



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Antikarzinogene *in vitro*-Aktivität der
Fusarium-Metabolite Enniatin und Beauvericin

verfasst von

Markus Zlesak

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ao.Univ.-Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei einigen Personen für ihren Beistand in dem Jahr während der Durchführung dieser Diplomarbeit bedanken.

Vor allem danke ich meiner Freundin, **Lisa Binder**, und meiner Familie, die mich mit vollem Einsatz unterstützt haben.

Ao.Univ.-Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber, für die Gelegenheit molekularbiologisch zu arbeiten und das Vertrauen in mich, welches ich hoffentlich erfüllen konnte.

Dr. Rita Dornetshuber, für ihre geduldige Hilfe und fabelhafte Betreuung bei der Einschulung und Durchführung dieser Arbeit.

Ao.Univ.-Prof. Dr. Walter Berger, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Möglichkeit, einmal in die Welt der Forschung zu schnuppern.

Außerdem danke ich allen, die mich während meiner Diplomarbeit fachlich kompetent unterstützt haben – insbesondere für die Geduld, die sie aufgebracht haben, um meine Fragen zu beantworten: **Christian Balzarek, Christine Pirker, Claudia Karnthaler, Daniela Lötsch, David Plattner, Irene Herbacek, Johannes Gojo, Kushtrim Kryeziu, Malgorzata Tryniecki, Maria Eisenbauer, Mir Alireza Hoda, Pakiza Rawnduzi, Petra Heffeter, Ute Jungwirth, Vera Bachinger, Walter Miklos** und den übrigen Mitarbeitern des Krebsforschungsinstitutes, auch dafür, dass es in den Pausen nicht immer nur ernst zugeht.

Inhaltsverzeichnis

Ia. Kurzfassung	6
Ib. Abstract	7
2. Einleitung	8
2.1 Cyclodepsipeptide	8
2.1.1 Enniatine und Beauvericin	8
2.1.2 Weitere antikarzinogene Cyclodepsipeptide	12
2.2. Proteinkinasen	13
2.2.1 Proteinkinaseinhibitoren	15
2.3 Der Zellzyklus	19
2.3.1 Ablauf	19
2.3.2 Regulation	20
2.4 Zelltod	22
2.4.1 Nekrose	22
2.4.2 Apoptose	22
2.5 Neoplasie, Tumor und Krebs	27
2.5.1 Epidemiologie	28
2.5.2 Prävention	29
2.5.3 Therapie	29
2.5.4 Therapieresistenz	34
2.6 Angiogenese	34
3. Ziel der Diplomarbeit	36
4. Material und Methoden	37
4.1 Zelllinien	37
4.2 Chemikalien, Gifte und Arzneistoffe	38
4.3 Methoden	39
4.3.1 Zellkultur	39

4.3.2 Zytotoxizitätstest	40
4.3.3 Proteinanalyse via Western Blot.....	42
4.3.4 Zellzyklus.....	49
4.3.5 Durchflusszytometrie	52
4.3.6 Angiogenese.....	54
4.3.7 Migration via Scratch-Assay.....	56
5. Ergebnisse und Diskussion	57
5.1 Zytotoxische Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix.....	57
5.2 Wirkung von ENN B und BEA auf ER-Stress.....	59
5.3 Kombinationsversuche mit ENN B, BEA und anderen Zytostatika	61
5.3.1 Zytotoxizitätsassays mit diversen Zytostatika	62
5.3.2 Weitere Kombinationsversuche mit ENN B, BEA und Sorafenib.....	74
5.4 Antiangiogene und migrationshemmende Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix.....	85
5.4.1 Tube-Formation-Assay	85
5.4.2 HET-CAM-Assay.....	86
5.4.3 Scratch-Assay.....	88
6. Zusammenfassung.....	93
7. Abkürzungen.....	95
8. Abbildungen und Tabellen	97
9. Literaturverzeichnis	100

Ia. Kurzfassung

Die Cyclodepsipeptide Enniatin B (ENN B) und Beauvericin (BEA) werden von Fusariumarten produziert, welche in Getreide weit verbreitet sind. Aufgrund der jüngsten Forschung kann ein möglicher Nutzen als Zytostatika in Betracht gezogen werden. Es zeigten sich zytotoxische Wirkungen gegen Krebszellen, bei gleichzeitig relativ hoher Resistenz von nicht malignen HUVEC-Zellen.

ENN B und BEA induzieren über den intrinsischen Weg Apoptose in Krebszellen, was zum Teil auf ionophore Wirkungen der amphiphilen Strukturen, aber auch auf verschiedene Signalwege die noch nicht ausreichend erforscht wurden, zurückzuführen ist. Ein möglicher Einfluss von „*unfolded protein response*“ und Endoplasmatisches Retikulum Stress (ER-Stress) wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die meisten Marker zeigten hierbei keine wesentlichen Veränderungen, nur die Expression von eIF-2 α sank mit steigender BEA-Konzentration.

Beide Substanzen erwiesen sich außerdem in HET-CAM-Assay, Scratch-Assay und Tube-Formation-Assay in subtoxischen Konzentrationen als antiangiogen und migrationshemmend, weswegen Kombinationsversuche mit dem Angiogenesehemmer Sorafenib durchgeführt wurden. Im Zytotoxizitätsassay konnte ein deutlicher Synergismus festgestellt werden. Am deutlichsten zeigte sich dies bei Konzentrationen von 2-3 μ M ENN B bzw. BEA und 2.5-5 μ M Sorafenib. Während die IC₅₀ für ENN B in KB-3-1-Zellen bei 3.73 μ M lag, konnte sie durch Zusatz von 2.5 μ M Sorafenib (IC₅₀: 6.58) auf 1.59 μ M gesenkt werden, durch Zusatz von 5 μ M gar auf 0.27 μ M.

Bei den einzelnen Substanzen fand eine Verlagerung in Richtung G₀/G₁-Phase statt. In der Kombination wurde genau das Gegenteil, nämlich eine deutliche Zunahme der Zellen in der G₂/M-Phase, festgestellt. In der Kombination nahm außerdem die DNA-Syntheserate deutlich ab, was nur zum Teil durch die erhöhte Zytotoxizität erklärt werden kann. Die Apoptose wurde mittels HöPI- und JC-1-Färbung bestätigt.

Kombinationen mit Gefitinib, Erlotinib und Cisplatin zeigten sich als schwach wirksam oder sogar gänzlich unwirksam. Der selektive B-Raf-Inhibitor Vemurafenib wirkte sogar antagonistisch.

Zusammenfassend erwiesen sich ENN B und BEA vor allem in Kombination mit Sorafenib als mögliche neue Therapieoptionen bei verschiedenen Krebsarten. Die vorliegenden Ergebnisse sollen in Kürze in *in vivo*-Studien bekräftigt werden.

Ib. Abstract

The cyclodepsipeptides enniatin B (ENN B) and beauvericin (BEA) are produced by various *Fusarium* species that frequently occur in grain samples. Based on recent research results both substances are potential candidates for new anticancer drugs. Despite being cytotoxic to cancer cells, non malignant HUVEC cells respond relatively resistant.

ENN B and BEA induce apoptosis via intrinsic pathway in cancer cells. This can partially be explained by ionophoric effects because of their amphiphile chemical structure, but also by different signalling pathways that are explored only insufficiently. A possible influence of unfolded protein response and ER stress was investigated via Western blot analysis. Most proteins showed no significant changes; the eiF-2 α expression levels decreased with increasing BEA concentrations.

Both substances proved to be antiangiogenetic and inhibitory to cell migration at subtoxic concentrations in HET-CAM assay, scratch assay and tube formation assay. Thus, combination therapy with angiogenesis inhibiting sorafenib was evaluated. Synergism could be observed in cell viability assays, most notably at 2-3 μ M ENN B and BEA and 2.5-5 μ M sorafenib. IC₅₀ for ENN B (3.73 μ M) could be reduced to 1.59 μ M by adding 2.5 μ M sorafenib (6.58 μ M) and to 0.27 μ M by adding 5 μ M sorafenib.

While treatment with single substances resulted in an increase of cells in G₀/G₁-phase in combination therapy the opposite was observed, namely an increase of cells in G₂/M-phase. Moreover, DNA-synthesis clearly decreased in combination therapy. This effect can only partially be explained by raising cytotoxicity. Apoptosis was confirmed by HöPI-staining and JC-1-staining.

Combinations with gefitinib, erlotinib and cisplatin resulted in weak or no synergistic effects. Selective B-Raf inhibitor vemurafenib actually was antagonistic.

Taken together, ENN B and BEA, especially in combination with sorafenib, proved to be possible new options in cancer therapy. Existing results should be corroborated in *in vivo*-studies.

2. Einleitung

2.1 Cyclodepsipeptide

Cyclodepsipeptide sind zyklische Peptide, bei denen mindestens eine alpha-Aminosäure durch eine alpha-Hydroxysäure ersetzt ist. Aufgrund dessen gehen sie keine klassischen Peptidbindungen mit Säureamidcharakter, sondern Esterbindungen ein. Die Ringform ist für eine biologische Aktivität essentiell, wie mit den Cyclodepsipeptiden Kahalalide F und G bewiesen wurde.¹

Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur sind sie in der Lage als Ionophore Löcher in biologischen Membranen zu bilden, die für ein- und zweiwertige Kationen durchlässig sind.²⁻³ Dies führt zu einem gestörten Elektrolythaushalt, bei hohen Cyclodepsipeptidkonzentrationen kommt es zum Zelltod durch Calcium-Überladung.⁴

2.1.1 Enniatine und Beauvericin

Die Enniatine (ENN) und Beauvericin (BEA) sind Mykotoxine, vorwiegend produziert von der Schimmelpilzgattung *Fusarium*, deren Arten zu den häufigsten Pilzverunreinigungen von Getreide (Mais, Reis, Weizen, Hafer, Roggen und Gerste⁵⁻⁷) gehören und auch andere bekannte Toxine wie zum Beispiel Fusaproliferin und Moniliformin als Sekundärstoffe produzieren.⁴ Alle diese Stoffe werden auch als „emerging mycotoxins“ bezeichnet, da sie erst spät entdeckt wurden, die Forschung an ihnen aber in letzter Zeit immer weiter zunimmt.⁸

Die erste Isolierung von ENN aus *Fusarium oxysporum* erfolgte im Jahr 1947, von BEA aus *Beauveria bassiana* 1969. Die Konzentrationen der beiden Mykotoxine reichen je nach Pilzart bis in den hohen mg/kg-Bereich,^{6,9-10} was sie auch interessant für die ernährungswissenschaftliche Forschung macht, da sie über infiziertes Getreide in die Nahrungskette gelangen. In Anbetracht der Bioverfügbarkeit von etwa 50 %¹¹⁻¹², ist es auch denkbar, dass tatsächlich zytotoxische Mengen über die Nahrung in den Blutkreislauf gelangen. In *in vitro*-Versuchen zeigte sich bereits eine Tumor-promovierende Wirkung in geringerer Konzentration.¹³ Die tatsächlichen Folgen sind allerdings noch nicht genau wissenschaftlich erforscht.

