strahlentherapie nur unter palliativen Gesichtspunkten statt. Sie wird z.B. zur Behandlung von Knochenmetastasen angewendet.

1.3 Interferone

Interferone (IFN) wurden erstmal 1957 von Isaacs und Lindemann in London entdeckt. Sie gehören zu der Gruppe der Zytokine und haben eine immunstimulierende, antivirale und antitumorale Wirkung (Isaacs and Lindenmann 1957). Sie werden von Zellen des Immunsystems (z.B. Monozyten, B- und T-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten) gebildet. Auslöser für diese Zellen, Interferone zu bilden und auszuschütten, sind fremde Zellen, virusinfizierte Zellen, Tumorzellen, Bakterien oder virale und andere fremde Nukleinsäuren. Interferone können allgemein in zwei Gruppen eingeteilt werden: Typ-I Interferone (IFN- α und IFN- β) und Typ-II Interferone (IFN- γ). IFN- α und IFN- β binden an den selben Rezeptor (Branca and Baglioni 1981; Williams and Haque 1997), jedoch ist die Affinität zum Rezeptor von IFN- β deutlich höher im Vergleich zu IFN- α (Johns et al. 1992). IFN- γ bindet an einen anderen Rezeptor als IFN- α oder IFN- β (Branca and Baglioni 1981). Die Aufgabe der Interferone ist es durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor benachbarte Zellen zu aktivieren und sie zur Produktion von Proteinen anzuregen, die z.B. die Virusreplikation hemmen und den Abbau von viraler und zellulärer RNA bewirken.

1.3.1 Einfluss von Interferonen auf die Genexpression

Interferone sind in der Lage, die Genexpression in ihren Zielzellen über den Jak/STAT Signalweg zu beeinflussen (Fu et al. 1992; Silvennoinen et al. 1993; Schindler and Darnell 1995; Stark et al. 1998). Wie dieser Signalweg abläuft, soll hier am Beispiel der Typ-I Interferone erklärt werden (Abb. 1-1). Nach der Bindung von IFN an die extrazelluläre Domäne des IFN-Rezeptor, bestehend aus zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, kommt es zu deren Dimerisierung. Die eine der beiden Untereinheiten ist an ihrer cytoplasmatischen Domäne mit der Janus-Kinase-1 (JAK), die andere mit der Tyrosinkinase-2 (TYK) assoziiert (Darnell et al. 1994; Plataniias 2003). Bei Kontakt der beiden Kinasen kommt es zu deren Phosphorylierung und zur Rekrutierung von STAT1 und STAT2 (signal transducer and activator of transcription) (Darnell et al. 1994). Nach deren Phosphorylierung bilden sie Heterodimere, welche mit IRF 9 (Interferon regulatory factor 9) assoziieren (Stark et al. 1998) und so den Interferon-stimulierten Transkriptionsfaktor 3 (ISGF 3) bilden (Darnell 1997; Stark et al. 1998). Dieser gelangt in den Nukleus und bindet an das „Interferon-stimulated-response-element“ (ISRE). Dieses ist verschiedenen Genen vorgeschaltet, welche durch Interferone reguliert werden (Darnell 1997).

Einleitung

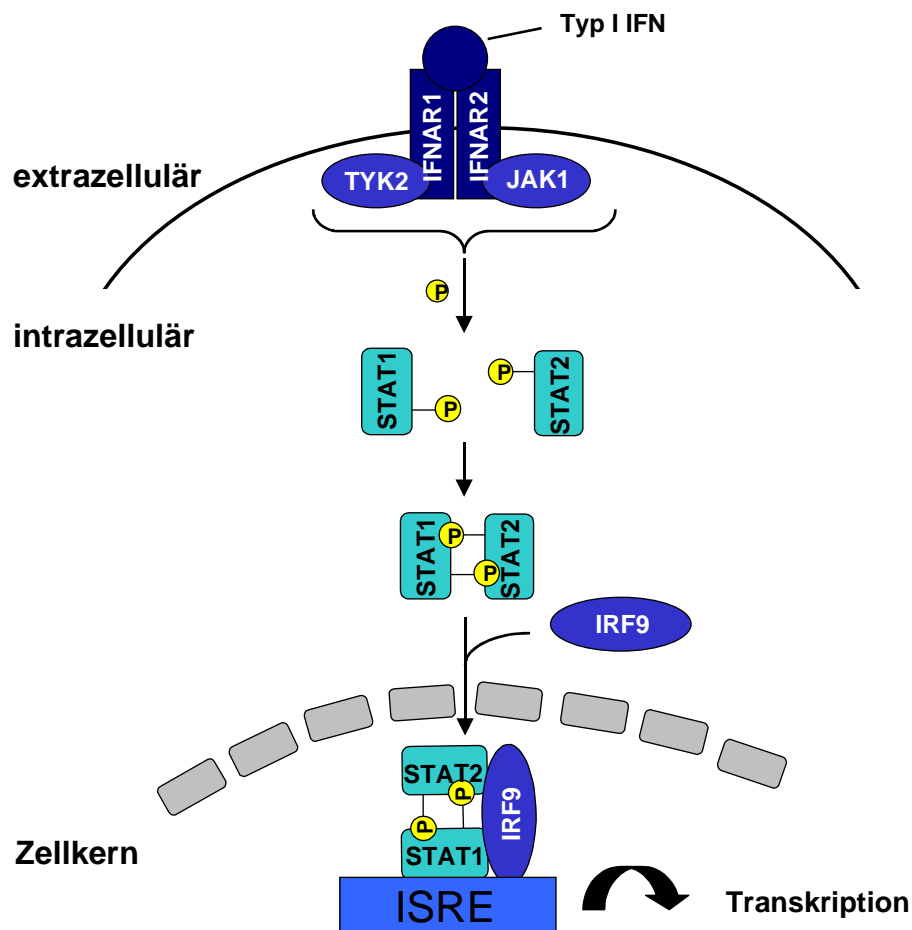


Abb. 1-1: Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch Typ-I Interferone

1.3.2 Interferone in der Therapie

Interferone werden häufig, wegen ihrer immunstimulierenden Wirkung, zur Behandlung von chronischen Viruserkrankungen eingesetzt. Hierzu zählen die chronische Hepatitis-B sowie die akute und chronische Hepatitis-C (Mutchnick et al. 1994). Weiterhin werden Interferone bei der Behandlung von AIDS, Herpes Zoster, viralen Innenohrinfekten und Virusencephalitis eingesetzt (Emodi et al. 1975; Baron and Dianzani 1994). Interferon- β wird zudem bei der Behandlung von multipler Sklerose verwendet (Panitch et al. 2002; Frank et al. 2004). Interferon- γ findet Anwendung in der Behandlung von Osteoporose. Auch zur Behandlung von malignen Erkrankungen sind Interferone zugelassen. Interferon- α findet Anwendung in der Behandlung von Haarzelleukämie (Quesada et al. 1984; Damasio et al. 2000), chronisch myeloischer Leukämie, T-Zell Lymphomen, Nierenzellkarzinomen (Hotte and Kapoor 2007) und bei der Behandlung des häufig bei

Einleitung

AIDS Patienten auftretendem Kaposi-Sarkoms. Aber auch in der adjuvanten Behandlung von Melanomen spielt IFN- α eine große Rolle (vgl. 1.2.2). Interferon- β ist in der Krebstherapie nicht so weit verbreitet und wird hauptsächlich zur Behandlung von Tumoren der Nasenhöhle (Nasopharynx) eingesetzt (Treuner et al. 1980). Die antitumorale Wirkung der Interferone beruht hauptsächlich auf der Hemmung der Proliferation der Tumorzellen (Borden et al. 1982; Qin et al. 1997; Subramaniam and Johnson 1997) und einer Stimulation der Immunantwort und der damit verbundenen Zerstörung der Tumorzellen. Auch eine Erhöhung der Apoptoserate durch Interferone wurde beschrieben (Chawla-Sarkar et al. 2001; Chawla-Sarkar et al. 2002). Von immer größer werdender Bedeutung ist die Verwendung von Interferonen als Radio- oder Chemosensibilisatoren. Eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen Krebsarten (unter anderem auch an Pankreastumoren und Melanomen) belegen den synergistischen oder additiven Effekt von Interferon auf Bestrahlung und Behandlung mit mehreren zytotoxischen Agenzien wie 5-FU, Gemcitabine, CDDP, Doxorubicin und Cyclophosphamid (Wadler and Schwartz 1990; Schadendorf et al. 1994; Stock et al. 1997; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003; Natsume et al. 2005; Saidi et al. 2006; Natsume et al. 2008; Nitsche et al. 2008). Besonders hervorzuheben sind *in vitro* Versuche an Pankreaskarzinom-Zelllinien, welche einen sensibilisierenden Effekt von Interferon- α , - β oder - γ gegenüber einer Behandlung mit 5-FU, Gemcitabine oder Bestrahlung zeigen (Ma et al. 2005; Saidi et al. 2006; Nitsche et al. 2008). Die Effekte werden jedoch kontrovers diskutiert. In Melanomzellen konnten aufgrund der hohen Chemoresistenz dieser Zellen nach einer Kombination aus Chemotherapeutikum und IFN meist nur additive Effekte beobachtet werden, welche jedoch auch von therapeutischem Nutzen sein könnten (Schadendorf et al. 1994).

1.3.2.1 Einfluss von Interferon auf die Behandlung des Pankreaskarzinoms (klinische Studien)

Um die Ansprechrate der Tumore zu erhöhen bzw. das Überleben der Patienten zu verlängern wird nach Substanzen gesucht, welche den klinischen Erfolg der Therapie verbessern können. Für eine Kombination von Chemotherapie mit Interferon gibt es vielversprechende Ansätze. Im Folgenden werden klinische Studien beschrieben, welche die Kombination von Interferon mit verschiedenen Chemotherapeutika und Bestrahlung bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms untersucht haben.

Die 5-Jahres Überlebensrate bei einem Patienten mit einem Pankreaskarzinom liegt nach einer vollständigen Entfernung des Pankreas und weiterer befallener umliegender Organe bei 10 – 18 %. Eine adjuvante Chemoradiotherapie bestehend aus 5-FU und Bestrahlung kann das 5-Jahres-Überleben auf 37 – 43 % erhöhen (Klinkenbijl et al. 1999). Der positive Effekt von Bestrahlung in dieser Kombinationsbehandlung im Vergleich zu der adjuvanten Monotherapie mit 5-FU wird jedoch in einer Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer-1 (ESPAC-1) kontrovers diskutiert (Neoptolemos et al. 2004). In einer klinischen Phase-II Studie, durchgeführt von der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) wurden Patienten mit einem metastasierenden Pankreaskarzinom mit 5-FU und Cisplatin (CDDP) behandelt. Eine Gruppe erhielt zusätzlich eine Kombination mit IFN- α , die andere nicht. Jedoch hatte in dieser Studie eine Kombination mit IFN- α keinen Effekt auf die Ansprechrate der Tumore oder das Überleben der Patienten (Wagener et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurden Daten veröffentlicht von einer klinischen Phase-II Studie, durchgeführt von der Virginia Mason Klinik, wonach eine adjuvante Behandlung bestehend aus CDDP, 5-FU, Interferon- α (IFN- α) und Bestrahlung (das Behandlungsschema wurde CapRI genannt) das 2-Jahres-Überleben auf 84 % und die 5-Jahres Überlebensrate auf 55 % erhöht. Die durchschnittliche Überlebensrate betrug > 24 Monate (Nukui et al. 2000; Picozzi et al. 2003). Der dramatische Anstieg der Überlebensrate wird auf die Kombination mit IFN- α zurückgeführt (Ma et al. 2005; Schmidt et al. 2007). Diese Studien erzielten die höchsten 2-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit einem Pankreaskarzinom, die bis dahin gemessen wurden.

1.3.2.2 Einfluss von Interferon auf die Behandlung des malignen Melanoms (klinische Studien)

Auch die Behandlung eines metastasierenden malignen Melanoms hat eine sehr schlechte Prognose mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 4 – 6 Monaten (Schuchter et al. 1992). Schuld daran ist das schlechte Ansprechen der Tumore auf eine Chemotherapie. Für das Mittel erster Wahl in der Behandlung von metastasierenden Melanomen das methylierende Agenz Dacarbazin (DTIC), liegt die Ansprechrate bei 12 % und die durchschnittliche Überlebensrate bei 6,4 Monaten (Middleton et al. 2000; Quirt et al. 2007). Mit dem neueren methylierenden Agenz Temozolomid (TMZ) werden in klinischen Studien vergleichbare Ansprechraten (13 %) und Überlebensraten (8,4 Monate) erzielt (Kaufmann et al. 2005; Quirt et al. 2007). Um die Ansprechrate der Tumore zu erhöhen, wurde in Form von Polytherapien die Gabe von IFN- α mit der Chemotherapie kombiniert. In einer klinischen Phase-II Studie von Hauschild et al. konnte gezeigt werden, dass die Kombination von DTIC mit IFN- α die Ansprechrate der Tumore auf 24 % erhöhte und das durchschnittliche Gesamtüberleben auf 13 Monate erhöhte (Hauschild et al. 2008). Auch eine Kombination von TMZ mit IFN- α konnte in einer klinischen Phase-III-Studie die Ansprechrate der Tumore von 14 % auf 24 % steigern (Kaufmann et al. 2005; Quirt et al. 2007), und auch das durchschnittliche Gesamtüberleben konnte auf 9,7 bzw. 14,5 Monate erhöht werden (Richtig et al. 2004; Kaufmann et al. 2005; Quirt et al. 2007). In einer klinischen Phase-II Studie, durchgeführt von Atkins et al., konnte gezeigt werden, dass durch eine Kombination von IFN- α mit CDDP, Vinblastin, DTIC und Interleukin-2 die Ansprechrate der Tumore und das Überleben der Patienten verbessert werden konnte, jedoch kam es durch die Kombinationsbehandlung auch zu verstärkten Nebenwirkungen (Atkins et al. 2008). IFN- β wird in Kombination mit dem methylierenden Agenz DTIC in Japan verwendet (Nagatani et al. 1995). In Deutschland ist IFN- β jedoch noch nicht für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen.

Einleitung

1.4 Induktion von DNA-Schäden

Die DNA jeder Zelle ist täglich einer Vielzahl schädigender Faktoren ausgesetzt. Hierzu gehören unter anderem physikalische Mutagene wie UV- und ionisierende Strahlung sowie chemische Mutagene. Wichtige chemische Mutagene sind die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe (z.B. Benzpyren), wie sie im Zigarettenrauch vorkommen und alkylierende Substanzen (z.B. Nitrosamine), die vor allem in der Nahrung enthalten sein können. Nicht repariert können diese zu Gendefekten und Krebs führen. Durch Reparatursysteme, welche in jeder Zelle vorhanden sind, können diese unterschiedlichen Schäden erkannt und repariert und so die genetische Stabilität gewährleistet werden.

1.4.1 DNA-Schäden durch chemotherapeutisch wirksame alkylierende Agenzien

Chemische Mutagene sind auf verschiedene Weise in der Lage, die DNA zu verändern. Es kann sich um Basenanaloga handeln, die anstelle der korrekten Base in die DNA eingebaut werden, es können DNA-interkalierende Substanzen sein oder alkylierende Agenzien, welche Alkylgruppen an die Basen der DNA anhängen. Letztere gehören zu einer Gruppe, welche aufgrund ihrer stark zytotoxischen Eigenschaften für die Krebstherapie von besonderer Bedeutung ist. Man unterscheidet methylierende Agenzien zu denen Temozolomid (TMZ), Dacarbazin (DTIC) und Procarbazin (PTIC) gehören und chlorethylierende Agenzien, so genannte CENU-Derivate, wie z.B. Fotemustin (FM), Nimustin (ACNU), Carmustin (BCNU) und Lomustin (CCNU). Bei dem methylierenden Agenz Methylmethansulfonat (MMS) handelt es sich um ein ausschließlich in der Forschung verwendetes Mustermethylanalog.

1.4.1.1 TMZ und DTIC

Temozolomid (TMZ) und Dacarbazin (DTIC) gehören zu den monofunktionellen methylierenden Agenzien, welche in der Krebstherapie verwendet werden. TMZ bildet durch spontane Hydrolyse bei physikalischem pH den aktiven Metaboliten 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-Carboxamid (MTIC), welcher mit der DNA reagiert (Newlands et al. 1997). DTIC bildet den selben aktiven Metaboliten MTIC aus, jedoch ist hierfür eine metabolische Aktivierung nötig (Reid et al. 1999). In einer nukleophilen Substitution wird eine Methylgruppe vor allem an die Ringstickstoff- oder

Einleitung

Ringsauerstoffatome der DNA-Basen angehängt. Diese Agenzien können die DNA an insgesamt 13 Stellen methylieren. Die am häufigsten methylierte Stelle ist die N7-Position des Guanins (N7MeG) mit bis zu 80 – 95 %. Sie wird wie die Läsion N3-Methylguanin (N3MeG) durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert. Am zweithäufigsten sind Methylierungen an der N3-Position des Adenins (N3MeA), welche ebenfalls von der BER repariert werden. Zudem ist diese Läsion, ähnlich wie N3MeG recht instabil und kann zusätzlich durch spontane Hydrolyse von der Base abgespalten werden. Die Methylierungen an den Positionen N1-Methyladenin (N1MeA) und N3-Methylcytosin (N3MeC) werden durch die Reparaturproteine ABH2 und ABH3 entfernt. Weitere Methylierungen erfolgen an den Positionen N3-Methylthymine (N3MeT), N1-Methylguanin (N1MeG), N7-Methyladenin (N7MeA), O⁴-Methylthymine (O⁴MeT) und O²-Methylcytosin (O²MeC) sowie am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die Reparatur dieser Methylierungen ist jedoch weitestgehend unerforscht.

Methylierung der O⁶-Position des Guanins (O⁶MeG) ist mit maximal 8 % für TMZ und nur 0,3 % für das experimentell häufig verwendete Methylnaz MMS (Beranek 1990) vergleichsweise selten, birgt jedoch das größte zytotoxische Potential. Genauso wie O⁴-Methylthymine (O⁴MeT) ist auch O⁶MeG ein Substrat der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), welche sehr effizient die Methylgruppe von der DNA entfernt. Findet eine Reparatur von O⁶MeG durch MGMT nicht statt, kommt es im Zuge der DNA-Replikation zu Basenfehlpaarungen, welche von der Fehlpaarungs-Reparatur (mismatch-repair, MMR) erkannt und prozessiert werden. Dieser Vorgang ist proliferationsabhängig (Roos et al. 2004) und kann zu Mutationen und Zelltod auslösenden sekundären Läsionen, in Form von DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), führen. Demnach stellt O⁶MeG in proliferierenden, MMR-kompetenten Zellen die zytotoxischste Läsion dar, welche durch methylierende Agenzien verursacht wird.

1.4.2 Ionisierende Strahlung (IR)

Zu ionisierender Strahlung (IR) zählen alle Strahlenarten ab einer Wellenlänge von 100 nm. Generell kann sie in Teilchenstrahlung und elektromagnetische Strahlung unterteilt werden. Teilchenstrahlung besteht aus Protonen, α -Teilchen oder Neutronen. Zur elektromagnetischen Strahlung gehören die kurzwellige UV-Strahlung, Röntgen- und γ -Strahlung. Röntgen- und γ -Strahlung unterscheiden sich hierbei nicht in ihren Eigenschaften, sondern in ihrer Entstehungsweise. Während Röntgenstrahlung durch

Einleitung

beschleunigte Elektronen erzeugt wird, entsteht γ -Strahlung durch den Zerfall radioaktiver Elemente z.B. Cäsium. Die Dosis ist definiert als absorbierte Energie pro Masse und wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben.

1.4.2.1 DNA-Schäden hervorgerufen durch ionisierende Strahlung

Die DNA wird jeden Tag durch exogene und endogene Faktoren auf unterschiedliche Art und Weise geschädigt. IR spielt hierbei durch die natürliche Hintergrundstrahlung und die Anwendung in der medizinischen Diagnostik eine entscheidende Rolle. Die Schädigung der DNA wird als Hauptursache für die Auslösung von Zelltod nach der Behandlung mit IR angesehen (Munro 1970). DNA-Schäden durch IR können entweder durch direkte oder indirekte Strahlenwirkung hervorgerufen werden. Direkte DNA-Schäden entstehen wenn ein Strahlungsteilchen (α -Teilchen) selbst oder ein Sekundärelektron direkt die DNA ionisieren. Bei der indirekten Strahlenwirkung werden über die Wechselwirkung mit anderen Atomen oder Molekülen in der Zelle zuerst diffuse Radikale erzeugt, welche über eine Radikalkettenreaktion zur Schädigung der DNA führen. Da eine Zelle zu einem hohen Prozentsatz aus Wasser besteht, ist der wichtigste indirekte Strahlungseffekt die Radiolyse des Wassers. Hierbei werden durch IR die Wassermoleküle gespalten wobei oxidierende Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\bullet$) und reduzierende H-Radikale ($\text{H}\bullet$) gebildet werden. Diese Hydroxyl-Radikale sind chemisch hoch reaktiv und können mit nahezu allen zellulären Molekülen (Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren) reagieren und gelten daher als hoch toxisch. Es wird vermutet, dass zweidrittel der durch IR induzierten DNA-Schäden durch Hydroxyl-Radikale verursacht werden (Ward 1985; Dahm-Daphi et al. 2000). Da diese Radikale nur eine sehr geringe Lebensdauer haben, müssen sie im Umkreis von wenigen Nanometern um die DNA entstehen, um diese zu schädigen (Ward 1985; Ward et al. 1987). DNA-Schäden hervorgerufen durch IR können wie folgt unterteilt werden: Basenschäden (Verlust oder Veränderung einer Base), DNA-Protein-Vernetzungen, Einzelstrangbrüche (ESB), „locally-multiply-damaged-sites“ (LMDS) und DSBs. Die häufigste und wegen ihres mutagenen Potentials wohl bedeutendste Basenveränderung ist das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) (Tchou and Grollman 1993). Reagiert ein Hydroxyl-Radikal mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, kann es zu ESB kommen. Wird eine große Menge an Energie auf einem kleinen Raum abgegeben, entstehen lokal begrenzt eine große Anzahl an Hydroxyl-Radikalen. Durch ihre hohe Reaktivität, aber geringe Reichweite kommt es zu einer Anhäufung von DNA-ESB in

Einleitung

einem Bereich von wenigen Nanometern (Hutchinson 1985). Es entstehen so genannte LMDS (Goodhead 1989). Wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat beider Einzelstränge der DNA in einem Bereich von 10 Basenpaaren geschädigt, sodass auf beiden Seiten ESB entstehen, kommt es zu einem DSB (Friedland et al. 1999). Diese zählen zu den kritischen Läsionen, welche den Zelltod nach Bestrahlung auslösen (Frankenberg-Schwager 1989; McMillan et al. 1990; Iliakis 1991). Unrepariert kann in mehrzelligen Organismen schon ein einziger DSB in einem wichtigen Gen zum Tod der Zelle (Frankenberg-Schwager and Frankenberg 1990), oder aber auch zu chromosomaler Instabilität und Mutationen (Myung and Kolodner 2003) führen. Um dies zu vermeiden haben die Zellen sehr effiziente und komplexe Reparaturmechanismen entwickelt.

1.5 Reparatur von DNA-Schäden

Um die genomische Stabilität zu wahren, besitzt die Zelle verschiedene Reparatursysteme, welche es ihr ermöglichen, Schäden in der DNA zu reparieren. Im folgenden Abschnitt wird die Reparatur der durch TMZ verursachten Methylierungen an den verschiedenen Positionen der DNA beschrieben. Hierbei wird besonders auf die Reparatur und Prozessierung der Läsion O⁶MeG eingegangen, da diese hauptursächlich für die Toxizität von TMZ ist. Auch auf die Reparatur von DSBs wird genauer eingegangen, da diese als sekundäre Läsionen während der Prozessierung von O⁶MeG entstehen und als Hauptursache für die Toxizität von ionisierender Strahlung angesehen werden.

1.5.1 N-Alkylierungen

N-Alkylierungen sind die am häufigsten auftretenden Alkylierungen nach Behandlung mit Alkylantien. Durch die übergeordnete Rolle der Alkylierungen an der O⁶ Position des Guanins und der effektiven Reparatur der N-Alkylierungen sind diese jedoch nur in begrenztem Maß für die Toxizität der Alkylantien verantwortlich.

1.5.1.1 Reparatur durch ABH2 und ABH3

Neben der hoch toxischen Läsion O⁶MeG wird die DNA durch TMZ noch an vielen weiteren Stellen methyliert (vgl. 1.4.1.1). Die Läsionen N1MeA und N3MeC werden durch die humanen AlkB Homologe 2 und 3 (ABH2 und ABH3) repariert jedoch mit unterschiedlicher Spezifität (Duncan et al. 2002; Delaney and Essigmann 2004). ABH2

Einleitung

repariert vorzugsweise einzel- und doppelsträngige DNA, während ABH3 hauptsächlich RNA und einzelsträngige DNA repariert. Die Reparatur erfolgt in einem alpha-ketoglutarat abhängigem Mechanismus, bei dem durch eine Oxidation der Alkylgruppe die Base demethyliert und ihr ursprünglicher Zustand wieder hergestellt wird (Sedgwick 2004).

1.5.1.2 Reparatur durch die Basenexzisionsreparatur (BER)

Durch die BER werden geschädigte Basen repariert, welche von bestimmten Enzymen, den DNA-Glykosylasen, erkannt werden können. Neben den durch TMZ verursachten Läsionen N7MeG, N3MeA und N3MeG werden auch Basenveränderungen repariert, welche durch ionisierende Strahlung hervorgerufen wurden. Der einleitende Schritt der Basenexzisionsreparatur ist die Erkennung und Ausschneidung der veränderten Base durch DNA-Glykosylasen, wodurch eine hoch toxische apurine/apyrimidine Stelle (AP site) in der DNA entsteht (Loeb 1985). In Säugetierzellen wurden 11 verschiedene Glykosylasen gefunden, welche Unterschiede in ihrer Substratspezifität und ihrer Wirkungsweise haben. Im Falle von N7MeG, N3MeA und N3MeG heißt diese N-Methylpurin-DNA-Glycosylase (MPG) (Mitra and Kaina 1993; Demple and Harrison 1994). Nach der Erkennung der modifizierten Base schneidet die AP-Endonuklease (AP1) das Phosphodiester-Rückgrat an der „AP site“, woraus ein 5'Desoxyribose-5-Phosphat (5'dRP) und ein 3'OH resultieren (Wilson and Barsky 2001). Danach erfolgt das Auffüllen des ersten Nukleotids durch die Polymerase- β (Pol- β) (Sobol et al. 1996; Podlutzky et al. 2001). Für die Ligation des DNA-Stranges stehen zwei Wege zur Verfügung. Die „short-patch“ Reparatur und die „long-patch“ Reparatur. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, hängt von den Modifikationen der Enden am offenen Phosphodiester-Rückgrat ab. Ist Pol- β in der Lage, die Trennung des 5'dRP von der DNA zu katalysieren, läuft die „short-patch“ Reparatur ab (Matsumoto and Kim 1995; Sobol et al. 1996; Prasad et al. 1998). Die DNA-Neusynthese übernimmt hierbei Pol- β und die Ligation der DNA erfolgt durch einen Komplex aus Ligase III, XRCC1, Pol- β and PARP-1 (Kubota et al. 1996). Ist jedoch die „AP site“ oxidiert oder reduziert, so kann die Pol- β die Phosphatgruppe nicht eliminieren, fällt von der DNA ab und die Reparatur erfolgt über die „long-patch“ Reparatur. Die DNA-Neusynthese wird von den Polymerasen Pol- ϵ und Pol- δ zusammen mit PCNA und RF-C übernommen (Stucki et al. 1998). Einen Komplex aus Ligase I, PCNA und Pol- β vermittelt die Ligation der DNA (Prasad et al. 1996; Srivastava et al. 1998). Die BER scheint eine

Einleitung

besondere Rolle im Schutz von nicht proliferierenden Zellen gegenüber Alkylation zu spielen (Briegert and Kaina 2007).

1.5.2 Reparatur und Prozessierung von Läsionen an der O⁶ Position des Guanins

In proliferierenden Zellen wird die Toxizität der Alkylation hauptsächlich über Läsionen an der O⁶ Position des Guanins vermittelt (Kaina et al. 1991; Kaina et al. 1997; Tominaga et al. 1997; Pepponi et al. 2003; Roos et al. 2004; Chinot et al. 2007; Roos et al. 2007a). Alkylierungen an der O⁶ Position des Guanins sind zwar mit unter 8 % relativ selten (Beranek 1990), unrepariert führen sie jedoch zu Mutationen, chromosomalen Aberrationen, Schwesterchromatidaustauschen, Krebs und Zelltod. Das Vorhandensein eines spezifischen Reparaturenzyms für diese Läsion, die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), spiegelt ihre Bedeutung wider.

1.5.2.1 Reparatur von Alkylierungen an der Position O⁶ des Guanins durch MGMT

Das humane MGMT Gen kodiert für ein 207 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa (Tano et al. 1990). MGMT ist in der Lage, Methylierungen (z.B. hervorgerufen durch TMZ und DTIC) und Chlorethylierungen (hervorgerufen durch Nitrosoharnstoffe wie z.B. FM) an den Positionen O⁶ des Guanins und O⁴ des Thymins zu entfernen. Hierbei wird in einer Ein-Schritt Reaktion die Methyl- oder Chlorethylgruppe von der Base auf ein Cystein-Rest im aktiven Zentrum des MGMT-Enzyms übertragen (Pegg et al. 1993; Pegg et al. 1995; Xu-Welliver and Pegg 2002). Dadurch wird MGMT irreversibel inaktiviert und nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut (Xu-Welliver and Pegg 2002). Daher wird MGMT auch als „Suizidenzym“ bezeichnet. Entscheidend für eine vollständige Reparatur des Schadens ist somit das Verhältnis zwischen O⁶ Alkylierungen und MGMT Molekülen. Sind in der Zelle nicht ausreichend MGMT Moleküle vorhanden, um alle Methylierungen der O⁶ Positionen zu entfernen, werden die Läsionen prozessiert und entfalten ihr mutagenes und toxisches Potential. Der MGMT-Status ist nicht in allen Geweben gleich. Darm und Leber weisen ein sehr hohes MGMT-Niveau auf, während MGMT im Gehirn relativ niedrig exprimiert wird. In Tumoren weist das MGMT-Niveau eine hohe Variabilität auf. In Melanomen kann die *mgmt* RNA-Menge um bis zum 38 fachen variieren (Evrard et al. 2003) während Pankreaskarzinome ein generell hohes

Einleitung

Niveau an MGMT aufweisen (Kokkinakis et al. 1997). MGMT defiziente Zellen sind nicht in der Lage, Methylierungen an der Position O⁶ des Guanins zu entfernen und sind daher hoch sensitiv gegenüber alkylierende Agenzien (Day et al. 1980; Yarosh et al. 1983). Werden Zellen mit MGMT transfiziert, erlangen sie eine expressions-abhängige Resistenz gegenüber Alkylantien (Kaina et al. 1991). Eine Abhängigkeit zwischen MGMT-Status und Resistenz konnte auch spezifisch für TMZ nachgewiesen werden (Roos et al. 2007a). Für das Reparaturenzym MGMT konnte erstmals Induzierbarkeit durch genotoxischen Stress nachgewiesen werden (Fritz et al. 1991), was zu einer adaptiven Antwort der Zellen auf mutagenen oder zytotoxischen Stress führt. Die Expression von MGMT wird durch Gen- und Promotormethylierung gesteuert. Eine Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer Inhibierung der MGMT Expression (Watts et al. 1997) während durch eine Methylierung des MGMT-Gens die Expression verstärkt wird (Pieper et al. 1991).

1.5.2.2 Prozessierung von O⁶MeG und Entstehung einer Punktmutation

O⁶MeG wird sehr effektiv von MGMT repariert. Ist jedoch kein MGMT vorhanden oder wird es durch den MGMT-Inhibitor O⁶Benzylguanin (O⁶BG) depletiert, ist O⁶MeG die am stärksten toxische Läsion, welche von TMZ generiert wird. O⁶MeG ist jedoch nur in proliferierenden Zellen toxisch (Roos et al. 2004). In nicht-proliferierenden Zellen wird die Toxizität von TMZ hauptsächlich über die N-Methylierungen vermittelt (Lindahl 2000; Briegert and Kaina 2007). Die proliferationsabhängige Toxizität dieser Läsion kommt dadurch zustande, dass erst durch die Replikation eine O⁶MeG vermittelte Basenfehlpaarung auftritt, welche dann zu den zelltodauslösenden sekundären Läsionen, den DSBs, führt. Demnach vermittelt O⁶MeG die Toxizität nicht direkt, sondern benötigt Proliferation und die MMR (Peponi et al. 2003; Hickman and Samson 2004; Roos et al. 2004). In der ersten Replikation nach DNA-Methylierung paart sich O⁶MeG mit einem Thymin statt mit der komplementären Base Cytosin (Toorchen and Topal 1983; Warren et al. 2006). Das kommt zustande, da die Methylgruppe die Ladungsverhältnisse verändert, weshalb nur noch zwei statt drei Wasserstoffbrücken zu der komplementären Base ausgebildet werden können. Im zweiten Zellzyklus nach der TMZ-Gabe wird auf dem einen DNA-Strang gegenüber dem Thymin ein Adenin eingebaut und somit eine Punktmutation manifestiert. Da sich auf dem anderen DNA-Strang noch immer die Methylgruppe an der O⁶ Position des Guanins befindet, wird erneut ein Thymin gegenüber dem O⁶MeG in die DNA eingebaut (Eadie et al. 1984).

Einleitung

1.5.2.3 Reparatur der Punktmutation durch die Fehlpaarungs-Reparatur

Basenfehlpaarungen können durch Deamination, Oxidation oder Methylierungen einer Base entstehen, aber auch durch Fehler bei der Replikation. Um die genomische Stabilität zu wahren, werden diese Fehlpaarungen durch die MMR entfernt. Sie entfernt nicht nur spontan entstehende Basenfehlpaarungen, sondern ist auch an der Reparatur chemisch induzierter Läsionen beteiligt. Zum Beispiel wird ein durch TMZ hervorgerufenen O^6MeG von der MMR erkannt, unabhängig davon, ob es mit Thymin oder Cytosin als komplementäre Base gepaart ist (Duckett et al. 1996). Die Fehlpaarung mit einem Thymin wird jedoch mit einer deutlich höheren Affinität erkannt. Aber auch die durch FM entstehenden interstrand-crosslinks oder UV induzierte Photoprodukte werden von der MMR erkannt (Yamada et al. 1997; Wang et al. 1999). Die Hauptziele der MMR sind die Basenfehlpaarungen G-T, G-G, A-C und C-C (Fang and Modrich 1993). Der erste Schritt der MMR ist die Erkennung der Fehlpaarung durch den MutS α Komplex. Dieser besteht aus den Proteinen MSH2 and MSH6 (Leach et al. 1993; Palombo et al. 1995). Im nächsten Schritt wird entschieden, auf welchem DNA-Strang die falsche Base eingebaut wurde. Wie genau hierbei zwischen parentalem und neu synthetisiertem Tochterstrang unterschieden wird, ist noch nicht bekannt. Es konkurrieren zwei Modelle: Beim Translokationsmodell wird vermutet, dass der MutS α -Komplex die Energie aus der ATP Hydrolyse nutzt, um aktiv an der DNA von der Basenfehlpaarung zu der Stelle zu wandern, an welcher durch einen Einzelstrangbruch die Strangspezifität festgelegt ist und wo die Interaktion mit dem MutL α -Komplex (MLH1 und PMS2) vermittelt wird (Blackwell et al. 1998a; Blackwell et al. 1998b; Blackwell et al. 2001). Das „molecular switch“ Modell geht davon aus, dass der MutS α -Komplex zwischen einem aktiven Zustand und einem inaktiven Zustand wechselt. Im aktiven Zustand ist der MutS α -Komplex mit ADP assoziiert und erkennt und bindet an die Basenfehlpaarung. Die Erkennung der Fehlpaarung vermittelt die Transition von ADP zu ATP und stimuliert somit die intrinsische ATPase Aktivität. Das führt zu einer Konformationsänderung, welche die Dissoziation des MutS α -Komplexes von der DNA vermittelt (inaktiver Zustand) (Gradia et al. 1997; Fishel 1998). Durch die anschließende ATP Hydrolyse kommt es zur Assoziation von MutS α mit dem MutL α -Komplex und anschließender Exzision des DNA-Strangs, welcher die Basenfehlpaarung enthält, durch die Exonuklease I (Genschel et al. 2002). Die DNA-Neusynthese erfolgt durch die Polymerase δ (Longley et al. 1997). Eine durch TMZ verursachte O^6MeG -T Basenfehlpaarung wird vergeblich durch die MMR repariert (Karran and Bignami 1994). Da die Methylgruppe an der O^6 Position des Guanins bestehen bleibt, wird in jeder

Einleitung

folgenden Replikationsrunde erneut ein Thymin an die Stelle eines Cytosins in die DNA eingebaut. Dadurch werden sekundäre Läsionen erzeugt, welche während der DNA-Replikation durch Anhalten der Replikationsgabel zu DSBs führen (Lips and Kaina 2001a). Diese entstandenen DSBs sind letztlich für die O⁶MeG vermittelte Zytotoxizität von TMZ verantwortlich (Kaina et al. 1997; Ochs and Kaina 2000). Die Anzahl der entstehenden DSB wird durch die Anzahl der hervorgerufenen Methylierungen, das Expressionsniveau an MGMT und das der MMR-Proteine MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 bestimmt. Zellen, welche einen Defekt in der MMR aufweisen, sind gegenüber O⁶MeG-induziertem Zelltod resistent (de Wind et al. 1995; Dosch et al. 1998; Fink et al. 1998; Hickman and Samson 1999). Zellen, welche ein sehr hohes Expressionsniveau an MMR-Proteinen aufweisen, sind sehr sensitiv gegenüber methylierende Agenzien (Roos et al. 2007b).

1.5.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

DSBs stellen hoch toxische Läsionen dar. Ihre Akkumulation während der Prozessierung der O⁶MeG Läsion ist letztlich der entscheidende apoptoseauslösende Faktor (Lips and Kaina 2001a; Naumann et al. 2009). Zur Reparatur dieser Doppelstrangbrüche stehen den Zellen zwei Wege zur Verfügung. Die Reparatur durch homologe Rekombination (HR) und die Reparatur durch „non homologous end-joining“ (NHEJ). HR gilt als der fehlerunanfälligere Weg und kann nur dann stattfinden, wenn eine homologe DNA-Sequenz der Schadensregion existiert. Daher kann die HR nur in der späten S-Phase und der G₂-Phase stattfinden (Takata et al. 1998; Johnson and Jasin 2000). Durch sie werden hauptsächlich DSB repariert, welche aus blockierten DNA-Replikationsgabeln, z.B. nach Alkylantien-Gabe, entstanden sind (Shrivastav et al. 2008; Roos et al. 2009). NHEJ ist fehleranfälliger, benötigt keine homologe DNA-Sequenz und findet hauptsächlich in der G₀/G₁-Phase statt (Takata et al. 1998; Johnson and Jasin 2000). Durch sie werden hauptsächlich DSB repariert, welche direkt, z.B. durch ionisierende Strahlung, entstehen. Während der HR tritt die geschädigte DNA-Sequenz in physikalischen Kontakt mit dem nicht geschädigten homologen DNA-Molekül, welches als Vorlage für die Reparatur dient (Sonoda et al. 2001). Der einleitende Schritt erfolgt durch das Ausschneiden eines Nukleotids in 5' – 3' Richtung an der DNA durch einen Komplex bestehend aus den Proteinen MRE11, Rad50 und NBS1, dem so genannten MRN-Komplex. Dieser besitzt sowohl Endo- als auch Exonukleaseaktivität. Der daraus resultierende einzelsträngige 3'-Überhang wird durch Rad52 vor Exonuklease-Abbau geschützt (Rattray and Symington

Einleitung

1994; Stasiak et al. 2000). An dieser Stelle konkurriert Rad52 mit dem für die NHEJ wichtigem Ku-Komplex, der darüber entscheidet, ob die Reparatur über HR oder NHEJ abläuft (Van Dyck et al. 1999). Rad52 interagiert mit Rad51-Proteinen und RPA (Shen et al. 1996; Kagawa et al. 2001), die den Strangaustausch stimulieren (New et al. 1998). Unter Rad51-Proteinen werden die Paralogen Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3 zusammengefasst (Kawabata et al. 2005). Rad51-Proteine katalysieren das Eindringen des beschädigten DNA-Stranges mit seinem einzelsträngigem 3'-Überhang in die homologe Region eines intakten DNA-Moleküls unter Ausbildung eines D-Loops (Baumann and West 1997). Danach erfolgt das Auffüllen und die Ligation nach dem klassischen Modell von Holliday (Holliday 1964).

Die NHEJ benötigt keine Sequenzhomologie, da sie direkt die getrennten Enden der DNA ligiert (Critchlow and Jackson 1998). Der erste Schritt im NHEJ ist das Binden von Ku70 und Ku80 an die beiden offenen Enden in der DNA, um diese vor einem Exonukleaseabbau zu schützen (Reeves and Stoeber 1989; Jeggo et al. 1992). Das Ku70/Ku80 Heterodimer assoziiert im Folgenden mit der katalytischen Untereinheit der DNA-PK. Durch einzelsträngige DNA an einem DSB wird die Ser/Thr Kinaseaktivität der DNA-PK aktiviert, wodurch XRCC4 phosphoryliert wird (Critchlow et al. 1997; Ding et al. 2003). Durch einen Komplex aus XRCC4 und Ligase IV werden die beiden DNA-Enden zusammengefügt. Die meisten DSB können nicht direkt von dem XRCC4/LigaseIV-Komplex ligiert werden, sondern müssen vorher prozessiert werden. Das geschieht hauptsächlich durch den MRN-Komplex (Maser et al. 1997; Nelms et al. 1998) zusammen mit dem Protein Artemis (Moshous et al. 2001).

1.6 Von der Erkennung des DNA-Schadens zur Induktion von Apoptose

Die Entstehung, Prozessierung und Reparatur verschiedener DNA-Läsionen sowie die Aktivierung von apoptotischen Signalkaskaden sind weitestgehend bekannt und beschrieben worden (Joza et al. 2002; Siegel and Lenardo 2002; Adams 2003; Christmann et al. 2003; Kaina 2003; Roos and Kaina 2006; Cotter 2009). Wie jedoch ein spezifischer DNA-Schaden erkannt wird und wie von ihm ausgehend Apoptose ausgelöst wird, ist noch nicht endgültig geklärt. Da für ionisierende Strahlung und methylierende Agenzien beschrieben ist, dass DSBs für das Auslösen von Apoptose verantwortlich sind (Frankenberg-Schwager and Frankenberg 1990; Lips and Kaina 2001a; Naumann et al. 2009), soll im Folgenden beschrieben werden, welche Signalkaskaden, ausgehend von

Einleitung

DSBs, Apoptose vermitteln können. In Abb. 1-2 ist die Vermittlung von Apoptose nach DSBs graphisch dargestellt.

DSBs werden von Proteinen erkannt, welche sowohl an deren Reparatur als auch durch ihre Kinaseaktivität an der Signal-Weiterleitung beteiligt sind. Die wichtigsten Vertreter hierbei sind ATM (ataxia-telangiectasia mutated) und ATR (ATM und Rad3-related) sowie DNA-PK. Diese werden durch DSB in der DNA aktiviert (Ismail et al. 2005). Während ATM durch DSB aktiviert wird, welche durch ionisierende Strahlung entstehen, wird ATR hauptsächlich durch DSB aktiviert, welche durch blockierte Replikationsgabeln verursacht werden (z.B. nach Behandlung mit FM oder TMZ) (Canman et al. 1998; Dart et al. 2004; Ismail et al. 2005). Die Aktivierung von ATM wird vermutlich durch den an einem DSB gebundenen MRN-Komplex initiiert und verläuft über Autophosphorylierung (Bakkenist and Kastan 2003). Aktiviertes ATM und ATR phosphorylieren eine Reihe von nachgeschalteten Signalproteinen wie z.B. die Checkpoint Kinase 2 (CHK2) (Matsuoka et al. 1998; Ahn et al. 2000), die Checkpoint Kinase 1 (CHK1) (Gatei et al. 2003), Mdm2 (Shinozaki et al. 2003), E2F1 (Lin et al. 2001), BRCA1 (Foray et al. 2003), H2AX (Burma et al. 2001) und p53 (Tibbetts et al. 1999; Saito et al. 2002). Demnach haben ATM und ATR drei wichtige Funktionen. Sie sind an der Reparatur der DSB beteiligt, können Zellzyklus-Kontrollpunkte aktivieren und über p53 Apoptose auslösen (Lavin et al. 2005). Die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (γ H2AX) dient als experimenteller Marker von DSBs (Ismail and Hendzel 2008). Über die Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens p53 wird, ausgehend von DSBs, über ATM/ATR Apoptose vermittelt. p53 fungiert hauptsächlich als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, welche an der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Lavin and Gueven 2006). Wird p53 DNA-schadensabhängig durch ATM/ATR (am Serin 15) (Banin et al. 1998) oder CHK2 (am Serin 20) (Chehab et al. 2000) phosphoryliert, kommt es zur Stabilisierung von p53 und zur Transkription p53 abhängiger Gene (Sionov and Haupt 1999). Wichtige Gene, welche p53 abhängig transkribiert werden, sind das Reparaturenzym MGMT (Harris et al. 1996; Grombacher et al. 1998), der für die Arretierung des Zellzyklus wichtige Cdk-Inhibitor p21 (el-Deiry et al. 1993) und die pro-apoptotischen Proteine Bax, Puma, Noxa (Wu and Deng 2002), Apaf-1 (Robles et al. 2001) sowie der Fas-Rezeptor (Muller et al. 1998). Die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 wird durch Bindung von p53 am entsprechenden Promotor inhibiert (Wu et al. 2001). Auch durch direkte Protein-Protein-Interaktion z.B. mit Bcl-2 oder Bcl-X_L kann p53 die anti-apoptotische Funktion dieser Proteine hemmen (Mihara et al.

Einleitung

2003). Es kann auch die Oligomerisierung von Bak und Bax initiieren, was zur Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium führt und damit Apoptose auslöst.

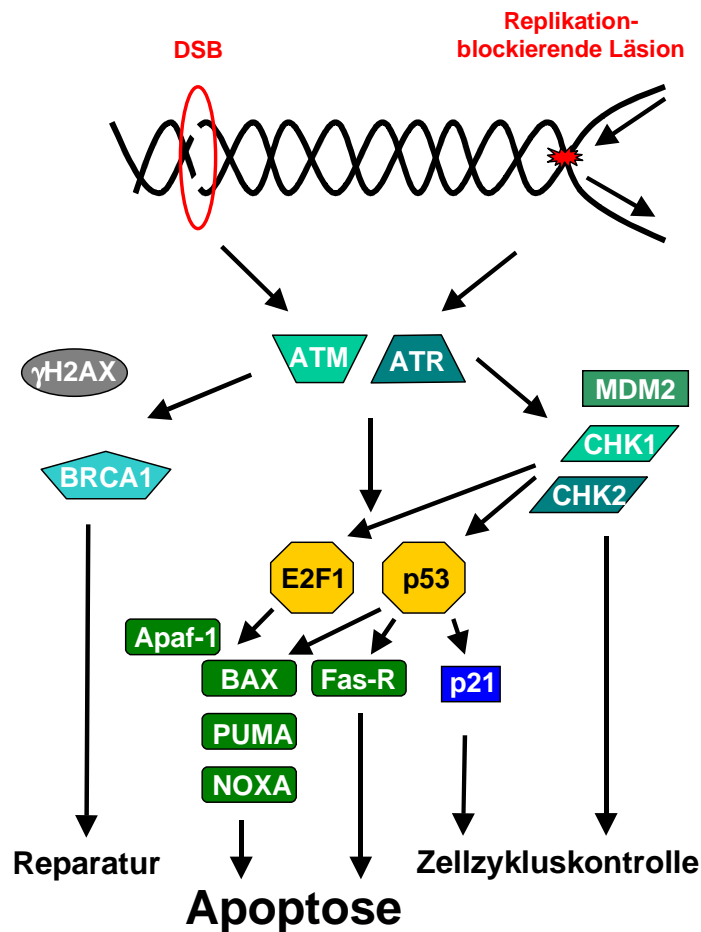


Abb. 1-2: Vermittlung von Apoptose nach DNA-Doppelstrangbrüchen

1.7 Apoptose

Apoptose (griech. apoptosis, fallende Blätter) bezeichnet den selbst bestimmten Tod von eukaryotischen Zellen und wird auch programmierter Zelltod genannt. Es handelt sich hierbei um einen aktiven, intrazellulären Prozess. Dieser ist für vielzellige Organismen lebensnotwendig und spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine große Rolle. Hierbei dient Apoptose hauptsächlich der Formbildung. Beispielsweise werden die Hautfalten zwischen den Fingern eines Embryos durch Apoptose zurückgebildet. In Geweben adulter Organismen dient Apoptose in erster Linie der Aufrechterhaltung der Homöostase (Jacobson et al. 1997), welche das Fließgleichgewicht zwischen Wachstum (durch Zellteilung) und Eliminierung alter Zellen (durch Apoptose) zur Aufrechterhaltung des Zellvolumens von Organen und Geweben darstellt. Zudem können bestimmte Zellen, wie die der Augenlinse oder der oberen Hautschicht, erst im toten Zustand ihre Funktion

Einleitung

erfüllen. Besonders wichtig ist die Apoptose bei der Vernichtung geschädigter Zellen. Fehlfunktionen können beispielsweise durch Mutationen oder durch virale Infektionen entstehen. In der Regel können sich solche Zellen selbst töten, oder sie werden durch Zellen des Immunsystems, dessen Effektivität zu einem wesentlichen Teil auf der Fähigkeit der Apoptoseauslösung beruht, vernichtet. Defekte in der Apoptosemaschinerie können für den Gesamtorganismus fatale Konsequenzen haben. Verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Selbsttötung, kann das zur Auslösung von Krebs oder einigen Autoimmunerkrankungen führen (Thompson 1995). Unterlaufen jedoch gesunde Zellen Apoptose, wird das mit der Alzheimer- oder Parkinsonkrankheit und Osteoporose in Verbindung gebracht. Es gibt verschiedene Charakteristika, welche apoptotische Zellen ausmachen. Erstens ist Apoptose ein aktiver, energieverbrauchender Vorgang, welcher durch zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion, Transkription, Proteinsynthese und Enzymaktivität kontrolliert wird und zweitens zu einem charakteristischen Phänotyp führt. Dazu gehören mehrere morphologische Veränderungen, welche in apoptotischen Zellen zu beobachten sind. Zuerst kommt es zu einer Abrundung der Zellen und zu einem Ablösen aus dem normalen Gewebe. Das Volumen der Zellen nimmt ab, das Chromatin wird kondensiert und schließlich die DNA durch Endonukleasen fragmentiert (Wyllie 1980). *In vitro* kommt es zu einem sehr späten Zeitpunkt in der Apoptose zu einer Zerstörung der Plasmamembran und zum Zerfall der Zelle in Vesikel (apoptotische Körperchen) (Wyllie et al. 1980). *In vivo* werden apoptotische Zellen von Zellen des Immunsystems beseitigt. Die Fragmentierung der DNA stellt das wichtigste Charakteristikum apoptotischer Zellen dar und wird für deren Nachweis verwendet.

Im Gegensatz zu der kontrolliert ablaufenden Apoptose gibt es noch einen weiteren Weg, auf welchem Zellen sterben können: die Nekrose. Bei dieser handelt es sich um einen chaotisch ablaufenden Prozess. Nekrose verläuft insgesamt schneller als Apoptose. Es kommt zu einem frühen Funktionsverlust der Organellen, zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials, zur Durchlässigkeit der äußeren Zellwand und dadurch bedingtes Anschwellen und schließlich Platzen der Zellen. Die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile führt oft zum Auftreten von Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz zur Apoptose wird die DNA erst zu einem relativ spätem Zeitpunkt abgebaut.

Bei der Behandlung von Krebs mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung spielt die Fähigkeit der Zellen Apoptose zu durchlaufen eine entscheidende Rolle. Chemotherapeutika, wie z.B. Temozolomid (TMZ) oder Fotemustin (FM), aber auch ionisierende Strahlung (IR) sind hoch zytotoxische und mutagene Substanzen, welche die

Einleitung

DNA der Zellen direkt oder indirekt schädigen. Die Zelle hat zwei Möglichkeiten, darauf zu reagieren: (i) es kommt zur Auslösung von Zellzykluskontrollpunkten und zur Reparatur des DNA-Schadens oder (ii) die geschädigte Zelle wird durch Auslösen von Zelltod aus der Population entfernt. DNA-Läsionen, welche Apoptose auslösen können, sind: O⁶-Methylguanin (O⁶MeG) (Kaina et al. 1997; Tominaga et al. 1997; Meikrantz et al. 1998), N-Alkylierungen, DNA Cross-links oder DSBs (Lips and Kaina 2001b). Apoptose kann in drei aufeinander folgende Phasen eingeteilt werden. (i) Die Initiatorphase, (ii) die Effektorphase und (iii) eine Degradationsphase (Allen et al. 1998). In der Initiatorphase kommt es durch interne (körpereigene Signale z.B. von Zellen des Immunsystems) oder externe Stimuli (z.B. DNA schädigende Substanzen) zum Auslösen von Apoptose. Verschiedene Stimuli können verschiedene apoptotische Wege aktivieren, welche aber alle zum selben Endresultat, einem gemeinsamen Suizidprogramm führen (Chinnaiyan and Dixit 1996; Vaux and Strasser 1996). Während der Effektorphase kommt es zur Ausführung des apoptotischen Weges. Diese Phase ist durch die Aktivität von Cystein-Aspartat Proteasen, den Caspasen, charakterisiert (Alnemri et al. 1996; Srinivasula et al. 1996). In ungeschädigten, gesunden Zellen liegen diese Caspasen in ihrer inaktiven Form, den Pro-Caspasen, vor. Im Verlauf der Apoptoseexekution kommt es zu deren Aktivierung durch heterologe Caspasen, Auto-Proteolyse oder Dimerisierung. Aktivierte Caspasen sind in der Lage, ihre Substrate nach einem Aspartat in einer bestimmten Sequenz zu spalten (Martin and Green 1995). In Säugerzellen sind bisher 15 Caspasen identifiziert, welche aber nicht alle an apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Entsprechend ihrer Aktivierungsweise und Substratspezifität kann man Initiator- und Effektorcaspasen unterscheiden. Initiatorcaspasen (Caspase-8 und -9) werden nach äußeren (extrinsische) oder inneren (intrinsische) Signalen durch Oligomerisierung und Spaltung aktiviert und aktivieren ihrerseits die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7). Die Effektorcaspasen sind maßgeblich an der Fragmentierung des Zellinventars wie zum Beispiel Cytoskelettelemente und Zellhaftstrukturen, Transkriptionsfaktoren sowie antiapoptotischen Proteine beteiligt (Chang and Yang 2000). Auch die Fragmentierung der DNA, welches ein Marker für Apoptose ist, wird indirekt durch Effektorcaspasen vermittelt. Hierbei schneidet Caspase-3 das DEF-Protein, welches der Inhibitor einer Desoxyribonuklease (caspase activated DNase, CAD) ist. CAD ist dann letztlich für die Fragmentierung der DNA verantwortlich (Liu et al. 1997; Enari et al. 1998), welche neben dem Abbau zellulärer Proteine durch die Effektorcaspasen der wohl wichtigste Vorgang in der Degradationsphase ist.

Einleitung

Die Initiatorphase kann, vereinfacht dargestellt, auf zwei Hauptwegen ausgelöst werden: Durch einen intrinsischen, mitochondrial vermittelten Weg und über einen extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Weg. Beide werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.7.1 Intrinsische mitochondrial vermittelte Apoptose

Im intrinsischen Apoptoseweg spielt das Mitochondrium eine entscheidende Rolle. Zum besseren Verständnis ist die nachfolgende Beschreibung in Abb. 1-3 graphisch dargestellt. Durch einen apoptotischen Stimulus kommt es zu Veränderungen der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation, MOMP). Dies wird durch die Konkurrenz zwischen anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie reguliert. Als pro-apoptotische Proteine spielen vor allem die Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak eine herausragende Rolle, da sie als Effektorproteine in der Lage sind, die MOMP direkt zu beeinflussen (Hacker and Weber 2007; Kepp et al. 2007). Am Beispiel des Bax Proteins soll dieser Vorgang genauer beschrieben werden. Nach der Aktivierung von Bax im Cytoplasma kommt es zu einer Konformationsänderung und dadurch zu einer Translokation von Bax in die äußere Mitochondrienmembran (Gross et al. 1998). Dort bildet Bax durch Oligomerisierung Poren, welche das MOMP erhöhen und zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren führen (Hacker and Weber 2007; Kepp et al. 2007). Ein entscheidender pro-apoptotischer Faktor, welcher über die gebildeten Poren ins Cytoplasma gelangt, ist Cytochrom C. Nach seiner Freisetzung aus den Mitochondrien bildet dieser zusammen mit Caspase-9 und Apaf-1 einen Komplex, das Apoptosom. In diesem Komplex wird durch autokatalytische Spaltung die Caspase-9 aktiviert (Acehan et al. 2002; Pop et al. 2006), welche ihrerseits die Effektorcaspasen aktiviert (Li et al. 1997; Srinivasula et al. 1998). Dadurch kommt es über CAD zur Fragmentierung der DNA. Weitere pro-apoptotische Faktoren, welche aus dem Mitochondrium freigesetzt werden, sind Smac/DIABLO und AIF (apoptosis inducing factor) (Susin et al. 1999; Chai et al. 2000; Du et al. 2000). Smac/DIABLO inhibiert die Familie der „Inhibitoren der Apoptose“ (IAPs) (Chai et al. 2000; Du et al. 2000), während AIF zusammen mit der Endonuklease G im Zellkern zur Fragmentierung der DNA in einer Caspase-unabhängigen Weise führt (Cregan et al. 2004). Die Regulation der pro-apoptotischen Proteine wie Bak und Bax ist nicht vollständig geklärt. In nicht apoptotischen Zellen ist Bak zwar auch in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wird aber durch eine Bindung mit den anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie Bcl-X_L und Mcl-1 (nicht aber Bcl-2) inaktiv gehalten (Willis et al. 2005). Gegenspieler dieser anti-

Einleitung

apoptotischen Proteine sind die pro-apoptotischen Proteine Bim, Puma, Noxa und Bad (Hacker and Weber 2007), welche durch Hemmung der anti-apoptotischen Proteine die Bak Aktivierung positiv beeinflussen. Bax wird in nicht apoptotischen Zellen z.B. durch Interaktion mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 an der Kanalbildung in der äußeren Mitochondrienmembran gehindert (Oltvai et al. 1993; Nomura et al. 1999). Auch hier fungieren pro-apoptotische Proteine wie Bad und Puma als Gegenspieler von Bcl-2 und wirken dadurch positiv auf die Bax vermittelte Kanalbildung (Gillissen et al. 2003; Chen et al. 2005). Des weiteren kann Bcl-2 als Folge von genotoxischem Stress durch Spaltung und proteosomale Degradation nach Ubiquitinierung inaktiviert und abgebaut werden (Dimmeler et al. 1999; Tomicic and Kaina 2001).

