

**Aus dem
Zentrum für Neurologie Tübingen
Abteilung für Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans**

**Zytotoxizität von Treosulfan nach
Glutathiondepletion durch BSO bei humanen
Glioblastomzellen**

Inaugural-Dissertation

**Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen**

vorgelegt von

**Jan Stock
aus Tübingen**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weller
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wesselborg

Für Yannick, Emely und Ingrid

1. Einleitung

1.1	Maligne Gliome und aktueller Stand der Therapie	7
1.2	Zytostatikaresistenz	9
1.2.1	Extrinsische Faktoren	9
1.2.2	Intrinsische Faktoren	10
1.3	Glutathion	12
1.3.1	Glutathion-Synthese	12
1.3.2	Funktion von Glutathion und seine Bedeutung in der antineoplastischen Therapie	13
1.4	D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin (BSO)	17
1.5	Treosulfan ((2S, 3S)-L-Threitol-1,4-Bismethansulfonat)	18
1.5.1	Chemische und pharmakologische Eigenschaften	18
1.5.2	Präklinische Forschung und Anwendung bei malignen Tumoren	19
1.6	Apoptose	21
1.6.1	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)	22
1.6.2	CD95/CD95L	23
1.7	Fragestellung	24

2. Material und Methoden

2.1	Material	25
2.1.1	Zelllinien	25
2.1.2	Reagenzien	25
2.1.3	Zellkultur	26
2.1.4	Zytotoxizitätsassay	27
2.1.5	Produktion von CD95L	27
2.1.6	Durchflusszytometrie	28
2.1.7	Glutathion-Messung	28
2.1.8	Messgeräte	29

2.2	Methoden	29
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.2	Produktion von CD95L	30
2.2.3	Bestimmung der Aktivität des CD95L	30
2.2.4	Durchflusszytometrie zur Bestimmung der CD95L-Expression	30
2.2.5	Zytotoxizitätsassay mit Kristallviolett färbung	31
2.2.6	Bestimmung des Glutathion-Gehaltes	32
2.3	Statistische Auswertung	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Effekte von BSO auf den Glutathion-Gehalt und die Zytotoxizität von Treosulfan bei 12 malignen Gliomzelllinien	33
3.1.1	Auswirkung der Behandlung mit BSO auf das Überleben 12 maligner Gliomzelllinien	33
3.1.2	Glutathion-Gehalt 12 maligner Gliomzelllinien nach Behandlung mit BSO	34
3.1.3	Sensibilitätssteigernder Effekt von BSO für die Zytotoxizität von Treosulfan	34
3.2	Untersuchung des Einflusses von BSO auf die CD95-vermittelte Apoptose	38
3.2.1	CD95-Expression bei humanen malignen Gliomzellen nach Behandlung mit BSO	38
3.2.2	Modulation CD95-vermittelter Apoptose nach Vorbehandlung mit BSO	39
3.2.3	Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von TNF- α	41
3.3	Interaktionen von CD95/CD95L-System und Treosulfan	42
3.3.1	Einfluss von CD95L auf den Glutathion-Gehalt maligner Gliomzellen	42
3.3.2	Sensibilität maligner Gliomzellen gegenüber Treosulfan nach Vorbehandlung mit CD95L	43

3.3.3	Effekte einer gleichzeitigen Behandlung maligner Gliomzellen mit Treosulfan und CD95L	43
3.3.4	Zytotoxizität von Treosulfan nach Vorbehandlung mit BSO bei crm-A-transfizierten malignen Gliomzellen	45
3.4	Effekte von BSO und Treosulfan bei der Rattengliom- zelllinie C6 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	46
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	54
6.	Literaturverzeichnis	56
7.	Abkürzungsverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1 Maligne Gliome

Maligne Gliome sind eine heterogene Gruppe primärer Hirntumore des zentralen Nervensystems, die sich aus Gliazellen oder deren Vorstufen entwickeln. Im Erwachsenenalter sind sie mit 15-20% aller Hirntumoren die häufigsten hirneigenen Tumore (Fine 1994). Ihre Inzidenz beträgt ca. 3,5 Neuerkrankungen pro 100.000 und Jahr. Nach der WHO-Klassifikation werden sie in die Grade III und IV eingeteilt (Kleihues und Cavenee 2000). Dazu gehören Glioblastome (Grad IV), anaplastische Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligogastrozytome, Ependymome (jeweils Grad III) und Plexus-Choroideus-Karzinome (Grad III oder Grad IV). Maligne Gliome zeigen als typische histologische Gemeinsamkeit eine hohe Zelldichte, eine hohe Zellpolymorphie sowie eine erhöhte Mitoseaktivität. Ihnen gemeinsam ist das diffuse und infiltrierende Wachstum. Unter den malignen Gliomen ist das Glioblastom der am häufigsten vorkommende Tumortyp.

Die Therapie maligner Gliome gestaltet sich sehr schwierig. Über viele Jahre wurde die Prognose für Patienten mit malignem Gliom kaum verbessert. Die neurochirurgische Therapie kann einerseits aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstums von malignen Gliomen nie zu einer vollständigen Eradikation von Tumorzellen führen, andererseits sind maligne Gliome oft in elementaren Strukturen des Gehirns lokalisiert, so dass auch hier der chirurgischen Intervention Grenzen gesetzt sind. Der Median der Überlebenszeit für Glioblastome liegt bei alleiniger Operation bei 4-6 Monaten (Fine et al. 1993).

Bei Glioblastomen ist die Strahlentherapie, die meist als Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion erfolgt, die wichtigste therapeutische Maßnahme. Die Standardstrahlentherapie besteht aus Dosierungen von 54-60 Gy, nach Möglichkeit 60 Gy, fraktioniert in Tagesdosen von 1,8 bis 2,0 Gy. Als palliative Maßnahme kann eine akzelerierte Strahlentherapie mit Dosen von 30-45 Gy in Fraktionen von 3 Gy durchgeführt werden.

In der Regel wird zuvor eine makroskopisch weitgehend komplette Tumorresektion angestrebt, wenngleich der therapeutische Nutzen des radikalen operativen Vorgehens gegenüber der Biopsie nicht durch prospektive randomisierte Studien gesichert ist (Metcalf und Grant 2002). Die mittlere Überlebenszeit für die zytoreduktive Operation

in Kombination mit postoperativer Bestrahlung beträgt bei Glioblastomen 9,4 Monate (Fine et al. 1993).

In der Primärtherapie des Glioblastomes war der Stellenwert der Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie lange umstritten. In einer kontrovers diskutierten Studie wurde bei zusätzlicher Chemotherapie nach PCV-Schema in der Primärtherapie keine Verbesserung der Prognose erzielt (Medical Research Council Brain Tumor Working Party 2001). Metaanalysen über alle Alters- und Prognosegruppen zeigten bei Nitrosoharnstoff-haltiger Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie gegenüber der alleinigen Strahlentherapie eine Steigerung des medianen Überlebens von 2-3 Monaten (Fine et al. 1993, Stewart 2002). In den den Metaanalysen zugrunde liegenden Studien wurde jedoch nicht zwischen Patienten mit anaplastischem Astrozytom und Patienten mit Glioblastom unterschieden und zudem wurden Patienten mit anaplastischem Oligodendrogliom eingeschlossen.

Die NOA-01-Studie, die die Kombination von ACNU/VM26 mit der Kombination aus ACNU/Cytarabin jeweils nach konventioneller Strahlentherapie untersuchte, führte zwar zu einer sehr guten medianen Überlebenszeit von 16 Monaten, wegen des Fehlens eines Kontrollarmes mit alleiniger Strahlentherapie definiert sie aber keine Wirkung der Chemotherapie (Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society (NOA) 2003).

Seit kurzem vorliegende Ergebnisse einer Phase-III-Studie der *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) und der *National Cancer Institute of Canada Clinical Trial Group* (NCIC) belegen für ein homogenes Studienkollektiv mit Glioblastom (WHO Klassifikation Grad IV) die Wirksamkeit der zusätzlichen Chemotherapie zur Strahlentherapie im Rahmen der Primärtherapie. Patienten die zusätzlich zur Standardstrahlentherapie eine begleitende und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid erhielten zeigten gegenüber Patienten mit alleiniger Standardstrahlentherapie ein signifikant längeres medianes Überleben von 3 Monaten (Stupp et al 2004).

Im Rezidiv nach Strahlentherapie zeigt die Chemotherapie mäßige Wirksamkeit. In einer Metaanalyse von Wong et al. (1999) lag das mediane progressionsfreie Intervall mit verschiedenen Protokollen bei 9 Wochen, die Progressionsfreiheit nach 6 Monaten bei 15% und das mediane Überleben bei 25 Wochen.

Es existieren keine verlässlichen Faktoren, die eine Aussage zulassen würden, welcher Patient von einer Chemotherapie profitieren könnte (De Angelis 1998). Bisher gibt es

lediglich für Oligodendrogliome erste Hinweise auf molekulargenetische Marker mit prognostischer Bedeutung (Cairncross et al. 1998).

Für das Versagen bzw. die schlechte Wirkung der Chemotherapie bei einem Großteil der Patienten mit malignem Gliom sind derzeit mehrere Ursachen bekannt, die im Folgenden näher dargestellt werden.

1.2 Zytostatikaresistenz

Die Zytostatikaresistenz ist ein entscheidender Faktor, durch den die Chemotherapie maligner Gliome zu nur unbefriedigenden Ergebnissen führt. Dazu kommen unerwünschte, dosislimitierende, zum Teil ausgeprägte Nebenwirkungen der Chemotherapeutika. Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika lässt sich in zwei unterschiedliche Bereiche gliedern, die auf unterschiedlichen Ebenen angesiedelt sind. Zum einen handelt es sich um extrinsische Faktoren. Diese beeinflussen die Wirksamkeit der Chemotherapeutika auf extrazellulärer Ebene.

Zum anderen gibt es auf subzellulärer Ebene Mechanismen, die auf verschiedene Art und Weise den hier gewünschten Zelltod verhindern können. Diese werden als intrinsische Faktoren zusammengefasst.

1.2.1 Extrinsische Faktoren

Für die Wirksamkeit von Chemotherapeutika sind eine ausreichende Durchblutung zum Transport der Substanzen zum Wirkort und eine gute Sauerstoffsättigung von elementarer Bedeutung. Maligne Tumoren verfügen jedoch nur über ein sehr unregelmäßiges, zum Teil fehlerhaft ausgebildetes Gefäßnetz. So finden sich im Tumorgewebe überdurchschnittlich viele arterio-venöse *Shunts* sowie oft ein nur unvollständiges Gefäßendothel. Durch die mangelhafte Perfusion herrscht im Tumorgewebe und den dort ansässigen Zellen eine Hypoxie (Behrens et al. 1998). *In vitro* haben sich hypoxische Gliomzellen gegenüber BCNU als Standardchemotherapeutikum als 15-30mal resistenter erwiesen (Liang 1996). Hinzu kommt, dass aufgrund der zum Teil großen Diffusionsstrecken lokal oft nur zu niedrige Konzentrationen des Chemotherapeutikums erreicht werden (Brown und Giaccia 1998).

Obwohl neu gebildete Tumorgefäße oft pathologisch ausgebildet sind, stellt die Blut-Hirn-Schranke in einigen Tumorregionen mit ihren dicht aneinander schließenden

Endothelzellen der Kapillaren ein kaum überwindbares Hindernis dar. Auf molekularer Ebene bestehen die Membranen der Endothelzellen aus einer Doppelpospholipidschicht, die für hydrophile Moleküle mit einem Molekülradius $> 0,2$ nm impermeabel ist. Die schlechte Wirksamkeit von Adriamycin und Cisplatin lässt sich unter anderem hierdurch erklären. Auch die Fähigkeit zur Permeation via Transzytose ist in den Endothelzellen nur sehr gering ausgeprägt. Andererseits resultiert das Hirnödem, die Hauptursache für die klinische Symptomatik von Patienten mit Hirntumoren, aus einer Störung der Blut-Hirn-Schranke. Gut darstellbar ist die Störung der Blut-Hirn-Schranke durch die beiden wichtigsten diagnostischen Verfahren des Hirnödems, die kontrastmittelverstärkte Computertomographie bzw. die gadoliniumunterstützte Kernspintomographie. Beide Verfahren tragen zur Einschätzung der Wirksamkeit nichtchirurgischer Therapieformen von Hirntumoren bei (Macdonald et al. 1990).

Während des Tumorwachstums produzieren Tumorzellen große Mengen an vasoaktiven Zytokinen mit parakrinen Effekten auf die lokal ansässigen Endothelzellen. Die derzeit bedeutendsten Vertreter sind *vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor* (VEGF/VPF), Interleukin-1 und Bradykinin (Kalkanis et al. 1996). In Gliomen gebildete Kapillaren zeigen neben einer gestörten Verbindung (*cell junction*) der Endothelzellen untereinander eine Hyperplasie sowie eingestülpte Oberflächen von Endothelzellen, Abnormalitäten der Basalmembran und ein erweitertes Interstitium (Shibata 1989). Daher verfügen Gliome in einigen Regionen nicht über eine normal funktionierende Blut-Hirn-Schranke und machen sie somit für wasserlösliche Chemotherapeutika empfänglicher als parenchymale Zellen.

1.2.2 Intrinsische Faktoren

Auf subzellulärer Ebene sind mehrere Mechanismen beschrieben, aufgrund derer Tumorzellen Resistenz gegenüber Zytostatika zeigen. Ein gut untersuchter Mechanismus ist die verstärkte Expression des *multi drug resistance* Gens (mdr-1) und dessen Produkt, P-Glykoprotein (P-GP). Dieses stellt eine energieabhängige Membranpumpe dar, die für den Auswärtstransport zahlreicher Stoffe, vor allem relativ lipophiler Substanzen, aus der Zelle sorgt. Die intrazelluläre Konzentration von Anthrazyklinen (z.B. Adriamycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin), Epipodophyllotoxinen (z.B. Etoposid, Tenoposid) und Vinca-Alkaloiden (z.B. Vincristin, Vinblastin) kann so an ihrem Wirkort stark vermindert sein. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass gerade am

Endothel von neugebildeten Tumorgefäßen eine erhöhte Expression des P-GP vorliegt (Takamiya et al. 1997). Für Zellen von niedrig- und hochgradigen Gliomen ist ebenfalls eine P-GP-Expression beschrieben (von Bossanyi et al. 1997, Andratschke et al. 2001). Andererseits haben aktuelle Untersuchungen *in vitro* und *ex vivo* gezeigt, dass die *multi drug resistance*-(MDR)-vermittelte Resistenz *in vivo* vermutlich Endothelzell- und nicht Gliomzell-vermittelt ist (Bähr et al. 2003)

Ein anderer Schutzmechanismus der Tumorzelle ist die Abnahme der Empfindlichkeit von Topoisomerase II gegenüber Epipodophyllotoxinen. Topoisomerasen spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation. Topoisomerasen verursachen temporäre DNA-Strangbrüche, die eine Translokation von DNA-Segmenten erlauben. Anschließend werden die DNA-Strangbrüche ebenfalls durch Topoisomerasen wieder geschlossen.

Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass der Zytostatika-induzierte Zelltod einen autokrin vermittelten Selbstmord der Zelle darstellt, der durch die verstärkte Expression von CD95 und CD95L vermittelt wird. Eine Zytostatikaresistenz wird durch die Inaktivierung des CD95 Wegs erklärt (Fulda et al. 1998). Allerdings zeigen andere Versuche, dass der CD95-vermittelte Zelltod blockiert werden konnte, ohne dass dies Einfluss auf den Zytostatika-induzierten Zelltod hatte (Villunger et al. 1997). Vermutlich spielt das CD95-System eine zelltypspezifische Rolle. Bei Gliomen läuft der Zytostatika-vermittelte Zelltod CD95-unabhängig ab (Glaser et al. 1999). Auch Veränderungen im System von pro- und antiapoptotischen Genen wie p53/p21 oder Veränderungen auf molekularer Ebene im CDK4/p16/RB-System und erhöhte Expression von Bcl-2 sind von wesentlicher Bedeutung. Die Unfähigkeit von Zellen mit schwerwiegenden molekularen Veränderungen in die Apoptose einzutreten, ist vermutlich ein bedeutender Mechanismus bei der Entstehung von Tumoren (Kerr et al. 1994). Auch für die Entstehung maligner Gliome wird dieser Pathomechanismus angenommen (Bogler et al. 1995). In solchen Zellen kann ein Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder aber die erhöhte Expression von antiapoptotischen Genen wie Bcl-2 und seiner Proteinprodukte vorliegen.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die Überexpression zytoprotektiver, bzw. zytostatikainaktivierender Enzymsysteme wie des Glutathion-Systems und dessen Untereinheiten wie Glutathion-S-Transferasen (GST) und Glutathion-Peroxidase (GPO) von besonderem Interesse. GST bilden eine Familie heterogener Proteine, die von Genen kodiert werden, die sich in Struktur und

Chromosomenlokation unterscheiden. Es sind dimere Proteine, die am besten für ihre Funktion als Phase II-Enzyme im Fremdstoffkatabolismus des menschlichen Organismus bekannt sind, in dem sie in nukleophilen Reaktionen die Konjugation der reduzierten Form von Glutathion und toxischer, elektrophiler Substanzen katalysieren und Thioätherderivate bilden (Morrow et al. 1998). Derzeit sind vier Hauptklassen der GST bekannt (α , μ , π und σ), von denen GST π am stärksten mit Karzinomen beim Menschen assoziiert wird. Eine positive Korrelation zwischen GST π -Expression und dem Tumorgrad sowie eine negative Korrelation zwischen GST-Expression und der Überlebensrate von Patienten mit malignem Gliom wurde bereits gezeigt (Ali-Osman et al. 1997).

1.3 Glutathion

1.3.1 Glutathion-Synthese

Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) ist ein aus einem Tripeptid bestehender Sulphydrylpuffer. Glutathion besitzt in seiner reduzierten Form (GSH) eine freie Sulphydryl (SH)- Gruppe, die als Protonen (H^+ -Ionen)- Donor dient.

Der erste Schritt der Glutathion-Synthese ist die Bildung eines Dipeptids. Diese Reaktion wird durch das Enzym γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS) katalysiert. Es kommt zu einer Peptidbindung zwischen der durch ATP aktivierten γ -Carboxylgruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins. Während dieser Reaktion entsteht als Zwischenprodukt ein Acylphosphat, das von der Aminogruppe des Cysteins angegriffen wird. Dieser Teil der Reaktion unterliegt einer negativen Rückkopplung durch Glutathion. Im zweiten Schritt wird zunächst die Carboxylgruppe des Cysteins durch ATP aktiviert. Anschließend wird mit Hilfe der Glutathionsynthetase (GS) die zweite Peptidbindung geschlossen, es entsteht das Tripeptid γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin.

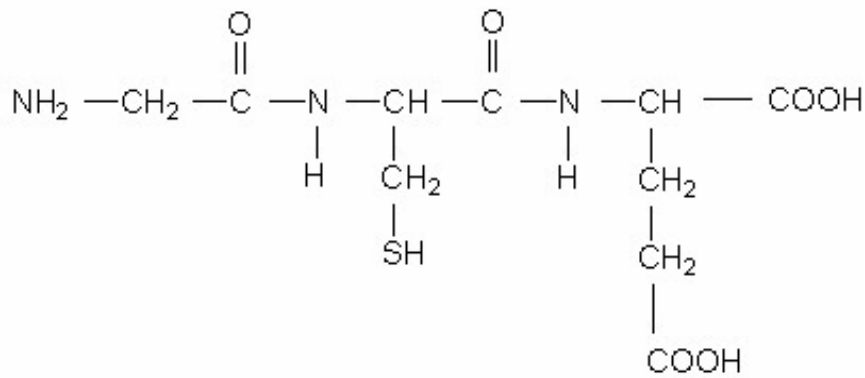


Abb. 1 Strukturformel von GSH

1.3.2 Funktion von Glutathion und seine Bedeutung in der antineoplastischen Therapie

Glutathion ist das intrazellulär vorherrschende, nichtribosomal synthetisierte Sulfhydryl und Antioxidans. Es beeinflusst die Wirksamkeit und die Wechselwirkung einer Vielzahl antineoplastischer Maßnahmen. Die Elimination von Fremdstoffen, z.B. Chemotherapeutika oder Abbauprodukten aus dem eigenen Stoffwechsel, ist für jede einzelne Zelle des Organismus von großer Bedeutung. Voraussetzung ist in vielen Fällen eine enzymatische Umwandlung.