2.1.1.1 Struktur

Die Enniatine und Beauvericin sind Cyclohexadepsipeptide, bestehend aus drei alpha-Aminosäuren mit variablem, lipophilen Rest und drei D-2-Hydroxyisovaleriansäuren, die alternierend einen Ring mit insgesamt 18 Ringgliedern bilden. Während BEA aromatische

Reste hat, sind jene der Enniatine aliphatisch.¹⁴ Die drei Stickstoffatome der alpha-Aminosäuren sind zusätzlich methyliert. Dreidimensional bilden die Substanzen eine Scheibe.

Substanz	R1	R2	R3
Enniatin A	Sec-Butyl	Sec-Butyl	Sec-Butyl
Enniatin A ₁	Isopropyl	Sec-Butyl	Sec-Butyl
Enniatin A ₂	Sec-Butyl	Isobutyl	Sec-Butyl
Enniatin B	Isopropyl	Isopropyl	Isopropyl
Enniatin B ₁	Isopropyl	Isopropyl	Sec-Butyl
Enniatin B ₄	Isopropyl	Isobutyl	Isopropyl
Beauvericin	Phenylmethyl	Phenylmethyl	Phenylmethyl

TABELLE 1: STRUKTURMERKMALE WICHTIGER ENNIATINE UND BEAUVERICIN.

Die Moleküle selbst sind amphiphil, wobei der Ring aus Estern und Amiden hydrophilen Charakter aufweist, während die lipophilen (apolaren) Reste der Amino- und Hydroxysäuren herausragen. Die Löslichkeit in Wasser ist allerdings sehr gering.

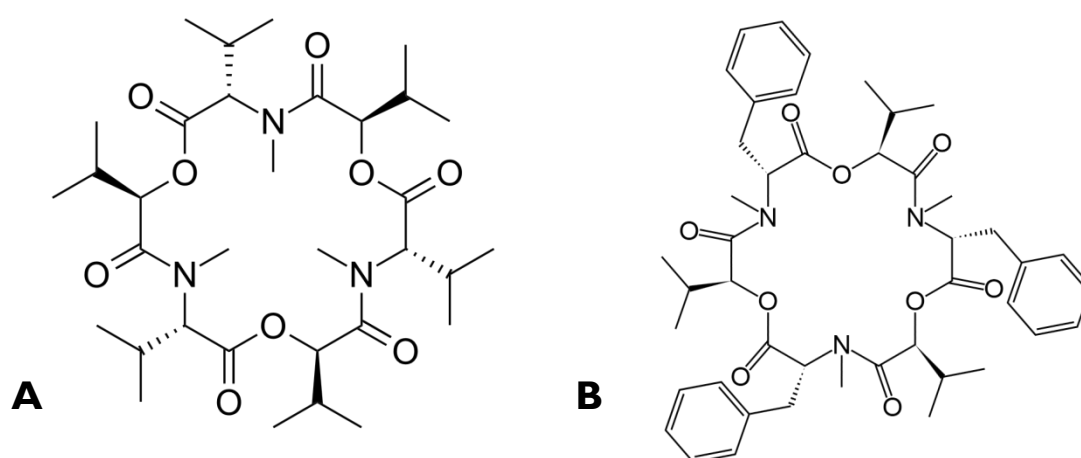


ABBILDUNG 1: CHEMISCHE STRUKTUREN VON (A) ENNIATIN B UND (B) BEAUVERICIN.

2.1.1.2 Wirkung

Zwar steht die Erforschung der Enniatine und Beauvericin noch in einem Frühstadium, doch rückt sie immer mehr in den Fokus einiger Wissenschaftler, die das Potential dieser und verwandter Substanzen erkannt haben.

Die starke Hydrophobie erlaubt den Substanzen das Inkorporieren in Zellmembranen, der hydrophile Teilcharakter bildet die Pore für Kationen, meist in Form von 2:1 und 3:2 Sandwich-Komplexen, während 1:1 Komplexe biologisch nicht von Bedeutung

sind.¹⁵ Aufgrund dieses sehr unspezifischen Mechanismus wurden toxische Wirkungen gegen verschiedenste Zellen beschrieben: neben einem zytotoxischen Effekt sind auch phytotoxische, insektizide, antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische, anthelminthische und fungizide Wirkungen im Gespräch. Und auch synergistische Effekte mit etablierten Substanzen wurden nachgewiesen.¹⁶⁻¹⁸

Hauptsächlich kommt es hier zu einem Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum, während das sarkoplasmatische Retikulum eine untergeordnete Rolle spielt.¹⁹ Auch ein Kaliumstrom konnte nachgewiesen werden und wird von einigen sogar als ebenso wichtig angesehen.²⁰

Doch der Ionenstrom selbst scheint nur teilweise für die zytotoxische Aktivität der Substanzen verantwortlich zu sein, vielmehr werden in Folge dessen wohl Signalwege aktiviert die zum apoptotischen Zelltod führen.

Durch Calciumaufnahme in die Mitochondrien kommt es zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. In A549 Zellen wurde die Erhöhung der proapoptotischen Proteine Bax, Bak und p-Bad festgestellt, während der Level des antiapoptotischen Bcl-2 sank. Die Folgen sind die Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung von Caspase 3.²¹⁻²³ Auch viele weitere klassische Apoptosemerkmale, wie Zellschrumpfung, Abbau der DNA, Chromatinkondensation und Bildung von apoptotischen Körperchen, konnten nachgewiesen werden¹³ (siehe 2.4.2 Apoptose).

Das Protein p53 spielt hier zumindest teilweise eine Rolle in der Signalkaskade. Während bei einem ³H-Thymidin-Einbau ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Zellen festgestellt wurde, reagieren die beiden Zelllinien im Vitality-Assay gleich. Dies lässt den Schluss zu, dass die zytostatische Wirkung an p53 gekoppelt ist, während die zytotoxische Wirkung p53-unabhängig verläuft.¹³ Weitere untersuchte Signalwege sind der Erk- und der NF-κB-Signalweg.²⁴

Durch die Calciumaufnahme ist außerdem eine Aktivierung von Blutplättchen möglich. Vor allem BEA steht im Verdacht diesen schon lange als calciumabhängig identifizierten Prozess zu verstärken.²⁵ Weitere untersuchte Effekte sind eine reduzierte Motilität von Spermien²⁶ und eine verminderte Kontraktionskraft im Enddarm, was wohl eine Folge des immer weiter aufrecht erhaltenen Calciumstroms ist.²⁷

Was macht ENN B und BEA nun zu potentiellen neuen Zytostatika? Einerseits ist die Grundvoraussetzung, nämlich eine zytotoxische Wirkung, gegeben^{13,28} und zweitens zeigte sich, dass gesunde Zellen – nämlich normale Fibroblasten und HUVEC (*human umbilical vein*

endothelial cells) – relativ unempfindlich sind.¹³ Weiters ist nach heutigem Wissenstand weder BEA noch ENN B mutagen.²⁹ Doch existieren hier nur sehr einfache *in vitro*-Assays. *In vivo*-Versuche müssen den Beweis erbringen, da der Test auf Mutagenität für ein vollständiges Toxizitätsprofil unabdinglich ist. Eine erhöhte Mutagenität würde bedeuten, dass mehr zufällige Mutationen stattfinden, was wiederum die Chance auf Entartung von Zellen erhöht. Weitere wichtige Ansatzpunkte sind erste nachgewiesene antiangiogene und migrationshindernde Effekte in Zellkultur, an die in dieser Arbeit auch angeschlossen werden soll.²⁸

In geringer Konzentration wirken die Substanzen zwar schwach, aber signifikant proliferierend, mit steigender Konzentration konnten eine Reduktion der DNA-Synthese und ein „cell cycle arrest“ nachgewiesen werden.¹³

Da auch oxidative Schäden, beispielsweise von ROS (*reactive oxygen species*) durch Läsionen an Proteinen und anderen Makromolekülen, zur Apoptose führen können und außerdem einige Fusariumtoxine, wie Desoxynivalenol und Fumonisin B1, bereits für ROS-induzierte Zytotoxizität bekannt sind³⁰⁻³¹, liegt der Verdacht nahe, dass auch die Wirkung von ENN B und BEA zumindest teilweise auf ROS beruht. Tatsächlich wird diese Thematik heiß diskutiert. Einerseits konnte eine erhöhte H₂O₂-Produktion durch BEA bei gleichzeitig verringerter Aktivität des H₂O₂-abbauenden Enzyms Katalase³² und auch eine erhöhte ROS-Produktion in CHO-K1-Zellen (Abkömmlinge der *chinese hamster ovary* Zelllinie, die zu den wichtigsten Zelllinien der medizinischen und biologischen Forschung zählt) nachgewiesen werden.³¹ Andererseits konnte in einer anderen Studie in drei etablierten ROS-Assays in Krebszelllinien kein Anstieg an ROS festgestellt werden.³³

In der Tat scheint ROS keine aktive Rolle beim Zelltod durch ENN B und BEA zu spielen, sondern nur die Konsequenz davon zu sein.²⁹ Die beiden Substanzen weisen in Zellkulturversuchen sogar antioxidative Fähigkeiten auf, so schützen sie vorbehandelte Zelllinien vor H₂O₂-induzierter Zytotoxizität. Hier ist also ein weiterer Ansatz für ein interessantes Forschungsthema gefunden. Zugleich konnten direkte DNA-Strangbrüche ausgeschlossen werden.³³

Auch Wechselwirkungen mit *ATP binding cassette*(ABC)-Transportern sind ein wichtiges Forschungsthema beim Auffinden von Zytostatika. Sie zählen durch ihre Fähigkeit, niedermolekulare Stoffe aus der Zelle auszuschleusen und dadurch die intrazelluläre Zytostatikakonzentration abzusenken, zu den wichtigsten Schutzmechanismen von Krebszellen. Die Tatsache, dass trotz der hohen Lipophilie die perorale Bioverfügbarkeit von

ENN und BEA in Vergleich zur intraperitonealen Gabe relativ niedrig ist³⁴, legt den Verdacht nahe, dass sie Substrate derartiger Pumpen sind. Und tatsächlich wurden sie in verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten als Substrat von ABCG₂, ABCB₁ und Pdr5p – einem ABCB₁ nahestehenden Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* – identifiziert.³⁵⁻³⁶

Weiters sind beide Substanzen – BEA stärker als ENN B – auch Hemmer der beiden ABC-Transporter.³⁵ Diese modulierende Eigenschaft könnte die Resorption anderer Nahrungsbestandteile und Medikamente beeinflussen. Bei starker Belastung der Nahrung würde auch dies möglicherweise ein Problem darstellen.

Vor allem BEA wurde als sehr starker Hemmer des Enzyms Acetyl-CoA-Acetyltransferase, welches in Verbindung mit Atherosklerose steht, identifiziert.³⁷ In der Traditionellen Chinesischen Medizin finden BEA-Tabletten schon lange als Blutholesterinsenker Anwendung.

ENN B wiederum ist bereits als Lokalantibiotikum im Einsatz. Eine Mischung verschiedener Enniatine in genau definierter Menge bildet das Kombinationsarzneimittel Fusafungin. Es wird bei Nasen-Rachen-Beschwerden und Infektionen im oberen Atemtrakt angewendet und ist wirksam gegen grampositive Bakterien.³⁸⁻³⁹

Tierversuche wurden bisher nur sehr wenige durchgeführt und diese wiederum meist in Kombination mit anderen Fusariumtoxinen, wie Aflatoxinen, Desoxynivalenol und anderen, weswegen die Aussagekraft zu ENN B und BEA als Einzelsubstanzen sehr gering ist. Hühner sind anscheinend relativ unsensibel gegenüber Fusariumtoxinen, es konnte keine akute Toxizität von BEA festgestellt werden.⁴⁰ Es müssen in Zukunft noch mit verschiedenen Tierarten Studien durchgeführt werden, humane Studien fehlen bisher komplett.