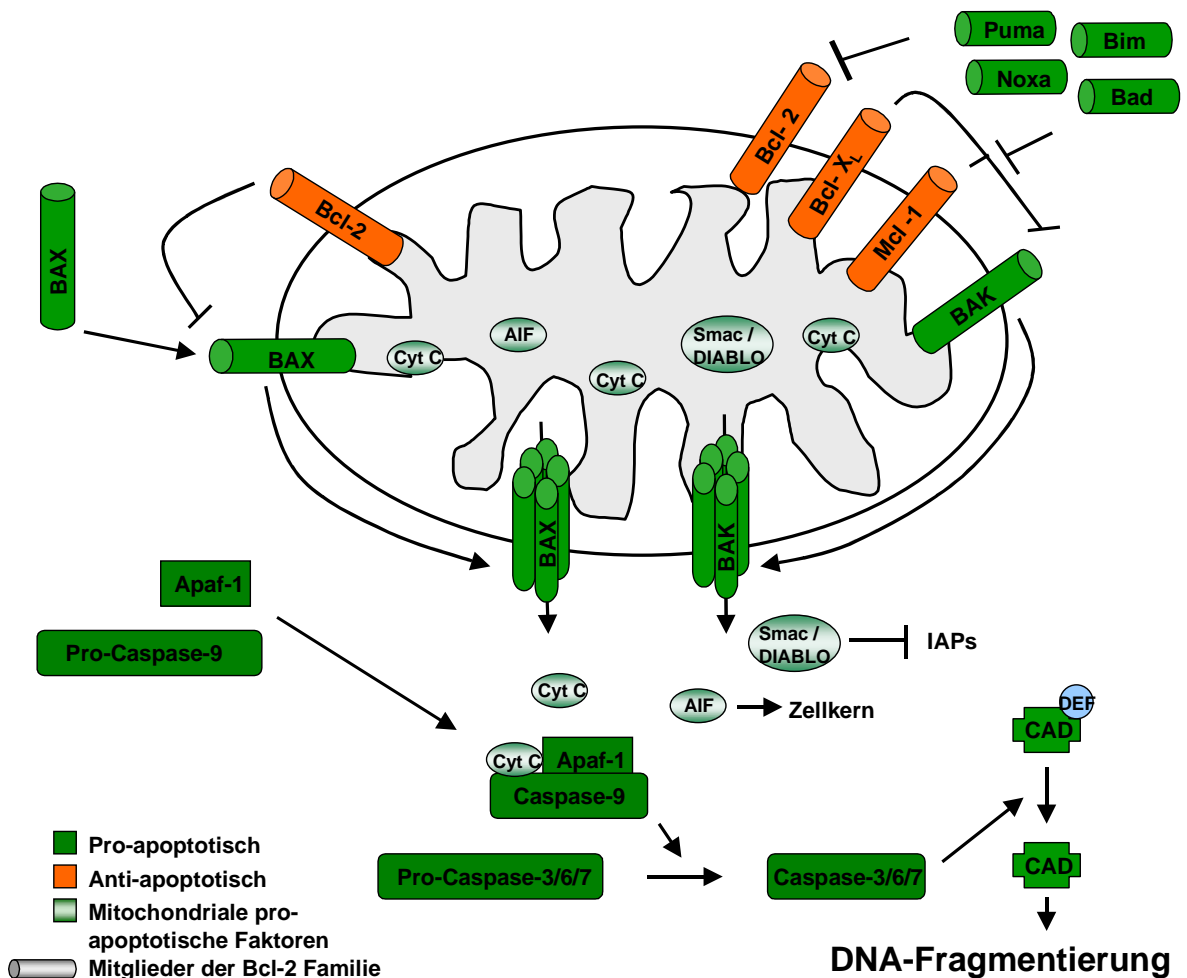


Abb. 1-3: Intrinsischer mitochondrial vermittelter Apoptose-Signalweg

Einleitung

1.7.2 Extrinsische Rezeptor vermittelte Apoptose

Im extrinsischen Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Rezeptor Apoptose ausgelöst. Die Rezeptoren werden Todesrezeptoren genannt, gegenwärtig sind sechs bekannt: Der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), der Todesrezeptor-3 und -6 (DR3 und DR6), der Fas-Rezeptor (CD95/APO-1), TRAIL Rezeptor-1 und -2 (TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5).

Die Rezeptor abhängige Apoptose setzt eine Bindung zwischen dem Rezeptor und seinem entsprechenden Liganden voraus. Bei dem Liganden handelt es sich um Cytokine, die durch Exocytose in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Der Ligand des Fas-Rezeptors ist der Fas-Ligand (CD95L), der des TRAIL-Rezeptors ist TRAIL. Der Fas-Ligand wird nach einem genotoxischen Stimulus durch AP-1 exprimiert (Faris et al. 1998). Auch der Fas-Rezeptor selbst wird stress-abhängig über p53 exprimiert (Muller et al. 1998).

Im Folgenden wird der Rezeptor vermittelte Apoptoseweg am Beispiel des Fas-Rezeptors beschrieben und ist zum besseren Verständnis in Abb. 1-4 graphisch dargestellt. Zum Auslösen von Apoptose reagiert der Fas-Ligand mit der extrazellulären Domäne des Fas-Rezeptors, wodurch es zur Oligomerisierung eines homotrimerischen Fas-Rezeptor Moleküls kommt. Die Trimerisierung bewirkt die Autophosphorylierung der Todesdomäne, welche sich in der intrazellulären Domäne der Fas-Rezeptor Moleküle befindet. Dadurch kommt es zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated death domain) (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1995). FADD besitzt eine Todeseffektor-Domäne (death effector domain, DED), welche zu den Caspaserekrutierungs-Domänen (caspase recruitment domains, CARD) gehört und Pro-Caspasen rekrutiert (Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996). Im Falle des Fas- und TRAIL-Rezeptors wird spezifisch die Pro-Caspase-8 rekrutiert. Der Komplex aus Pro-Caspase-8 und FADD wird DISC (death inducing signaling complex) genannt (Boldin et al. 1995; Medema et al. 1997; Muzio et al. 1997). In diesem Komplex erfolgt die Aktivierung der Pro-Caspase-8 durch Dimerisierung und autoproteolytische Spaltung (Muzio et al. 1998). Die aktive Form der Caspase-8 aktiviert ihrerseits die Effektorcaspasen-3 und -7 und leitet somit die Degradationsphase der Apoptose ein (Srinivasula et al. 1996; Muzio et al. 1997). Über die aktive Caspase-8 besteht eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischen Apoptoseweg. Diese beruht auf der Spaltung von Bid in die verkürzte Form tBid durch die Caspase-8, was eine Aktivierung von Bax bewirkt (Chou et al. 1999). Dies führt letztlich über Caspase-9 zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7.

Einleitung

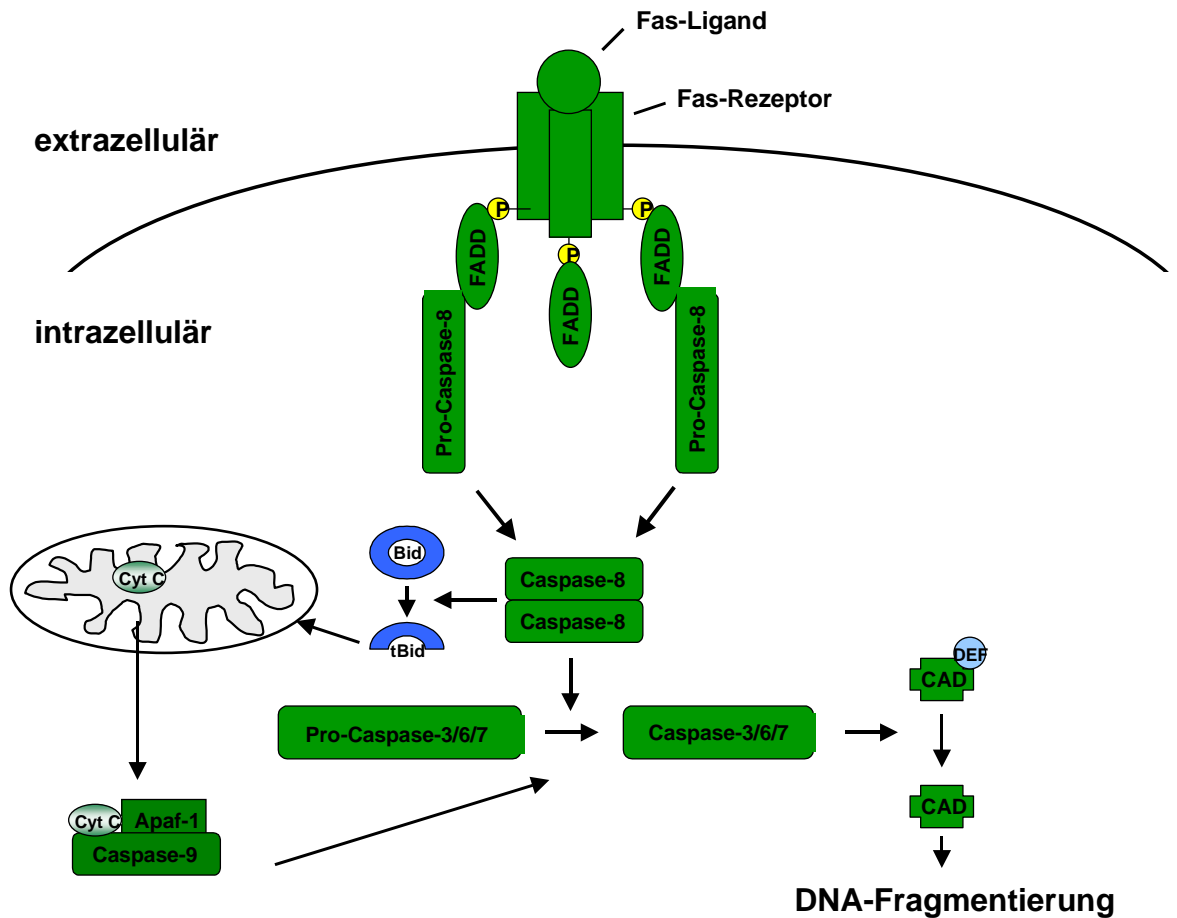


Abb. 1-4: Extrinsischer Fas-Rezeptor vermittelter Apoptose-Signalweg

1.8 Der Zellzyklus

In eukaryotischen Zellen erfolgt die Reproduktion in einem zyklischen Prozess, dem Zellzyklus. Generell werden vier Zellzyklusphasen unterschieden: die G1-Phase, die S-Phase, die G2-Phase und die M-Phase. Die S-Phase ist die Synthese-Phase, in welcher die Replikation stattfindet und sich das Genom der Zellen verdoppelt. In der M-Phase findet die Mitose statt. Die G1-Phase umfasst den Zeitraum zwischen M- und S-Phase. Hier liegt in der Zelle nur ein einfacher Chromosomensatz vor. Von der G1-Phase aus kann die Zelle auch in eine Art Ruhezustand, der G0-Phase, übergehen. Durch geeignete Signale, z.B. Wachstumsfaktoren, kann die Zelle diese Phase wieder verlassen und weiter am Zellzyklus teilnehmen. Die G2-Phase beschreibt den Zeitraum zwischen S- und M-Phase. In ihr liegt demnach der doppelte Chromosomensatz vor.

Einleitung

1.8.1 Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist strengen Kontrollen unterworfen. An bestimmten Punkten können sowohl externe als auch interne Kontrollmechanismen greifen, die sicherstellen, dass die einzelnen Phasen vollständig und fehlerfrei ablaufen. Zudem können verschiedene DNA-Schäden Kontrollpunkte auslösen, um sicher zu stellen, dass die geschädigte DNA nicht weitervererbt wird und es somit nicht zur Anhäufung von Mutationen kommt. Durch das Anhalten der Zellen im Zellzyklus bleibt ihnen genug Zeit, um den Schaden zu reparieren oder das Selbstmordprogramm (Apoptose) der Zellen zu aktivieren. Eine Inaktivierung dieser Kontrollmechanismen führt zu ungehindertem Zellwachstum, Anhäufung von Mutationen und Krebs. Wichtige Kontrollpunkte liegen am Übergang der G1-Phase in die S-Phase (G1/S-Kontrollpunkt), sowie am Übergang zwischen G2-Phase in die M-Phase (G2/M-Kontrollpunkt). Nach DNA-Schädigung ist der G1/S-Kontrollpunkt von großer Bedeutung, da er die Zelle davor bewahrt, während der DNA-Replikation Mutationen anzuhäufen. Im Mittelpunkt der Regulation des Zellzyklus stehen Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDKs), deren Aktivität durch die Cycline und die zugeordneten Inhibitoren der CDKs, den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs), kontrolliert wird (Nasmyth 1993; Nasmyth and Hunt 1993). Die CDKs müssen mit ihrem jeweiligen Cyclin assoziiert sein, um durch Phosphorylierung aktiviert werden zu können (Pines and Hunter 1991; Nasmyth 1993). Cycline sind Proteine, welche zellzyklusabhängigen Konzentrationsschwankungen unterliegen und zu verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktiv werden (Morgan 1995; Pines 1995). Die zellzyklusbedingten Schwankungen der Cyclin-Konzentration wird durch gezielte Transkription und Proteolyse gesteuert (Pines 1995). Cycline sind überwiegend im Kern lokalisiert und üben dort ihre Funktion aus. Eine Übersicht der Cycline und der dazugehörigen CDKs und CKIs in den verschiedenen Zellzyklusphasen ist in Tabelle 1-3 zusammengestellt. Zu den G1/S-Cyclinen gehören die D- und E-Typ-Cycline (Sherr 1994). Diese bilden hauptsächlich einen Komplex mit der CDK2, 4, 5, 6 (Hunter and Pines 1994). Cycline vom Typ A sind in der S-, G2 und M-Phase aktiv und komplexieren hauptsächlich mit CDK2 (Hunter and Pines 1994). Die Aufgabe dieser Cycline ist es, die CDKs in einen aktiven Zustand zu überführen und so den Zellzyklus voranzutreiben. Ein wichtiger Gegenspieler sind die Inhibitoren der CDKs, die CKIs. Diese assoziieren in reversibler Weise mit den CDKs oder mit dem CDK-Cyclin-Komplex, wodurch sie die CDK-Aktivität inhibieren (Peter and Herskowitz 1994). Die fünf am besten untersuchten CKIs in Säugerzellen sind p21, p27, p57, p15 und p16. p21 und p27 sind eng verwandt und binden bevorzugt an CDK2- und CDK4-Cyclin-

Einleitung

Komplexe (Harper et al. 1993; Xiong et al. 1993; Polyak et al. 1994a; Toyoshima and Hunter 1994). Ebenso sind p15 und p16 eng verwandt. Diese binden bevorzugt an CDK4- und CDK6-Komplexe (Serrano et al. 1993; Hannon and Beach 1994).

Da die inhibitorische Wirkung der CKIs vom Konzentrationsverhältnis zwischen CKI und Cyclin abhängt, ist die Regulation der CKIs von großer Bedeutung. Nach DNA-Schädigung spielt vor allem p21 eine große Rolle. Die Konzentration von p21 wird hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert, wobei das p53 Protein als Transkriptionsfaktor wirkt (el-Deiry et al. 1993; el-Deiry et al. 1994). Nach einem DNA-Schaden kommt es zur Stabilisierung von p53 und somit zu einer erhöhten Expression von p21 (vgl. 1.6). Dadurch kommt es zum Auslösen des G1/S-Kontrollpunkts und zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase (Dulic et al. 1994). Aber p21 hat noch eine weitere inhibitorische Funktion. Es besitzt eine Bindungsstelle für das Replikationshilfsprotein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Flores-Rozas et al. 1994; Waga et al. 1994). Eine Bindung von p21 an PCNA inhibiert die PCNA abhängige DNA Replikation, aber nicht die PCNA abhängige Nukleotidexzisions-Reparatur (Li et al. 1994; Waga et al. 1994). p15 wird ebenfalls auf Transkriptionsebene über den negativen Wachstumsfaktor TGF β reguliert. Ein Anstieg der p15 Konzentration bewirkt ebenfalls ein Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase. p27 liegt in proliferierenden Zellen in einer inaktiven Form vor (Polyak et al. 1994a). Sein Niveau bleibt den gesamten Zellzyklus über konstant, und wird nicht durch antimitogene Signale z.B. TGF β induziert (Polyak et al. 1994b; Toyoshima and Hunter 1994), sondern post-transkriptionell auf eine noch unbekannt Weise aktiviert (Morgan 1995) und so die Zellen in der G1-Phase arretiert.

p16 fungiert als Tumorsuppressorgen und ist daher in vielen Tumoren inaktiv (Kamb et al. 1994; Nobori et al. 1994) z.B. in Pankreastumoren (Caldas et al. 1994; Schutte et al. 1997). Dadurch kommt es zu einem ungehemmten Zellwachstum, zur Anhäufung von Mutationen und schließlich zu Krebs. All diese CKIs rufen eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase hervor. Der G1-Phase kommt eine besondere regulatorische Funktion im Zellzyklus zu, da hier entschieden wird, ob die Zelle eine neue S-Phase und somit eine neue Zellteilung durchläuft. Daher soll der G1/S-Phase-Übergang durch D-Typ Cycline im Folgenden genauer beschrieben werden. Eine grundlegende Aufgabe der Cycline besteht darin, externe Signale in den Zellzyklus zu integrieren. Mitogene Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren bewirken eine erhöhte Transkription an Cyclin D1. Dieses assoziiert in der G1-Phase mit der CDK4 und bewirkt deren Aktivierung durch Phosphorylierung mittels CAK (CDC2 activating kinase) (Morgan 1995). Der aktivierte CDK-Cyclin-

Einleitung

Komplex ist nun in der Lage, das Rb-Protein, welches sich im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 befindet, zu phosphorylieren (Ewen et al. 1993; Kato et al. 1993; Weinberg 1995). E2F1 löst sich daraufhin aus dem Komplex mit dem Rb-Protein. Dadurch wird E2F1 aktiviert und kann die Expression von Genen vorantreiben, welche zum Durchlaufen der S-Phase nötig sind (Chellappan et al. 1991). Erhält die Zelle im Gegensatz dazu anti-mitogene Signale (vom TGF β , cAMP, durch bestimmte Zell-Zell-Kontakte oder durch DNA-Schädigung), kommt es zu einer Hochregulation oder Aktivierung der CKIs p15, p16, p27 und p21. p21 spielt hierbei die entscheidende Rolle nach DNA-Schädigung und wird p53 abhängig transkribiert (Dulic et al. 1994). Diese CKIs assoziieren mit dem CDK-Cyclin-Komplex und inhibieren dadurch seine Kinaseaktivität. Dadurch kann das Rb-Protein nicht phosphoryliert werden, der Transkriptionsfaktor E2F1 ist nicht aktiv und die Zellen verbleiben in der G1-Phase. Eine Ausnahme stellt p16 dar. Es bindet freie D-Cycline, destabilisiert diese und übt so seine inhibitorische Funktion aus.

Tabelle 1-3: Übersicht der Cycline, CDKs und CKIs in den verschiedenen Zellzyklusphasen
CDK: Cyclin-abhängige Proteinkinase, CKI: Inhibitor der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen

Cyclin	CDK	CKI	Zellzyklusphase
Säugetiere:			
A1	CDC2, CDK2	p21	Meiose
A2	CDC2, CDK2	p21	S, G2, M
B1, B2, B3	CDC2	p21	M
C	?	?	?
D1, D2, D3	CDK2, 4, 5, 6	p15, p16, p21, p27	G1, Restriktionspunkt
E	CDK2	p15, p21, p27	G1/S
F	?	?	G2?
H	CDK7		

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Pankreaskarzinom und das maligne Melanom zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber den in der Therapie verwendeten Zytostatika aus. Bei der Behandlung eines metastasierenden Pankreaskarzinoms wird eine Kombinationstherapie bestehend aus 5-FU, Cisplatin und ionisierender Strahlung (IR) angewendet. Bei Melanomen sind die Mittel erster Wahl die methylierenden Agenzien Dacarbazin (DTIC) und Temozolomid (TMZ). Um die Ansprechrate der Tumore auf diese Behandlungen zu erhöhen, werden für beide Krebsarten u. a. Interferone (IFNs) mit in die Therapie aufgenommen. IFNs sind Zytokine, welche zytotoxisch auf Tumorzellen wirken. Für IFNs sind zusätzlich radio- und chemosensibilisierende Eigenschaften in verschiedenen Krebsarten beschrieben worden.

In der vorliegende Arbeit soll die zytotoxische bzw. radio- und chemosensibilisierende Wirkung von Typ-I IFNs in Pankreaskarzinom- und Melanomzelllinien untersucht werden. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Kombination von IFNs mit Bestrahlung bzw. TMZ gelegt. Eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus der IFNs könnte dazu beitragen, die Kombinationstherapie mit Zytostatika und / oder IR zu optimieren.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollen an zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien (Panc-1, Su8686, Capan-1, Capan-2, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Aspc-1, HS 766T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902) und vier Melanomzelllinien (D05, D14, A375 und RPMI 7951) durchgeführt werden.

Folgende Themenschwerpunkte stehen im Vordergrund:

- Charakterisierung der intrinsischen Radio- und Chemosensitivität der Pankreaskarzinom- und Melanomzelllinien;
- Vergleich der zytotoxischen Wirkung von IFN- α und IFN- β auf die verschiedenen Krebszelllinien;
- Bestimmung der radiosensibilisierenden bzw. chemosensibilisierenden Eigenschaften der Typ-I IFNs;
- Untersuchung des zellulären Mechanismus, welcher dem radio- bzw. chemosensibilisierenden Effekt der IFNs zugrunde liegt.
 - Bei diesen Untersuchungen soll ein besonderes Augenmerk auf der Fragestellung liegen, ob Typ-I IFNs die DNA-Reparatur oder die Apoptoserate nach IR bzw. TMZ beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Blot-Kammer, Trans Blot Cell
Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell
Brutschrank, Hera cell
[¹³⁷Cs]-Quelle Gammacell 2000
Durchflusszytometer FACS Calibur
ECL-Filme
Elektrophoreseapparaturen
Feinwaage
Fluoreszenzeinrichtung BX-FLA
Geldokumentation, InGenius
Hybridisierungsofen
Kühlschrank (4°C)
Microplatten Reader Sunrise RC
Mikroskop Axiovert 35
Mikroskop BX 50
Mikroskop Wilovert A
Neubauer-Zählkammer
Nitrozellulosemembran (Protan)
PCR-Cycler TGradient
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)
Schüttelinkubator B.
Szintillationsmeßgerät
Spannungsquelle 200/2.0
Spannungsquelle Power Pac 200/300
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus
Sterilbank, CLASSII A/B3, NUAIR
Sterilbank, Hera safe
Tiefkühler (-20°C)
Tiefkühler (-80°C)
Tischzentrifuge 5402
Thermomixer 5436
Thermocycler
Thermostat 5320
Transilluminator
Ultraschallstab 250
UV-C-Quelle NSE 11-270
Vakuumpumpe
Vortex Genie
Wasserbad
Whatman 3 MM Filterpapier
Zellkulturartikel
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360
Zentrifuge, Centrifuge 5402
Bio-Rad, München
Bio-Rad, München
Heraeus, München
Molsgaard Medical, Dänemark
BD Pharmingen, Heidelberg
Amersham, Braunschweig
Bio-Rad, München
Satorius, Göttingen
Olympus, Hamburg
Syngene, Cambridge UK
Appligen, Heidelberg
Liebherr, Ochsenhausen
Tecan, Crailsheim
Zeiss, Jena
Olympus, Hamburg
Hund, Wetzlar
Marienfeld, Lauda-Königshofen
Schleicher & Schuell, Dassel
Biometra, Göttingen
Kodak, USA
Braun Biotech. Int., Melsungen
Kontron, Gosheim
Bio-Rad, München
Bio-Rad, München
Labsystems, Finnland
Zapf, Sarstedt
Heraeus, München
Liebherr, Ochsenhausen
Forma, Frankfurt
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Biometra, Göttingen
Eppendorf, Hamburg
Bachhofer, Reutlingen
Branson, Danbury, USA
Phillips, Hamburg
Brandt, Wertheim
Bender & Hobein, Zürich
Köttermann, Uetze-Hänigsen
Schleicher & Schuell, Dassel
Greiner, Nürtingen
Heraeus, München
Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Zentrifuge, Centrifuge 5415D, Rotor F45-24-11 Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Discovery M120Se, Rotor S100AT6 Sorvall, Schwerte

2.1.2. Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Annexin V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
cDNA-Synthesekit (First Strand Synthesis Kit)	Sigma-Aldrich, München
cDNA-Synthesekit	ABgene, Hamburg
Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
Comassie Blue G-250	Bio-Rad, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker pBR322 DNA/AluI	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL- und ECL-Plus-Kit	Pharmacia/Amersham, Braunschweig
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Geneticin, G418	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Giemsa	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Low Melting Point Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
NucleoSpin RNA II	Marcherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA / Protein	Marcherey-Nagel, Düren
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ BG)	Sigma-Aldrich, München
PBS	Biochrom, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Propidium-jodid	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™	Roche, Mannheim
Proteinprobenpuffer RotiLoad 1	Roth, Karlsruhe
peqGold Proteinmarker II, 10-200 kDa	PEQLAB, Erlangen
Prestained Proteinmarker, 19-118 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Radioaktiv markiertes [³ H]-Uridin	NEN Dupoint, Zaventem, Belgien
RNase A	Sigma-Aldrich, München
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe
SuperKillerTRAIL	AXXORA GmbH, Lörrach
Taq DNA Pol, Master Mix Red	Ampliqon, Hamburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween20	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs; CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (München) in der Qualitätsstufe p. a. bezogen.

Material und Methoden

2.1.3 Interferone

IFN- α , (Interferon-alpha-2a, Roferon-A) Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wylen.

IFN- β , (Interferon-beta-1a, Rebiff 22) Merck Serano, Darmstadt.

2.1.4 Zytostatika

Fotemustin (Muphoran®)

Diethyl (1-(((2-chloroethyl)(nitroso)carbamoyl)amino)ethyl)phosphonat

Servier, München

Methylmethansulphonat

MMS

Sigma-Aldrich, München

Temozolomid (Temodar®)

4-Methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo (4.3.0) nona-2,7,9-triene-9-carboxamid

Schering-Plough, München

2.1.5 Software

Cell A

Olympus, Hamburg

CellQuest Pro

BD Pharmingen, Heidelberg

GeneSnap

Syngene, Cambridge, UK

GeneTools

Syngene, Cambridge, UK

Kinetic Imaging Komet 4.0.2.

BFI-Optilas, Puchheim

WinMDI

<http://facs.scripps.edu/software.html>

2.1.6 Medien und Komponenten für Zellkultur

RPMI 1640 plus L- Gutamin

PAA, Pasching, Österreich

DMEM high Glucose

PAA, Pasching, Österreich

McCoy's 5A

Lonza, bioWhittaker, Basel, Schweiz

Fötale Kälberserum (FCS)

biowest, Nuaille, Frankreich

Fötale Pferdeserum (FHS)

PAA, Pasching, Österreich

Penicillin / Streptomycin

PAA, Pasching, Österreich

L-Gutamin

PAA, Pasching, Österreich

Trypsin (10x)

PAA, Pasching, Österreich

2.1.7 Antikörper

anti-Bak	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Bax	pAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bcl-2	mAb	(1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Caspase-3	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-7	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-8	mAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-9	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Erk2	pAb	(1:6000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-FADD	pAb	(1:1000)	Merck (Calbiochem), Darmstadt
anti-Fas-R	mAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Fas-R (agonistisch)	mAb		AXXORA GmbH, Lörrach
anti- γ H2AX [p-H2AX(Ser139)]	mAb	(1:1000)	Upstate, NY/USA

Material und Methoden

anti-IFN-R	pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MGMT	pAb	(1:1000)	Institut für Toxikologie, Mainz
anti-MLH1	pAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MSH2	mAb	(1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-MSH6	mAb	(1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-p15	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p21	pAb	(1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p27	pAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p53	pAb	(1:2000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Rad 51	mAb	(1:1000)	Merck (Calbiochem), Darmstadt
anti-Rad 52	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-PCNA	mAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PMS2	mAb	(1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Puma	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-RPA(p34)	mAb	(1:4000)	NeoMarkers, Asbach
IgG Kaninchen (HRP konjugiert)		(1:4000)	Amersham, Braunschweig
IgG Maus (HRP konjugiert)		(1:4000)	Amersham, Braunschweig
AlexaFluor 488 Ziege-anti-Maus		(1:500)	Invitrogen, Karlsruhe
AlexaFluor 546 Ziege-anti-Maus		(1:500)	Invitrogen, Karlsruhe
α -CD3			BD Pharmingen, Heidelberg
α -CD28			BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.8 Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden in *A. bidest* angesetzt.

Bradford

8,5% Phosphorsäure,
4,75% Ethanol,
1% Commasie blue G250
(anschließend filtern)

PBS (pH 7.4)

137 mM NaCl,
2,7 mM KCl,
6,5 mM Na₂HPO₄,
1,5 mM KH₂PO₄,
0,7 mM CaCl₂,
0,6 mM MgCl₂

Ponceau S Lösung

0,1% Ponceau
5% CH₂COOH

Protein-Transfer-Puffer

50 mM Tris
384 mM Glycin
20% Methanol

SDS-Trenngel (5%) (7,5) (10%) (12%) (15%)

(7,2) (6,5) (5,7) (5,1) (4,3) ml
3 ml
120 μ l
(1,5) (2,3) (3,0) (3,6) (4,5) ml
60 μ l
6 μ l

A. bidest
Tris-HCl (pH 8,8)
SDS (10%)
Acrylamid (40%)
APS (10%)
TEMED

Material und Methoden

SDS-Sammelgel (4%)	4,4 ml 0,76 ml 60 µl 0,76 ml 60 µl 6 µl	<i>A.bidest</i> Tris-HCl (pH 6,8) SDS Acrylamid (40%) APS (10%) TEMED
SDS-Laufpuffer (5x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin	
TBE-Puffer (pH 8.2) (5x)	450 mM Tris 450 mM Borsäure 6,25 mM EDTA	
TBS-Puffer (pH 7,6) (10x)	24,2 g Tris-HCl 80 g NaCl ad 1 l <i>A.bidest</i>	
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	

2.1.9 Vektoren

pSV2MGMT: Aus dem Plasmidvektor *pSV2neo* (Southern and Berg 1982) wurde das Neomycinresistenzgen zugunsten des humanen MGMT-Gens ausgetauscht (Kaina et al. 1991).

pcDNA3-FADD-DN: In den pcDNA3 Vektor wurde eine trunkierte Version der FADD cDNA kloniert, welcher die Todes-Effektor-Domäne fehlt (DN-FADD) (Tewari and Dixit 1995; Chinnaiyan et al. 1996).

pTER+ Caspase-8: In den pTER+ Vektor (van de Wetering, 2003) wurde über die Schnittstellen Bgl II und Hind III eine Caspase-8 siRNA Sequenz (5' GGGTCATGCTCTATCAGAT 3') kloniert (Ehrhardt et al. 2008). Als Kontroll-siRNA wurde über die selben Schnittstellen eine HRS-Sequenz (5' GATCATGTAGATACGCTAC 3') kloniert.

2.1.10 Primer

Primer für qRT-PCR-Experimente

Gen	Sequenz	Zyklen- Zahl	Annealing- Temperatur (°C)
<i>p15</i>	5'-TGG GGG CGG CAG CGA TGA G-3' (up)	29	72
	5'-AGG TGG GTG GGG GTG GGA AAT-3' (low)		
<i>p27</i>	5'-AAC GTG CGA GTG TCT AAC GGG AGC-3' (up)	28	63,5
	5'-CGA CGG ATC AGT CTT TGG GTC CAC-3' (low)		
<i>gapdh</i>	5'-CCC CTC TGG AAA GCT GTG GCG TGA T-3' (up)	21	56
	5'-GGT GGA AGA GTG GGA GTT GCT GTT GA-3' (low)		
<i>Rad52</i>	5'-GAC GCA CAG CAC TCC TGT AAC-3' (up)	28	63,5
	5'-CAT CTG TCC AGA GCC TCT CC-3' (low)		
<i>Rad 54</i>	5'-CAT CAT GGC TGA TGA GAT GG-3' (up)	29	58,5
	5'-TGA GGA TGG GAG AAG ACA CC-3' (low)		

Material und Methoden

2.1.11 Zelllinien

Humane Pankreaskarzinom Zelllinien

PA-TU 8902 ¹	Adenokarzinom des exokrinen Pankreas
PA-TU 8988T ¹	Adenokarzinom des exokrinen Pankreas
Panc-1 ²	Tumor des Pankreas-Gangs
Su8686 ²	Tumor des endokrinen Pankreas
Capan-1 ²	isoliert aus Lebermetastasen
Capan-2 ²	Adenokarzinom des exokrinen Pankreas
Aspc-1 ²	isoliert aus Aszitesmetastasen
BxPc-3 ²	Adenokarzinoms des exokrinen Pankreas
MiaPaCa-2 ²	Tumor des endokrinen Pankreas
HS 766T ²	isoliert aus Lymphknotenmetastasen

Humane maligne Melanom Zelllinien

D05 ^{3,4}	isoliert aus Primärtumor
D14 ^{3,4}	isoliert aus Primärtumor
RPMI 7951 ¹	isoliert aus Lymphknotenmetastasen
A375 ²	isoliert aus Primärtumor

¹ Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen

² Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen

³ Zellen wurden von Prof. C.W. Schmidt (Institute of Medical Research, Australien) zur Verfügung gestellt

⁴ Zellen wurden von Prof. T. Wölfel (Institut für Hämatologie/Onkologie; Mainz) zur Verfügung gestellt

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen oder -schalen im Inkubator bei 37°C und 7% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre. Die Zelllinien PA-TU 8902, Panc-1, SU8686, BxPc-3, Aspc-1, HS 766T und Mia-PaCa-2 sowie die Melanomzelllinien D05, D14 und A375 wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS kultiviert. PA-TU 8988T wurde in DMEM kultiviert mit 5% FCS und 5% fötalem Pferdeserum. Für Capan-1 wurde DMEM verwendet mit 20% FCS. Die Melanomzelllinien RPMI 7951 wurde in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Capan-2 wurde in McCoy's 5A Medium mit 10% FCS kultiviert. Allen Medien wurde zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Trypsin (0,25%) von dem Kulturgefäß abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in frischem 37°C warmem Medium, wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend verdünnt ausgesät. Zum Einfrieren der Zellen wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet. Diese wurden geerntet, in frischem Medium aufgenommen und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 1000 Upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriereserum (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden in Zellstoff verpackt und über Nacht bei -80°C gelagert. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeit-Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Kultivieren gelagerter Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension durch

Material und Methoden

37°C warmes Medium aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert um die Reste des DMSO auszuwaschen. Danach wurde das Zellpellet in frischem 37°C warmem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Alle etablierten Zelllinien wurden durch das Mykoplasma-Detektions-Kit (Minerva Biolabs, Berlin) regelmäßig auf eine Mykoplasmenkontamination hin untersucht.

2.2.2 Behandlung von Zellen mit Interferon

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei der Interferon-Behandlung immer um eine 24-stündige Vorinkubation. Dafür wurden die adhärenenten, exponentiell wachsenden Zellen mit 300 oder 3000 I.E./ml Interferon- α oder- β behandelt. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel und wenn angegeben eine Behandlung mit ionisierender Strahlung oder mit entsprechenden Zytostatika.

2.2.3 Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung

Die Behandlung mit ionisierender Strahlung erfolgte für adhärenente Zellen in Kulturschalen (6 cm) oder für abgelöste Zellen in 15 ml Reaktionsgefäßen. Die letztere Strategie eignete sich vor allem für die Behandlung der Zellen bei 4°C. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 3,75 Gy/min einer Cäsium 137 Quelle.

2.2.4 Behandlung von Zellen mit Zytostatika und deren Zubereitung

Die Behandlung mit den Zytostatika Temozolomid (TMZ) und Fotemustin (FM) erfolgte durch Zugabe einer bestimmten Konzentration der jeweiligen Lösung in das Medium der Zellen. Durch die kurze Halbwertszeit dieser beiden Stoffe in wässriger Lösung war eine Dauerbehandlung möglich. Zuvor wurde von beiden Stoffen eine Stammlösung hergestellt. Hierfür wurde TMZ mit einer Konzentration von 35 mM in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. FM wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgewogen und bei -20°C gelagert. Die Bereitung der Stammlösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) erfolgte stets frisch mit 1/3 EtOH und 2/3 *A. bidest.* Die Behandlung mit MMS erfolgte, aufgrund der hohen Stabilität der Substanz in Wasser, als Pulsbehandlung für eine Stunde. MMS wurde zuvor mit *A. bidest* auf eine Stock-Konzentration von 100 mM verdünnt. Wurden die Zellen zusätzlich mit IFN behandelt, erfolgte dies 24 h vor der Zytostatikagabe. War eine Co-Behandlung mit O⁶BG (Endkonzentration 10 μM) nötig, erfolgte dies 1 h vor der Zytostatikagabe. Direkt vor der Behandlung mit dem Zytostatikum wurde das Medium gewechselt, um gegebenenfalls das Interferon zu entfernen, und nochmals O⁶BG zugegeben. Danach wurden die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert.

2.2.5 Erstellen einer Wachstumskurve

Um die Verdopplungszeit der Zellen mit und ohne Interferon zu bestimmen, wurden 5×10^4 Zellen in eine 6 cm Schale ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhäreniert waren, wurde die erste Kontrolle (0 h) geerntet und die restlichen Zellen gar nicht bzw. mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das Interferon durch einen Medienwechsel entfernt und der 24 h Wert geerntet. Mit den unbehandelten Zellen wurden in gleicher Weise verfahren, um Schwankungen zu vermeiden. Danach wurden die Zellen bis zu 144 h alle 24 h mittels Trypsin geerntet und in einem Volumen von 2 ml

Material und Methoden

aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

2.2.6 Bestimmung des Zellüberlebens durch den Koloniebildungstest

Zur Durchführung eines Koloniebildungstestes wurden je nach Strahlendosis bzw. Zytostatikakonzentration 5×10^2 – 2×10^4 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Je nach Zellwachstum wurden die Zellen zehn bis 14 Tage nach Behandlung fixiert. Die Fixierung erfolgte durch ein Gemisch aus einem Teil Essigsäure, einem Teil Methanol und acht Teilen *A. bidest.* für 30 min. Anschließend wurden die Zellen durch 1,25 % v/v Giemsa / 0,125 % w/v Kristallviolett für 10 min angefärbt und Kolonien, bestehend aus mindestens 50 Zellen, ausgezählt. Die Anzahl der gezählten Kolonien wurde relativ auf die Zahl der in den Kontrollen gewachsenen Kolonien bezogen.

2.2.7 Bestimmung des Zelltods am Durchflusszytometer

Alle Messungen am Durchflusszytometer wurden an einem FACSCalibur (BD Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Jede Messung bestand aus der Analyse von 1×10^4 Zellen.

2.2.7.1 Bestimmung der SubG1 Fraktion und der Zellzyklusverteilung

Bei der Messung der SubG1 Fraktion wird der DNA Gehalt der Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Dadurch ist diese Methode auch dazu geeignet, die Zellzyklusverteilung zu bestimmen. Da es beim Tod der Zellen durch Apoptose unter anderem zu einer Fragmentierung bzw. im folgenden Verlauf auch zu einem Abbau der DNA der Zellen kommt, liegt somit der DNA-Gehalt sterbender Zellen unter dem DNA-Gehalt von Zellen in der G1-Phase. Somit entspricht die Zellpopulation mit einem DNA-Gehalt $< G1$ (SubG1) dem Anteil toter Zellen (Nicoletti et al. 1991; Fraker et al. 1995). Für die Bestimmung des Zelltods über die SubG1 Fraktion wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät und entsprechend behandelt. Nach der gewünschten Zeit wurden die Zellen geerntet, indem erst der Überstand in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurde und anschließend, nach Trypsinbehandlung, die abgelösten Zellen ebenfalls in dieses Reaktionsgefäß transferiert wurden. Danach wurde die Zellsuspension 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 μ l PBS resuspendiert. Zum Fixieren der Zellen wurden 2 ml eiskaltes 70 %iges EtOH zugegeben und die Zellen für mindestens 1 h (höchstens aber 4 Wochen) bei -20°C gelagert. Um die Zellen für die Messung vorzubereiten, wurden sie erneut zentrifugiert (5 min; 1500 Upm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zum Verdau der RNA mit RNase A (Endkonzentration 0,03 $\mu\text{g/ml}$) in 333 μ l PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt vor der Messung wurde die DNA mit 164 μ l Propidiumjodid-Lösung (50 $\mu\text{g/ml}$) angefärbt. Die quantitative Analyse erfolgte mittels der CellQuest Pro Software und der WinMDI Software.

2.2.7.2 Annexin V / Propidium-jodid Doppelfärbung

Diese Methode basiert auf einer Umlagerung der Phosphatidylserin-Reste von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran, was ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt (Vermes et al. 1995). Durch Annexin-V-FITC können diese umgelagerten

Material und Methoden

Serinreste nachgewiesen werden. Es wurden in 6 cm Schalen 2×10^4 – 1×10^5 bzw. in 24-Lochplatten 5×10^3 – $1,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät und beim Ernten der Überstand und die durch Trypsin abgelösten Zellen vereinigt. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS und einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 50 µl Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 0,1 % BSA) aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 2,5 µl Annexin V-FITC zu den Zellen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Um die DNA anzufärben wurden pro Ansatz 430 µl Bindungspuffer und 10 µl PI (50 µg/µl) zugegeben. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte direkt im Anschluss und wurde mit Hilfe der CellQuest Pro Software und der WinMDI Software quantifiziert. Die Zellpopulation, welche weder für Annexin V noch für PI positiv ist, beschreibt die lebende Population. Die nur Annexin V positiven Zellen stellen die früh apoptotische Population dar, die Annexin V und PI positiven Zellen die spät apoptotischen und nekrotischen Zellen.

2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Kits oder des NucleoSpin RNA/Protein-Kits, beide von Machery & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer in wässriger Lösung. Hierbei wurde die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen (260 nm, 280 nm, 230 nm) gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Den Grad der Verunreinigung der Probe mit Protein wird durch das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ beschrieben. Für reine RNA liegt dieser Wert unter 2,0. Der Wert für nicht gelöste Nukleinsäuren (OD₂₆₀/OD₂₃₀) sollte 0,005 nicht überschreiten.

2.2.10 Synthese von Nukleinsäure in vitro

2.2.10.1 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte mittels des „First Strand Synthesis-Kit“ von Sigma-Aldrich (München) nach Angaben des Herstellers. Für die Reaktion wurden 0,6 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.2.10.2 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Diese Methode wird verwendet um zu untersuchen, in welcher Größenordnung ein bestimmtes Gen (repräsentiert durch ein Fragment dieses Gens) auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Referenzproben transkribiert wurde. Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, um kurze Nukleinsäurestücke zu amplifizieren. Dies kann, durch eine Denaturierung der nach jedem Zyklus neu entstandenen DNA-Doppelstränge, beliebig oft wiederholt werden. Um spezifische Nukleinsäurestücke zu vervielfältigen, sind Primer notwendig, die auf den verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen. Durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus*

Material und Methoden

aquaticus werden die Primer an ihrem 3'-OH-Ende anhand der vorliegenden Matrize verlängert. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize, an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmente exponentiell an. Für die qRT-PCR wird cDNA eingesetzt, die aus Gesamt-RNA synthetisiert wurde. Die Reaktionen wurden mit 0,5 - 4 µl der synthetisierten cDNA in einem Endvolumen von 25 µl mit Master Mix Red (Ampliqon, Hamburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

- 1 Mal 2 min bei 95°C;
- x¹ Mal Synthesezyklus (30 sec bei 95°C-Denaturierung,
45 sec bei x²°C-Annealing, 60 sec bei 72°C-Verlängerung);
- 1 Mal 5 min bei 72°C.

x¹: siehe 2.1.10: Zyklenzahl; x²: siehe 2.1.10: Annealing-Temperatur

2.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten I

Je nach Fragestellung wurde der Überstand mit den abgelösten Zellen vereinigt oder nur die abgelösten Zellen verwendet. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (3200 Upm, 5 min, 4°C), nach dem der Überstand erneut verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung der Extrakte wurden die Pellets auf Eis aufgetaut und je nach Größe in einer bestimmten Menge (100 – 500 µl) Fraktionierungspuffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 0,5 mM PMSF, 10 mM DTT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert. Mittels Ultraschall (3x 10 Pulse, Duty cycle: 40%, Output control: 4) wurde die Zellmembran aufgebrochen und das Proteinlysate durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min 4°C) geklärt. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert. Eine Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (s. 2.2.14).

2.2.12 Herstellung von Gesamtzellextrakten II

Adhärente Zellen, 70 – 80 % konfluent, wurden in einer 10 cm Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl heißem 1fach konzentriertem Proteinprobenpuffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Nach langsamer Rotation der Platte wurden die vereinigten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mittels Ultraschall (1x 10 Pulse, Duty cycle: 40 %, Output control: 4) wurden DNA und Membran zerstört und die Proben 5 min bei 95°C denaturiert. Die Extrakte wurden bei -20°C gelagert. Eine Proteinangleichung erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

2.2.13 Herstellung fraktionierter Zellextrakte

Diese Methode ermöglicht das Herstellen von Zytoplasma-, Kern-, und Membranextrakten aus einer Probe. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben geerntet. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 100 – 500 µl Fraktionierungspuffer A (10 mM Hepes-KOH [pH 7,4], 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM Saccharose, 0,5 mM PMSF, 10 mM DTT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und in flüssigen Stickstoff überführt. Danach wurden die Proben bei 37°C auf dem Heizblock aufgetaut, 5 sec gevortext und wieder in flüssigen Stickstoff transferiert. Durch dreimaliges Wiederholen dieses Vorgangs wurde selektiv die Zellmembran zerstört. Nach einem Zentrifugationsschritt (700 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand, welcher der

Material und Methoden

Zytoplasmafraktion entspricht, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das verbleibende Pellet, bestehend aus Zellkernen und Membranfragmenten, wurde in 100 – 250 µl Fraktionierungspuffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 0,5 mM PMSF, 10 mM DTT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) aufgenommen und mittels Ultraschall (3x 10 Pulse, Duty cycle: 40%, Output control: 4) die Kernmembranen aufgebrochen. Durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C) wurden die Membranfragmente pelletiert und somit von den Kernproteinen (Überstand) getrennt. Diese wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Membranpellet wurde, je nach Größe, in 50 – 100 µl Fraktionierungspuffer B (Fraktionierungspuffer C + 1% Triton X-100) durch sorgfältiges resuspendieren gelöst und in flüssigen Stickstoff überführt. Alle Fraktionen wurden bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung aller Extrakte erfolgte nach Bradford (s. 2.2.14).

2.2.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test (Bradford 1976) ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. In saurer Lösung bildet der Farbstoff Comassie-Brilliant-Blau mit den Seitenketten der Proteine Komplexe. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsspektrum von 470 auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration. Um den Proteingehalt der verschiedenen Extrakte zu bestimmen, wurde in einer 96-Lochplatte 1 µl der Probe mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption nach 15 min Inkubation im Dunklen am Mikroplatten-Reader bei 600 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve (0 – 5 µg BSA) errechnet.

2.2.15 Western-Blot-Analyse

2.2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Hierbei wurden, je nach Größe des zu detektierenden Proteins, denaturierende Polyacrylamidgele mit 5, 7,5, 10, 12, oder 15 % Acrylamid-Anteil verwendet. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Beendigung der ca. 30-minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol verworfen und auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen, in welches ein Kamm eingebracht wurde um Ladetaschen auszusparen. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült. Pro Tasche wurden zwischen 25 und 50 µg Protein geladen, was zuvor mit ¼ Volumen Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert wurde. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 130 V.

2.2.15.2 Western-Blot-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese durch Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel auf eine in Blot-Puffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Beide Seiten wurden von einem ebenfalls mit Puffer getränktem Watman-Papier und einem Schwammtuch umschlossen, in einer Halterung fixiert und vertikal in eine mit Blot-Puffer gefüllte Transferkammer gestellt, so

Material und Methoden

dass die Nitrozellulosemembran zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der Proteine erfolgte bei 300 mA für eine Stunde (Mini Trans Blot Cell, Biorad, München), bei 300 mA für 3 h (Trans Blot Cell, Biorad, München) oder bei 100 mA über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Beladung des Nitrozellulosefilters durch Färbung mit Ponceau S Lösung überprüft. Anschließend wurde die Membran mit TBS-Tween20 (0,1 %) gespült, um die Färbelösung zu entfernen.

2.2.15.3 Detektion von Proteinen mittels Antikörpern

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung (5 % Magermilch in TBS-Tween20 (0,1 %)) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:500 – 1:4000) erfolgte in 5 % BSA in TBS-Tween20 (0,1 %) oder in Blockierungslösung (je nach Angaben des Antikörper-Herstellers) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 10 min mit TBS-Tween20 (0,1 %) gewaschen und für 1 h mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:4000) inkubiert. Danach wurde die Membran ebenfalls 3x 10 min gewaschen. Das Chemolumineszenzsignal der gebundenen Antikörper wurde durch ein ECL-Kit auf einem „high performance chemoluminescence film“ (beide Amersham, Braunschweig) dokumentiert. Sollte auf der Membran ein zweiter primärer Antikörper verwendet werden, wurde sie 2x 20 min in 100 mM Glycinlösung (pH 2,8) inkubiert, um die vorigen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Nitrocellulosefilter 1x 10 min mit TBS-Tween20 gewaschen und erneut 1 h in Blockierungslösung inkubiert.

2.2.16 Immunfluoreszenz (γ H2AX-Foci)

2.2.16.1 Vorbereitung der Deckgläser und Ansetzen des Versuchs

Die Reinigung der Deckgläser (20x 20 mm) erfolgte für 15 min in Diethylether und einem anschließenden Waschen für 5 min mit 100 %igem Ethanol, 5 min mit 70 %igem Ethanol und mit *A.bidest*. Damit sich die Zellen auf den Deckgläsern anheften können, wurde ihre Oberfläche durch eine 20 minütige Behandlung mit 1 M KCl aufgeraut. Die Lagerung der Deckgläser erfolgte in 70 %igem Ethanol. Für die Versuche wurden jeweils zwei solcher Deckgläser in eine 6 cm Kulturschale gelegt. Nach vollständigem Verdampfen des Alkohols wurden die Zellen ausgesät und entsprechend behandelt.

2.2.16.2 Antikörper- und DAPI Färbung

Vor dem Fixieren der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das Fixieren erfolgte in PBS mit einem 4 %igem Formaldehydanteil für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 100 %igem Methanol überschichtet und für 20 min bei -20°C gelagert. Im folgenden Schritt wurde jeweils ein Deckglas in eine 2 cm Schale überführt und 1 h in Blockierungslösung (5 % BSA in PBS mit 0,3 % Triton X-100) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Blockmedium abgenommen wurde, wurden je 50 μ l Primärantikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 in PBS mit 0,3 % Triton X-100 auf jedes Deckglas gegeben. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Schalen mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf dem Deckglas 2x 5 min mit PBS, 1x 2 min mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) und 1x 5 min mit PBS (0,3 % Triton X-100) gewaschen. Anschließen

Material und Methoden

wurden 50 µl des fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (1:500 in PBS, 0,3 % Triton X-100) auf die Deckgläser gegeben und in Dunkelheit für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut 2x 5 min mit PBS, 1x 2 min mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI. Hierfür wurden die Zellen mit 0,5 ml DAPI-Färbelösung (100 ng/ml DAPI in PBS mit 0,1 % Tween20) für 15 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS (0,1 % Tween20) gewaschen.

2.2.16.3 Versiegelung der Proben und Auswertung

Zum Schutz der Präparate vor Ausbleichung und Austrocknung wurden die Proben mit DAPCO-Lösung (1 % DAPCO, 90 % Glycerin in PBS) versiegelt. Hierfür wurde auf einen Objektträger jeweils 15 µl pro Deckglas DAPCO-Lösung aufgebracht und die beiden Deckgläser des Doppelansatzes mit der mit Zellen bewachsenen Seite nach unten in die Lösung gelegt. Nach Abtupfen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Die Dokumentation und Auswertung der Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer Digitalkamera und der Software Cell A (Olympus, Hamburg). Auch die Anzahl der Foci wurde mit Hilfe dieser Software bestimmt.

2.2.17 Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität

(MGMT-Aktivitäts-Test)

Diese Methode beruht auf der Übertragung radioaktiv markierter Methylgruppen von Kalbsthymus-DNA auf das MGMT-Protein des zu untersuchenden Zellextrakts. Die Radioaktivität, die von der DNA auf das MGMT-Protein übertragen wurde, ist ein Maß für die Methyltransferase-Aktivität. Für die Messung wurden 40 µl [³H]-Methyl-N-Nitrosoharnstoff markierte Kalbsthymus-DNA (ca. 80000 cpm) mit 200 µg Gesamtprotein des zu untersuchenden Extrakts in 200 µl Reaktionspuffer (70 mM Hepes-KOH (pH 7,8), 1 mM DTT, 5 mM EDTA) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37°C erfolgte die Zugabe von 100 µg BSA. Die DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Trichloressigsäure (TCA) (13 %) und 15 minütiges Aufkochen der Proben bei 95°C hydrolysiert. Durch ein anschließendes Abkühlen der Proben auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm) sedimentiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 %-iger TCA-Lösung (5 %) wurden sie durch Zugabe von 300 µl 0,2 N NaOH hydrolysiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt. Die MGMT-Aktivität wurde in fmol/mg Gesamtprotein angegeben.

2.2.18 Stabile Transfektionen

2.2.18.1 Stabile Transfektion von MGMT in Säugerzellen

Für die stabile Transfektion von Zellen mit MGMT wurde eine Co-Transfektion mit dem Expressionsvektor pSV2MGMT, der das MGMT Gen trägt, und dem pSV2neo Plasmid durchgeführt. Letzteres trägt ein Geneticin-Gen zur späteren Selektion der positiven Klone. Als Transfektionsreagenz wurde Effectene (Qiagen, Hilden) verwendet. Eine subkonfluente Zellkulturschale (10 cm) wurde mit 1,5 µg pSV2MGMT und 0,5 µg pSV2neo transfiziert. Anschließend wurden die positiven Klone durch Zugabe von

Material und Methoden

0,4 mg/ml G418 selektiert und die Kolonien in eine 24-Lochplatte überführt. Die Expression von MGMT wurde durch Western-Blot-Analyse und den MGMT-Aktivitätstest überprüft.

2.2.18.2 Stabile Transfektion von DN-FADD und Caspase-8 siRNA in

Säugerzellen

Für die stabile Transfektion der Zellen mit DN-FADD oder einem Vektor, welcher eine Caspase-8 siRNA wurden die Vektoren pcDNA3-FADD-DN bzw. pTER+ Caspase-8 verwendet. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die positiven Klone wurden mit 0,4 mg/ml G418 bzw. 300 µg/ml Zeocin selektiert und die Kolonien in eine 24-Lochplatte überführt. Die Expression von DN-FADD bzw. Caspase-8 wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft.

2.2.19 Bestimmung der DNA-Synthese durch BrdU-ELISA

Zur Bestimmung der Zellproliferationsrate wurde ein immunologisch-colorimetrischer Test (Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit, Roche, Mannheim) verwendet. Diese Methode basiert auf der Messung der Inkorporationsrate des Thyminanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese. Hierfür wurden 1×10^3 Zellen pro Ansatz in eine Mikrotiterplatte ausgesät und wenn angegeben am darauf folgenden Tag für 24 h mit Interferon behandelt. Die entsprechenden Kontrollen blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Proben für 3 h mit der BrdU-Lösung inkubiert um einen Einbau zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur fixiert und mit dem Peroxidase gekoppeltem anti-BrdU-POD Antikörper für 90 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe der Substratlösung (TMB). Diese wird von dem Peroxidase gekoppelten Antikörper erkannt und BrdU positive Zellen werden durch einen Farbumschlag markiert. Die Einbaurate wurde anhand der Absorption nach 5 – 30 min am Mikroplatten-Reader bei 492 nm bestimmt.

2.2.20 Neutrale Einzelzellelektrophorese (neutraler Komet Test)

Diese Methode beruht auf der Messung der Mobilität fragmentierter DNA. Hierfür wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt, wodurch DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt wurden, was zu einer gleichmäßigen Fragmentierung führte. Durch eine Bestrahlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte eine Reparaturkinetik erstellt werden. Dies wurde mit und ohne Interferon-Vorbehandlung durchgeführt. Für diese Methode ist es von essentieller Bedeutung, dass alle Proben zum gleichen Zeitpunkt aufgearbeitet werden. Zum Erlangen einer Zeitkinetik ist es daher dringend erforderlich, die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu behandeln.