Glutathion ist in der reduzierten Thiolform mit seiner Sulfhydrylgruppe an Reaktionen beteiligt, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen:

- Phase I-Reaktionen, oder Funktionalisierungsreaktionen, durch die an der Ausgangsverbindung oder an dem Ausgangsprodukt funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt werden. Diese Reaktionen beeinflussen die Wirkungen von Pharmaka.
- Phase II-Reaktionen, bei denen an die meist in Phase I geschaffenen funktionellen Gruppen Reste gekoppelt werden, die vom Organismus zur Verfügung gestellt werden. Meist entstehen hierbei, bis auf wenige Ausnahmen, biologisch inaktive, wasserlösliche Produkte.

	Phase I	Phase II
		Konjugation mit:
Pharmakon/ Stoffwechselprodukt	Oxidation	Glukuronsäure
	Reduktion	Schwefelsäure
	Hydrolyse	Karbonsäure
		Aminosäuren
		GSH

Für alle Oxidationsformen der Phase I muss Sauerstoff aktiviert werden und fällt in aktivierter Form an.

Des Weiteren geben die im Stoffwechsel anfallenden Radikale leicht Elektronen an Sauerstoff ab und erzeugen so Sauerstoffradikal-Ionen. Damit erhöht der Fremdstoffwechsel grundsätzlich die Belastung der Zelle.

Voraussetzung für eine Zelle auf Dauer überleben zu können ist deshalb ein Abwehrsystem zur Verminderung von toxischen Stoffen.

Neben Vitaminen und synthetischen Stoffen steht hierfür eine ganze Reihe von Enzymen zur Verfügung. Ein wichtiger Vertreter ist die Glutathion-Peroxidase (GPO). GPO katalysiert die Reaktion von durch aerobe Lebensweise physiologisch entstehenden schädlichen Sauerstoffradikalen, aber auch von Sauerstoffradikalen, die bei einer Chemotherapie durch akuten oxidativen Stress entstehen und somit für die Wirkung des Chemotherapeutikums verantwortlich sind. Im Speziellen sind dies die Reaktionen von Wasserstoffperoxid oder anderen organischen Peroxiden.

Dabei reagiert ein Molekül des Peroxids, zum Beispiel Wasserstoffperoxid, mit zwei Molekülen GSH. Es resultieren Wasser und die oxidierte Form von GSH, das GSSG, in Form eines Disulfids.



Bei der Phase II-Reaktion spielt Glutathion ebenfalls eine wichtige Rolle.

Im Gegensatz zu den anderen Reaktionen dieser Eliminationsstufe ist für die Konjugation mit GSH keine besondere Aktivierung notwendig, die Reaktionsbereitschaft muss in den zu konjugierenden Substanzen bereits vorhanden sein. Die deshalb auch spontan ablaufende Reaktion wird durch Enzyme der GST-Familie enorm gesteigert.

Glutathion ist an der Bildung von gemischten Disulfiden und der Bildung von Thioestern bei der Detoxifikation potentiell schädlicher Substanzen beteiligt. Dies spielt bei der Therapie mit Melphalan, Quinon-enthaltenden Chemotherapeutika wie Adriamycin oder Mitomycin c (Arrick und Nathan 1984) und Thiotepa (Cnubben et al. 1998) eine wesentliche Rolle bei deren Entgiftung und verminderter Zytotoxizität. Umgekehrt kann Glutathion auch an der Aktivierung bestimmter Chemotherapeutika beteiligt sein und deren Wirksamkeit steigern, zum Beispiel die Verstoffwechslung von Azathioprin und Bleomycin. Des Weiteren wird Glutathion eine Rolle bei der DNA-Replikation und der DNA-Reperatur zugesprochen (Hickson und Harris 1988, Sancar und Sancar 1988). Durch Glutathion kann der Transport von Substanzen, zum Beispiel Methotrexat nach intra- und extrazellulär, also die Substanzaufnahme und der Substanztransport zum Wirkort beeinflusst werden (Arrick und Nathan 1984). Durch eine gesteigerte Aktivität von GPO, oder anderer Faktoren des Glutathion-Systems, kann eine sehr ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika hervorgerufen werden, vor allem, wenn diese ihre Zytotoxizität über die Bildung freier Radikale entwickeln (Black und Wolf 1991, Morrow et al. 1998).

Auch für die Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber Bestrahlung kann Glutathion eine wichtige Rolle spielen (Bailey 1998).

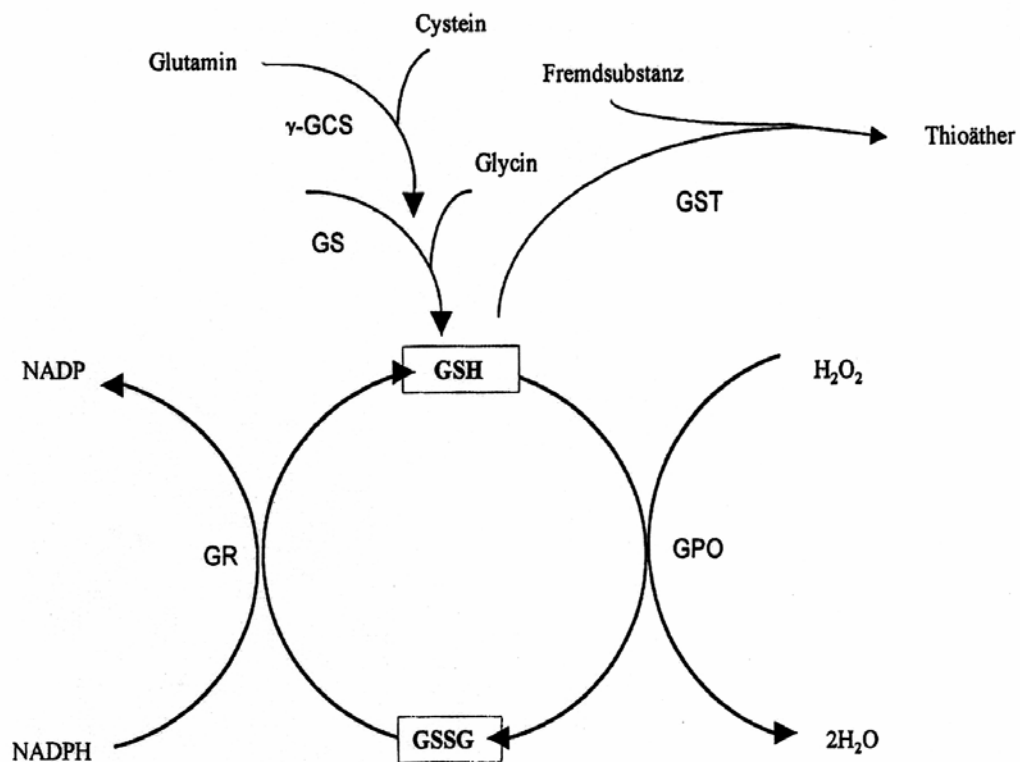


Abb. 2 Glutathionmetabolismus: Oxidations-Reduktions-Reaktion und Thioätherbildung.

Beteiligte Enzyme: GPO = Glutathionperoxidase, GR = Glutathionreduktase, GST = Glutathion-S-Transferrase, γ -GCS = γ Glutamyl-Cystein-Synthetase, GS = Glutathion-Synthetase (nach Arrick 1984).

Für die dargestellten zwei Gruppen von Reaktionen muss Glutathion in seiner aktiven, reduzierten Form als GSH und somit einer freien Sulphydrylgruppe vorliegen (Abb. 1). In der oxidierten Form GSSG sind zwei GSH-Moleküle über eine Disulfidbrücke verbunden. In dieser Form ist Glutathion inaktiv. Eine zentrale Rolle spielt hier GR, die mit Hilfe von NADPH als Protonendonator und FAD als Cofaktor, GSSG in seine reduzierte Form GSH zurückführt. Durch Reduktion von GSSG und Efflux aus der Zelle liegt das in den verschiedenen Geweben reichlich vorkommende Glutathion (1-10 mmol/kg Feuchtgewicht) zu 98% in seiner reduzierten und nur zu ca. 2% in seiner oxidierten Form vor.

Das Glutathion-System hat einen wichtigen Anteil an der Erhaltung der Funktion und Matrix der einzelnen Zelle. Sind diese Systeme der Entgiftung potentiell schädlicher

Substanzen nicht ausreichend wirksam, kommt es unter anderem zum Zustand des oxidativen Stresses und akut toxischen Effekten; bei der Therapie von Tumoren beabsichtigt durch Chemotherapeutika.

1.4 D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin (BSO)

Bereits 1979 wurden von Owen W. Griffith und Alton Meister Studien durchgeführt, bei denen sie nach einem spezifischen Inhibitor für die γ -Glutamyl-Synthetase, dem Schrittmacherenzym in der Glutathion-Synthese, suchten (Griffith und Meister 1979). Es war bekannt, dass Methioninsulfoximin, ein Analogon aus der Familie der Sulfoximine, zu der auch Ethionin- und Prothioninsulfoximin zählen und die sich strukturell durch ihre Kohlenwasserstoffgruppe (CH) im S-Alkyl-Teil unterscheiden, sowohl die Glutaminsynthetase als auch die γ -Glutamylsynthetase hemmt. Das Ersetzen der Methyl-Gruppe von Methioninsulfoximin durch einen größeren n-Butyl-Rest führte zu einem sehr spezifischen und hoch potenten Inhibitor der γ -Glutamylsynthetase, der aber keinen Effekt auf die Glutaminsynthetase oder die Synthese anderer Proteine hat: Buthioninsulfoximin (S-n-Butyl-Homocystein Sulfoximin (BSO)) (Griffith und Meister 1979, Griffith 1982).

Die inhibitorischen Effekte auf die γ -Glutamylsynthetase sind allosterische Hemmungen. So bindet das durch Phosphorylasen aktivierte Sulfoximin mit seiner S-Alkyl-Einheit in der Region des aktiven Zentrums des Enzyms, in der normalerweise die Akzeptoraminosäure (Cystein, *alpha-aminobutyrat*) bindet.

BSO ist das potenteste bekannte S-Alkyl-Sulfoximin für eine spezifische Hemmung der γ -Glutamylsynthetase. Unter Bedingungen wie bei Griffith und Meister (1979) wirkt es auf die γ -Glutamylsynthetase *in vitro* und *in vivo* mindestens 100mal stärker inhibitorisch als Methioninsulfoximin und 2000mal stärker hemmend als Prothioninsulfoximin.

1.5 Treosulfan ((2S, 3S)-L-Threitol-1,4-Bismethansulfonat)

1.5.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften

Treosulfan ist ein bifunktionelles Alkylanz. Die Substanz ist dem Busulfan in seinem Molekülaufbau ähnlich. Allerdings wurden die chemischen Eigenschaften und auch die Wirkweise durch das Einfügen von zwei Hydroxylgruppen gegenüber Busulfan verändert (Kopf-Maier und Sass 1992). Zwei endständige Methansulfonat-Gruppen verhindern eine direkte Alkylierung von nukleophilen Zentren.

Treosulfan wurde 1961 erstmals synthetisiert (Feit 1961).

Der chemische Name lautet (2S, 3S)- L – Threitol-1, 4-Bismethansulfonat. Als internationale chemische Kurzbezeichnung wird Treosulfan oder synonym Dihydroxybusulfan bzw. DHB verwendet.

Treosulfan selbst ist ein *pro-drug* und pharmakologisch inaktiv. Unter physiologischen Bedingungen wird es Temperatur- und ph-Wert-abhängig, aber Ezym-unabhängig über ein Monoepoxid zu einem Diepoxid umgewandelt (Feit et al. 1970, Abb. 2).

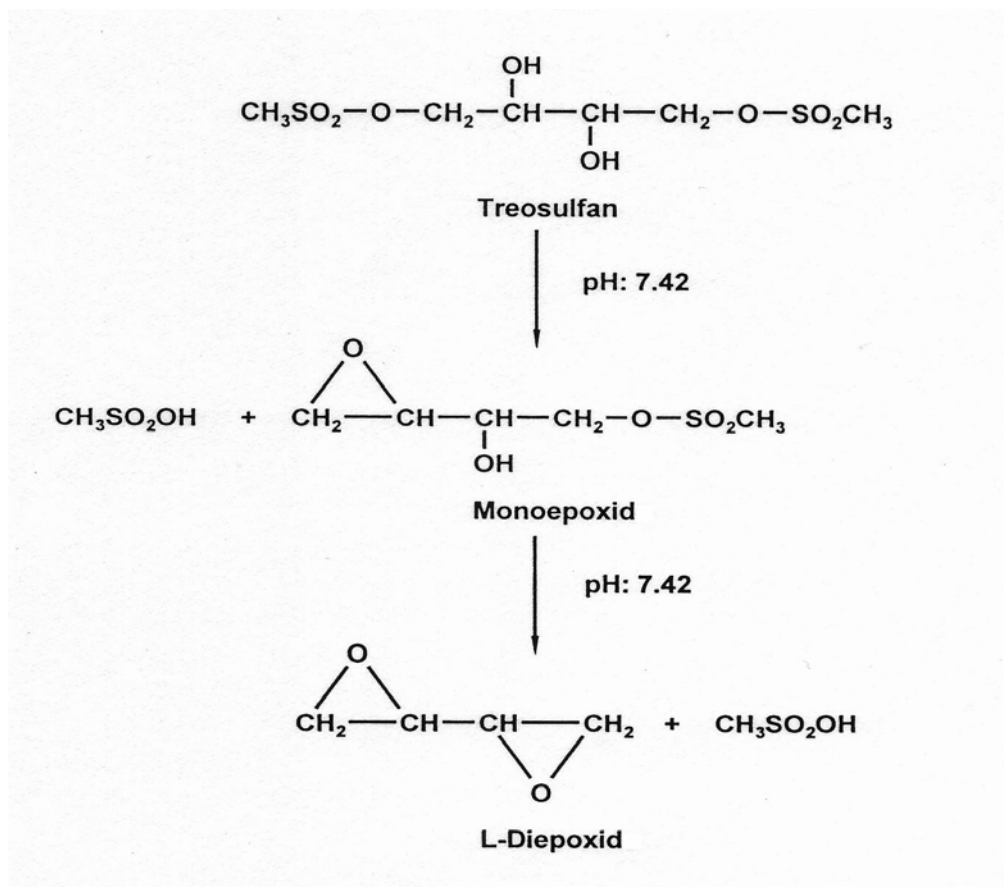


Abb. 3 Temperatur- und ph-Wert-abhängige Umwandlung von Treosulfan in die aktiven Metaboliten Monoepoxid und Diepoxid (nach Feit et al. 1970)

Die gebildeten Epoxide reagieren mit nukleophilen Zentren der DNA und sind über sekundäre biologische Mechanismen für die antineoplastische Wirkung verantwortlich. Hierbei kann das zunächst entstehende Monoepoxid bereits ein nukleophiles Zentrum alkylieren. Damit wird die Verbindung durch eine chemische Reaktion an diesem Zentrum fixiert, ehe der zweite Epoxidring gebildet wird und ein *cross-linking* bzw. eine kovalente Verknüpfung zwischen verschiedenen DNA-Strängen mit bevorzugter Alkylierung des Guanin-N7 folgen kann (Hartley et al. 1999).

Die chemische Halbwertszeit beträgt 2,2 h. Unter *in vivo*-Bedingungen unterliegen ca. 30% des unveränderten Treosulfan einer renalen Ausscheidung, so dass sich eine Halbwertszeit von ca. 1,8 h ergibt (Hilger et al. 1998). Die aktiven Metaboliten sind sehr lipophil, daher ist eine Passage der Blut-Hirn-Schranke denkbar. Daten liegen dazu bisher nicht vor.

Treosulfan besitzt einen hohen therapeutischen Index ($TI = LD_{50} / ED_{95}$), also eine breite Spanne zwischen therapeutischer Dosis und letaler Dosis und somit eine hohe Sicherheit. Der therapeutische Index von Treosulfan kann in Abhängigkeit von der Sensitivität des Tumors höher als 10 liegen. Eine weitere interessante Eigenschaft ist, dass zu Cisplatin, Carboplatin, Doxorubicin, Bleomycin und Hydroxy-Harnstoffpräparaten keine Kreuzresistenzen bestehen.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass sich die unerwünschten Wirkungen von Treosulfan, neben gastrointestinalen Nebenwirkungen, im Wesentlichen auf die Hämatotoxizität beschränken (Duncan und Clayton 1985, Gropp et al. 1998) und beherrschbar bleiben (Meden et al. 1997).

Auf Grund oben dargestellter Wirkweise und der darin begründeten Mutagenität sowie induzierten Chromosomenaberrationen (Matagne 1969) sind die aus Treosulfan entstehenden Epoxide als teratogen einzustufen und es muss von einem karzinogenem Potential ausgegangen werden. Leukämien nach Behandlung mit Treosulfan bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen sind beschrieben (Pedersen-Bjergaard et al. 1980, Kaldor et al. 1990).

1.5.2 Präklinische Forschung und Anwendung bei malignen Tumoren

Treosulfan wurde erstmals 1961 in den Forschungslaboratorien von "LEO Pharmaceutical Products" in Dänemark synthetisiert (Feit 1961). Die tumorhemmenden Eigenschaften von Treosulfan zeigten sich bereits in den frühen sechziger Jahren, als

man eine wachstumshemmende Wirkung an verschiedenen transplantierten Tumoren bei Maus und Ratte fand.

In vitro-Experimente zeigten, dass Treosulfan zytotoxische Aktivität gegenüber malignen hämatologischen Erkrankungen wie akuter lymphatischer Leukämie, akuter T-Zell-Leukämie, akuter myelotischer Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphomen besitzt (Bosanquet und Burlton 1994, Fichtner et al. 2003)

In weiteren präklinischen Versuchen zeigte sich ein breites Wirkspektrum bei humanen Tumorentransplantaten verschiedener Herkunft, so z.B. bei Tumoren der Brust, der Lunge, der Blase und der Niere (Kopf-Maier und Sass 1992, 1996, Kopf-Maier 1998). In verschiedenen Modellen an Maus, Ratte und Rhesusaffe zeigte Treosulfan die für Alkylantien typisch toxischen Effekte auf das hämatopoetische System sowie eine schädigende Wirkung auf die Gonaden. Schwerwiegende Schädigungen anderer Organsysteme ließen sich nicht nachweisen.

Ursprünglich lag der Schwerpunkt in der Entwicklung eines gegen Ovarialkarzinome gerichteten Präparates. Derzeit wird Treosulfan wegen seines breiten Wirkspektrums auf verschiedene Tumoren in präklinischen Studien neu evaluiert und weiteren klinischen Studien unterzogen. Das günstige Nebenwirkungsprofil lässt auch an den Einsatz in Hochdosisregimen in Verbindung mit autologer Stammzelltransplantation denken. Hierzu wurde bereits eine Studie zur Behandlung mit Treosulfan in Kombination mit autologer peripherer Stammzelltransplantation bei fortgeschrittenen soliden Tumoren mit Dosen von 20 g/m² begonnen (Hilger et al. 1998).