2.1.2 Weitere antikarzinogene Cyclodepsipeptide

Aus der beinahe unüberschaubaren Menge an Strukturverwandten von ENN und BEA sind einige bereits deutlich weiter fortgeschritten in ihrer Erforschung. Eine Handvoll wird sogar schon klinisch untersucht, die meisten davon mit der Indikation Krebs.

Kahalalid F ist ein Cyclodepsipeptid aus Grünalgen und Weichtieren, welches in Phase I- und Phase II-Studien gute Erfolge bei Prostatakarzinom und anderen fortgeschrittenen Malignomen zeigt. Ähnlich wie ENN B und BEA weist es eine geringe Toxizität bei gesunden Zellen bei gleichzeitig guter Wirkung gegen Krebszellen auf.⁴¹⁻⁴³

Auch Aplidin⁴⁴ wurde bereits klinisch an Krebspatienten getestet, Romidepsin sogar kürzlich von der FDA für peripheres T-Zell-Lymphom zugelassen.⁴⁵⁻⁴⁸

2.2. Proteinkinasen

Die Proteinkinasen – im Menschen sind 518 verschiedene bekannt⁴⁹⁻⁵⁰ – sind Enzyme, die in der Lage sind, andere Proteine an funktionellen Gruppen ihrer Aminosäurereste zu phosphorylieren, also eine Phosphatgruppe (PO_4^{3-}) anzuhängen. Sie können eine Zellmembran durchspannen (Zelloberflächenproteinkinasen) oder sich im Zytoplasma befinden (intrazelluläre Proteinkinasen), wobei sie dort entweder frei (z.B. Raf, MEK) oder an Membranen gebunden (z.B. Ras, PIP_2) vorkommen.⁵¹

Als Angriffspunkt in Frage kommen die alkoholischen Aminosäuren Serin und Threonin, die phenolische Aminosäure Tyrosin und – seltener – die basische Aminosäure Histidin mit einem Imidazolring. Je nachdem, an welcher Aminosäure die Proteinkinase angreift, können somit sowohl diese (z.B. Serinkinase, Tyrosinkinase) als auch ihre Inhibitoren (z.B. Serinkinaseinhibitor, Tyrosinkinaseinhibitor) näher unterteilt werden.⁵¹⁻⁵²

Zelloberflächenproteinkinasen bestehen aus 3 Teilen:

- einem **extrazellulären** Teil mit Ligandenbindungsstelle, der durch einen hydrophilen Signalstoff, der die Membran nicht durchdringen kann und deshalb über einen Rezeptor von außen wirkt, aktiviert wird,
- einer **Transmembranregion**, die eben jenes Signal durch allosterische Konformationsänderung nach innen weitergibt und somit die Membran überbrückt und
- einem **intrazellulären** Teil mit katalytischer Domäne, der eine Reaktion auslöst, zum Beispiel die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes im Fall einer Tyrosinkinase.⁵²

Meist bilden sich nach Ligandenbindung über unterschiedliche molekulare Mechanismen Dimere zweier unterschiedlicher, aber verwandter Rezeptoren (*Heterodimere*) oder zweier gleicher Rezeptoren (*Homodimere*), die sich gegenseitig durch Phosphorylierung aktivieren (*Autophosphorylierung*, *Autoaktivierung*).

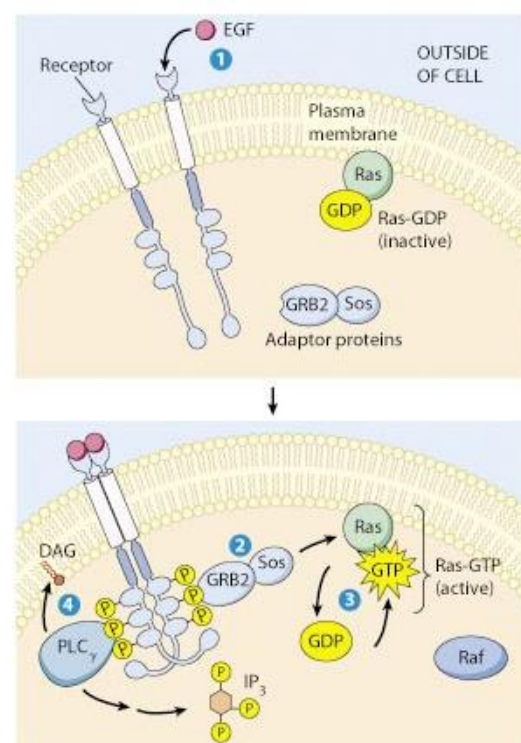


ABBILDUNG 2: MECHANISMUS DER AUTOPHOSPHORYLIERUNG AM BEISPIEL DES EGF-REZEPTORS.⁵³

Durch diese erstmalige Aktivierung wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die sich über etliche intrazelluläre Kinasen erstreckt, welche nach eigener Aktivierung wiederum die nächste Kinase aktivieren. Durch hohe Substratspezifität ist es auch hier noch möglich, einen geordneten Ablauf innerhalb der Signalkaskade zu garantieren und schließlich im Zellkern bei einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren zu münden.⁵¹

Die tatsächliche Auswirkung ist abhängig vom jeweiligen Rezeptor. Beispielsweise kann die Transkription eines Wachstumsfaktors resultieren, was somit bei einer Überaktivität das Wachstum eines Tumors begünstigt oder diesen erst entstehen lässt.⁵²

Der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGF-Rezeptor)

Da alle vier in der Studie verwendeten Proteinkinaseinhibitoren den EGF-Rezeptor entweder direkt blockieren oder zumindest in seine Signalwege eingreifen, soll hier etwas näher auf ihn und seine Signalwege als Prototyp für Zelloberflächenproteinkinasen eingegangen werden.

Die EGF-Rezeptorfamilie besteht aus vier Mitgliedern, die jeweils Tyrosinkinaseaktivität besitzen: HER1/ErbB1 (oder einfach EGFR), HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4.⁵⁴⁻⁵⁵ Nach Ligandenbindung oder toxischer Stimuli wie UV-Licht werden Hetero- oder Homodimere gebildet. Diese phosphorylieren nun jeweils Effektorproteine wie Grb2, welche alle eine SH2-Einheit enthalten. Grb2 wiederum bindet und aktiviert den Austauschfaktor SOS, welcher nun bei Ras den Austausch von GDP zu GTP katalysiert und somit zu einer Aktivierung führt. Über weitere Effektorproteine kann es zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen (MAPK) ERK oder JNK kommen, welche ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun, AP-1 und ELK-1 aktivieren, die zur Bildung von proliferationsfördernden Proteinen führen. Der MAPK/ERK-Pathway ist wohl der bekannteste und meistbeschriebene Signalweg in der modernen Zellbiologie.

Doch wie in Abbildung 3 zu sehen ist, sind auch noch weitere Signalwege erforscht, beispielsweise ein Ca^{2+} -release aus dem ER über IP_3 . Und gerade die Vielzahl verschiedener Signalwege erklärt einleuchtend, wieso der EGF-Rezeptor so pleiotrope und sogar teils widersprüchliche Effekte haben kann, wie Angiogenese, Apoptose, Migration und Adhäsion.⁵⁵

Ras gehört zu den häufigsten Onkogenen (Gene, die die Tumorentstehung fördern) menschlicher Tumoren. Eine Punktmutation im ras-Gen reicht schon aus, um die GTPase-Aktivität des kleinen G-Proteins abzuschwächen oder gänzlich auszuschalten, was dazu führt, dass die aktive GTP-bindende Form nicht mehr inaktiviert werden kann und

Wachstumssignale unkontrolliert weitergegeben werden, auch wenn gar keine vorhanden sind. Ebenso die für den EGF-Rezeptor selbst codierende DNA-Region gilt als Proto-Onkogen, also als gesundes Gen, das durch eine Mutation zu einem tumorauslösenden Onkogen wird. Dieses enthält keine extrazelluläre Domäne, wodurch die katalytische Domäne konstitutiv aktiv ist.⁵⁶

In der modernen Krebstherapie werden prädiktive Biomarker verwendet. Beim Einsatz des humanen monoklonalen EGFR-Antikörpers Panitumumab wurde als Erstes eine Analyse des für KRAS (ein Protein aus der Ras-Familie) codierenden Gens in die Fachinformation aufgenommen. Hierdurch kann eine unnötige Antikörpertherapie verhindert werden, denn Panitumumab wäre wirkungslos – aber natürlich trotzdem genauso nebenwirkungsreich – wenn der Tumor in einem nachgeschalteten Effektorprotein begründet wäre.

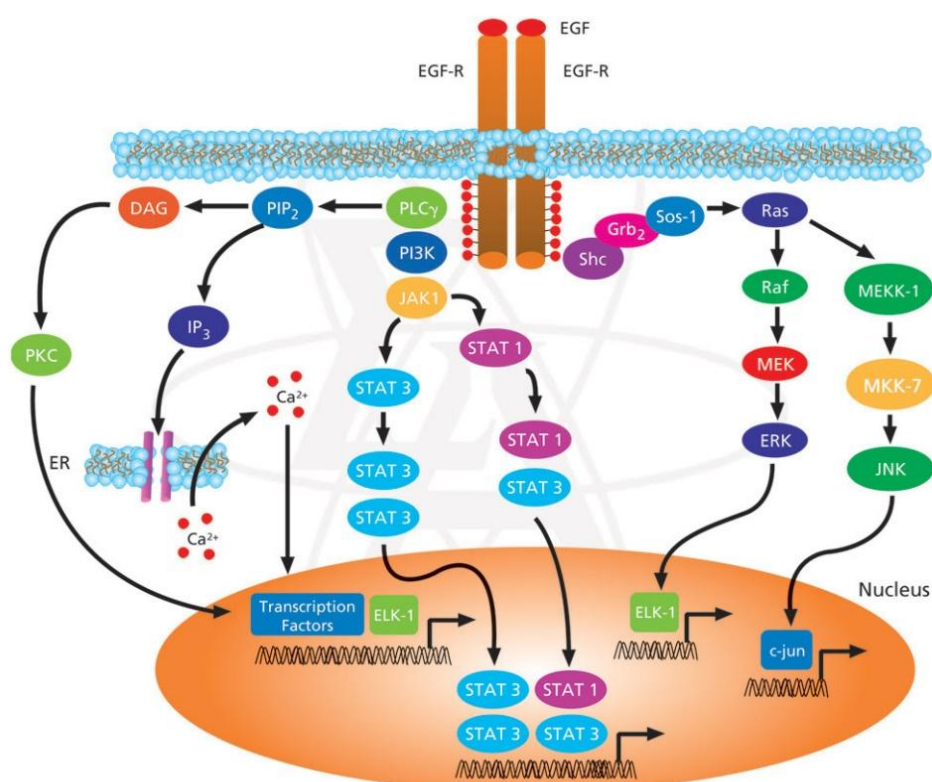


ABBILDUNG 3: DIE VERSCHIEDENEN PATHWAYS DES EGF-REZEPTORS.⁵⁷

2.2.1 Proteinkinaseinhibitoren

Die Gemeinsamkeit dieser chemisch strukturell sehr diversen Gruppe von Substanzen besteht in ihrer Fähigkeit Proteinkinasen zu inhibieren. Ihr Einsatz ist von Interesse, da bei vielen Tumoren ein Ungleichgewicht zwischen Phosphorylierung durch Kinasen und Desphosphorylierung durch ihre Gegenspieler – die Phosphatasen – besteht. Dieses

Ungleichgewicht kann zum Beispiel durch eine Mutation der Proteinkinase begründet sein, welche dadurch dauerhaft aktiv ist, und nicht nur bei Aktivierung durch einen entsprechenden Signalstoff, wie es eigentlich von der Natur vorgesehen ist. Daher sind viele Proteinkinasen – wie schon beim EGF-Rezeptor besprochen – Proto-Onkogene, die durch eine entsprechende Mutation zum Onkogen werden.^{56,58}

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteinkinaseinhibitoren sind „small molecules“ – also kleine Moleküle – es gibt aber auch wesentlich größere Vertreter wie beispielsweise Bevacizumab oder Cetuximab, welche monoklonale Antikörper sind.