Es wurden 1×10^6 Zellen in einer 6 cm Kulturschale ausgesät. Die Proben mit und ohne Interferon wurden 4 h, 2 h, 1 h, 30 min und die Kontrollen direkt vor der Aufarbeitung in den Schalen bestrahlt. Für die Kontrollen war es zwingend notwendig, die Bestrahlung auf Eis durchzuführen, um vorzeitige Reparaturvorgänge zu unterbinden.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl bestimmt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in der entsprechenden Menge eiskaltem PBS aufgenommen, um eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml zu erhalten. 10 µl dieser

Material und Methoden

Zellsuspension wurden mit 120 µl LMP-Agarose (0,5 % in *A.bidest*, 37°C) gemischt und auf einen mit Agarose (1,5 % in PBS, über Nacht getrocknet) beschichteten Objektträger aufgebracht. Um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, wurde direkt im Anschluss ein Deckglas (24x 60 mm) darüber gelegt. Zum Erstarren der Agarose wurden die Objektträger für 5 min bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das Deckglas entfernt und die Proben für mindestens eine Stunde im vorgekühlten Lysepuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Na-Laurylsarcosinat, pH 7,5 direkt vor Gebrauch 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO zugeben) bei 4°C inkubiert. Es ist wichtig, die Inkubationszeit einmal zu definieren und dann für die folgenden Versuche beizubehalten. Nach der Lyse wurden die Präparate aus dem Puffer genommen, in die Elektrophoresekammer gelegt und mit kaltem Elektrophoresepuffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH im neutralen Bereich) überschichtet. Nach 15-minütiger Elektrophorese (25 V, 4°C) wurden die Objektträger aus der Kammer geholt, kurz mit dH₂O gespült und für 5 min in 100 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Präparate über Nacht getrocknet. Vor der Auswertung wurde die DNA mit 50 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) angefärbt und ein Deckglas (24x 60 mm) aufgebracht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit einer CCD-Kamera und der Software Kinetic Imaging Komet 4.0.2. (BFI-Optilas, Puchheim). Pro Präparat wurden 50 Zellen ausgewertet, indem das „*Olive-Tail-Moment*“ (OTM) bestimmt wurde. Das OTM ist als das Produkt der DNA-Menge im Komet-Schweif (%) und der Distanz zwischen dem Zentrum der Masse vom Komet-Kopf (Zellkern) und dem Ende des Komet-Schweifs definiert (Olive et al. 1991).

2.2.21 Das linearquadratische Modell

Die Zellüberlebenskurven nach Bestrahlung können durch das linearquadratische Modell mit Hilfe folgender Gleichung beschrieben werden: $-\ln S = \alpha D + \beta D^2$ (Technical basis of radiation therapy, Daniel Arthur Peter and Seymour H. Levitt, Springer Verlag, S. 6-10). Hierbei ist S das Überleben der Zellen bei einer bestimmten Dosis D. Bei α und β handelt es sich um zellspezifische Konstanten. Bei einer semi-logarithmischen Darstellung beschreibt die α -Komponente den linearen Anteil der zusammengesetzten Überlebenskurve, während die β -Komponente den quadratischen Anteil beschreibt. Letale Ereignisse an der DNA tragen zur α -Komponente bei, während subletale Ereignisse, welche in ihrer Summation zum Zelltod führen, zur β -Komponente beitragen. Vereinfacht ausgedrückt beschreibt die α -Komponente den nicht reparierbaren Strahlenschaden, während die β -Komponente den reparierbaren Anteil beschreibt.

2.2.22 Arbeiten mit peripheren Blutzellen

2.2.22.1 Aufreinigung von Lymphozyten

Die Isolation humaner mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) des peripheren Blutes (PBMCs, „peripheral blood mononuclear cells“) erfolgte aus „Buffy Coat“ Präparationen, welche bei der Aufarbeitung von Blutkonserven anfallen. Die verwendeten „Buffy Coats“ wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsklinik Mainz bezogen. Hierbei lassen sich die PBMCs aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von den anderen Blutbestandteilen durch Dichtezentrifugation mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten separieren. Hierfür wurde in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß 10 ml Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Biochrom, Belgien) vorgelegt und vorsichtig mit 20 ml „Buffy

Material und Methoden

Coat“ Blut beschichtet. Zellen mit einer Dichte über 1,077 g/ml, wie z.B. Erythrocyten und Granulozyten, befinden sich nach der Zentrifugation (30 min, 1200 Upm, RT, ohne Bremse) unterhalb der Ficoll-Schicht, während PBMCs und Thrombocyten als Interphase auf der Ficoll-Schicht aufliegen. Die Interphase wird abgenommen und die Thrombozyten durch mehrmaliges Waschen mit PBS und anschließender Zentrifugation (5 min, 1500 Upm, 4 °C) entfernt. Um die Lymphozyten von den Monozyten zu trennen macht man sich die Adhärenzfähigkeit der Monozyten zunutze. Hierfür werden die aufgereinigten PBMCs über Nacht in einer Kulturflasche kultiviert (37 °C, 7 % CO²). Das Medium, welches die aufgereinigten Lymphozyten enthält, wird in eine neue Kulturflasche überführt.

2.2.22.2 Herstellung des Lymphozytenmediums (500 ml)

Hierbei handelt es sich um RPMI 1640 Medium, dem 3 mg/l L-Glutamin, 110 mg/l Natrium Pyruvat, 2 ml Penicillin/Streptomycin und 15 % FCS zugesetzt wurden. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert, 1 g Natriumbicarbonat und 1,75 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt.

2.2.22.3 Bestimmung der Lymphozytenanzahl durch Trypan-Blau-Färbung

Zur Ermittlung der Vitalität und Anzahl von Suspensionszellen nach einer Isolierung aus dem Blut wurden diese mit 1 Volumen Trypan-Blau (0,04 %) versetzt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind unter dem Mikroskop an ihrer Blaufärbung erkennbar.

2.2.22.4 Stimulation der Lymphozyten mit CD3 / CD28 Antikörpern

Isolierte Lymphozyten proliferieren nicht und sind in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Durch eine Stimulation ihrer spezifischen Oberflächenmarker CD3 und CD28 mit den entsprechenden Antikörpern (α-CD3 bzw. α-CD28) beginnen sie zu proliferieren. Hierfür wurde jedes Loch einer 24-Lochplatte mit 200 µl / well Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃, 0,1 M) und jeweils 4 µl α-CD3 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Puffer entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Zu einem Milliliter der Lymphozyten (0,5x 10⁶ Zellen) wurden 2 µl α-CD28 hinzugefügt und über Nacht bei 37 ° inkubiert. Die Kontrolle der Proliferation erfolgt am Durchflusszytometer.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der radio- und chemosensibilisierenden Eigenschaften von Typ-I Interferonen in Pankreaskarzinom-Zelllinien

3.1.1 Radiosensibilisierung von Pankreaskarzinom-Zelllinien durch Typ-I Interferone

Die adjuvante Therapie des Pankreaskarzinoms besteht aus Chemotherapie, Bestrahlung oder einer Kombination aus beidem. Die Ansprechrate der Tumore auf diese Therapien ist jedoch gering. Eine Kombination aus Chemotherapie, Bestrahlung und Interferonen (IFNs) erhöht die Ansprechrate der Tumore und steigert die Fünf-Jahres-Überlebensrate (Picozzi et al. 2003). In den folgenden Abschnitten wird in zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien der Einfluss von IFN auf Bestrahlung (IR) bzw. auf eine Behandlung mit Temozolomid (TMZ) dargestellt. Bei den zehn Zelllinien handelt es sich um Panc-1, Su8686, Capan-2, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902, welche aus einem Primärtumor des Pankreas isoliert wurden und Capan-1, Aspc-1 und HS 766T, welche von verschiedenen Metastasen, hervorgegangen aus einem Pankreas-Tumor, isoliert wurden. Von den zehn Zelllinien ist Capan-2 die einzige p53-Wildtyp Zelllinie und Capan-1 die einzige Zelllinie mit einem bekannten Defekt in der homologen Rekombination (HR) (BRCA2 defizient).

3.1.1.1 Intrinsische Radiosensitivität der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die verwendeten zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer intrinsischen Radiosensitivität untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit Dosen von 0, 2, 4, 6 oder 8 Gy bestrahlt und mittels eines Kolonie-Bildungstest das Zellüberleben bestimmt (Abb.3-1). Die Kurven wurden semi-logarithmisch dargestellt und hinsichtlich der unbestrahlten Kontrollen korrigiert. Von den zehn getesteten Zelllinien zeigte Su8686 nach Bestrahlung die geringste Abnahme der Überlebensfraktion, während die Zelllinien PA-TU 8902 und Capan-1 am sensitivsten auf Bestrahlung reagierten.

Ergebnisse

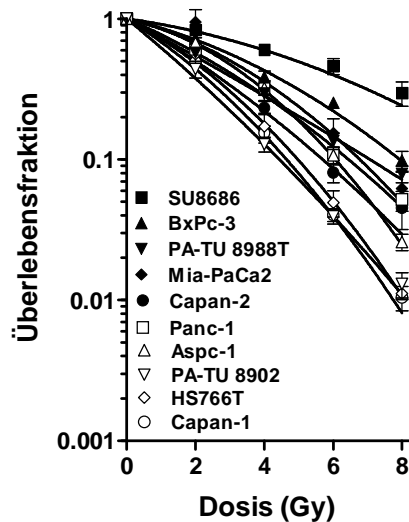


Abb. 3-1: Bestimmung der intrinsischen Radiosensitivität der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die verwendeten zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden einmalig mit den angegebenen Dosen bestrahlt. Über einen Kolonie-Bildungstest wurde das Überleben der Zellen nach Bestrahlung bestimmt. Die Überlebenskurven wurden semi-logarithmisch aufgetragen und das zelluläre Überleben als relativer Anteil der unbestrahlten Kontrolle dargestellt. Die Kurven repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

Um die verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Radiosensitivität besser miteinander vergleichen zu können, wurden verschiedene Charakteristika der Überlebenskurven berechnet: Die Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF2), die mittlere Inaktivierungsdosis (MID) als Fläche unter der Kurve, sowie die zwei zellspezifischen Konstanten α und β , welche über Anwendung des linear-quadratischen Modells berechnet werden konnten. Die vier Parameter sind für alle zehn Zelllinien in Tab. 3-1 zusammengefasst. Durch eine Berechnung der SF2 konnte Su8686 als die resistenteste Zelllinie bestätigt werden. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy lag die Überlebensfraktion bei 81 % (SF2 = 0,81). In den beiden sensitivsten Zelllinien PA-TU 8902 und Capan-1 führte eine Bestrahlung mit 2 Gy zu einer Abnahme des Überlebens auf 38 % bzw. 44 %. Die übrigen Zelllinien zeigten eine durchschnittliche Radiosensitivität mit Werten für SF2 von 0,5 – 0,7. Die mittlere Inaktivierungsdosis (MID) lag für Su8686 bei 5,1 Gy, für die sensitiven Zelllinien PA-TU 8902 und Capan-1 bei 2,2 Gy bzw. 2,4 Gy. Für die übrigen Zelllinien lagen die Werte für die MID zwischen 2,6 Gy und 4,0 Gy.

Eine Überlebenskurve setzt sich aus einem quadratischem und einem linearen Teil zusammen. Die zellspezifische Konstante α beschreibt die Steigung, also den linearen Teil der zusammengesetzten Überlebenskurve, hervorgerufen durch einzelne letale Ereignisse an der DNA. Die β -Komponente beschreibt die Schulter, also den quadratischen Anteil, der Überlebenskurve, hervorgerufen durch subletale Ereignisse an der DNA, welche in ihrer Summierung zum Zelltod führen. Die α -Komponente für die resistenteste Zelllinie Su8686 war mit $0,079 \text{ Gy}^{-1}$ am niedrigsten, was die geringste Abnahme der Überlebensfraktion widerspiegelt. Für die sensitivsten Zelllinien PA-TU 8902 und Capan-1 war der Wert für α mit $0,46 \text{ Gy}^{-1}$ bzw. $0,35 \text{ Gy}^{-1}$ am höchsten, was den steilsten Abfall des

Ergebnisse

Zellüberlebens widerspiegelt. Für die β -Komponente konnte kein einheitlicher Trend beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien eine hohe Variabilität in ihrer intrinsischen Radiosensitivität zeigen. Eine erhöhte Sensitivität kann mit einer Zunahme der α -Komponente in Verbindung gebracht werden.

Tabelle 3-1: Charakteristika der Überlebenskurven der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung.

Für die in Abb. 3-1 dargestellten Überlebenskurven wurden verschiedene Charakteristika berechnet. SF2 beschreibt die überlebende Fraktion bei 2 Gy und die MID die allgemeine Radiosensitivität als Fläche unter der Kurve. Unter Anwendung des linearquadratischen Modells konnten die zellspezifischen Konstanten α und β errechnet werden. Die α -Komponente beschreibt den linearen Teil der zusammengesetzten Überlebenskurve, hervorgerufen durch einzelne letale Ereignisse an der DNA. Die β -Komponente beschreibt den quadratischen Anteil, hervorgerufen durch subletale Ereignisse an der DNA, welche in ihrer Summation zum Zelltod führen.

Zelllinie	SF2	MID	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
Su8686	0.81	5.1	0.079 ± 0.040	0.0012 ± 0.0060
BxPc-3	0.71	3.8	0.13 ± 0.031	0.020 ± 0.0046
PA-TU 8988T	0.54	3.1	0.30 ± 0.034	0.0032 ± 0.0050
Mia PaCa-2	0.67	4.0	0.14 ± 0.092	0.030 ± 0.013
Capan-2	0.50	2.9	0.32 ± 0.058	0.016 ± 0.0086
Panc-1	0.58	3.1	0.24 ± 0.028	0.018 ± 0.0072
Aspc-1	0.66	3.2	0.12 ± 0.036	0.043 ± 0.0052
PA-TU 8902	0.38	2.2	0.46 ± 0.056	0.013 ± 0.0082
HS 766T	0.49	2.6	0.29 ± 0.053	0.034 ± 0.0077
Capan-1	0.44	2.4	0.35 ± 0.046	0.032 ± 0.0068

3.1.1.2 Zytotoxische Wirkung von Typ-I Interferonen auf zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die zehn verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder IFN- β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel. Die Kontrollen erhielten kein Interferon. Mit Hilfe eines Kolonie-Bildungstests wurde die Zytotoxizität der Behandlung bestimmt. Das zelluläre Überleben wurde als relativer Anteil der unbehandelten Kontrollen aufgeführt und in Abb. 3-2 graphisch dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse ist wie folgt definiert: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005. Acht der zehn Zelllinien (Su8686, Capan-1, Capan-2, Bxpc-3, Aspc-1, HS 766T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902) reagierten sensitiv auf eine Behandlung mit IFN- β , was sich in einer signifikanten Verringerung des Zellüberlebens zeigte. Hingegen zeigten nur fünf der zehn

Ergebnisse

Zelllinien (Su8686, Capan-1, Bxpc-3, Aspc-1 und HS 766T) ein signifikant verringertes Überleben durch eine Inkubation mit IFN- α . Zwei der zehn Zelllinien (Panc-1 und PA-TU 8988T) reagierten weder auf eine Inkubation mit IFN- α noch mit IFN- β . Capan-1 zeigte eine überdurchschnittlich hohe Sensitivität sowohl gegenüber IFN- α als auch gegenüber IFN- β . Durch eine Inkubation mit IFN- α sank das zelluläre Überleben auf 24 %, durch eine Inkubation mit IFN- β auf 11 %. Alle anderen Zelllinien zeigten eine moderate Sensitivität gegenüber den beiden IFNs. Die Überlebensrate nach Inkubation mit IFN- α schwankte zwischen 45 % für Bxpc-3 und 80 % für Aspc-1. Eine Inkubation mit IFN- β verringerte das Überleben auf 47 % für Su8686 und auf 75 % für PA-TU 8902.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die zehn verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien deutlich in ihrer Sensitivität gegenüber IFN unterscheiden. IFN- β hatte auf einen größeren Teil der Pankreaskarzinom-Zelllinien eine zytotoxische Wirkung als IFN- α .

Ergebnisse

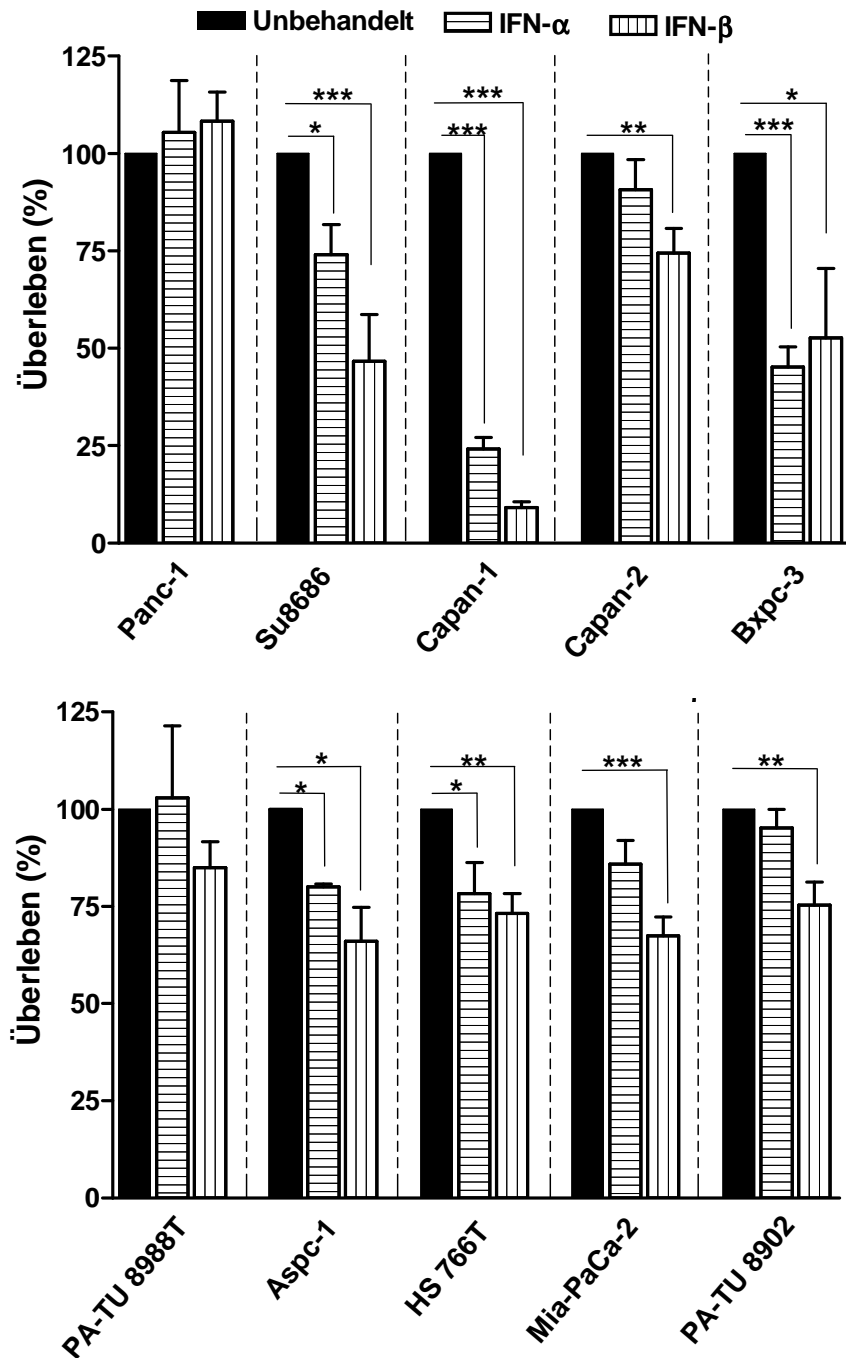


Abb. 3-2: Wirkung von Interferon- α und Interferon- β auf das Überleben der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die zehn Zelllinien wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder IFN- β inkubiert. Danach erfolgte ein Medienwechsel. Durch einen Kolonie-Bildungstest wurde die Toxizität der IFN-Behandlung bestimmt. Das zelluläre Überleben wurde als relativer Anteil der unbehandelten Kontrollen dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse ist durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ definiert. Die Diagramme repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

3.1.1.3 Kombinationswirkung von Typ-I Interferonen und ionisierender Strahlung auf Pankreaskarzinom-Zelllinien

Um den Einfluss von Typ-I IFNs auf die Strahlensensitivität der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden diese für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder IFN- β inkubiert. Als Referenz dienten ausschließlich bestrahlte Proben, ausschließlich mit IFN- β behandelte Proben bzw. unbehandelte Kontrollen. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 2 Gy (Capan-1, Capan-2, HS 766T, PA-TU 8902) oder 4 Gy (Panc-1, Su8686, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Aspc-1 und Mia-PaCa-2) bestrahlt. Die Intensität der Bestrahlung richtete sich nach der intrinsischen Radiosensitivität der jeweiligen Zelllinien. Über einen Kolonie-Bildungstest wurde die Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit IR bestimmt. Das zelluläre Überleben nach Bestrahlung wurde als relativer Anteil der unbehandelten Kontrollen dargestellt. Für die Kombinationsbehandlung wurden die Werte zusätzlich gegenüber der alleinigen IFN-Zytotoxizität korrigiert. Demnach beschreiben die Werte der Kombinationsbehandlungen nur den zusätzlichen Effekt der IFNs auf Bestrahlung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ definiert. Wie in Abb. 3-3 dargestellt, hatte eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β in drei der zehn Zelllinien (Su8686, Capan-2 und Bxpc-3) einen radiosensibilisierenden Effekt und verringerte das Überleben der Zellen um ca. 50 % im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Proben. In einer der zehn Zelllinien, der BRCA2 defizienten Zelllinien Capan-1, hatte eine Vorbehandlung mit IFN- β einen schützenden Effekt auf das Überleben der Zellen nach Bestrahlung. Es führte zu einem Anstieg der Überlebensrate um ca. 20 %. Eine Vorinkubation mit IFN- α zeigte nur in zwei Zelllinien (Su8686 und Capan-2) einen sensibilisierenden Einfluss auf Bestrahlung. IFN- α verringerte das Überleben um ca. 50 % im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Proben. In zwei Zelllinien (Panc-1 und Aspc-1) erhöhte eine Vorbehandlung mit IFN- α das Überleben nach Bestrahlung um ca. 15 %.

Zusammenfassend wirkten die IFNs nur in einem sehr geringen Teil der Pankreaskarzinom-Zelllinien als Radiosensibilisator. IFN- β zeigte im Vergleich zu IFN- α in mehr Zelllinien einen sensibilisierenden Effekt und in weniger Zelllinien einen schützenden. In Pankreaskarzinom-Zelllinien ist somit IFN- β ein potenterer Radiosensibilisator als IFN- α .

Ergebnisse

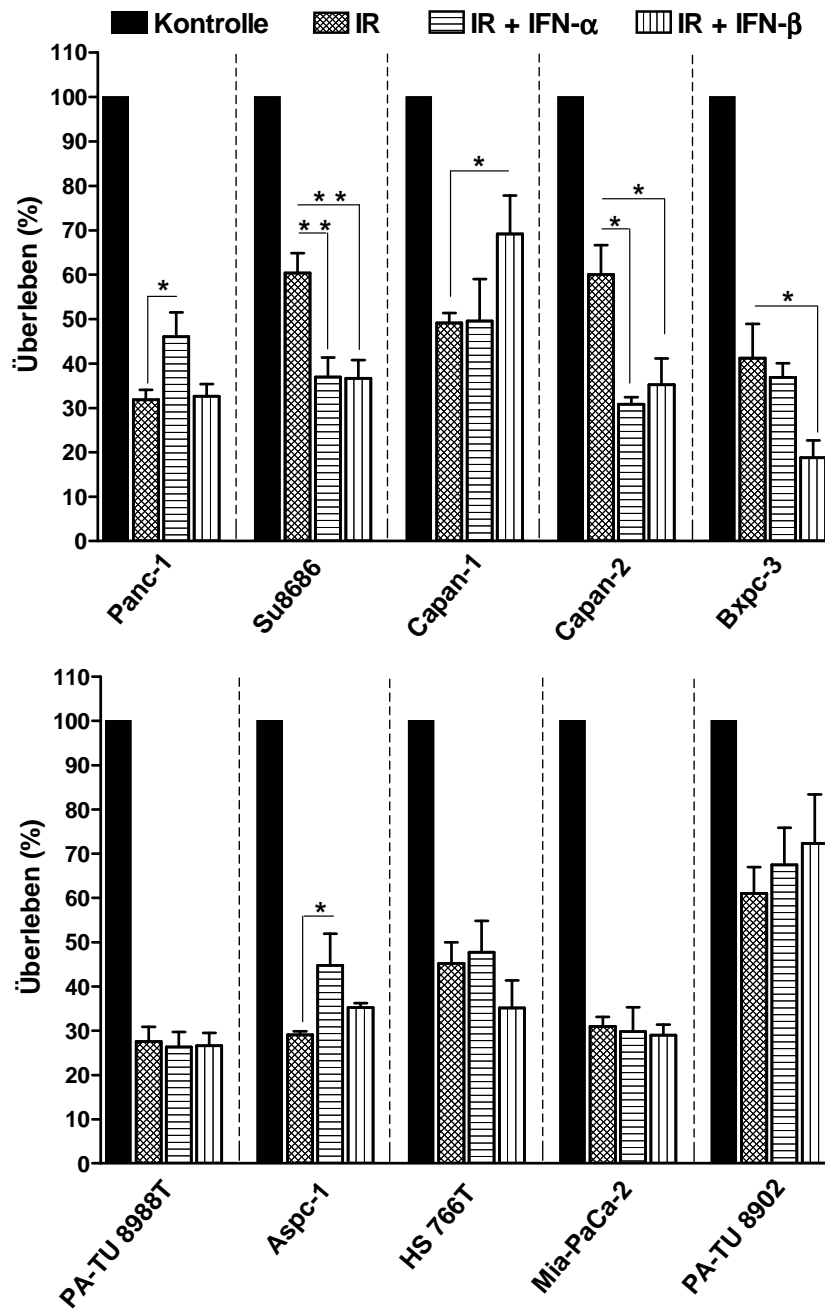


Abb. 3-3: Kombinationswirkung von Typ-I Interferonen und Bestrahlung auf das zelluläre Überleben der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien

Zur Bestimmung des Einflusses von IFN- α und - β auf Bestrahlung wurden die zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder IFN- β behandelt und nach einem Medienwechsel mit Einzeldosen von 2 Gy (für die Zelllinien Capan-1, Capan-2, HS 766T, PA-TU 8902) bzw. 4 Gy (für die Zelllinien Panc-1, Su8686, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Aspc-1 und Mia-PaCa-2) bestrahlt. Die Sensitivität wurde über einen Kolonie-Bildungstest ermittelt. Die Werte wurden als relativer Anteil der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN- α oder IFN- β behandelten Kontrollen dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse ist durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ definiert. Die Diagramme repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

3.1.2 Untersuchung zellulärer Mechanismen, welche eine Bedeutung für den radiosensibilisierenden Effekt der Interferone in Pankreaskarzinom-Zelllinien haben könnten

Für weiterführende Versuche wurden vier Zelllinien ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer Radiosensitivität, Interferonantwort und einer Kombinationsbehandlung aus IR und IFN unterschieden. Der p53-Status wurde bei der Auswahl ebenfalls berücksichtigt. Die entsprechenden Daten sind in der Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Ergebnisse für Radiosensitivität, Interferonantwort und deren Kombinationswirkung unter Berücksichtigung des p53-Status der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien
Die vier Zelllinien, welche für die folgenden Versuche verwendet wurden, sind hervorgehoben.

Zelllinie	Intrinsische Radio-sensitivität	Zytotoxische Reaktion auf		Kombinationseffekt				p53-Status
				sensibilisierend		schützend		
		IFN- α	IFN- β	IFN- α	IFN- β	IFN- α	IFN- β	
Panc-1	moderat	–	--	--	--	ja	--	p53 mut
Su8686	niedrig	ja	ja	ja	ja	--	--	p53 mut
Capan-1	sehr hoch	ja	ja	--	--	--	ja	p53 mut
Capan-2	moderat	–	ja	ja	ja	--	--	p53 wt
Bxpc-3	moderat	ja	ja	--	ja	--	--	p53 mut
PA-TU 8988T	moderat	–	--	--	--	--	--	p53 mut
Aspc-1	moderat	ja	ja	--	--	ja	--	p53 mut
HS 766T	moderat	ja	ja	--	--	--	--	p53 mut
Mia-PaCa-2	moderat	–	ja	--	--	--	--	p53 mut
PA-TU 9802	sehr hoch	–	ja	--	--	--	--	p53 mut

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die vier Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 verwendet. Die Zelllinie Panc-1 diente in den folgenden Experimenten als negativ-Kontrolle, da sie durch keines der beiden IFNs ein vermindertes Überleben oder eine Radiosensibilisierung zeigte. Su8686 reagierte auf beide IFNs sensitiv und konnte durch beide IFNs gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden. Capan-1 zeigte die stärkste toxische Antwort auf IFN-Behandlung, aber keinen IFN bedingten radiosensibilisierenden Effekt. Diese Zelllinie wurde in erster Linie wegen ihrer BRCA2 Defizienz und der daraus resultierenden Beeinflussung der HR ausgewählt. Capan-2 reagierte nur auf eine Behandlung mit IFN- β sensitiv, konnte aber durch beide IFNs gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Zelllinie war ihr p53-Status.

Ergebnisse

Capan-2 ist die einzige der zehn Zelllinien mit einem wildtypischen p53 Protein. Da mit IFN- β deutlichere Effekte zu beobachten waren, wurde für die folgenden Versuche ausschließlich IFN- β verwendet und dessen Einfluss auf das Überleben der Zellen genauer untersucht. Um eine Ursache für den radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β zu finden, wurde sein Einfluss auf den Zellzyklus, auf die Bildung der durch Bestrahlung induzierten DSBs und deren Reparatur sowie der Einfluss auf die Apoptoserate nach Bestrahlung genauer betrachtet.

3.1.2.1 Einfluss von Interferon- β auf die Überlebenskurven der vier ausgewählten Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung

Um die Kombinationswirkung von IFN- β und Bestrahlung in den vier ausgewählten Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 genauer zu untersuchen, wurden mit Hilfe des Kolonie-Bildungstests Überlebenskurven erstellt. Hierfür wurden die Zelllinien für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und nach einem Medienwechsel mit Dosen zwischen 0 Gy und 8 Gy bestrahlt. Als Referenz dienten ausschließlich bestrahlte Proben. Unter Anwendung des linear-quadratischen Modells wurden Überlebenskurven erstellt und in Abb. 3-4 graphisch dargestellt. Das zelluläre Überleben nach Bestrahlung wurde hinsichtlich der unbehandelten Kontrollen korrigiert. Für die Kombinationsbehandlung wurden die Werte zusätzlich gegenüber der alleinigen IFN-Zytotoxizität korrigiert. In den Zelllinien Su8686 und Capan-2 führte eine Kombination aus IR und IFN- β zu einer Abnahme des Zellüberlebens im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Proben. Das bedeutet, durch eine Vorbehandlung mit IFN- β können diese beiden Zelllinien gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie Panc-1, welche nicht auf IFN- β reagierte, durch eine IFN- β Vorinkubation auch keinen sensibilisierenden Effekt auf Bestrahlung. Auch die BRCA2 defiziente Zelllinie Capan-1 zeigte keinen radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β , obwohl sie hoch sensitiv auf IFN- β reagierte. Wie unter 3.1.1.3 beschrieben, zeigte in der Zelllinie Capan-1 eine Vorinkubation mit IFN- β einen schützenden Effekt auf das Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy. Bei Betrachtung des gesamten Dosisbereichs konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden.

Ergebnisse

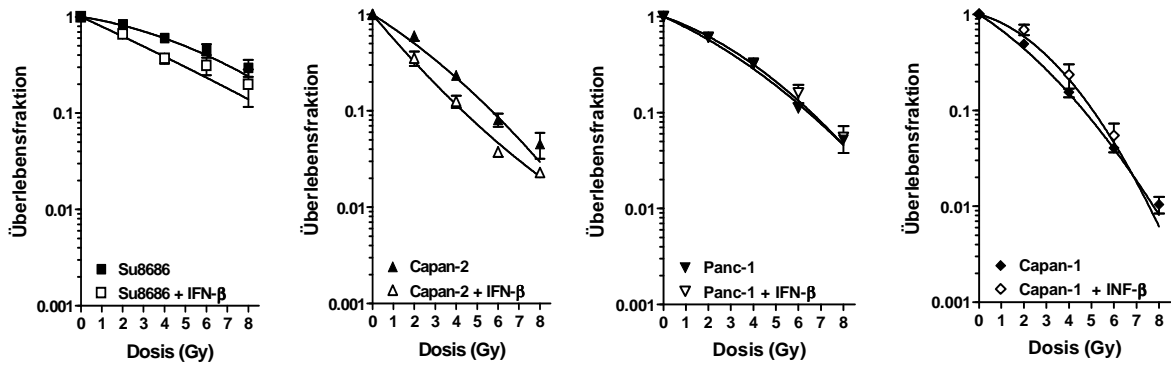


Abb. 3-4: Überlebenskurven der vier Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorinkubation

Die Proben, welche einer Kombinationsbehandlung ausgesetzt wurden, wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und nach einem Medienwechsel mit Einzeldosen von 0 – 8 Gy bestrahlt. Als Referenzwert dienten ausschließlich bestrahlte Proben. Die Kurven wurden semi-logarithmisch aufgetragen und für die Kombinationsbehandlung hinsichtlich der alleinigen IFN-Toxizität korrigiert. Die Diagramme repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

Um den radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β genauer beschreiben zu können, wurden die Parameter SF2, MID und die zellspezifischen Konstanten α und β (siehe 3.1.1.1) errechnet und in Tab. 3-3 zusammengefasst. Die Zellen wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste besteht aus Su8686 und Capan-2, welche durch IFN- β gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden konnten. Die zweite besteht aus Panc-1 und Capan-2, welche den sensibilisierenden Effekt von IFN- β auf Bestrahlung nicht zeigten. Su8686- und Capan-2-Zellen zeigten durch Kombinationsbehandlung von ionisierender Strahlung und IFN- β eine Abnahme der SF2 und der MID im Vergleich zu ausschließlich bestrahlten Zellen. Beide Zelllinien zeigten ebenfalls eine durch Kombination von IR mit IFN- β verursachte Zunahme der α -Komponente. In den Zelllinien Panc-1 und Capan-1 kam es durch Kombination von IFN- β mit Bestrahlung zu einer Zunahme der SF2 und der MID im Vergleich zu ausschließlich bestrahlten Zellen. Die α -Komponente nahm in beiden Zelllinien durch zusätzliche Behandlung mit IFN- β ab. Für die β -Komponente konnte kein Zusammenhang zwischen einer Zu- oder Abnahme und einem sensibilisierenden Effekt beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte ein sensibilisierender Effekt von IFN- β auf IR mit einer Abnahme von SF2 und MID und einer Zunahme der α -Komponente der Überlebenskurven in Verbindung gebracht werden.

Ergebnisse

Tabelle 3-3: Charakteristika der Überlebenskurven der vier Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung

Für die in Abb. 3-4 gezeigten Überlebenskurven wurden verschiedene Charakteristika errechnet. **A** SF2 beschreibt die überlebende Fraktion bei 2 Gy und MID die allgemeine Radiosensitivität als Fläche unter der Kurve. **B** Unter Anwendung des linearquadratischen Modells konnten die zellspezifischen Konstanten α und β errechnet werden. Die α -Komponente beschreibt den linearen Teil der zusammengesetzten Überlebenskurve, hervorgerufen durch einzelne letale Ereignisse an der DNA. Die β -Komponente beschreibt den quadratischen Anteil, hervorgerufen durch subletale Ereignisse an der DNA, welche in ihrer Summation zum Zelltod führen. Alle Werte wurden sowohl für die ausschließlich bestrahlten Proben als auch für die mit 24-stündiger Vorbehandlung mit 300 I.E./ml IFN- β berechnet.

A

	SF2		MID	
	IR	IR + IFN- β	IR	IR + IFN- β
Su8686	0,81	0,63	5,1	3,9
Capan-2	0,50	0,32	2,9	2,1
Panc-1	0,57	0,62	3,2	3,3
Capan-1	0,44	0,59	2,4	3,0

B

	α (Gy ⁻¹)		β (Gy ⁻²)	
	IR	IR + IFN- β	IR	IR + IFN- β
Su8686	0,079 ± 0,040	0,23 ± 0,065	0,0012 ± 0,0060	0,0020 ± 0,0098
Capan-2	0,32 ± 0,058	0,59 ± 0,053	0,016 ± 0,0086	-0,014 ± 0,0085
Panc-1	0,24 ± 0,028	0,19 ± 0,048	0,018 ± 0,0072	0,025 ± 0,0072
Capan-1	0,35 ± 0,046	0,14 ± 0,13	0,032 ± 0,0068	0,062 ± 0,027

3.1.2.2 Typ-I Interferon Rezeptor Status der Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Panc-1, Capan-1 und Capan-2

IFNs wirken auf ihre Zielzellen durch Bindung an einen spezifischen IFN-Rezeptor, wodurch der JAK/STAT-Signalweg aktiviert wird. Um zu untersuchen, ob die vier Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 den IFN-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die Kontrollen erhielten kein IFN- β . Anschließend wurden von allen Ansätzen Membranextrakte hergestellt. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen die Untereinheit IFNAR2 des IFN-Rezeptors konnte dessen Expression nachgewiesen werden. Abb. 3-5 zeigt, dass alle vier getesteten Pankreaskarzinom-Zelllinien diese Untereinheit des IFN-Rezeptors exprimierten. Die geringste Expression zeigte die Zelllinie Su8686, die stärkste die Zelllinie Capan-1.

Ergebnisse

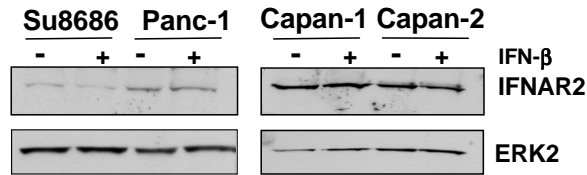


Abb.3-5: Expression des Interferon-Rezeptors in den Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Panc-1, Capan-1 und Capan-2

Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und anschließend zu Membranextrakten aufbereitet. Die Kontrollen erhielten kein IFN- β . Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 μ g Protein eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen die IFNAR2 Untereinheit des IFN-Rezeptors inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.1.2.3 Einfluss von Interferon- β auf den Zellzyklus

IFNs sind in der Lage, Krebszellen in ihrer Proliferation zu inhibieren und sie entweder in der G1-Phase (Subramaniam and Johnson 1997), der S-Phase (Qin et al. 1997) oder der G2/M-Phase (Chang and Keng 1987) zu arretieren. In den folgenden Abschnitten wurde der Einfluss von IFN- β auf die Proliferation der Zellen mittels BrdU-Einbau und der Einfluss von IFN- β auf die einzelnen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Des weiteren wurde auch der Einfluss von IFN- β auf die Expression der Zellzyklus-regulierenden Gene p15, p21 und p27 untersucht.

3.1.2.3.1 Einfluss von Interferon- β auf die Proliferation der Pankreaskarzinom-Zelllinien

Um den Einfluss von IFN- β auf die Proliferation der verwendeten Zelllinien zu bestimmen, wurde der BrdU-Einbau in An- und Abwesenheit von IFN- β gemessen. Das Thymidinanalogon BrdU wird in der S-Phase während der Replikation in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die Menge des eingebauten BrdUs spiegelt somit den Anteil proliferierender Zellen in einer Population wider. Für dieses Experiment wurden die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 für 24 bzw. 48 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen erhielten kein IFN- β . Nach Zugabe von BrdU für weitere drei Stunden wurde dessen Gehalt in der DNA der Zellen gemessen. In Abb. 3-6 zeigten die zwei Zelllinien Su8686 und Capan-2 durch Behandlung mit IFN- β eine verringerte BrdU-Einlagerung im Vergleich zu den Kontrollen. Aber auch die Zelllinie Panc-1, welche sich im Kolonie-Bildungstest als resistent gegenüber IFN- β herausstellte, zeigte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine deutliche Abnahme des BrdU-Gehalts. Die Zelllinie Capan-1, welche nach 24-stündiger Inkubation mit IFN- β im Kolonie-

Ergebnisse

Bildungstest am sensitivsten reagierte, zeigte nach 24 h noch keine Abnahme des BrdU-Gehalts. Eine Reduktion konnte erst nach 48-stündiger Inkubation beobachtet werden. Somit konnte in den vier untersuchten Zelllinien eine Hemmung der Proliferation durch 24-stündige bzw. 48-stündige IFN- β Behandlung beobachtet werden. Dies konnte jedoch weder mit dem toxischen Effekt des IFN noch mit seinem radiosensibilisierenden Effekt in Verbindung gebracht werden.

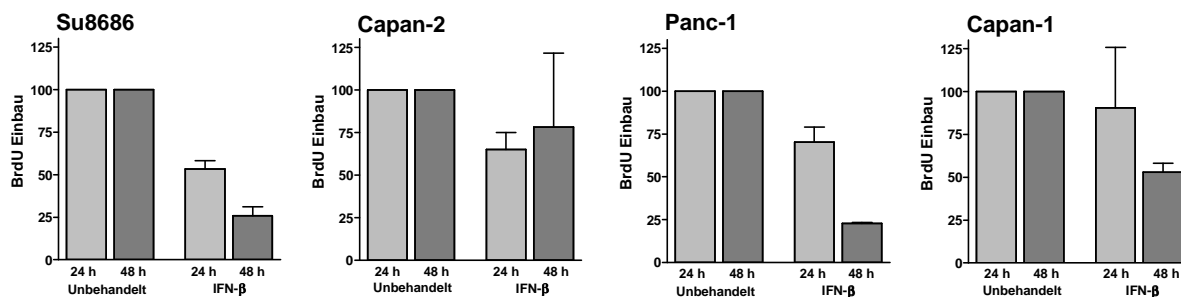


Abb. 3-6: Bestimmung des BrdU-Gehalts der Pankreaskarzinom-Zelllinien nach 24- bzw. 48-stündiger Interferon- β Behandlung

Die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 wurden für 24 bzw. 48 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die unbehandelten Kontrollen erhielten kein IFN- β . Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit BrdU-Lösung inkubiert. BrdU positive und somit proliferierende Zellen konnten durch einen Farbumschlag photometrisch nachgewiesen werden.

3.1.2.3.2 Einfluss von Interferon- β auf die verschiedenen Zellzyklusphasen

Um den Einfluss von IFN- β auf den Zellzyklus genauer zu betrachten, wurden die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert und im Anschluss die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Kontrollen erhielten kein IFN- β . Wie in Abb. 3-7 gezeigt, konnte in den Zelllinien Su8686 und Capan-1 eine Zunahme von S-Phase-Zellen durch IFN- β beobachtet werden. Die Zelllinie Capan-2 zeigte eine leichte Abnahme der S-Phase-Zellen durch IFN- β , dafür eine schwache Zunahme der G2-Phase-Zellen. In der Zelllinie Panc-1, welche nicht sensitiv auf IFN- β reagierte, hatte die IFN- β Behandlung keinen Einfluss auf die einzelnen Zellzyklusphasen.

Zusammenfassend konnte kein eindeutiger Einfluss von IFN- β auf eine bestimmte Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden. Auch der sensibilisierende oder protektive Effekt von IFN- β lässt sich nicht mit einem Arrest der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus in Verbindung bringen. Die beiden Zelllinien, in denen IFN- β als Radio-Sensibilisator wirkte, zeigten eine gegensätzliche Zellzyklusverteilung nach einer IFN- β -Inkubation.

Ergebnisse

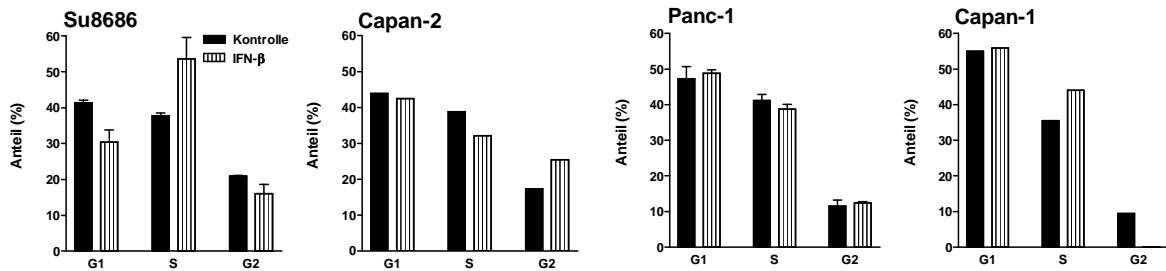


Abb. 3-7: Zellzyklusverteilung der Pankreaskarzinom-Zelllinien nach 24-stündiger Interferon- β Inkubation

Die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die Kontrollen erhielten kein IFN- β . Durch die anschließende Zellzyklus-Bestimmung am Durchflusszytometer konnten die einzelnen Zellzyklusphasen unterschieden werden und so der Einfluss von IFN- β auf die Zellzyklusverteilung bestimmt werden.

3.1.2.3.3 Einfluss von Interferon- β auf die Expression Zellzyklus-regulierender Gene

Die bisherigen Versuche zeigten, dass eine 24-stündige IFN- β Behandlung zu einem verminderten BrdU-Einbau führte. Zudem sind IFNs in der Lage über den Jak/STAT Signalweg die Genexpression in ihren Zielzellen zu beeinflussen, unter anderem p15, p21 und p27 (Mandal et al. 1998; Schmidt et al. 2004). Daher wurde die Expression der Zellzyklus-regulierenden Gene p15, p21 und p27 nach IFN- β Behandlung untersucht. p15, p21 und p27 gehören zu der Familie der Cyclin-abhängigen-Kinase Inhibitoren und sind an der Kontrolle des Übergangs von der G1 in die S-Phase beteiligt. Um den Einfluss von IFN- β auf das Proteinniveau zu untersuchen, wurden die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurden die unbehandelten Zellen und die Zellen für den 24 h Wert geerntet. Bei den Ansätzen für die späteren Werte wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Wie in Abb. 3-8 A zu sehen ist, hatte IFN- β zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf das p15, p21 oder p27 Proteinniveau in den Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 oder Capan-2. Um den Einfluss von IFN- β auf das p15 bzw. p27 mRNA-Niveau zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach dieser 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen entweder geerntet (24 h Wert) oder nach einem Medienwechsel weitere 24 h kultiviert und dann geerntet (48 h Wert). Die unbehandelten Zellen wurden zum selben Zeitpunkt wie der 24 h Wert geerntet. Nach anschließender mRNA Isolation und cDNA-Synthese wurden PCRs mit spezifischen Primern für p15 und p27 durchgeführt. In keiner Zelllinie hatte eine 24-stündige Behandlung mit IFN- β einen Effekt auf das mRNA-Niveau der untersuchten Gene (Abb. 3-8 B).

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige IFN- β Behandlung keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Zellzyklus-regulierenden Gene hat.

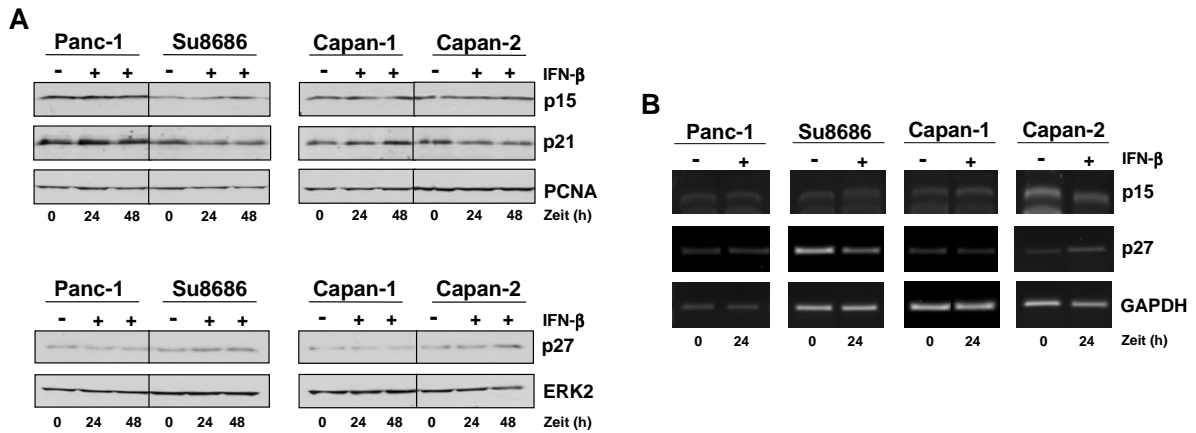


Abb. 3-8: Beeinflussung der Zellzyklus-regulierenden Gene p15, p21 und p27 durch Interferon- β in den Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2

Die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurden sie geerntet (24 h Wert) oder das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h geerntet (48 h Wert). Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. **(A)** Nach der Herstellung von Kernextrakten wurden je 30 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Membranen wurden mit Antikörper gegen p15 und p21 bzw. p27 inkubiert. PCNA bzw. ERK2 dienten als Ladekontrolle. **(B)** Nach der Isolation von mRNA und anschließender cDNA-Synthese wurden PCRs mit spezifischen Primern für p15 bzw. p27 durchgeführt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

3.1.2.4 Einfluss von Interferon- β auf die Doppelstrangbruch-Induktion und Reparatur

Für Gliomzellen wird vermutet, dass IFNs die Reparatur der durch IR entstehenden DSBs beeinflussen. Besonders der Reparaturweg, welcher über die HR erfolgt, scheint davon betroffen zu sein (Schmidberger et al. 2003). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob IFN- β auch in den Pankreaskarzinom-Zelllinien einen Einfluss auf die Induktion oder Reparatur von DSBs nach Bestrahlung hat. Hierfür wurden die zwei Zelllinien Su8686 und Panc-1 verwendet. Die Zelllinie Su8686 reagierte auf eine alleinige IFN- β Behandlung sensitiv und konnte durch eine Vorbehandlung mit IFN- β gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden. Panc-1 wurde für die folgenden Versuche als negativ-Kontrolle verwendet, da diese Zelllinie nicht auf die Behandlung mit IFN- β reagierte und auch keinen radiosensibilisierenden Effekt zeigte.

Ergebnisse

3.1.2.4.1 Einfluss von Interferon- β auf die γ H2AX Foci Bildung und Abnahme

Um zu untersuchen, ob die Anzahl der durch IR hervorgerufenen DSBs durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit IFN- β erhöht wird, wurde die Bildung von γ H2AX Foci untersucht. Grundlage dieser Methode ist, dass an einem DSB die H2AX-Histone schadensabhängig am Serin139 phosphoryliert werden und dadurch einen γ H2AX Focus bilden. Demnach korreliert die Anzahl der Foci mit der Anzahl an DSBs (Sedelnikova et al. 2002; Rothkamm and Lobrich 2003; Ismail and Hendzel 2008). Eine Abnahme der Foci-Anzahl spiegelt die Reparatur der DSBs wider. Zur Untersuchung der γ H2AX Foci wurden Su8686 und Panc-1 Zellen wie unter 2.2.16 beschrieben, auf Deckgläser ausgesät und für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Als Referenz dienten ausschließlich bestrahlte Proben bzw. unbehandelte Kontrollen. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt um DSBs zu generieren. 30 min und 4 h nach Bestrahlung wurde die Proben fixiert, gefärbt und die Anzahl der Foci in 40 Zellen pro Präparat gezählt. In Abb. 3-9 ist die Anzahl der Foci der verschiedenen behandelten Ansätze graphisch dargestellt. In der Zelllinie Su8686 wurden in der unbehandelten Kontrolle durchschnittlich 3 Foci pro Zelle gezählt. Dieser Wert stieg auch durch eine Inkubation mit 300 I.E./ml IFN- β nicht an. 30 min nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden durchschnittlich 16 γ H2AX Foci pro Zelle gezählt. Eine zusätzliche Inkubation mit 300 I.E./ml IFN- β ließ die γ H2AX Foci Anzahl um durchschnittlich 3 Foci pro Zelle, im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Proben, ansteigen. 4 h nach Bestrahlung sank die γ H2AX-Foci Anzahl in den ausschließlich bestrahlten Proben auf durchschnittlich 6 Foci pro Zelle. In den Zellen, welche zusätzlich mit 300 I.E./ml IFN- β vorbehandelt wurden, lag die γ H2AX Foci Anzahl durchschnittlich 3 Foci über den ausschließlich bestrahlten Proben. Die relative Abnahme der Foci-Anzahl für ausschließlich bestrahlte oder zusätzlich mit IFN- β vorbehandelte Proben blieb gleich. In der Zelllinie Panc-1 wurden in der unbehandelten Kontrolle und den ausschließlich mit 300 I.E./ml IFN- β behandelten Proben \sim 4 Foci pro Zelle gezählt. Eine Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy lies die γ H2AX Foci Anzahl 30 min nach Bestrahlung auf durchschnittlich 19 Foci pro Zelle angestiegen. Durch eine zusätzliche Inkubation mit 300 I.E./ml IFN- β verringerte sich die γ H2AX Foci Anzahl um 3 Foci pro Zelle, im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Proben. 4 h nach Bestrahlung sank die γ H2AX-Foci Anzahl in den ausschließlich bestrahlten Proben auf durchschnittlich 8 Foci pro Zelle. In den Zellen, welche zusätzlich mit 300 I.E./ml IFN- β

Ergebnisse

vorbehandelt wurden, lag die γ H2AX Foci Anzahl 4 h nach Bestrahlung bei durchschnittlich 11 Foci pro Zelle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in der Zelllinie Su8686 eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β nicht zu signifikant mehr durch IR generierte DSBs, gemessen als γ H2AX Foci, führt. Die Reparatur der DSBs wurde durch IFN- β Inkubation nicht verändert. Auch in der Zelllinie Panc-1 führte eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β nicht zu einer signifikanten Änderung der γ H2AX Foci Anzahl nach Bestrahlung.

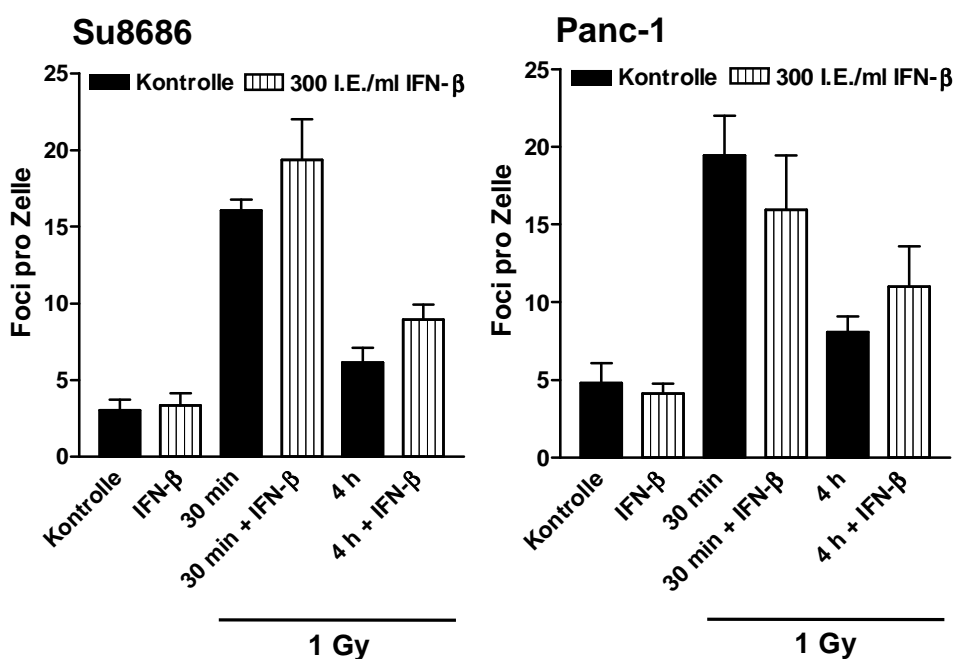


Abb. 3-9: Vergleich der γ H2AX Foci Bildung und Abnahme nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinie Su8686 und Panc-1

Su8686- und Panc-1-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und, wenn angegeben, für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt und das Medium gewechselt. Nach 30 min bzw. 4 h wurden die Zellen für die Analyse aufbereitet. In drei unabhängigen Versuchen wurden für jeden Ansatz 40 Zellen ausgezählt und der Mittelwert der Foci graphisch dargestellt.

3.1.2.4.2 Einfluss von Interferon- β auf die Doppelstrangbruch-Reparatur, gemessen durch den neutralen Komet-Test

Die Detektion von γ H2AX Foci ist ein indirekter Nachweis von DSBs. Direkt können DSB durch den neutralen Komet-Test nachgewiesen werden. Hierbei spiegelt die Mobilität der durch Einzelzell-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA, welche in der Einheit „olive tail moment“ (OTM) gemessen wird, die Anzahl der DSBs wider. Je höher demnach das OTM ist, desto mehr DSBs weist die DNA einer Zelle auf. Zur Erstellung einer DSB-Reparatur-Kinetik wurden Su8686 und Panc-1 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert. 24 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h, und 0 h vor Durchführung des Tests wurden, sowohl die mit IFN- β

Ergebnisse

vorbehandelten, als auch die nicht vorbehandelten Zellen mit 40 Gy bestrahlt und alle Proben, einschließlich der nicht bestrahlten Kontrollen, gemeinsam aufbereitet. Von jeweils 40 Zellen wurde das OTM bestimmt und als Funktion der Zeit in Abb. 3-10 dargestellt. Durch die Bestrahlung, zum Zeitpunkt $t = 0$ h, erhöhte sich in beiden Zelllinien das OTM von 5, dem Niveau der unbestrahlten Kontrollen (Zeitpunkt $t = -1$), auf 15 und fiel nach 24 h wieder auf den Ausgangswert zurück. Weder für Panc-1 noch für Su8686 führte eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β zu einer Veränderung der Reparaturkinetik.

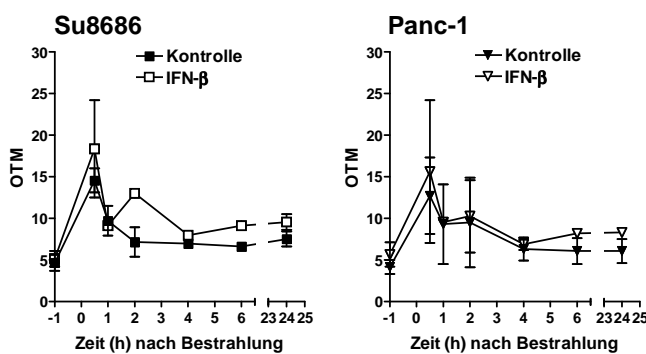


Abb. 3-10: Vergleich der Doppelstrangbruch-Reparatur nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinien Su8686 und Panc-1

Su8686 und Panc-1 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert und 24 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h und 0 h vor der Analyse mit 40 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein Medienwechsel. Der Zeitpunkt $t = -1$ zeigt das OTM der unbestrahlten Kontrollen. Alle Proben wurden gemeinsam aufbereitet und für jeden Ansatz das OTM von jeweils 40 Zellen gemessen.