In letzter Zeit wurden klinische Studien der Phase I und II bei Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, kleinzelligem und nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom sowie Non-Hodgkin-Lymphom durchgeführt (Kugler et al. 1998). Eine Multicenter-Studie der Phase III an 500 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte für eine Behandlung mit Cisplatin und Treosulfan einen günstigeren Einfluss auf die Überlebensrate und auf das Nebenwirkungsprofil gegenüber der Standardbehandlung mit Cisplatin und Cyclophosphamid (Breitbach et al. 2002).

Treosulfan wird in der Klinik als Monotherapie oder in Kombination mit anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen, z.B. Cisplatin, in der palliativen Therapie epithelialer Ovarialkarzinome der FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) Stadien II-IV eingesetzt.

1.6 Apoptose

Für die Entwicklung und Funktionstüchtigkeit eines multizellulären Organismus ist die Möglichkeit den Zelltod ebenso zu regulieren wie die Zellproliferation von entscheidender Bedeutung. Der physiologische Zelltod gewährleistet über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, Proteasen und hier vor allem Caspasen, die Eliminierung funktionsuntüchtiger oder nicht benötigter Zellen.

Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 verwandt (Kerr et al. 1972). Kerr beschreibt die intrazellulären Abbauvorgänge, die durch den physiologischen Zelltod ausgelöst werden. Typische Merkmale der Apoptose sind Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins, Zellschrumpfung und Abschnürungen der Plasmamembran und damit Auflösung der Zelle durch das Entstehen apoptotischer Vesikel (Arends et al. 1990, Sen und D'Inalci 1992, Kerr et al. 1994). Charakteristisch ist hierbei der Erhalt der Membranintegrität, die das Austreten von Zellinhaltsstoffen und damit eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe verhindert. Dieser Prozess verläuft innerhalb weniger Stunden.

Im Gegensatz hierzu steht der nekrotische Zelltod, bei dem es durch die Zerstörung der Plasmamembran zur Freisetzung entzündungsfördernder Zellinhaltsstoffe und Schädigung benachbarten Gewebes kommt (Wyllie 1997).

Vor allem der physiologische Zelltod wie er sich bei der Embryogenese, der Metamorphose oder dem normalem Gewebsumsatz ereignet zeigt die Merkmale der Apoptose.

Auch exogene Einflüsse wie Hitzeschock, Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren und Chemotherapeutika können in bestimmten Zelltypen Apoptose auslösen. Unter den Zytostatika, die Apoptose auslösen können, sind die wichtigsten Zytostatikaklassen vertreten: Alkylantien, Topoisomerase-I- und II-Inhibitoren, Vinca-Alkaloide, Antimetabolite (Sen und D'Inalci 1992). Bei der Tumorentstehung spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. So können Defekte in der Induktion oder Exekution der Apoptose dazu führen, dass geschädigte Zellen nicht zu Grunde gehen oder sogar unkontrolliert proliferieren. Beides kann zur Entstehung von Tumoren führen (Wyllie 1997). Das Therapieversagen bei vielen malignen Tumoren wird durch einen Defekt in der Apoptoseregulation erklärt. Dabei bleibt die physiologische Antwort „Apoptose“ auf genotoxischen Stress aus (Reed et al. 1996). Die intakte Regulation der Apoptose hat also zum einen entscheidenden Anteil daran ein Entstehen von Tumoren zu verhindern,

zum anderen ist sie aber auch für das erfolgreiche Ansprechen vieler Tumorthérapien von entscheidender Bedeutung.

1.6.1 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor gehört zu einer Familie transmembraner Rezeptoren, die mit ihren Liganden eine Vielzahl von verschiedenen zellulären Signalen übertragen.

TNF- α wurde erstmals im Serum von mit *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) und Endotoxin beimpften Mäusen, bei einem Versuch die Antitumoraktivität von Serum gegenüber Leukämiezellen zu erhöhen, identifiziert (Carswell et al. 1975).

Seit einigen Jahren steht auch rekombinantes humanes TNF- α (rhTNF- α) zur Verfügung (Shirai et al. 1985) und ist in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien getestet worden (Feinberg et al. 1988). TNF- α kann eine Vielzahl biologischer Prozesse aktivieren und besitzt bei einigen Tumorzellen direkte zytotoxische und zytostatische Aktivität (Sugarman et al. 1985, Ruggiero et al. 1987). Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, dass TNF- α *in vivo* über eine Zerstörung der Endothelzellen von Gefäßen im Tumorgewebe zu starken additiven Effekten bei der Zytotoxizität von Chemotherapeutika führen kann (van Etten et al. 2003).

Allerdings sind die meisten Tumorzellen gegenüber alleiniger Behandlung mit TNF- α resistent (Williamson et al. 1983, Watanabe et al. 1992), unabhängig davon wie ausgeprägt die TNF-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche ist (Kull und Cuatrecasas 1981, Tsujimoto und Vilcek 1985). Die Zytotoxizität von TNF- α bei Tumorzellen kann durch Protein- bzw. RNA-Synthesehemmer erheblich gesteigert und bei malignen Gliomzellen hiermit die Resistenz gegenüber TNF- α überwunden werden (Kull und Cuatrecasas 1981, Weller et al. 1994). An einem *in vivo*-Tiermodell konnten Zimmermann et al. (1989) für das murine Fibrosarkom Meth A eine erhöhte Sensitivität für rhTNF bei vorheriger intrazellulären Glutathion-Depletion durch BSO erzeugen. Außerdem wurde für Zellen von Ovarialkarzinom und Nierenzellkarzinomen bereits gezeigt, dass die Resistenz gegenüber TNF- α durch eine Kombinationsbehandlung mit BSO überwunden werden kann und die beiden Substanzen synergistisch zytotoxische Effekte zeigen (Mizutani und Yoshida 1994).

1.6.2 CD95 und CD95L

CD95 ist ein 48 kDa schweres Protein, das 1989 identifiziert wurde (Trauth et al. 1989, Yonehara et al. 1989) und ist Mitglied der TNF-(*tumor necrosis factor*)/NGF-(*nerve growth factor*)-Rezeptorfamilie (Itoh et al. 1991, Oehm et al. 1992, Itoh und Nagata 1993, Tartaglia et al. 1993). Als transmembraner Rezeptor vom Typ I ist es in der Membran einer Vielzahl verschiedener Zelltypen vorhanden. Die Aktivierung von CD95 erfolgt über einen spezifischen Liganden, den CD95-Liganden, ein 40 kDa schweres Typ II-Transmembranprotein, das erstmals auf der Oberfläche zytotoxischer T-Lymphozyten gefunden wurde (Nagata und Goldstein 1995) und auch auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen werden kann (Walker et al. 1997, Weller et al. 1998). Die Bindung eines agonistischen Antikörpers oder des trimerisierten CD95L an CD95 führt über eine Verbindung mit FADD (*fas-associated protein with death domain*) zu einer Aktivierung einer Signalkaskade aus Caspasen. Für die Therapie maligner Tumoren wurde auch die direkte Stimulierung des CD95 speziell für die Behandlung maligner Gliome untersucht (Weller et al. 1994).

Der lösliche CD95-L wurde 1993 identifiziert und ist ebenfalls Mitglied der TNF-Familie. Es handelt sich hierbei um die sehr wahrscheinlich durch die Matrixmetalloproteinase-7 abgespaltene, extrazelluläre Region des CD95L, die *in vivo* ca. 1000fach weniger aktiv ist als die Membran-gebundene Form (Schneider et al. 1998).

Die Bindung von CD95 an den alternativen *decoy*-Rezeptor 3 (DcR3) hemmt die Funktionen von CD95L in einigen Tumoren. DcR3 wird in Zelllinien maligner Gliome, in *ex vivo*-Kulturen von Glioblastomen und auch *in vivo* exprimiert (Roth et al. 2001). Im Gehirn wird CD95 nicht in normalem Parenchym, und nur in 50% der dort ansässigen Endothelzellen exprimiert (Leithäuser et al. 1993). Allerdings exprimieren Gliomzelllinien CD95 und können durch dessen Aktivierung getötet werden (s.o.).

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten Effekte einer Depletion von Glutathion und dessen Auswirkung auf die Zytotoxizität von Treosulfan ist es interessant, dass die Aktivierung des CD95 zu einem Verlust von Glutathion aus Jurkat-Zellen führt (Van den Dobbelsteen et al. 1997).

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden maligne Gliomzellen hinsichtlich des Einflusses von BSO auf den Glutathion-Gehalt und die Zytotoxizität von Treosulfan untersucht.

Zunächst wurde geprüft, ob sich bei allen untersuchten Zelllinien Glutathion depletieren lässt und welche Auswirkungen dies auf das Zellüberleben hat.

Es wurde getestet, ob BSO durch Glutathion-Depletion bei allen in dieser Arbeit verwendeten malignen Gliomzellen einen sensibilitätsteigernden Effekt für die Zytotoxizität von Treosulfan hat.

In der Literatur gibt es einige Hinweise für eine Rolle von Glutathion bei der Zellantwort auf CD95L und TNF- α (Mizutani und Yoshida 1994, Efferth et al. 1996, Um et al. 1996, van den Dobbelsteen et al. 1997). Daher wurde der Frage nachgegangen, ob durch Glutathion-Depletion mit BSO eine erhöhte Empfindlichkeit für die CD95/CD95L-vermittelte Apoptose erreicht werden kann. Zudem sollte geklärt werden, ob BSO zu einer Expression von CD95 führt.

Maligne Gliomzellen sind für alleinige TNF- α -vermittelte Zytotoxizität nicht empfindlich (Weller et al. 1994). Hier wurde untersucht, ob bei malignen Gliomzellen durch Vorbehandlung mit BSO eine gegenüber TNF- α induzierte Zytotoxizität erzielt werden kann, wie es für andere Tumorzellen bereits beschrieben wurde.

Für CD95L wurde geprüft, ob er den Glutathion-Gehalt von malignen Gliomzellen reduziert und zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber der Zytotoxizität von Treosulfan führt.

Abschließend wurde die Möglichkeit einer durch BSO gesteigerten Zytotoxizität von Treosulfan *in-vivo* überprüft. Die Wirksamkeit von Treosulfan und BSO wurde im C6-Rattengliommodell untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die T98G-Zelllinie stammt aus einem Glioblastom und wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) bezogen.

C6 ist eine Rattengliomzelllinie und wurde ebenfalls von ATCC bezogen.

Die Gliomzelllinien LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG und A172 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. N. de Tribolet (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

N2A ist eine Neuroblastomzelllinie der Maus und wurde zur Produktion des CD95L verwendet. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Fontana zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurden LN-18- und LN-229-Zellen verwendet, die mit einem pEFR-Vektor plus crm-A-cDNA stabil transfiziert waren (Strasser et al. 1995, Wagenknecht et al. 1998). Als Kontrolle dienten Zellen (puro), die mit einem Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenz ohne crm-A-cDNA transfiziert waren.

2.1.2 Reagenzien

D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin (BSO):

Zur Herstellung der benötigten Konzentrationen wurde BSO in isotonischer NaCl-Lösung bzw. in Medium gelöst.

Bezug über Sigma (Deisenhofen)

Cycloheximid (CHX):

Bezug über Sigma (Deisenhofen)

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α):

Bezug über Boehringer (Mannheim)

(2S, 3S) -L-Threitol-1,4-Bismethanolsulfat (Treosulfan):

Die Substanz wurde freundlicherweise von der Firma medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Treosulfan wurde in H₂O gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Zellkultur

Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (DMEM):

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA):

Bezug über Sigma (Deisenhofen)

Fetales Kälberserum (FCS):

FCS wurde für 30 min. auf 56°C erhitzt und dadurch inaktiviert und bei -20°C in 50 ml Aliquots gelagert.

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Phosphat-Pufferlösung/ *Phosphate buffered saline* (PBS):

Dulbecco`s PBS Special (8 g/Liter NaCl ; 0,2 g/Liter KCl ; 1,44 g/Liter Na₂HPO₄ und 0,24 g/Liter KH₂PO₄)

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Penicillin:

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Streptomycin:

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Trypsin:

Es wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung hergestellt und bei -20°C gelagert.

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

Serumfreies Medium:

Serumfreies Medium wurde aus DMEM mit Zusatz von 1%iger Penicillin-/Streptomycinlösung hergestellt, die Penicillinkonzentration betrug 100 U/ml, die Streptomycinkonzentration 100 µg/ml.

Vollmedium:

Das Vollmedium wurde aus DMEM hergestellt. Hierzu wurden dem DMEM 10% inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-/Streptomycinlösung hinzugefügt.

Die Penicillinkonzentration betrug 100 U/ml, die Streptomycinkonzentration 100 µg/ml.

2.1.4 Zytotoxizitätsassay

Kristallviolett:

Bezug über Sigma (Deisenhofen)

Kristallviolettlösung:

In 500 ml einer 20%igen Methanol-Lösung wurden 2,5 g Kristallviolett gelöst. Anschließend wurde die Lösung zweimal filtriert, um verbliebene Kristalle zu entfernen.

Methanol:

Bezug über Merck (Darmstadt)

Natriumzitratlösung (0,1 M):

Zur Herstellung einer gesättigten Lösung wurden 29,4 g Natriumzitat in 1000 ml einer Lösung aus gleichen Teilen H₂O und Methanol gelöst.

Natrium-Dihydrat:

Bezug über Merck (Darmstadt)

2.1.5 Produktion von CD95L

Glutamin, nicht essentielle Aminosäurenlösung:

Bezug über Sigma (Deisenhofen)

Geneticin/Neomycin (G418):

1 g G418 wurden in 20 ml Aqua dest. gelöst, durch einen 0,2 µm-Millipore-Filter steril filtriert, zu je 2,5 ml aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Bezug über Gibco BRL (Basel, Schweiz)

2.1.6 Durchflusszytometrie

Antikörper:

Fluoreszein-Isothiocyant-gebundener anti-CD95-Antikörper UB2 (FITC-UB2- α -CD95)

Bezug über: Kamiya (Thousand Oaks, Californien, USA)

Fluoreszein-Isothiocyant-gebundener Maus-IgG (FITC-Maus-IgG)

Bezug über Immunotech (Hamburg)

Formaldehydlösung (1%):

Es wurden 5 g Formaldehyd in 500 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Bezug über Merck (Darmstadt)

Pufferlösung:

Es wurden 1 g BSA und 10 mg Natriumazid in 100 ml PBS gelöst. Die Pufferlösung wurde bei 4°C gelagert.

2.1.7 Glutathion-Messung

Sulfosalizylsäure (SSA):

1% SSA in Aqua bidest gelöst.

Bezug über Merck (Darmstadt)

Pufferlösung:

1 mM EDTA, 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2

Diphosphoridinnukleotid (DTNB) 10 mM:

3,96 mg DTNB pro ml Pufferlösung

Nikotin-Adenosin-Dinukleotidphosphat (NADPH) 10 mM:

8,33 mg NADPH pro ml Pufferlösung

Glutathionreduktase (GR):

Bezug über Sigma (St. Louis, USA)

Pro well wurden folgende Mengen für den Reaktionsmix eingesetzt:

92,7 µl Puffer, 3 µl DTNB, 4 µl NADPH, 0,32 µl GR (auf Eis und zügig hergestellt)

Standards aus:

Stocklösung 500 µM (0,306 mg GSSG/ml SSA) , Lagerung bei -80°C.

2.1.8 Messgeräte

Durchflusszytometriegerät/FACS-Gerät:

Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FACSalibur Gerät und Cell Quest-Software durchgeführt.

Bezug über Becton & Dickinson (Heidelberg)

Fotometer:

Die Zytotoxizitätsassays wurden mit einem Titer Multiskan Plus Gerät und dazugehöriger BioLinx-Software gemessen.

Bezug über Flow Laboratories (Meckenheim)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Die transfizierten Zellen wurden bei den gleichen Bedingungen in Selektionsmedium kultiviert. Dieses wurde aus DMEM mit 10% inaktiviertem FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin und mit Zusatz von Puromycin (2 µg/ml), entsprechend des mit dem Plasmid transfizierten Resistenzgens für Puromycin, hergestellt.

Das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen erfolgte nach Waschen des Zellrasens mit PBS, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 2 min. Die gelösten Zellen konnten dann in neuem Medium aufgenommen werden.

2.2.2 Produktion von CD95L

Der CD95L enthaltende Zellüberstand wurde von N2A-Zellen gewonnen, die mit einem BCMGS-Expressionsplasmid, das für den murinen CD95-Ligand und ein Neomycin-Resistenzgen kodiert, transfiziert wurden (Rensing-Ehl et al. 1995). Als Kontrolle wurde Überstand aus N2A-Zellen gewonnen, die mit einem nur für das Neomycin-Resistenzgen kodierenden Plasmid ohne CD95L-Insert transfiziert wurden („neo“-Überstand). Die N2A-Zellen wurden im Vollmedium unter Zusatz von 250 µl/ml G418 kultiviert und waren im Labor vorhanden.

Die Herstellung des Überstands erfolgte durch eine 24-stündige Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium ohne G418. Die anschließenden Arbeitsgänge wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt: Der Zellüberstand wurde aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und bei 1700 U/min 10 min. zentrifugiert. Hieraus wurden nur die Überstände gesammelt. Dies war nötig, um eventuell vom Zellrasen gelöste und jetzt im Überstand befindliche Zellen abzuzentrifugieren. Die gesammelten Überstände wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Bestimmung der Aktivität des CD95L

Die Aktivität des CD95L-Überstands wurde anhand seiner zytotoxischen Wirkung auf die für CD95L sehr empfindliche Zelllinie LN-18 bestimmt.

Hierfür wurden 10^4 Zellen pro well in eine 96-well-Platte ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und CD95L- bzw. „neo“-Überstand in Verdünnungsreihen, zum Beispiel von unverdünnt bis 1:1024, mit serumfreiem Medium aufpipettiert.

Nach 24 h Inkubation wurde der Anteil der überlebenden Zellen mit einer Kristallviolett-Färbung anhand eines Fotometers in Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Zeigte der „neo“-Überstand auf die Zellen keine Wirkung, wurde über eine Konzentrations-Wirkungskurve des CD95-Liganden dessen IC_{50} -Wert ermittelt. Dabei wurde eine Unit als die Aktivität in 100 µl Überstand definiert, die benötigt wird, um 50% der LN-18-Zellen während einer 24-stündigen Inkubation zu töten.

2.2.4 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der CD95-Expression

Nach dem Abpipettieren des Mediums von den Gliomzellen wurden diese mit 4°C kaltem PBS gespült, um sie anschließend für einige Sekunden mit Trypsin zu behandeln. Das Trypsin wurde dann abpipettiert und die Zellen für ca. 3-4 min. bei

37°C inkubiert. Durch kräftiges Abspülen mit der Pipette wurden die Zellen in Vollmedium resuspendiert. Die einzelnen Ansätze wurden in 5 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min. bei 1000 U/min. und 4°C zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abpipettiert und die Zellen (ca. $10^6/150 \mu\text{l}$) wurden dann in 150 μl FACS-Puffer (1% BSA, PBS, 0,01% Natriumazid) resuspendiert. Zur Markierung wurden 2 μl FITC-UB2 anti-CD95 Antikörper oder als Isotypkontrolle 2 μl FITC-Maus IgG1 hinzugefügt und über 30 min. bei 4°C inkubiert. Der SFI-Wert wurde als Quotient aus dem Fluoreszenzmittelwert für den spezifischen CD95-Antikörper und dem Wert der Isokontrolle gebildet.

2.2.5 Zytotoxizitätsassay mit Kristallviolett färbung

Anhand der Kristallviolett färbung können überlebende Zellen nach Behandlung bestimmt werden. Kristallviolett wird nur von lebenden, adhären Zellen aufgenommen. Tote, nicht adhären Zellen werden nach der Färbung mit der übrigen Kristallviolettlösung abgekippt. In den Vertiefungen der Platte bleiben nach gründlichem, jedoch vorsichtigem Waschen nur die angefärbten, adhären Zellen zurück.