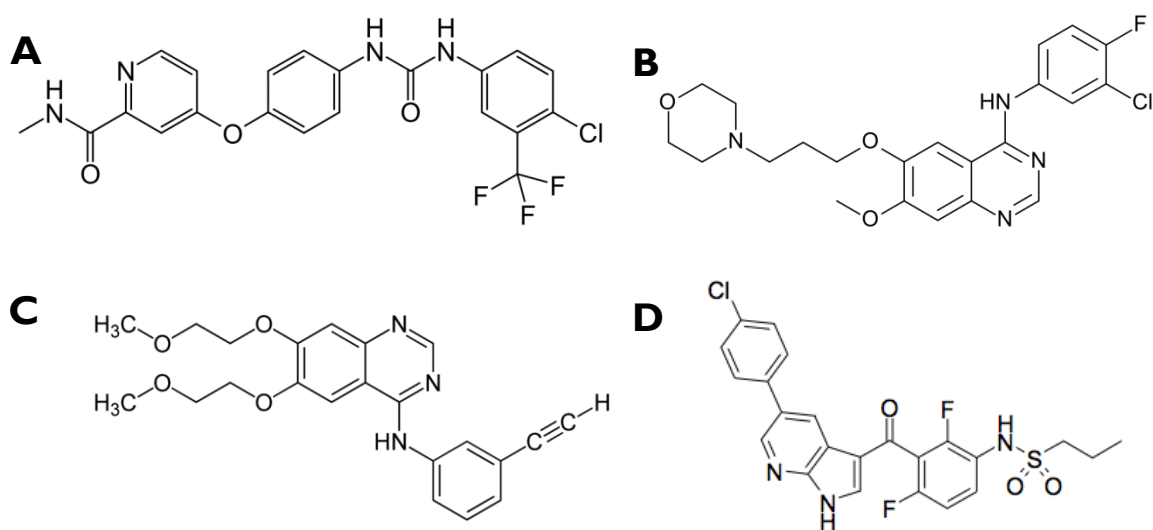


ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUREN VON (A) SORAFENIB, (B) GEFITINIB, (C) ERLOTINIB UND (D) VEMURAFENIB.⁵⁹

2.2.1.1 Sorafenib

Sorafenib, kurz Sora, (Nexavar®) von Bayer Pharma AG wurde 2006 in der EU zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms bei Versagen von Interferon alfa oder Interleukin 2 und später auch für nicht mehr reserzierbares hepatozelluläres Karzinom als Medikament mit Orphan-Drug-Status zugelassen. Seine Effektivität wurde in placebokontrollierten Doppelblindstudien bestätigt. Die Überlebensrate bei Nierenzellkarzinom beträgt 19.3 Monate (im Vergleich zu 15.9 Monaten unter Placebo), bei hepatozellulärem Karzinom 10.7 Monate (im Vergleich zu 7.9 Monaten unter Placebo).⁶⁰

Es ist ein Multikinasehemmer, der nicht nur Oberflächenkinasen wie VEGF-Rezeptor 1-3, PDGF-Rezeptor β , KIT, Ret und FLT-3 hemmt, sondern auch intrazelluläre Proteinkinasen wie C-Raf, B-Raf (Isoformen von Raf) und mutiertes B-Raf, wichtige Zwischenstufen im MAP-Kinase-Signalweg.⁴⁹

Die Nebenwirkungen betreffen größtenteils das kardiovaskuläre System. Herzischämien, Herzinfarkte und erhöhter Blutdruck dürften auf die VEGFR-Inhibierung zurückzuführen

sein, da diese auch bei Sunitinib und Bevacizumab aufscheinen.⁶¹ Lymphopenie tritt bei mehr als 10 % der Patienten auf, außerdem Hypophosphatämie, Diarrhoe und Alopezie.⁶⁰

Die Gabe von Nexavar® erfolgt oral als Tablette, 2x200 mg, zweimal pro Tag ohne Essen, da dieses die Bioverfügbarkeit senken kann.^{49,60} Sorafenib wird nur zu geringen Teilen von CYP3A4 und UGT1A9 metabolisiert, der Großteil wird unverändert ausgeschieden. Die Plasmaproteinbindung ist mit 99.5 % sehr hoch.⁴⁹ Außerdem ist es ein Substrat von P-gp.⁶²

2.2.1.2 Gefitinib

Gefitinib (Iressa®) von AstraZeneca AB wurde 2009 in der EU zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierenden nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) zugelassen.^{49,63} In einer Studie wurde die Effektivität gegenüber Carboplatin/Paclitaxel bestätigt. Bei Patienten mit EGFR-Mutationen beträgt das verschlechterungsfreie Intervall 9.5 Monate (im Vergleich zu 6 Monaten mit Carboplatin/Paclitaxel).⁶³

Es handelt sich um einen reversiblen EGFR(HER1)-Hemmer. Die Therapie ist nur wirksam bei EGFR-Mutationen, welche allerdings viele NSCL-Tumore aufweisen.

Außer den klassischen Nebenwirkungen, wie Rash (Hautausschlag), Diarrhoe, Appetitlosigkeit und Übelkeit⁶³⁻⁶⁴, besteht auch noch die Gefahr des Auftretens einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD), die sehr gefährliche Auswirkungen haben kann.^{63,65-66} Obendrein sind Leberschäden möglich.^{63,67}

Die Gabe von Iressa® erfolgt einmal täglich oral als Tablette entsprechend 250 mg. Die Bioverfügbarkeit beträgt etwa 57 %⁶⁸ und die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich über CYP3A4. Bei Rauchern werden durch das überregulierte CYP1A1 weitere Metabolite gebildet, die im Verdacht stehen für die ILD mitverantwortlich zu sein. Gefitinib ist außerdem ein Substrat von BCRP, was allerdings in höheren Dosen nicht relevant zu sein scheint und ein Inhibitor von BCRP und P-gp.⁴⁹

2.2.1.3 Erlotinib

Erlotinib (Tarceva®) von Roche Registration Ltd. wurde in der EU 2005 zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) und 2007 zusätzlich zur Therapie von pankreatischen Neoplasien in Kombination mit Gemcitabin zugelassen.^{49,69-70}

Eine placebokontrollierte Studie an Non-Respondern von mindestens einer vorhergehenden chemotherapeutischen Intervention zeigte eine durchschnittliche Überlebensrate von 8.6 Monaten bei EGFR-Mutanten (im Vergleich zu 5 Monaten bei EGFR-Gesunden und 4.7 Monaten unter Placebo).⁷⁰

In einer placebokontrollierten Studie von Erlotinib/Gemcitabin bei Pankreastumoren zeigte sich eine Zeitspanne von 5.9 Monaten ohne Verschlechterung der Symptome (im Vergleich zu 5.1 Monaten unter Placebo), allerdings nur unter jenen Patienten ohne Metastasen.⁷⁰

Wie Gefitinib ist auch Erlotinib ein reversibler EGFR(HER1)-Hemmer, der ebenfalls nur bei EGFR-Mutationen wirksam ist.

Durch die nahe Verwandtschaft im Wirkmechanismus zu Gefitinib sind auch die Nebenwirkungen ähnlich. Hier wird ebenso von Rash, Diarrhoe, Appetitlosigkeit und Leberschäden berichtet.⁷⁰⁻⁷¹ Letztere können bei Erlotinib allerdings noch deutlich verheerender sein und bis zum Tod führen. Das Symptom Rash soll mit der Wirksamkeit der Therapie korrelieren.⁴⁹

Die Gabe von Tarceva® erfolgt oral als Tablette welche in verschiedenen Dosen erhältlich ist: 25, 100 und 150 mg. Die Tagesdosis bei NSCLC beträgt 150 mg, bei Pankreaskrebs 100 mg. Das Medikament sollte nicht mit dem Essen eingenommen werden, da hier die Bioverfügbarkeit nahezu 100 % beträgt und die Gefahr einer Intoxikation besteht. Außerdem sollte der Patient aufgrund schwankender Blutspiegel, die mit der Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 assoziiert sind, mit dem Rauchen aufhören. Ansonsten erfolgt die Metabolisierung hauptsächlich über CYP3A4. Erlotinib ist sowohl Substrat als auch Inhibitor von P-gp und BCRP.^{49,70}

2.2.1.4 Vemurafenib

Vemurafenib, auch PLX4032, (Zelboraf®) von Roche Registration Ltd. wurde 2012 in der EU zur Behandlung des metastasierenden oder nicht operativ entfernbaren Melanoms zugelassen.⁷² Eine Studie ergab eine Überlebenszeit von 13.2 Monaten (im Vergleich zu 9.9 Monaten unter Dacarbazin). Das verschlechterungsfreie Intervall betrug 5.3 Monate (im Vergleich zu 1.6 Monaten unter Dacarbazin).⁷²

Es handelt sich um einen spezifischen B-Raf-Inhibitor, der allerdings nur bei B-Raf-V600E-positiven Melanomen wirksam ist und daher auch nur bei diesen eingesetzt werden darf. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation an Position 600 von Valin (V) zu Glutaminsäure (E), welche bei jedem zweiten malignen Melanom vorliegt.⁷³ Da es sich bei B-Raf-Inhibitoren um eine sehr neue Gruppe von Arzneimitteln handelt – B-Raf wurde erst 2002 als Onkogen identifiziert – ist die erste Generation, obwohl sehr wirksam, noch sehr anfällig für Resistenzmechanismen.⁷⁴

Die Nebenwirkungen umfassen Gelenksschmerzen, Müdigkeit, Rash, und Pruritus. Es

kommt außerdem bei 20 % der Patienten zu Plattenepithelkarzinomen als Folge der Arzneimittelgabe, welche allerdings relativ gut operativ entfernt werden können und deshalb in Kauf genommen werden.⁷²

Die Gabe von Zelboraf® erfolgt oral als Tablette, 4x240 mg, zweimal täglich.