3.1.2.4.3 Einfluss von Interferon- β auf die Expression der HR-Proteine Rad51 und Rad52

Für IFNs wird vermutet, dass sie die HR beeinträchtigen können (Schmidberger et al. 2003). Daher wurde die Expression der HR-Proteine Rad51 und Rad52 nach IFN- β Behandlung durch Western-Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde der 24 h Wert geerntet. Für den 48 h Wert wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren 24 h geerntet. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. Nach der Herstellung von Kernextrakten wurde durch Western-Blot-Analyse das Proteinniveau von Rad51 und Rad52 untersucht. Abb. 3-11 zeigt, dass weder die Expression von Rad51 noch von Rad52 in einer der vier Zelllinien durch eine IFN- β Behandlung beeinflusst wurde.

Ergebnisse

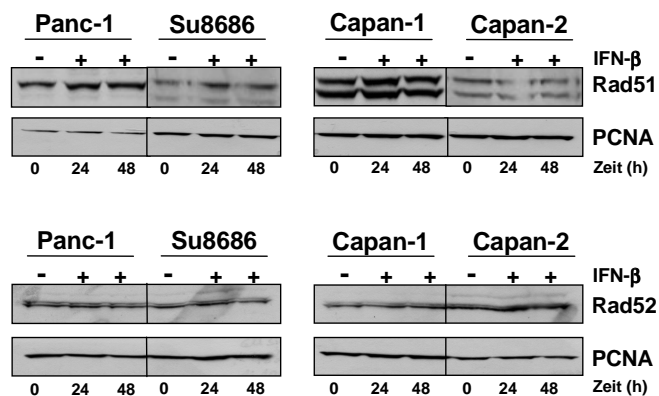


Abb. 3-11: Beeinflussung der Reparaturgene Rad51 und Rad52 durch Interferon-β

Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Danach wurden sie geerntet (24 h Wert) oder das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h geerntet (48 h Wert). Als Referenz dienten unbehandelte Proben. Nach der Herstellung von Kernextrakten wurden je 30 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen Rad51 und Rad52 inkubiert. PCNA diente als Ladekontrolle.

3.1.2.5 Einfluss von Interferon-β auf die Apoptoserate nach Bestrahlung

IFNs sind in der Lage, Apoptose zu induzieren (Saidi et al. 2006). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt für die Radiosensibilisierung der Pankreaskarzinom-Zelllinie Su8686 von Bedeutung ist, wurden durch SubG1-Messungen und Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbungen am Durchflusszytometer die Apoptoseraten nach Bestrahlung mit und ohne IFN-β Vorbehandlung bestimmt. Als Negativ-Kontrolle diente auch hier die Zelllinie Panc-1, welche nicht sensitiv auf eine Behandlung mit IFN-β reagierte und auch keinen radiosensibilisierenden Effekt zeigte. Su8686 und Panc-1 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β inkubiert und anschließend mit Einzeldosen von 0, 2, 4, 6, und 8 Gy bestrahlt. Als Referenz dienten ausschließlich bestrahlte bzw. ausschließlich mit IFN-β behandelte Proben. Direkt nach Bestrahlung erfolgte ein Medienwechsel. Nach 72 h wurde die Apoptoserate bestimmt. Abb. 3-12 **A** zeigt, dass in der Zelllinie Su8686 die induzierte Apoptoserate nach Kombination von ionisierender Strahlung und IFN-β höher war als in den ausschließlich bestrahlten Proben. Die Apoptoserate stieg zwar durch Bestrahlung mit zunehmender Dosis auf ca. 25 % an, für die zusätzlich mit IFN-β vorbehandelten Zellen war sie jedoch für jeden Dosispunkt ca. 5 – 10 % höher. Auch in den Histogrammen der Zelllinie Su8686 ist in Abb. 3-12 **B** der Unterschied in der SubG1 Fraktion durch eine IFN-β Vorbehandlung zu erkennen. In dem Histogramm, welches die Zellen nach einer Behandlung mit 6 Gy und IFN-β zeigt, lag die SubG1 Fraktion bei 38 %, während sie für die ausschließlich mit 6 Gy bestrahlten Zellen bei 27 % lag. Ebenso zeigte die Annexin V/Propidiumjodid Messung in Abb. 3-12 **C** eine Erhöhung der früh-apoptotischen Fraktion (Quadrant 2), wenn die „Density-Blots“ der ausschließlich bestrahlten Proben mit denen der Kombination aus IR und IFN-β verglichen wurden. Die früh-apoptotische Fraktion stieg von 14 %, in den ausschließlich bestrahlten Proben, auf 31 % nach einer

Ergebnisse

Kombinationsbehandlung. In der Zelllinie Panc-1 war diese Erhöhung der Apoptoserate durch IFN- β nicht zu beobachten (Abb. 3-12 A und B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine IFN- β Vorbehandlung in der Zelllinie Su8686 die strahleninduzierte Apoptose verstärkt, was in der Zelllinie Panc-1 nicht zu beobachten war.

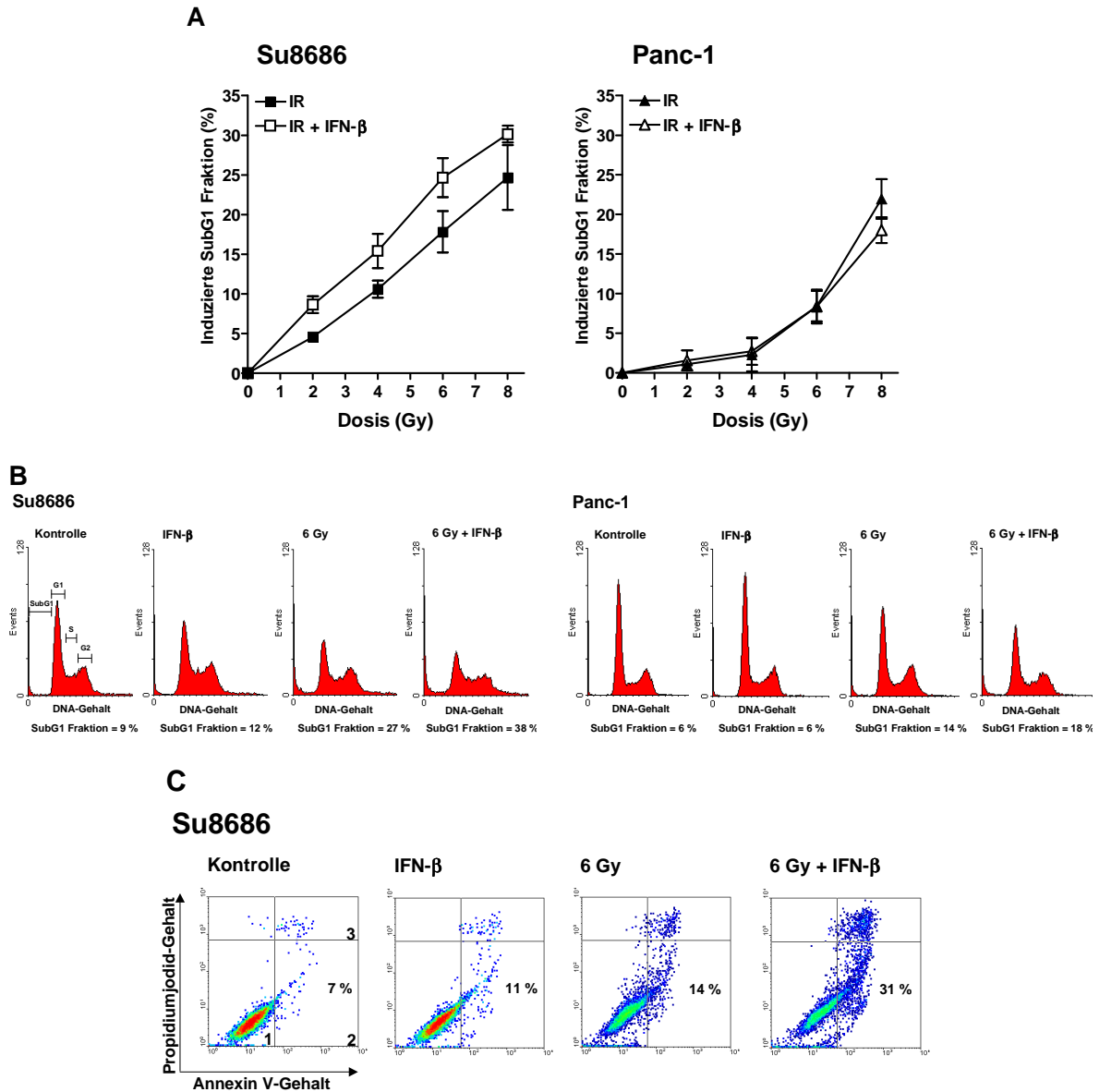


Abb. 3-12: Vergleich der Apoptoserate nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinien Su8686 und Panc-1

(A) Su8686 und Panc-1 Zellen wurden, wenn angegeben, für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und anschließend mit Einzeldosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und eine SubG1-Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. Die Apoptoserate wurde relativ zu den unbestrahlten bzw. ausschließlich mit IFN- β behandelten Kontrollen dargestellt. (B) Repräsentative Histogramme der SubG1 Messungen von (A) mit den Unterteilungen SubG1 (tote Zellen), G1-, S- und G2/M-Phase. (C) Su8686 Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt und nach 72 h zur Bestimmung der Apoptose-/Nekrosefrequenz eine Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung durchgeführt und am Durchflusszytometer analysiert. Abgebildet sind exemplarische „Density-Blots“ dieser Messungen der Zelllinie Su8686. Quadrant 1 entspricht der lebenden Population, Quadrant 2 entspricht der früh-apoptotischen Population und Quadrant 3 der spät-apoptotischen / nekrotischen Population.

3.1.3 Chemosensibilisierung der Pankreaskarzinom-Zelllinien durch Interferon- β

Die Therapie von Pankreaskarzinomen besteht aus einer Kombination von Chemotherapie, Bestrahlung und IFN. Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten ausführlich der Einfluss von IFN- β auf die Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung beschrieben wurde, wird in den folgenden Abschnitten der Einfluss von IFN- β auf die Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid untersucht. Die Behandlung von Pankreaskarzinom-Zellen mit Alkylanzien verlief bis jetzt wenig Erfolg versprechend. Das basiert auf der schlechten Ansprechrate der Tumore auf diese Stoffklasse, welche wahrscheinlich auf ein hohes MGMT-Expressions-Niveau dieser Krebsart zurückzuführen ist (Kokkinakis et al. 1997). Gliomzellen, welche ebenfalls Resistent auf eine Behandlung mit Methylanzen reagieren, konnten durch eine Behandlung mit IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert werden (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008). Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob auch in den Pankreaskarzinom-Zelllinien die Sensitivität gegenüber Temozolomid durch eine Kombination mit IFN- β verstärkt werden kann.

3.1.3.1 Auswirkungen einer Interferon- β Behandlung auf das p53 Expressions-Niveau in Pankreaskarzinom-Zelllinien

Für Gliomzellen wurde gezeigt, dass diese durch eine Behandlung mit IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert werden können (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008). Als verantwortlich dafür wurde eine IFN- β vermittelte Abnahme der MGMT-Expression angenommen. Diese wurde durch eine IFN- β induzierte Stabilisierung des p53 Proteins erklärt, welches die MGMT-Expression negativ reguliert (Grombacher et al. 1998). Zur Überprüfung, ob eine IFN- β Behandlung auch in den Pankreaskarzinom-Zelllinien zu einer Stabilisierung von p53 führt, wurden Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und anschließend geerntet. Für den 48 h Wert erfolgte nach 24-stündiger IFN- β Inkubation ein Medienwechsel und die Zellen wurden noch weitere 24 h kultiviert und dann geerntet. Als Referenzwerte dienten unbehandelte Kontrollen. Nach der Herstellung von Kernextrakten wurden Western-Blot-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen p53 durchgeführt. Eine Inkubation mit IFN- β zeigte weder in der p53-Wildtyp Zelllinie Capan-2 noch in den p53-mutierten Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 einen Anstieg der p53 Proteinmenge im Zellkern (Abb. 3-13).

Ergebnisse

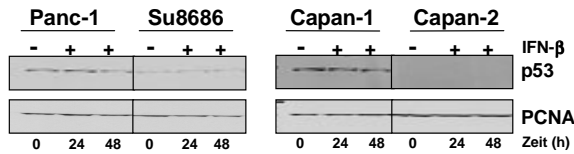


Abb. 3-13: Beeinflussung der Expression des Tumorsuppressorgens p53 durch Interferon- β

Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Der 24 h Wert wurde anschließend geerntet. In den Ansätzen des 48 h Wertes wurde das Medium gewechselt und diese für weiter 24 h kultiviert. Nach der Herstellung von Kernextrakten wurden je 30 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen p53 inkubiert. PCNA diente als Ladekontrolle.

3.1.3.2 MGMT-Status und dessen Beeinflussung durch Interferon- β in Pankreaskarzinom-Zelllinien

Um den in Gliomzellen beobachteten Einfluss von IFN- β auf den MGMT-Status in den verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurde die MGMT-Aktivität in den vier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien mittels eines MGMT-Aktivitäts-Test bestimmt. Dies ergab für die Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 folgende Werte:

Tab.: 3-4: MGMT-Aktivität der vier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2

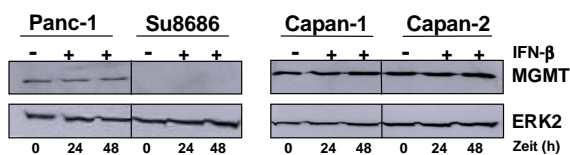
Zelllinie	MGMT-Aktivität (fmol/mg Protein)
Panc-1	247
Su8686	0
Capan-1	> 1100
Capan-2	716

Der MGMT-Aktivitäts Test zeigte, dass alle Zelllinien - mit Ausnahme von Su8686 - MGMT profizient sind. Um den Einfluss von IFN- β auf die MGMT-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt und anschließend Proteinextrakte hergestellt. Als Referenzwert wurden unbehandelte Proben verwendet. In allen Zelllinien, außer Su8686, konnte die Expression von MGMT nachgewiesen werden. Eine Vorinkubation mit IFN- β führte weder in den p53-mutierten Zelllinien Panc-1, Su8686 oder Capan-1 noch in der p53-Wildtyp Zelllinie Capan-2 zu einer Beeinflussung der Expression des MGMT-Proteins (Abb. 3-14).

Ergebnisse

Abb. 3-14: Beeinflussung der Expression des Reparaturenzyms MGMT durch Interferon- β

Die Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die Kontrollen erhielten kein IFN- β . Danach wurden sie geerntet (24 h Wert) oder das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h geerntet (48 h Wert). Nach der Herstellung von Kernextrakten wurden je 30 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen MGMT inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.



3.1.3.3 Einfluss von Interferon- β auf die Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung in vier Pankreaskarzinom-Zelllinien

Um die Wirkung von IFN- β auf eine Behandlung der Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 mit TMZ zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert und nach einem Medienwechsel mit 100 μ M TMZ behandelt. Als Referenz dienten ausschließlich mit TMZ behandelte Proben. Um die apoptotische Antwort der vier Zelllinien unter MGMT depletierten Bedingungen zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit 10 μ M des MGMT Inhibitors O⁶BG 1 h vor TMZ-Gabe vorinkubiert. Die Zelltodmessung erfolgte 144 h nach TMZ-Behandlung durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer. Abb. 3-15 zeigt die vier Zelllinien nach TMZ-Behandlung in Kombination mit und ohne O⁶BG bzw. mit und ohne 24-stündiger IFN- β Vorinkubation. Die Zelltodrate wurde als relativer Anteil der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN- β behandelten Proben dargestellt. In den drei Zelllinien Panc-1, Capan-1 und Capan-2 führte, wie bereits der MGMT-Status vermuten ließ, eine alleinige TMZ-Behandlung kaum zu einem Anstieg der Zelltodrate. Erst durch Zugabe des MGMT-Inhibitors O⁶BG wurde in diesen Zelllinien Zelltod induziert. Für Panc-1 lag danach die induzierte Zelltodrate bei 40 %, für Capan-1 bei 20 % und für Capan-2 bei 7 %. Eine zusätzliche Inkubation mit IFN- β hatte keinen Einfluss auf die Zelltodrate. In der MGMT defizienten Zelllinie Su8686 führte eine alleinige TMZ-Behandlung zur Induktion von Zelltod und konnte auch durch Zugabe von O⁶BG nicht gesteigert werden. Die Zelltodrate lag in beiden Fällen zwischen 10 % und 17 %. Hier führte eine IFN- β Vorinkubation ebenfalls nicht zu einem Anstieg der Zelltodrate. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MGMT eine Kombination von IFN- β mit TMZ in keiner Zelllinie zu

Ergebnisse

einer signifikanten Erhöhung der Zelltodrate im Vergleich zu den ausschließlich mit TMZ behandelten Proben führte.

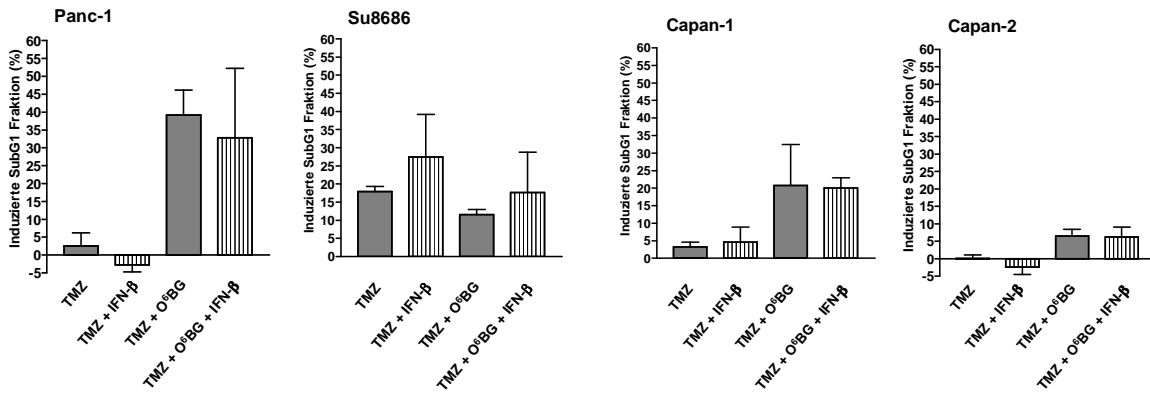


Abb. 3-15: Beeinflussung der Temozolomid-induzierten Apoptoserate durch Interferon-β in den Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1

Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 wurden, wenn angegeben, für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel und, wenn angegeben, eine Inkubation mit 10 μM O⁶BG. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μM TMZ behandelt und nach 144 h durch Messung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer die Zelltodrate bestimmt. Die Werte wurden als relativer Anteil der unbehandelten bzw. nur mit IFN-β behandelten Kontrollen dargestellt. Die Diagramme repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2 Untersuchung der chemosensibilisierenden Eigenschaften von Interferon- β in malignen Melanomzelllinien

3.2.1. Charakterisierung der malignen Melanomzelllinien D05 und D14 hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber alleiniger Temozolomid- und Interferon-Behandlung

Im zweiten Versuchskomplex werden Arbeiten zur Chemosensibilisierung durch IFNs an malignen Melanomzelllinien durchgeführt. Das Mittel erster Wahl bei der Therapie eines metastasierenden malignen Melanoms ist das methylierende Agenz Dacarbazin (DTIC). Im Ausland ist auch das methylierende Agenz Temozolomid (TMZ) zugelassen. Zusätzlich wird für eine Monotherapie des malignen Melanoms das chlorethylierende Agenz Fotemustin (FM) und auch IR verwendet (Eggermont and Kirkwood 2004; Kaufmann et al. 2005). Da die Ansprechrate der Tumore auf diese Therapieformen gering ist (Middleton et al. 1998; Bedikian et al. 2003), wurden auch Cytokine wie IFNs in die Therapie aufgenommen. Klinische Studien belegen, dass die Kombination von IFN- α mit TMZ die Ansprechraten und Remissionsraten der Tumore deutlich erhöht (Ridolfi et al. 2004). Auch IFN- β wird in Kombination mit methylierenden Agenzien eingesetzt (Nagatani et al. 1995). *In vitro* Experimente und Tumor-Xenograft Experimente zeigten, dass IFN- β toxischer auf Melanomzellen wirkt als andere IFNs (Johns et al. 1992).

3.2.1.1 Wirkung von Temozolomid auf die Melanomzelllinien D05 und D14

Bei dem für die folgenden Versuche verwendeten Zellpaar handelt es sich um die p53-Wildtyp Melanomzelllinie D05 und die p53-mutierte Melanomzelllinie D14 (Naumann et al. 2009). Um die Wirkung des methylierenden Agenz TMZ auf die Melanomzellen zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit der klinisch relevanten Dosis von 50 μ M TMZ behandelt. Um eventuell vorhandenes MGMT zu inaktivieren, wurden einige Proben vor der TMZ-Behandlung mit 10 μ M O⁶BG inkubiert. Nach 144 h wurde die Zelltodrate am Durchflusszytometer durch Bestimmung der SubG1 Fraktion ermittelt. Die Zelllinie D05 zeigte nach alleiniger TMZ-Gabe keine erhöhte Zelltodrate im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3-16). Wurden die Zellen zusätzlich mit dem MGMT-Inhibitor O⁶BG behandelt, führte dies in der Zelllinie D05 zu einem Anstieg des Zelltods um 20 % relativ zur unbehandelten Kontrolle. In der Zelllinie D14 bewirkte bereits eine alleinige TMZ-Inkubation einen Anstieg des Zelltods um 25 % im Vergleich zu der

Ergebnisse

unbehandelten Kontrolle. Wurde in der Zelllinie D14 MGMT depletiert, hatte dies keine zusätzliche Erhöhung der Zelltodrate zur Folge. Das bedeutet, dass in der Zelllinie D14 das Reparaturenzym MGMT nicht aktiv ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unter MGMT inaktivierten Bedingungen eine Behandlung mit TMZ in beiden Zelllinien (D05 und D14) zu einem vergleichbaren Anteil an Zelltod führt, unabhängig von ihrem p53-Status.

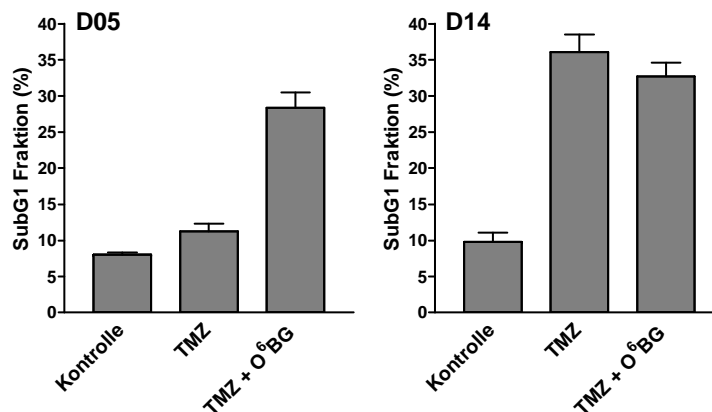


Abb. 3-16: Zytotoxizität der Temozolomid-Behandlung in den Zelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden, wenn angegeben, mit 10 μM O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μM TMZ behandelt. Nach 144 h wurden die Zellen geerntet und die Zytotoxizität anhand der SubG1 Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.1.2 Untersuchungen zum apoptotischen Signalweg nach Temozolomid-Behandlung in malignen Melanomzellen

Der durch TMZ-induzierte Zelltod in den Melanomzelllinien D05 und D14 wurde bereits als Apoptose charakterisiert (Naumann et al. 2009). Ob die Apoptose über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg verläuft, wurde bisher noch nicht untersucht. Für den intrinsischen Apoptoseweg ist die Caspase-9 die entscheidende Initiatorcaspase, welche als Bestandteil des Apoptosoms die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert. Um zu untersuchen, ob es nach TMZ-Behandlung zur Aktivierung d.h. Spaltung der Caspase-9 kommt, wurden die Zellen mit 10 μM O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μM TMZ behandelt. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung geerntet und Cytoplasmaextrakte hergestellt. Durch Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen das Spaltprodukt der Caspase-9 konnte dessen Niveau nach TMZ-Behandlung untersucht werden. Abb. 3-17 zeigt, dass sowohl für die Zelllinie D05 als auch für die Zelllinie D14 eine Zunahme an gespaltenen Caspase-9 nach TMZ-Behandlung zu beobachten war.

Ergebnisse

Zusammenfassend kann die TMZ vermittelte Spaltung der Caspase-9 als Hinweis dafür angesehen werden, dass in den Melanomzelllinien D05 und D14 nach einer Behandlung mit TMZ Apoptose über den intrinsischen Signalweg vermittelt wird.

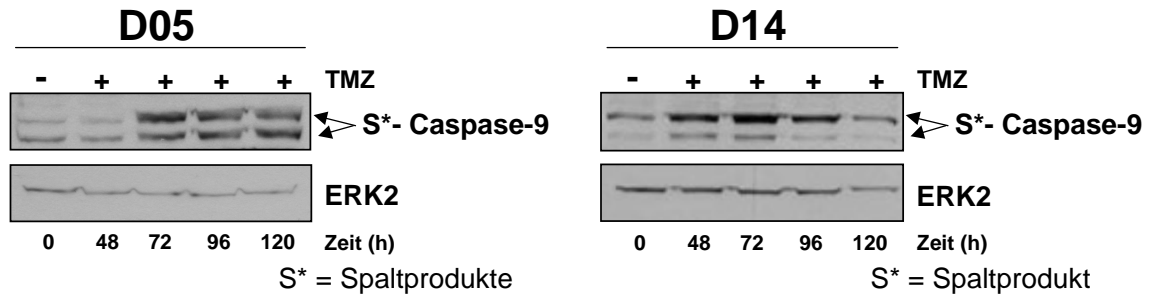


Abb. 3-17: Spaltung der Caspase-9 nach Temozolomid-Behandlung in den Zelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden vor der Behandlung mit 50 μ M TMZ mit 10 μ M O⁶BG inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und Cytoplasmaextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 μ g Protein eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen das Spaltprodukt der Caspase-9 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.1.3 Aktivität des Reparaturproteins MGMT in den Melanomzelllinien D05 und D14

Zur Bestimmung der MGMT-Enzymaktivität der beiden Zelllinien D05 und D14 wurde ein MGMT-Aktivitätstest durchgeführt. Die Zelllinie D05 weist mit 298 fmol/mg Protein ein moderates MGMT-Niveau auf, während in der Zelllinie D14 mit diesem Testverfahren keine MGMT-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

3.2.1.4 Typ-I Interferon Rezeptor Status der Melanomzelllinien D05 und D14

IFNs wirken auf ihre Zielzellen durch Bindung an einen spezifischen IFN-Rezeptor, wodurch der JAK/STAT-Signalweg aktiviert wird. Um zu untersuchen, ob die beiden Melanomzelllinien D05 und D14 den IFN-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden von beiden Zelllinien Membranextrakte hergestellt. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen IFNAR2 Untereinheit des IFN-Rezeptors konnte dessen Expression nachgewiesen werden. Abb. 3-18 zeigt, dass sowohl die Zelllinie D05 als auch die Zelllinie D14 auf ihren Oberflächen den IFN-Rezeptor exprimierten.

Ergebnisse

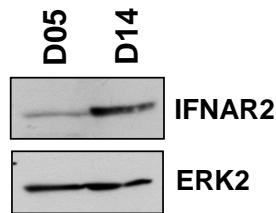


Abb. 3-18: Expression des IFN-Rezeptors in den Zelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden zu Membranextrakten aufbereitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 µg Protein eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen die IFNAR2 Untereinheit des IFN-Rezeptors inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.1.5 Einfluss von Typ-I Interferonen auf das Überleben der Melanomzelllinien D05 und D14

Um zu untersuchen, ob Typ I IFNs einen Einfluss auf das Überleben der Melanomzelllinien D05 und D14 haben, wurde ein Kolonie-Bildungstest durchgeführt. Hierfür wurde von beiden Zelllinien eine geeignete Zellzahl ausgesät und am folgenden Tag für 24 h mit 30, 300 und 3000 I.E./ml IFN- α oder IFN- β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel. Das zelluläre Überleben wurde semilogarithmisch als Funktion der Dosis aufgetragen. In beiden Zelllinien nahm das Überleben der Zellen mit steigender IFN-Dosis ab (Abb. 3-19). Eine 24-stündige Inkubation mit IFN- α hatte in beiden Zelllinien einen geringeren Einfluss auf das zelluläre Überleben als eine Inkubation mit IFN- β . Für die folgenden Versuche wurde IFN in der Dosis von 300 I.E./ml verwendet.

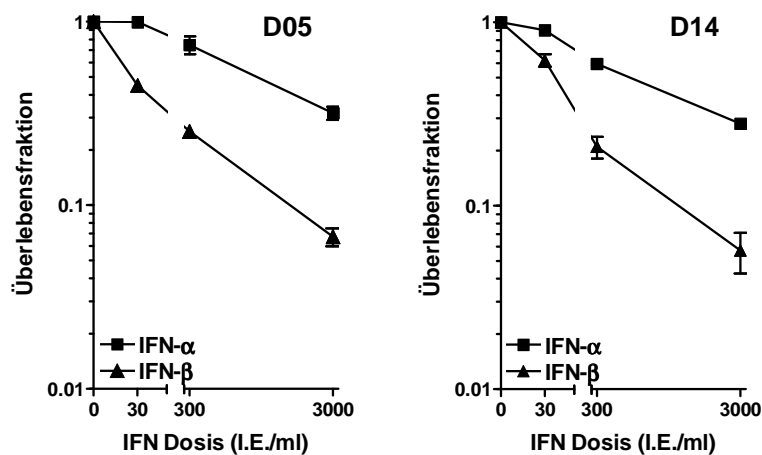


Abb. 3-19: Überlebenskurven der Melanomzelllinien D05 und D14 nach Behandlung mit verschiedenen Dosen Interferon- α oder Interferon- β

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen IFN Dosen behandelt. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel. Über einen Kolonie-Bildungstest wurde das Überleben der Zellen bestimmt. Die Überlebenskurven wurden semi-logarithmisch aufgetragen und das zelluläre Überleben als relativer Anteil der unbehandelten Kontrollen dargestellt.

Ergebnisse

3.2.1.6 Einfluss von Typ I Interferonen auf die Proliferation der Melanomzelllinien

Um zu untersuchen, ob IFN- β einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Melanomzelllinien D05 oder D14 hat, wurden 5×10^4 Zellen ausgesät und für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und alle 24 h die Zellzahl bestimmt. Die Kontrolle wurde nicht mit IFN- β behandelt. In Abb. 3-20 kann man in beiden Zelllinien eine deutliche Verlangsamung des Zellwachstums durch IFN- β beobachten. Für die Zelllinie D05 ergab sich unbehandelt eine Verdopplungszeit von 35,51 h. Durch die IFN- β Vorbehandlung stieg diese auf 60,06 h an. Die Zelllinie D14 wuchs unbehandelt etwas schneller als die Zelllinie D05 mit einer Verdopplungszeit von 26,7 h. Durch IFN- β stieg die Verdopplungszeit auf 33,45 h an.

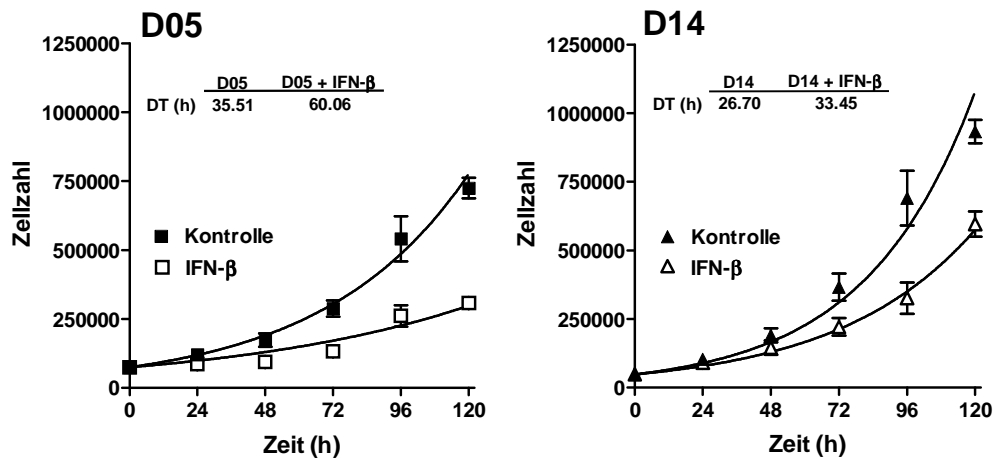


Abb. 3-20: Wachstumskurven der Zelllinien D05 und D14 mit und ohne 24-stündiger Interferon- β Behandlung

Von beiden Zelllinien wurden 5×10^4 Zellen ausgesät und entweder für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt oder nicht. Nach dieser 24-stündigen Inkubation wurde das Medium gewechselt und zum ersten Mal die Zellzahl bestimmt. In den folgenden fünf Tagen wurde alle 24 h die Zellzahl bestimmt. Der Zeitpunkt 0 h markiert die Aussaat. DT (h) ist die errechnete Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie mit und ohne Kombination mit IFN- β . Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen zusammen.

3.2.2 Sensibilisierung der malignen Melanomzelllinien D05 und D14 gegenüber Temozolomid durch Interferon- β

3.2.2.1 Bestimmung der durch Temozolomid-induzierten Apoptose der Zelllinien D05 und D14 vorbehandelt mit Interferon- α oder- β

Der Einfluss von IFN auf den durch TMZ vermittelten Zelltod wurde durch Messung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Hierfür wurden die entsprechenden Proben für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder IFN- β vorbehandelt und anschließend das Medium gewechselt. Um den Effekt von IFN auf TMZ-Behandlung sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MGMT zu untersuchen, wurde ein Teil der Proben mit dem MGMT Inhibitor O⁶BG (10 μ M) vorbehandelt. Die einmalig verabreichte TMZ Dosis betrug 50 μ M. Nach 144 h wurden die Zellen geerntet und die Proben am Durchflusszytometer analysiert. In Abb. 3-21 ist die Apoptoserate relativ zur unbehandelten bzw. nur mit IFN behandelten Kontrolle für die entsprechenden Einfach- oder Kombinationsbehandlungen dargestellt. In der p53-Wildtyp Zelllinie D05 hatte TMZ alleine nur einen sehr geringen Einfluss auf das Überleben der Zellen, was auf das Vorhandensein von MGMT zurückzuführen war. Der Wert für die induzierte Apoptose lag bei 3 %. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit IFN- α bewirkte keine Erhöhung der Apoptoserate. Durch eine 24-stündige Vorinkubation mit IFN- β erhöhte sich die Zelltodrate signifikant auf 9,5 %. Wurde MGMT durch die Inkubation mit O⁶BG depletiert, stieg die induzierte Zelltodrate nach alleiniger TMZ-Behandlung auf 22 % an. Durch eine zusätzliche Inkubation mit IFN- α erhöhte sich die induzierte Zelltodrate signifikant auf 28 %, während eine Vorbehandlung mit IFN- β die Zelltodrate von 22 auf 42 % steigerte.

In der p53-mutierten Zelllinie D14 führte, wie unter 3.2.1.1 erwähnt, schon eine alleinige TMZ-Gabe zum Zelltod, was auf das Fehlen von MGMT zurückzuführen ist. Die induzierte Zelltodrate betrug in diesem Fall 26 %. Eine Vorinkubation mit IFN- α bzw. IFN- β erhöhte die Zelltodrate nicht signifikant. Eine zusätzliche Inkubation mit O⁶BG hatte in dieser Zelllinie keinen Effekt auf das Überleben der Zellen. Auch hier führte eine Inkubation mit IFN- α nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Zelltodrate. Durch eine Vorbehandlung mit IFN- β konnte jedoch unter diesen Bedingungen auch in der Zelllinie D14 eine signifikante Zunahme der Zelltodrate von 24 auf 32 % beobachtet werden.

Zusammenfassend lassen sich beide Zelllinien in Abwesenheit von MGMT gegenüber TMZ durch IFNs sensibilisieren. Diese Sensibilisierung ist jedoch in der p53-Wildtyp

Ergebnisse

Zelllinie deutlich ausgeprägter als in der p53-mutierten Zelllinie. Eine Vorbehandlung mit IFN- α hat im Vergleich zu IFN- β in der Zelllinie D05 einen deutlich geringeren Effekt auf das Überleben der Zellen nach TMZ-Behandlung und in den p53-mutierten D14-Zellen keinen Effekt. Für die folgenden Versuche wurde daher IFN- β verwendet.

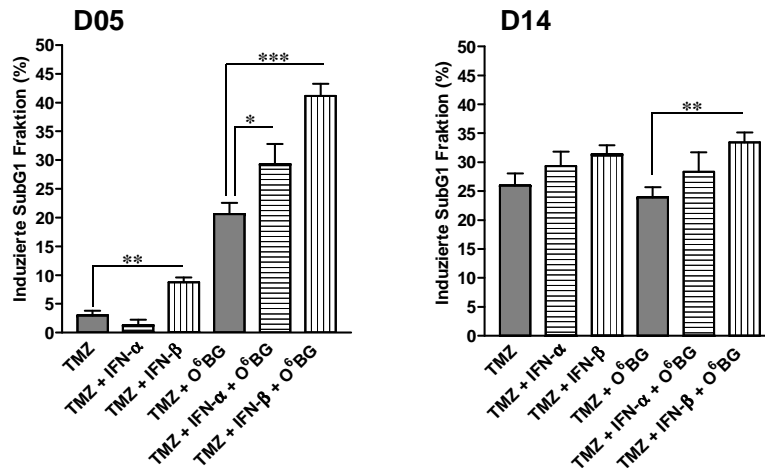


Abb. 3-21: Zytotoxizität nach Kombinationsbehandlung mit Temozolomid und Interferon- α oder - β in den Melanomzelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- α oder - β behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 10 μ M O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μ M TMZ behandelt. Nach 144 h wurden die Zellen geerntet und die SubG1 Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Apoptoserate wurde als relativer Anteil der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN behandelten Proben dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse ist durch * p < 0,03, ** p > 0,002, *** p < 0,0001 definiert. Beide Diagramme zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.2 Der durch eine Kombination von Temozolomid und Interferon- β hervorgerufenen Zelltod in Melanomzellen ist bedingt durch Apoptose

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem durch eine Kombinationsbehandlung mit TMZ und IFN- β induzierten Zelltods um eine Zunahme der Apoptose- oder Nekroserate handelt, wurde eine Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung durchgeführt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β vorbehandelt und anschließend das Medium gewechselt. Da ohne O⁶BG-Behandlung in der Zelllinie D05 kein Zelltod zu beobachten war, wurden für dieses Experiment alle Ansätze mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit 50 μ M TMZ behandelt und nach 120 h am Durchflusszytometer analysiert. In Abb. 3-22 sind exemplarische „Density Blots“ der einzelnen Messungen dargestellt, bei welchen auf der Abszisse der Annexin V-Gehalt und auf der Ordinate der Propidiumjodid-Gehalt der Zellen aufgetragen ist. Ausschließlich Annexin V-positive Zellen wurden als apoptotisch

Ergebnisse

definiert (Quadrant 2); Annexin V/Propidium Jodid doppelgefärbte Zellen als nekrotisch bzw. spät-apoptotisch (Quadrant 3). In den Kontrollen der beiden Zelllinien war allgemein wenig Zelltod zu beobachten, welcher auch nicht durch eine 24-stündige Inkubation mit IFN- β signifikant erhöht wurde. Nach Depletion von MGMT führte eine TMZ-Behandlung in der Zelllinie D05 zu einer frühen Apoptoserate von 14,7 %, welche durch eine IFN- β Vorbehandlung auf 39,3 % gesteigert werden konnte. In der Zelllinie D14 war eine ähnliche Verteilung zu beobachten. Auch hier stieg die apoptotische Fraktion durch eine IFN- β Vorbehandlung von 10,9 auf 27,1 %. Demnach handelt es sich in beiden Zelllinien um eine IFN- β bedingte Zunahme der Apoptoserate, welche aber in D14 im Vergleich zu D05 schwächer ausgeprägt war. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass in beiden Zelllinien der TMZ vermittelte Zelltod über Apoptose verläuft, und diese durch eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β signifikant verstärkt wird.

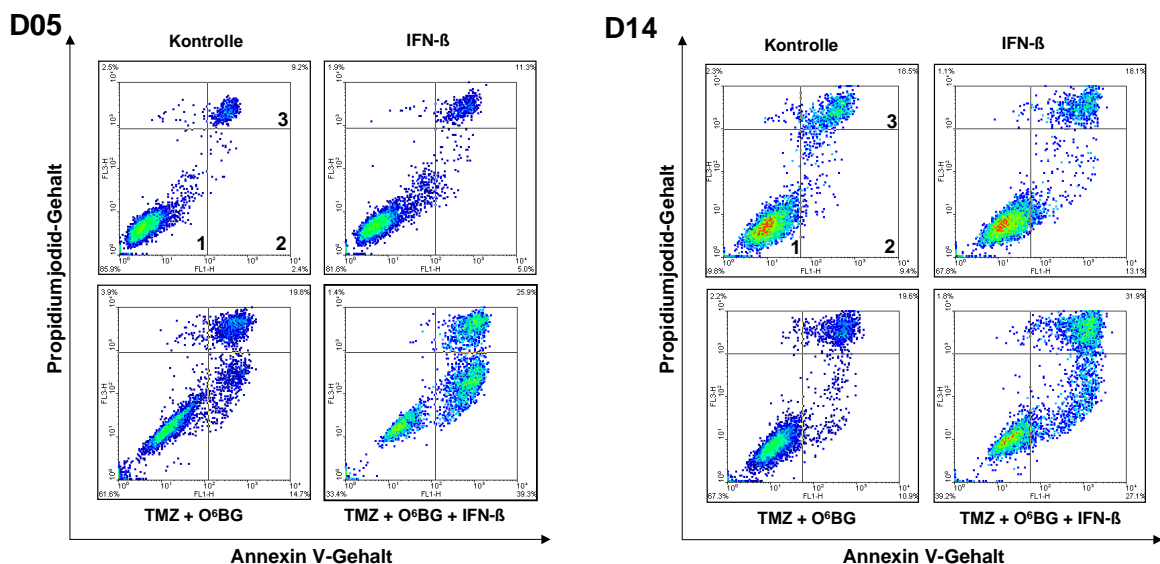


Abb. 3-22: Bestimmung der Apoptose-/Nekrosefrequenz nach alleiniger Temozolomid-Behandlung oder in Kombination mit Interferon- β in den Melanomzelllinien D05 und D14

Die Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Inkubation mit 10 μ M O⁶BG. Anschließend wurden die Zellen mit 50 μ M TMZ behandelt. 120 h später wurden die Zellen mit Annexin V/Propidiumjodid gefärbt und die Apoptose-/Nekrosefrequenz am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind exemplarische „Density-Blots“ der verschiedenen Ansätze. 1 entspricht den lebenden Zellen, 2 der früh-apoptotischen Population und 3 der spät-apoptotischen/nekrotischen Population.

Ergebnisse

3.2.2.3 Kombinationsbehandlung von Melanomzellen mit Temozolomid und Interferon- β bewirkt eine Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7

Um durch eine weitere unabhängige Methode zu belegen, dass es sich bei der Erhöhung des TMZ-induzierten Zelltods durch eine IFN- β Kombinations-Behandlung um Apoptose handelt, wurde die Spaltung der Effektorcaspasen-3 und -7 untersucht. Dies ist eine weitere Möglichkeit, um den Zelltod als Apoptose zu charakterisieren, da Caspasen ausschließlich im Apoptose-vermittelten Zelltod eine Rolle spielen, nicht aber bei Nekrose. Die Spaltprodukte der Caspasen sind durch Western-Blot-Analyse mit geeigneten Antikörpern nachweisbar. Hierfür wurden die Proben für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β vorbehandelt und anschließend das Medium gewechselt. Um MGMT zu depletieren, wurden alle Proben mit O⁶BG vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 50 μ M TMZ. In einem Zeitraum von 0 – 144 h wurden alle 24 h Proben geerntet. Die Zellpellets wurden zu Cytoplasmaextrakten aufbereitet und eine Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen das Spaltprodukt der Caspase-3 bzw. -7 durchgeführt. Abb. 3-23 zeigt, dass in der Zelllinie D05 die TMZ-Behandlung eine Zunahme der Spaltprodukte von Caspase-3 und -7 bewirkte. In der Kontrolle waren die jeweiligen Spaltprodukte kaum nachweisbar. Die Signalstärke stieg mit Dauer der Behandlung an. Diese Zunahme wurde durch die Vorinkubation mit IFN- β deutlich verstärkt. Schon in der ausschließlich mit IFN- β behandelten Probe war ein höheres Protein-Niveau der gespaltenen Caspasen erkennbar als in der unbehandelten Kontrolle. In der Zelllinie D14 konnte ebenfalls ein Anstieg der gespaltenen Caspasen-3 und -7 nach TMZ-Behandlung beobachtet werden. Die Zelllinie D14 wies ein generell höheres Caspase-Niveau auf als die Zelllinie D05. Auch hier bewirkte eine Kombination von IFN- β mit TMZ eine Erhöhung des Protein-Niveaus der gespaltenen Caspase-3 bzw. -7 im Vergleich zu den ausschließlich mit TMZ behandelten Proben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TMZ in den Zelllinien D05 und D14 eine Spaltung und damit Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 bewirkt. Diese Aktivierung wurde durch eine Vorinkubation mit IFN- β wesentlich verstärkt.

Ergebnisse

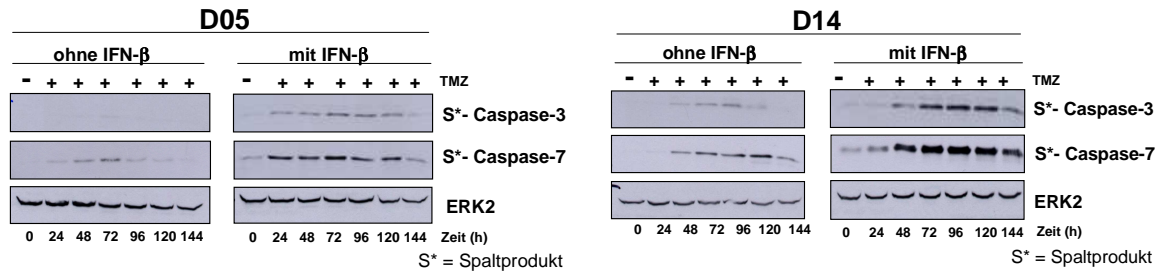


Abb. 3-23: Einfluss von Interferon- β auf die TMZ-induzierte Spaltung der Effektorcaspasen-3 und -7 in den Melanomzelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG und eine Behandlung mit 50 μ M TMZ. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und Cytoplasmaextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 μ g Protein eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen das Spaltprodukt der Caspase-3 bzw. -7 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.2.4 Zeitlicher Verlauf der Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung bzw. nach Kombinationsbehandlung bestehend aus Temozolomid und Interferon- β

Um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt der Zelltod nach Behandlung mit TMZ einsetzt, wurde die Apoptoserate als Funktion der Zeit nach Beginn der Behandlung bestimmt. Es wurden unbehandelte, ausschließlich mit IFN- β behandelte, ausschließlich mit TMZ + O⁶BG und mit IFN- β , TMZ + O⁶BG behandelte Versuchsreihen verglichen. Die IFN- β Gabe (300 I.E./ml) erfolgte 24 h vor TMZ-Behandlung. Nach 24-stündiger IFN- β Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 10 μ M O⁶BG inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 h mit 50 μ M TMZ behandelt und von 0 – 144 h Stunden alle 24 h Proben geerntet. Die Apoptoserate wurde durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. In Abb. 3-24 wurde die Apoptoserate gegenüber der Zeit aufgetragen. In der Zelllinie D05 blieb die Apoptoserate in den unbehandelten Kontrollen über den gesamten Zeitverlauf konstant niedrig (~8 %). Eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β zeigte zum Zeitpunkt 0 h noch keine Auswirkungen. Nach 24, 48 und 72 h konnte jedoch ein Anstieg der Zelltodrate auf bis zu 13 % beobachtet werden, welcher aber bis zu 144 h wieder auf das Kontroll-Niveau sank. Durch eine Behandlung mit TMZ und O⁶BG begann die Apoptoserate nach 72 h zu steigen und erreichte nach 144 h ihr Maximum von 30 %. Durch eine Kombination aus TMZ, O⁶BG und IFN- β stieg die Apoptoserate nach 144 h auf 50 % an. In der Zelllinie D14 blieb die Apoptoserate in der Kontrolle über den gesamten Zeitverlauf konstant bei ~7 %. Durch eine Inkubation mit IFN- β konnte schon zum Zeitpunkt 0 h eine leicht erhöhte Apoptoserate festgestellt werden (9,5 %). Diese erhöhte sich bis zu 48 h nach Inkubation

Ergebnisse

der Zellen auf ein Maximum von 14 % und nahm bis 144 h wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die Behandlung mit TMZ und O⁶BG führte bereits nach 24 h zu einer erhöhten Apoptoserate, welche nach 144 h bis auf 30 % anstieg. Durch eine Kombination von IFN- β mit TMZ und O⁶BG stieg die Apoptoserate nach 144 h auf 43 % an. Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die Zelllinie D05 in einem deutlich höheren Maß durch IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert wird als D14. Der Zeitpunkt der Apoptoseinduktion wird durch IFN- β nicht beeinflusst.

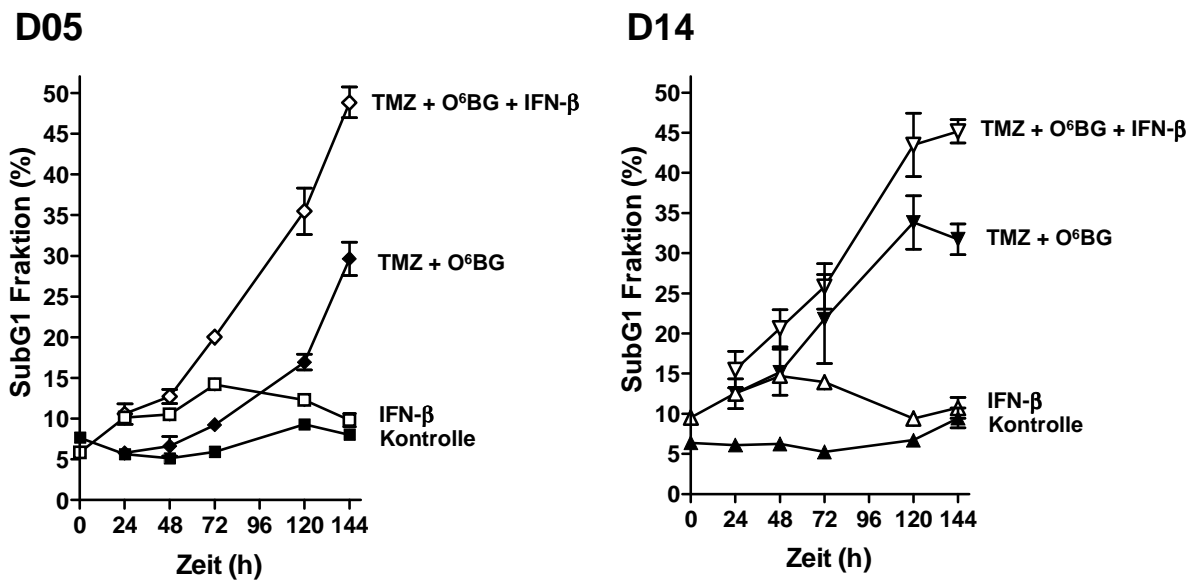


Abb. 3-24: Einfluss von Interferon- β auf den zeitlichen Verlauf der Apoptoserate nach Behandlung mit Temozolomid in den Melanomzelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel und eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG. Anschließend wurden die Zellen mit 50 μ M TMZ behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die Apoptoserate wurde mittels Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Einfluss von Interferon- β auf die Behandlung nicht-maligner Zellen mit Temozolomid und auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin oder ionisierender Strahlung

3.2.3.1 Kombinationswirkung von Temozolomid und Interferon- β auf humane Lymphozyten

Um den sensibilisierenden Effekt von IFN- β auf eine Behandlung mit TMZ in einem nicht malignen Zellsystem zu untersuchen, wurden humane Lymphozyten gewählt. Diese wurden aus „Buffy Coats“ isoliert. Lymphozyten sind, solange sie nicht durch eine Immunreaktion stimuliert werden, nicht-proliferierende Zellen. Experimentell können Lymphozyten durch eine Inkubation mit den Antikörpern CD3 und CD28 zur Proliferation angeregt werden. Dadurch ist es möglich, die Bedeutung der Proliferation auf eine Behandlung mit TMZ bzw. TMZ und IFN- β zu untersuchen. Sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen wurden mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach 24 h wurden sie mit 100 μ M TMZ behandelt, was entweder unter MGMT depletierten oder unter MGMT nicht depletierten Bedingungen erfolgte. 96 h nach TMZ-Gabe wurde am Durchflusszytometer die Proliferation der Zellen überprüft und die Zytotoxizität der Behandlung durch Bestimmung der SubG1 Fraktion ermittelt. Daraus ergaben sich die in Abb. 3-25 dargestellten Daten. Unter **A** sind nicht-proliferierende Lymphozyten dargestellt, welche vor der TMZ-Behandlung nicht mit O⁶BG inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen war eine Behandlung mit TMZ nicht toxisch und auch eine zusätzliche Vorinkubation mit IFN- β führte nicht zu einer Erhöhung des Zelltods. Für alle Ansätze blieb die SubG1 Fraktion unter 10 %. Unter **B** sind proliferierende Zellen dargestellt, welche vor der TMZ-Behandlung ebenfalls nicht mit O⁶BG inkubiert wurden. Auch hier war eine Behandlung mit TMZ in Anwesenheit von MGMT trotz Proliferation der Zellen nicht toxisch. Die Toxizität wurde nicht durch eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β gesteigert. Die Toxizität der verschieden behandelten Ansätze stieg nicht über 16 %. **C** zeigt nicht-proliferierende Lymphozyten, welche vor der TMZ-Behandlung mit O⁶BG inkubiert wurden. In nicht proliferierenden Zellen löste eine Behandlung mit TMZ trotz Depletion des Reparaturenzyms MGMT keine Apoptose aus. Auch durch eine Vorbehandlung mit IFN- β kam es unter diesen Bedingungen nicht zu einer Erhöhung des Zelltods. Die SubG1 Fraktion stieg in keinem der Ansätze über 10 %. **D** zeigt proliferierende Lymphozyten unter MGMT depletierten Bedingungen. Unter diesen Bedingungen war eine Behandlung mit TMZ toxisch und die SubG1 Fraktion stieg auf

Ergebnisse

56 %. Eine Vorbehandlung mit IFN- β führte zu einer Abnahme der Zelltodrate auf 41 %. Zusammenfassend konnte die Proliferationsabhängigkeit der TMZ vermittelten Apoptoseinduktion gezeigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass MGMT für die Sensitivität der Lymphozyten nach TMZ-Behandlung entscheidend ist. Eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β führte in Lymphozyten nicht zu einem Anstieg der Apoptoserate.

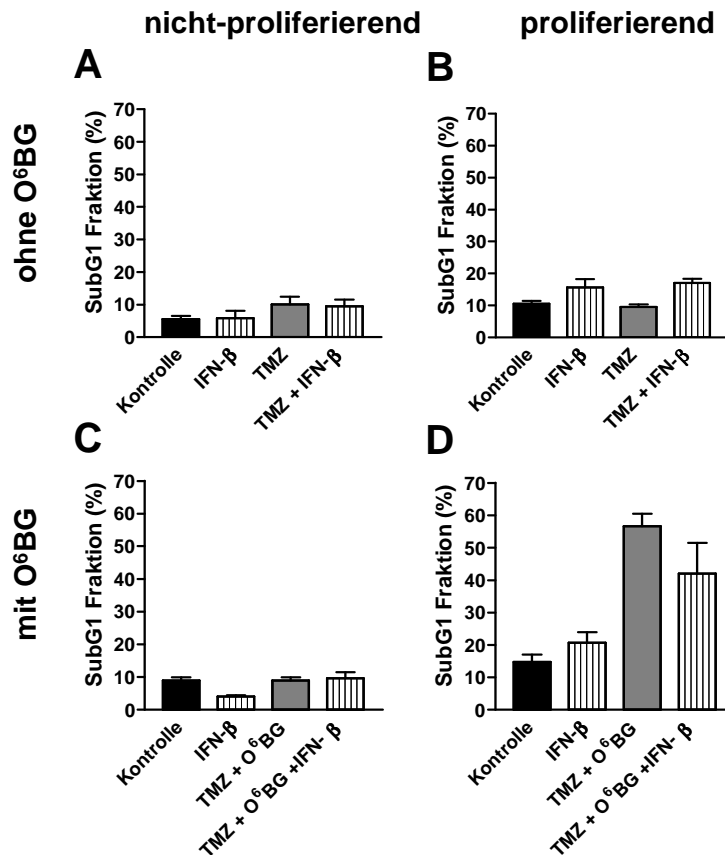


Abb. 3-25: Einfluss von Interferon- β auf die Temozolomid vermittelte Zytotoxizität in humanen Lymphozyten

Humane Lymphozyten wurden aus „Buffy Coats“ isoliert. Um sie zur Proliferation anzuregen, wurden sie mit CD3 und CD28 Antikörpern inkubiert. Sowohl proliferierende als auch nicht-proliferierende Zellen wurden mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. 24 h später wurden sie mit 100 μ M TMZ behandelt entweder mit einer Vorinkubation von 10 μ M O⁶BG oder ohne. 96 h nach TMZ-Gabe wurde am Durchflusszytometer die Proliferation der Zellen überprüft und die Zytotoxizität der Behandlung durch Bestimmung der SubG1 Fraktion ermittelt. (A) nicht-proliferierende Zellen ohne O⁶BG; (B) proliferierende Zellen ohne O⁶BG; (C) nicht-proliferierende Zellen mit O⁶BG; (D) proliferierende Zellen mit O⁶BG. Die dargestellten Ergebnisse setzten sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen zusammen.