Für die Assays wurden auf 96-well-Platten 10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach einer Anwuchszeit von 24 h wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde die für das Experiment vorgesehene, in serumfreiem Medium gelöste Substanz aufgebracht und die Zellen für den im Experiment vorgesehenen Zeitraum inkubiert. Die Platte war so aufgeteilt, dass jedes Einzelexperiment, bzw. jede Verdünnungsreihe zumindest als Triplet-Ansatz durchgeführt wurde. Nach Ablauf der Inkubationzeit wurde der Zellüberstand abgekippt und in jede Vertiefung 50 μl Kristallviolettlösung pipettiert und hiermit bei Raumtemperatur für 15 min. inkubiert. Danach wurde die Kristallviolettlösung abgegossen, die Platten gründlich mit Wasser gewaschen und für 24 h an Raumluft getrocknet. Vor der Messung im Fotometer wurden die Zellen zur gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes in 50 μl Natriumzitat gelöst und dann bei 550 nm der Extinktionswert bestimmt.

Als Leerwert dienten in Natriumzitat gelöste ungefärbte Zellen, dieser wurde vom Extinktionswert subtrahiert. Der Extinktionwert ist hierbei proportional zur Anzahl der gefärbten Zellen.

2.2.6 Bestimmung des Glutathion-Gehaltes

Die Messung des Glutathion-Gehalts erfolgte enzymatisch. Die hier durchgeführten Messungen erfolgten anhand eines modifizierten Protokolls von Baker (1990). Die Methode wurde erstmals von Owens und Belcher (1965) beschrieben.

Die Zellen wurden in Vollmedium auf 6-well-Platten ausgesät und konnten über einen Zeitraum von 12 h anwachsen. Dann wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes BSO in der vorgesehenen Konzentration hinzugefügt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Medium mit dem darin gelösten BSO abgesaugt und die Zellen zweimal mit 4°C temperiertem PBS gewaschen. Zur Zersetzung der Makromoleküle der Zellen wurden die Zellen in jeder Vertiefung mit 400 µl 1% SSA über 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Platten gelöst, in Eppendorf-Cups pipettiert, bei 13000 U/min. und 4°C für 10 min. zentrifugiert und bei -24°C konserviert und später gemessen. Die Bestimmung des Glutathion erfolgte aus dem Überstand. Der Proteingehalt wurde an im gleichen Untersuchungsgang mitgeführten, jedoch nicht mit SSA behandelten Kontrollen, quantitativ nach der BioRad-Methode bestimmt.

Glutathion-Messung:

Auf einer 96-well-Platte wurden pro Vertiefung 90 µl bidestilliertes Wasser aufgebracht und 10 µl Probe, bzw. 10 µl Standard dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde hergestellt und unmittelbar im Anschluss ebenfalls in die Vertiefungen pipettiert. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader, gemessen bei 405 nm alle 15 s. Es wurden zehn Messungen durchgeführt.

2.3 Statistische Auswertung

Die durchgeführten Versuche wurden zumindest dreimal wiederholt. Aus den Daten wurden Mittelwerte gebildet, auf deren Basis die graphischen Darstellungen produziert wurden. Um einen Eindruck von der Reproduzierbarkeit der Daten zu vermitteln, wurden Standardabweichungen berechnet. Ausgehend von einer Normalverteilung der Daten wurde die Signifikanz mittels des t-Tests bestimmt. Für die Auswertung der hier gezeigten Daten wurde folgende Software benutzt: Excel 8.0 (Microsoft), Biolinx 2.21 (MRX Dynatech Laboratories) und CellQuest-Software (Becton & Dickinson).

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von BSO auf den Glutathion-Gehalt und die Zytotoxizität von Treosulfan bei 12 malignen Gliomzelllinien

3.1.1 Auswirkung der Behandlung mit BSO auf das Überleben 12 maligner Gliomzelllinien

In diesem Versuch wurde geprüft, ob die Behandlung mit BSO Auswirkungen auf die Zellüberlebensrate hat, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass der Effekt von BSO auf das Zellwachstum sehr zelltypspezifisch ist und einzelne Zelllinien unterschiedlich auf eine Behandlung mit BSO reagieren (Kang und Enger 1992). BSO hatte bei keiner der untersuchten Zelllinien einen wesentlichen Einfluss auf die Überlebensrate (Abb. 3).

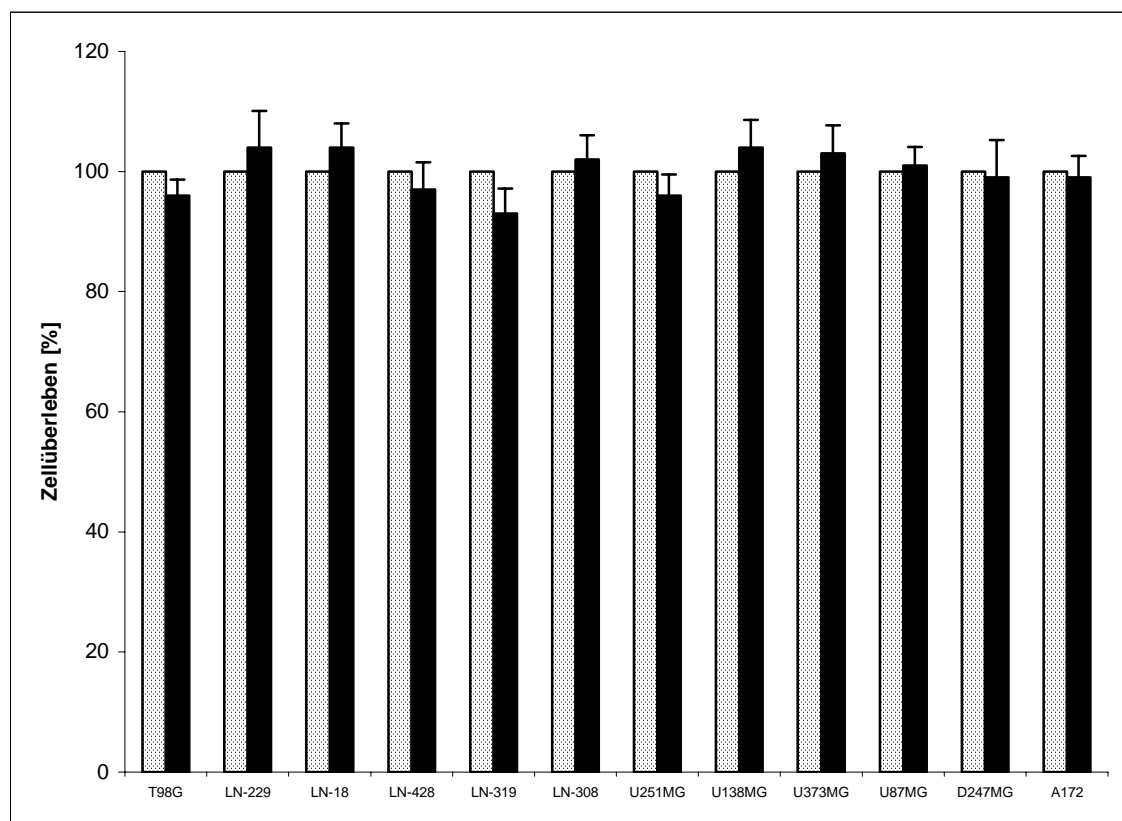


Abb. 3 zeigt die Wirkung von BSO anhand des Zellüberlebens in Prozent bei den humanen Gliomzelllinien T98G, LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG und A172. Die Zellen wurden für 39 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ mit jeweils 1 mM BSO behandelt (schwarze Säulen). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (graue Säulen). Der Einfluss von BSO auf die Überlebensrate wurde anhand einer Kristallviolett-färbung ermittelt. Dargestellt sind Daten von Triplikatexperimenten mit Standardabweichung (n=3).

3.1.2 Glutathion-Gehalt 12 maligner Gliomzelllinien nach Behandlung mit BSO

In diesem Experiment wurde untersucht, ob eine Behandlung mit BSO bei allen 12 Zelllinien zu einem Abfall des Glutathion-Gehaltes führt oder einzelne Zelllinien sich hier als resistent erweisen. Außerdem wurde dargestellt, wie stark die Verringerung des Glutathion-Gehaltes bei der einzelnen Zelllinie ausfällt.

Keine der untersuchten Zelllinien erwies sich als resistent gegenüber einem Abfall des Glutathion-Gehaltes. Alle Zelllinien zeigten eine konzentrationsabhängige Verminderung des Glutathion-Gehaltes durch BSO. Allerdings waren die EC_{50} -Werte von BSO bei den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich. Die BSO-Konzentrationen variierten von unter $0,1 \mu\text{M}$ für die am sensibelsten reagierende Zelllinie LN-308 bis zu $25 \mu\text{M}$ für die Zelllinie LN-229 (Tab. 1).

<u>Zelllinie</u>	<u>BSO EC_{50} (μM)</u>	<u>Zelllinie</u>	<u>BSO EC_{50} (μM)</u>
T98G	8	U251MG	9
LN-229	25	U138MG	< 0,5
LN-18	2,5	U373MG	1,5
LN-428	6	U87MG	10
LN-319	5	D247MG	1
LN-308	< 0,1	A172	3

Tab. 1 Die EC_{50} -Konzentrationen für BSO zeigen die für die Gliomzelllinien T98G, LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG und A172 benötigten Konzentrationen an, die zu einer Reduktion des Glutathion-Gehaltes auf 50% erforderlich waren. Die Zelllinien wurden für 15 h mit BSO in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ und 1mM behandelt und anschließend der Glutathion-Gehalt bestimmt. Die EC_{50} -Werte wurden mittels einer linearen Regressionsanalyse ermittelt.

3.1.3 Sensibilitätssteigernder Effekt von BSO für die Zytotoxizität von Treosulfan

Der folgende Versuch sollte für die 12 Zelllinien überprüfen, ob der für die Zelllinien T98G und LN-229 vorbeschriebene, sensibilitätsteigernde Effekt von BSO für Treosulfan (Reber et al. 1998) auf die unten dargestellten Zelllinien übertragbar ist oder sich

eine der untersuchten Zelllinien möglicherweise als resistent erweist. Die Zelllinien reagierten sowohl auf die Behandlung mit Treosulfan alleine als auch auf die BSO- Prä- und Koinkubation mit unterschiedlicher Sensibilitätssteigerung für die Zytotoxizität von Treosulfan. In den durchgeführten Zytotoxizitätsassays erwies sich keine der getesteten Zelllinien als resistent gegenüber einer Sensibilisierung durch BSO für Treosulfan (Abb. 4a und 4b). In Tab. 2 sind die hieraus ermittelten EC₅₀-Werte und der Grad der Sensibilisierung für Treosulfan dargestellt.

Zelllinie	EC ₅₀ Treosulfan (µM) ohne BSO	EC ₅₀ Treosulfan (µM) mit BSO	Grad der Sensibilisierung
T98G	500	125	4
LN-229	45	4	11
LN-18	>950	21	45
LN-428	375	9	42
LN-319	40	2	20
LN-308	475	18	27
U251MG	345	7	52
U138MG	950	40	24
U373MG	725	40	18
U87MG	350	10	35
D247MG	500	25	20
A172	190	4	47

Tab. 2 Die Zellen wurden entweder nicht oder mit BSO (1 mM) für 15 h vorbehandelt und anschließend für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Treosulfan (0,1; 1; 10; 100 µM) mit oder ohne Koinkubation mit BSO weiterbehandelt. Die EC₅₀-Werte für Treosulfan mit oder ohne Koinkubation mit BSO wurden anhand eines Kristallviolett-Assays und anschließender linearer Regressionsanalyse ermittelt. Der Grad der Sensibilisierung wurde aus den EC₅₀-Werten ohne Koinkubation mit BSO, dividiert durch die EC₅₀-Werte mit Koinkubation mit BSO ermittelt. Die Daten stammen aus drei von-einander unabhängigen Experimenten, die mittlere Standardabweichung lag unter 10%.

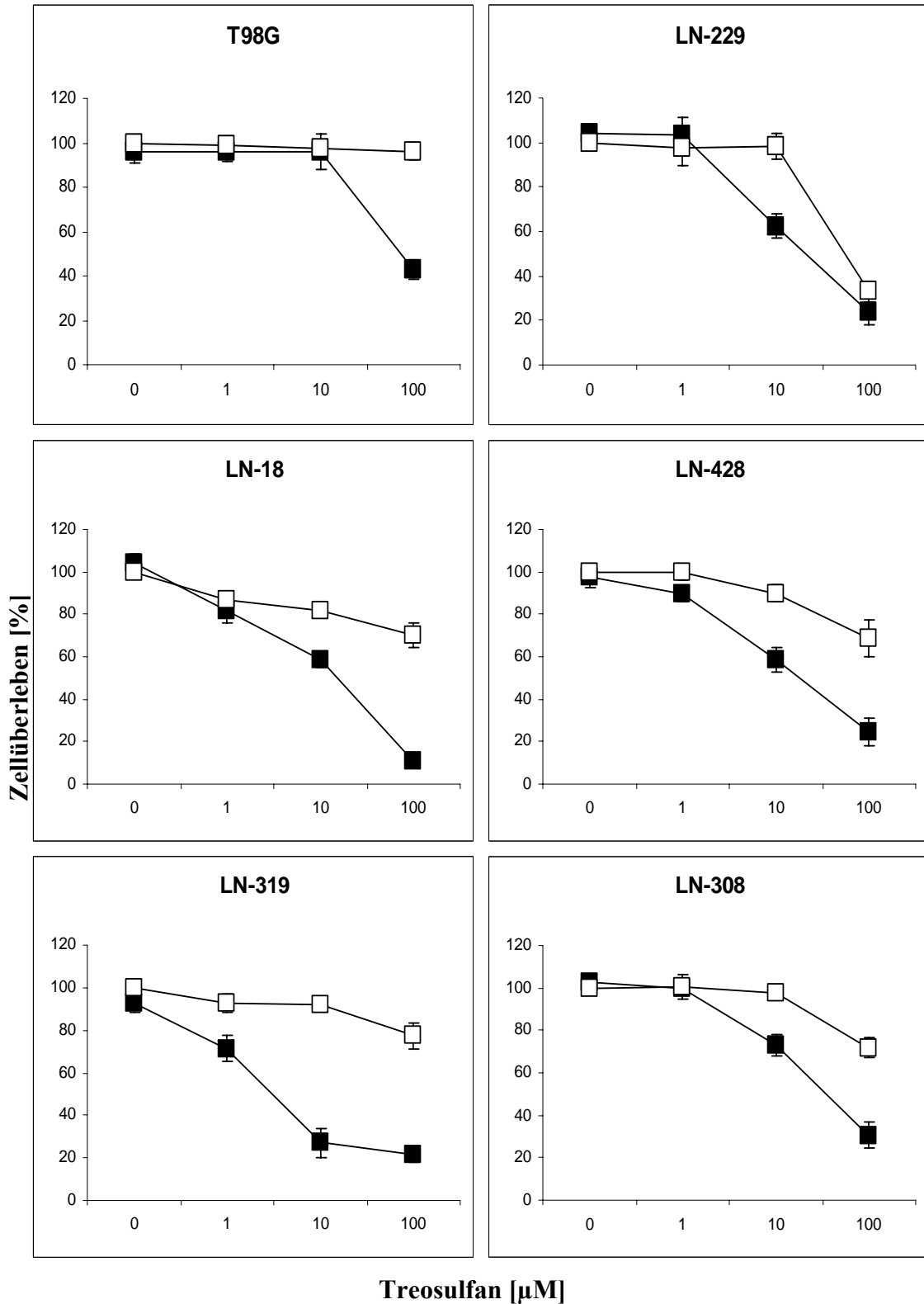


Abb. 4a

Abb. 4a und **4b** zeigen das Überleben der Gliomzelllinien T98G, LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG und A172. Die Zellen wurden entweder mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole) oder ohne BSO (offene Symbole) präinkubiert, und anschließend für 24 h mit Treosulfan in den Konzentrationen 1, 10 und 100 μM und mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole), oder

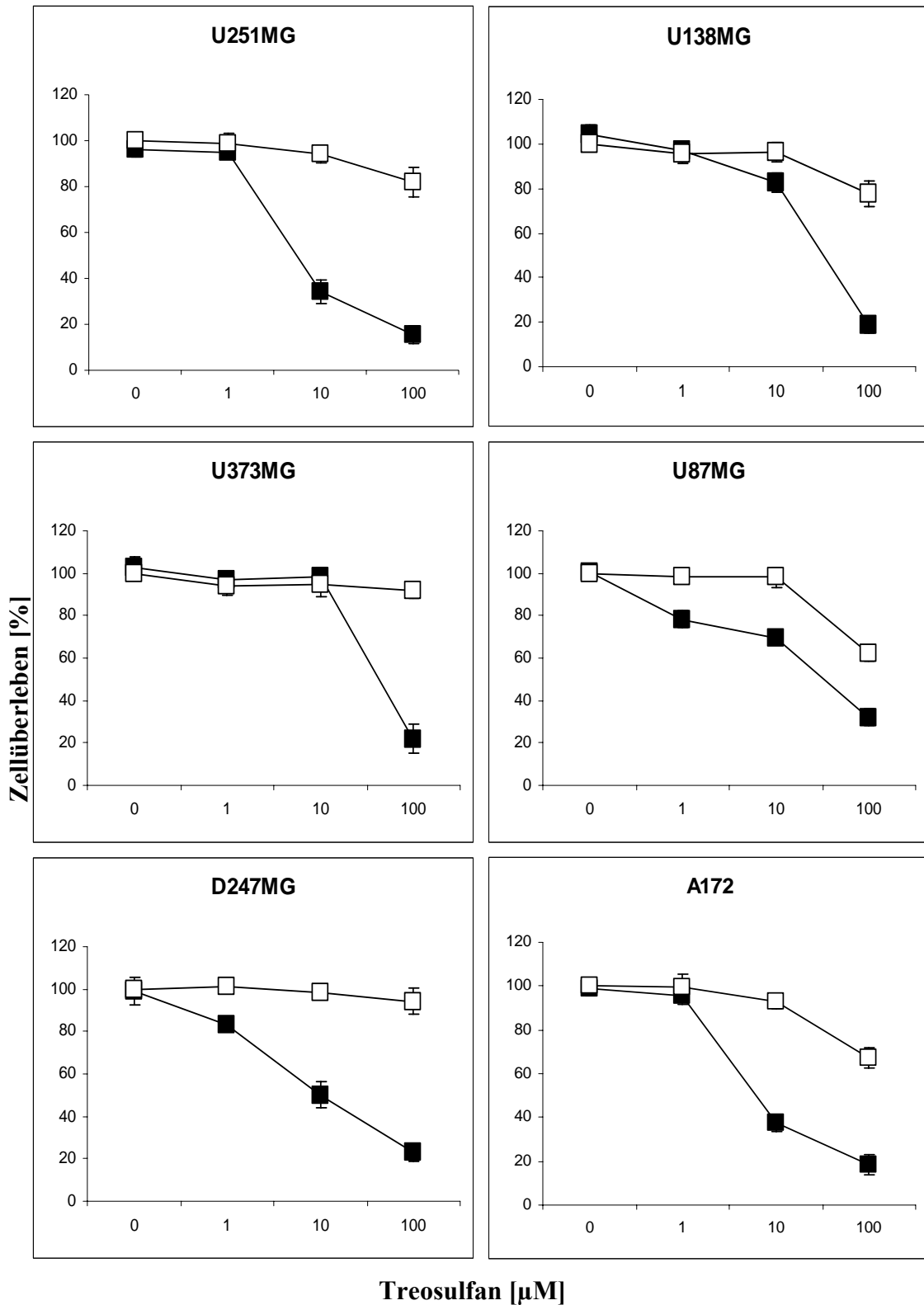


Abb. 4b

ohne BSO (offene Symbole) weiterbehandelt. Die Überlebensrate wurde direkt nach der Inkubationszeit anhand eines Kristallviolett-Assays ermittelt. Dargestellt sind Daten von Triplikatexperimenten, die zumindest dreimal wiederholt wurden. Gezeigt wird das mittlere Zellüberleben in Prozent mit Standardabweichung; diese war < 10%.