2.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein basaler Aspekt des Lebens. Jeder mehrzellige Organismus kann in seiner Form nur bestehen, weil er von der Befruchtung an unzählige Zyklen durchgegangen und dabei jeweils eine exakte Kopie einer Zelle hergestellt hat, die sich erst daraufhin spezialisieren kann. Auch einzellige Organismen sind auf eine Zellteilung angewiesen, da nur so ihre Fortpflanzung und so das Fortbestehen der Spezies ermöglicht werden kann.

2.3.1 Ablauf

Der Zellzyklus wird grob in die Mitose- oder M-Phase und in die Interphase eingeteilt. Ein kompletter Zellzyklus bei höheren eukaryotischen Zellen, wozu auch Tumorzellen zählen, dauert zirka 24 Stunden, wobei die M-Phase zwar nur 30 Minuten bis 1 Stunde beansprucht, in ihr aber trotzdem die deutlichsten Veränderungen der Zelle stattfinden – nämlich die Verdoppelung von Zelle und Kern.⁵¹⁻⁵² Sie kann noch genauer eingeteilt werden, nämlich in:

- **Prophase:** die Zentrosomen – für die Zellteilung wesentliche Zellorganellen, deren Hauptstruktur jeweils ein Zentriolenpaar aus Mikrotubuli ist – wandern an unterschiedliche Pole der Zelle; die Chromosomen kondensieren und sind nun lichtmikroskopisch sichtbar;
- **Prometaphase:** die Kernhülle löst sich auf und die Chromosomen sind nun für die Spindelfasern des Spindelapparates, welcher von den Zentrosomen ausgeht, am Zentromer – dem Punkt der die Schwesterchromatiden zusammenhält – fassbar;
- **Metaphase:** die Spindelfasern ordnen die Chromosomen an der Äquatorialebene genau zwischen den Zentriolen an;
- **Anaphase:** die Chromatiden werden auseinandergezogen, sodass im Anschluss jeweils eine Schwesterchromatide eines jeden Chromosoms an jedem Pol vorhanden ist – die Grundlage für die beiden Tochterzellen;
- **Telophase:** die Kernhülle bildet sich wieder; die Chromosomen dekontensieren; der Spindelapparat wird nicht mehr gebraucht und deswegen abgebaut; an der Äquatorialebene bildet sich ein kontraktile Ring als Grundlage für die Zytokinese;
- **Zytokinese:** Teilung der Zelle und des Zytoplasmas.⁷⁵

In der Interphase wachsen beide Zellen nun wieder zu ursprünglicher Größe heran, produzieren Proteine, replizieren ihre DNA und bereiten sich auf den nächsten Zellzyklus vor.

Auch sie kann weiter unterteilt werden in:

- **G₁-Phase** („gap“-Phase): die Lücke zwischen Mitose und S-Phase; die Zelle wächst und synthetisiert Proteine;
- **G₀-Phase**: nicht alle Zellen teilen sich permanent, viele – zum Beispiel differenzierte Zelle wie Neuronen⁵¹ – bleiben auch an einer Stelle des Zellzyklus stehen und verharren in einem Ruhezustand, der G₀-Phase, die über die G₁-Phase erreicht wird. Die Zelle kann aber, wenn die Bedingungen geeignet sind, auch wieder in den normalen Zellzyklus eintreten;
- **S-Phase** (Synthese-Phase): Replikation der DNA, die Chromosomenanzahl bleibt gleich, aber die Chromatiden werden verdoppelt;
- **G₂-Phase**: zweite „gap“-Phase; vor Beginn der nächsten Zellteilung muss die DNA auf Unversehrtheit kontrolliert und eine entsprechende Zellgröße erreicht werden.⁵¹

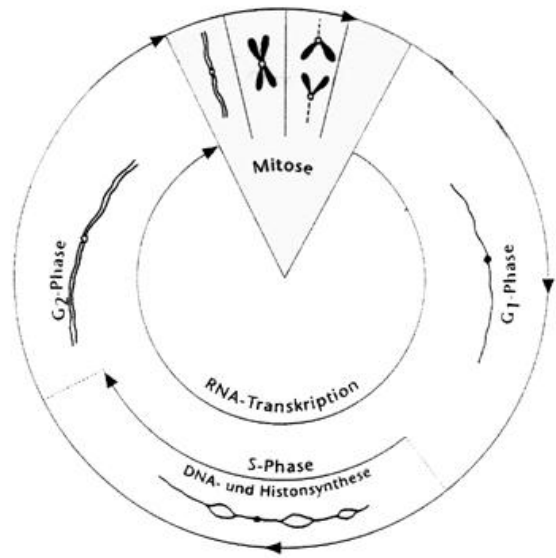


ABBILDUNG 5: ZELLYKLUS SCHEMATISCH, G_0 IST NICHT EINGEZEICHNET.⁷⁶

2.3.2 Regulation

Wenn man die Wichtigkeit des Zellzyklus bedenkt und sich der Komplexität der Organisation einer Zelle, der Größe und des Aufbaus der DNA bewusst wird, ist es selbstverständlich, dass hier vielschichtige Regulationsmechanismen notwendig sind, einerseits um Mutationen zu verhindern oder zumindest möglichst gering zu halten – jede Mutation birgt das Risiko der Entstehung von entarteten Zellen – und andererseits um den zeitlichen und organisatorischen Ablauf des Zellzyklus in korrekter Weise sicherzustellen.

Es gibt wichtige Kontrollpunkte im Zellzyklus, vor allem jene am Ende einer Phase. Sie müssen passiert werden und erst nach positiver Überprüfung darf in die nächste Phase eingetreten werden. So müssen DNA-Schäden ausgeschlossen und mitogene Signale vorhanden sein.⁷⁵

Die wichtigsten Regulationsproteine sind wohl jene der Cyclin-Familie. Wie der Name schon vermuten lässt, erleben sie während eines Zellzyklus Hoch- und Tiefzeiten. Wann diese sind, variiert zwischen den mindestens 8 bekannten Cyclinen. So hat zum Beispiel

Cyclin B die Aufgabe, die Mitose zu starten. Dementsprechend ist seine Konzentration während der G₁-Phase noch sehr gering, ab der S-Phase steigt sie kontinuierlich an und erreicht am Ende der G₂-Phase ihren Höhepunkt. Sobald die Mitose begonnen hat, ist seine Aufgabe erledigt, Cyclin B wird noch während der M-Phase wieder abgebaut. Auf diese Weise begleiten auch die anderen Cycline mit ihrer ganz speziellen Sequenz den Zellzyklus.^{51,75}

Die Wirkung der Cycline beruht auf einer Komplexbildung mit CDKs (*cycline dependent kinases*), die ständig in gleicher Konzentration vorliegen, aber ungebunden unwirksam sind. Für ihre Wirksamkeit sind außerdem mehrere Phosphorylierungsschritte und Dephosphorylierungen jeweils an ganz bestimmten Stellen notwendig, die von einer Reihe von Enzymen vorgenommen werden. Diese Vielzahl an Schritten, die notwendig ist bis CDK endlich wirken kann – dies geschieht unter anderem über Phosphorylierung von Histonen und Fragmentierung der Kernlamina –, zeigt schon wie akribisch hier gearbeitet wird.^{51,75}

Aber auch an den anderen Phasenübergängen sind Cyclin/CDK-Komplexe beteiligt. Bei Vorhandensein von genügend Wachstumsfaktoren in der G₁-Phase – eine ausreichende Zellgröße ist ein wichtiger Faktor, der erfüllt werden muss, damit mit der DNA-Synthese begonnen werden darf – wird die Synthese von Cyclin D drastisch erhöht, welches im Komplex mit CDK4 oder 6 das Retinoblastom-Protein (Rb) phosphoryliert. Rb ist im unphosphorylierten Zustand ein Hemmer der Transkription von S-Phase-Genen. Diese können nun produziert werden, wodurch die S-Phase eingeleitet wird.⁵¹⁻⁵²

Ein anderer wichtiger Regulator ist p53 (ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa). Er wird bei DNA-Veränderungen beispielsweise nach Strahlung vermehrt exprimiert und wirkt einerseits direkt durch Herabsetzung der Polymeraseaktivität und andererseits indirekt als Transkriptionsfaktor für p21 und bax.

P21 ist ein Inhibitor für CDK4 und 2, die in der späten G₁- bzw. S-Phase aktiv sind.⁵¹ Es wirkt also antiproliferativ und verschafft der Zelle auf diese Weise mehr Zeit um die geschädigte DNA zu reparieren. Bax wiederum ist ein proapoptotisches Protein, das im intrinsischen Signalweg Bedeutung hat (siehe 2.4.2.2 Intrinsischer Weg). Sind die Schäden im Erbgut nicht mehr reparabel, wird die Zelle zum Wohl des Organismus geopfert.⁵²

Rb und p53 sind also zwei wichtige Beispiele für Tumorsuppressoren. Defekte sind direkt mit Tumorerkrankungen assoziiert, da sich diese durch eine erhöhte Zellteilungsrate auszeichnen. Wenn sie in der Zelle nicht vorhanden sind, ist die Gefahr zur Entwicklung und zum Überleben eines Tumors deutlich höher. So finden sich bei mehr als 50 % aller

Neoplasien Veränderungen im p53-Gen. Auch in der HeLa-Zelllinie, deren Abkömmling KB-3-I in dieser Arbeit verwendet wurde, ist p53 verändert.^{51,77}

2.4 Zelltod

Da der Zellzyklus auch im ausgewachsenen Organismus unentbehrlich ist – man bedenke zum Beispiel die Schleimhäute oder die Blutzellen, welche täglich in billionenfacher Menge produziert werden –, muss als Konsequenz auch der Zelltod eine Rolle spielen, da die Zellzahl in Grenzen gehalten werden soll.