3.2.3.2 Auswirkung von Interferon- β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin und ionisierender Strahlung

In der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms wird, neben den methylierenden Agenzien Dacarbazin oder Temozolomid, auch das chlorethylierende Agenz Fotemustin (FM) und ionisierende Strahlung (IR) verwendet. Um zu untersuchen, ob IFN- β Auswirkungen auf die Sensitivität der Zellen gegenüber FM hat, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel, um die Zellen mit 10 μ M O⁶BG vorzubehandeln. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 32 μ M FM behandelt und die Zelltodrate nach 144 h durch Ermittlung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Die dargestellten SubG1-Werte wurden hinsichtlich der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN- β behandelten Kontrollen korrigiert. In der MGMT profizienten Zelllinie D05 führte eine Behandlung mit FM nur zu einer sehr geringen Zelltodrate von 6 % (Abb. 3-26). Auch eine Vorbehandlung mit IFN- β konnte diese Rate nicht erhöhen. Wurden die Zellen jedoch mit dem MGMT Inhibitor O⁶BG vorbehandelt, stieg die Zelltodrate nach FM-Behandlung auf 20 % an. Unter MGMT depletierten Bedingungen hatte eine IFN- β Vorbehandlung einen signifikanten Anstieg der Zelltodrate auf 28 % zur Folge. In der MGMT defizienten Zelllinie D14 führte eine FM-Behandlung auch ohne O⁶BG-Inkubation zu einer Zelltodrate von 28 %. Eine Vorbehandlung mit O⁶BG führte nicht zu einer Erhöhung des Zelltods. Auch eine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β hatte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von O⁶BG keinen signifikanten Einfluss auf die SubG1 Fraktion.

Ergebnisse

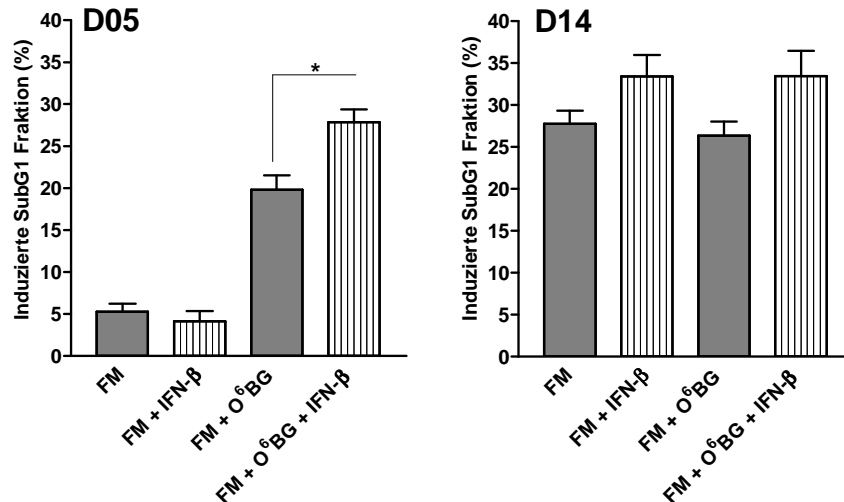


Abb. 3-26: Einfluss von Interferon-β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Inkubation mit 10 μM O⁶BG und eine Behandlung mit 32 μM FM. Nach 144 h wurden die Zellen geerntet und durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer die Toxizität der Behandlungen ermittelt. Die Zelltodrate wurde als relativer Anteil der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN-β behandelten Proben dargestellt und setzt sich aus drei unabhängigen Versuchen zusammen.

Zur Untersuchung des Einflusses von IFN-β auf IR, wurden die Zelllinien D05 und D14, wenn angegeben, für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit 4 bzw. 10 Gy bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgte ein Medienwechsel. Nach 96 h wurde durch Ermittlung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer die Zelltodrate bestimmt und als relativer Anteil der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN-β behandelten Proben dargestellt. In der Zelllinie D05 führte eine Bestrahlung der Zellen mit 4 Gy zu einem Anstieg der Zelltodrate auf 3% im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3-27). Durch eine Vorbehandlung mit IFN-β stieg die Zelltodrate auf 6 % an. Dieser Anstieg war nicht signifikant. Auch eine Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy ließ die Zelltodrate mit und ohne IFN-β Vorbehandlung nur auf 10 % steigen. In der Zelllinie D14 führte eine Bestrahlung der Zellen mit 4 Gy sowohl mit als auch ohne IFN-β Vorbehandlung zu einer induzierten SubG1 Rate von 3 – 4 %. Durch eine Bestrahlung mit 10 Gy erhöhte sich die Zelltodrate auf 16 % und blieb auch für die Kombinationsbehandlung mit IFN-β auf diesem Wert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit IFN-β in der Zelllinie D05 einen sensibilisierenden Effekt auf FM ausübt, wenn das Reparaturenzym MGMT depletiert wurde. In der Zelllinie D14 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. IR führt in beiden Zelllinien nur zu einer sehr geringen Zelltodrate, welche auch durch IFN-β nicht erhöht werden konnte.

Ergebnisse

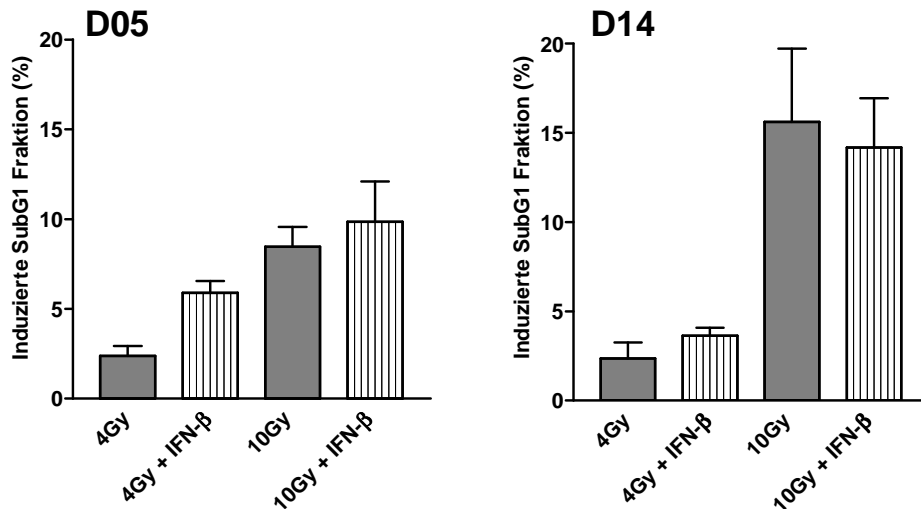


Abb. 3-27: Einfluss von Interferon-β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit ionisierender Strahlung

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Bestrahlung mit 4 bzw. 10 Gy. Nach 96 h wurden die Zellen geerntet und die Zytotoxizität durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. In allen Diagrammen wurde die Zelltodrate als relativer Anteil der unbehandelten bzw. nur mit IFN-β behandelten Proben graphisch dargestellt, welcher sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen zusammensetzt.

3.2.4 Identifizierung der Läsion, von welcher der sensibilisierende Effekt des Interferon-β gegenüber Temozolomid ausgeht

Die toxischste durch TMZ verursachte Läsion ist die mit ~8 % verhältnismäßig seltene Methylierung an der O⁶-Position des Guanins (O⁶MeG) (Pepponi et al. 2003; Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). O⁶MeG ist ein potenter Apoptose-Auslöser, wird jedoch sehr effizient von dem Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert (Pegg et al. 1993; Pegg et al. 1995; Ochs and Kaina 2000; Kaina et al. 2007). Weit häufiger werden die Position N7 des Guanins (N7MeG) mit 80 – 95 % und N3 des Adenins (N3MeA) methyliert. Diese Läsionen sind vor allem in nicht proliferierenden Zellen bzw. in MGMT profizienten Zellen für die Zytotoxizität von TMZ verantwortlich (Briegert and Kaina 2007). Wie unter 3.2.2.1 beschrieben, tritt in der Zelllinie D05 der sensibilisierende Effekt des IFN-β sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MGMT auf. Demnach könnte IFN-β sowohl die Toxizität der N-Methylierungen als auch die von O⁶MeG verstärken. Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, welche Läsion der Ausgangspunkt für den sensibilisierenden Effekt des IFN-β ist.

3.2.4.1 Auswirkung von Interferon- β auf die Zelltodrate nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens Methylmethansulphonat (MMS)

Durch das Alkylanz MMS werden hauptsächlich N-Alkylierungen hervorgerufen. Der Anteil von O⁶-Alkylierungen des Guanins beträgt maximal 0,3 % (Beranek 1990). Würde IFN- β die Toxizität der N-Alkylierungen verstärken, sollte eine Kombination von MMS und IFN- β in Anwesenheit von MGMT zu einer Erhöhung der Zelltodrate führen. Um den Einfluss von IFN- β auf die MMS-Behandlung zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die Behandlung mit MMS erfolgte als Pulsbehandlung mit 1 mM für 1 h entweder mit oder ohne IFN- β Vorbehandlung. Anschließend wurde das Medium gewechselt. Nach 144 h wurde die Zytotoxizität der Behandlungen durch Ermittlung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. In Abb. 3-28 sind die SubG1 Werte relativ zu der unbehandelten bzw. nur mit IFN- β behandelten Kontrolle dargestellt. Die p53-Wildtyp Zelllinie D05 zeigte in Anwesenheit von MGMT nach einer Behandlung mit MMS eine Zelltodrate von 4 %. Eine Vorbehandlung mit IFN- β führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der SubG1 Fraktion. Nach zusätzlicher Behandlung der Zellen mit O⁶BG stieg die Zelltodrate auf 15 % an. In Abwesenheit von MGMT führte eine IFN- β Vorbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der SubG1 Fraktion auf 33 %. In der p53-mutierten, MGMT defizienten Zelllinie D14 führte die MMS-Behandlung in Ab- und Anwesenheit von O⁶BG zu einer induzierten SubG1 Fraktion von 26 %. Eine zusätzliche Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β führte nicht zu einer Erhöhung der Sensitivität. Zusammenfassend konnte der sensibilisierende Effekt von IFN- β nur in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 und nur in Abwesenheit von MGMT beobachtet werden.

Ergebnisse

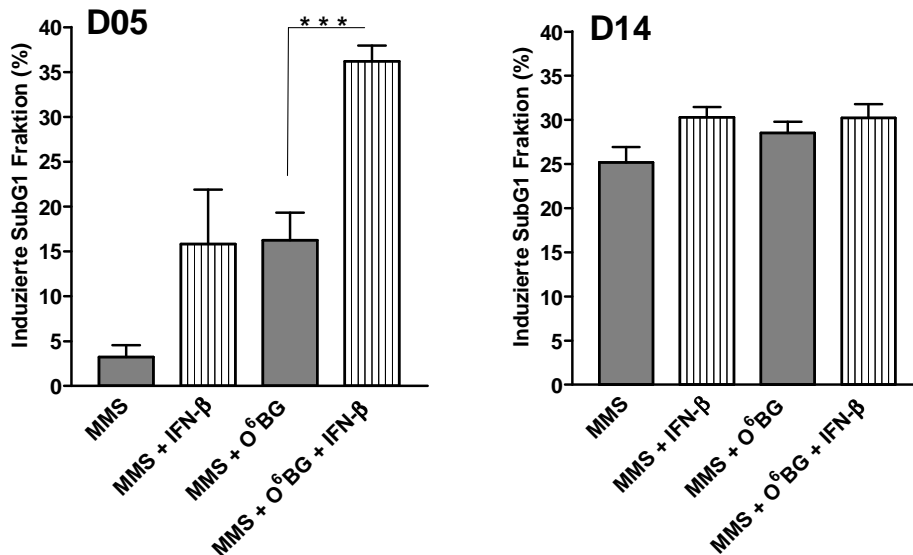


Abb. 3-28: Einfluss von Interferon-β auf die Behandlung der Zelllinien D05 und D14 mit MMS

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Danach erfolgte die Inkubation mit 10 μM O⁶BG und anschließend die Behandlung mit 1 mM MMS für 1 h. Die Zytotoxizität wurde mittels Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer gemessen. In beiden Diagrammen wurde die Zelltoderate als relativer Anteil der unbehandelten bzw. nur mit IFN-β behandelten Proben graphisch dargestellt. Die Werte setzten sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen zusammen.

3.2.4.2 Einfluss von Interferon-β auf die Apoptoserate nach Temozolomid-Behandlung in MGMT überexprimierenden Melanomzellen

In der p53-Wildtyp Zelllinie D05 führte eine Vorbehandlung mit IFN-β auch in Anwesenheit von MGMT zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate durch TMZ (3.2.2.1). Da diese Zelllinie MGMT mit einer Aktivität von 298 fmol/mg Protein aufweist und um auszuschließen, dass IFN-β einen Einfluss auf die Toxizität der N-Alkylierungen hat, wurde die Zelllinie D05 stabil mit MGMT transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde durch Western-Blot-Analysen und mit Hilfe des MGMT-Aktivitäts-Tests untersucht. Die Klone C4 und C30 wiesen in der Western-Blot-Analyse ein deutlich höheres MGMT-Niveau auf als die untransfizierten Zellen (Abb. 3-29 A). Auch war die MGMT-Enzymaktivität der beiden Klone C4 und C30 mit 796 bzw. 604 fmol/mg Protein doppelt so hoch wie in den nicht transfizierten D05 Zellen. Um die Auswirkungen von IFN-β auf die MGMT-Transfektanten zu untersuchen, wurden sowohl untransfizierte D05 Zellen als auch beide Klone mit 300 I.E./ml IFN-β für 24 h behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 50 μM TMZ behandelt. Nach 144 h wurde die Apoptoserate mittels SubG1-Messungen am Durchflusszytometer bestimmt. Während in den nicht-transfizierten Zellen eine Inkubation mit IFN-β zu einer Erhöhung der

Ergebnisse

Apoptoserate führte, war dieser Effekt in beiden MGMT-transfizierten Klonen nicht zu beobachten (Abb. 3-29 **B**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der sensibilisierende Effekt des IFN- β auf die TMZ-Behandlung nicht durch eine Verstärkung der Toxizität bedingt durch die N-Alkylierungen hervorgerufen wird, sondern von der Läsion O⁶MeG ausgeht. Dass IFN- β in der Zelllinie D05 auch ohne O⁶BG zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt, ist folglich auf das niedrige MGMT-Niveau zurückzuführen.

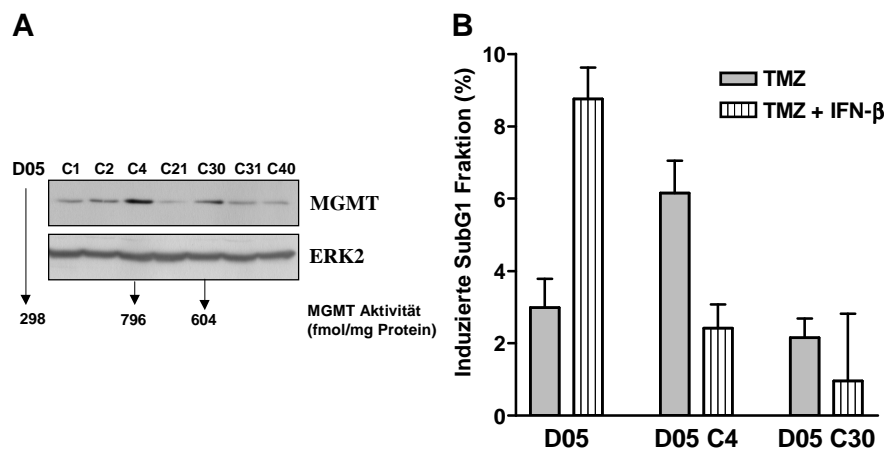


Abb. 3-29: Bestimmung der Apoptoserate nach Kombinationsbehandlung von Temozolomid und Interferon- β in stabil mit MGMT transfizierten Melanomzellen

(**A**) Die Zelllinie D05 wurde stabil mit MGMT transfiziert. Um die Effektivität der Transfektion zu überprüfen, wurden von nicht-transfizierten Zellen und MGMT-transfizierten Zellen Gesamtzellextrakte hergestellt und die MGMT-Expression durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Ebenfalls wurde ein MGMT-Aktivitätstest durchgeführt um die MGMT-Enzymaktivität (fmol/mg Protein) in nicht-transfizierten und MGMT-transfizierten Zellen zu vergleichen. (**B**) Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die nicht-transfizierten D05-Zellen und die ausgewählten Klone D05 C4 und D05 C30 für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Behandlung mit 50 μ M TMZ. Die Apoptoserate wurde nach 144 h durch Messung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Die Werte wurden als relativer Anteil der unbehandelten bzw. nur mit IFN- β behandelten Proben dargestellt und bestehen aus einem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5 Einfluss von Interferon- β auf die Prozessierung des Temozolomid-induzierten DNA-Schadens O⁶MeG und die darauf folgende Apoptose-Induktion

Unter 3.2.4.2 konnte gezeigt werden, dass die TMZ-induzierte Läsion O⁶MeG der Ausgangspunkt für den sensibilisierenden Effekt des IFN- β ist. In Anwesenheit des Reparaturenzyms MGMT wird die Läsion O⁶MeG sehr effizient repariert. Ist jedoch kein MGMT vorhanden, führt diese Läsion zu einer Basenfehlpaarung. Diese Fehlpaarung wird durch die Fehlpaarungs-Reparatur (mismatch-repair, MMR) in der S-Phase erkannt und prozessiert (Duckett et al. 1996). Im Verlauf dieses Reparaturschrittes kommt es zur Bildung von DSBs (Ochs und Kaina 2000), welche durch die Doppelstrangbruchreparatur repariert werden (Roos et al. 2009). Treten jedoch zu viele Doppelstrangbrüche (in Folge zu vieler O⁶MeG-Läsionen) im Genom auf, so führen diese sekundären Schäden zur Induktion von Zelltod (Lips and Kaina 2001a). IFN- β Behandlung könnte einen dieser Prozessierungsschritte beeinflussen und dadurch eine höhere Apoptoserate hervorrufen. Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, durch welche IFN- β die Toxizität von TMZ erhöhen könnte: i) IFN- β könnte das MGMT-Niveau, die MMR oder die DSB-Reparatur beeinflussen, welche an der Beseitigung des DNA-Schadens beteiligt sind; ii) IFN- β Vorbehandlung könnte zu einem höheren Niveau an DSB, den apoptoseauslösenden sekundären Läsionen, führen; iii) IFN- β könnte die Apoptose auslösende Signalkaskade verstärken. In den folgenden Abschnitten wurde der Einfluss von IFN- β auf die Reparatur bzw. Prozessierung der O⁶MeG-Läsion untersucht. Die letzten Punkte dieses Abschnittes befassen sich mit dem Einfluss von IFN- β auf den intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweg.

3.2.5.1 Einfluss von Interferon- β auf die Reparatur und Prozessierung der durch Temozolomid hervorgerufenen Läsionen

3.2.5.1.1 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die MGMT Expression

Für IFN- β wurde in Gliomzellen beschrieben, dass es MGMT p53 abhängig herunterreguliert und die Zellen daher gegenüber TMZ sensibilisiert (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008). Ob auch in den Melanomzellen D05 und D14 die MGMT Expression durch ein Behandlung mit IFN- β beeinflusst wird, wurde im Folgenden untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde bei allen

Ergebnisse

Ansätzen das Medium gewechselt und der 24 h Wert und die unbehandelte Kontrolle geerntet. An den darauf folgenden Tagen wurden 48 h und 72 h Werte geerntet. Nachdem Gesamtzellextrakte hergestellt wurden, konnte mittels Western-Blot-Analyse die MGMT Expression untersucht werden. In der p53-Wildtyp Zelllinie D05 konnte nach IFN- β Behandlung kein Einfluss auf das MGMT-Niveau beobachtet werden (Abb. 3-30). Da die Zelllinie D14 wie unter 3.2.1.3 beschrieben MGMT defizient ist, wurde hier kein MGMT nachgewiesen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit IFN- β weder in der p53-Wildtyp Melanomzelllinie D05 noch in der p53-mutierten Zelllinie D14 einen Einfluss auf das MGMT-Niveau hat.

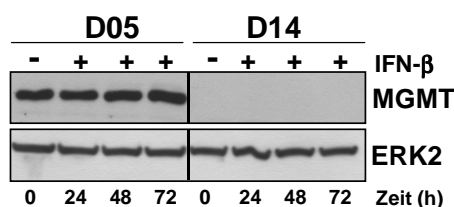


Abb. 3-30: Einfluss von Interferon- β auf die Expression des Reparaturenzyms MGMT

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach IFN- β Gabe geerntet. Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen MGMT inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.5.1.2 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Fehlpaarungs- Reparatur-Proteine

Um den Einfluss von IFN- β auf die Expression verschiedener MMR-Proteine zu untersuchen, wurden D05 und D14 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und der 24 h Wert und die unbehandelte Kontrolle geerntet. An den darauf folgenden Tagen wurden Zellen nach 48 h und 72 h Postinkubationszeit geerntet. Nachdem Gesamtzellextrakte hergestellt wurden, konnte mittels Western-Blot-Analyse die Expression der MMR-Proteine PMS2, MLH1, MSH2 und MSH6 untersucht werden. Abb. 3-31 zeigt, dass weder in der Zelllinien D05 noch in der Zelllinie D14 eine Behandlung mit IFN- β zu einer Veränderung in der Expression der untersuchten Proteine führte. Demnach scheint die MMR nicht durch eine IFN- β Behandlung beeinflusst zu werden.

Ergebnisse

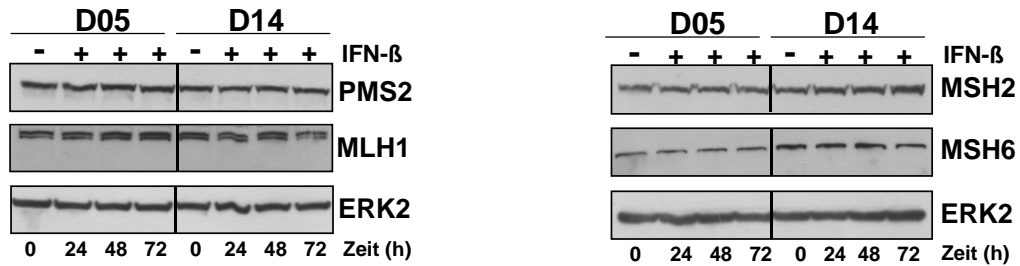


Abb. 3-31: Einfluss von Interferon- β auf die Expression der Fehlpaarungs-Reparaturenzyme PMS2, MLH1, MSH2 und MSH6

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach IFN- β Gabe geerntet. Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen PMS2, MLH1, MSH2 und MSH6 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.5.1.3 Interferon- β hat keinen Einfluss auf die Expression der Proteine der homologen Rekombination

Da gezeigt werden konnte, dass die durch TMZ-induzierten DSBs hauptsächlich über die Homologe Rekombination (HR) repariert werden (Roos et al. 2009), wurden die Proteine Rad51 und Rad52 der HR auf einen Einfluss von IFN- β hin untersucht. Hierfür wurden D05 und D14 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt und der 24 h Wert und die unbehandelte Kontrolle geerntet. An den darauf folgenden Tagen wurden Zellen nach 48 h und 72 h geerntet. Nachdem Gesamtzellextrakte hergestellt wurden, konnte mittels Western-Blot-Analyse die Expression von Rad51 und Rad52 untersucht werden. Weder in der Zelllinie D05 noch in der Zelllinie D14 konnte eine Veränderung in der Expression der untersuchten Proteine Rad51 und Rad52 durch IFN- β beobachtet werden (Abb. 3-32).

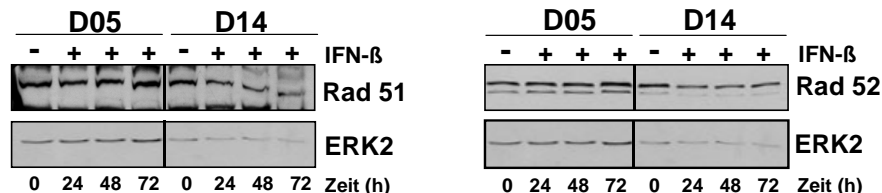


Abb. 3-32: Einfluss von Interferon- β auf die Expression der HR-Proteine Rad51 und Rad52

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach IFN- β Gabe geerntet. Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Rad51 und Rad52 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.5.2 Einfluss von Interferon- β auf die Anzahl der durch Temozolomid entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche

Nach einer Behandlung mit TMZ sind die im Zuge der Prozessierung der O⁶MeG-Läsion entstehenden DSBs die Apoptose auslösenden Läsionen (Lips and Kaina 2001a). Um den Einfluss von IFN- β auf die Induktion an DSBs zu untersuchen, wurde durch Immunfluoreszenz die schadensabhängige Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (γ H2AX) nachgewiesen. Die durch diese Methode nachweisbaren γ H2AX Foci gelten als Indikatoren für vorhandene DSBs (Sedelnikova et al. 2002; Ismail and Hendzel 2008). D05 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert. Danach erfolgte ein Medienwechsel und eine Behandlung mit 10 μ M O⁶BG. Anschließend wurden die Zellen mit 50 μ M TMZ behandelt, 24, 48 und 72 h nach TMZ-Gabe geerntet und für den Immunfluoreszenz-Nachweis aufbereitet. Die unbehandelten Kontrollen bzw. die ausschließlich mit IFN- β behandelten Proben wurden zusammen mit dem 24 h Wert geerntet. Für jeden Ansatz wurden 40 Zellen ausgezählt und der Mittelwert der Foci-Anzahl graphisch dargestellt. In der Zelllinie D05 konnten in der Kontrolle bzw. der IFN- β behandelten Probe im Durchschnitt zwischen 2 und 3 Foci pro Zelle gezählt werden (Abb. 3-33). Dieser Wert erhöhte sich 24 h nach TMZ-Behandlung auf 38 Foci pro Zelle. Er wurde auch durch die zusätzlich Inkubation mit IFN- β nicht signifikant verändert. 48 h und 72 h nach TMZ-Behandlung konnte kein weiterer Anstieg der Foci-Anzahl beobachtet werden. Auch die Kombination mit IFN- β ließ die Foci-Anzahl nicht ansteigen. Zusammenfassend konnte durch diese Methode kein höherer Wert an DSBs durch eine Vorbehandlung mit IFN- β nachgewiesen werden.

Ergebnisse

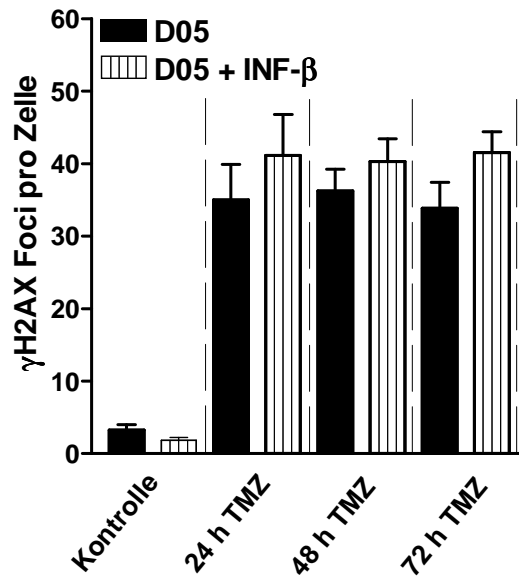


Abb. 3-33: Einfluss von Interferon-β auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Temozolomid-Behandlung

D05-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt, die Zellen mit 10 μM O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μM TMZ behandelt. 24 h, 48 h und 72 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und für die Immunfluoreszenz aufbereitet. In jedem der drei unabhängigen Versuche wurden für jeden Ansatz 40 Zellen ausgezählt und der Mittelwert graphisch dargestellt.

3.2.5.3 Einfluss von Interferon-β auf die Apoptose auslösenden Signalkaskaden

Um nach DNA-Schädigung Apoptose auszulösen, stehen der Zelle zwei Signalwege zur Verfügung. Der mitochondrial vermittelte (intrinsische) Apoptoseweg und der Rezeptor-vermittelte (extrinsische) Weg. Da, wie unter 3.2.5.1 und 3.2.5.2 gezeigt wurde, IFN-β keinen Einfluss auf die Reparatur der durch TMZ hervorgerufenen Läsionen hatte und auch die Anzahl der entstehenden DSB durch IFN-β nicht erhöht wurde, könnte der sensibilisierende Effekt durch eine Verstärkung der apoptotischen Signale hervorgerufen werden. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von IFN-β auf das Expressionsniveau einiger relevanter Proteine der beiden Apoptose-Signalkaskaden untersucht.

3.2.5.3.1 Interferon-β hat in der Zelllinie D14, nicht aber in der Zelllinie D05, einen Einfluss auf den intrinsischen Apoptoseweg

Wie unter 1.7.1 beschrieben, stehen die Mitochondrien im Mittelpunkt des intrinsischen Apoptoseweges. Nach einem apoptotischen Stimulus kommt es durch Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak zur Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran und dadurch zur Freisetzung von Cytochrom C. Die Bildung der

Ergebnisse

Poren kann durch anti-apoptotische Proteine, wie das hier untersuchte Bcl2, verhindert werden. Das pro-apoptotische Protein Puma beeinflusst negativ die Funktion der anti-apoptotischen Proteine der Bcl2-Familie und begünstigt dadurch die Bax und Bak vermittelte Porenbildung in den Mitochondrien. Daher wurde der Einfluss von IFN- β auf die Expression dieser Proteine untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel und eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG. Um einen apoptotischen Stimulus zu erhalten, wurden die Zellen mit 50 μ M TMZ behandelt und 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h nach TMZ-Gabe geerntet. Die unbehandelten Kontrolle sowie die ausschließlich mit IFN- β behandelten Proben wurden zum Zeitpunkt 0 h geerntet. Nach der Herstellung von Cytoplasmaextrakten wurden durch Western-Blot-Analysen die Expression der Proteine Puma, Bak, Bax und Bcl2 nachgewiesen. Abb. 3-34 zeigt, dass die Expression des pro-apoptotischen Proteins Puma sowohl in der Zelllinie D05 als auch in der Zelllinie D14 zu späten Zeitpunkten nach TMZ-Behandlung abnimmt. Dies ist dadurch zu erklären, dass zu diesen späten Zeitpunkten bereits sehr viele Zellen apoptotisch sind und dadurch die Proteine nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax nimmt in der Zelllinie D05 nach TMZ-Behandlung zu. Jedoch wird die Zunahme durch eine Inkubation mit IFN- β nicht beeinflusst. In der Zelllinie D14 bleibt die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax nach einer Behandlung der Zellen mit TMZ konstant. Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- β kann Bax im Cytoplasma kaum noch nachgewiesen werden. Die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bak bleibt in beiden Zelllinien nach einer TMZ-Behandlung auf einem konstanten Niveau und wird auch durch eine zusätzliche Inkubation mit IFN- β nicht verändert.

Zusammenfassend hatte eine zusätzlich zu TMZ erfolgte Behandlung der Zellen mit IFN- β nur in der Zelllinie D14 einen Effekt auf das Expressionsniveau des pro-apoptotischen Proteins Bax. Das Expressionsniveau aller weiteren untersuchten Proteine wurde in keiner der beiden Zelllinien durch eine Vorbehandlung mit IFN- β verändert.

Ergebnisse

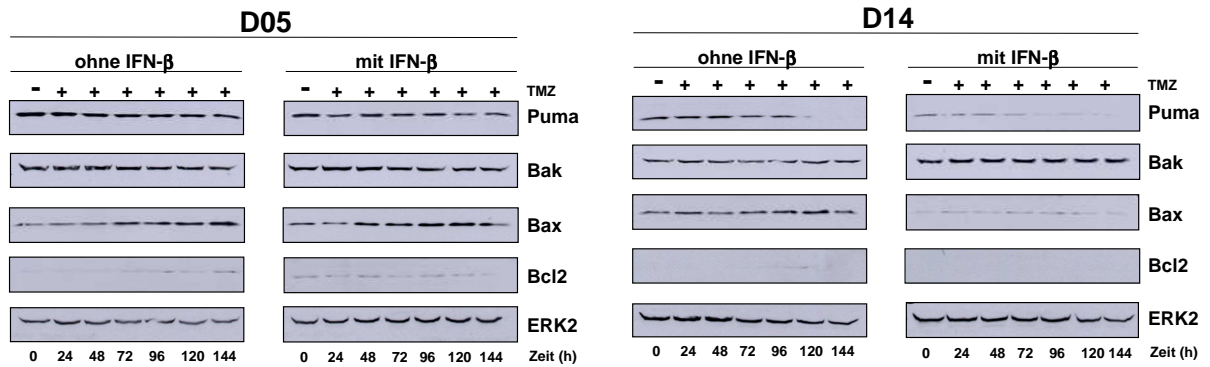


Abb. 3-34: Einfluss von Interferon- β auf die Expression der pro-apoptischen Proteine Puma, Bak und Bax und das anti-apoptische Protein Bcl2 nach Temozolomid-Behandlung

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG und eine Behandlung mit 50 μ M TMZ. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und Cytoplasmaextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analysen wurden je 30 μ g Protein eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen Puma, Bak, Bax oder Bcl2 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.5.3.2 Interferon- β führt zu einer verstärkten Expression der Pro-Caspase-8, beeinflusst jedoch nicht die Expression des Fas-Rezeptors

Wie unter 1.7.2 beschrieben, wird bei einer Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges das Fas-Rezeptor-Protein in den Zellen p53-abhängig heraufreguliert. Nach Aktivierung des Fas-Rezeptors wird die Fas-assoziierte-Todesdomäne (FADD) rekrutiert, um daraufhin die Pro-Caspase-8 zu rekrutieren und zu aktivieren. Diese aktive Initiatorcaspase spaltet direkt die Effectorcaspasen-3 und -7, welche Apoptose auslösen. Die Caspase-8 übernimmt somit eine Schlüsselrolle im extrinsischen Apoptoseweg. Um den Einfluss von IFN- β auf das Expressionsniveau der Pro-Caspase-8 zu untersuchen, wurden D05 und D14 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeiten nach IFN- β Gabe geerntet. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. Nach der Herstellung von Cytoplasmaextrakten wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen Pro-Caspase-8 durchgeführt. Abb. 3-35 A zeigt, dass das Pro-Caspase-8 Proteinniveau in beiden Zelllinien in den unbehandelten Kontrollen kaum nachweisbar war. Erst durch 24-stündige IFN- β Inkubation stieg das Pro-Caspase-8 Proteinniveau in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 stark an und blieb bis 72 h nach IFN- β Gabe auf einem konstant hohen Niveau. In der p53-mutierten Zelllinie D14 war dieser IFN- β bedingte Anstieg des Pro-Caspase-8 Niveaus ebenfalls vorhanden, jedoch deutlich geringer. Auch die Expression des Fas-Rezeptors nach IFN- β Gabe wurde untersucht. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen zu den

Ergebnisse

entsprechenden Zeiten nach IFN- β Gabe geerntet und Membranextrakte hergestellt. Durch eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den Fas-Rezeptor konnte dessen Expression nachgewiesen werden. Weder in der Zelllinie D05 noch in der Zelllinie D14 führte eine Inkubation mit IFN- β zu einer Hochregulation des Fas-Rezeptors auf Proteinebene (Abb. 3-35 **B**).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine 24-stündige IFN- β Behandlung in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 zu einer verstärkten Expression der Pro-Caspase-8 führte, welche in der p53-mutierten Zelllinie zwar ebenfalls zu beobachten war, jedoch in einem deutlich schwächeren Ausmaß. Die Expression des Fas-Rezeptor Proteins auf der Zelloberfläche wurde in keiner der beiden Zelllinien durch IFN- β beeinflusst.

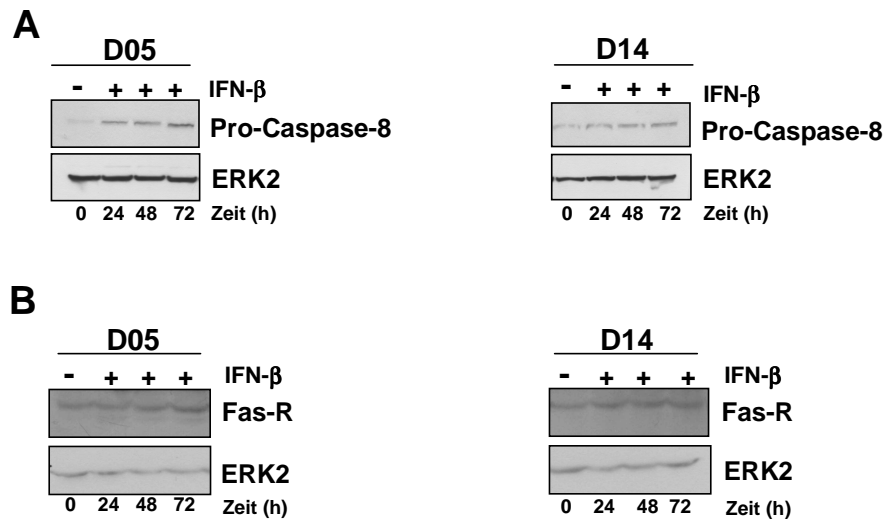


Abb. 3-35: Einfluss von Interferon- β auf die Expression der für den extrinsischen Apoptoseweg essenziellen Proteine Pro-Caspase-8 und Fas-Rezeptor

D05- und D14-Zellen wurden für 24 h mit IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach IFN- β Gabe geerntet. (**A**) Für die Western-Blot-Analyse wurden Cytoplasmaextrakte hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Pro-Caspase-8 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle. (**B**) Für die Western-Blot-Analyse wurden Membranextrakte hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Ergebnisse

3.2.6 Verifizierung der Ergebnisse durch eine weitere p53-Wildtyp Melanomzelllinie (A375) und eine weitere p53-mutierte Melanomzelllinie (RPMI 7951)

IFN- β hat nach den bisher erlangten Erkenntnissen in p53-Wildtyp Melanomzellen einen stärkeren sensibilisierenden Einfluss auf eine TMZ-Behandlung als in p53-mutierten Melanomzellen. Der sensibilisierende Effekt von IFN- β wurde mit einer verstärkten Expression der für den extrinsischen Apoptoseweg essentiellen Pro-Caspase-8 in Verbindung gebracht. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen für die beiden Melanomzelllinien D05 und D14 einzigartigen Effekt handelt, wurde eine weitere p53-Wildtyp (A375) und eine weitere mutierte Melanomzelllinie (RPMI 7951) hinsichtlich des Einflusses von IFN- β auf die TMZ-Sensitivität und die Expression der Pro-Caspase-8 untersucht. Um den sensibilisierenden Effekt von IFN- β auf TMZ zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Die entsprechenden Kontrollen wurden nicht behandelt. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen mit 10 μ M O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μ M TMZ behandelt. 144 h nach TMZ-Gabe wurden die Proben geerntet und mittels Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer die Zytotoxizität ermittelt. Abb. 3-36 A zeigt die Zelltodraten nach den verschiedenen Behandlungen. Die p53-Wildtyp Zelllinie A375 zeigte in Anwesenheit von MGMT eine geringe Toxizität gegenüber TMZ, welche auch durch IFN- β nicht gesteigert werden konnte. Ist jedoch MGMT durch den Inhibitor O⁶BG depletiert, zeigte die alleinige TMZ-Behandlung eine leicht erhöhte Toxizität mit einer Apoptoserate von 6 %, womit diese Zelllinie vergleichsweise resistent auf TMZ reagierte. Durch die 24-stündige Vorinkubation mit IFN- β konnte die Apoptoserate unter MGMT depletierten Bedingungen auf 22 % gesteigert werden. In der p53-mutierten Zelllinie RPMI 7951 hatte eine Vorbehandlung mit IFN- β weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von MGMT einen Einfluss auf die Apoptoserate nach TMZ-Behandlung.

Ergebnisse

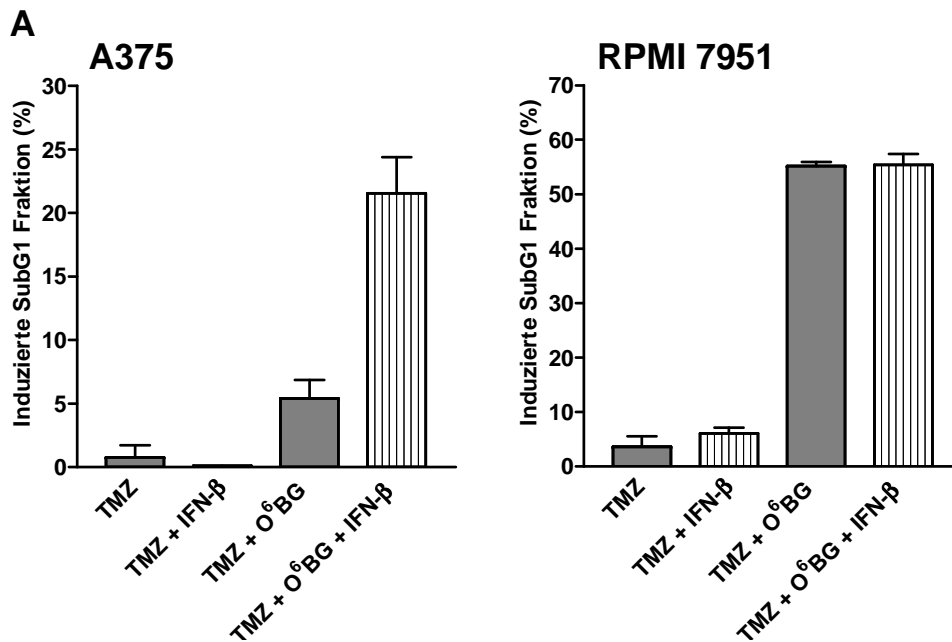


Abb. 3-36 A: Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung aus Temozolomid und Interferon - β in den Zelllinien A375 und RPMI 7951

A375- und RPMI 7951-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Inkubation mit 10 μ M O⁶BG und anschließend die Behandlung mit 50 μ M TMZ. Die Zytotoxizität wurde mittels Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer gemessen. In beiden Diagrammen wurde die Zelltodrate als relativer Anteil der unbehandelten bzw. nur mit IFN- β behandelten Proben graphisch dargestellt, welche sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen zusammensetzt.

Um den Einfluss von IFN- β auf die Expression der Pro-Caspase-8 in diesen Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeiten nach IFN- β Gabe geerntet. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. Nach der Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen Pro-Caspase-8 durchgeführt. Die Abb. 3-36 **B** zeigt, dass das Pro-Caspase-8 Proteinniveau in der p53-Wildtyp Zelllinie A375 in der unbehandelten Kontrolle kaum nachweisbar war, vergleichbar zu der Zelllinie D05 (vgl. Abb. 35 **A**). Durch die 24-stündige Inkubation mit IFN- β konnte auch in dieser p53-Wildtyp Zelllinie das Pro-Caspase-8 Proteinniveau nach Behandlung deutlich erhöht werden. Diese Erhöhung blieb bis 72 h nach IFN- β Behandlung auf einem konstant hohem Niveau. In der p53-mutierten Zelllinie RPMI 7951 war die Expression der Pro-Caspase-8 bereits in der Kontrolle verhältnismäßig hoch und konnte durch IFN- β nicht gesteigert werden. Zusammenfassend konnte in der p53-Wildtyp Zelllinie A375 unter MGMT depletierten Bedingungen eine deutliche Sensibilisierung durch IFN- β gegenüber TMZ sowie eine

Ergebnisse

Hochregulation der Pro-Caspase-8 nachgewiesen werden. In der p53-mutierten Zelllinie RPMI 7951 war dies nicht zu beobachten.

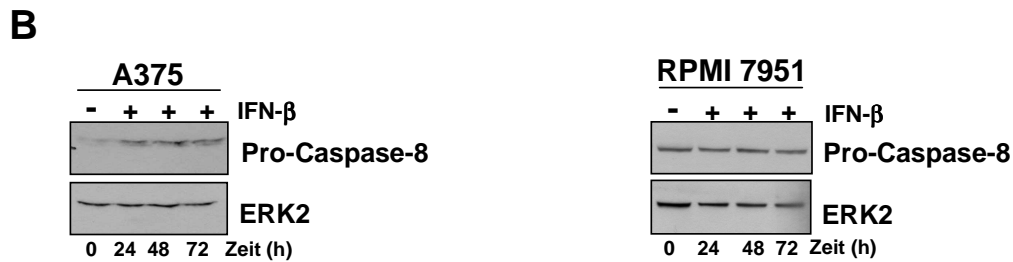


Abb. 3-36 B: Beeinflussung des Pro-Caspase-8 Niveaus durch Interferon- β in den Zelllinien A375 und RPMI 7951

A375- und RPMI 7951-Zellen wurden für 24 h mit IFN- β behandelt. Danach wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach IFN- β Gabe geerntet. Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzellextrakten hergestellt und je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Pro-Caspase-8 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.2.7 Untersuchungen zur Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose in malignen Melanomzelllinien durch eine Interferon- β induzierte verstärkte Expression der Pro-Caspase-8

Nach TMZ-Behandlung wird in p53-Wildtyp Gliomzellen und humanen Lymphozyten über den Fas-Rezeptor vermittelten Signalweg Apoptose ausgelöst, weshalb p53-Wildtyp Zellen deutlich sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ reagieren als p53-mutierte Zellen (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). Nach den bisherigen Untersuchungen trifft dies für Melanomzellen nicht zu. Nach TMZ-Behandlung scheint in Melanomzellen Apoptose über den mitochondrialen Weg vermittelt zu werden (siehe 3.2.1.2), weshalb p53-Wildtyp Zellen im Vergleich zu p53-mutierten Zellen nicht sensitiver auf die Behandlung mit TMZ reagieren. Hinzu kommt, dass in drei der vier untersuchten Melanomzelllinien (D05, D14 und A375) die Pro-Caspase-8, welche essentiell für den extrinsischen Apoptoseweg ist, nahezu nicht nachweisbar war. Erst eine Vorbehandlung mit IFN- β bewirkte eine Sensibilisierung der p53-Wildtyp Zellen gegenüber TMZ-Behandlung, was in p53-mutierten Zellen gar nicht oder in geringerem Ausmaß zu beobachten war. Die Sensibilisierung ging mit einer IFN- β vermittelten Hochregulation der Pro-Caspase-8 einher. Im Folgenden wurde untersucht, ob durch die IFN- β vermittelte Hochregulation der Pro-Caspase-8 in den p53-Wildtyp Zellen die Aktivierung des Fas-Rezeptor- sowie des TRAIL-Rezeptor- vermittelten Apoptoseweges nach TMZ-Behandlung ermöglicht wird.

3.2.7.1 Einfluss von Interferon- β auf die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Melanomzelllinien D05 und D14 nicht oder nur eingeschränkt in der Lage sind, den Fas-Rezeptor vermittelten Apoptoseweg zu nutzen. Weiterhin wurde mit Hilfe eines Fas-aktivierenden Antikörpers untersucht, ob eine Vorbehandlung mit IFN- β die Aktivierbarkeit des Fas-Rezeptor vermittelten Apoptoseweges beeinflusst. Für diese Versuchsreihe war es essentiell, dass sich zum Zeitpunkt der Gabe des Fas-aktivierenden Antikörpers der Fas-Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen befindet. Wie u. a. für Gliomzellen beschrieben, führt eine Behandlung mit TMZ in p53-Wildtyp Zellen zu einer Hochregulation des Fas-Rezeptors und zu dessen Anreicherung an der Zelloberfläche (Muller et al. 1998). Um zu untersuchen, ob auch in Melanomzellen eine TMZ-Behandlung zur p53 abhängigen Hochregulation des Fas-Rezeptors führt, wurden D05 und D14 Zellen mit 10 μ M O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μ M TMZ behandelt. 72 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und Membranextrakte hergestellt. Durch Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor konnte seine Expression nachgewiesen werden. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. Die Western-Blot-Analyse in Abb. 3-37 A zeigte, dass ohne TMZ-Behandlung der Fas-Rezeptor in der Membran nur sehr schwach exprimiert wurde. 72 h nach TMZ-Gabe konnte dagegen eine stark erhöhte Expression des Fas-Rezeptors in der Membran der p53-Wildtyp Zelllinie D05 nachgewiesen werden. In der p53-mutierten Zelllinie D14 war dies nicht zu beobachten. Aufgrund dieser Untersuchung wurde für die Zugabe des Fas-aktivierenden Antikörpers der Zeitpunkt 72 h nach TMZ-Behandlung gewählt. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten die p53-Wildtyp Zellen D05 bereits sehr stark den Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, die Apoptoserate war jedoch noch gering (vgl. 3.2.2.4), so dass sie durch den Fas-aktivierenden Antikörper gesteigert werden konnte. Der verwendete Antikörper bindet und aktiviert den Fas-Rezeptor und aktiviert dadurch die Rezeptor-vermittelte Apoptosekaskade. D05 und D14 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt, die Zellen mit 10 μ M O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 μ M TMZ behandelt. 72 h nach TMZ-Behandlung wurden die Zellen für 24 h mit 25 ng/ml eines Fas-aktivierenden Antikörpers inkubiert oder nicht. Alle Ansätze wurden zusätzlich mit 25 ng/ml Protein A behandelt. Nach 24-stündiger Antikörper-Inkubation wurden die Zellen geerntet und für die Bestimmung der Apoptose-/Nekrosefrequenz am Durchflusszytometer mit Annexin V/Propidiumjodid gefärbt. In

Ergebnisse

Abb. 3-37 **B** ist die relative Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung dargestellt. Alle Werte wurden vorher hinsichtlich der unbehandelten Kontrolle korrigiert. In der Zelllinie D05 bewirkte die alleinige Behandlung der Zellen mit dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säule **1**) oder mit IFN- β (Säule **2**) keine Steigerung der relativen Apoptoserate. IFN- β kombiniert mit dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säule **3**) führte zu einer Steigerung der Apoptoserate um das 7-fache, vergleichbar der Kombinationsbehandlung von TMZ, O⁶BG und IFN- β (Säule **6**). Für die in diesem Abschnitt relevante Fragestellung ist der Vergleich der beiden folgenden Behandlungen entscheidend. Wurden die Zellen nur mit TMZ, O⁶BG und dem Fas-aktivierenden Antikörper behandelt (Säule **5**), stieg die relative Apoptoserate um das 8-fache. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- β (Säule **7**) ließ unter diesen Bedingungen die relative Apoptoserate um das 17-fache ansteigen. In der Zelllinie D14 zeigte der Vergleich zwischen TMZ + O⁶BG kombiniert mit dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säule **5**) und einer zusätzlichen Vorbehandlung mit IFN- β (Säule **7**) zwar auch eine Erhöhung der relativen Apoptoserate, jedoch nur von einer Verdopplung auf das 6-fache. Somit war dieser Anstieg deutlich geringer als in der Zelllinie D05.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der p53-Wildtyp Zelllinie D05 mit TMZ, O⁶BG und dem Fas-aktivierenden Antikörper nur zu einem geringen Anstieg der Apoptoserate führte. Erst durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- β konnte in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 deutlich die Fas-Rezeptor vermittelten Apoptoserate gesteigert werden. Dies war in der p53-mutierten Zelllinie D14 nicht der Fall. Demnach scheint sowohl die TMZ vermittelte und p53 abhängige Hochregulation des Fas-Rezeptors als auch die IFN- β Vorbehandlung notwendig zu sein, um in der Zelllinie D05 die Fas-Rezeptor abhängige Apoptosekaskade zu aktivieren.

Ergebnisse

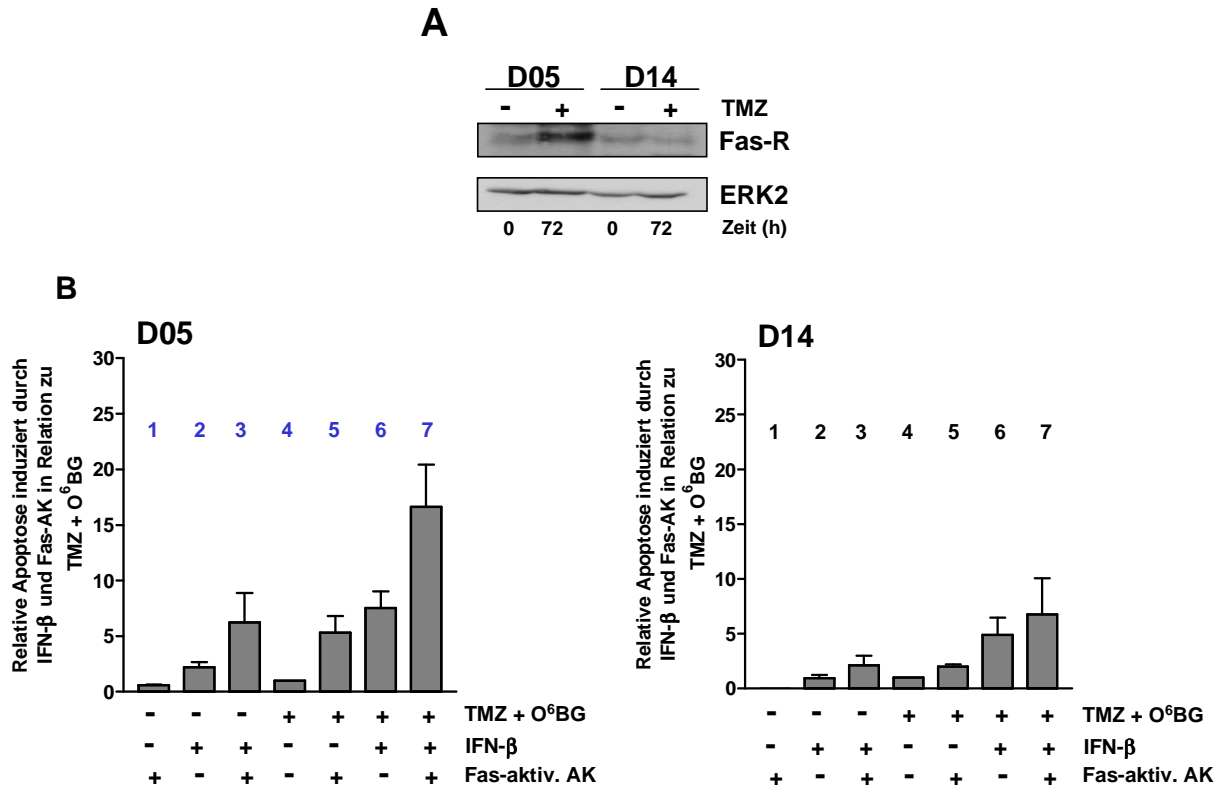


Abb. 3-37: Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose durch Interferon-β in den Zelllinien D05 und D14

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG inkubiert und anschließend für 72 h mit 50 μM TMZ behandelt. Anschließend wurden Membranextrakte hergestellt und je 30 μg Protein für die Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den Fas-Rezeptor verwendet. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen. ERK2 diente als Ladekontrolle. (B) Die Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen mit 10 μM O⁶BG inkubiert und mit 50 μM TMZ behandelt. 72 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen, wenn angegeben, für 24 h mit 25 ng/ml eines Fas-aktivierenden Antikörpers behandelt. Zusätzlich wurden alle Ansätze mit 25 ng/ml Protein A behandelt. Die Bestimmung der Apoptosefrequenz durch Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung erfolgte am Durchflusszytometer. In den Graphen ist die relative Apoptose im Vergleich zu alleiniger TMZ-Behandlung dargestellt. Zusätzlich wurden alle Werte hinsichtlich der Apoptose in der unbehandelten Kontrolle korrigiert. Die Ziffern 1-7 stellen verschiedene Behandlungsschemata dar. **1:** Fas-aktivierender Antikörper, **2:** IFN-β, **3:** IFN-β + Fas aktivierender Antikörper, **4:** TMZ + O⁶BG, **5:** TMZ + O⁶BG + Fas aktivierender Antikörper, **6:** TMZ + O⁶BG + IFN-β, **7:** TMZ + O⁶BG + IFN-β + Fas aktivierender Antikörper. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Ergebnisse

3.2.7.2 Stabile Transfektion der Zelllinien D05 und A375 mit DN-FADD und deren Auswirkungen auf die Interferon- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber Temozolomid

In der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose spielt FADD eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Pro-Caspase-8. DN-FADD ist durch eine Mutation im FADD-Protein nicht in der Lage, die Pro-Caspase-8 zu rekrutieren. Eine stabile Transfektion der Zellen mit DN-FADD hat zur Folge, dass dieses nicht funktionsfähige Protein im Vergleich zum endogen exprimierten Protein in den Zellen überexprimiert wird, was den Fas-Rezeptorweg beeinträchtigt. Um den Einfluss einer Beeinträchtigung des Fas-Rezeptorweges auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ zu untersuchen, wurden die Zelllinien D05 und A375 stabil mit DN-FADD transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion, anhand einer Überexpression an FADD, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen FADD durchgeführt. Hierfür wurden sowohl von den transfizierten als auch den untransfizierten Zellen Gesamtzellextrakte hergestellt. Abb. 3-38 A zeigt eine deutliche Überexpression an FADD in den Klonen D05 DN-FADD1, D05 DN-FADD2, A375 DN-FADD 15 und A375 DN-FADD 16, hervorgerufen durch die stabile Transfektion mit DN-FADD. Das endogen exprimierte FADD ist in den untransfizierten Kontrollen, bei den hier gewählten Belichtungszeiten, aufgrund der starken Überexpression an DN-FADD nicht nachzuweisen.