3.2 Untersuchung des Einflusses von BSO auf die CD95-vermittelte Apoptose

Es gibt zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen zellulärem Glutathion-Gehalt und CD95L- bzw. TNF- α -vermittelter Apoptose (Chiba et al. 1996, Delneste et al. 1996, Kohno et al. 1996, Watson et al. 1997). Die folgenden Untersuchungen sollten eine mögliche Beteiligung von CD95/CD95L-Interaktionen an der erhöhten Zytotoxizität von Treosulfan bei BSO-Behandlung klären. Im Einzelnen sollte auch untersucht werden, ob durch eine Glutathion-Depletion mittels BSO eine erhöhte Sensibilität maligner Gliomzellen gegenüber CD95L erreicht werden kann und ob dem eine erhöhte Expression von CD95 zugrunde liegt.

3.2.1 CD95-Expression bei humanen malignen Gliomzellen nach Behandlung mit BSO

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob maligne Gliomzellen bei Behandlung mit BSO die CD95-Expression regulieren. Hierzu wurden LN-229- und T98G-Zellen mit BSO in einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 0,1 μ M bis 1 mM über einen Zeitraum von 15 h behandelt. Die CD95-Expression wurde 15 h nach Behandlung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

In der Durchflusszytometrie zeigte weder die Zelllinie T98G noch die Zelllinie LN-229 nach Behandlung mit BSO eine veränderte Expression von CD95 (Tab. 3).

		CD95-Expression (SFI)					
BSO [μ M]		0	0,1	1	10	100	1000
T98G		1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
LN229		1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8

Tab. 3 SFI-Werte für die Expression von CD95 nach 15 h Behandlung mit BSO in einer logarithmischen Verdünnungsreihe. Die SFI-Werte wurden aus dem Verhältnis der Fluoreszenzmittelwerte von CD95-Antikörpern zu Kontrollantikörpern ermittelt.

Anschließend wurde für alle 12 Zelllinien die Expression von CD95 vor und nach 15 h Behandlung mit 1 mM BSO untersucht. Auch hier zeigte sich bei keiner der Zelllinien eine Veränderung der CD95-Expression (Tab. 4).

Zelllinie	CD95-Expression ohne BSO (SFI)	CD95-Expression mit BSO (SFI)
T98G	1,4	1,4
LN-229	1,8	1,8
LN18	1,8	1,8
LN-428	1,2	1,2
LN-319	1,8	1,8
LN-308	1,3	1,3
U251MG	1,8	1,8
U138MG	2,5	2,5
U373MG	2,0	2,0
U87MG	1,5	1,5
D247MG	1,5	1,5
A172	1,6	1,6

Tab. 4 CD95-Expression der Gliomzelllinien T98G, LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG und A172 in Form der SFI-Werte nach 15 h Behandlung ohne und mit 1 mM BSO.

3.2.2 Modulation CD95-vermittelter Apoptose nach Vorbehandlung mit BSO

In diesem Versuch wurde eruiert, ob eine Verminderung des Glutathion-Gehaltes durch BSO bei humanen malignen Gliomzellen zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber CD95L führt. Da einige Gliomzelllinien nur bei paralleler Inkubation mit CD95L und Cycloheximid (CHX) apoptotisch sterben (Weller et al. 1994), wurden die Experimente

mit und ohne CHX durchgeführt. Prä- und Koinkubation mit BSO zeigte bei keiner der behandelten Zelllinien eine signifikante Steigerung der Sensibilität gegenüber CD95L, unabhängig von der CHX-Behandlung (Tab. 5).

Zelllinie	Zellüberleben CD95L (%)	Zellüberleben CD95L+BSO (%)	Zellüberleben CD95L+CHX (%)	Zellüberleben CD95L+BSO +CHX (%)
T98G	30	32	28	32
LN-229	84	80	40	40
LN-18	13	19	28	25
LN-428	61	66	45	49
LN-319	97	92	74	70
LN-308	85	80	68	71
U251MG	68	75	42	38
U138MG	101	99	90	91
U373MG	100	101	100	100
U87MG	70	74	46	48
D247MG	75	84	82	82
A172	78	85	44	42

Tab. 5 Die Zellen wurden 15 h mit BSO (1 mM) präinkubiert oder ohne BSO unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde für 16 h mit CD95L (100 U/ml) alleine oder mit CHX (10 µg/ml) behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert (in %) von Triplikatexperimenten, die dreimal wiederholt wurden, die Standardabweichung lag unter 10%.

3.2.3 Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von TNF- α

In einer früheren Arbeit wurde die Resistenzüberwindung gegenüber TNF- α -vermittelter Apoptose bei humanen Nieren- und Ovarialkarzinomzellen durch eine Kombinationsbehandlung mit TNF- α und BSO beschrieben (Mizutani und Yoshida 1994). Um zu prüfen, ob dies für TNF- α -resistente, maligne Gliomzellen (Weller et al. 1994) möglich ist, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie unter 3.2.2 gewählt. LN-229-, LN-308-, U87MG- und T98G-Zellen wurden nach Prä- und Koinkubation mit BSO mit TNF- α behandelt. Der Versuch wurde mit oder ohne Zusatz von CHX durchgeführt. Die Resistenz gegenüber TNF- α wurde durch BSO nicht überwunden. Die Sensibilisierung der Zelllinien durch CHX für TNF- α -vermittelte Apoptose, wie von Weller et al. (1994) gezeigt, blieb durch die Anwesenheit von BSO unbeeinflusst (Abb. 5).

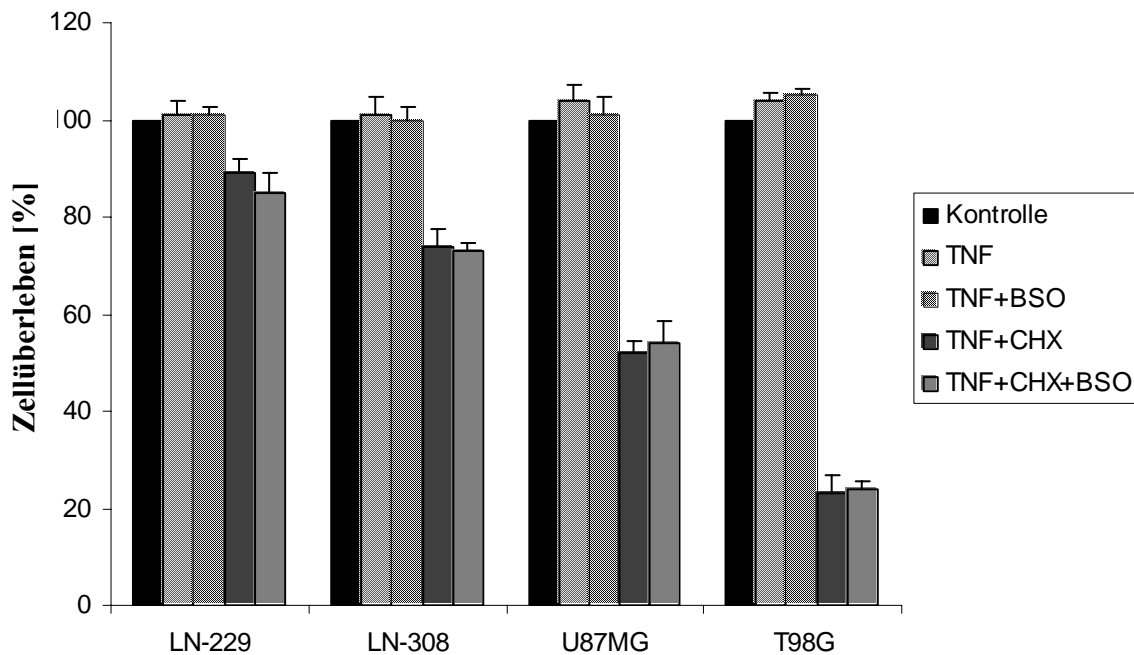


Abb. 5 Zellüberlebensrate der Zelllinien LN-229, LN-308, U87MG und T98G. Die Zellen wurden mit BSO (1 mM) präinkubiert (15 h) oder nicht, und anschließend mit TNF- α (10 ng/ml) und CHX (10 μ g/ml) inkubiert (24 h). Dargestellt ist das mittlere Überleben in Prozent mit Standardabweichung aus Triplikatexperimenten, die dreimal wiederholt wurden.

3.3 Interaktionen von CD95/CD95L-System und Treosulfan

In diesem Teil der Arbeit wurden mögliche Interaktionen und Zusammenhänge zwischen CD95-vermittelter Apoptose und der Zytotoxizität von Treosulfan untersucht.

3.3.1 Einfluss von CD95L auf den Glutathion-Gehalt maligner Gliomzellen

Wie für Leukämie- und T-Zellen beschrieben (Efferth et al. 1996, van den Dobbelsteen et al. 1997), wurde in diesem Experiment der Einfluss von CD95L auf den Glutathion-Gehalt von malignen Gliomzellen anhand der Zelllinien LN-229, T98G, LN-308 und U87MG analysiert. Keine der Zelllinien antwortete mit einem signifikanten Verlust von Glutathion auf die Vorbehandlung mit CD95L.

Zelllinie	Glutathion-Gehalt (nmol/mg Protein)			
	Kontrolle	CD95L 10 U/ml	CD95L 100 U/ml	BSO 1 mM
LN-229	34,7	29,3	31,2	7,6
LN-308	5,0	4,2	4,5	0,2
U87MG	20,7	16,9	18,0	2,3
T98G	69,1	62,0	66,4	21,6

Tab. 6 zeigt den Glutathion-Gehalt der Zelllinien LN-229, LN-308, U87MG und T98G nach einer Inkubation mit CD95L für 16 h. Für CD95L wurden die Konzentrationen 10 und 100 U/ml gewählt. Als Positivkontrollen galten die Werte des Glutathion-Gehaltes der Zelllinien nach Behandlung mit 1 mM BSO. Standardabweichung < 10%.

3.3.2 Sensibilität maligner Gliomzellen gegenüber Treosulfan nach Vorbehandlung mit CD95L

Ergänzend zu dem unter 3.3.1 beschriebenen Experiment, in dem kein Effekt von CD95L auf den Glutathion-Gehalt der Zelllinien LN-229 und T98G nachgewiesen wurde, sollte hier die Frage geklärt werden, ob durch eine Vorbehandlung mit CD95L die Zytotoxizität für Treosulfan dennoch gesteigert werden kann.

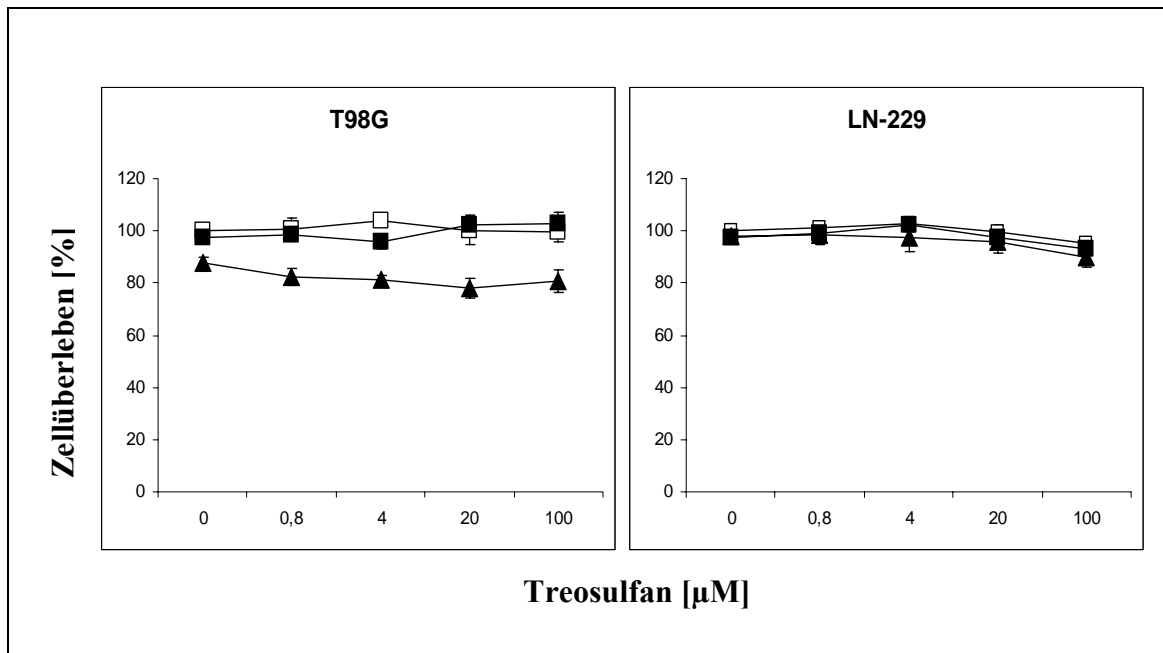


Abb. 6 Zellüberleben als Mittelwert in % der Zelllinien LN-229 und T98G für die Behandlung mit 0; 0,8; 4; 20 und 100 µM Treosulfan. Die Zellen wurden entweder ohne (offene Quadrate), mit 10 U/ml (geschlossene Quadrate) oder 100 U/ml (geschlossene Dreiecke) CD95L für 16 h vorbehandelt (n = 3).

3.3.3 Effekte einer gleichzeitigen Behandlung maligner Gliomzellen mit Treosulfan und CD95L

Unter 3.2.1 wurde für die Zelllinien T98G und LN-229 demonstriert, dass eine Präinkubation mit CD95L weder zum Absinken der Glutathion-Spiegel noch zu einer gesteigerten Sensibilität für Treosulfan führt. Für Leukämiezellen wurde gezeigt, dass eine Koinkubation mit CD95L und verschiedener Chemotherapeutika nur additive Effekte auf die Zytotoxizität hatte (Efferth et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde in dem unter Abb. 7 dargestellten Experiment die Wirkung einer Koinkubation maligner Gliomzellen mit CD95L und Treosulfan mit und ohne BSO untersucht.

Bei den untersuchten Zelllinien zeigten sich ebenfalls nur additive Effekte der Zytotoxizität (Abb. 7).

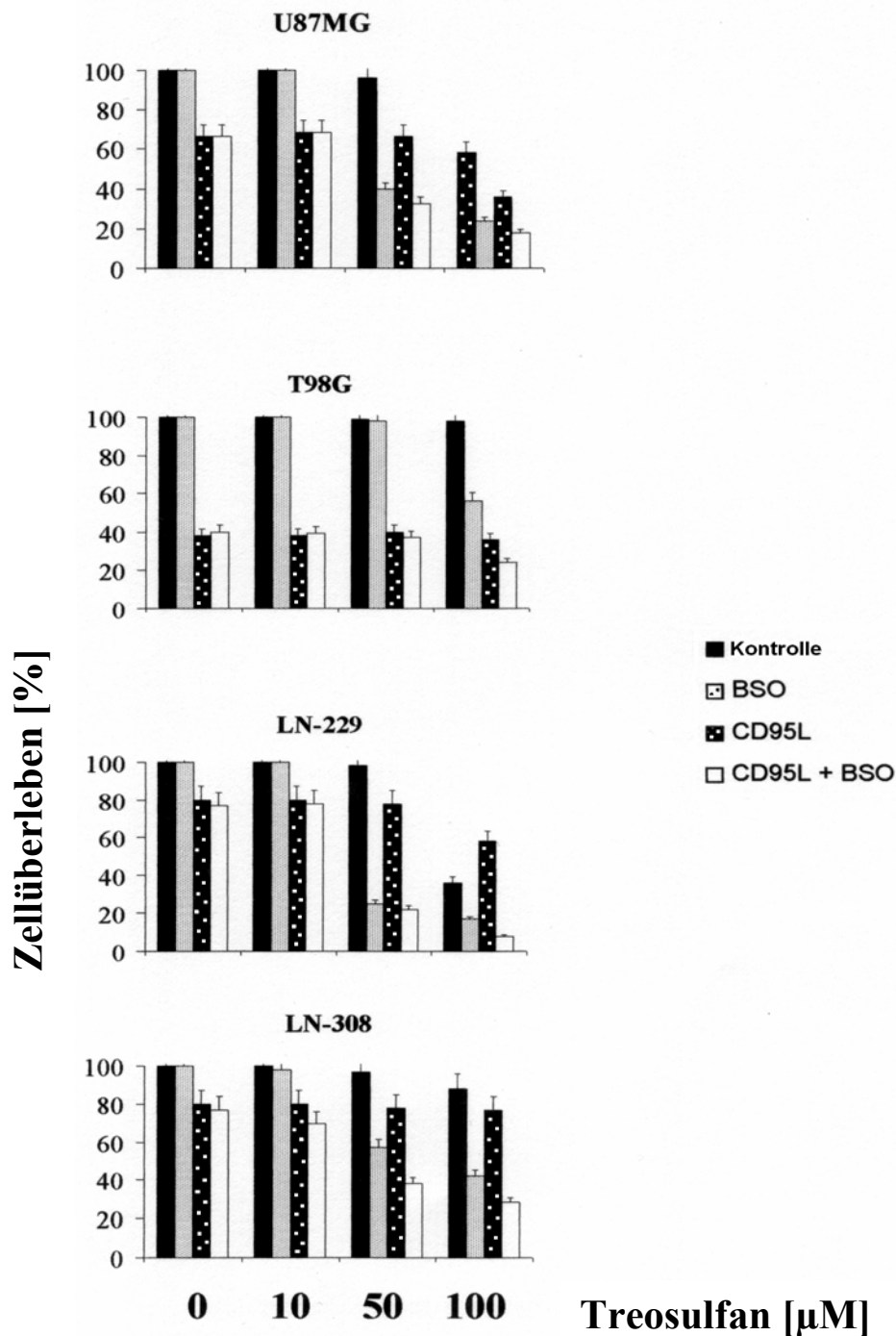


Abb. 7 Die Zelllinien U87MG, T98G, LN-229 und LN-308 wurden entweder ohne (schwarze Säulen) oder mit (weiße Säulen mit schwarzen Punkten) 1 mM BSO für 15 h prä- und anschließend mit 0, 10, 50 und 100 μ M Treosulfan koinkubiert. Dies geschah entweder mit (schwarze Säulen mit weißen Punkten) oder ohne (weiße Säulen) Zugabe von 100 U/ml CD95L. Es zeigten sich keine synergistischen Effekte zwischen BSO und CD95L-vermittelter Apoptose oder BSO und Treosulfan. Die Schaubilder zeigen Daten als mittlere Prozentangabe des Zellüberlebens mit Standardabweichung (n=3).

3.3.4 Zytotoxizität von Treosulfan nach Vorbehandlung mit BSO bei crm-A-transfizierten malignen Gliomzellen

Hier wurde die Unabhängigkeit der durch BSO gesteigerten Zytotoxizität von Treosulfan vom CD95/CD95L-System überprüft. crm-A-transfizierte Zelllinien LN-229 und LN-18 wurden mit Treosulfan behandelt. crm-A ist ein Serpin des Cowpox-Virus und ein natürlich vorkommender irreversibler Caspase-Inhibitor. Es kann durch Hemmung der Caspase 1 und Caspase 8 TNF- und CD95L-induzierte Apoptose verhindern (Talley et al. 1995, Tewari et al. 1995, Zhou et al. 1997, Wagenknecht et al. 1998).

Die Zellen wurden entweder ohne oder mit BSO vor- und koinkubiert. Auch bei den mit crm-A transfizierten Zellen wurde durch eine Vorbehandlung mit BSO eine erhöhte Zytotoxizität von Treosulfan erreicht. Als Kontrolle dienten nicht mit crm-A transfizierte Zellen („puro“) (Abb. 8).