2.4.1 Nekrose

Die Nekrose beschreibt den pathophysiologischen Weg des Zelltodes. Sie wird etwa



ABBILDUNG 6: NEKROSE.⁷⁸

IN DER PATHOLOGIE BEZEICHNET NEKROSE DIE MAKROSKOPISCH SICHTBAREN FOLGEN DES ABSTERBENS VIELER ZELLEN, Z.B. INFOLGE EINER ISCHÄMIE⁷⁹

durch Umweltgifte, Bakterien oder einfach nur Sauerstoffmangel ausgelöst und ist unerwünscht, da dabei kein kontrollierter Zellabbau stattfindet, sondern die Lyse der Zelle zu einem Freiwerden des Zellinhaltes samt der darin enthaltenen Entzündungsmediatoren führt. Die Folge ist eine lokale Entzündungsreaktion. Auch viele Krankheitsbilder sind mit einem nekrotischen Untergang der Zelle assoziiert,

etwa Gangrän oder Herzinfarkt.^{51,79}

Bei der Tumornekrose handelt es sich um eine ischämische Nekrose von inneren Zellen eines großen Tumors, die nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden können.⁸⁰

2.4.2 Apoptose

Einen ganz anderen Weg beschreitet die Apoptose. Sie ist ein physiologischer, geordneter und energieaufwendiger Mechanismus, um die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod zu ermöglichen, und wird deswegen auch „programmierter Zelltod“ oder „Selbstmordprogramm“ genannt. Als klassische Beispiele hierfür werden gerne die Entfernung der schwimnhautähnlichen Strukturen zwischen den Fingern und Zehen, die zunächst in der Embryonalentwicklung gebildet werden, und das Abfallen des Schwanzes von Kaulquappen während der Metamorphose zum Frosch genannt.⁷⁵

Charakteristische Merkmale der Apoptose sind Zellschrumpfung, DNA-Abbau infolge von Chromatinkondensation, Fragmentierung von Kern und schließlich der ganzen Zelle, wobei

die Plasmamembran im Gegensatz zur Nekrose funktionstüchtig bleibt. Kleine Zellbruchstücke lösen sich als sogenannte „apoptotische Körperchen“ ab. Schließlich zerfällt so die komplette Zelle in kleinere Einheiten, die von Phagozyten aufgenommen und eliminiert werden können.⁵¹

Die Apoptose kann von außen ausgelöst werden (*extrinsisch*) oder auf inneren Prozessen beruhen (*intrinsisch*). In jedem Fall ist aber eine Signalkaskade, die ähnlich funktioniert, wie in 2.2. Proteinkinasen beschrieben, die Folge. Die aktivierten zytosolischen Proteine sind hierbei Caspasen, „cysteiny-l-aspartate specific proteases“ – also cysteinhältige, C-terminal von Asparatresten spaltende Proteasen. Sie bewirken als wichtigste apoptotische Enzyme nicht nur die Aktivierung von Nukleasen, wie CAD (*caspase activated DNase*), die die DNA abbauen, sondern spalten auch selbst strukturelle Einheiten der Zelle, wie Aktin und Lamin. Eine weitere Wirkung ist die Ausschaltung von Reparaturmechanismen, wie PARP (*Poly-ADP-Ribose-Polymerase*), der zu „cleaved PARP“ gespalten wird und somit in der Molekularbiologie gerne als Marker für Apoptose benutzt wird.⁸²

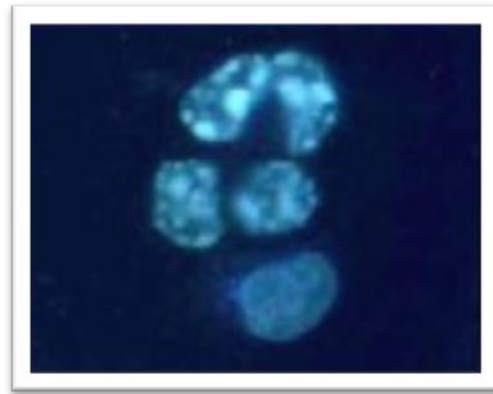


ABBILDUNG 7: DIE BILDUNG APOPTOTISCHER KÖRPERCHEN KANN MITTELS DAPI-FÄRBUNG SICHTBAR GEMACHT WERDEN.⁸¹

2.4.2.1 Extrinsischer Weg

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Liganden, wie TNF, Fas-L(igand), TRAIL oder Apo, ausgelöst, welcher an der Zelloberfläche an Rezeptoren, wie Fas-Rezeptor, TNF-Rezeptor, TRAIL-Rezeptor-1 und 2 oder TRADD, bindet. Der Fas-Rezeptor etwa, der unter anderem bei Virusinfektion exprimiert wird, induziert nach Bindung von Fas-L, der von T-Lymphozyten ausgeschüttet wird, über Effektordomänen wie DD (*death domain*) an der zytosolischen Seite die Aktivierung von der inaktiven Procaspase 8 zu Caspase 8. Diese wiederum aktiviert die Caspasen 3 und 7 und setzt damit den Zelltod in Gang, um somit in diesem Beispiel die virusinfizierte Zelle vernichten.^{51-52,56}

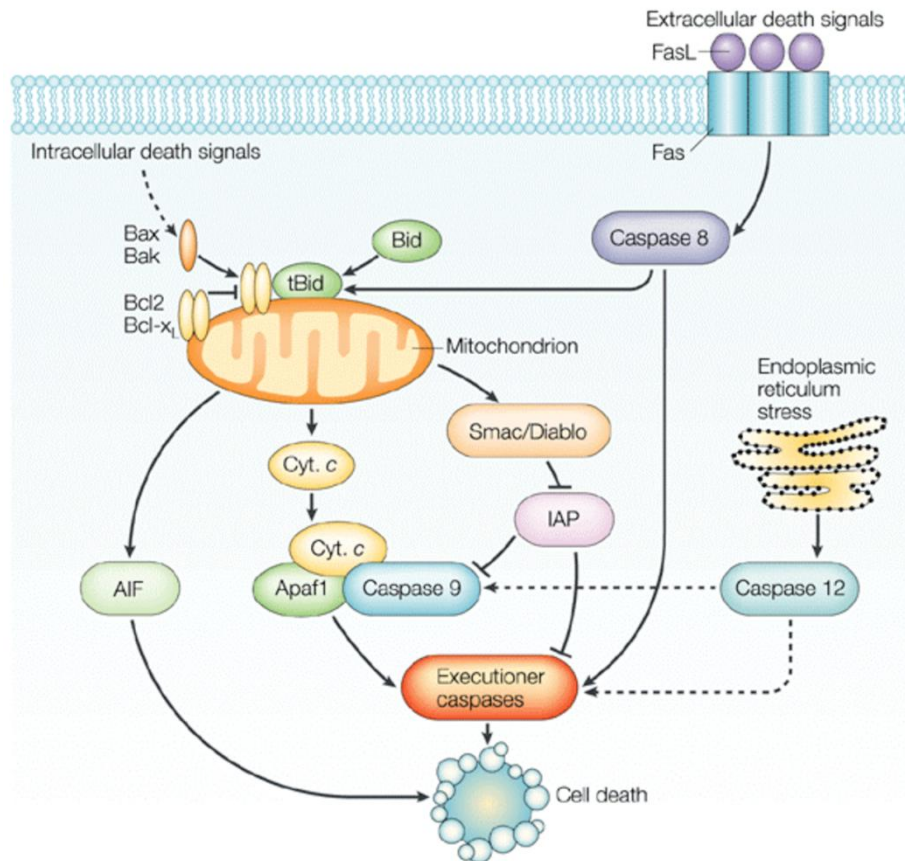


ABBILDUNG 8: DIE DREI SIGNALWEGE DER APOPTOSE:
ER-STRESS UND EXTRINSISCHER UND INTRINSISCHER WEG.⁸³

2.4.2.2 Intrinsischer Weg

Beim intrinsischen Weg spielen vor allem die Mitochondrien eine große Rolle, weswegen er auch mitochondrialer Weg genannt wird.⁵¹ Proteine der Bcl-2-Familie (*B-cell-lymphoma*) beeinflussen das mitochondriale Membranpotential. Bax und Bak wirken pro-, Bcl-2 und Bcl-X_L antiapoptotisch. Das bax-Gen wird beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor p53 transkribiert und das daraus translozierte Bax-Protein bildet an der Mitochondrienmembran Poren, die zu einem Ausstrom von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol führen. Dort bindet Bax APAF-1, welches wiederum mit zwei Molekülen Procaspase 9 den Komplex Apoptosom bildet. Nach Freigabe der aktiven Caspase 9 aktiviert diese die Effektorcaspasen 3 und 7, womit der intrinsische Weg hier in den gemeinsamen apoptotischen Weg mündet.^{52,56,75}

2.4.2.3 Endoplasmatisches Retikulum Stress

Der ER-Stress kann als intrinsischer Signalweg mit Sonderstellung angesehen werden. Er beruht auf einer Akkumulation ungefalteter oder missgefalteter Proteine im

Endoplasmatischen Retikulum (ER), welches neben wichtiger Aufgaben, wie der Speicherung von Calcium und der Lipidbiosynthese⁸⁴, auch als Ort der korrekten Proteinfaltung Bedeutung hat. Nach der Proteinsynthese in den Ribosomen werden diese ins ER eingeschleust, wo die Faltung durch die Anwesenheit von Chaperonen, wie GRP78/BIP, PDI und Calnexin, erleichtert wird. Außerdem ermöglicht das oxidative Milieu die Bildung von Disulfidbrücken.⁸⁵⁻⁸⁶ Hierbei spielen die Proteine Ero1 und PDI eine wichtige Rolle als Katalysatoren in einer Elektronentransportkaskade.

Durch verschiedene äußere Einflüsse wie Hypoxie (Störungen im zellulären RedOx-System), Hypoglykämie (möglicherweise aufgrund von nicht mehr möglicher Proteinglykosylierung) oder virale Infektionen (Überladung des ER mit Virusproteinen und somit Signal an die Zelle, in Apoptose zu gehen, um die Virusinfektion abzuwenden), kann es nun zu Fehlern bei dieser Faltung kommen.⁸⁷ Die Fehlproteine akkumulieren im ER, wodurch bald ein Regulationsmechanismus, der „*unfolded protein response*“ (UPR), aktiviert wird. Inaktive Chaperone binden an transmembranäre Proteine, wie PERK, IRE1 α und ATF6 α , und blockieren diese. Bei erhöhter Fehlproteinkonzentration werden diese Chaperone allerdings aktiv und geben somit auch die Transmembranproteine frei, wodurch diese oligomerisieren und Signalkaskaden gestartet werden können.⁸⁸ Auch eine direkte Aktivierung durch die Fehlproteine wird diskutiert.⁸⁹⁻⁹⁰

Der UPR wird in drei Phasen geteilt.⁹¹ In der Adaptionsphase wird einerseits versucht, das ER von den Fehlproteinen zu reinigen. Dies geschieht durch das ERAD-System (*ER-assisted degradation*). Um diesem System die Arbeit zu erleichtern, wird andererseits auch die Translation neuer Proteine gehemmt, wodurch der Nachstrom gebremst wird. Einzig die Produktion von Chaperonen wird erhöht, welche ihrerseits ja wieder für den Abbau der Proteine verantwortlich sind. In der Alarmphase kommt es über IRE1 α zur Aktivierung von MAP-Kinasen (p38-MAPK und JNK) und anderen zellulären Stressreaktionen. Schlussendlich, wenn die zelluläre Homöostase nicht mehr erreicht werden konnte, kommt es zur Apoptosephase, welche über Aktivierung von Caspase 12 abläuft. Auch eine Caspase-unabhängige Nekrose konnte hier nachgewiesen werden.⁹²

Zentrales Element in den verschiedenen UPR-Hauptpathways ist das apoptosefördernde Protein CHOP, welches von allen drei Armen früher oder später aktiviert wird. Es greift in die Signalkaskade der Bcl-2-Familie zugunsten des proapoptotischen Bim und zuungunsten des antiapoptotischen Bcl-2 ein.⁹³ Weiters führt JNK selbst – CHOP-unabhängig – ebenfalls zur Bim-Aktivierung und Bcl-2-Hemmung.