Da, wie unter 3.2.7.1 beschrieben, IFN- β die Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose steigert, wurden die Experimente mit einem Fas-aktivierenden Antikörper für die beiden stabil mit DN-FADD transfizierten Zelllinien D05 und A375 durchgeführt und mit den untransfizierten Kontrollen verglichen. Hierfür wurden D05, D05 DN-FADD1, D05 DN-FADD2, A375, A375 DN-FADD 15 und A375 DN-FADD 16 Zellen wie bereits unter 3.2.7.1 beschrieben behandelt. In Abb. 3-38 B + C ist die Apoptoserate nach den jeweiligen Behandlungen, dargestellt. Abb. 3-38 B zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie D05. In den unbehandelten Kontrollen der Zelllinie D05 sowie der DN-FADD transfizierten Klone lag die Apoptoserate bei 2 – 3 % (Säulen 1). Eine Behandlung der Zellen ausschließlich mit dem Fas-aktivierenden Antikörper führte nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate (Säulen 2). Eine alleinige Inkubation mit IFN- β (Säulen 3) führte in den untransfizierten Zellen zu einem Anstieg der Apoptoserate auf 7 % und wirkte in beiden DN-FADD transfizierten Klonen nicht toxisch. Die Toxizität der IFN- β Behandlung wurde in den nicht transfizierten Zellen durch eine zusätzliche Inkubation mit dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 4) auf 10 % gesteigert, nicht jedoch in den Klonen

Ergebnisse

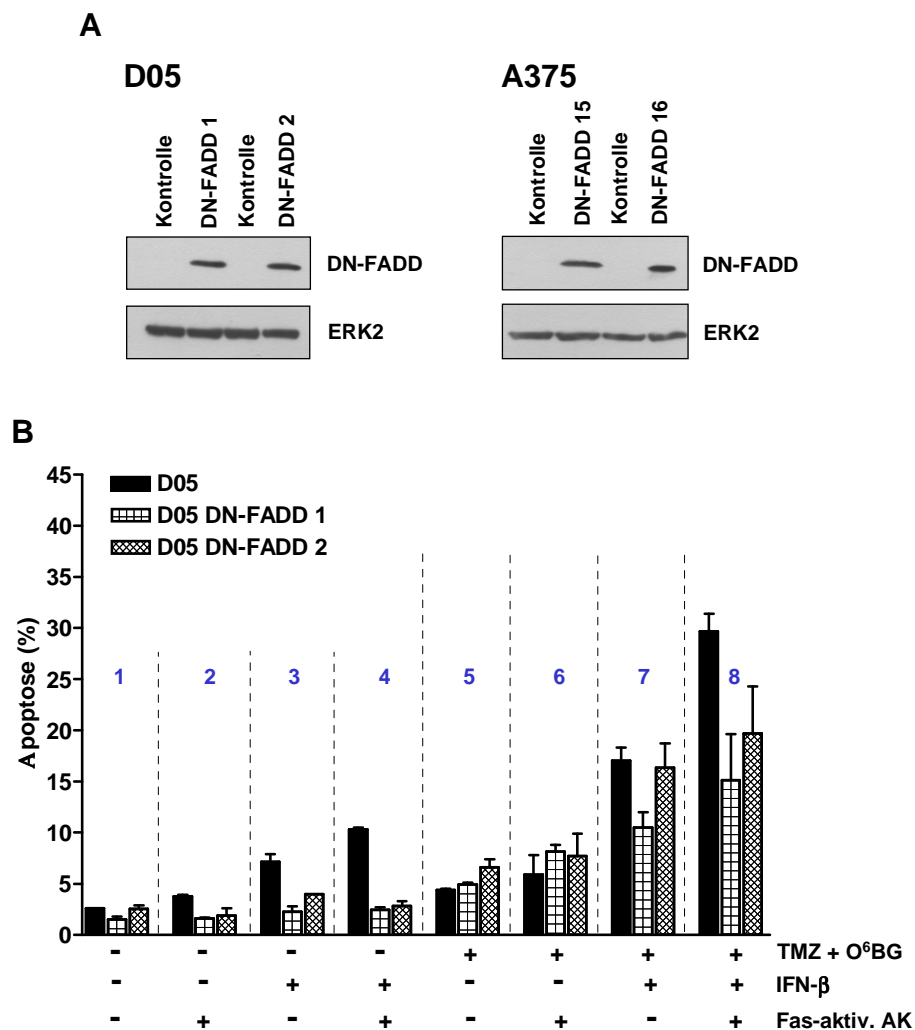
DN-FADD1 und DN-FADD2. Die Behandlung der Zellen ausschließlich mit TMZ und O⁶BG (Säulen 5) führte sowohl für untransfizierte Zellen als auch transfizierte Zellen zu einer Apoptoserate von 5 – 7 %. Eine Behandlung der Zellen mit TMZ, O⁶BG und IFN- β (Säulen 7) rief in den nicht transfizierten Zellen und dem Klon DN-FADD 2 eine Apoptoserate von 17 % hervor, in dem Klon DN-FADD 1 nur von 12 %. Die zwei ausschlaggebenden Behandlungsansätze waren Behandlung der Zellen mit TMZ, O⁶BG und dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 6) und, im Vergleich dazu, Behandlung der Zellen mit TMZ, O⁶BG, dem Fas-aktivierenden Antikörper und zusätzlich IFN- β (Säulen 8). Wurde der Fas-Rezeptorweg nach Behandlung der Zellen mit TMZ und O⁶BG durch den Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 6) aktiviert, so zeigten die nicht transfizierten Zellen einen Anstieg der Apoptoserate auf 7 %. Die Transfektion mit DN-FADD hatte hier keinen Einfluss auf die Apoptoserate im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Durch eine zusätzliche Inkubation mit IFN- β (Säulen 8) konnte in den untransfizierten Zellen die Apoptoserate auf 30 % gesteigert werden. Diese IFN- β bedingte Steigerung der Apoptoserate war in den DN-FADD transfizierten Klonen deutlich schwächer. Hier stieg die Apoptoserate in beiden Klonen nur auf 16 – 19 % an.

In der Zelllinie A375 wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet (Abb. 3-38 C). Hier lag die Basale-Apoptoserate für die unbehandelten Kontrollen bei 2 % (Säulen 1). Weder eine Behandlung der Zellen mit dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 2) noch mit IFN- β (Säulen 3) steigerte die Apoptoserate. Untransfizierte A375 Zellen und die DN-FADD transfizierten Klone 15 und 16 verhielten sich gleich. Durch eine Kombination aus IFN- β und dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 4) stieg die Apoptoserate sowohl für die untransfizierten als auch für die DN-FADD transfizierten Zellen auf 6 %. Nach einer Behandlung mit TMZ und O⁶BG (Säulen 5) stieg die Apoptoserate auf 15 % an. Eine Transfektion mit DN-FADD hatte unter diesen Bedingungen keine Auswirkungen auf die Apoptoserate. Durch eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β (Säulen 7) stieg die Apoptoserate in den untransfizierten Zellen auf 21 % während sie für die transfizierten Klone DN-FADD 15 und DN-FADD 16 bei 17 % blieb. Ein Vergleich der beiden entscheidenden Behandlungsansätze (Säulen 6) und (Säulen 8) zeigte, dass IFN- β nur in den untransfizierten A375 Zellen die Apoptoserate deutlich steigern konnte, nicht aber in den DN-FADD transfizierten Klonen. Eine Behandlung der Zellen mit TMZ, O⁶BG und dem Fas-aktivierenden Antikörper (Säulen 6) führte in untransfizierten Zellen zu einer Apoptoserate von 25 %. Die Transfektion mit DN-FADD hatte unter diesen Bedingungen nur einen geringen Effekt. Eine zusätzliche Vorinkubation mit IFN- β (Säulen 8) rief in den

Ergebnisse

untransfizierten Zellen eine deutliche Steigerung der Apoptoserate auf 35 % hervor. Diese Erhöhung war in den DN-FADD transfizierten Klonen nicht zu beobachten. Hier blieb die Apoptoserate bei 20 %.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien D05 und A375 den Fas-Rezeptor vermittelten Apoptoseweg nach TMZ-Behandlung nicht oder nur eingeschränkt nutzen, weshalb ohne IFN- β eine Transfektion mit DN-FADD keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose hatte. Durch eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β wurde in den untransfizierten Zellen die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose deutlich gesteigert. Wurde der Fas-Rezeptor Signalweg durch eine stabile Transfektion mit DN-FADD unterbrochen, so hatte eine Vorinkubation mit IFN- β keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber TMZ.



Ergebnisse

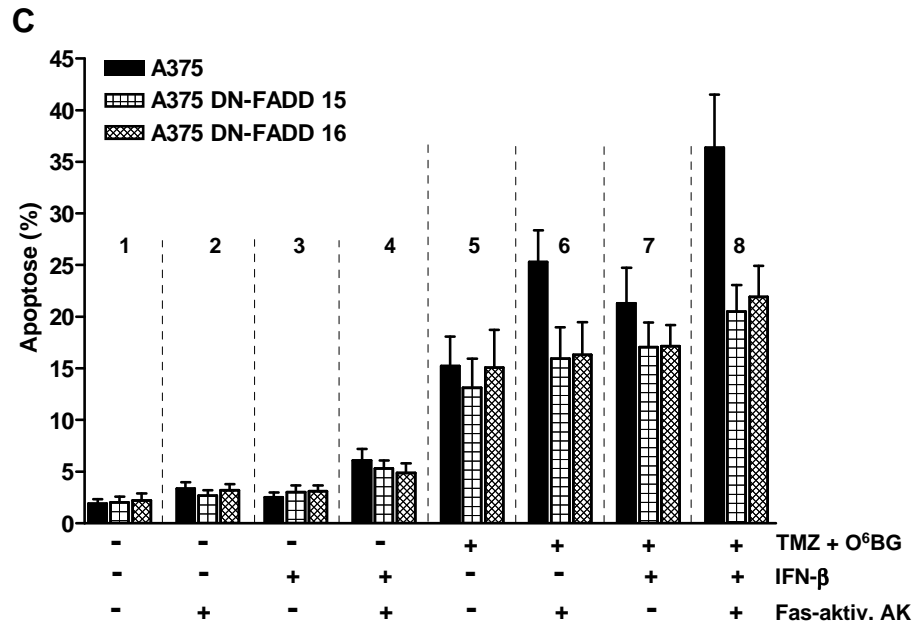


Abb. 3-38: Einfluss der stabilen Transfektion mit DN-FADD auf die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose mit und ohne IFN-β Vorbehandlung in den Zelllinien D05 und A375

(A) Zur Kontrolle der Transfektion mit DN-FADD wurden sowohl von untransfizierten (D05 bzw. A375 Kontrolle) als auch von DN-FADD transfizierten Klonen (D05 DN-FADD 1, D05 DN-FADD 2, A375 DN-FADD 15 und A375 DN-FADD 16) Gesamtzellextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 µg Protein verwendet und die Membran mit einem Antikörper gegen DN-FADD inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle. **(B und C)** Untransfizierte D05-Zellen und transfizierte DN-FADD 1 und DN-FADD 2 Klone sowie untransfizierte A375-Zellen und DN-FADD 15 und DN-FADD 16 Klone wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen mit 10 µM O⁶BG inkubiert und mit 50 µM TMZ behandelt. 72 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen, wenn angegeben, für 24 h mit 25 ng/ml eines Fas-aktivierenden Antikörpers behandelt. Zusätzlich wurden alle Ansätze mit 25 ng/ml ProteinA behandelt. Danach erfolgte die Bestimmung der Apoptosefrequenz durch Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung am Durchflusszytometer. Die Ziffern 1-7 stellen verschiedene Behandlungsschemata dar. 1: unbehandelt, 2: Fas-aktivierender Antikörper, 3: IFN-β, 4: IFN-β + Fas aktivierender Antikörper, 5: TMZ + O⁶BG, 6: TMZ + O⁶BG + Fas aktivierender Antikörper, 7: TMZ + O⁶BG + IFN-β, 8: TMZ + O⁶BG + IFN-β + Fas aktivierender Antikörper. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Um durch ein weiteres unabhängiges Experiment den Einfluss der Transfektion mit DN-FADD auf die IFN-β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ zu untersuchen, wurde die Zelllinie D05 sowie der Klon D05 DN-FADD 1 verwendet. D05 DN-FADD 1 als auch untransfizierte D05 Zellen wurden mit 10 µM O⁶BG inkubiert und anschließend mit 50 µM TMZ behandelt. Ein Ansatz wurde zusätzlich vor der TMZ-Gabe für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt. Nach 96, 120 und 144 h wurde die Apoptoserate durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Die Werte wurden hinsichtlich der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN-β behandelten Proben korrigiert. Die Abb. 3-39 zeigt, dass nach einer Behandlung ausschließlich mit TMZ und O⁶BG kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen untransfizierten und DN-FADD transfizierten Zellen vorliegt. Die Apoptoserate stieg in beiden Versuchsansätzen mit der Zeit von 4 % auf 10 % an. Wurden die Zellen mit

Ergebnisse

IFN- β vorbehandelt, so kam es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate. Sie stieg in den untransfizierten Zellen von 23 % über 27 % auf 33 % bei 144 h an. Der Klon D05 DN-FADD1 zeigte eine deutliche Reduktion der Apoptoserate in den mit IFN- β vorbehandelten Zellen. Hier stieg die Apoptoserate nur von 14 % bei 96 h auf 26 % bei 144 h an.

Zusammenfassend konnte durch ein weiteres unabhängiges Experiment gezeigt werden, dass D05 Zellen ohne IFN- β nicht in der Lage sind, den Fas-Rezeptor vermittelten Apoptoseweg zu nutzen. Durch eine 24 h Vorinkubation mit IFN- β erlangen sie diese Fähigkeit zurück.

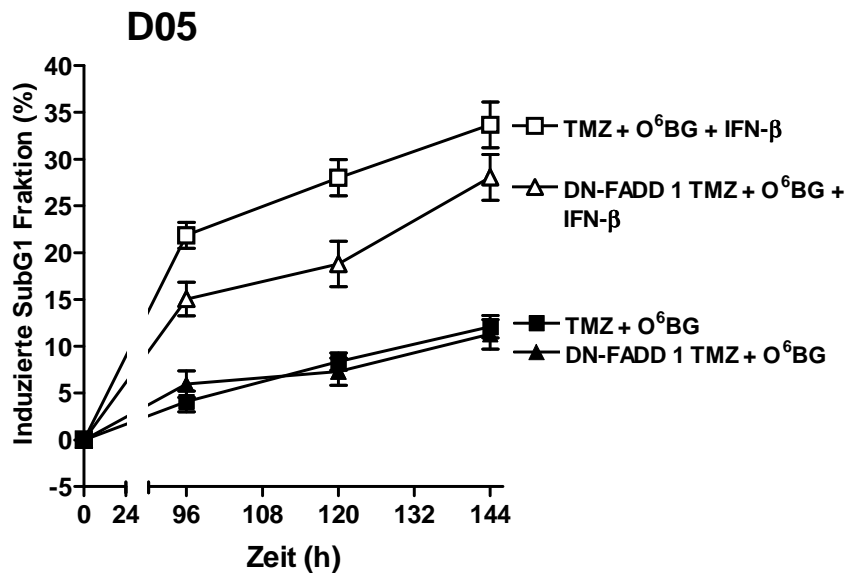


Abb. 3-39: Einfluss der stabilen Transfektion mit DN-FADD auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ in der Zelllinie D05

Untransfizierte D05 Zellen und DN-FADD 1 Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG und eine Behandlung mit 50 μ M TMZ. 96 h, 120 h und 144 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und die Zytotoxizität durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Alle Werte wurden relativ zur alleinigen TMZ-Behandlung dargestellt und hinsichtlich der Toxizität in der unbehandelten Kontrolle korrigiert. Alle Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.7.3 Auswirkungen der Interferon- β induzierten verstärkten Expression der Pro-Caspase-8 auf die TRAIL vermittelte Apoptose

Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose kann nicht nur über den Fas-Rezeptor ausgelöst werden, sondern auch über die Familie der TRAIL-Rezeptoren. Der Ligand, welcher hierbei zum Auslösen der Apoptose nötig ist, heißt TRAIL. Eine Aktivierung des TRAIL-Rezeptors führt, wie beim Fas-Rezeptor, über Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-8 zur Auslösung von Apoptose. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob die Melanomzelllinien durch ihr niedriges Niveau an Pro-Caspase-8 resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind und ob diese Resistenz durch eine IFN- β bedingte Hochregulation der Pro-Caspase-8 überwunden werden kann. Hierzu wurden D05, D14 und A375 Zellen für 24 h mit 300 I.E./ml IFN- β inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Weitere 24 h später wurden die entsprechenden Ansätze für 6 h mit 25 ng/ml TRAIL inkubiert und anschließend die Apoptose-/Nekrosefrequenz durch Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen sowie ausschließlich mit IFN- β oder TRAIL behandelte Proben. Die drei untersuchten Zelllinien zeigten durch alleinige TRAIL-Behandlung eine Apoptoserate von 20 % in der Zelllinie D05, 9 % in der Zelllinie D14 und 2 % in der Zelllinie A375 (Abb. 3-40). Jedoch führte eine Vorbehandlung mit IFN- β nur in den Zelllinie D05 und A375 zu einem synergistischen Effekt auf die Apoptoserate. In der Zelllinie A375 stieg die Apoptoserate auf 20 % und in der Zelllinie D05 sogar auf 45 %. In der Zelllinie D14 war der Effekt des IFN- β auf die TRAIL-induzierte Apoptose lediglich additiv. Hier erhöhte sich die Apoptoserate durch die IFN- β Inkubation zwar auf 25 %, jedoch wies die alleinige IFN- β Inkubation auch schon eine Apoptoseinduktion mit einer Rate von 14 % auf.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β in den Melanomzelllinien D05 und A375 einen synergistischen Effekt auf die TRAIL-vermittelte Apoptose hat, während sie in der Zelllinie D14 nur additiv wirkt.

Ergebnisse

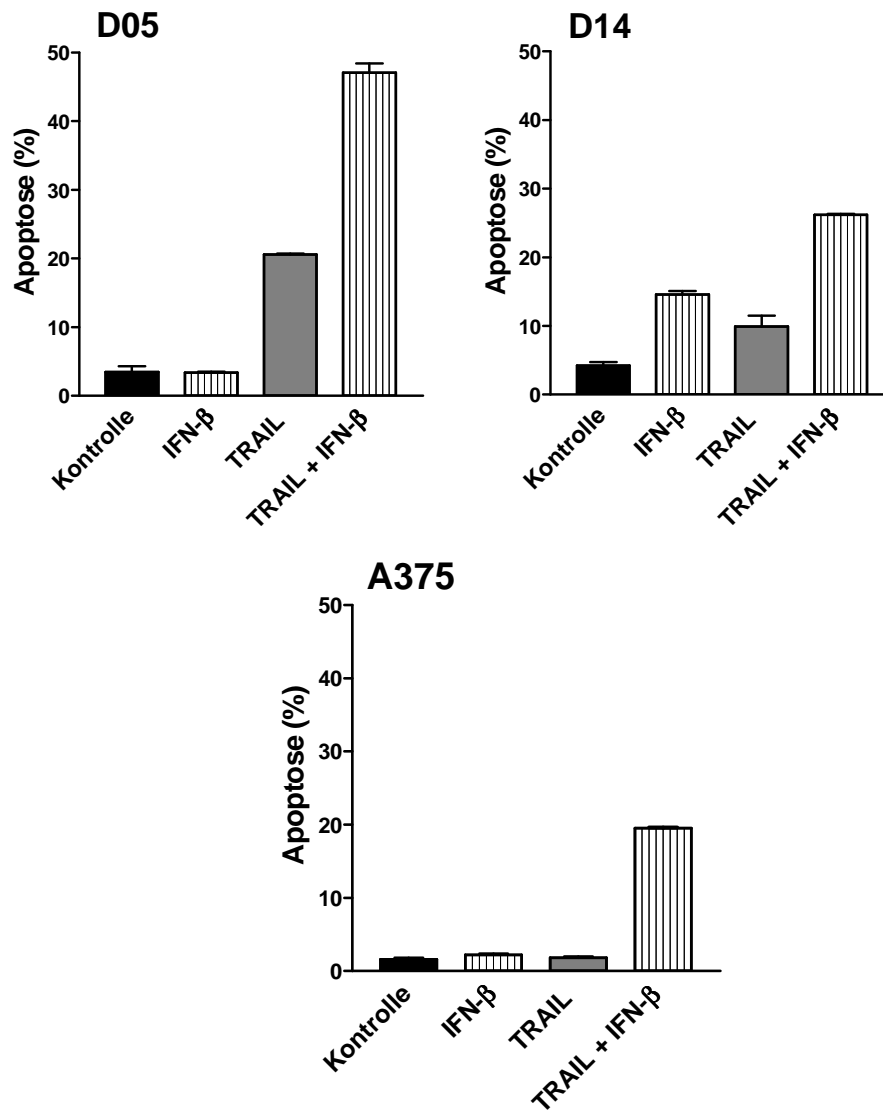


Abb. 3-40: Einfluss von Interferon-β auf die TRAIL vermittelte Apoptose in den Zelllinien D05, D14 und A375

D05-, D14- und A375-Zellen wurden für 24 h mit 300 I.E./ml IFN-β behandelt. Danach erfolgte ein Medienwechsel. Weitere 24 h später wurden die Zellen für 6 h mit 25 ng/ml TRAIL inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Apoptose-/Nekrosefrequenz durch Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollen, ausschließlich mit IFN-β behandelte und ausschließlich mit TRAIL behandelte Proben. Die Diagramme zeigen jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.7.4 Stabile Transfektion der Zelllinie A375 mit einem Caspase-8 siRNA codierenden Vektor und deren Auswirkungen auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber Temozolomid

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die p53-Wildtyp Melanomzelllinien D05 und A375 nach einer Behandlung mit TMZ nicht in der Lage sind, über den Fas-Rezeptor Apoptose auszulösen. Gleichzeitig wurde in beiden Zelllinien ein sehr geringes Niveau an Pro-Caspase-8 gefunden. Durch eine IFN- β Vorinkubation konnte die Expression der Pro-Caspase-8 deutlich gesteigert werden. Ebenso waren die Zellen nach einer Vorbehandlung mit IFN- β in der Lage, nach TMZ-Behandlung über den Fas-Rezeptor Apoptose auszulösen. Um zu überprüfen, ob die IFN- β vermittelte Verstärkung der Pro-Caspase-8-Expression für die Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose ausschlaggebend ist, wurde die Zelllinie A375 stabil mit einem Vektor transfiziert, welcher für eine Caspase-8 siRNA oder (als Kontrolle) für eine „nonsense“ siRNA (HRS-Sequenz) codiert. Durch eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Pro-Caspase-8 wurde die Reduktion des Pro-Caspase-8 Proteinniveaus durch die siRNA überprüft. Abb. 3-41 A zeigt, dass es in den Klonen A375 siCas8c4 und A375 siCas8c7 zu einer deutlichen Reduktion des Pro-Caspase-8 Niveaus durch die siRNA kam. Eine Transfektion der Zellen mit der HRS-Sequenz (A375 siHRSc2) hatte keinen Effekt auf das Proteinniveau der Pro-Caspase-8. Um den Einfluss der Transfektion mit Caspase-8 siRNA auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung der Zellen gegenüber TMZ zu untersuchen, wurden die Klone A375 siCas8c4 und A375 siCas8c7 sowie zur Kontrolle der Klon A375 siHRSc2 verwendet. Caspase-8 siRNA Klone als auch der HRS-Sequenz Klon siHRSc2 wurden mit 10 μ M O⁶BG inkubiert und anschließend mit 100 μ M TMZ behandelt. Ein Ansatz wurde zusätzlich vor der TMZ-Gabe für 24 h mit 100 I.E./ml IFN- β inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt. Nach 48 h, 72 h und 120 h wurde die Apoptoserate durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Die Werte wurden hinsichtlich der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN- β behandelten Proben korrigiert. Abb. 3-41 B zeigt, dass in dem mit der HRS-Sequenz transfizierten Klon (A375 siHRSc2) eine Vorinkubation mit IFN- β die Zellen zu jedem Zeitpunkt gegenüber TMZ sensibilisiert. Wurde das Pro-Caspase-8 Niveau durch eine siRNA in den Klonen A375 siCas8c4 und A375 siCas8c7 reduziert, hatte eine Vorbehandlung mit IFN- β keinen Effekt mehr auf die TMZ-induzierte Apoptoserate. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den Zellen, welche keine Pro-Caspase-8 exprimieren, eine IFN- β Vorinkubation keinen Effekt auf die Sensitivität der Zellen

Ergebnisse

gegenüber TMZ hatte. Demnach ist in den p53-Wildtyp Melanomzelllinien die verstärkte Expression der Pro-Caspase-8 durch eine 24-stündige IFN- β Behandlung ausschlaggebend für die Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose und damit für die Sensibilisierung der Zellen gegenüber TMZ.

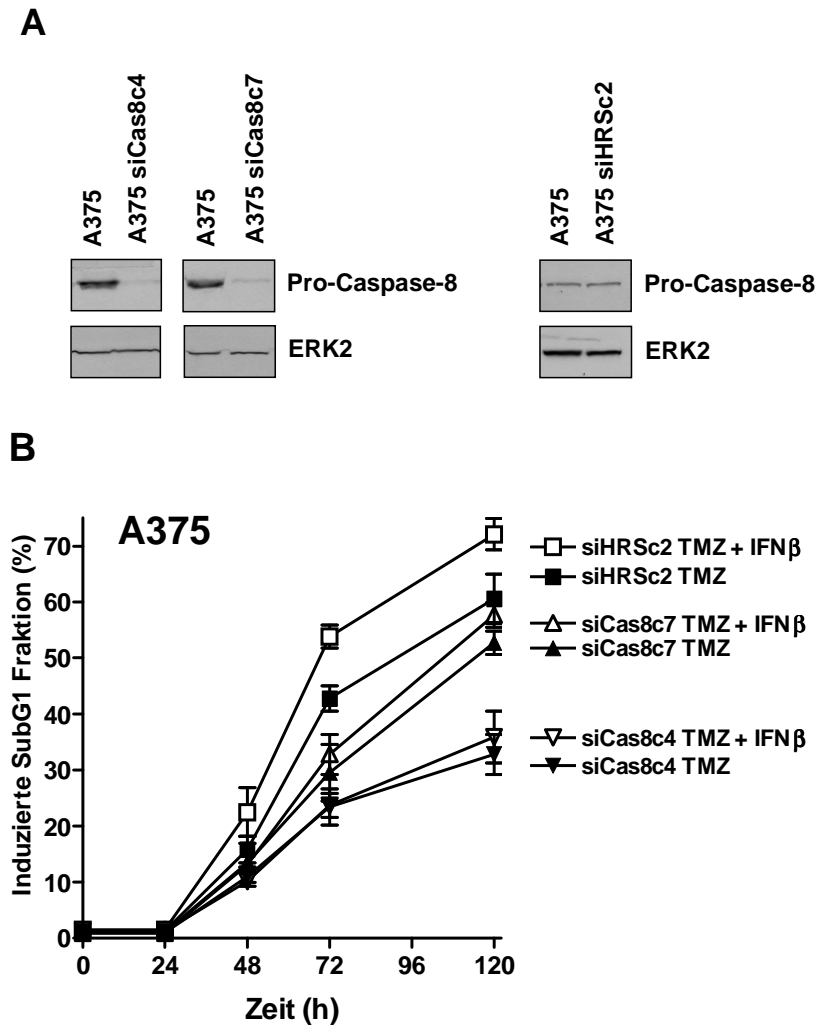


Abb. 3-41: Einfluss der stabilen Transfektion mit Caspase-8 siRNA auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ in der Zelllinie A375

(A) Zur Kontrolle der Transfektion mit Caspase-8 siRNA und einer Transfektion mit einer „nonsense“ siRNA (HRS-Sequenz) wurden sowohl von untransfizierten (A375 Kontrolle) als auch von Caspase-8 siRNA transfizierten Klonen (A375 siCas8c4 und A375 siCas8c7) und HRS-transfizierten Klonen (A375 siHRSc2) Gesamtzellextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 30 μ g Protein verwendet und die Membran mit einem Antikörper gegen Pro-Caspase-8 inkubiert. ERK2 diente als Ladekontrolle.

(B) Mit „nonsense“ siRNA stabil transfizierte Klone (A375 siHRSc2) als Referenz, sowie mit Caspase-8 siRNA stabil transfizierte Klone (A375 siCas8c4 und A375 siCas8c7) wurden für 24 h mit 100 I.E./ml IFN- β behandelt. Nach einem Medienwechsel erfolgte eine Inkubation mit 10 μ M O⁶BG und eine Behandlung mit 100 μ M TMZ. 48 h, 72 h und 120 h nach TMZ-Gabe wurden die Zellen geerntet und die Zytotoxizität durch Bestimmung der SubG1 Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Die Werte wurden hinsichtlich der unbehandelten bzw. ausschließlich mit IFN- β behandelten Proben korrigiert. Alle Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

4. Diskussion

4.1 Radio- und chemosensibilisierende Eigenschaften von Typ-I Interferonen in Pankreaskarzinom- Zelllinien

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (IR), Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β) untersucht. Besonderes Augenmerk galt dem radiosensibilisierenden Effekt der IFNs und dem zugrunde liegenden Mechanismus. Weiterhin wurde untersucht, ob IFNs die Pankreaskarzinom-Zelllinien gegenüber Temozolomid (TMZ) sensibilisieren können.

4.1.1 Die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität in ihrer intrinsischen Radiosensitivität

Bei der Behandlung eines Pankreaskarzinoms wird neben den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil (5-FU) und Gemcitabin auch Bestrahlung (IR) eingesetzt. Meistens erfolgt eine Bestrahlung in Kombination mit Chemotherapeutika. Der Nutzen einer solchen Chemoradiotherapie wird jedoch kontrovers diskutiert (Neoptolemos et al. 2001; Neoptolemos et al. 2004). Die Aufnahme von Zytokinen in die Therapie erhöht die Ansprechrate der Tumore, da sie die Wirkung von IR verstärken können (Gould et al. 1984; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003; Ma et al. 2005).

Zur genaueren Charakterisierung wurden die zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1, Capan-2, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Aspc-1, HS 766T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902 hinsichtlich ihrer intrinsischen Radiosensitivität getestet. Die Zelllinien wiesen eine große Variabilität in ihrer Strahlensensitivität auf. Von den hier untersuchten Zelllinien erwies sich Su8686 als die resistenteste Zelllinie gegenüber IR und PA-TU 8902 als die sensitivste Zelllinie. Die Berechnung der für Überlebenskurven charakteristischen Werte (u.a. die Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF2) und die mittlere Inaktivierungsdosis (MID)) unterstützten diese Beobachtungen. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen der Strahlensensitivität und der Zunahme der α -Komponente der Überlebenskurven beobachtet werden. Die α -Komponente beschreibt den linearen Teil der Überlebenskurve und kann mit dem nicht reparablen Strahlenschaden in Verbindung gebracht werden (Levitt et al. 2006). Eine Zunahme der α -Komponente in Verbindung mit einer erhöhten

Diskussion

Radiosensitivität entspricht Untersuchungen von Schmidberger et al. an menschlichen Tumorzelllinien (Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003). Somit spiegelt eine erhöhte α -Komponente eine erhöhte Strahlensensitivität der Zellen wider.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die BRCA2 mutierte Zelllinie Capan-1 nicht sensitiver auf IR reagiert als BRCA2 Wildtyp Zelllinien. Die Zelltod auslösenden Läsionen nach IR-Behandlung sind DSBs (Frankenberg-Schwager 1989; McMillan et al. 1990; Iliakis 1991). Diese können von Zellen über zwei Wege repariert werden. Das „non-homologous end-joining“ (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). BRCA2 spielt eine entscheidende Rolle bei der HR (Xia et al. 2001). Da aber der Großteil der durch IR entstandenen DSBs über NHEJ und nur zu einem sehr geringen Teil über HR repariert werden (Rothkamm et al. 2003), scheint die BRCA2 Mutation der Zelllinie Capan-1 nicht zur Sensitivität der Zellen gegenüber IR beizutragen.

Ebenfalls interessant ist, dass die einzige p53-Wildtyp Zelllinie Capan-2 nur eine moderate Radiosensitivität zeigte, obwohl wildtypisches p53 Protein als Sensitivitätsmarker gegenüber IR beschrieben wurde (Mohiuddin et al. 2002). In der Studie von Mohiuddin et al. wurden jedoch nur drei der hier ebenfalls verwendeten Zelllinien (Capan-2, Panc-1 und MiaPaCa-2) untersucht, von welchen Capan-2 am sensitivsten auf IR reagierte. Vergleicht man nur diese drei Zelllinien, so erwies sich auch in den vorliegenden Untersuchungen Capan-2 als die sensitivste Zelllinie. Da aber von den zehn Zelllinien noch drei sensitiver auf IR reagierten als Capan-2, konnte in der vorliegenden Arbeit der p53-Status nicht mit einer erhöhten Radiosensitivität in Verbindung gebracht werden.

4.1.2 Die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität gegenüber einer Behandlung mit Typ-I Interferonen

Typ-I Interferone (IFN- α und IFN- β) gehören zu der Gruppe der Zytokine. Diese üben nach der Bindung an einen spezifischen Oberflächenrezeptor über den JAK/STAT Signalweg in ihren Zielzellen verschiedene biologische Effekte aus. Dazu gehört die zytotoxische Wirkung auf Krebszellen sowie die Hemmung der Proliferation (Greenberg and Mosny 1977; Borden et al. 1982; Qin et al. 1997; Subramaniam and Johnson 1997).

Die zehn untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien reagierten unterschiedlich sensitiv auf eine Behandlung mit Typ-I IFNs. In zwei Zelllinien (Panc-1 und PA-TU 8988T) hatte eine Behandlung mit IFN keine Auswirkungen auf das Überleben der Zellen. Bereits in der Literatur wurde Panc-1 als sehr resistent gegenüber eine IFN-Behandlung beschrieben

Diskussion

(Vitale et al. 2007). Fünf Zelllinien (Su8686, Capan-1, BxPc-3, Aspc-1 und HS 766T) zeigten ein vermindertes Überleben nach einer Behandlung mit IFN- α und acht Zelllinien (Su8686, Capan-1, Capan-2, BxPc-3, Aspc-1, HS 766T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902) nach einer Behandlung mit IFN- β . IFN- β hatte demnach eine toxischere Wirkung auf Pankreaskarzinom-Zelllinien als IFN- α , was bereits in der Literatur für Melanomzellen (Johns et al. 1992), Brustkrebszellen (Coradini et al. 1994), Leberkarzinomzellen (Damdinsuren et al. 2003) und Pankreaskarzinom-Zelllinien (Vitale et al. 2007) beschrieben wurde. Eine Begründung für diese Beobachtungen könnte sein, dass zwar IFN- α und IFN- β an den selben Rezeptor binden, um in ihren Zielzellen eine Reaktion auszulösen, IFN- β jedoch mit höherer Affinität (Johns et al. 1992). Zudem kommt es nach der Bindung von IFN- β , nicht aber von IFN- α , zu einer Assoziation der beiden IFN-Rezeptor Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, was zu einer effektiven Signalweiterleitung führt (Croze et al. 1996). Die BRCA2 mutierte Zelllinie Capan-1 reagierte von allen zehn Zelllinien am sensitivsten auf eine Behandlung mit IFN- α oder IFN- β . Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass IFNs die Zellen in ihrer Proliferation hemmen, was in einer Zelllinie, welche bereits durch einen BRCA2 Defekt einen verlangsamten Zellzyklus zeigt (Lomonosov et al. 2003; Kumaraswamy and Shiekhattar 2007) einen besonders toxischen Phänotyp hervorrufen könnte.

4.1.3 Eine radiosensibilisierende Wirkung durch Typ-I Interferone ist nur in drei von zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien zu beobachten

In der Literatur wurde ein radiosensibilisierender Effekt von IFN- α und IFN- β in Gliomzellen, Lungenkarzinomzellen, Brustkrebszellen, in Zellen eines Mundschleimhaut-Karzinoms sowie in Pankreaskarzinom-Zelllinien beschrieben (Gould et al. 1984; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003; Ma et al. 2005). Klinische Studien belegen, dass eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie mit IFNs den Ausgang der Pankreaskrebs-Therapie positiv beeinflussen kann (Picozzi et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigten zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien (Su8686 und Capan-2) einen sensibilisierenden Effekt gegenüber IR durch IFN- α , und zwei (Panc-1 und Aspc-1) einen schützenden. Der schützende Effekt von IFN- α gegenüber IR könnte dadurch erklärt werden, dass IFN- α den „epidermal growth factor receptor“ (EGF-R) hochreguliert. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Ras und Raf-1, was einen anti-apoptotischen Effekt auf die Zellen ausübt (Budillon et al. 1991; Caraglia et

Diskussion

al. 1995). IFN- β zeigte in drei Zelllinien (Su8686, Capan-2 und BxPc-3) einen radiosensibilisierenden Effekt und nur in einer Zelllinie (Capan-1) einen schützenden. Betrachtet man jedoch nicht nur eine Strahlendosis, sondern einen Dosisbereich von 0 – 8 Gy, so ist der schützende Effekt von IFN- β auf IR in dieser Zelllinie nicht mehr zu beobachten (siehe 3.1.2.1). IFN- β erwies sich erneut als effektiver in der Strahlensensibilisierung, was bereits für den zytotoxischen Effekt einer alleinigen IFN-Behandlung beschrieben wurde.

4.1.4 Betrachtung der Wirkungsweise von Interferon- β auf eine Behandlung der Pankreaskarzinom-Zelllinien mit ionisierender Strahlung

Um im Folgenden den Mechanismus des radiosensibilisierenden Effekts von IFN- β in Pankreaskarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden vier Zelllinien ausgewählt, welche sich hinsichtlich ihrer Reaktionen auf Bestrahlung, IFN-Behandlung und Kombinationsbehandlung aus IR und IFNs unterschieden. Su8686 zeigte ein vermindertes Überleben nach IFN- β Behandlung und einen radiosensibilisierenden Effekt. Capan-2 zeigte ebenfalls ein vermindertes Überleben nach IFN- β Behandlung und einen radiosensibilisierenden Effekt. Da es sich bei Capan-2 um die einzige p53-Wildtyp Zelllinie handelt, wurde sie in die Untersuchungen einbezogen. Panc-1 reagierte nicht auf eine Behandlung mit IFN- β und zeigte auch keinen radiosensibilisierenden Effekt. Sie diente daher für die folgenden Versuche als negativ-Kontrolle. Capan-1 zeigte die stärkste Abnahme im zellulären Überleben nach einer Behandlung mit IFN- β , aber keinen radiosensibilisierenden Effekt. Diese Zelllinie ist zudem defizient in dem für die HR notwendigen Protein BRCA2. Für die folgenden Untersuchungen wurde nur noch IFN- β verwendet, da es im Vergleich zu IFN- α einen größeren Effekt hervorrief.

Um auszuschließen, dass ein Ausbleiben des toxischen oder radiosensibilisierenden Effekts von IFN- β an einem Fehlen des IFN-Rezeptors liegt, wurde durch Western-Blot-Analysen die Expression der IFNAR2 Untereinheit des IFN-Rezeptors untersucht. In allen vier Zelllinien war die Untereinheit IFNAR2 des IFN-Rezeptors nachweisbar. Die stärkste Expression zeigten die Zelllinien Capan-1 und Capan-2, die schwächste Expression die Zelllinie Su8686. Auch die Zelllinie Panc-1, welche nicht auf eine Behandlung mit IFN- β reagierte, exprimierte den Rezeptor. Demnach kann der Rezeptorstatus nicht mit der Toxizität von IFN- β in Verbindung gebracht werden. Dies steht im Einklang mit verschiedenen Untersuchungen an menschlichen Tumorzellen, welche keinen

Diskussion

Zusammenhang zwischen der Expression des IFN-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen und einer Wirkung von IFN in den Zielzellen zeigten (Grups and Bange 1990; Perea et al. 1993; Yano et al. 1999).

Zur genaueren Betrachtung des radiosensibilisierenden Effekts von IFN- β in den vier ausgewählten Zelllinien wurden Überlebenskurven nach verschiedenen Bestrahlungsdosen von 0 – 8 Gy mit oder ohne IFN- β Vorbehandlung erstellt. In der Zelllinie Su8686, welche die strahlenresistenteste Zelllinie war, und in der p53-Wildtyp Zelllinie Capan-2 zeigte IFN- β einen radiosensibilisierenden Effekt. Panc-1 und Capan-1 zeigten nach einer Kombination von IFN- β und IR keine Abnahme des zellulären Überlebens im Vergleich zu IR alleine. Dass die Zelllinie Capan-1 hoch sensitiv auf eine Behandlung mit IFN- β reagierte, aber keinen radiosensibilisierenden Effekt zeigte, deutet darauf hin, dass der zytotoxischen Wirkung von IFN- β und der radiosensibilisierenden Wirkung nicht der gleiche Wirkmechanismus zugrunde liegt. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Wirkung von IFN- β und dem radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β beobachtet werden. Dies bestätigt Untersuchungen an Gliomzellen, Colonkarzinomzellen und embryonalen Lungenfibroblasten, für die ebenfalls ein solcher Zusammenhang nicht gezeigt werden konnte (Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003).

Auffällig ist, dass mit dem radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β in den Zelllinien Su8686 und Capan-2 eine Erhöhung der α -Komponente der Überlebenskurven einherging. Dieser Anstieg war in den Zelllinien Panc-1 und Capan-1, in welchen IFN- β keinen sensibilisierenden Effekt auf Bestrahlung hatte, nicht zu beobachten. Dass eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Bestrahlung mit einem Anstieg der α -Komponente der Überlebenskurven in Verbindung zu bringen ist, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Dritschilo et al. 1982; Gould et al. 1984; Liebmann et al. 1994; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003) und auch in dieser Arbeit gezeigt. Eine Erhöhung der α -Komponente durch IFN- β könnte verschiedene Ursachen haben: i) eine Veränderung des Zellzyklus, wie ihn Interferone hervorrufen können, könnte für die Veränderung der Überlebenskurven verantwortlich sein. ii) Da die α -Komponente den nicht reparierbaren Strahlenschaden beschreibt, könnte eine Zunahme der α -Komponente mit einer Beeinflussung der Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden verbunden sein, wie es bereits für Gliomzellen und Lungenkarzinom-Zellen beschrieben wurde (Dritschilo et al. 1982; Gould et al. 1984; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003). iii) Könnte die Zunahme der

Diskussion

α -Komponente durch eine erhöhte Apoptoseinduktion nach Kombination von IFN- β mit IR hervorgerufen werden (Fisher 1994; Hardenbergh et al. 1999).

Für die β -Komponente, welche den reparierbaren Strahlenschaden beschreibt (Levitt et al. 2006), konnte kein Zusammenhang zwischen dem radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β und einer Zu- oder Abnahme beobachtet werden.

4.1.5 Der radiosensibilisierende Effekt von Interferon- β ist nicht durch einer Veränderung des Zellzyklus bedingt

Die Reparatur der durch IR induzierten DSBs ist an den Zellzyklus gekoppelt. Somit könnte eine IFN- β Vorbehandlung über eine Veränderung des Zellzyklus einen Einfluss auf die Reparatur und Sensitivität der Zellen nach IR haben. Die Reparatur der DSBs kann über zwei Wege ablaufen: die NHEJ und die HR. In der G1-Phase werden die DSBs ausschließlich über die NHEJ repariert, während in der S-Phase und der G2/M-Phase auch die HR an der DSB-Reparatur beteiligt ist (Takata et al. 1998; Johnson and Jasin 2000). Strahleninduzierte DSBs werden hauptsächlich über NHEJ repariert (Rothkamm et al. 2003). Liegt ein DNA-Schaden in der Zelle vor, so werden im Zellzyklus Kontrollpunkte aktiviert, um ausreichend Zeit für die Reparatur der Schäden zu schaffen. Wird der Schaden nicht repariert, so kommt es zur Auslösung der Apoptose. Dadurch werden geschädigte Zellen eliminiert. Interferone können auf verschiedene Weise in den Zellzyklus eingreifen. Sie sind in der Lage, einen G1-Arrest (Hobeika et al. 1997; Subramaniam and Johnson 1997) auszulösen. Im Gegensatz dazu wurde für p53-Wildtyp Zellen beschrieben, dass eine Behandlung mit IFN- β zu einer Überwindung des G1-Kontrollpunkts und zu einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase führt (Qin et al. 1997). Auch eine IFN vermittelte Akkumulation der Zellen in der strahlensensitiven G2/M-Phase wurde für IFN beschrieben (Chang and Keng 1987). In welcher der Zellzyklusphasen die Tumorzellen nach einer Behandlung mit IFN arretieren hängt vermutlich vom genetischen Repertoire der Zellen ab (Qin et al. 1997). Dies wird im Folgenden für die vier hier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien diskutiert.

Die Zelllinie Su8686 wurde als einzige durch eine Behandlung mit IFN- β in der S-Phase arretiert. Die anderen drei Zelllinien, inklusive Capan-2, zeigten keine Arretierung im Zellzyklus durch IFN- β . Da in den beiden Zelllinien Su8686 und Capan-2, welche den radiosensibilisierenden Effekt durch IFN- β zeigten, kein einheitlicher Zellzyklusarrest durch eine Behandlung mit IFN- β beobachtet werden konnte, kann ein Einfluss auf den

Diskussion

Zellzyklus als Ursache des radiosensibilisierenden Effekt von IFN- β ausgeschlossen werden. Auch die Expression der für den G1-Kontrollpunkt wichtigen Proteine p15, p21 und p27 wurde durch eine IFN- β Behandlung der Zellen nicht verändert. Dass die Expression dieser Proteine durch IFN- β beeinflusst werden kann wurde bereits in der Literatur erwähnt (Mandal et al. 1998; Schmidt et al. 2004). Jedoch zeigten alle vier Zelllinien, inklusive Panc-1, welche nicht sensitiv auf IFN- β reagierte, eine verminderte S-Phase-Aktivität nach IFN- β Behandlung. Die Zelllinie Capan-1, für welche eine Behandlung mit IFN- β besonders toxisch war, zeigte die geringste Abnahme der S-Phase-Aktivität durch IFN- β . Demnach konnte in den vier untersuchten Zelllinien weder der zytotoxische Effekt von IFN- β noch der radiosensibilisierende Effekt mit einer Beeinflussung des Zellzyklus ursächlich in Verbindung gebracht werden.

4.1.6 Eine Interferon- β Vorbehandlung zeigte in den Zelllinien Su8686 und Panc-1 keine Auswirkungen auf die Reparatur der durch Bestrahlung induzierten DNA-Doppelstrangbrüche

Nach Bestrahlung von Zellen stellen die induzierten DSBs die Zelltod auslösenden Läsionen dar (Frankenberg-Schwager 1989; McMillan et al. 1990; Iliakis 1991). Diese können auf zwei Wegen repariert werden, über HR oder NHEJ. Die Sensitivität der Zellen gegenüber IR hängt somit von der Anzahl der entstandenen DSBs und von deren Reparatur ab.

In den Zelllinien Su8686 und Capan-2 führte eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- β zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber IR. Diese Sensibilisierung ging mit einer Erhöhung der α -Komponente einher. Eine mögliche Ursache für die IFN- β vermittelte Erhöhung der α -Komponente bzw. der Veränderung der Überlebenskurve nach Bestrahlung könnte eine Beeinflussung der DSB-Reparatur sein. Bereits Dritschillo et al. zeigten an murinen Tumorzellen eine Zunahme der α -Komponente durch eine IFN- β Vorbehandlung (Dritschillo et al. 1982). Ebenso zeigten Schmidberger et al. an humanen Tumorzellen eine Zunahme der α -Komponente durch eine IFN- β Vorbehandlung (Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003). In diesen Untersuchungen wurde die Zunahme der α -Komponente mit einer Beeinflussung der Reparatur von Strahlenschäden durch IFN- β in Verbindung gebracht. Hierbei war besonders die HR durch IFN- β beeinträchtigt (Schmidberger et al. 2003).

Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die DSB-Reparatur in den Zelllinien Su8686 und Panc-1 untersucht. Su8686 reagierte sensitiv auf eine Behandlung mit IFN- β und zeigte einen radiosensibilisierenden Effekt, während Panc-1 nicht auf IFN- β reagierte und auch keinen sensibilisierenden Effekt gegenüber Bestrahlung zeigte. Panc-1 diente dementsprechend als negativ-Kontrolle. In beiden Zelllinien wurde die γ H2AX Foci Anzahl bzw. deren Abnahme untersucht, entweder ausschließlich nach IR oder nach einer Kombination von IR und IFN- β . Die Phosphorylierung des Histons H2AX (γ H2AX) ist ein frühes Ereignis nach DNA-Schädigung und konnte mittels Immunfluoreszenz als γ H2AX Focus sichtbar gemacht werden. Dabei wird ein im Genom entstandener DSB durch einen γ H2AX Focus repräsentiert (Sedelnikova et al. 2002). Somit dienen γ H2AX Foci als ein häufig verwendeter und akzeptierter Marker für DSBs (Ismail and Hendzel 2008). Die hier durchgeführten Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten keine Beeinflussung der DSB-Induktion oder der DSB-Reparatur durch IFN- β . Auch durch neutrale Einzelzellgelelektrophorese konnte keine IFN- β bedingte Beeinflussung der DSB-Reparatur nach IR festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die strahleninduzierten DSBs hauptsächlich über NHEJ repariert werden, IFN- β aber die HR beeinträchtigen soll. In den Untersuchungen von Schmidberger et al. war der sensibilisierende Effekt von IFN- β nur dann synergistisch, wenn die Zellen einen Defekt in der NHEJ aufwiesen (Schmidberger et al. 2003). Keine der hier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien weist einen Defekt in der NHEJ auf. Um den Einfluss von IFN- β auf die HR zu untersuchen, wurde die Expression der HR Proteine Rad51 und Rad52 mit und ohne IFN- β Exposition untersucht. Eine verringerte Expression dieser Reparaturproteine könnte zu einer verminderten Reparaturkapazität führen. Western-Blot-Analysen zeigten, dass IFN- β keinen Einfluss auf die Expression der getesteten Reparaturproteine Rad51 und Rad52 hat. Somit konnte der radiosensibilisierende Effekt von IFN- β in den hier untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien nicht mit einer verminderten DSB-Reparaturkapazität in Verbindung gebracht werden.

4.1.7 Interferon- β erhöht die Apoptoserate nach Bestrahlung

IFN- β ist in der Lage, Apoptose zu induzieren (Tomoda et al. 1998; Chawla-Sarkar et al. 2002). Ebenso kann es die Apoptoserate verschiedener zytotoxischer Substanzen erhöhen und somit die Zellen gegenüber diesen sensibilisieren (Hu et al. 2005). Die Zunahme der α -Komponente der Überlebenskurve, wie sie durch eine IFN- β Vorbehandlung beobachtet

Diskussion

wurde, könnte folglich durch eine Zunahme der strahleninduzierten Apoptose bedingt sein. Dies wurde bereits in mehreren Studien an Tumorzellen gezeigt (Fisher 1994; Hardenbergh et al. 1999). Aus diesen Gründen wurde in den Zelllinien Su8686 und Panc-1 die Apoptoserate nach IR bzw. nach IR in Kombination mit IFN- β Vorbehandlung untersucht. Die Zelllinie Su8686 zeigte eine Erhöhung der strahleninduzierten Apoptose durch IFN- β . Dies wurde mit zwei unabhängigen Methoden (SubG1 Messung und Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung) nachgewiesen. In der Negativkontrolle Panc-1 war dies nicht zu beobachten.

4.1.8 Interferon- β sensibilisiert die Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 nicht gegenüber einer Behandlung mit Temozolomid

Pankreaskarzinome ebenso wie Gliome sprechen sehr schlecht auf eine Behandlung mit alkylierenden Agenzien wie z.B. dem methylierende Agenz TMZ an. Im Falle der Pankreaskarzinome ist dies auf ein allgemein hohes Niveau des Reparaturenzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) zurückzuführen (Kokkinakis et al. 1997). O⁶MeG stellt in proliferierenden Zellen die toxischste Läsion dar, welche durch methylierende Agenzien induziert wird (Kaina et al. 1991; Kaina et al. 1997; Peponi et al. 2003; Roos et al. 2004; Chinot et al. 2007; Roos et al. 2007a). Diese Läsion wird sehr effizient von MGMT repariert (Tominaga et al. 1997; Daniels and Tainer 2000; Kaina et al. 2007). Deshalb wurde MGMT bereits mehrfach als Resistenzmarker gegenüber einer Behandlung mit Methylanzen beschrieben. Natsume et al. erreichte in seinen Untersuchungen eine Sensibilisierung von Gliom-Zelllinien gegenüber TMZ durch IFN- β . Dies wurde durch eine p53 vermittelte Herunterregulation von MGMT durch IFN- β erklärt (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008). Vergleichbare Versuche wurden an den hier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2 durchgeführt. Eine Behandlung der Zellen mit TMZ führte in den Zelllinien Panc-1, Capan-1 und Capan-2 nicht zur Induktion von Zelltod. Erst durch Vorbehandlung mit O⁶BG und der daraus resultierenden Depletion von MGMT wurde in diesen Zelllinien durch TMZ Zelltod ausgelöst. Dies zeigt, dass MGMT in diesen Zellen exprimiert wird. In der Zelllinie Su8686 führte schon eine alleinige TMZ Behandlung zum Zelltod, welcher durch eine zusätzliche Behandlung mit O⁶BG nicht gesteigert werden konnte. Su8686 ist somit MGMT defizient. Das Vorhandensein bzw. das Fehlen von MGMT in diesen

Diskussion

Zelllinien wurde durch Western-Blot-Analysen und durch Bestimmung der MGMT-Aktivität verifiziert. Die Untersuchungen zeigten, dass O⁶MeG in diesen Zelllinien die Zelltod vermittelnde Läsion ist und MGMT ein entscheidender Resistenzmarker. Eine Vorbehandlung mit IFN-β führte weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von MGMT in einer der verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien zu einer Sensibilisierung gegenüber TMZ. Eine Beeinflussung von p53 oder MGMT durch IFN-β war für die hier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien im Gegensatz zu den von Natsume et al. verwendeten Gliom-Zelllinien nicht zu beobachten. Demnach scheint der von Natsume et al. beschriebene Effekt von IFN-β auf eine Behandlung mit TMZ zelltypspezifisch zu sein und für Pankreaskarzinom-Zelllinien nicht zu gelten.

4.2 Chemosensibilisierende Eigenschaften von Typ-I Interferonen in malignen Melanomzelllinien

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die Melanomzelllinien D05 und D14 hinsichtlich ihrer TMZ-Sensitivität, IFN- α und IFN- β Sensitivität sowie ihrer Sensitivität gegenüber einer Kombinationsbehandlung bestehend aus TMZ und IFN- α oder IFN- β untersucht. Weiterführend wurde in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 der Mechanismus untersucht, welcher dem sensibilisierenden Effekt von IFN- β gegenüber TMZ zugrunde liegt.

4.2.1 In den untersuchten Melanomzelllinien D05 und D14 spielt der p53-Status keine Rolle für die Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber Temozolomid

Das Mittel erster Wahl bei der Behandlung von metastasierenden malignen Melanomen ist das methylierende Agenz Dacarbazin (DTIC) (Eggermont and Kirkwood 2004). Dieses wird jedoch immer häufiger von dem ebenfalls methylierenden Agenz Temozolomid (TMZ) abgelöst (Bleehen et al. 1995; Middleton et al. 2000). TMZ methyliert die DNA an 13 Positionen, von welchen O⁶MeG in mehreren Zellsystemen als die entscheidende Zytotoxizität induzierende Läsion beschrieben wurde (Kaina et al. 1991; Kaina et al. 1997; Pepponi et al. 2003; Roos et al. 2004; Chinot et al. 2007; Roos et al. 2007a). O⁶MeG wird sehr effizient von dem Reparaturenzym O⁶-Methylguanin DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert (Tominaga et al. 1997; Daniels and Tainer 2000; Kaina et al. 2007). Findet keine Reparatur statt, führt diese Läsion in proliferierenden Zellen zur Auslösung von Zelltod.

Für diesen Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei Melanomzelllinien, D05 und D14 verwendet, welche aus metastasierenden malignen Melanomen isoliert worden sind. Bei D05 handelt es sich um eine p53-Wildtyp, MGMT profiziente (298 fmol/mg Protein) Zelllinie, bei D14 um eine p53-mutierte, MGMT defiziente Zelllinie (Naumann et al. 2009). Beide Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber einer klinisch relevanten Dosis (50 μ M) TMZ untersucht. D05 zeigte nach einer Behandlung mit TMZ keine erhöhte Apoptoserate, was auf das Vorhandensein des Reparaturenzyms MGMT zurückzuführen ist (Day et al. 1980; Kaina et al. 1991; Kaina et al. 2007). Wird MGMT in der Zelllinie D05 durch den Inhibitor O⁶BG in seiner Wirkung gehemmt, so führte das zur

Diskussion

Induktion von Zelltod. In der MGMT defizienten Zelllinie D14 führte eine alleinige Behandlung mit TMZ zur Induktion von Zelltod, welcher durch zusätzliche Behandlung mit O⁶BG nicht verstärkt werden konnte. Wie bereits gezeigt worden ist, stellt in Melanomzellen O⁶MeG eine zytotoxische Läsion dar und MGMT einen entscheidenden Resistenzmarker (Naumann et al. 2009). Naumann et al. konnte für die Melanomzelllinien D05 und D14 zeigen, dass es sich bei dem TMZ-induzierten Zelltod um Apoptose handelt (Naumann et al. 2009).

Die hier durchgeführten Untersuchungen, sowie die Untersuchungen von Naumann et al. zeigten, dass die p53-Wildtyp Melanomzelllinie D05 nicht sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ reagierte als p53-mutierte Zelllinien wie z.B. D14. Das steht im Widerspruch zu bereits einheitlich veröffentlichten Untersuchungen an p53-Wildtyp Lymphozyten bzw. Gliomzelllinien (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). Hierbei reagierten p53-Wildtyp Zelllinien deutlich sensitiver auf eine Behandlung mit methylierenden Agenzien als p53-mutierte Zelllinien. Grund hierfür war, dass in den p53-Wildtyp Zelllinien nach einer Behandlung mit TMZ der Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg aktiviert wird, was aufgrund der p53-Abhängigkeit der Fas-Rezeptor Aktivierung in p53-mutierten Zelllinien nicht stattfinden konnte. In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch nach einer Behandlung mit TMZ sowohl in der p53-mutierten Zelllinie D14 als auch in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 das Spaltprodukt der Caspase-9 nachgewiesen werden. Caspase-9 ist die entscheidende Initiatorcaspase im mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg (Wang 2001; Acehan et al. 2002; Pop et al. 2006), welche nach Aktivierung im Apoptosom die Effektorcaspasen-3 und -7 spaltet (Li et al. 1997; Srinivasula et al. 1998). Somit ist der Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-9 ein Hinweis darauf, dass in den Melanomzelllinien D05 und D14, unabhängig vom p53-Status, nach einer Behandlung mit TMZ der mitochondrial-vermittelte Apoptoseweg aktiviert wird.