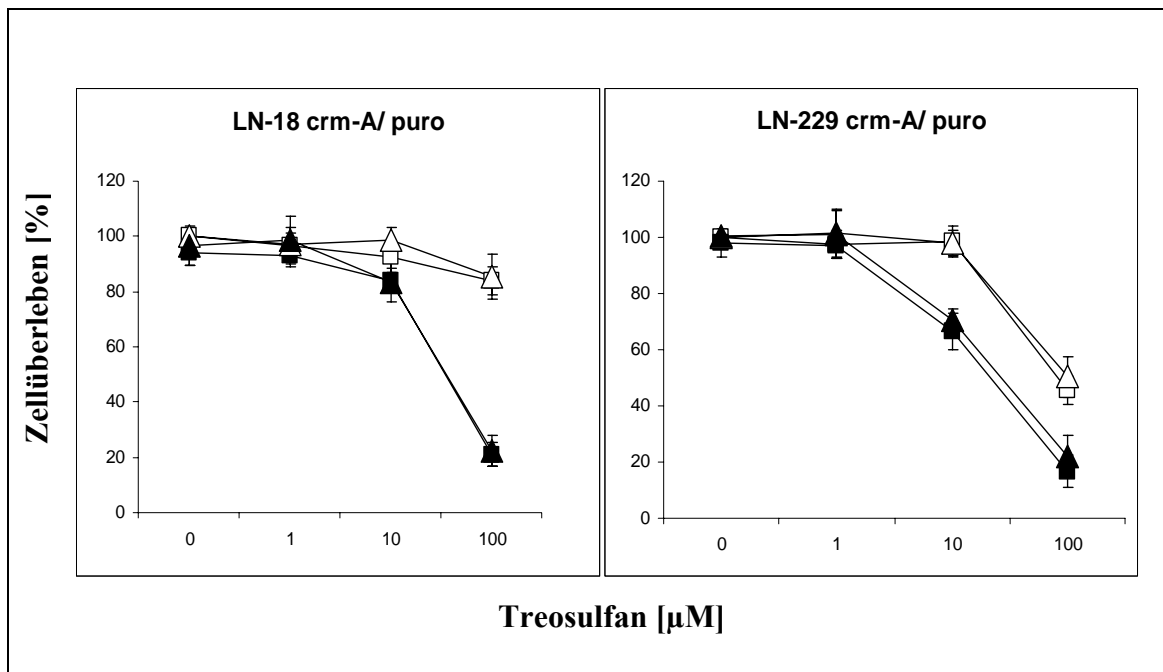


Abb. 8 Zellüberleben der crm-A-Transfektanten (Rechtecke) und der puro-Kontrollen (Dreiecke) der Gliomzelllinien LN-18 und LN-229. Die Zellen wurden entweder mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole) oder ohne BSO (offene Symbole) präinkubiert, und anschließend für 24 h mit Treosulfan in den Konzentrationen 1, 10 und 100 μM mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole) oder ohne BSO (offene Symbole) weiterbehandelt. Gezeigt wird das mittlere Überleben in Prozent mit Standardabweichung. Die Überlebensrate wurde direkt nach der Inkubationszeit anhand einer Kristallviolett-färbung und eines Fotometers ermittelt. Dargestellt sind Daten von Triplikatexperimenten, die zumindest dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurden.

3.4 Effekte von BSO auf die Zytotoxizität von Treosulfan bei der Rattengliomzelllinie C6 *in vitro* und *in vivo*

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob BSO auch *in vivo* für Treosulfan sensibilisiert. Es wurden intrakraniell transplantable C6-Rattengliomzellen in Sprague-Dalway Ratten eingesetzt. Vor der *in vivo* Untersuchung wurden die Zellen *in vitro* untersucht. Auch für C6-Rattengliomzellen wurde eine gesteigerte Zytotoxizität bei Prä- und Koinkubation mit BSO gezeigt.

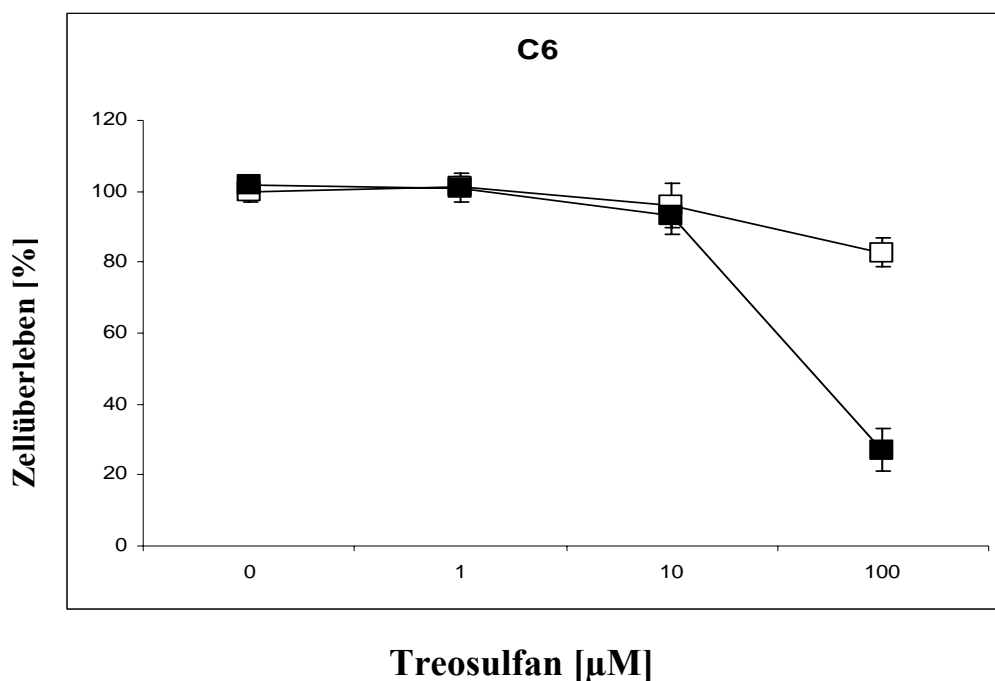


Abb. 9 Zellüberleben der Rattengliomzelllinie C6, die entweder mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole) oder ohne BSO (offene Symbole) präinkubiert, und anschließend für 24 h mit Treosulfan in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM mit 1 mM BSO (geschlossene Symbole) oder ohne BSO (offene Symbole) weiterbehandelt wurden. Die Überlebensrate wurde direkt nach der Inkubationszeit mit einem Kristallviolett-Assay ermittelt. Dargestellt sind Daten von Triplikatexperimenten, die zumindest dreimal wiederholt wurden. Gezeigt wird das mittlere Überleben in Prozent mit Standardabweichung, diese war < 10 %.

Ergänzend, zu den von mir im Rahmen der Dissertation erhobenen Befunde, wurde im Tiermodell die synergistische Antitumorwirkung einer Kombinationsbehandlung von BSO und Treosulfan an einem Ratten-C6-Gliom-Modell gezeigt. Durch Treosulfan

wurde eine Reduktion des Tumolvolumens von 18% gegenüber den Kontrollen induziert. Durch eine Kombinationsbehandlung mit Treosulfan und BSO wurde eine Reduktion des mittleren Tumolvolumens von 59% erzielt, BSO alleine zeigte keinen signifikanten Effekt (Abb. 10, Wick et al. 2002b). Treosulfan und BSO führten zu keiner verstärkten Toxizität bzw. Nebenwirkung verglichen mit der alleinigen Gabe von Treosulfan. Die Hauptnebenwirkung war eine Granulozytopenie, die aber bei keinem Tier zum Tode führte.

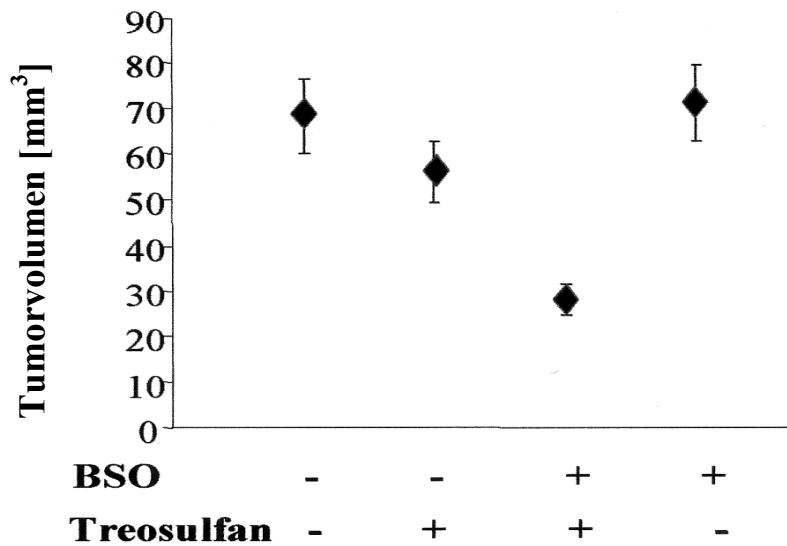


Abb. 10 Tumolvolumina in mm³ bei Sprague Dawley-Ratten nach Behandlung mit BSO, Treosulfan oder der Kombination beider Substanzen. Den Tieren wurden an Tag 1 stereotaktisch 10⁴ Zellen der Rattengliomzelllinie C6 implantiert. Die Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt, an Tag 8 wurde mit H₂O und/oder BSO und/oder Treosulfan behandelt (Tag 1: Tumorimplantation, Tag 8: H₂O oder BSO (150 mg/kg KG 5x alle 12 h, Tag 10 H₂O oder Treosulfan (2,5 mg/kg KG), Tag 10 H₂O oder BSO (150 mg/kg KG). Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardfehler von 6 Tieren pro Gruppe (Wick et al. 2002b).

4. Diskussion

Die Behandlung von Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen ist eines der herausforderndsten Felder der Onkologie. Jedoch wurden in vergangener Zeit kaum Fortschritte bei der Behandlung durch Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie erzielt. Um diese unbefriedigende Situation zu ändern, werden in präklinischer Forschung neue Therapieformen wie zum Beispiel Immuntherapie, Gentherapie und neue Zytostatika auf ihre Wirksamkeit untersucht (Roth und Weller 1999, Andratscke et al. 2001, Steinbach und Weller 2002).

Zwei wesentliche Bedingungen beeinflussen die Antwort maligner Zellen auf eine Chemotherapie: erstens der Anteil an intrazellulär vorhandener, zytotoxisch aktiver Substanz, zweitens deren Verweildauer in der zu tötenden Zelle.

Beeinflussende Faktoren können abhängig von ihrer Lokalisation und ihrem Mechanismus vornehmlich in zwei unterschiedliche Bereiche gliedert werden. Es handelt sich um extrinsische Faktoren (1.2.1) oder um auf subzellulärer Ebene angesiedelte Mechanismen, die als intrinsische Faktoren (1.2.2) bezeichnet werden können. Zu den intrinsischen Faktoren gehören auch zytoprotektive bzw. zytostatika-inaktivierende Enzymsysteme, die zu Zytostatikaresistenz verschiedener solider Tumorarten, inklusive maligner Gliome einen entscheidenden Beitrag leisten können.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die Rolle des Glutathion-Systems und dessen Aktivitätsstatus von großem Interesse.

Die Entdeckung eines erhöhten Glutathion-Gehaltes in zytostatikaresistenten Tumorzelllinien ließ vermuten, dass Glutathion eine wichtige Rolle bei Resistenzen gegenüber Chemotherapie spielt (Begleiter et al. 1983, Suzukake et al. 1983). Deshalb wird das Glutathion-System als mögliches Ziel bei der Überwindung von Chemoresistenz in der Tumorthherapie betrachtet (Arrick und Nathan 1984, Black und Wolf 1991).

BSO ist die wirksamste Substanz aus der Gruppe der Methionin-Sulfoximin-Analoga und hemmt in dieser Form den ersten Schritt der *de novo*-Synthese von Glutathion durch spezifische Hemmung der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase. Diese irreversible Hemmung des limitierenden Schrittes der Glutathion-Biosynthese ist *in vitro* und *in vivo* möglich (Griffith und Meister 1979). Für eine durch BSO verursachte Verminderung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes wurde bereits an Nacktmäusen

ein verbessertes Ansprechen für Melphalan bei xenotransplantierten humanen Gliomen gezeigt und in klinischen Phase I-Studien wurde die Durchführbarkeit einer kombinierten Behandlung von Tumorpatienten mit BSO und Melphalan demonstriert (Friedman et al. 1989, O'Dwyer et al. 1992, Baily et al. 1997).

Dennoch haben BSO und andere Substanzen zur Verminderung des zellulären Glutathion-Gehaltes bisher keine Bedeutung bei der Behandlung maligner Gliome erlangt.

Treosulfan zeigt gegen eine große Anzahl verschiedener solider Tumoren und humaner Tumorxenotransplantate unterschiedlichster Herkunft Wirksamkeit (Feit et al. 1970, Wilson und Neal 1981, Kopf-Maier und Sass 1996). In der Klinik wird Treosulfan bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen als *second line*-Therapie angewendet. Es zeichnet sich durch eine sehr gute Verträglichkeit und ein günstiges Nebenwirkungsprofil aus (Gropp et al. 1998, Breitbach et al. 2002). Untersuchungen bei Glioblastomen, im Rezidiv oder neoadjuvant in Kombination mit Gemcitabin, zeigten mäßige Effekte (Schmidt et al. 2000, Wick et al. 2002a).

Die vorgelegte Arbeit baut auf der Beobachtung einer durch BSO vermittelten, für Treosulfan spezifischen Steigerung der Zytotoxizität an den Glioblastomzelllinien T98G und LN-229 auf (Reber et al. 1998).

Momentan ist noch unklar wie BSO die Sensitivität maligner Gliomzellen für Treosulfan erhöht. Weder eine vermehrte Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies noch Proteine der Bcl-2-Familie haben entscheidenden Einfluss auf den synergistischen Effekt von BSO und Treosulfan (Reber et al. 1998, Wick et al. 2002b). Eine mögliche Erklärung für die synergistische Wirkung ist die Fähigkeit von Glutathion alkylierende Substanzen zu entgiften. Treosulfan erreicht seine Wirkung in Form alkylierender Mono- und Diepoxide (Ashby 1993). Denkbar ist eine Beteiligung von Glutathion beim Treosulfantransport aus der Zelle. Für Methotrexat wurde ein Transport durch Glutathion nach intra- und extrazellulär bereits beschrieben (Arrick und Nathan 1984). Möglich ist auch eine Beeinflussung der DNA-Interkalation oder eine Beeinträchtigung der Reparatur von DNA-Schäden, da Glutathion eine Rolle bei der DNA-Replikation (Hickson und Harris 1988) und der DNA-Reperatur (Sancar und Sancar 1988) zugesprochen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geklärt, ob sich der zytotoxizitätssteigernde Effekt von Treosulfan durch BSO auch bei zehn weiteren humanen Gliomzelllinien nachweisen lässt. In dem unter 3.1.2 dargestellten Experiment zeigte sich keine der

Zelllinien resistent gegenüber einer Glutathion-Depletion durch BSO. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren allerdings bei den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich. Sie reichten von unter $0,1 \mu\text{M}$ für LN-308 bis zu $25 \mu\text{M}$ für die Zelllinie LN-229 (Tab.1). Einige Autoren berichten von einem für die BSO-Behandlung unempfindlichen Glutathion-Kompartiment (Ali-Osman et al. 1996). Der mitochondriale (Shertzer et al. 1994) und der nukleäre Glutathion-Gehalt sollen BSO-unempfindlich sein (Jevtovic-Todorovic und Günther 1992). Zudem wurde von einem Austausch zwischen nukleärem und zytosolischem Glutathion berichtet (Briviba et al. 1993), so dass die einzelnen Glutathion-Kompartimente nicht völlig unabhängig voneinander zu sein scheinen. Der möglicherweise bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Austausch von Glutathion zwischen diesen Kompartimenten könnte eine Erklärung für die beobachtete, zelltypspezifische Absenkung des Glutathion-Gehaltes sein. BSO alleine hatte bei keiner der zwölf untersuchten Zelllinien Einfluss auf das Zellüberleben (Abb. 3). Dies steht in Einklang mit Beobachtungen von Kang und Enger (1992) und Reber et al. (1998).

Für jede der 12 Zelllinien konnte konzentrationsabhängig ein synergistischer Effekt der durch BSO vermittelten Zytotoxizität von Treosulfan nachgewiesen werden (Abb. 4a und 4b). Auch hier zeigten die einzelnen Zelllinien erhebliche Unterschiede der EC_{50} -Werte von Treosulfan, sowohl mit als auch ohne BSO. Eine Korrelation zwischen der Sensibilität für die Glutathion-Depletion und dem Grad der Sensibilisierung für die zytotoxische Wirkung von Treosulfan ließ sich jedoch nicht erkennen (Tab. 2). Dies könnte auf andere, zusätzliche Mechanismen neben der Glutathion-Depletion hinweisen, die zu einer gesteigerten Zytotoxizität von Treosulfan führen.

Für Zellen nicht-gliale Ursprungs wurde in mehreren Arbeiten ein Einfluss von BSO auf CD95L- und TNF- α vermittelte Apoptose beobachtet (Zimmermann et al. 1989, Mizutani und Yoshida 1994, Cossarizza et al. 1995). Für leukämische T-Zellen wurde bereits gezeigt, dass diese durch eine Behandlung mit BSO für CD95L-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden (Kohno et al. 1996). Umgekehrt konnte ein erhöhter Glutathion-Gehalt CD95-vermittelte Apoptose bei humanen neutrophilen Granulozyten stark vermindern (Watson et al. 1997) oder bei humanen Monozyten sogar blockieren (Um et al. 1996). Mizutani und Yoshida (1994) zeigten bei humanen Nieren- und Ovarialkarzinomzellen eine Überwindung der Resistenz gegen TNF- α durch eine Kombinationsbehandlung mit TNF- α und BSO. Zudem wurde eine reduzierte CD95-

Expression bei T-Zellen durch Behandlung mit dem Glutathion-Vorläufermolekül N-Acetylcystein gezeigt (Delneste et al. 1996).

Widersprüchliche Literaturangaben zu anderen Zytostatika führten zur Frage einer direkten Beteiligung oder möglichen Interaktionen des CD95/CD95L-Systems bei der durch BSO gesteigerten Zytotoxizität von Tressulfan. Im ersten Versuch unter 3.2.2 wurden die Zelllinien U87MG, T98G, LN-229 und LN-308 mit BSO prä- und koinkubiert und einer direkten Behandlung mit CD95L ausgesetzt. Im zweiten Experiment wurden die Zellen anstatt mit CD95L mit TNF- α behandelt. In der Auswertung zeigte keine der behandelten Zelllinien eine signifikante Steigerung der Sensibilität für CD95L- (Tab. 5) oder TNF- α -vermittelte Zytotoxizität (Abb. 5). Dies steht im Gegensatz zu oben aufgeführter Literatur und einer Arbeit von Chiba et al. (1996), die zeigte, dass bei CD95 exprimierenden, aber gegenüber CD95L-vermittelter Apoptose resistenten, humanen T-Zellen eine Verringerung des Glutathion-Gehaltes durch BSO zu einer Überwindung der Resistenz führte. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden diese beiden Experimente unter gleichen Bedingungen und zusätzlicher Koinkubation mit CHX durchgeführt. CHX ist ein Proteinsynthese-Inhibitor, der maligne Gliomzellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sensibilisiert (Weller et al. 1994). Auch mit CHX hatte die Glutathion-Depletion durch BSO keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von CD95L (Tab. 5) oder TNF- α (Abb. 5). Die Anwesenheit von BSO hatte keinen Einfluss auf die bereits belegte Resistenzüberwindung maligner Gliomzellen gegenüber TNF- α durch Koinkubation mit CHX (Weller et al. 1994, Abb. 5).