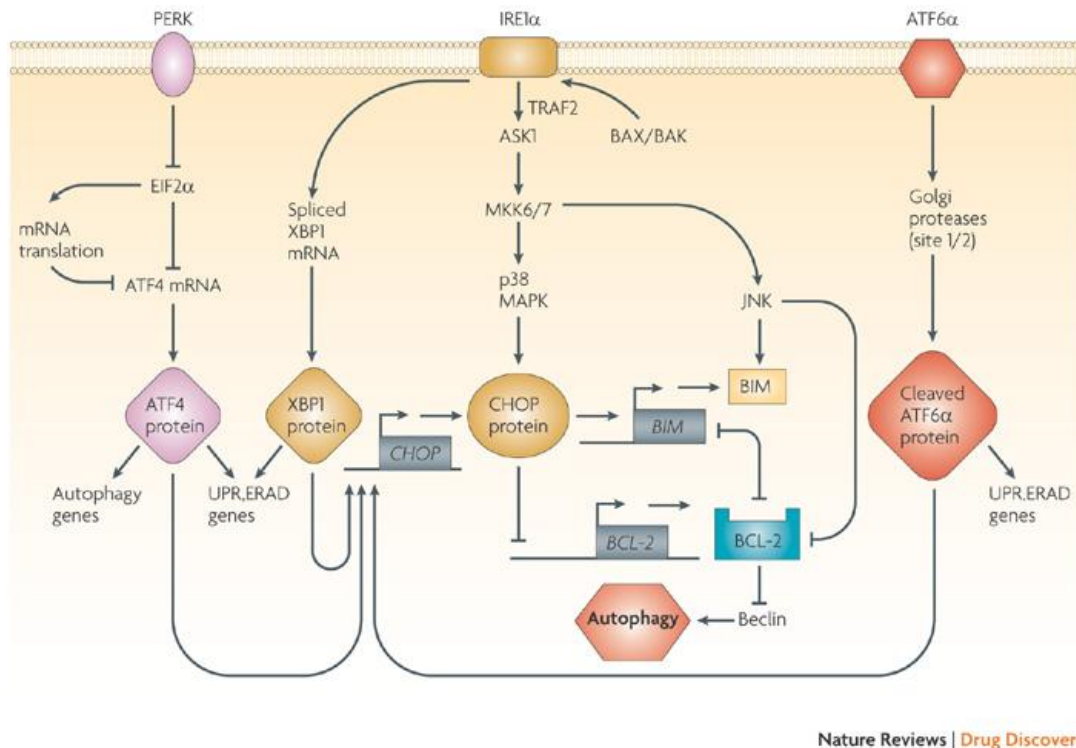


ABBILDUNG 9: HAUPTSIGNALWEGE IM „UNFOLDED PROTEIN RESPONSE“.⁸⁷

Der ER-Stress ist kein typischer Vorgang in Zellen, sondern assoziiert mit verschiedenen Erkrankungen, darunter Alzheimer, Parkinson, Diabetes und auch Krebs.⁸⁷ In Krebszellen können UPR-Proteine vermehrt gefunden werden, was auf Hypoxie, Milieuveränderungen und Störungen in der Proteinsynthese zurückzuführen ist. Durch bis jetzt noch nicht genau geklärte Prozesse schafft es der Tumor anscheinend, sich die grundlegenden überlebensfördernden Eigenschaften des ER-Stresses zunutze zu machen. Allerdings wurde in einer Prostatakrebsstudie auch schon ein verringerter UPR-Level festgestellt, wohl um der Apoptose zu entgehen.⁹⁴

Diese Prozesse scheinen also sehr komplex zu sein und jede Krebsart handhabt sie ein bisschen anders. Doch wäre eine gezielte ER-Stress-fördernde Therapie ein vielversprechender neuer Weg der Chemotherapie. Allerdings muss bis zur erfolgreichen Anwendung entsprechender Substanzen noch ein großer Schritt in der Forschung getan werden, um die tatsächlichen molekularen Mechanismen besser zu verstehen. Tatsächlich sind bereits einige Mittel in Entwicklung oder sogar erhältlich, die den UPR quasi als positiven Nebeneffekt ebenfalls beeinflussen – beispielsweise der Proteasominhibitor Bortezomib, der unter anderem PERK und CHOP aktiviert.⁸⁶

2.5 Neoplasie, Tumor und Krebs

Neoplasien (Neubildungen) bzw. **Tumoren** (Geschwülste) generell zeichnen sich durch eine Störung der gesunden Regulation zwischen Zellteilung (verstärkt) und Zelltod (geschwächt) und folgend durch unkontrolliertes Wachstum aus. Weitere Charakteristika sind ein größerer Zellkern, veränderte Zelloberfläche, Dedifferenzierung, autonomes Arbeiten und häufig auch eine Aneuploidie, also eine Veränderung in der Anzahl der Chromosomen, und die Fähigkeit, Hypoxie zu überleben.

Ein **Malignom** oder **Krebs** wird definiert als „allgemeine Bezeichnung für eine bösartige Geschwulst. Man unterscheidet hauptsächlich das Karzinom (bösartige epitheliale Geschwulst) und das Sarkom (bösartige mesenchymale Geschwulst).“⁹⁵ Dabei sind Karzinome wesentlich häufiger als Sarkome. Als Sonderform gelten Hämoblastosen, wie Leukämien und andere Krebsarten des blutbildenden Systems. Sie werden umgangssprachlich als Blutkrebs bezeichnet. Diese sind nicht solide, sondern wie ihre Ursprungszellen schwimmend.

Eigenschaft	Benigner Tumor	Maligner Tumor
Metastasenbildung	Nein	Ja (metastasierend)
Rezidive	Selten	Ja
Wachstum	Verdrängen umliegendes Gewebe	Wachsen in umliegendes Gewebe invasiv ein (infiltrierend) und zerstören es (destruierend)
Abgrenzung	Gut	Schlecht
Verlauf	Langsam	Schnell
Prognose	Gut	Schlecht

TABELLE 2: VERGLEICH GUTARTIGE UND BÖSARTIGE NEOPLASIEN.

BÖSARTIGE MIT DEN DREI WICHTIGSTENS KRITERIEN: METASTASIERENDES, INFILTRIERENDES UND DESTRUIERENDES WACHSTUM.⁵⁶

Abzugrenzen ist die benigne (gutartige) Geschwulst, die sich in wesentlichen Punkten von der malignen (bösartigen), als Krebs bezeichneten Variante unterscheidet. Wichtiges Differenzierungsmerkmal ist die Fähigkeit Metastasen zu bilden. Dabei handelt es sich um Tochtergeschwülste, die über Abtropfung oder mit Blut (hämatogene-) oder Lymphe (lymphogene Metastasen) im Körper transportiert werden, um an anderen Organen zu einem eigenständigen Krebs heranzuwachsen. Sie werden für bis zu 90 % der Krebstode verantwortlich gemacht.⁹⁶⁻⁹⁸ Interessanterweise sind Metastasen selbst nicht zur Metastasierung befähigt.⁹⁹ Als Voraussetzung für Metastasenbildung des Primärtumors gilt invasives Wachstum, welches definitionsgemäß auch der Unterscheidung dient. Beides

verschlechtert die Prognose drastisch.

Der Fortschritt der Erkrankung kann mittels **TNM-Klassifikation** beschrieben werden:

- **T** steht für die Größe des Primärtumors (T0 bis T4),
- **N** für den Befall von Lymphknoten (lat. *Nodi lymphatici*) (N0 bis N3) und
- **M** für die Bildung von Metastasen (M0 oder M1).

2.5.1 Epidemiologie

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache, was auch mit der relativ hohen **Letalität** – der Sterberate bezogen auf die Erkrankungen - von fast 50 % zu tun hat.¹⁰⁰ Als Risikofaktoren gelten unter anderem hohes Alter, Rauchen (30 %), Ernährung/Übergewicht (30 %), Stress, Infektionen, Hormone, Immunschwäche, Strahlung, Umwelt- und genetische Faktoren.¹⁰¹ Infolgedessen kommt es zu einer Mutation der DNA, was harmlos sein, oder – wenn zufällig ein Proto-Onkogen betroffen ist – zu einem Onkogen führen kann. In vielen Fällen greift hier noch der natürliche Schutz der Zelle, indem diese etwa in die Apoptose geschickt wird, aber im ungünstigen Fall entsteht so ein Tumor.⁵⁶

Die häufigsten Arten von Malignomen (**Prävalenz**) sind in absteigender Reihenfolge: Brust, Prostata, Darm, Gebärmutter, Haut,

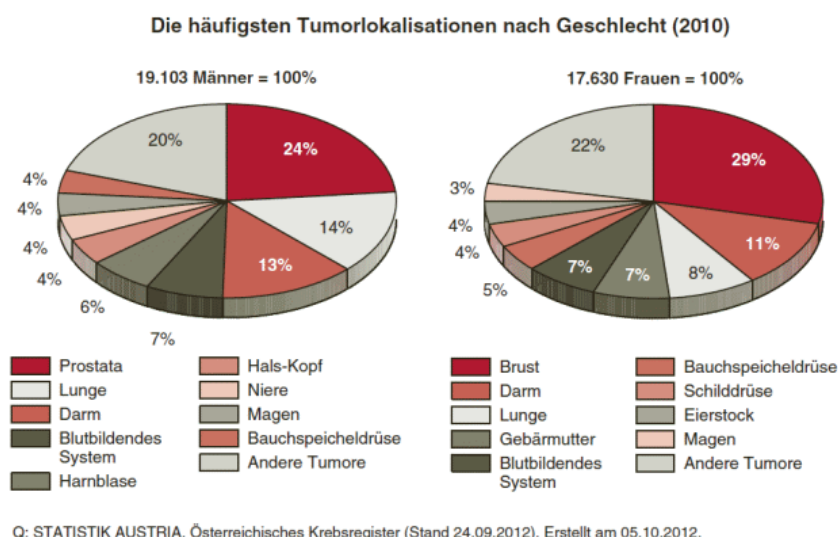


ABBILDUNG 10: KREBSINZIDENZ IN ÖSTERREICH (2010).¹⁰⁰

Harnblase, Niere, Schilddrüse und Lunge. Beim Mann liegt die Prostata vor Darm und Harnblase, bei der Frau die Brust vor Gebärmutter und Darm.¹⁰⁰

Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr (**Inzidenz**) beträgt österreichweit seit 2000 jeweils zwischen 37.000 und 39.000, wobei der Anteil der Männer jeweils um etwa 2.000-3.000 Personen überwiegt. Die Hälfte der Fälle betrifft Lunge, Darm, Brust oder Prostata. Bösartige Tumore der Lunge liegen, obwohl in der Prävalenz bei beiden Geschlechtern noch abgeschlagen, in der Inzidenz bei Männern hinter dem Prostatakrebs an der zweiten, bei Frauen hinter Brust und Darm an der dritten Stelle.¹⁰⁰

Die Sterbefälle pro Jahr (**Mortalität**) betragen 18.000-20.000, wobei auch hier die

Männer etwas überwiegen, was durch die erhöhte Inzidenz erklärt werden kann. Malignome mit hoher Mortalität betreffen die Lunge, Brust, Darm, Prostata und – trotz eher geringer Prävalenz, aber aufgrund der besonders hohen Letalität von beinahe 100 % – auch die Bauchspeicheldrüse.¹⁰⁰

2.5.2 Prävention

Der beste Schutz gegen Krebs ist natürlich die Vorsorge, damit man gar nicht erst daran erkrankt. Durch einen gesunden Lebensstil mit entsprechender Ernährung (Antioxidanten), Alkohol-, Nikotin- und Drogenabstinenz sowie Sport kann das Krebsrisiko nachweislich drastisch gesenkt werden. So sind etwa 95 % aller Lungenkrebserkrankten Raucher. Eine Impfung gegen HPV (*humane Papillomaviren*), möglichst vor dem ersten Sexualkontakt, verhindert weitestgehend die Infektion mit den gefährlichen Stämmen HPV-16 und 18, die für 70 % aller Cervixkarzinome verantwortlich gemacht werden.¹⁰²

Bei bestimmten gut erforschten Mutationen, die das Risiko für Eierstock- und Brustkrebs erhöhen, besteht die Möglichkeit einer prophylaktischen Ovariectomie oder Mastektomie.¹⁰³

2.5.3 Therapie

Doch egal wie vorsichtig man auch ist, nicht jeder Tumor lässt sich verhindern. Je weiter der Krebs fortgeschritten ist, desto schwieriger ist die Behandlung und desto geringer die Lebenserwartung. Deswegen ist die Früherkennung besonders wichtig. Bei einigen Krebsarten, wie Brust-, Prostata- oder Hautkrebs, hat sich die regelmäßige ärztliche Kontrolluntersuchung bereits durchgesetzt.