4.2.2 Interferone hemmen die Proliferation der Melanomzelllinien D05 und D14, wobei Interferon- β einen deutlich stärkeren Effekt hervorruft als Interferon- α

Interferone sind Zytokine (Isaacs and Lindenmann 1957; Isaacs et al. 1957), welche nach einer Bindung an einen spezifischen Oberflächenrezeptor und der daraus resultierenden Aktivierung des JAK/STAT Signalweges in der Lage sind, die Genexpression in ihren Zielzellen zu beeinflussen (Schindler et al. 1992; Silvennoinen et al. 1993; Stark et al.

Diskussion

1998) und dadurch verschiedene biologische Effekte hervorzurufen. Zu den biologischen Effekten, welche Interferone auf Krebszellen ausüben können, gehören ihre zytotoxische Wirkung und die Hemmung der Proliferation (Greenberg and Mosny 1977; Borden et al. 1982; Qin et al. 1997; Subramaniam and Johnson 1997). IFN- α und IFN- β binden an den selben Rezeptor, welcher aus zwei Untereinheiten besteht (Branca and Baglioni 1981; Williams and Haque 1997). Eine der wichtigeren der beiden Untereinheiten (IFNAR2), welche für die IFN-Bindung essentiell ist (Domanski et al. 1995), konnte in den beiden Melanomzelllinien D05 und D14 nachgewiesen werden. Die zweite Untereinheit (IFNAR1) wurde nicht untersucht.

Die zytotoxische und antiproliferative Wirkung der Interferone konnte für die beiden hier verwendeten Melanomzelllinien D05 und D14 gezeigt werden. Eine 24-stündige Behandlung mit IFN- α oder mit IFN- β führte zu einer Verminderung des Zellüberlebens. IFN- β erwies sich hierbei als effektiver wie bereits in Pankreaskarzinom-Zelllinien gezeigt worden ist. Die höhere Effektivität von IFN- β wurde in mehreren Veröffentlichungen für Melanomzellen, Gliomzellen, Brustkrebszellen und Leberkarzinomzellen beschrieben (Borden et al. 1982; Johns et al. 1992; Coradini et al. 1994; Damdinsuren et al. 2003). Sie kann für Melanomzellen dadurch erklärt werden, dass zwar beide Interferone an den selben Rezeptor binden, die Affinität von IFN- β zum IFN-Rezeptor aber deutlich höher ist als die von IFN- α (Johns et al. 1992).

4.2.3 Typ-I Interferone sensibilisieren maligne Melanomzelllinien gegenüber TMZ

Melanome weisen eine hohe Resistenz gegenüber methylierenden Agenzien auf. Die Ansprechrate eines metastasierenden malignen Melanoms auf eine Behandlung mit methylierenden Agenzien liegt zwischen 12 und 14 % (Middleton et al. 2000). Um die Ansprechrate zu erhöhen, werden Interferone im Rahmen einer Chemoimmuntherapie mit dem Chemotherapeutikum kombiniert (Nagatani et al. 1995; Richtig et al. 2004; Kaufmann et al. 2005).

Interferone werden wegen ihrer antineoplastischen Wirkung als Monotherapie zur Behandlung von Melanomen eingesetzt (Agarwala and Kirkwood 2002), erlangen aber auch immer größere Bedeutung als Sensibilisatoren für die verschiedensten chemotherapeutischen Agenzien. Natsume et al. beschreibt einen sensibilisierenden Effekt von IFN- β auf Temozolomid in sechs verschiedenen Glioblastomzelllinien und in

Diskussion

Glioblastom Xenografts (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008). Fujimaki et al. beschreibt in einer klinischen Studie einen sensibilisierenden Effekt von IFN- α auf eine Behandlung von Gehirntumoren mit TMZ (Fujimaki et al. 2007). Auch für Melanom-Patienten zeigten klinischen Studien einen sensibilisierenden Effekt von IFN- α auf eine Behandlung mit TMZ oder dem verwandten Methylanalog DTIC (Richtig et al. 2004; Kaufmann et al. 2005; Hauschild et al. 2008). IFN- β wird in Japan in Kombination mit DTIC in der Therapie des malignen Melanoms eingesetzt (Nagatani et al. 1995). Jedoch ist der Mechanismus, durch welchen der sensibilisierende Effekt in Melanomzellen ausgelöst wird noch nicht untersucht worden.

Im Folgenden wird diskutiert, ob Typ-I Interferone in den verwendeten Melanomzelllinien D05 und D14 einen sensibilisierenden Effekt auf eine Behandlung mit TMZ ausüben. Wie bereits unter 4.2.1 und von Naumann et al. beschrieben, ist die Läsion O⁶MeG für die Induktion von Apoptose nach TMZ-Behandlung in den Melanomzelllinien D05 und D14 verantwortlich, und MGMT ist ein Resistenz-vermittelnder Faktor (Naumann et al. 2009). Der sensibilisierende Effekt von IFN- α oder IFN- β auf eine Behandlung der Zelllinien D05 und D14 mit TMZ wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MGMT (durch Depletion von MGMT mittels O⁶BG) untersucht.

In der p53-Wildtyp Zelllinie D05 zeigte eine Vorbehandlung mit IFN- β einen sensibilisierenden Effekt gegenüber TMZ unabhängig vom MGMT Status. Der Effekt war jedoch deutlich ausgeprägter, wenn MGMT durch O⁶BG depletiert wurde und führte unter diesen Bedingungen zu einer Verdopplung der durch TMZ-induzierten Apoptoserate. In der p53-mutierten, MGMT defizienten Zelllinie D14 war der sensibilisierende Effekt von IFN- β auf TMZ auch vorhanden, jedoch deutlich geringer als in der p53-Wildtyp Zelllinie D05. Das steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Natsume et al., und Rosati et al. an Gliomzellen, wonach es durch IFN- β zu einer p53 abhängigen Herunterregulation von MGMT kommt, was den sensibilisierenden Effekt gegenüber TMZ hervorruft (Natsume et al. 2005; Natsume et al. 2008; Rosati et al. 2008). Western-Blot-Analysen zeigten, dass eine Inkubation mit IFN- β in keiner der beiden Melanomzelllinien einen Einfluss auf das Expressionsniveau von MGMT hatte.

Eine Vorbehandlung mit IFN- α sensibilisierte die Zellen schwächer gegenüber TMZ als IFN- β und war in der Zelllinie D05 nur unter MGMT depletierten Bedingungen zu beobachten. In der Zelllinie D14 hatte eine Vorbehandlung mit IFN- α keine Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber TMZ. Die höhere Effektivität von IFN- β wurde bereits unter 4.2.2 für die zytotoxische Wirkung der IFNs beschrieben.

Diskussion

Bei dem sensibilisierenden Effekt von IFN- β gegenüber TMZ handelt es sich um eine Erhöhung der TMZ-induzierten Apoptose, was durch Annexin/Propidiumjodid Doppelfärbungen am Durchflusszytometer sowie durch eine verstärkte Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 durch IFN- β nach TMZ-Behandlung nachgewiesen wurde. Dies entsprach den Erwartungen, da Interferone an sich in der Lage sind, in Krebszellen Apoptose auszulösen, was in der Literatur auch für Melanomzellen beschrieben wurde (Chawla-Sarkar et al. 2001; Chawla-Sarkar et al. 2002).

Eine genauere Betrachtung des Zeitraums, in welchem der sensibilisierende Effekt des IFN- β in den Zelllinien D05 und D14 auftritt zeigte, dass er bereits 72 h nach TMZ-Gabe auftritt und sich bis 144 h noch verstärkte. Ebenfalls ist in Abb. 3-24 zu erkennen, dass es sich gerade zu den späten Zeitpunkten (120 und 144 h) sowohl in der Zelllinie D05 als auch in der Zelllinie D14 um einen synergistischen Effekt des IFN- β gegenüber TMZ handelte. Da es sich bei der IFN-Behandlung um eine 24-stündige Inkubation vor der Gabe von TMZ handelte, der sensibilisierende Effekt aber noch 144 h später zu erkennen war, ist es wahrscheinlich, dass er durch eine IFN-bedingte Veränderung der Genexpression ausgelöst wird.

4.2.4 In nicht malignen Zellen wird die Toxizität von Temozolomid nicht durch Interferon- β verstärkt

Für eine Krebstherapie ist es von entscheidender Bedeutung, dass durch die verwendeten Agenzien selektiv die Tumorzellen abgetötet werden, wobei die „gesunden“ Zellen nicht beeinträchtigt werden. Als Beispiel für nicht maligne Zellen, welche jedoch ebenfalls mit dem Chemotherapeutikum im Patienten in Kontakt kommen, dienen in der vorliegenden Arbeit humane Lymphozyten. Bei ihnen handelt es sich um MGMT profiziente, nicht proliferierende Zellen, deren Wachstum jedoch durch Inkubation mit den Antikörpern CD3 und CD28 angeregt werden kann. In proliferierenden Zellen führte eine Behandlung mit TMZ, wie erwartet, nur dann zur Induktion von Apoptose, wenn MGMT nach einer Behandlung mit O⁶BG nicht mehr zur Verfügung stand. Auch in proliferierenden Lymphozyten wird die Zytotoxizität von TMZ über die Läsion O⁶MeG vermittelt und MGMT ist für die Resistenz verantwortlich (Roos et al. 2004). Die hohe Sensitivität der proliferierenden Lymphozyten wird damit erklärt, dass nach einer Behandlung mit TMZ sehr effektiv über den Fas-Rezeptor Apoptose ausgelöst wird (Roos et al. 2004). Eine Behandlung der Zellen mit TMZ erwies sich in nicht-proliferierenden Zellen auch dann

Diskussion

nicht als toxisch, wenn MGMT durch O⁶BG depletiert wurde. Dies zeigt die Notwendigkeit der Proliferation für die TMZ vermittelte Apoptose, welche in der Literatur beschrieben worden ist (Roos et al. 2004). Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β konnte weder in proliferierenden noch in nicht-proliferierenden Zellen, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von MGMT die Toxizität der TMZ-Behandlung erhöht werden. Das wird durch Untersuchungen an Lungenzellen gestützt, wobei Interferone die Toxizität von ionisierender Strahlung in Krebszellen verstärken, nicht jedoch in nicht-malignen Zellen (Schmidberger et al. 1999b).

4.2.5 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β ist gegenüber Fotemustin und ionisierender Strahlung deutlich schwächer ausgeprägt

In der Behandlung von malignen Melanomen wird neben den methylierenden Agenzien DTIC und TMZ auch das chlorethylierende Agens Fotemustin (FM) und ionisierende Strahlung (IR) verwendet (Jacquillat et al. 1990; Mornex et al. 2003). Interferone sind in der Lage, Krebszellen gegenüber chlorethylierenden Agenzien und IR zu sensibilisieren (Garbe et al. 1992; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b). Daher wurde auch der Effekt von IFN- β auf eine Behandlung der Zellen mit FM oder IR untersucht.

FM verursacht in den Zellen Chlorethylierungen an verschiedenen Positionen der DNA. Ähnlich wie für TMZ wurde auch für FM die Alkylierung an der O⁶-Position des Guanins als Läsion nachgewiesen, über welche die Zytotoxizität vermittelt wird (Gonzaga et al. 1992; Vassal et al. 1998; Christmann et al. 2001; Passagne et al. 2003). Diese Läsion wird ebenfalls durch MGMT repariert. In der Zelllinie D05 zeigte eine alleinige FM-Behandlung nur einen sehr schwachen Anstieg der Zelltodrate, was auch hier auf das Vorhandensein von MGMT zurückzuführen war. Erst nach Depletion von MGMT durch O⁶BG führte FM zur Induktion von Zelltod. In der MGMT defizienten Zelllinie D14 führte bereits eine alleinige FM-Behandlung zu Zelltod, dessen Niveau auch durch zusätzliche Behandlung mit O⁶BG nicht gesteigert werden konnte. Somit wird in Melanomzellen die FM-induzierte Zytotoxizität, welche als Apoptose beschrieben wurde, über die Läsion O⁶CIETG vermittelt (Naumann et al. 2009). Gleichzeitig zeigte die Arbeit von Naumann et al., dass MGMT einen entscheidenden Resistenzmarker darstellt.

Ähnlich wie nach TMZ-Gabe führte in der Melanomzelllinie D05 eine Vorbehandlung mit IFN- β zu einer Sensibilisierung gegenüber FM, allerdings ausschließlich unter MGMT depletierten Bedingungen. Diese war jedoch deutlich geringer als nach TMZ-Behandlung.

Diskussion

In der Zelllinie D14 war keine IFN- β bedingte Sensibilisierung zu beobachten. Dass IFN- β die Zellen gegenüber FM deutlich geringer sensibilisiert als gegenüber TMZ könnte damit zusammenhängen, dass beide Agenzien in der Zelle zu unterschiedlichen Reaktionen führen und für die Sensitivität der Zellen gegenüber beider Agenzien unterschiedliche Mechanismen ausschlaggebend sind. Nach einer Behandlung von Gliomzellen und Lymphozyten mit TMZ wird die Aktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose für die hohe Sensitivität von p53-Wildtyp Zellen verantwortlich gemacht, während nach FM-Behandlung die Kapazität der p53 abhängigen DNA-Reparatur für die Sensitivität verantwortlich ist (Roos et al. 2004; Batista et al. 2007; Roos et al. 2007a).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits ausführlich der sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber IR in Pankreaskarzinom-Zelllinien untersucht und diskutiert. In den Melanomzelllinien D05 und D14 führte eine Bestrahlung nur zu einer geringen Zelltodrate, welche auch durch IFN- β nicht gesteigert werden konnte. Das steht in Widerspruch zu Untersuchungen an humanen Krebszelllinien, in denen ein radiosensibilisierender Effekt von IFN- β beschrieben wurde (Gould et al. 1984; Schmidberger et al. 1999a; Schmidberger et al. 1999b; Schmidberger et al. 2003; Ma et al. 2005). Dieser Effekt scheint jedoch zelltypspezifisch zu sein und ist in Melanomzellen nicht vorhanden.

4.2.6 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β gegenüber Temozolomid geht von der Läsion O⁶MeG aus

Der sensibilisierende Effekt von IFN- β auf eine Behandlung der Zelllinie D05 mit TMZ war sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MGMT zu beobachten. Unter diesen zwei Bedingungen wird die Toxizität von TMZ durch verschiedene Läsionen vermittelt. TMZ methyliert die DNA an 13 verschiedenen Positionen. Der größte Anteil der Methylierungen findet an den Ringstickstoffatomen verschiedener Basen statt (Beranek 1990; Kaina et al. 2007). Diese N-Methylierungen sind bei weitem nicht so toxisch wie die Läsion O⁶MeG, vermitteln aber in nicht-proliferierenden Zellen und MGMT profizienten Zellen die Toxizität von TMZ (Briegert and Kaina 2007). Ist kein MGMT vorhanden, ist die mit unter 8 % weitaus seltenere, jedoch hoch toxische Läsion O⁶MeG für die Induktion von Apoptose verantwortlich. Unter diesen Bedingungen überlagert die Toxizität des O⁶MeG die Toxizität der N-Methylierungen. Es wäre somit denkbar, dass IFN- β entweder die Toxizität der N-Methylierungen oder die des O⁶MeG verstärkt. Zur Klärung dieser

Diskussion

Frage wurden die Zelllinien D05 und D14 mit einem weiteren methylierenden Agens, Methylmethansulphonat (MMS) behandelt. Dieses Agens induziert hauptsächlich N-Methylierungen und nur zu 0,3 % die hoch toxische Läsion O⁶MeG (Beranek 1990). Mittels dieses Agens sollte der Einfluss von IFN- β auf die N-Methylierungen untersucht werden. Eine Behandlung der Zelllinie D05 mit MMS führte in Anwesenheit von MGMT kaum zur Induktion von Zelltod. Erst nach MGMT Depletion waren die Zellen sensitiv gegenüber MMS. Die Zelllinie D14 zeigte aufgrund ihrer MGMT Defizienz bereits ohne den MGMT Inhibitor O⁶BG eine hohe Sensitivität gegenüber MMS, welche auch durch Zugabe von O⁶BG nicht erhöht werden konnte. Demnach reicht der geringe Anteil an O⁶MeG aus, um in den Zellen Zelltod auszulösen, was die hohe Toxizität dieser Läsion unterstreicht. Durch eine Vorbehandlung der D05-Zellen mit IFN- β konnte in Anwesenheit von MGMT eine geringe Sensibilisierung beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant war. Wurde jedoch MGMT durch O⁶BG depletiert, zeigte IFN- β einen hoch signifikanten sensibilisierenden Effekt. Dieser war in der Zelllinie D14 nur sehr schwach ausgeprägt und nicht signifikant. Demnach scheint eine IFN- β Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Toxizität der N-Methylierungen zu haben. Ausgangspunkt für den sensibilisierenden Effekt von IFN- β scheint in der Zelllinie D05 die Läsion O⁶MeG zu sein.

Dass der sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber TMZ in der Zelllinie D05 in Anwesenheit von MGMT zu beobachten war könnte damit zusammenhängen, dass diese Zelllinie nur ein geringes Expressionsniveau an MGMT von 298 fmol/mg Protein aufweist. Wie für Melanomzellen beschrieben, besteht eine direkte Korrelation zwischen MGMT Niveau und Sensitivität der Zellen gegenüber methylierenden Agenzien (Pepponi et al. 2003). Wurde die Zelllinie D05 stabil mit MGMT transfiziert, um in den Zellen eine Überexpression des Proteins hervorzurufen, hatte eine IFN- β Vorbehandlung keinen Einfluss mehr auf die Sensitivität der Zellen gegenüber TMZ.

4.2.7 Der sensibilisierende Effekt von Interferon- β gegenüber Temozolomid wird nicht durch eine Beeinflussung der DNA-Reparatur vermittelt

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die durch TMZ hervorgerufene Läsion O⁶MeG als die Läsion charakterisiert, von welcher der sensibilisierende Effekt des IFN- β ausgeht. Wurde MGMT durch den Inhibitor O⁶BG depletiert, verstärkt IFN- β die Toxizität der durch TMZ hervorgerufenen Läsion O⁶MeG. Während der Prozessierung von O⁶MeG kommt es im

Diskussion

Zuge der Replikation zur Manifestierung einer Basenfehlpaarung. Diese wird von der MMR erkannt und vergeblich prozessiert, woraufhin es zum Kollaps der Replikationsgabeln und zur Bildung von DSB kommt (Mojas et al. 2007). Über diese sekundären Läsionen wird nach TMZ-Gabe die Apoptose vermittelt (Kaina et al. 1997; Ochs and Kaina 2000; Lips and Kaina 2001a). Eine 24-stündige Inkubation mit IFN- β könnte auf die verschiedenen Prozessierungsschritte einen Einfluss haben, was im Folgenden zu einer erhöhten Apoptoserate führt, welche den sensibilisierenden Effekt ausmacht.

Als erstes wurde der Einfluss von IFN- β auf die MMR untersucht. Der MMR Status ist entscheidend für die Sensitivität von Zellen gegenüber methylierende Agenzien (Dosch et al. 1998; Pepponi et al. 2003; Naumann et al. 2009). MMR defiziente Zellen reagieren hoch resistent auf eine Behandlung mit TMZ (Fink et al. 1998; Naumann et al. 2009), wohingegen eine Hochregulation der MMR die Zellen gegenüber Methylanzen sensibilisiert (Roos et al. 2007b). Da IFNs über den JAK/STAT Signalweg in der Lage sind, Einfluss auf die Genexpression ihrer Zielzellen zu nehmen (Silvennoinen et al. 1993; Schindler and Darnell 1995; Stark et al. 1998), wäre es vorstellbar, dass durch eine Behandlung mit IFN- β in den Melanomzellen die MMR-Proteine hochreguliert werden, was im Folgenden durch das vermehrte Auftreten von DSB den sensibilisierenden Effekt auslösen könnte. Western-Blot-Analysen ergaben, dass das Expressionsniveau der für die MMR entscheidenden Proteine MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 durch IFN- β nicht beeinflusst wurde.

Zweitens wurde der Einfluss von IFN- β auf die TMZ vermittelte Bildung von DSBs mittels γ H2AX Immunfluoreszenz untersucht. Die Phosphorylierung des Histons H2AX (γ H2AX) an einem DSB ist ein frühes Ereignis nach DNA-Schädigung. Daher sind die durch Immunfluoreszenz nachweisbaren γ H2AX Foci ein häufig verwendeter und weitgehend akzeptierter Marker für DSBs (Ismail and Hendzel 2008). Die Abnahme der Foci-Anzahl über die Zeit spiegelt demnach die Reparatur der DSBs wider. Eine 24-stündige IFN- β Vorbehandlung führte nicht zu einer verstärkten Induktion von TMZ vermittelten DSBs. Dies war auch nicht zu vermuten, da die MMR, welche ausschlaggebend für die Bildung von DSBs nach TMZ-Behandlung ist, durch IFN- β nicht beeinflusst wurde. Auch die Reparaturkinetik der TMZ-induzierten DSBs wurde durch vorangegangene Inkubation mit IFN- β nicht beeinflusst. Da für die Reparatur von O⁶MeG vermittelten DSBs hauptsächlich die HR und nicht NHEJ verantwortlich ist (Roos et al. 2009), wurde durch Western-Blot-Analysen der Einfluss von IFN- β auf die Expression

Diskussion

zweier HR-Proteine, Rad51 und Rad52 untersucht. Eine 24-stündige IFN- β Inkubation veränderte nicht das Expressionsniveau der untersuchten Proteine. Somit konnten die Western-blot Analysen die durch γ H2AX erlangten Ergebnisse, dass IFN- β keinen Einfluss auf die Reparatur der TMZ-induzierten DSBs nimmt, bestätigen. Das steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Schmidberger et al. und Dritschilo et al. an humanen und murinen Tumor-Zellen, wonach IFN- β die HR beeinflusst (Dritschilo et al. 1982; Schmidberger et al. 2003). Somit wird der sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber TMZ weder durch einen Einfluss auf die MMR noch durch eine Veränderung der Induktion von DSBs oder eine Beeinflussung der HR ausgelöst.

4.2.8 Der sensibilisierende Effekt des Interferon- β gegenüber Temozolomid könnte in der p53-mutierten Zelllinie D14, nicht aber in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 durch eine Verstärkung des mitochondrial-vermittelten Apoptoseweges ablaufen

Nachdem gezeigt worden ist, dass O⁶MeG die ausschlaggebende Läsion für den sensibilisierenden Effekt von IFN- β gegenüber TMZ ist und ein Einfluss von IFN- β auf deren Prozessierung ausgeschlossen wurde, scheint der sensibilisierende Effekt von IFN- β direkt mit einer Verstärkung der durch TMZ ausgelösten Apoptose-Signalkaskade zusammen zu hängen.

Nach einer Behandlung mit TMZ stehen den Zellen zwei Wege zur Verfügung, über welche Apoptose ausgelöst werden kann. Der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Weg und der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Weg. Im Gegensatz zur Literatur, wonach TMZ-Behandlung in p53-Wildtyp Zellen zu einer Aktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose führt (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a), konnten in der hier vorliegenden Arbeit Hinweise dafür erbracht werden, dass nach TMZ-Gabe in Melanomzellen der mitochondriale Apoptose-Signalweg aktiviert wird. Dies geschah unabhängig vom p53-Status. Dafür sprach der Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-9 nach TMZ-Behandlung in der Zelllinie D05 und D14 (vgl. 3.2.1.2) sowie die Tatsache, dass p53-Wildtyp Melanomzellen nicht sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ reagierten als p53-mutierte Zellen (vgl. 3.2.1.1). Daher wurde als erstes das Expressionsniveau einiger für den mitochondrialen Weg wichtiger Proteine nach TMZ-Behandlung und nach Kombination von TMZ mit IFN- β in beiden Zelllinien D05 und D14 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Eine zusätzliche Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β führte jedoch in

Diskussion

der Zelllinie D05 nicht zu einer Veränderung der Expression der untersuchten Proteine. In der Zelllinie D14 führte nur eine Kombination von TMZ und IFN- β Vorbehandlung zu einer deutlichen Abnahme von Bax im Cytoplasma. Bax wird auf einen apoptotischen Stimulus hin in die Mitochondrienmembran rekrutiert, wo es Kanäle bildet und die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt, was der entscheidende Schritt in der mitochondrial-vermittelten Apoptose darstellt (Hacker and Weber 2007; Kepp et al. 2007). Da Bax nach TMZ-Gabe p53 abhängig transkribiert wird (Wu and Deng 2002), D14 aber p53-mutiert ist, kann auf diesen apoptotischen Stimulus hin nur begrenzt zusätzliches Bax transkribiert werden, wobei die Translokation an die Mitochondrienmembran durch eine Abnahme von Bax im Cytoplasma zeigt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Vorbehandlung mit IFN- β in der Zelllinie D14 zu einer Verstärkung der mitochondrial-vermittelten Apoptose führt. Diese Vermutung muss jedoch noch durch weitere Experimente gestützt werden.

Da der sensibilisierende Effekt in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 stärker ausgeprägt war und die Mehrzahl der Melanome p53-wildtypisch ist, wurde im Folgenden hauptsächlich auf die Aufklärung des dem sensibilisierenden Effekts zugrunde liegenden Mechanismus in p53-Wildtyp Zelllinien eingegangen.

4.2.9 Interferon- β bewirkt in den p53-Wildtyp Melanomzelllinien D05, aber auch in der p53-mutierten Zelllinie D14 eine verstärkte Expression der Pro-Caspase-8

Sowohl für Gliomzellen als auch für humane Lymphozyten wurde beschrieben, dass in p53-Wildtyp Zellen die TMZ vermittelte Apoptose über den Fas-Rezeptor Signalweg verläuft (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). Deshalb wurde in den hier verwendeten Melanomzellen, obwohl für sie beschrieben wurde, dass sie einen Defekt in der Fas-Rezeptor-vermittelnden Apoptose-Signalkaskade haben (Rivoltini et al. 1998; Thomas and Hersey 1998), der Einfluss von IFN- β auf die Fas-Rezeptor induzierte Apoptose untersucht. Zwei entscheidende Komponenten des Fas-Rezeptor Signalweges sind der Fas-Rezeptor und die Pro-Caspase-8 (Muzio et al. 1996; Muzio et al. 1998). Der Fas-Rezeptor wird durch einen apoptotischen Stimulus p53 abhängig transkribiert und in der Zellmembran angereichert (Muller et al. 1998). Diese p53 Abhängigkeit erklärt, weshalb der Fas-Rezeptorweg nur in p53-Wildtyp Zellen eine Rolle spielt. Die Pro-Caspase-8 ist

Diskussion

die für diesen Apoptoseweg entscheidende Initiatorcaspase, welche die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (Muzio et al. 1997).

Durch Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass die Expression des Fas-Rezeptors nicht durch IFN- β beeinflusst wird. In beiden untersuchten Melanomzelllinien war das basale Pro-Caspase-8 Niveau sehr gering. Das entspricht Untersuchungen von Fulda et al. (Fulda et al. 2001). Durch eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit IFN- β konnte das Niveau an Pro-Caspase-8 besonders in der Zelllinie D05 gesteigert werden. In der Zelllinie D14 war der Anstieg des Pro-Caspase-8 Niveaus durch IFN- β geringer. Das entspricht den unter 3.2.2.1 bzw. 4.2.3 beschriebenen Daten, wonach besonders die p53-Wildtyp Zelllinie D05 durch IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert werden kann. In der p53-mutierten Zelllinie D14 könnte das geringe basale Niveau des Fas-Rezeptors ausreichen, um durch die IFN- β vermittelte Verstärkung der Pro-Caspase-8 Expression einen leichten sensibilisierenden Effekt auszulösen. Dass in p53-mutierten Zelllinien das basale Niveau des Fas-Rezeptors ausreichen kann, um über diesen Signalweg Apoptose auszulösen, wurde bereits an p53 -/- Mäusefibroblasten gezeigt (Tomicic et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit, weshalb der sensibilisierende Effekt von IFN- β auch in der p53-mutierten Zelllinie D14 auftritt wäre, dass über die Pro-Caspase-8 eine Verknüpfung des Fas-Rezeptor vermittelten und mitochondrial vermittelten Apoptosewegs besteht. Die Pro-Caspase-8 ist in der Lage, das Protein Bid zu schneiden, wodurch tBid entsteht. tBid kann das für den mitochondrialen Weg notwendige pro-apoptotische Protein Bax aktivieren. Daher könnte eine verstärkte Expression der Pro-Caspase-8 auch in der p53-mutierten Zelllinie D14 über den mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg zu einem höheren Apoptoseniveau führen.

Die hier beobachtete Hochregulation der Pro-Caspase-8, wie sie bereits für IFN- γ und IFN- α an Medullablastomzellen und Leberkarzinomzellen beschrieben wurde (Fulda and Debatin 2002; Casciano et al. 2004a; Liedtke et al. 2006), könnte dadurch erklärt werden, dass IFNs über den JAK/STAT Signalweg in der Lage sind, die Genexpression zu beeinflussen (Silvennoinen et al. 1993; Schindler and Darnell 1995; Stark et al. 1998), wenn in den Zielgenen ein Bereich vorhanden ist, an den der Interferon-stimulierte Transkriptionsfaktor 3 (ISGF 3) binden kann. Ein solcher Bereich, ein „Interferon-stimulated-response-element“ (ISRE), wurde in der Promotorregion der Pro-Caspase-8 nachgewiesen (Casciano et al. 2004b; De Ambrosis et al. 2007). Eine weitere Möglichkeit, wie IFN- β eine Verstärkung der Pro-Caspase-8 Expression hervorrufen könnte, wäre über Demethylierung der Promotorregion. Die Expression von Genen kann über Hypermethylierung an der Promotorregion gehemmt werden. Dies wurde bereits für das

Diskussion

MGMT-Gen (Watts et al. 1997) wie auch für Caspase-8 in Tumorzellen gezeigt (Eggert et al. 2000; Grotzer et al. 2000; Hopkins-Donaldson et al. 2003) und ist, im Falle der Caspase-8, mit einer schlechten Prognose der Patienten verbunden (Pingoud-Meier et al. 2003). Demethylierung der Promotorregion führt demnach zu einer Verstärkung der Genexpression. Für IFN- β ist gezeigt worden, dass es Promotor-Demethylierungen hervorrufen kann (Micali et al. 2007). Welcher Mechanismus in der vorliegenden Arbeit zu der Verstärkung der Pro-Caspase-8 Expression führt, wurde nicht weiterführend untersucht.

4.2.10 Der in D05 und D14 beobachtete Interferon-Effekt konnte in weiteren Melanomzellen bestätigt werden

Durch Einbeziehung einer weiteren p53-Wildtyp Melanomzelllinie (A375) und einer weiteren p53-mutierten Melanomzelllinie (RPMI 7951) (Haapajarvi et al. 1999) sollten im Folgenden mehrere Fragen beantwortet werden: **i)** Handelt es sich bei dem sensibilisierenden Effekt von IFN- β gegenüber TMZ um ein für die Zelllinien D05 und D14 spezifischen Phänotyp? **ii)** Ist der sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber TMZ generell in p53-Wildtyp Zelllinien ausgeprägter als in p53-mutierten Zelllinien und demnach abhängig vom p53-Status der Zellen? **iii)** Zeigen auch andere Melanomzelllinien das für D05 und D14 beobachtete und in der Literatur für Melanomzellen beschriebene (Fulda et al. 2001) geringe Niveau an Pro-Caspase-8 und kann dieses besonders in p53-Wildtyp Zellen durch eine Inkubation mit IFN- β gesteigert werden?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden die p53-Wildtyp Zelllinie A375 und mutierte Zelllinien RPMI 7951 hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TMZ und hinsichtlich des sensibilisierenden Effekts von IFN- β gegenüber TMZ untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die p53-Wildtyp Zelllinie A375 nicht sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ reagierte als die p53-mutierte Zelllinie RPMI 7951. Jedoch konnte die p53-Wildtyp Zelllinie A375 deutlich stärker durch IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert werden als die p53-mutierte Zelllinie RPMI 7951. Ebenfalls wurde in der Zelllinie A375 ein sehr geringes Niveau an Pro-Caspase-8 nachgewiesen, was durch eine 24-stündige IFN- β Inkubation deutlich erhöht werden konnte. Die Zelllinie RPMI, welche nicht durch IFN- β gegenüber TMZ sensibilisiert werden konnte, zeigte ein vergleichsweise hohes Niveau an Pro-Caspase-8, welches durch IFN- β Inkubation nicht gesteigert werden konnte.

Diskussion

Der beschriebene Effekt von IFN- β gegenüber einer Behandlung von Melanomzelllinien mit TMZ konnte demnach von dem bisherigen Zellsystem D05 und D14 auf weitere Melanomzelllinien ausgeweitet werden. Das spricht für die Allgemeingültigkeit des beobachteten IFN Effekts in p53-Wildtyp Melanomzelllinien.

4.2.11 p53-Wildtyp Melanomzellen weisen einen Defekt in der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose auf, welcher durch eine 24-stündige Interferon- β Vorinkubation überwunden werden kann

Sowohl für Gliomzellen als auch für humane Lymphozyten wurde gezeigt, dass p53-Wildtyp Zellen deutlich sensitiver auf eine Behandlung mit methylierenden Agenzien, wie TMZ, reagieren als p53-mutierte Zellen. Die erhöhte Sensitivität der p53-Wildtyp Gliomzellen und humanen Lymphozyten war auf eine p53 abhängige Aktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose zurückzuführen (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). Die hier verwendeten Melanomzelllinien verhielten sich jedoch gegensätzlich. p53-Wildtyp Zelllinien waren resistenter bzw. vergleichbar sensitiv wie p53-mutierte Zelllinien. Erst eine Vorbehandlung mit IFN- β führte dazu, dass p53-Wildtyp Melanomzellen ihre Resistenz gegenüber TMZ überwunden und sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ reagierten als p53-mutierte Zelllinien. Im Folgenden wird diskutiert, ob die Resistenz der hier verwendeten p53-Wildtyp Melanomzelllinien gegenüber TMZ durch einen Defekt in der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose hervorgerufen wird und ob dieser durch IFN- β überwunden werden kann.

Essentiell für die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Signalkaskade ist eine Methylanzen induzierte Hochregulation des Fas-Rezeptors, wie sie u. a. für Gliomzellen und humane Lymphozyten beschrieben wurde (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007a). Da der Fas-Rezeptor p53 abhängig exprimiert wird, findet diese Hochregulation nur in p53-Wildtyp Zellen statt (Muller et al. 1998). In den hier verwendeten Melanomzelllinien D05 und D14 konnte die gesteigerte Expression des Fas-Rezeptors in der p53-Wildtyp Zelllinie D05 72 h nach TMZ-Gabe nachgewiesen werden, nicht jedoch in der p53-mutierten Zelllinie D14. Damit verhalten sich die Melanomzelllinien in diesem Punkt, dem Beginn der Fas-Rezeptor Signalkaskade, wie die in der Literatur beschriebenen Zellsysteme. Der Unterschied zwischen Gliomzellen und Melanomzellen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TMZ muss sich demnach im weiteren Verlauf der Signalkaskade manifestieren. Dies sollte, ebenso wie die Ursache der IFN- β bedingten Sensibilisierung gegenüber TMZ,

Diskussion

durch Experimente mit einem Fas-aktivierenden Antikörper genauer charakterisiert werden. Der Fas-aktivierende Antikörper ist in der Lage durch Bindung an den Fas-Rezeptor gezielt diesen Apoptoseweg auszulösen. Die Antikörpergabe erfolgte 72 h nach TMZ-Behandlung. Die Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine moderate Apoptoserate (vgl. Abb.: 3-24), so dass eine zusätzliche Aktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose durch den aktivierenden Antikörper beobachtet werden konnte. Die p53-Wildtyp Melanomzelllinie D05 zeigte nach einer Behandlung mit TMZ, O⁶BG und dem Fas-aktivierenden Antikörper nur eine sehr geringe Apoptoserate (Abb. 3-37 B, Säule 5). Dies deutet auf einen Defekt in der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptosekaskade hin. Durch eine Kombination von TMZ, O⁶BG und IFN- β konnte, nach der Gabe des Fas-aktivierenden Antikörpers, die Apoptoserate deutlich erhöht werden (Abb. 3-37 B, Säule 7). Demnach scheinen die Zellen durch die Kombination mit IFN- β ihre Fähigkeit wieder zu erlangen nach TMZ-Gabe über den Fas-Rezeptor-Signalweg Apoptose auszulösen. Dieser Effekt war in der p53-mutierten Zelllinie D14 nur sehr schwach erkennbar.

Funktionell bewiesen wurden diese Ergebnisse durch eine stabile Transfektion der p53-Wildtyp Zelllinien D05 und A375 mit einem Vektor, welcher für dominant-negatives (DN)-FADD codiert. FADD ist das Adaptermolekül zwischen dem Fas-Rezeptor und der Pro-Caspase-8 und für die Ausführung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose zwingend notwendig (Chinnaiyan et al. 1995; Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996). DN-FADD ist aufgrund eines Aminosäureaustausches nicht in der Lage Pro-Caspase-8 zu rekrutieren (Tewari and Dixit 1995; Chinnaiyan et al. 1996). Da es gegenüber endogenem FADD dominant exprimiert wird kommt es durch eine Transfektion der Zellen mit DN-FADD zu einer Hemmung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose (Chinnaiyan et al. 1996). In den Zelllinien D05 und A375 hatte die Expression von DN-FADD keine oder nur eine geringe Auswirkung auf die Apoptoserate, wenn die Zellen, in Abwesenheit von MGMT, mit TMZ und dem Fas-aktivierenden Antikörper behandelt wurden (Abb. 3-38 B+C, Säulen 6). Das beweist, dass die p53-Wildtyp Melanomzelllinien D05 und A375 den Fas-Rezeptorweg nach einer Behandlung mit TMZ nicht nutzen. Erst wenn die Zellen mit IFN- β vorbehandelt wurden, hatte eine Hemmung des Fas-Rezeptorweges durch DN-FADD einen Einfluss auf die TMZ-induzierte Apoptoserate (Abb. 3-38 B+C, Säulen 8). DN-FADD exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen, welche das Protein nicht exprimieren, eine deutlich geringere Apoptoserate. Das beweist, dass die Zellen nach einer Vorbehandlung mit IFN- β in der Lage sind, den Fas-Rezeptorweg zu nutzen, weshalb eine Hemmung des selben zu einer niedrigeren Apoptoserate führt. Für die

Diskussion

Zelllinie D05 konnten diese Ergebnisse mit einer weiteren unabhängigen Methode (SubG1 Messung) bestätigt werden.

4.2.12 Interferon- β sensibilisiert Melanomzellen ebenfalls gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass dem sensibilisierenden Effekt des IFN- β gegenüber TMZ-Behandlung eine Verstärkung des Rezeptor-vermittelten Apoptoseweges zugrunde liegt. Ausschlaggebend hierfür könnte eine IFN- β vermittelte Erhöhung des Expressionsniveau der Pro-Caspase-8 sein. Die Pro-Caspase-8 ist ein Schlüsselenzym der Rezeptor-vermittelten Apoptose, zu der sowohl die Fas-Rezeptor als auch die TRAIL-vermittelte Apoptosekaskade gehören. Wenn die IFN- β vermittelte Hochregulation der Pro-Caspase-8 das entscheidende Ereignis darstellt, so sollte eine IFN- β Behandlung die Zellen auch gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose sensibilisieren. Um das zu überprüfen, wurden Experimente mit dem Todes-Rezeptor Liganden TRAIL durchgeführt. TRAIL bindet an spezifische Rezeptoren und ist dadurch in der Lage, Apoptose zu induzieren. Eine zusätzliche Behandlung mit einem Zytostatikum war in diesem Falle nicht notwendig. Außerdem ist die TRAIL vermittelte Apoptose im Gegensatz zu der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose unabhängig vom p53-Status der Zellen (Meng and El-Deiry 2001; Ehrhardt et al. 2008). Eine Behandlung der Zellen mit TRAIL zeigte in allen drei untersuchten Melanomzelllinien nur eine moderate Induktion von Apoptose. Das steht in Einklang mit der Literatur, wonach Melanomzellen Resistent gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose sind (Chawla-Sarkar et al. 2002). Erst durch eine zusätzliche Vorinkubation mit IFN- β konnten die Zellen gegenüber TRAIL sensibilisiert werden, wie auch schon von Chawla-Sarkar et al. beschrieben (Chawla-Sarkar et al. 2002). Die Sensibilisierung korrelierte in der vorliegenden Arbeit mit der Hochregulation der Pro-Caspase-8. Die Zelllinien D05 und A375, welche eine starke Hochregulation der Pro-Caspase-8 durch IFN- β zeigten, zeigten auch eine starke Sensibilisierung gegenüber TRAIL. Die Zelllinie D14, welche nur eine schwache Hochregulation der Pro-Caspase-8 zeigte, wurde durch IFN- β auch nur schwach gegenüber TRAIL sensibilisiert.

Bei dem Fas-Rezeptor und dem TRAIL-Rezeptor handelt es sich um verschiedene Rezeptoren, welche durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden. Auch erfolgt die Expression der Rezeptoren über verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Trotz dieser Unterschiede sensibilisierte IFN- β die Melanomzellen sowohl gegenüber TMZ und der damit verbundenen Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose als auch gegenüber TRAIL-

Diskussion

vermittelter Apoptose. Daraus ergibt sich, dass der sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber TMZ nicht durch eine Verstärkung der Expression des Fas-Rezeptors oder des Fas-Liganden hervorgerufen wird. Dies konnte ebenfalls durch Western-Blot Analysen bestätigt werden, wonach die Expression des Fas-Rezeptors durch IFN- β nicht beeinflusst wird. Die IFN- β vermittelte Hochregulation der Pro-Caspase-8 scheint dagegen das essentielle Ereignis zu sein, was den sensibilisierenden Effekt von IFN- β gegenüber Rezeptor-vermittelter Apoptose auslöst.

4.2.13 Die verstärkte Expression der Pro-Caspase-8 durch Interferon- β ist essentiell für die Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose in p53-Wildtyp Melanomzellen

Die bisherigen Untersuchungen zur Sensibilisierung von p53-wildtypischen Melanomzelllinien durch eine Kombinationsbehandlung aus IFN- β und TMZ deuten auf die IFN- β vermittelte Heraufregulierung der Pro-Caspase-8 als das essentielle Ereignis dieses Effekts hin. Um dies funktionell zu untersuchen, wurde die p53-Wildtyp Melanomzelllinie A375 mit einem Vektor, welcher eine siRNA-Sequenz gegen Caspase-8 enthält, stabil transfiziert und mit A375 Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA (HRS-Sequenz) transfiziert wurden, verglichen. Die Caspase-8 siRNA exprimierenden Zellen, nicht aber die, welche die Kontroll-siRNA exprimierten, besaßen ein deutlich verringertes Pro-Caspase-8 Niveau. Durch den „knock-down“ der Caspase-8 zeigte eine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β keinen zusätzlichen Effekt mehr auf die Behandlung mit TMZ. Die Expression der Kontroll-siRNA hatte hingegen keinen Einfluss auf den sensibilisierende Effekt von IFN- β gegenüber TMZ. Hierdurch konnte funktionell nachgewiesen werden, dass die Hochregulation der Pro-Caspase-8 das entscheidende Ereignis darstellt, welches für die Sensibilisierung der p53-Wildtyp Melanomzelllinien gegenüber TMZ verantwortlich ist. Diese Untersuchungen zeichnen sich durch ihre hohe klinische Relevanz aus, da 80 % aller malignen Melanome p53-Wildtyp sind.

4.2.14 Schematische Darstellung der Ergebnisse

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich für die Sensibilisierung der p53 Melanomzelllinien gegenüber TMZ durch IFN- β folgendes Modell erstellen:

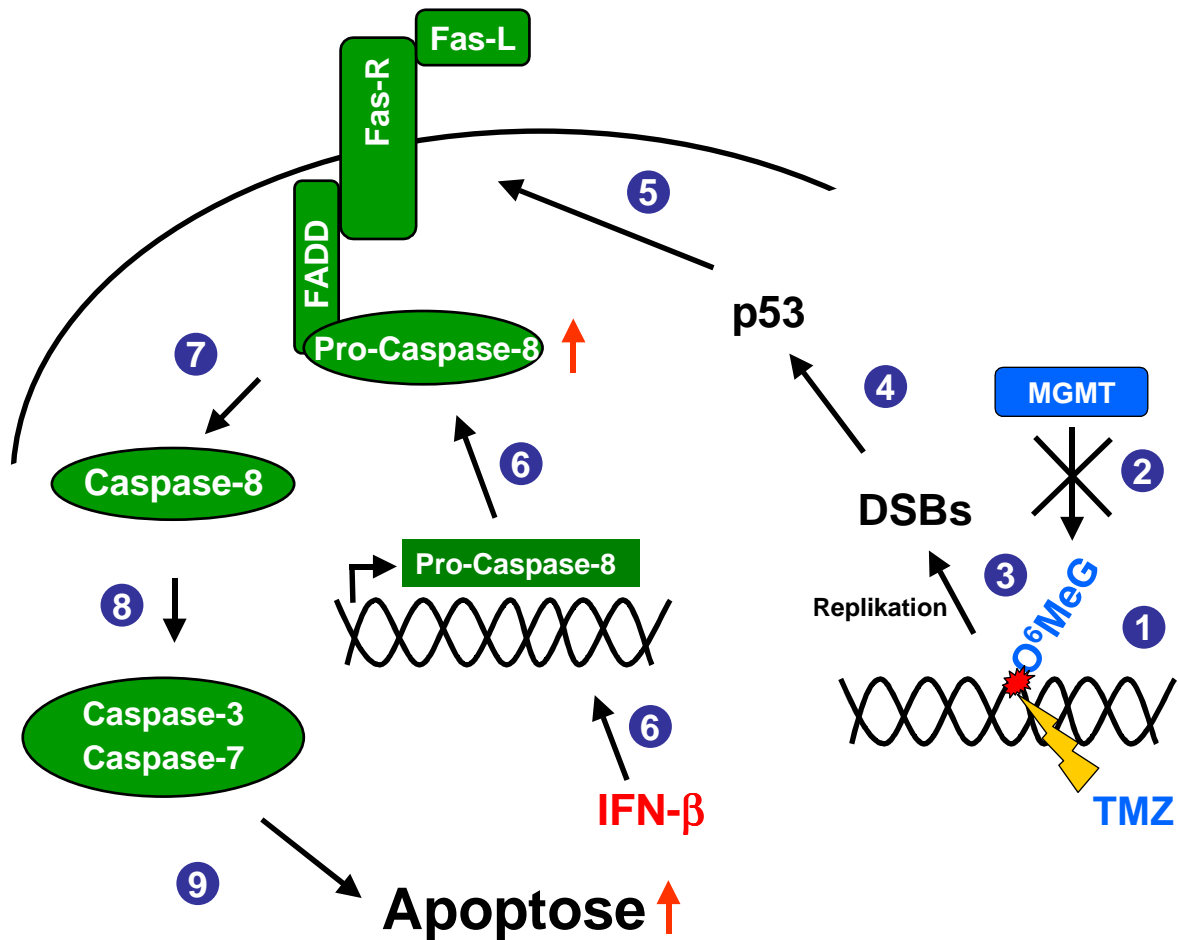


Abb. 4-1: Sensibilisierung von p53-Wildtyp Melanomzellen gegenüber Temozolomid durch Interferon- β
Die Zelltod vermittelnde Läsion, welche von TMZ induziert wird, ist die Methylierung der DNA an der Position O⁶ des Guanins (O⁶MeG) (1). Diese Läsion wird sehr effizient von dem Reparaturenzym MGMT repariert (2). Wird dieses durch O⁶BG depletiert, kommt es während der DNA-Replikation über O⁶MeG zur Induktion von DSBs (3). Von diesen ausgehend kommt es zur Stabilisierung von p53 (4). p53 fungiert als Transkriptionsfaktor und bewirkt die verstärkte Expression des Fas-Rezeptor Proteins, welches sich in der Membran der Zellen anreichert (5). Die Aktivierung des Fas-Rezeptors durch die Bindung des Fas-Liganden an der extrazellulären Domäne des Rezeptormoleküls bewirkt die Rekrutierung von FADD was wiederum die Initiatorcaspase Pro-Caspase-8 rekrutiert. Pro-Caspase-8 wird jedoch in den Melanomzellen nur sehr schwach exprimiert. Eine IFN- β Inkubation steigert die Expression der Pro-Caspase-8 (6). Durch proteolytische Spaltung wird die Pro-Caspase-8 in die aktive Caspase-8 überführt (7) Diese aktive Caspase-8 ist in der Lage die Effektorcaspasen-3 und -7 zu spalten und somit zu aktivieren (8). Durch die IFN- β bedingte Steigerung der Pro-Caspase-8 Expression kommt es zu vermehrter Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 und damit zu einer IFN- β vermittelten Steigerung der TMZ-induzierten Apoptose (9).

5 Zusammenfassung

Pankreaskarzinome und maligne Melanome weisen eine hohe Resistenz gegenüber Zytostatika und Bestrahlung in der Therapie auf. Die Behandlung eines metastasierenden Pankreaskarzinoms besteht aus einer Kombination aus 5-FU, CDDP und IR. Für die Behandlung des malignen Melanoms ist das methylierende Agenz DTIC das Mittel erster Wahl. Das ebenfalls methylierende Agenz TMZ, welches jedoch in Deutschland noch nicht für die Behandlung von malignen Melanomen zugelassen ist, erlangt immer größere Bedeutung. Die Ansprechrate der Tumore kann durch Kombination mit IFNs erhöht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde an Pankreaskarzinom- bzw. Melanomzelllinien untersucht, ob IFNs einen radio- bzw. chemosensibilisierender Effekt ausüben und, wenn ja, welcher Mechanismus hierfür verantwortlich ist.

Es wurden zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien (Panc-1, Su8686, Capan-1, Capan-2, Bxpc-3, PA-TU 8988T, Aspc-1, HS 766T, Mia-PaCa-2 und PA-TU 8902) untersucht. Diese zeigten eine hohe Variabilität in ihrer intrinsischen Radiosensitivität sowie in ihrer Sensitivität gegenüber IFN- α und IFN- β . IFN- β erwies sich als toxischer im Vergleich zu IFN- α . Die radiosensibilisierende Wirkung der IFNs an Pankreaskarzinom-Zelllinien war moderat, wobei IFN- β im Vergleich zu IFN- α effektiver war. Ein Zusammenhang zwischen dem IFN-Rezeptor Status und dem zytotoxischen oder radiosensibilisierenden Effekt der IFNs konnte nicht beobachtet werden. Der radiosensibilisierende Effekt ging mit einer deutlichen Erhöhung der α -Komponente, einer für Überlebenskurven charakteristische zellspezifische Konstante, einher und kam durch eine IFN- β vermittelte Verstärkung der IR-induzierten Apoptoserate zustande. Dies wurde sowohl durch SubG1 als auch durch Annexin V / PI Messungen gezeigt. Einen Einfluss von IFN- β auf den Zellzyklus und die DSB-Reparatur konnte durch funktionelle Untersuchungen sowie durch PCR bzw. Western-Blot-Analysen als Grund für den sensibilisierenden Effekt ausgeschlossen werden. Ein sensibilisierender Effekt von IFN- β auf die durch TMZ-induzierte Zytotoxizität war für die Pankreaskarzinom-Zelllinien weder in MGMT-profizientem noch –depletiertem Zustand zu beobachten.

Zur Untersuchung der sensibilisierenden Eigenschaften von IFNs gegenüber TMZ in malignen Melanomzelllinien wurden p53-Wildtyp (D05 und A375) und mutierte Zelllinien (D14 und RPMI 7951) untersucht. Gegenüber alleiniger TMZ-Behandlung reagierten die untersuchten p53-Wildtyp Melanomzelllinien, im Gegensatz zu Gliomzellen oder humanen Lymphozyten, nicht sensitiver auf eine Behandlung mit TMZ als p53-mutierte Zelllinien.

Zusammenfassung

Der Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-9 lieferte einen Hinweis darauf, dass in den Melanomzelllinien unabhängig vom p53-Status nach alleiniger TMZ-Behandlung der mitochondriale Apoptoseweg aktiviert wird. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- α oder IFN- β konnte die TMZ-induzierte Apoptoserate in malignen Melanomzellen deutlich gesteigert werden. In p53-Wildtyp Melanomzellen war der chemosensibilisierende Effekt der IFNs besonders ausgeprägt. IFN- β erwies sich hierbei als effektiver im Vergleich zu IFN- α , weshalb für die folgenden Versuche IFN- β verwendet wurde. In humanen Lymphozyten, welche als Beispiel für nicht malignen Zellen verwendet wurden, hatte eine zusätzliche IFN- β Behandlung keine Auswirkungen auf die Sensitivität der Zellen gegenüber TMZ. Durch stabile Transfektion der Zelllinie D05 mit MGMT konnte das durch TMZ-induzierte Addukt O⁶MeG als für den sensibilisierenden Effekt ausschlaggebende DNA-Schädigung charakterisiert werden. Western-Blot-Analysen und γ H2AX-Immunfluoreszenz Untersuchungen konnten einen Einfluss von IFN- β auf die Prozessierung der Läsion O⁶MeG sowie einen Einfluss von IFN- β auf die Induktion und Reparatur von TMZ verursachten DSBs ausschließen. Durch Experimente mit einem Fas-aktivierenden Antikörper und durch eine stabile Transfektion der Zelllinien D05 und A375 mit DN-FADD konnte gezeigt werden, dass p53-Wildtyp Melanomzellen nicht oder nur eingeschränkt in der Lage sind, nach TMZ-Behandlung über den Fas-Rezeptor Signalweg Apoptose zu induzieren. Ausschlaggebend hierfür ist die geringe Pro-Caspase-8 Expression dieser Zelllinien. Eine IFN- β Vorbehandlung bewirkte eine Reaktivierung des Fas-Rezeptor Signalweges, was mit einer verstärkten Expression der Pro-Caspase-8 einherging. Durch Experimente mit Caspase-8 siRNA konnte diese IFN- β induzierte Verstärkung der Pro-Caspase-8 Expression als entscheidender Faktor für den sensibilisierenden Effekt ausgemacht werden. Zum ersten Mal konnte damit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass p53-Wildtyp Melanomzellen durch eine IFN- β vermittelte Hochregulation der Pro-Caspase-8 ihre Fähigkeit wiedererlangen, nach TMZ-Behandlung über den Fas-Rezeptor Signalweg Apoptose auszulösen. Diese Arbeiten weisen einen Weg, auf welchem die hohe Resistenz von malignen Melanomzellen, welche zu 80 % das nicht mutierte p53 Gen beherbergen, über eine IFN- β induzierte Reaktivierung der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptosekaskade überwunden werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9(2): 423-432.
- Adams, J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17(20): 2481-2495.
- Agarwala, S.S. and Kirkwood, J.M. 2002. Update on adjuvant interferon therapy for high-risk melanoma. *Oncology (Williston Park)* 16(9): 1177-1187; discussion 1190-1172, 1197.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. 2000. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 60(21): 5934-5936.
- Alanko, T., Rosenberg, M., and Saksela, O. 1999. FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 113(1): 111-116.
- Allema, J.H., Reinders, M.E., van Gulik, T.M., Koelemay, M.J., Van Leeuwen, D.J., de Wit, L.T., Gouma, D.J., and Obertop, H. 1995. Prognostic factors for survival after pancreaticoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region. *Cancer* 75(8): 2069-2076.
- Allen, R.T., Cluck, M.W., and Agrawal, D.K. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 54(5): 427-445.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171.
- Atkins, M.B., Hsu, J., Lee, S., Cohen, G.I., Flaherty, L.E., Sosman, J.A., Sondak, V.K., and Kirkwood, J.M. 2008. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 26(35): 5748-5754.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922): 499-506.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D., Ross, M.I., Sober, A., Soong, S.J., Thompson, J.A., Thompson, J.F., Gershenwald, J.E., and McMasters, K.M. 2000. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 88(6): 1484-1491.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D.S., Ross, M.I., Sober, A., Thompson, J.A., and Thompson, J.F. 2001a. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19(16): 3635-3648.
- Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., Thompson, J.F., Reintgen, D.S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K.M., Ross, M.I., Kirkwood, J.M., Atkins, M.B., Thompson, J.A., Coit, D.G., Byrd, D., Desmond, R., Zhang, Y., Liu, P.Y., Lyman, G.H., and Morabito, A. 2001b. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19(16): 3622-3634.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281(5383): 1674-1677.
- Baron, S. and Dianzani, F. 1994. The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. *Antiviral Res* 24(2-3): 97-110.
- Batista, L.F., Roos, W.P., Christmann, M., Menck, C.F., and Kaina, B. 2007. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 67(24): 11886-11895.
- Baumann, P. and West, S.C. 1997. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* 16(17): 5198-5206.
- Bedikian, A.Y., Papadopoulos, N., Plager, C., Eton, O., and Ring, S. 2003. Phase II evaluation of temozolomide in metastatic choroidal melanoma. *Melanoma Res* 13(3): 303-306.
- Beranek, D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231(1): 11-30.