Anschließend wurde geprüft, ob BSO auf der Zelloberfläche der untersuchten Zelllinien eine vermehrte Expression von CD95 induziert. Die CD95L-vermittelte Zytotoxizität bei maligner Gliomzellen korreliert mit der Expression von CD95 (Weller et al. 1994). Zunächst wurden LN-229- und T98G-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von BSO behandelt. In einem zweiten Experiment wurden alle 12 Zelllinien untersucht und mit 1 mM BSO inkubiert. Im Gegensatz zu den von Khono et al. (1996) für leukämischen T-Zellen berichteten Ergebnissen wurde hier für humane Gliomzellen keine Modulation der CD95-Expression festgestellt (Tab. 3, Tab. 4).

In anderen Arbeiten wird von einem durch CD95L induzierten Verlust an intrazellulärem Glutathion bei Jurkat T-Zellen (van den Dobbelen et al. 1997) und Leukämiezellen berichtet (Efferth et al. 1996). In den hier durchgeführten Experimenten verringerte CD95L den Glutathion-Spiegel in humanen malignen Gliomzellen nicht

(Tab. 6). Die Zellen zeigten, im Gegensatz zu einer Vorbehandlung mit BSO, nach einer Vorbehandlung mit CD95L keine erhöhte Sensibilität für die Zytotoxizität von Treosulfan (Abb. 6). Dies entspricht Ergebnissen von Watson et al. (1997) bei aktivierten humanen neutrophilen Granulozyten.

Anhand gleichzeitiger Exposition der Gliomzellen gegenüber CD95L und Treosulfan, mit oder ohne Zusatz von BSO, wurde unter 3.3.3 und 3.3.4 gezeigt, dass endogene CD95/CD95L-Interaktionen nicht an der durch BSO gesteigerten Zytotoxizität von Treosulfan bei humanen malignen Gliomzellen beteiligt sind und dass es sich bei der CD95L-vermittelten Apoptosekaskade und der Zytotoxizität von Treosulfan um zwei voneinander unabhängige und sich gegenseitig nicht beeinflussende Systeme handelt. Im Experiment zeigten sich lediglich additive Effekte hinsichtlich der Zytotoxizität. Die Anwesenheit von CD95L hatte keinen Einfluss auf die erhöhte Zytotoxizität von Treosulfan durch BSO (Abb. 7). Zur Bestätigung dieser Erkenntnis wurden die crm-A-transfizierten und damit nicht zur CD95L-vermittelten Apoptose fähigen, Zelllinien LN-229 und LN-18 mit BSO und Treosulfan behandelt. Die ektope Expression von crm-A bei den Zelllinien LN-229 und LN-18 hatte keinen Einfluss auf die BSO-vermittelte Steigerung der Zytotoxizität von Treosulfan (Abb. 8).

In einem abschließenden Experiment unter 3.4 wurde der synergistische Effekt von BSO und Treosulfan auch bei Zellen der transplantablen Rattengliomzelllinie C6 dargestellt (Abb. 9). Damit bot sich die Möglichkeit, den Zytotoxizitäts-steigernden Effekt von BSO für Treosulfan auch in vivo an einem Tiermodell zu überprüfen.

Treosulfan (Ovastat®) ist in verschiedenen europäischen Ländern für die Therapie fortgeschrittener Ovarialkarzinome zugelassen. Für Treosulfan ist die Verträglichkeit von Plasmaspitzenwerten bis zu 1-2 mM beschrieben worden (Hilger et al. 1998). Vor kurzem wurde in einer Arbeit von Schmidt et al. (2000) über Patienten mit Rezidiv eines malignen Glioms berichtet, die mit Treosulfan behandelt wurden. Es zeigte sich keine Reduktion der Tumorumfänge durch Treosulfan, allerdings eine längere Stabilisierung und bei zwei Patienten mit einem Rezidiv eines anaplastischen Astrozytomes eine Stabilisierung über 24 bzw. 60 Monate.

BSO wurde bereits in klinischen Phase-I-Studien untersucht. In verschiedenen Therapieprotokollen hat sich gezeigt, dass BSO in Dosen toleriert wird, die eine deutliche Verminderung des Glutathion-Spiegels in verschiedenen Körpergeweben und in peripheren Lymphozyten auf unter 30-50% der Kontrollzellen bewirken (O'Dwyer et al. 1996, Bailey et al. 1997). Andere Studien mit Krebspatienten haben die

Durchführbarkeit einer BSO-Applikation mit Glutathion-Depletion sowie die Kombination mit einer intravenösen Melphalantherapie *in vivo* gezeigt (Friedman et al. 1989, O'Dwyer et al. 1992, Lacreta et al. 1994)

Eine an die Ergebnisse der in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen anschließende, kürzlich erschienene Publikation belegt im Tiermodell eindrücklich eine synergistische Antitumorwirkung einer Kombinationsbehandlung von BSO und Treosulfan am Ratten-C6-Gliom-Model (Abb. 10). So wurde durch Treosulfan eine Tumorstillung induziert, die für die alleinige Behandlung mit Treosulfan eine Verminderung des mittleren Tumorstillungsvolumens von 18% bewirkte. Durch eine Kombinationsbehandlung mit Treosulfan und BSO wurde eine Reduktion des mittleren Tumorstillungsvolumens von 59% erzielt. Treosulfan und BSO führten zu keinen verstärkten Nebenwirkungen verglichen mit der alleinigen Gabe von Treosulfan. Die Hauptnebenwirkung war eine Granulozytopenie, die aber bei keinem Tier zum Tod führte (Wick et al. 2002b). Im Einklang mit oben genannten Studien wurde eine Reduktion von Glutathion in Monozyten auf bis zu 25-30 % gezeigt. Auch in den Tumoren wurde eine signifikante Glutathion-Reduktion von 50% erzielt. Dies ist ein höherer Restgehalt an Glutathion als erwartet und steht nicht im Einklang mit Beobachtungen aus vorangegangenen Studien, in denen BSO den Glutathion-Spiegel in experimentellem Tumorgewebe schneller senkte als in normalem Hirngewebe und Knochenmark und gliale Tumoren BSO schneller aufnahmen als normales Hirngewebe (Tsutsui et al. 1986, Friedman et al. 1989, Fekete et al. 1990). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die höheren Glutathion-Werte bei schwierigen Präparationsbedingungen durch Verunreinigungen mit Glutathion aus umgebenden, nicht Glutathion-vermindertem normalen Hirngewebe verursacht wurden. Interessanterweise wurde in der kontralateralen, nicht mit Tumorzellen beimpften Hemisphäre keine Glutathion-Depletion festgestellt. Dies spricht dafür, dass BSO die intakte Blut-Hirnschranke nicht überwindet (Friedman et al. 1989, Fekete et al. 1990). Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass:

- (i) zwölf humane maligne Gliomzelllinien sowie die Rattengliomzelllinie C6 auf eine BSO-Behandlung mit einer konzentrationsabhängigen Glutathion-Depletion reagieren und bei allen untersuchten Zelllinien ein synergistischer Effekt für die Behandlung mit Treosulfan und BSO erzielt werden kann,
- (ii) eine Glutathion-Depletion durch BSO nicht zur Veränderung der CD95-Expression führt und keinen Einfluss auf CD95L- oder TNF- α -vermittelte Apoptose hat,

- (iii) CD95L den Glutathion-Gehalt in humanen Gliomzelllinien nicht vermindert, für CD95L und Treosulfan lediglich additive, zytotoxische Effekte bestehen,
- (iv) die gesteigerte Zytotoxizität von Treosulfan durch BSO unabhängig vom CD95/CD95L-System ist,
- (v) die Kombination im Tiermodell eine deutlich höhere Tumolvolumenreduktion verursacht als eine Treosulfan-Monobehandlung.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von BSO und Treosulfan auf die zwölf humanen malignen Gliomzelllinien T98G, LN-229, LN-18, LN-428, LN-319, LN-308, U251MG, U138MG, U373MG, U87MG, D247MG, A172 und die Rattengliomzelllinie C6 untersucht. Bei allen Zelllinien wurde ein synergistischer Effekt für die Behandlung mit Treosulfan und BSO erzielt. Keine der Zelllinien zeigte sich resistent, alle zwölf Zelllinien reagierten auf eine BSO- Behandlung mit einer konzentrationsabhängigen Glutathion-Depletion. Die fehlende Korrelation zwischen der Sensibilität gegenüber einer Glutathion-Depletion durch BSO und dem Grad der Sensibilisierung für die Zytotoxizität von Treosulfan ließ, neben Hinweisen aus der Literatur, mögliche Interaktionen mit dem CD95L-System vermuten. Im Gegensatz zu den beschriebenen sensibilisierenden Effekten bei malignen, nicht glialen Zelllinien führte eine Glutathion Depletion durch BSO bei keiner der Gliomzelllinien zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber CD95L- oder TNF- α -vermittelter Apoptose. Bekräftigt wurde diese Beobachtung an mit CHX-vorbehandelten und damit für CD95L und TNF- α sensibilisierten Zelllinien, bei denen sich nach Glutathion-Depletion durch BSO ebenfalls keine Steigerung der Zytotoxizität von CD95L und TNF- α erzeugen ließ. Durch eine Glutathion-Depletion mit BSO konnte die Resistenz maligner Gliomzellen gegenüber TNF- α -vermittelter Apoptose nicht überwunden werden. Auf die bereits bekannte Resistenzüberwindung maligner Gliomzellen gegenüber TNF- α durch Koinkubation mit CHX hatte die Behandlung mit BSO keinen Einfluss. Die Glutathion Depletion durch BSO hatte weder auf den CD95L- noch auf den TNF- α -vermittelten Zelltod einen Einfluss. Passend hierzu und der Kenntnis, dass CD95L-vermittelte Zytotoxizität bei malignen Gliomzellen mit der Expression von CD95 an der Zelloberfläche korreliert, zeigte keine der zwölf humanen malignen Gliomzelllinien

nach Inkubation mit BSO eine Veränderung der CD95-Expression. Trotz Hinweisen aus früheren Arbeiten vermindert CD95L nicht den Glutathion-Gehalt humaner Gliomzelllinien. Bei gleichzeitiger Exposition maligner Gliomzellen gegenüber Treosulfan und CD95L, mit oder ohne BSO, zeigten sich additive, aber keine synergistischen Effekte der Zytotoxizität beider Substanzen.

Die Unabhängigkeit der durch BSO gesteigerten Zytotoxizität von Treosulfan vom CD95/CD95L-System wurde mittels crm-A transfizierter Zelllinien, die resistent gegen CD95L-vermittelte Apoptose sind, belegt. Auch bei diesen Zellen wurde der Effekt verstärkter Zytotoxizität von Treosulfan durch Glutathion-Depletion mittels BSO nachgewiesen. Bei der Rattengliomzelllinie C6 wurde ebenfalls ein synergistischer Effekt für die Behandlung mit BSO und Treosulfan erzeugt.

In einem im Anschluss an diese Dissertation durchgeführten Untersuchung im C6-Ratten-Gliommodell wurde durch die Kombinationsbehandlung mit BSO und Treosulfan eine synergistische Antitumoraktivität beider Substanzen gezeigt. Vermehrte Nebenwirkungen gegenüber einer Treosulfan-Monotherapie wurden nicht beobachtet.

6. Literaturverzeichnis

1. Ali Osman F., Antoun G., Wang H., Rajagopal S., Gagucas E. (1996)
Buthionine sulfoximine induction of gamma-L-glutamyl-L-cysteine synthetase gene expression, kinetics of glutathione depletion and resynthesis, and modulation of carmustine-induced DNA-DNA cross-linking and cytotoxicity in human glioma cells.
Mol Pharmacol. 49, 1012-1020.
2. Ali-Osman F., Brunner J. M., Kutluk T. M., Hess K. (1997)
Prognostic significance of glutathione S-transferase π Expression and subcellular localization in human gliomas.
Clin Cancer Res. 3, 2253-2261.
3. Andratschke N., Grosu A. L., Molls M., Nieder C. (2001)
Perspectives in the treatment of malignant gliomas in adults.
Anticancer Res. 21, 3541-3550.
4. Arrick B. A., Nathan C. F. (1984)
Gluthathione metabolism as determinant of therapeutic efficacy: a review.
Cancer Res. 44, 4224-4232.
5. Arends M. J., Morris R. G., Wyllie A. H. (1990)
Apoptosis. The role of the endonuclease.
Am J Pathol. 136, 593-608.
6. Ashby J. (1993)
Treasulphan, myleran and butadiene: similarities and differences.
Mutat Res. 300, 77-78.
7. Bahr O., Rieger J., Duffner F., Meyermann R., Weller M., Wick W. (2003)
P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells.
Brain Pathol. 13, 482-494.
8. Bailey H. H. (1998)
L-S, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues.
Chem Biol Interact. 111-112, 239-254.
9. Bailey H. H., Ripple G., Tutsch K. D., Arzoomanian R. Z., Alberti D., Feierabend C., Mahvi D., Schink J., Pomplun M., Mulcahy R. T., Wilding G. (1997)
Phase I study of continous infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan.
J Natl Cancer Inst. 89, 1789-1796.

10. Baker M. A., Cerniglia G. J., Zaman A. (1990)
Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples.
Anal Biochem. 190, 360-365.
11. Begleiter A., Grover J., Froese E. (1983)
Membrane transport, sulfhydryl levels and DNA cross-linking in Chinese hamster ovary cell mutants sensitive and resistance to melphalan.
Biochem Pharmacol. 32, 293-300.
12. Behrens P. F., Ostertag C. B., Warnke P. C. (1998)
Regional cerebral blood flow in peritumoral brain edema during dexamethason treatment: a xenon-enhanced computed tomographic study.
Neurosurgery 43, 235-240, discussion 240-241.
13. Black S. M., Wolf C. R. (1991)
The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance.
Pharmacol Ther. 51, 139-154.
14. Bogler O., Huang H. J., Kleihues P., Cavenee W. K. (1995)
The p53 gene and its role in human brain tumors.
Glia. 15, 308-327.
15. Bosanquet A.G., Burlton A. R. (1994)
Airborne cytotoxicity in the DiSC assay caused by solutions of treosulfan but not busulphan.
Cytotechnology 16, 131-136.
16. Breitbach G.P., Meden H., Schmid H., Kuhn W., Sass G., Schach S., Schmidt-Rohde P., Bastert G., GTOC Study Group (2002)
Treosulfan in the treatment of advanced ovarian cancer: a randomised co-operative multicentre phase III-study.
Anticancer Res. 22, 2923-2932.
17. Briviba K., Fraser G., Sies H., Ketterer B. (1993)
Distribution of monochlorobimane-glutathione conjugate between nucleus and cortisol in isolated hepatocytes.
Biochem J. 294, 631-633.
18. Brown J. M., Giaccia A. J. (1998)
The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy.
Cancer Res. 58, 1408-1416.
19. Cairncross J. G., Ueki K., Zlatescu M. C., Lisle D. K., Finkelstein D. M., Hammond R. R., Silver J. S., Stark P. C., Macdonald D. R., Ino Y., Ramsay D. A., Louis D. N. (1998)
Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas.
J Natl Cancer Inst. 90, 1473-1479.

20. Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975)
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc Nat Acad Sci USA. 72, 3666-3670.
21. Chiba T., Takahashi S., Sato N., Ishii S., Kikuchi K. (1996)
Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human
T cells.
Eur J Immunol. 26, 1164-1169.
22. Cnubben N. H., Rommens A. J., Oudshoorn M. J., Van Bladeren P. J. (1998)
Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiotepa and
transport of its metabolite monogluthionylthiotepa in human MCF-7 breast
cancer cells.
Cancer Res. 58, 4616-4623.
23. Cossarizza A., Franceschi C., Monti D., Salvioli S., Bellesia E., Rivabene R.,
Biondo L., Rainaldi G., Tinari A., Malorni W. (1995)
Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor- α -induced
apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria.
Exp Cell Res. 220, 232-240.
24. De Angelis L. M., Burger P. C., Green S. B. and Cairncross J. G. (1998)
Malignant glioma : Who benefits from adjuvant chemotherapy ?
Ann Neurol. 44 691-695.
25. Delneste Y., Jeannin P., Sebille E., Aubry J. P., Bonnefoy J. Y. (1996)
Thiols prevent Fas (CD95)-mediated T cell apoptosis by down-regulating
membrane Fas expression.
Eur J Immunol. 26, 2981-2988.
26. Duncan I. D., Clayton L. A. (1985)
Combination chemotherapy of ovarian carcinoma with cisplatin and
treosulfan--a phase II study.
Br J Obstet Gynaecol. 92, 762-767.
27. Efferth T., Fabry U., Osieka R. (1996)
Anti- Fas/Apo-1 monoclonal antibody CH-11 depletes glutathione and kills
multidrug-resistant human leukemic cells.
Blood Cells Mol Dis. 22, 2-9.
28. Feinberg B., Kurzrock R., Talpaz M., Blick M., Saks S., Guttermann J. U.
(1988)
A Phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis
factor-alpha in cancer patients.
J Clin Oncol. 6, 1328-1334.
29. Feit P. W. (1961)
Stereoisomere 1,4-Methansulfonyl-butan-1,2,3,4-tetrole.
Tetrahedron Letters 20, 716-717.

30. Feit P. W., Rastrup Andersen N., Matagne R. (1970)
Studies on epoxide formation from (2S,3S)- threitol 1,4-bismethanesulfonate. The preparation and biological activity of (2S, 3S)-1,2-epoxy-3,4butanediol 4-methanesulfonate.
J Med Chem. 13, 1173-1175.
31. Fekete I., Griffith O. W., Scлагeter K. E., Bigner D. D., Friedman H. S., Groothuis D. R. (1990)
Rate of buthionine sulfoximine entry into brain and xenotransplanted human gliomas.
Cancer Res. 50, 1251-1256.
32. Fichtner I., Becker M., Baumgart J. (2003)
Antileukaemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukaemias (ALL).
Eur J Cancer. 39, 801-807.
33. Fine H. A. (1994)
The basis for current treatment recommendation for malignant gliomas.
J Neurooncol. 20, 111-120.
34. Fine H. A., Dear K. B., Loeffler J. S., Black P. M., Canelllos G. P. (1993)
Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults.
Cancer 71, 2585-2597.
35. Friedman H. S., Colvin O. M., Griffith O. W., Lippitz B., Elion G. B., Schold S. C. Jr., Hilton J., Bigner D. D. (1989)
Increased melphalan activity in intracranial human medulloblastoma and glioma xenografts following buthionine sulfoximine-mediated glutathione depletion.
J Natl Cancer Inst. 81, 524-527.
36. Fulda S., Marek L., Friesen C., Debatin K. M. (1998)
Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 System.
Int J Cancer. 76, 105-114.
37. Glaser T., Wagenknecht B., Groscurth P., Krammer P. H., Weller M. (1999)
Death ligand/receptor-independent caspase activation mediates drug-induced cell death in malignant glioma cells.
Oncogene 18, 5044-5053.
38. Griffith O. W. (1982)
Mechanism of action, metabolism and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis.
J Biol Chem. 257, 13704-13712.
39. Griffith O. W., Meister A. (1979)
Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine).
J Biol Chem. 254, 7558-7560.