Literaturverzeichnis

- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., Allen, D.J., and Modrich, P. 2001. Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *J Biol Chem* 276(36): 34339-34347.
- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., and Modrich, P. 1998a. DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem* 273(48): 32049-32054.
- Blackwell, L.J., Martik, D., Bjornson, K.P., Bjornson, E.S., and Modrich, P. 1998b. Nucleotide-promoted release of hMutSalpha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* 273(48): 32055-32062.
- Bleehen, N.M., Newlands, E.S., Lee, S.M., Thatcher, N., Selby, P., Calvert, A.H., Rustin, G.J., Brampton, M., and Stevens, M.F. 1995. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 13(4): 910-913.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6): 803-815.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270(14): 7795-7798.
- Borden, E.C., Hogan, T.F., and Voelkel, J.G. 1982. Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells. *Cancer Res* 42(12): 4948-4953.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bramhall, S.R., Allum, W.H., Jones, A.G., Allwood, A., Cummins, C., and Neoptolemos, J.P. 1995. Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *Br J Surg* 82(1): 111-115.
- Branca, A.A. and Baglioni, C. 1981. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature* 294(5843): 768-770.
- Briegert, M. and Kaina, B. 2007. Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res* 67(1): 26-31.
- Budillon, A., Tagliaferri, P., Caraglia, M., Torrisi, M.R., Normanno, N., Iacobelli, S., Palmieri, G., Stoppelli, M.P., Frati, L., and Bianco, A.R. 1991. Upregulation of epidermal growth factor receptor induced by alpha-interferon in human epidermoid cancer cells. *Cancer Res* 51(4): 1294-1299.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276(45): 42462-42467.
- Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., and Von Hoff, D.D. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15(6): 2403-2413.
- Caldas, C., Hahn, S.A., da Costa, L.T., Redston, M.S., Schutte, M., Seymour, A.B., Weinstein, C.L., Hruban, R.H., Yeo, C.J., and Kern, S.E. 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8(1): 27-32.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281(5383): 1677-1679.
- Caraglia, M., Leardi, A., Corradino, S., Ciardiello, F., Budillon, A., Guarrasi, R., Bianco, A.R., and Tagliaferri, P. 1995. alpha-Interferon potentiates epidermal growth factor receptor-mediated effects on human epidermoid carcinoma KB cells. *Int J Cancer* 61(3): 342-347.
- Casciano, I., Banelli, B., Croce, M., De Ambrosis, A., di Vinci, A., Gelvi, I., Pagnan, G., Brignole, C., Allemanni, G., Ferrini, S., Ponzoni, M., and Romani, M. 2004a. Caspase-8 gene expression in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 157-167.
- Casciano, I., De Ambrosis, A., Croce, M., Pagnan, G., Di Vinci, A., Allemanni, G., Banelli, B., Ponzoni, M., Romani, M., and Ferrini, S. 2004b. Expression of the caspase-8 gene in neuroblastoma cells is regulated through an essential interferon-sensitive response element (ISRE). *Cell Death Differ* 11(1): 131-134.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406(6798): 855-862.
- Chang, A.Y. and Keng, P.C. 1987. Potentiation of radiation cytotoxicity by recombinant interferons, a phenomenon associated with increased blockage at the G2-M phase of the cell cycle. *Cancer Res* 47(16): 4338-4341.

Literaturverzeichnis

- Chang, H.Y. and Yang, X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 821-846.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D.W., and Borden, E.C. 2001. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res* 7(6): 1821-1831.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D.W., Jacobs, B.S., and Borden, E.C. 2002. IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J Immunol* 169(2): 847-855.
- Cehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14(3): 278-288.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65(6): 1053-1061.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17(3): 393-403.
- Chinnaiyan, A.M. and Dixit, V.M. 1996. The cell-death machine. *Curr Biol* 6(5): 555-562.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4): 505-512.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271(9): 4961-4965.
- Chinot, O.L., Barrie, M., Fuentes, S., Eudes, N., Lancelot, S., Metellus, P., Muracciole, X., Braguer, D., Ouafik, L., Martin, P.M., Dufour, H., and Figarella-Branger, D. 2007. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 25(12): 1470-1475.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96(5): 615-624.
- Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., and Kaina, B. 2001. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer* 92(1): 123-129.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193(1-2): 3-34.
- Coradini, D., Biffi, A., Pirronello, E., and Di Fronzo, G. 1994. The effect of alpha-, beta- and gamma-interferon on the growth of breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 14(5A): 1779-1784.
- Cotter, T.G. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9(7): 501-507.
- Cregan, S.P., Dawson, V.L., and Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23(16): 2785-2796.
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P., and Jackson, S.P. 1997. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 7(8): 588-598.
- Critchlow, S.E. and Jackson, S.P. 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-398.
- Croze, E., Russell-Harde, D., Wagner, T.C., Pu, H., Pfeffer, L.M., and Perez, H.D. 1996. The human type I interferon receptor. Identification of the interferon beta-specific receptor-associated phosphoprotein. *J Biol Chem* 271(52): 33165-33168.
- Dahm-Daphi, J., Sass, C., and Alberti, W. 2000. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol* 76(1): 67-75.
- Damasio, E.E., Clavio, M., Masoudi, B., Isaza, A., Spriano, M., Rossi, E., Casciaro, S., Cerri, R., Risso, M., Nati, S., Siccardi, M., Truini, M., and Gobbi, M. 2000. Alpha-interferon as induction and maintenance therapy in hairy cell leukemia: a long-term follow-up analysis. *Eur J Haematol* 64(1): 47-52.
- Damdinsuren, B., Nagano, H., Sakon, M., Kondo, M., Yamamoto, T., Umeshita, K., Dono, K., Nakamori, S., and Monden, M. 2003. Interferon-beta is more potent than interferon-alpha in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. *Ann Surg Oncol* 10(10): 1184-1190.
- Daniels, D.S. and Tainer, J.A. 2000. Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat Res* 460(3-4): 151-163.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277(5332): 1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164): 1415-1421.

Literaturverzeichnis

- Dart, D.A., Adams, K.E., Akerman, I., and Lakin, N.D. 2004. Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. *J Biol Chem* 279(16): 16433-16440.
- Day, R.S., 3rd, Ziolkowski, C.H., Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Lubiniecki, A.S., Girardi, A.J., Galloway, S.M., and Bynum, G.D. 1980. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature* 288(5792): 724-727.
- De Ambrosis, A., Casciano, I., Croce, M., Pagnan, G., Radic, L., Banelli, B., Di Vinci, A., Allemanni, G., Tonini, G.P., Ponzoni, M., Romani, M., and Ferrini, S. 2007. An interferon-sensitive response element is involved in constitutive caspase-8 gene expression in neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 120(1): 39-47.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. 1995. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82(2): 321-330.
- Delaney, J.C. and Essigmann, J.M. 2004. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanines, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14051-14056.
- Demple, B. and Harrison, L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63: 915-948.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189(11): 1815-1822.
- Ding, Q., Reddy, Y.V., Wang, W., Woods, T., Douglas, P., Ramsden, D.A., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23(16): 5836-5848.
- Domanski, P., Witte, M., Kellum, M., Rubinstein, M., Hackett, R., Pitha, P., and Colamonici, O.R. 1995. Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem* 270(37): 21606-21611.
- Dosch, J., Christmann, M., and Kaina, B. 1998. Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents. *Carcinogenesis* 19(4): 567-573.
- Dritschilo, A., Mossman, K., Gray, M., and Sreevalsan, T. 1982. Potentiation of radiation injury by interferon. *Am J Clin Oncol* 5(1): 79-82.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1): 33-42.
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M., and Modrich, P. 1996. Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6443-6447.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Reed, S.I. 1994. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76(6): 1013-1023.
- Duncan, T., Treweek, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T., and Sedgwick, B. 2002. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16660-16665.
- Eadie, J.S., Conrad, M., Toorchen, D., and Topal, M.D. 1984. Mechanism of mutagenesis by O6-methylguanine. *Nature* 308(5955): 201-203.
- Eggermont, A.M. and Kirkwood, J.M. 2004. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer* 40(12): 1825-1836.
- Eggert, A., Grotzer, M.A., Zuzak, T.J., Wiewrodt, B.R., Ikegaki, N., and Brodeur, G.M. 2000. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Med Pediatr Oncol* 35(6): 603-607.
- Ehrhardt, H., Hacker, S., Wittmann, S., Maurer, M., Borkhardt, A., Toloczko, A., Debatin, K.M., Fulda, S., and Jeremias, I. 2008. Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene* 27(6): 783-793.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., and et al. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54(5): 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-825.
- Emodi, G., Ruffi, T., Just, M., and Hernandez, R. 1975. Human interferon therapy for herpes zoster in adults. *Scand J Infect Dis* 7(1): 1-5.

Literaturverzeichnis

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662): 43-50.
- Evrard, A., Passagne, I., Bibeau, F., Raynaud, P., Capdetrey, H., Depelle, P., Macari, F., Cuq, P., Vian, L., and Cupissol, D. 2003. Real-time PCR quantification of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in human melanoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 94: 4658.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D.M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73(3): 487-497.
- Fang, W.H. and Modrich, P. 1993. Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J Biol Chem* 268(16): 11838-11844.
- Faris, M., Latinis, K.M., Kempniak, S.J., Koretzky, G.A., and Nel, A. 1998. Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol Cell Biol* 18(9): 5414-5424.
- Fink, D., Aebi, S., and Howell, S.B. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4(1): 1-6.
- Fishel, R. 1998. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* 12(14): 2096-2101.
- Fisher, D.E. 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78(4): 539-542.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. 1994. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8655-8659.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* 22(11): 2860-2871.
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D., and Telford, W.G. 1995. Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol* 46: 57-76.
- Frank, J.A., Richert, N., Bash, C., Stone, L., Calabresi, P.A., Lewis, B., Stone, R., Howard, T., and McFarland, H.F. 2004. Interferon-beta-1b slows progression of atrophy in RRMS: Three-year follow-up in NAb- and NAb+ patients. *Neurology* 62(5): 719-725.
- Frankenberg-Schwager, M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 14(4): 307-320.
- Frankenberg-Schwager, M. and Frankenberg, D. 1990. DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol* 58(4): 569-575.
- Friedland, W., Jacob, P., Paretzke, H.G., Merzagora, M., and Ottolenghi, A. 1999. Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat Environ Biophys* 38(1): 39-47.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., and Kaina, B. 1991. Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol* 11(9): 4660-4668.
- Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., and Darnell, J.E., Jr. 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7840-7843.
- Fujimaki, T., Ishii, H., Matsuno, A., Arai, H., and Nakagomi, T. 2007. Effectiveness of interferon-beta and temozolomide combination therapy against temozolomide-refractory recurrent anaplastic astrocytoma. *World J Surg Oncol* 5: 89.
- Fulda, S. and Debatin, K.M. 2002. IFNgamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 21(15): 2295-2308.
- Fulda, S., Kufer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K.M. 2001. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20(41): 5865-5877.
- Garbe, C., Kreuser, E.D., Zouboulis, C.C., Stadler, R., and Orfanos, C.E. 1992. Combined treatment of metastatic melanoma with interferons and cytotoxic drugs. *Semin Oncol* 19(2 Suppl 4): 63-69.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J., and Khanna, K.K. 2003. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278(17): 14806-14811.
- Genschel, J., Bazemore, L.R., and Modrich, P. 2002. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* 277(15): 13302-13311.
- Gillissen, B., Essmann, F., Graupner, V., Starck, L., Radetzki, S., Dorken, B., Schulze-Osthoff, K., and Daniel, P.T. 2003. Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J* 22(14): 3580-3590.

Literaturverzeichnis

- Gloster, H.M., Jr. and Brodland, D.G. 1996. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 22(3): 217-226.
- Gonzaga, P.E., Potter, P.M., Niu, T.Q., Yu, D., Ludlum, D.B., Rafferty, J.A., Margison, G.P., and Brent, T.P. 1992. Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA. *Cancer Res* 52(21): 6052-6058.
- Goodhead, D.T. 1989. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* 56(5): 623-634.
- Gould, M.N., Kakria, R.C., Olson, S., and Borden, E.C. 1984. Radiosensitization of human bronchogenic carcinoma cells by interferon beta. *J Interferon Res* 4(1): 123-128.
- Gradia, S., Acharya, S., and Fishel, R. 1997. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91(7): 995-1005.
- Greenberg, P.L. and Mosny, S.A. 1977. Cytotoxic effects of interferon in vitro on granulocytic progenitor cells. *Cancer Res* 37(6): 1794-1799.
- Greene, M.H., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., Kraemer, K.H., Elder, D.E., and Fraser, M.C. 1985. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 102(4): 458-465.
- Grob, J.J., Dreno, B., de la Salmoniere, P., Delaunay, M., Cupissol, D., Guillot, B., Souteyrand, P., Sassolas, B., Cesarini, J.P., Lionnet, S., Lok, C., Chastang, C., and Bonerandi, J.J. 1998. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet* 351(9120): 1905-1910.
- Grombacher, T., Eichhorn, U., and Kaina, B. 1998. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* 17(7): 845-851.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17(14): 3878-3885.
- Grossman, D. and Altieri, D.C. 2001. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* 20(1-2): 3-11.
- Grotzer, M.A., Eggert, A., Zuzak, T.J., Janss, A.J., Marwaha, S., Wiewrodt, B.R., Ikegaki, N., Brodeur, G.M., and Phillips, P.C. 2000. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19(40): 4604-4610.
- Grups, J.W. and Bange, F.C. 1990. Interferon receptors on the surface of interferon-sensitive and interferon-resistant urothelial carcinomas. *Urol Res* 18(2): 119-122.
- Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.P., Ramaswamy, S., Kuo, W.L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A. 2005. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37(10): 1047-1054.
- Haapajarvi, T., Pitkanen, K., and Laiho, M. 1999. Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function. *Cell Growth Differ* 10(3): 163-171.
- Hacker, G. and Weber, A. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys* 462(2): 150-155.
- Hannon, G.J. and Beach, D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371(6494): 257-261.
- Hardenbergh, P.H., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., Takemoto, C., Shimamura, A., McGill, G., Fung, C.Y., Bodis, S., and Fisher, D.E. 1999. Distinct mathematical behavior of apoptotic versus non-apoptotic tumor cell death. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43(3): 601-605.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75(4): 805-816.
- Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., and Brent, T.P. 1996. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 56(9): 2029-2032.
- Hauschild, A., Dummer, R., Ugurel, S., Kaehler, K.C., Egberts, F., Fink, W., Both-Skalsky, J., Laetsch, B., and Schadendorf, D. 2008. Combined treatment with pegylated interferon-alpha-2a and dacarbazine in patients with advanced metastatic melanoma: a phase 2 study. *Cancer* 113(6): 1404-1411.
- Hickman, M.J. and Samson, L.D. 1999. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10764-10769.
- . 2004. Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Mol Cell* 14(1): 105-116.
- Hobeika, A.C., Subramaniam, P.S., and Johnson, H.M. 1997. IFNalpha induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells. *Oncogene* 14(10): 1165-1170.

Literaturverzeichnis

- Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 5: 282-304.
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Wittke, U., and Stahel, R. 2003. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 10(3): 356-364.
- Hotte, S.J. and Kapoor, A.K. 2007. Systemic therapy for patients with advanced, unresectable or metastatic renal cell carcinoma: moving to guidelines. *Can Urol Assoc J* 1(2 Suppl): S34-40.
- Hu, G., Mancl, M.E., and Barnes, B.J. 2005. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res* 65(16): 7403-7412.
- Hunter, T. and Pines, J. 1994. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79(4): 573-582.
- Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32: 115-154.
- Iliakis, G. 1991. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 13(12): 641-648.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., and Valentine, R.C. 1957. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 268-273.
- Ismail, I.H. and Hendzel, M.J. 2008. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* 49(1): 73-82.
- Ismail, I.H., Nystrom, S., Nygren, J., and Hammarsten, O. 2005. Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280(6): 4649-4655.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3): 347-354.
- Jacquillat, C., Khayat, D., Banzet, P., Weil, M., Avril, M.F., Fumoleau, P., Namer, M., Bonnetterre, J., Kerbrat, P., Bonerandi, J.J., and et al. 1990. Chemotherapy by fotemustine in cerebral metastases of disseminated malignant melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 25(4): 263-266.
- Jeggo, P.A., Hafezparast, M., Thompson, A.F., Broughton, B.C., Kaur, G.P., Zdzienicka, M.Z., and Athwal, R.S. 1992. Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6423-6427.
- Johns, T.G., Mackay, I.R., Callister, K.A., Hertzog, P.J., Devenish, R.J., and Linnane, A.W. 1992. Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: higher efficacy of interferon beta. *J Natl Cancer Inst* 84(15): 1185-1190.
- Johnson, R.D. and Jasin, M. 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* 19(13): 3398-3407.
- Joza, N., Kroemer, G., and Penninger, J.M. 2002. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 18(3): 142-149.
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T. 2001. Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem* 276(37): 35201-35208.
- Kaina, B. 2003. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* 66(8): 1547-1554.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 6(8): 1079-1099.
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., and Coquerelle, T. 1991. Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 12(10): 1857-1867.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., and Coquerelle, T. 1997. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 381(2): 227-241.
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., 3rd, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264(5157): 436-440.
- Karran, P. and Bignami, M. 1994. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 16(11): 833-839.

Literaturverzeichnis

- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7(3): 331-342.
- Kaufmann, R., Spieth, K., Leiter, U., Mauch, C., von den Driesch, P., Vogt, T., Linse, R., Tilgen, W., Schadendorf, D., Becker, J.C., Sebastian, G., Krengel, S., Kretschmer, L., Garbe, C., and Dummer, R. 2005. Temozolomide in combination with interferon-alfa versus temozolomide alone in patients with advanced metastatic melanoma: a randomized, phase III, multicenter study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 23(35): 9001-9007.
- Kawabata, M., Kawabata, T., and Nishibori, M. 2005. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* 59(1): 1-9.
- Kepp, O., Rajalingam, K., Kimmig, S., and Rudel, T. 2007. Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. *Embo J* 26(3): 825-834.
- Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sondak, V.K., Richards, J., Flaherty, L.E., Ernstoff, M.S., Smith, T.J., Rao, U., Steele, M., and Blum, R.H. 2000. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 18(12): 2444-2458.
- Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sosman, J.A., Sondak, V.K., Agarwala, S.S., Ernstoff, M.S., and Rao, U. 2001. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 19(9): 2370-2380.
- Klinkenbijn, J.H., Jeekel, J., Sahnoud, T., van Pel, R., Couvreur, M.L., Veenhof, C.H., Arnaud, J.P., Gonzalez, D.G., de Wit, L.T., Hennipman, A., and Wils, J. 1999. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 230(6): 776-782; discussion 782-774.
- Kokkinakis, D.M., Ahmed, M.M., Delgado, R., Fruitwala, M.M., Mohiuddin, M., and Albores-Saavedra, J. 1997. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents. *Cancer Res* 57(23): 5360-5368.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J* 15(23): 6662-6670.
- Kumaraswamy, E. and Shiekhatar, R. 2007. Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase. *Mol Cell Biol* 27(19): 6733-6741.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lavin, M.F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S., and Gueven, N. 2005. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 569(1-2): 123-132.
- Lavin, M.F. and Gueven, N. 2006. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13(6): 941-950.
- Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., Nystrom-Lahti, M., and et al. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75(6): 1215-1225.
- Levitt, S.H., Purdy, J.A., Perez, C.A., and Vijayakumar, S. 2006. *Technical basis of radiation therapy*. Springer Verlag.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., and Abbruzzese, J.L. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet* 363(9414): 1049-1057.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-489.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371(6497): 534-537.
- Liebmann, J., Cook, J.A., Fisher, J., Teague, D., and Mitchell, J.B. 1994. Changes in radiation survival curve parameters in human tumor and rodent cells exposed to paclitaxel (Taxol). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29(3): 559-564.
- Liedtke, C., Groger, N., Manns, M.P., and Trautwein, C. 2006. Interferon-alpha enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8 transcription in human hepatoma cells. *J Hepatol* 44(2): 342-349.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. 2001. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15(14): 1833-1844.
- Lindahl, T. 2000. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res* 462(2-3): 129-135.
- Lips, J. and Kaina, B. 2001a. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* 22(4): 579-585.

Literaturverzeichnis

- . 2001b. Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. *Mutat Res* 487(1-2): 59-66.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-184.
- Loeb, L.A. 1985. Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell* 40(3): 483-484.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., and Venkitaraman, A.R. 2003. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 17(24): 3017-3022.
- Longley, M.J., Pierce, A.J., and Modrich, P. 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* 272(16): 10917-10921.
- Ma, J.H., Patrut, E., Schmidt, J., Knaebel, H.P., Buchler, M.W., and Marten, A. 2005. Synergistic effects of interferon-alpha in combination with chemoradiation on human pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 11(10): 1521-1528.
- Mandal, M., Bandyopadhyay, D., Goepfert, T.M., and Kumar, R. 1998. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene* 16(2): 217-225.
- Martin, S.J. and Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82(3): 349-352.
- Maser, R.S., Mosen, K.J., Nelms, B.E., and Petrini, J.H. 1997. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 17(10): 6087-6096.
- Matsumoto, Y. and Kim, K. 1995. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269(5224): 699-702.
- Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H.N. 2002. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci* 7: d765-783.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395): 1893-1897.
- McMillan, T.J., Cassoni, A.M., Edwards, S., Holmes, A., and Peacock, J.H. 1990. The relationship of DNA double-strand break induction to radiosensitivity in human tumour cell lines. *Int J Radiat Biol* 58(3): 427-438.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16(10): 2794-2804.
- Meikrantz, W., Bergom, M.A., Memisoglu, A., and Samson, L. 1998. O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* 19(2): 369-372.
- Meng, R.D. and El-Deiry, W.S. 2001. p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma. *Exp Cell Res* 262(2): 154-169.
- Micali, O.C., Cheung, H.H., Plenchette, S., Hurley, S.L., Liston, P., LaCasse, E.C., and Korneluk, R.G. 2007. Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta. *BMC Cancer* 7: 52.
- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., Dreno, B., Henz, M., Schadendorf, D., Kapp, A., Weiss, J., Fraass, U., Statkevich, P., Muller, M., and Thatcher, N. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18(1): 158-166.
- Middleton, M.R., Lunn, J.M., Morris, C., Rustin, G., Wedge, S.R., Brampton, M.H., Lind, M.J., Lee, S.M., Newell, D.R., Bleehen, N.M., Newlands, E.S., Calvert, A.H., Margison, G.P., and Thatcher, N. 1998. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in pretreatment tumour biopsies as a predictor of response to temozolomide in melanoma. *Br J Cancer* 78(9): 1199-1202.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11(3): 577-590.
- Mitra, S. and Kaina, B. 1993. Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 44: 109-142.
- Mohiuddin, M., Chendil, D., Dey, S., Alcock, R.A., Regine, W., Mohiuddin, M., and Ahmed, M.M. 2002. Influence of p53 status on radiation and 5-fluorouracil synergy in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 22(2A): 825-830.
- Mojas, N., Lopes, M., and Jiricny, J. 2007. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* 21(24): 3342-3355.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374(6518): 131-134.

Literaturverzeichnis

- Mornex, F., Thomas, L., Mohr, P., Hauschild, A., Delaunay, M.M., Lesimple, T., Tilgen, W., Bui, B.N., Guillot, B., Ulrich, J., Bourdin, S., Mousseau, M., Cupissol, D., Bonnetterre, M.E., De Gislain, C., Bensadoun, R.J., and Clavel, M. 2003. A prospective randomized multicentre phase III trial of fotemustine plus whole brain irradiation versus fotemustine alone in cerebral metastases of malignant melanoma. *Melanoma Res* 13(1): 97-103.
- Mosca, F., Giulianotti, P.C., Balestracci, T., Di Candio, G., Pietrabissa, A., Sbrana, F., and Rossi, G. 1997. Long-term survival in pancreatic cancer: pylorus-preserving versus Whipple pancreatoduodenectomy. *Surgery* 122(3): 553-566.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., and de Villartay, J.P. 2001. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105(2): 177-186.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P.H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188(11): 2033-2045.
- Munro, T.R. 1970. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* 42(3): 451-470.
- Mutchnick, M.G., Ehrinpreis, M.N., Kinzie, J.L., and Peleman, R.R. 1994. Prospectives on the treatment of chronic hepatitis B and chronic hepatitis C with thymic peptides and antiviral agents. *Antiviral Res* 24(2-3): 245-257.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6): 817-827.
- Muzio, M., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1997. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 272(5): 2952-2956.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273(5): 2926-2930.
- Myung, K. and Kolodner, R.D. 2003. Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 2(3): 243-258.
- Nagatani, T., Ichiyama, S., Onuma, R., Miyazawa, M., Matsuzaki, T., Miyagawa, K., Baba, N., Uchiyama, M., and Nakajima, H. 1995. The use of DAV (DTIC, ACNU and VCR) and natural interferon-beta combination therapy in malignant melanoma. *Acta Derm Venereol* 75(6): 494.
- Nasmyth, K. 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 5(2): 166-179.
- Nasmyth, K. and Hunt, T. 1993. Cell cycle. Dams and sluices. *Nature* 366(6456): 634-635.
- Natsume, A., Ishii, D., Wakabayashi, T., Tsuno, T., Hatano, H., Mizuno, M., and Yoshida, J. 2005. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res* 65(17): 7573-7579.
- Natsume, A., Wakabayashi, T., Ishii, D., Maruta, H., Fujii, M., Shimato, S., Ito, M., and Yoshida, J. 2008. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 61(4): 653-659.
- Naumann, S.C., Roos, W.P., Jost, E., Belohlavek, C., Lennerz, V., Schmidt, C.W., Christmann, M., and Kaina, B. 2009. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer* 100(2): 322-333.
- Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G., and Petrini, J.H. 1998. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280(5363): 590-592.
- Neoptolemos, J.P., Dunn, J.A., Stocken, D.D., Almond, J., Link, K., Beger, H., Bassi, C., Falconi, M., Pederzoli, P., Dervenis, C., Fernandez-Cruz, L., Lacaine, F., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D.J., Friess, H., and Buchler, M.W. 2001. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 358(9293): 1576-1585.
- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., Falconi, M., Pederzoli, P., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D.J., and Buchler, M.W. 2004. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350(12): 1200-1210.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391(6665): 407-410.
- Newlands, E.S., Stevens, M.F., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T., and Brock, C. 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23(1): 35-61.

Literaturverzeichnis

- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Nitsche, M., Horstmann, O., Christiansen, H., Hermann, R.M., Hess, C.F., Becker, H., Pradier, O., and Schmidberger, H. 2008. Chemoradioimmunotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and interferon-alpha in pancreatic and periampullary cancer: results of a feasibility study. *Cancer Radiother* 12(8): 817-821.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368(6473): 753-756.
- Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. 1999. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 59(21): 5542-5548.
- Nukui, Y., Picozzi, V.J., and Traverso, L.W. 2000. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy improves survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 179(5): 367-371.
- Ochs, K. and Kaina, B. 2000. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 60(20): 5815-5824.
- Olive, P.L., Wlodek, D., and Banath, J.P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51(17): 4671-4676.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4): 609-619.
- Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J.J., and Jiricny, J. 1995. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 268(5219): 1912-1914.
- Panitch, H., Goodin, D.S., Francis, G., Chang, P., Coyle, P.K., O'Connor, P., Monaghan, E., Li, D., and Weinshenker, B. 2002. Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* 59(10): 1496-1506.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., and Devesa, S.S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37 Suppl 8: S4-66.
- Passagne, I., Evrard, A., Winum, J.Y., Depelle, P., Cuq, P., Montero, J.L., Cupissol, D., and Vian, L. 2003. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression. *J Pharmacol Exp Ther* 307(2): 816-823.
- Pegg, A.E., Boosalis, M., Samson, L., Moschel, R.C., Byers, T.L., Swenn, K., and Dolan, M.E. 1993. Mechanism of inactivation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O6-benzylguanine. *Biochemistry* 32(45): 11998-12006.
- Pegg, A.E., Dolan, M.E., and Moschel, R.C. 1995. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51: 167-223.
- Pepponi, R., Marra, G., Fuggetta, M.P., Falcinelli, S., Pagani, E., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'Atri, S. 2003. The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 304(2): 661-668.
- Perea, S.E., Geronimo, H., and Lopez Saura, P. 1993. [Expression of interferon alpha receptors in cell lines from human tumors. Relationship with the antiproliferative effect]. *Acta Cient Venez* 44(1): 22-27.
- Peter, M. and Herskowitz, I. 1994. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79(2): 181-184.
- Picozzi, V.J., Kozarek, R.A., and Traverso, L.W. 2003. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 185(5): 476-480.
- Pieper, R.O., Costello, J.F., Kroes, R.A., Futscher, B.W., Marathi, U., and Erickson, L.C. 1991. Direct correlation between methylation status and expression of the human O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Cancer Commun* 3(8): 241-253.
- Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308 (Pt 3): 697-711.
- Pines, J. and Hunter, T. 1991. Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends Cell Biol* 1(5): 117-121.
- Pingoud-Meier, C., Lang, D., Janss, A.J., Rorke, L.B., Phillips, P.C., Shalaby, T., and Grotzer, M.A. 2003. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 9(17): 6401-6409.

Literaturverzeichnis

- Platanias, L.C. 2003. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 98(2): 129-142.
- Podlutzky, A.J., Dianova, II, Wilson, S.H., Bohr, V.A., and Dianov, G.L. 2001. DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry* 40(3): 809-813.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. 1994a. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8(1): 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massague, J. 1994b. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78(1): 59-66.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., and Salvesen, G.S. 2006. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 22(2): 269-275.
- Prasad, R., Beard, W.A., Strauss, P.R., and Wilson, S.H. 1998. Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 273(24): 15263-15270.
- Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, A.E., and Wilson, S.H. 1996. Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem* 271(27): 16000-16007.
- Qin, X.Q., Runkel, L., Deck, C., DeDios, C., and Barsoum, J. 1997. Interferon-beta induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *J Interferon Cytokine Res* 17(6): 355-367.
- Quesada, J.R., Reuben, J., Manning, J.T., Hersh, E.M., and Gutterman, J.U. 1984. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 310(1): 15-18.
- Quirt, I., Verma, S., Petrella, T., Bak, K., and Charette, M. 2007. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *Oncologist* 12(9): 1114-1123.
- Rattray, A.J. and Symington, L.S. 1994. Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the RAD51 and RAD52 genes of *Saccharomyces cerevisiae* have different roles in mitotic recombination. *Genetics* 138(3): 587-595.
- Reeves, W.H. and Stoeber, Z.M. 1989. Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* 264(9): 5047-5052.
- Reid, J.M., Kuffel, M.J., Miller, J.K., Rios, R., and Ames, M.M. 1999. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res* 5(8): 2192-2197.
- Richtig, E., Hofmann-Wellenhof, R., Pehamberger, H., Forstinger, C., Wolff, K., Mischer, P., Raml, J., Fritsch, P., Zelger, B., Ratzinger, G., Koller, J., Lang, A., Konrad, K., Kindermann-Glebowski, E., Seeber, A., Steiner, A., Fialla, R., Pachinger, W., Kos, C., Klein, G., Kehrer, H., Kerl, H., Ulmer, H., and Smolle, J. 2004. Temozolomide and interferon alpha 2b in metastatic melanoma stage IV. *Br J Dermatol* 151(1): 91-98.
- Ridolfi, R., Romanini, A., Sileni, V.C., Michiara, M., Guida, M., Biasco, G., Poletti, P., Amaducci, L., Leoni, M., and Ravaoli, A. 2004. Temozolomide and interferon-alpha in metastatic melanoma: a phase II study of the Italian Melanoma Intergroup. *Melanoma Res* 14(4): 295-299.
- Rivoltini, L., Radrizzani, M., Accornero, P., Squarcina, P., Chiodoni, C., Mazzocchi, A., Castelli, C., Tarsini, P., Viggiano, V., Belli, F., Colombo, M.P., and Parmiani, G. 1998. Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing. *J Immunol* 161(3): 1220-1230.
- Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., and Harris, C.C. 2001. APO-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 61(18): 6660-6664.
- Roos, W., Baumgartner, M., and Kaina, B. 2004. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23(2): 359-367.
- Roos, W.P., Batista, L.F., Naumann, S.C., Wick, W., Weller, M., Menck, C.F., and Kaina, B. 2007a. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 26(2): 186-197.
- Roos, W.P., Christmann, M., Fraser, S.T., and Kaina, B. 2007b. Mouse embryonic stem cells are hypersensitive to apoptosis triggered by the DNA damage O(6)-methylguanine due to high E2F1 regulated mismatch repair. *Cell Death Differ* 14(8): 1422-1432.
- Roos, W.P. and Kaina, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12(9): 440-450.
- Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S.C., Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z., and Kaina, B. 2009. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-

Literaturverzeichnis

- methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)* 8(1): 72-86.
- Rosati, S.F., Williams, R.F., Nunnally, L.C., McGee, M.C., Sims, T.L., Tracey, L., Zhou, J., Fan, M., Ng, C.Y., Nathwani, A.C., Stewart, C.F., Pfeffer, L.M., and Davidoff, A.M. 2008. IFN-beta sensitizes neuroblastoma to the antitumor activity of temozolomide by modulating O6-methylguanine DNA methyltransferase expression. *Mol Cancer Ther* 7(12): 3852-3858.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H., and Lobrich, M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23(16): 5706-5715.
- Rothkamm, K. and Lobrich, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5057-5062.
- Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. 2002. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 3(1): 35-43.
- Saidi, R.F., Williams, F., Ng, J., Danquah, G., Mittal, V.K., ReMine, S.G., and Jacobs, M.J. 2006. Interferon receptors and the caspase cascade regulate the antitumor effects of interferons on human pancreatic cancer cell lines. *Am J Surg* 191(3): 358-363.
- Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E., and Anderson, C.W. 2002. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 277(15): 12491-12494.
- Schadendorf, D., Jurgovsky, K., Worm, M., and Czarnetzki, B.M. 1994. In vitro sensitivity of human melanoma cells to chemotherapeutic agents and interferons. *Melanoma Res* 4(4): 243-249.
- Schindler, C. and Darnell, J.E., Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64: 621-651.
- Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., and Darnell, J.E., Jr. 1992. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257(5071): 809-813.
- Schmidberger, H., Rave-Frank, M., Lehmann, J., Schweinfurth, S., Pradier, O., and Hess, C.F. 1999a. Radiosensitizing effect of natural and recombinant beta-interferons in a human lung carcinoma in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(6): 350-356.
- Schmidberger, H., Rave-Frank, M., Lehmann, J., Schweinfurth, S., Rehring, E., Henckel, K., and Hess, C.F. 1999b. The combined effect of interferon beta and radiation on five human tumor cell lines and embryonal lung fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43(2): 405-412.
- Schmidberger, H., Rave-Frank, M., Lehmann, J.J., Weiss, E., Gerl, L., Dettmer, N., Glomme, S., and Hess, C.F. 2003. Lack of interferon beta-induced radiosensitization in four out of five human glioblastoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55(5): 1348-1357.
- Schmidt, J., Jager, D., Hoffmann, K., Buchler, M.W., and Marten, A. 2007. Impact of interferon-alpha in combined chemoradioimmunotherapy for pancreatic adenocarcinoma (CapRI): first data from the immunomonitoring. *J Immunother* 30(1): 108-115.
- Schmidt, M., Bies, J., Tamura, T., Ozato, K., and Wolff, L. 2004. The interferon regulatory factor ICSBP/IRF-8 in combination with PU.1 up-regulates expression of tumor suppressor p15(Ink4b) in murine myeloid cells. *Blood* 103(11): 4142-4149.
- Schuchter, L.M., Wohlganger, J., Fishman, E.K., MacDermott, M.L., and McGuire, W.P. 1992. Sequential chemotherapy and immunotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *J Immunother (1991)* 12(4): 272-276.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S.B., Kern, S.E., and Herman, J.G. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57(15): 3126-3130.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158(4): 486-492.
- Sedgwick, B. 2004. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 148-157.
- Sener, S.F., Fremgen, A., Menck, H.R., and Winchester, D.P. 1999. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 189(1): 1-7.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456): 704-707.
- Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., and Park, M.S. 1996. Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem* 271(1): 148-152.
- Sherr, C.J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79(4): 551-555.
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., and Okamoto, K. 2003. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* 22(55): 8870-8880.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18(1): 134-147.

Literaturverzeichnis

- Siegel, R.M. and Lenardo, M.J. 2002. Apoptosis signaling pathways. *Curr Protoc Cytom* Chapter 7: Unit 7 18.
- Silvennoinen, O., Ihle, J.N., Schlessinger, J., and Levy, D.E. 1993. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 366(6455): 583-585.
- Sionov, R.V. and Haupt, Y. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18(45): 6145-6157.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K., and Wilson, S.H. 1996. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* 379(6561): 183-186.
- Soengas, M.S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409(6817): 207-211.
- Sohn, T.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R.A., Sauter, P.K., Coleman, J., Hruban, R.H., and Lillemo, K.D. 2000. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 4(6): 567-579.
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison, C., and Takeda, S. 2001. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8388-8394.
- Southern, P.J. and Berg, P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1(4): 327-341.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1(7): 949-957.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14486-14491.
- Srivastava, D.K., Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E., and Wilson, S.H. 1998. Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem* 273(33): 21203-21209.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
- Stasiak, A.Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S.C., and Egelman, E.H. 2000. The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol* 10(6): 337-340.
- Stock, R.G., Dottino, P., Jennings, T.S., Terk, M., DeWynngaert, J.K., Beddoe, A.M., and Cohen, C. 1997. Enhanced radiosensitization with interferon-alpha-2b and cisplatin in the treatment of locally advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 67(3): 309-315.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U., and Dogliotti, E. 1998. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17(7): 835-843.
- Subramaniam, P.S. and Johnson, H.M. 1997. A role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the G1 cell cycle arrest mediated by the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 17(1): 11-15.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718): 441-446.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17(18): 5497-5508.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R.S., and Mitra, S. 1990. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 686-690.
- Tchou, J. and Grollman, A.P. 1993. Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res* 299(3-4): 277-287.
- Tewari, M. and Dixit, V.M. 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270(7): 3255-3260.
- Thomas, W.D. and Hersey, P. 1998. CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). *Int J Cancer* 75(3): 384-390.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456-1462.

Literaturverzeichnis

- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13(2): 152-157.
- Tomicic, M.T., Christmann, M., and Kaina, B. 2005. Apoptosis in UV-C light irradiated p53 wild-type, apaf-1 and p53 knockout mouse embryonic fibroblasts: interplay of receptor and mitochondrial pathway. *Apoptosis* 10(6): 1295-1304.
- Tomicic, M.T. and Kaina, B. 2001. Hamster Bcl-2 protein is cleaved in vitro and in cells by caspase-9 and caspase-3. *Biochem Biophys Res Commun* 281(2): 404-408.
- Tominaga, Y., Tsuzuki, T., Shiraishi, A., Kawate, H., and Sekiguchi, M. 1997. Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* 18(5): 889-896.
- Tomoda, K., Ohishi, N., Kikkawa, F., Mizutani, S., Tomoda, Y., and Yagi, K. 1998. Cationic multilamellar liposome-mediated human interferon-beta gene transfer into cervical cancer cell. *Anticancer Res* 18(3A): 1367-1371.
- Toorchen, D. and Topal, M.D. 1983. Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. *Carcinogenesis* 4(12): 1591-1597.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78(1): 67-74.
- Treuner, J., Niethammer, D., Dannecker, G., Hagmann, R., Neef, V., and Hofschneider, P.H. 1980. Successful treatment of nasopharyngeal carcinoma with interferon. *Lancet* 1(8172): 817-818.
- Uehara, H., Nakaizumi, A., Tatsuta, M., Baba, M., Takenaka, A., Uedo, N., Sakai, N., Yano, H., Iishi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Okada, S., and Kakizoe, T. 1999. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 94(9): 2513-2518.
- Van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 401(6751): 403.
- Vassal, G., Boland, I., Terrier-Lacombe, M.J., Watson, A.J., Margison, G.P., Venuat, A.M., Morizet, J., Parker, F., Lacroix, C., Lellouch-Tubiana, A., Pierre-Kahn, A., Poullain, M.G., and Gouyette, A. 1998. Activity of fotemustine in medulloblastoma and malignant glioma xenografts in relation to O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and alkylpurine-DNA N-glycosylase activity. *Clin Cancer Res* 4(2): 463-468.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2239-2244.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1): 39-51.
- Vitale, G., van Eijck, C.H., van Koetsveld Ing, P.M., Erdmann, J.I., Speel, E.J., van der Wansem Ing, K., Mooij, D.M., Colao, A., Lombardi, G., Croze, E., Lamberts, S.W., and Hofland, L.J. 2007. Type I interferons in the treatment of pancreatic cancer: mechanisms of action and role of related receptors. *Ann Surg* 246(2): 259-268.
- Wadler, S. and Schwartz, E.L. 1990. Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res* 50(12): 3473-3486.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369(6481): 574-578.
- Wagener, D.J., Wils, J.A., Kok, T.C., Planting, A., Couvreur, M.L., and Baron, B. 2002. Results of a randomised phase II study of cisplatin plus 5-fluorouracil versus cisplatin plus 5-fluorouracil with alpha-interferon in metastatic pancreatic cancer: an EORTC gastrointestinal tract cancer group trial. *Eur J Cancer* 38(5): 648-653.
- Wang, H., Lawrence, C.W., Li, G.M., and Hays, J.B. 1999. Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. *J Biol Chem* 274(24): 16894-16900.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22): 2922-2933.
- Ward, J.F. 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8: S103-111.
- Ward, J.F., Evans, J.W., Limoli, C.L., and Calabro-Jones, P.M. 1987. Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer Suppl* 8: 105-112.
- Warren, J.J., Forsberg, L.J., and Beese, L.S. 2006. The structural basis for the mutagenicity of O(6)-methyl-guanine lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52): 19701-19706.
- Watts, G.S., Pieper, R.O., Costello, J.F., Peng, Y.M., Dalton, W.S., and Futscher, B.W. 1997. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)

Literaturverzeichnis

- CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 17(9): 5612-5619.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3): 323-330.
- Wenger, F.A., Zieren, J., Peter, F.J., Jacobi, C.A., and Muller, J.M. 1999. K-ras mutations in tissue and stool samples from patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 384(2): 181-186.
- Wiecker, T.S., Luther, H., Buettner, P., Bauer, J., and Garbe, C. 2003. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 97(3): 628-638.
- Williams, B.R. and Haque, S.J. 1997. Interacting pathways of interferon signaling. *Semin Oncol* 24(3 Suppl 9): S9-70-S79-77.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19(11): 1294-1305.
- Wilson, D.M., 3rd and Barsky, D. 2001. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* 485(4): 283-307.
- Wu, X. and Deng, Y. 2002. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci* 7: d151-156.
- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20(2): 240-251.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756): 555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xia, F., Taghian, D.G., DeFrank, J.S., Zeng, Z.C., Willers, H., Iliakis, G., and Powell, S.N. 2001. Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8644-8649.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366(6456): 701-704.
- Xu-Welliver, M. and Pegg, A.E. 2002. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23(5): 823-830.
- Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R., and Karran, P. 1997. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* 25(3): 491-496.
- Yano, H., Iemura, A., Haramaki, M., Ogasawara, S., Takayama, A., Akiba, J., and Kojiro, M. 1999. Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. *Hepatology* 29(6): 1708-1717.
- Yarosh, D.B., Foote, R.S., Mitra, S., and Day, R.S., 3rd. 1983. Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis* 4(2): 199-205.
- Zerp, S.F., van Elsas, A., Peltenburg, L.T., and Schrier, P.I. 1999. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer* 79(5-6): 921-926.
- Zhai, S., Yaar, M., Doyle, S.M., and Gilchrist, B.A. 1996. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels. *Exp Cell Res* 224(2): 335-343.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABH2	“alkylation repair homolog 2”
ABH3	“alkylation repair homolog 3”
<i>A.bidest</i>	<i>aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
abs.	absolut
ACNU	1-(4-Amino-2-Methyl-5-Pyrimidinyl)Methyl-3-(2-Chlorethyl)-3-Nitrosoharnstoff (Nimustin)
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AIF	“apoptosis-inducing factor”
Akt	“v-akt murine thymoma viral oncogene homolog”
Apaf-1	“apoptotic protease-activating factor 1”
APE	AP-Endonuklease
APNG	Alkylpurin-DNA N-Glycosylase
APS	Ammoniumpersulfat
AP-	apyrimidine Stelle
ATM	“ataxia-telangiectasia mutated”
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATR	“ATM- und Rad3-related”
As	Aminosäure(n)
Bad	“Bcl2-antagonist of cell death”
Bak	“Bcl2-antagonist/killer”
Bax	“Bcl-2 associated protein X”
Bcl-2	“B cell lymphoma 2 / B cell leukemia 2”
Bcl-X _L (Bcl2L1)	“Bcl2-like 1”
BCNU	1-(2-Chlorethyl)- <i>L</i> -Nitrosoharnstoff (Carmustin)
BER	“base excision repair” (Basenexzisionsreparatur)
Bid	“BH3 interacting domain death agonist”
tBid	“truncated Bid”
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BRCA1/2	“breast cancer 1/2, early onset”
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
c-Abl	“v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog”
CAD	„caspase-activated DNase“
CAK	“CDC2 activating kinase”
CARD	„caspase recruitment domain”
Caspase	„cysteine-aspartic acid proteases“
CCNU	Lomustin
CDK	Cyclin-abhängige Proteinkinase
CENU	<i>N</i> -chloroethyl- <i>N</i> -nitrosourea (<i>N</i> -Chlorethyl- <i>N</i> -Nitrosoharnstoff)
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CKI	Inhibitor der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen
Cyt C	Cytochrom C
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DISC	“death-inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN-FADD	dominant negative-“Fas-associated death domain”

Anhang

DNA-PK	DNA-Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSB(s)	DNA-Doppelstrangbru(ü)ch(e)
DTIC	Dimethyl-trizeno-imidazol-Carboxamid (Dacarbazin)
DTT	Dithiothreitol
ECL	“enhanced chemoluminescence”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	“epidermal growth factor-receptor”
EMSA	“electrophoretic mobility shift assay” (Gelretardationsexperiment)
ERCC1	“excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1”
Erk2	“extracellular signal receptor regulated kinase 2”
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
f	femto
FACS	“fluorescence activated cell sorter”
FADD	“Fas-associated death domain”
FasL	Fas-(CD95-) Lignad
Fas-R	Fas-(CD95-) Rezeptor
Fen1	“flap structure-specific endonuclease 1”
FCS	„fetal calve serum“ (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein
FM	Diethyl (1-[[2-chloroethyl)(nitroso)carbamoyl]amino}ethyl) phosphonate (Fotemustin)
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
Gy	Gray
h	Stunde(n) oder human
HAP	humane apurine/apyrimidine Endonuklease
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HR	homologe Rekombination
HRP	“horseradish peroxidase” (Meeretich Peroxidase)
H2AX	“H2A histone family, member X”
γH2AX	gamma H2AX
IAP	“inhibitor of apoptosis proteins“
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN-α	Interferon-α
IFN-β	Interferon-β
IFN-γ	Interferon-γ
IFNAR2	Untereinheit des Interferon-Rezeptors 2
IFN-R	Interferon-Rezeptor
IgG	Immunoglobulin G
IL-2	Interleukin-2
IR	Ionisierende Strahlung
IRF	„Interferon regulatory factor“
ISGF	Interferon stimulierter Transkriptionsfaktor
ISRE	„Interferon signaling response element“
J	Joule
JAK	Janus-Kinase
k	kilo
K	Kontrolle
kBp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Ku70 (XRCC6)	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6”
Ku80 (XRCC5)	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5”
L	Liter
LMDS	“locally-multiply-damaged-site”

Anhang

LMP-Agarose	“low melting point Agarose” (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
mA	Miliamper
mAb	monoklonaler Antikörper
Mcl-1	“myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl2-related)”
ml	Mililiter
MID	mittlere Inaktivierungsdosis
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
m	milli
M	molar
Mdm2	„transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein”
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLH1	“mutL homolog 1”
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOMP	“mitochondrial outer membrane permeabilisation“
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glycosydase
Mre11	“meiotic recombination 11 homolog”
MSH2	„mutS homolog 2“
MSH6	„mutS homolog 6“
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)Imidazol-4-Carboxamid
mRNA	„messenger RNA“
n	nano
Nbs1	„Nijmegen breakage syndrome 1“
NER	„nucleotide excision repair“ (Nukleotidexzisionsreparatur)
NHEJ	„nonhomologous end-joining“
Noxa	Latein für Schaden (Bcl2-related)
O ⁶ BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ ClEtG	O ⁶ -Chlorethylguanin
O ⁶ MeG	O ⁶ -Methylguanin
O ⁴ MeT	O ⁴ -Methylthymidin
PAA	Polyacrylamid (38%) / Bispolyacrylamid (2%)
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	“proliferating cell nuclear antigen“
PCZ	N-Isopropyl-4- (2-methylhydrazin omethyl)benzamid (Procarbazin)
PI	Propidium Jodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinasen
PMS2	“postmeiotic segregation increased 2”
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
Pol	DNA-Polymerase
PTIC	N-Isopropyl-4- (2-methylhydrazin omethyl)benzamid (Procarbazin)
Puma	“p53 up-regulated modulator of apoptosis”
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Rad50	“DNA repair protein Rad50 homolog”
Rad51	“DNA repair protein Rad51 homolog”
Rad52	“DNA repair protein Rad52 homolog”
Raf	“rapidly growing fibrosarcoma” or “rat fibrosarcoma”
Ras	“rat sarcoma”
Rb-Protein	“retinoblastoma protein”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	“replication protein A, 32 kDa”
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat

Anhang

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SF2	Überlebensfraktion bei 2 Gy
siRNA	“small interfering RNA”
Smac/DIABLO	“second mitochondria-derived activator of caspase”
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
Survivin (BIRC5)	“baculoviral IAP repeat-containing 5”
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TMZ	4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-triene-9-carboxamide (Temozolomid)
TNF	“tumor necrosis factor”
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor”
Tris	Tris - (Hydroxymethyl)-Aminoethan
Tyk	Tyrosin-Kinase
U	Units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
Vol	Volumen
XAF1	“XIAP-associated factor 1”
XIAP	“X-linked IAP”
XPF (ERCC4)	“excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4”
XRCC1	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1”
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celcius
5'dRP	5'-Deoxyribose-5-Phosphat

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1** Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch Typ-I Interferone
- Abb. 1-2** Vermittlung von Apoptose nach DNA-Doppelstrangbrüchen
- Abb. 1-3** Intrinsischer mitochondrial vermittelter Apoptose-Signalweg
- Abb. 1-4** Extrinsischer Fas-Rezeptor vermittelter Apoptose-Signalweg
- Abb. 3-1** Bestimmung der intrinsischen Radiosensitivität der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien
- Abb. 3-2** Wirkung von Interferon- α und Interferon- β auf das Überleben der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien
- Abb. 3-3** Kombinationswirkung von Typ-I Interferonen und Bestrahlung auf das zelluläre Überleben der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien
- Abb. 3-4** Überlebenskurven der vier Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1 nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorinkubation
- Abb. 3-5:** Expression des Interferon-Rezeptors in den Pankreaskarzinom-Zelllinien Su8686, Panc-1, Capan-1 und Capan-2
- Abb. 3-6** Bestimmung des BrdU-Gehalts der Pankreaskarzinom-Zelllinien nach 24- bzw. 48-stündiger Interferon- β Behandlung
- Abb. 3-7** Zellzyklusverteilung der Pankreaskarzinom-Zelllinien nach 24-stündiger Interferon- β Inkubation
- Abb. 3-8** Beeinflussung der Zellzyklus-regulierenden Gene p15, p21 und p27 durch Interferon- β in den Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2
- Abb. 3-9** Vergleich der γ H2AX Foci Bildung und Abnahme nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinie Su8686 und Panc-1
- Abb. 3-10** Vergleich der Doppelstrangbruch-Reparatur nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinien Su8686 und Panc-1
- Abb. 3-11** Beeinflussung der Reparaturgene Rad51 und Rad52 durch Interferon- β
- Abb. 3-12** Vergleich der Apoptoserate nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung in den Zelllinien Su8686 und Panc-1
- Abb. 3-13** Beeinflussung der Expression des Tumorsuppressorgens p53 durch Interferon- β
- Abb. 3-14** Beeinflussung der Expression des Reparaturenzyms MGMT durch Interferon- β
- Abb. 3-15** Beeinflussung der Temozolomid induzierten Apoptoserate durch Interferon- β in den Zelllinien Su8686, Capan-2, Panc-1 und Capan-1
- Abb. 3-16** Zytotoxizität der Temozolomid-Behandlung in den Zelllinien D05 und D14
- Abb. 3-17** Spaltung der Caspase-9 nach Temozolomid-Behandlung in den Zelllinien D05 und D14
- Abb. 3-18** Expression des IFN-Rezeptors in den Zelllinien D05 und D14
- Abb. 3-19** Überlebenskurven der Melanomzelllinien D05 und D14 nach Behandlung mit verschiedenen Dosen Interferon- α oder Interferon- β

Anhang

- Abb. 3-20** Wachstumskurven der Zelllinien D05 und D14 mit und ohne 24-stündiger Interferon- β Behandlung
- Abb. 3-21** Zytotoxizität nach Kombinationsbehandlung mit Temozolomid und Interferon- α oder - β in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-22** Bestimmung der Apoptose- / Nekrosefrequenz nach alleiniger Temozolomid-Behandlung oder in Kombination mit Interferon- β in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-23** Einfluss von Interferon- β auf die TMZ induzierte Spaltung der Effektorcaspasen-3 und -7 in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-24** Einfluss von Interferon- β auf den zeitlichen Verlauf der Apoptoserate nach Behandlung mit Temozolomid in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-25** Einfluss von Interferon- β auf die Temozolomid vermittelte Zytotoxizität in humanen Lymphozyten
- Abb. 3-26** Einfluss von Interferon- β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit Fotemustin
- Abb. 3-27** Einfluss von Interferon- β auf die Behandlung der Melanomzelllinien D05 und D14 mit ionisierender Strahlung
- Abb. 3-28** Einfluss von Interferon- β auf die Behandlung der Zelllinien D05 und D14 mit MMS
- Abb. 3-29** Bestimmung der Apoptoserate nach Kombinationsbehandlung von Temozolomid und Interferon- β in stabil mit MGMT transfizierten Melanomzellen
- Abb. 3-30** Einfluss von Interferon- β auf die Expression des Reparaturenzyms MGMT
- Abb. 3-31** Einfluss von Interferon- β auf die Expression der Fehlpaarungs-Reparaturenzyme PMS2, MLH1, MSH2 und MSH6
- Abb. 3-32** Einfluss von Interferon- β auf die Expression der HR-Proteine Rad51 und Rad52
- Abb. 3-33** Einfluss von Interferon- β auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Temozolomid-Behandlung
- Abb. 3-34** Einfluss von Interferon- β auf die Expression der pro-apoptotischen Proteine Puma, Bak und Bax und das anti-apoptotische Protein Bcl2 nach Temozolomid-Behandlung
- Abb. 3-35** Einfluss von Interferon- β auf die Expression der für den extrinsischen Apoptoseweg essenziellen Proteine Pro-Caspase-8 und Fas-Rezeptor
- Abb. 3-36 A** Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung aus Temozolomid und Interferon - β in den Zelllinien A375 und RPMI 7951
- Abb. 3-36 B** Beeinflussung des Pro-Caspase-8 Niveaus durch Interferon- β in den Zelllinien A375 und RPMI 7951
- Abb. 3-37** Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose durch Interferon- β in den Zelllinien D05 und D14
- Abb. 3-38** Einfluss der stabilen Transfektion mit DN-FADD auf die Aktivierbarkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose mit und ohne IFN- β Vorbehandlung in den Zelllinien D05 und A375
- Abb. 3-39** Einfluss der stabilen Transfektion mit DN-FADD auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ in der Zelllinie D05

Anhang

- Abb. 3-40** Einfluss von Interferon- β auf die TRAIL vermittelte Apoptose in den Zelllinien D05, D14 und A375
- Abb. 3-41** Einfluss der stabilen Transfektion mit Caspase-8 siRNA auf die IFN- β vermittelte Sensibilisierung gegenüber TMZ in der Zelllinie A375
- Abb. 4-1** Sensibilisierung von p53-Wildtyp Melanomzellen gegenüber Temozolomid durch Interferon- β

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1-1** Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms
- Tabelle 1-2** Stadieneinteilung des malignen Melanoms
- Tabelle 1-3** Übersicht der Cycline, CDKs und CKIs in den verschiedenen Zellzyklusphasen
- Tabelle 3-1** Charakteristika der Überlebenskurven der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung
- Tabelle 3-2** Zusammenfassung der Ergebnisse für Radiosensitivität, Interferonantwort und deren Kombinationswirkung unter Berücksichtigung des p53 Status der zehn Pankreaskarzinom-Zelllinien
- Tabelle 3-3** Charakteristika der Überlebenskurven der vier Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung mit und ohne Interferon- β Vorbehandlung
- Tabelle 3-4** MGMT-Aktivität der vier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Su8686, Capan-1 und Capan-2

7.4 Veröffentlichungen

Eva Jöst, Wynand P. Roos, Bernd Kaina and Heinz Schmidberger

Response of pancreatic cancer cells treated with interferone- α and - β and co-exposed to ionizing radiation.

Zur Publikation eingereicht

Eva Jöst, Wynand P. Roos, Christina Belohlavek, Gerhard Fritz and Bernd Kaina
Interferons sensitize malignant melanoma cells to anticancer drugs by reactivating the death-receptor pathway.

Zur Publikation eingereicht

Naumann, S.C., Roos, W.P., **Jöst E.**, Belohlavek C, Lennerz V, Schmidt CW, Christmann M, Kaina B.

Temozolomide and fotemustine induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53.

British Journal of Cancer, **100** (2): 322 -333

7.5 Kongressteilnahme

7.5.1 Posterpräsentationen

- Jöst, E.,** Roos, W.P., Schmidberger H. and Kaina, B., 2007. Alleinige Interferon-Behandlung führt in Pankreaszellen zum Zelltod und sensibilisiert diese Zellen in Kombination mit Bestrahlung. *Archives of Pharmacology*, **375**, Nr. 417 [48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), März 2007, Mainz]
- Eva Jöst,** Wynand P. Roos, Bernd Kaina and Heinz Schmidberger, 2007. IFN induces cell kill in pancreatic cancer cell lines on its own and sensitizes these cells in combination with ionizing radiation. [10th International Wolfsberg Meeting on Molecular radiation Biology / Oncology, Mai 2007, Schweiz]
- E. Jöst,** W.P. Roos, B. Kaina, H. Schmidberger, 2007. Interferons as a sensitizer of ionizing radiation in a panel of pancreatic cancer cell lines. [10. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Oktober 2007, Mainz]
- Jöst, E.,** Roos, W.P., Schmidberger H., Kaina, B., 2008. Interferons as a modulator of the radio-and chemosensitivity of different tumor cell lines. *Archives of Pharmacology*, **377**, Nr. 374 [49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), März 2008, Mainz]
- E. Jöst,** B. Kaina, W.P. Roos, 2008. Interferons sensitize malignant melanoma cell lines to the alkylating agent temozolomide. [10th Biennial Meeting of the DGDR (German Society for Research on DNA Repair), September 2008, Berlin]

7.5.2 Vorträge

- Eva Jöst,** Gerhard Fritz, Bernd Kaina, Wynand Paul Roos, 2009. Interferons sensitise malignant melanoma cell lines to the alkylating agent temozolomide by reactivating the death-receptor (Fas/CD95) apoptosis pathway. *Archives of Prarmakologie*, **379**, Nr. 356 [50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), März 2009, Mainz]

7.6 Lebenslauf

Name: Eva Jöst
Geburtsort: Heidelberg