40. Gropp M., Meier W., Hepp H. (1998)
Treosulfan as an effective second-line therapy in ovarian cancer.
Gynecol Oncol. 71, 94-98.
41. Hartley J. A., O'Hare C. C., Baumgart J. (1999)
DNA alkylation and interstrand cross-linking by treosulfan.
Br J Cancer. 79, 264-266.
42. Hickson I. D., Harris A. L. (1988)
Mammalian DNA repair--use of mutants hypersensitive to cytotoxic agents.
Trends Genet. 4, 101-106.
43. Hilger R. A., Harstrick A., Eberhardt W., Oberhoff C., Skorcek M., Baumgart J.,
Seeber S., Scheulen M. E. (1998)
Clinical pharmacokinetics of intravenous treosulfan in patients with advanced
solid tumors.
Cancer Chemother Pharmacol. 42, 99-104.
44. Itoh N., Nagata S. (1993)
A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human
Fas antigene
J Biol Chem. 268, 10932-10937.
45. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S. I., Sameshima M.,
Hase A., Seto Y., Negata S. (1991)
The polypeptid encoded by the cDNA for human cell surface antigene Fas can
mediate apoptosis
Cell 66, 233-243.
46. Jevtovic-Todorovic V., Guenther T. M. (1992)
Depletion of a discrete nuclear glutathione pool by oxidative stress, but not by
buthionine sulfoximine. Correlatin with enhanced alkylating agent cytotoxicity
melanoma cells in vitro.
Biochem Pharmacol. 44, 1383.
47. Kaldor J. M., Day N. E., Pettersson F., Clarke E. A., Pedersen D., Mehnert W.,
Bell J., Horst H., Prior P., Karjalainen S. et al. (1990)
Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer.
N Engl J Med. 322, 1-6.
48. Kalkanis S. N., Carroll R. S., Zhang J., Zamani A. A., Black P. M. (1996)
Correlation of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression
with peritumoral vasogenic cerebral edema in meningiomas.
J Neurosurg. 85, 1095-1101.
49. Kang Y. J., Enger M. D. (1992)
Buthionine sulfoximine-induced cytostasis does not correlate with glutathione
depletion.
Am J Physiol. 265, C122-127.

50. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972)
Apoptosis : a basic biologic phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics.
Br J Cancer. 26, 239-257.
51. Kerr J. F., Winterford C. M., Harmon B. V. (1994)
Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy [published erratum appears in Cancer 73, 3108].
Cancer 73, 2013-2026.
52. Kleihues P., Cavenee W. K. (2000)
Tumors of the Nervous System.
Pathology & Genetics, IARC Press Lyon
53. Kohno T., Yamada Y., Hata T., Mori H., Yamamura M., Tomonaga M., Urata Y., Goto S., Kondo T. (1996)
Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells.
J Immunol. 156, 4722-4728.
54. Kopf-Maier P. (1998)
The alkylator treosulfan shows activity towards human renal-cell carcinoma in vivo and in vitro.
In Vivo 12, 275-288.
55. Kopf-Maier P., Sass G. (1992)
Antitumor activity of treosulfan against human breast carcinomas.
Cancer Chemother Pharmacol. 31, 103-110.
56. Kopf-Maier P., Sass G. (1996)
Antitumor therapy of treosulfan in human lung carcinomas.
Cancer Chemother Pharmacol. 37, 211-221.
57. Kugler A., Hemmerlein B., Gross A. J., Seseke F., Kallerhoff M., Ringert R. H. (1998)
Treosulfan displays cytotoxic effect on spheroids of primary cell cultures of renal cell carcinoma independent of p-glycoprotein expression.
Urologe A. 37, 367-371.
58. Kull F. C. Jr. and Cuatrecasas P. (1981)
Possible requirement of internalization in the mechanism of in vitro cytotoxicity in tumor necrosis serum.
Cancer Res. 41, 4885-4890.
59. Lacreata F. P., Brennan J. M., Hamilton T. C., Ozols R. F., O'Dwyer P. J. (1994)
Stereoselective pharmacokinetics of L-buthionine SR-sulfoximine in patients with cancer.
Drug Metab Dispos. 22, 835-842.

60. Leithauser F., Dhein J., Mechtersheimer G., Koretz K., Bruderlein S., Henne C., Schmidt A., Debatin K. M., Krammer P. H., Moller P. (1993)
Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells.
Lab Invest. 69, 415-429.
61. Liang B. C. (1996)
Effect of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human gliomas cell lines.
J Neurooncol. 29, 149-155.
62. Macdonald D. R., Cascino T. L., Schold S. C. Jr, Cairncross J. G. (1990)
Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma.
J Clin Oncol. 8, 1277-1280.
63. Matagne R. (1969)
Induction of chromosomal aberrations and mutations with isomeric forms of L-threitol-1,4-bismethansulfonate in plant materials.
Mutation Res. 7, 241-247.
64. Meden H., Wittkop Y., Kuhn W. (1997)
Maintenance chemotherapy with oral treosulfan following first-line treatment in patients with advanced ovarian cancer: feasibility and toxicity.
Anticancer Res. 17, 2221-2223.
65. Medical Research Council Brain Tumor Working Party (2001)
Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial.
J Clin Oncol. 19, 509-518.
66. Metcalf S. E., Grant R. (2002)
Biopsy versus resection for malignant glioma (Cochrane Review).
The Cochrane Library. Issue 4
67. Mizutani Y., Yoshida O. (1994)
Overcoming tumor necrosis factor- α resistance of human renal and ovarian carcinoma cells by combination with buthionine sulfoximine and tumor necrosis factor- α . Role of tumor necrosis factor-alpha mRNA down-regulation in tumor cell sensitization.
Cancer 73, 730-737.
69. Morrow C. S., Smitherman P. K., Townsend A. J. (1998)
Combined expression of multi drug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase p1-1 (GSTP1-1) in MCF 7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin.
Biochem Pharmacol. 56, 1013-1021.
70. Nagata S., Goldstein P. (1995)
The Fas death factor
Science 267, 1449-1456.

71. Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society (NOA) (2003)
Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus
nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field
radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma.
J Clin Oncol. 21, 3276-3284.
72. O'Dwyer P. J., Hamilton T. C., LaCreta F. P., Gallo J. M., Kilpatrick D.,
Halbherr T., Brennan J., Bookmann M. A., Hoffmann J., Young R. C.,
Comis R. L., Ozols R. F. (1996)
Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in
patients with cancer.
J Clin Oncol. 14, 249-256.
73. O'Dwyer P. J., Hamilton T. C., Young R. C., LaCreta F. P., Carp N., Tew K. D.,
Padavic K., Comis R. L., Ozols R. F. (1992)
Depletion of glutathione in normal and malignant human cells in vivo by
buthioninesulfoximine: clinical and biochemical results.
J Natl Cancer Inst. 84, 264-267.
74. Oehm A., Bermann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C.,
Li-Wever M., Richards S., Dhein J., Trauth B. C., Postingl H., Krammer P. H.
(1992)
Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigene, a
member of the tumor necrosis factor/ nerve growth factor receptor
superfamily. Sequence identity with the Fas antigene.
J Biol Chem. 267, 10709-10715.
75. Owens C. W., Belcher R. V. (1965)
A colorimetic micro-method for the determination of glutathion.
Biochem J. 94, 705-711.
76. Pedersen-Bjergaard J., Nissen N. I., Sorensen H. M., Hou-Jensen K.,
Larsen M. S., Ernst P., Ersbol J., Knudtzon S., Rose C. (1980)
Acute non-lymphocytic leukemia in patients with ovarian carcinoma following
long-term treatment with Treosulfan (= dihydroxybusulfan).
Cancer 45, 19-29.
77. Reber U., Wullner U., Trepel M., Baumgart J., Seyfried J., Klockgether T.,
Dichgans J., Weller M. (1998)
Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine
sulfoximine in human malignant glioma cells: the role of bcl-2.
Biochem Pharmacol. 55, 349-359.
78. Reed J.C. (1996)
Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer.
J Clin Invest. 97, 2651-2659.
79. Rensing-Ehl A., Frei K., Flury R., Maiba B., Mariani S. M., Weller M.,
Aebischer P., Krammer P. H., and Fontana A. (1995)
Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo.
Eur. J. Immunol. 25, 2253-2258.

80. Roth W., Weller M. (1999)
Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives.
Cell Mol Life Sci. 56, 481-506.
81. Roth W., Isenmann S., Nakamura M., Platten M., Wick W., Kleihues P., Bahr M., Ohgaki H., Ashkenazi A., Weller M. (2001)
Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis.
Cancer Res. 61, 2759-2765.
82. Ruggiero V., Latham K., Baglioni C. (1987)
Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells.
J Immunol. 138, 2711-2717.
83. Sancar A., Sancar G. B. (1988)
DNA repair enzymes.
Annu Rev Biochem. 57, 29-67.
84. Schmidt F., Wick W., Herrlinger U., Dichgans J., Weller M. (2000)
Treoosulfan chemotherapy for recurrent malignant glioma.
J Neurooncol. 49, 231-234.
85. Schneider P., Holler N., Bodmer J. L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. (1998)
Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity
J Exp Med. 187, 1205-1213.
86. Shibata S. (1989)
Ultrastructure of capillary walls in human brain tumors.
Acta Neuropathol. 78, 561-571.
87. Shertzer H. G., Bannenberg G. L., Zhu H., Liu R. M., Moldeus P. (1994)
The role of thiols in mitochondrial susceptibility to iron and tert-butyl hydroperoxide-mediated toxicity in cultured mouse hepatocytes.
Chem Res Toxicol. 7, 358-366.
88. Shirai T., Yamaguchi H., Ito H., Todd C. W., Wallace R. B. (1985)
Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor.
Nature 313, 803-806.
89. Steinbach J. P., Weller M. (2002)
Mechanisms of apoptosis in central nervous system tumors: application to theory.
Curr Neurol Neurosci Rep. 2, 246-253.

90. Stewart L.A. (2002)
Chemotherapie in adult high-grade glioma: a systematic review and metaanalysis of individual patient data from 12 randomised trials.
Lancet 359, 1011-1018.
91. Strasser A., Harris A. W., Huang D. C., Krammer P. H., und Cory S. (1995)
Bcl-2 und Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis.
EMBO J. 14, 6136-6147.
92. Stupp R., Mason W. P., Van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M., Brandes A. A., Cairncross G., Lacombe D., Mirimanoff R. O. (2004)
Concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). Conclusive results of a randomized phase III trial by the EORTC Brain & RT Groups and NCIC Clinical Trial Group.
Proceedings of ASCO Volume 23, Abstract 2
93. Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari I. S., Palladino M. A., Shepard H. M. (1985)
Recombinant human tumor necrosis factor-alpha : effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro.
Science 230, 943-946.
94. Suzukake K., Vistica B. P., Vistica D. T. (1983)
Dechlorination of L-phenylalanine mustard by sensitive and resistant tumor cells and its relationship to intracellular glutathione content.
Biochem Pharmacol. 32, 165-167.
95. Takamiya Y., Abe Y., Tanaka Y., Tsugu A., Kazuno M., Oshika Y., Maruo K., Ohnishi Y., Sato O., Yamazaki H., Kijima H., Ueyama Y., Tamaoki N., Nakamura M. (1997)
Murine p-glycoprotein on stromal vessels mediates multidrug resistance in intracerebral human glioma xenografts.
Br J Cancer. 76, 445-450.
96. Talley A. K., Dewhurst S., Perry S. W., Dollard S. C., Gummuluru S., Fine S. M., New D., Epstein L. G., Gendelman H. E., Gelbard H. A. (1995)
Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA.
Mol. Cell. Biol. 15, 2359-2366.
97. Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H. W., Goeddel D. V. (1993)
A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death.
Cell 74, 845-853.
98. Tewari M., Telford W. G., Miller R. A., Dixit V. M. (1995)
CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis.
J. Biol. Chem. 270, 22705-22708.

99. Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. J., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K. M., Krammer P. H. (1989)
Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.
Science 245, 301-305.
100. Tsujimoto M., Yip Y. K., Vilcek J. (1985)
Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 82, 7626.
101. Tsutsui K., Komuro C., Ono K., Nishidai T., Shibamoto Y., Takahashi M., Abe M. (1986)
Chemosensitization by buthionine sulfoximine in vivo.
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 12, 1183-1186.
102. Um H. D., Orenstein J. M., Wahl S. M. (1996)
Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway.
J Immunol. 156, 3469-3477.
103. van den Dobbelsteen D. J., Nobel C. S. I., Schlegel J., Cotgreave I. A., Orrenius S., Slater A. F. G. (1997)
Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody.
J Biol Chem. 271, 15420-15427.
104. van Etten B., de Vries M. R., van Ijken M. G., Lans T. E., Guetens G., Ambagtsheer G., van Tiel S. T., de Boeck G., de Bruijn E. A., Eggermont A. M., ten Hagen T. L. (2003)
Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion.
Br J Cancer. 88, 314-319.
105. Villunger A., Egle A., Kos M., Hartmann B. L., Geley S., Kofler R., Greil R. (1997)
Drug- induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/ CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/ CD95) signalling in human T-acute lymphatic leukemia cells.
Cancer Res. 57, 3331-3334.
106. von Bossanyi P., Dietsch S., Dietzmann K., Warich-Kirches M., Kirches E. (1997)
Immunohistochemical expression of P-Glycoprotein and Glutathion-S-transferases in cerebral Gliomas and response to chemotherapy.
Acta Neuropathol. 94, 605-611.
107. Wagenknecht B., Schulz J. B., Gulbins E., Weller M. (1998)
Crm-A, bcl-2 and NDGA inhibit CD95L-induced apoptosis of malignant glioma cells at the level of caspase-8 processing.
Cell Death Differ. 5, 894-900.

108. Walker M. D., Alexander E. Jr., Hunt W. E., MacCarty C. S., Mahaley M. S. Jr., Mealey J. Jr., Norrell H. A., Owens G., Ransohoff J., Wilson C. B., Gehan E. A., Strike T. A. (1978)
Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial.
J. Neurosurg. 49, 333-343.
109. Walker P. R., Saas P., Dietrich P. Y. (1997)
Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape. The tumor cell strikes back.
J. Immunol. 158, 4521-4524.
110. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Nagata S. (1992)
Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.
Nature 356, 314-317.
111. Watson R. W. G., Rotstein O. D., Jiminez M., Parado J., Marshall J. C. (1997)
Augmented intracellular glutathione inhibits FAS-triggered apoptosis of activated human neutrophils.
Blood 89, 4175-4181.
112. Weller M., Frei K., Groscurth P., Krammer P. H., Yonekawa Y., Fontana A. (1994)
Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines.
J Clin Invest. 94, 954-964.
113. Weller M., Kleihues P., Dichgans J., Ohgaki H. (1998)
CD95 ligand: lethal weapon for malignant glioma?
Brain Pathol. 8, 285-293.
114. Wick W., Hermisson M., Kortmann R. D., Kuker W. M., Duffner F., Dichgans J., Bamberg M., Weller M. (2002a)
Neoadjuvant gemcitabine/treosulfan chemotherapy for newly diagnosed glioblastoma: a phase II study.
J Neurooncol. 59, 151-5.
115. Wick W., Stock J., Seyfried J., Baumgart J., Wüllner U., Weller M. (2002b)
CD95/CD95 ligand-independent potentiation of treosulfan cytotoxicity by BSO in malignant glioma cells in vitro and in vivo.
Int J Oncol. 21, 213-220.
116. Williamson B. D., Carswell E. A., Rubin B. Y., Prendergast J. S., Old L. J. (1983)
Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon.
Proc Natl Acad Sci U S A. 80, 5397-5401.

117. Wilson A. P., Neal F. E. (1981)
In vitro sensitivity of human ovarian tumors to chemotherapeutic agents.
Br J Cancer. 44, 189-200.
118. Winter S., Strik H., Rieger J., Beck J., Meyermann R., Weller M. (2000)
Glutathione S-transferase and drug sensitivity in malignant glioma.
J Neurol Sci. 179, 115-121.
119. Wong E. T., Hess K. R., Gleason M. J., Jaeckle K. A., Kyritsis A. P.,
Prados M. D., Levin V. A., Yung W. K. (1999)
Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled into
phase II clinical trials.
J Clin Oncol. 17, 2572.
120. Wyllie A. H. (1997)
Apoptosis: an overview.
Br Med Bull. 53, 451-465.
121. Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. (1989)
A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-
downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.
J Exp Med. 169, 1747-1756.
122. Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V. M., Salvesen G. S. (1997)
Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases.
J Biol Chem. 272, 7797-7780.
123. Zimmermann R. J., Marafino B. J. Jr, Chan A., Landre P., Winkelhake J. L.
(1989)
The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human
necrosis factor in vivo. Implications for mechanisms of action.
J Immunol. 142, 1405-1409.

7. Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
BSO	D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
Bcl-2	<i>B cell lymphoma</i>
BCNU	1,3-Bis(2-Chlorethyl)-1-Nitrosourea = Carmustin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD95	<i>cluster of differentiation 95</i>
CD95L	CD95-Ligand
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CHX	Cycloheximid
crm-A	<i>cytokine response modifier, (crm)-A</i> , Serpin des Cowpox-Virus, verhindert TNF- und CD95L-induzierte Apoptose
DcR3/TNFRSF6B	<i>decoy-Rezeptor 3</i>
DHB	Dihydroxybusulfan = Treosulfan
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTNB	Diphosphoridinnukleotid
EC ₅₀	Konzentrationen, die zum Erreichen eines 50%igen Effekts erforderlich sind
ED ₉₀	Effektive Dosis, bei der 90% der Individuen den erwarteten Effekt zeigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
F	Faraday
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FADD	<i>fas-associated protein with death domain</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d`Obstrétique</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat

G418	Geneticin/ Neomycin
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, chemisch reduzierte Form
GST	Glutathion-S-Transferasen
γ -GCS	γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase
GPO	Glutathion-Peroxidase
GS	Glutathionsynthetase
GSSG	die oxidierte Form des Glutathion
Gy	Gray
h	Stunde
IC ₅₀	Konzentration, die das Wachstum um 50% hemmt
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LD ₁₀	letale Dosis, bei der 10% der Individuen getötet werden
MDR	<i>multidrug resistance</i>
mdr -1	<i>multi drug resistance gene</i>
min	Minute
n	Numerus, Gesamtzahl der Versuche
NADPH	Nikotin-Adenosin-Dinukleotidphosphat
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NOA	Neuro-Onkologische Arbeitsgemeinschaft
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Puffer
PCV-Schema	Chemotherapie-Schema mit Procarbazin, CCNU, und Vincristin
P-GP	P-Glykoprotein
p53, p21, p16	Tumorsuppressorgen 53, 21, 16
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SSA	Sulfosalizylsäure
Tab.	Tabelle
TI	Therapeutischer Index
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
rhTNF- α	rekombinanter humaner TNF- α
U	<i>unit</i>
U/min	Umdrehung pro Minute

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Weller danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine vielfältige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Monika Kermer, Cornelia Grimmel und PD Dr. Wolfgang Wick sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuro-Onkologie (unter Leitung von Prof. Dr. Michael Weller) der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen möchte ich mich für die gesamte Unterstützung, für die Hilfe beim Erlernen der verschiedenen Labortechniken, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Christoph Meisner vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Experimente.

Meiner Frau Ingrid und meinen Kindern Yannick und Emely danke ich für ihre Unterstützung und die Zeit, in der sie auf mich verzichten mussten.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mich in jeder Situation meines Lebens unterstützt haben und immer hinter mir stehen.

Lebenslauf:

Name: Jan Rudolf Stock
Geburtsdatum: 4. Februar 1970
Geburtsort: Tübingen

Familienstand: verheiratet mit Ingrid Stock, geb. Teufel,
zwei Kinder: Yannick und Emely Stock

Eltern: Dr. Wieland Stock, Diplom-Biochemiker
Gisela Stock, geb. Lang, Pharmazeutin

Schulbildung: August 1976 – Juli 1980 Grundschule Winkelwiese
Tübingen
August 1980 – Juli 1989 Gesamtschule Waldhäuser-Ost
Abschluss : Abitur

Studium der Medizin: Beginn: Wintersemester 1991/1992
Ärztliche Vorprüfung : 13.09.1994
Erstes Staatsexamen: 15.04.1996
Zweites Staatsexamen: 16.09.1999
Praktisches Jahr Universitätsklinikum Tübingen:
I: 25.10.1999 - 13.02.2000 Chirurgie
II: 14.02.2000 - 04.06.2000 Radiologie
III: 05.06.2000 – 24.09.2000 Innere Medizin
Ärztliche Prüfung: 03.11.2000

Weiterbildung: Medizinische Klinik Universitätsklinikum Tübingen,
Innere Medizin Abt. IV:
Arzt im Praktikum: 15.12.2000 – 14.06.2002
Assistenzarzt seit 15.06.2002