Die Wahl der Therapie ist äußerst komplex, da jeder einzelne Krebs anders ist und sich durch spezifische Mutationen auch spezifische Resistenzmechanismen aneignen kann (siehe 2.5.4 Therapieresistenz). Deswegen können allgemeine Aussagen nur schwer getroffen werden. Ein Medikament, das einen Tumor gänzlich vernichtet, zeigt bei einem anderen nicht die geringste Wirkung. Doch aufgrund von Leitlinien kann doch meist eine adäquate Therapie gefunden werden, da der klinische Erfahrungsschatz bereits groß ist. Die Entscheidung muss selbstverständlich von einem erfahrenen Spezialisten getroffen werden. Der Weg zur individuellen, personalisierten Medizin wird in frühen Ansätzen bereits verfolgt, etwa durch die Auswahl des Zytostatikums mittels Genanalyse. Siehe hierzu auch 2.2. Proteinkinasen: Das für KRAS codierende Gen wird auf Mutationen untersucht und danach die beste Therapieoption gewählt.

Ein Patient gilt als geheilt, wenn mindestens 5 Jahre kein Rezidiv gefunden wurde. Doch ist auch danach die Rezidivgefahr noch hoch und somit sollte dieser Begriff doch mit Vorsicht

genossen werden. Das Stammzellenmodell – eine von unzähligen Theorien zur Tumorentstehung – besagt, dass die meisten Tumorzellen von einigen wenigen Stammzellen abstammen. Da diese sich nur langsam teilen, werden sie von den üblichen Therapien nicht vernichtet und können so auch viele Jahre später noch zu einem Rückfall führen.¹⁰⁴

Zu den wenigen heilbaren Tumoren zählen Hodenkarzinom und akute lymphatische Leukämie (ALL). Doch meist ist eine Heilung gar nicht mehr möglich, dann wird versucht, durch palliative Behandlung einerseits die Schmerzen zu lindern und andererseits auch psychosoziales und emotionales Leiden zu verringern. Auch dadurch kann die Restlebenszeit verlängert werden.^{56,58}

2.5.3.1 Chirurgische Therapie

Die Resektion ist trotz der intensiven Forschung am Arzneimittelsektor beim überwiegenden Teil solider Krebsgeschwüre das Mittel der Wahl.⁵⁶ Voraussetzung ist einerseits, dass sichergestellt werden kann, dass der Tumor, das umgebende Gewebe und wenn nötig nahe Lymphknoten restlos entfernt werden können, andererseits dürfen noch keine Metastasen vorhanden sein. Bei bestimmten Tumoren ist aufgrund der Lokalisation eine Operation nicht möglich.

Im Vorfeld kann versucht werden, durch Chemo- oder Strahlentherapie eine Verkleinerung des Tumorgewebes zu erreichen. Auch anschließend kann noch eine adjuvante Chemotherapie (manchmal in Kombination mit adjuvanter Strahlentherapie) durchgeführt werden, um Mikrometastasen zu zerstören.¹⁰⁵

2.5.3.2 Chemotherapie

Chemotherapie bezeichnete ursprünglich jegliche medikamentöse Therapie, die gegen Mikroorganismen, Zellen und subzelluläre Partikel gerichtet war. Damit waren damals aber vor allem antibakterielle Stoffe, wie Penicillin und Sulfonamide, gemeint. Heutzutage wird der Begriff Chemotherapeutikum synonym mit der neueren Bezeichnung Zytostatikum verwendet und meint damit antineoplastische Verbindungen, während Antibiotika, Antimykotika, Virustatika, etc. eigene Gruppen darstellen.⁵⁸

Die Vielzahl und die Heterogenität der Zytostatikagruppen (eine Auswahl der wichtigsten ist aus Tabelle 3 zu entnehmen) und das Fehlen eines Goldstandards zeigt einerseits wie komplex die „Krankheit Krebs“ je nach Lokalisation und Mutation – im Vergleich zu überschaubareren Krankheiten, die oft mit einer Handvoll verschiedener Arzneimittel auskommen – ist. Andererseits bedeutet es auch, dass die medikamentöse Therapie noch

lange nicht auf einem zufriedenstellenden Level angekommen ist und dass die Heilung von Krebs, die in den letzten Jahren und Jahrzehnten mit der Findung neuer vielversprechender Wirkstoffgruppen, wie Angiogenesehemmer, Antikörper, hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Proteasom-Inhibitoren, immer wieder etwas überschwänglich angekündigt wurde, noch lange Zeit der Forschung benötigen wird.⁵⁸

Nur selten erfolgt die Therapie mit einer einzigen Substanz, meist werden bereits definierte Therapieschemata verwendet, also Kombinationen mehrerer Stoffe, die sich in der Praxis als synergistisch erwiesen haben.⁵⁸ Ein Beispiel hierfür wäre FOLFOX (Folinsäure/Fluorouracil/Oxaliplatin), angewendet bei Darmkrebs. Auch die zeitliche Abfolge muss genau eingehalten werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen und Arzneimittelwechselwirkungen zu verhindern.

Wirkstoffgruppe	Beispiel	Wirkmechanismus
Alkylantien und Verwandte	LOST, Cyclophosphamid, Dacarbazin	Inter- und Intrastrangbrücken in DNA
Platinkomplexe	Cisplatin, Oxaliplatin	Inter- und Intrastrangbrücken in DNA
Antimetabolite	Methotrexat, Fluorouracil, Cytarabin	Beeinträchtigen Stoffwechsel
Interkalantien	Doxorubicin, Mitoxanthron	Interkalieren in DNA
Topoisomerasehemmer	Topotecan	Blockieren Topoisomerase
Mitosehemmstoffe		Hemmen die Zellteilung
→ Spindelgifte	Viblastin, Vincristin	Interagieren mit Tubulin
→ Taxane	Paclitaxel	Interagieren mit Mikrotubuli
Proteinkinasehemmer	Sorafenib, Gefitinib	Blockieren Signaltransduktion
Immunotherapie		
→ Zytokine	Aldesleukin, Interferone	Beeinflussen Immunsystem
→ Antikörper	Trastuzumab, Cetuximab	Blockieren verschiedene Proteine
Hormontherapie	Tamoxifen, Flutamid	Beeinflussen Hormonstoffwechsel
Diverse	Bortezomib, Trabectedin	Diverse

TABELLE 3: ÜBERSICHT DER WICHTIGSTEN ZYTOSTATIKAGRUPPEN.^{56,58}

Die Intention einer Chemotherapie kann eine komplette Heilung sein, bei fortgeschrittenen Tumoren wird das Leben aber möglicherweise nur um einige Monate

verlängert und zusätzlich müssen noch die Risiken der in den folgenden Absätzen beschriebenen Nebenwirkungen in Kauf genommen werden. Das Ziel einer Chemotherapie ist beispielsweise die Inhibierung der Proliferation, die möglichst selektive Störung des Stoffwechsels oder die Induktion von Apoptose.^{56,58}

Chemotherapeutika weisen teils verheerende und lebensbedrohliche Nebenwirkungen auf, die wohl kaum bei einer anderen Medikamentengruppe toleriert werden würden. Der Grund dafür ist, dass sich Tumorzellen als körpereigene Zellen in ihren Stoffwechselprodukten und –wegen, Expressionsmustern und spezifischen Signalproteinen nur wenig von gesunden Zellen unterscheiden und daher nicht gezielt bekämpft werden können, ohne auch gesunde Zellen zu treffen.⁵⁸

Was allerdings viele Krebsarten – vor allem jene die mit Chemotherapie bekämpft werden – gemein haben ist das schnelle Wachstum, und dies wiederum macht Medikamente interessant, die vor allem rasch teilende Zellen angreifen, wie beispielsweise Mitosehemmstoffe, Antimetabolite oder Proteinkinasehemmer. Die Konsequenz dieses besonderen Selektionsmechanismus ist, dass auch schnell proliferierende, gesunde Zellen, wie Haar-, Keim-, Schleimhaut- oder Blutzellen, bekämpft werden. Daher rühren auch die klassischen starken Nebenwirkungen von Chemotherapeutika, wie Haarausfall, Teratogenität, Sterilität, Wundheilungsstörungen und Immunschwäche.⁵⁶

Außerdem wirken viele Zytostatika nephro-, oto- oder kardiotoxisch und selbst kanzerogen und mutagen. Zusätzlich haben sie jeweils noch eine Reihe an individuellen unerwünschten Arzneimittelwirkungen.^{56,58}

Könnten krebspezifische Strukturen gefunden und gezielt bekämpft werden wie es bei Mikroorganismen der Fall ist – beispielsweise attackieren die meisten Antimykotika das pilzeigene Cholesterinanalogen Ergosterol – wäre auch hier eine deutliche Senkung der Nebenwirkungen zu erwarten.⁵⁸

2.5.3.3 Strahlentherapie

Strahlentherapie bezeichnet die Krebstherapie mithilfe von ionisierender Strahlung, dazu gehören neben radioaktiver auch Röntgen- und Gammastrahlung. Diese schädigt die DNA soweit, dass die Zelle keine Mitose mehr durchführen kann und optimalerweise sogar apoptotisch wird. Da die Krebszelle aufgrund fehlender Reparaturmechanismen nicht mehr in der Lage ist, sich wie das umgebende Gewebe – welches natürlich auch einen Teil der Strahlung abbekommt – zu regenerieren, kann der Tumor mit geschickter Aufteilung der Strahlendosis in vielen einzelnen Sitzungen, sogenannten Fraktionen, mit nur einem Bruchteil

der toxischen Strahlung relativ selektiv angegriffen werden.¹⁰⁶

Bei der Brachytherapie erfolgt die Bestrahlung von innen, indem die Strahlenquelle in Form von kleinen Nadelchen oder ähnlichem in einer Körperhöhle (Kontaktbrachytherapie) oder direkt im Tumorgewebe (interstitielle Brachytherapie) platziert wird. Dies bietet sich bei gut zugänglichen Orten wie Uterus oder Luft- und Speiseröhre an, kann aber auch operativ in andere Gewebe eingebracht werden, wie es zum Beispiel beim Prostatakarzinom der Fall ist. Um die Strahlendosis für das Operationsteam so gering wie möglich zu halten, wird wenn möglich die Afterloading-Methode angewandt, bei der erst eine leere Hülle in den Patienten eingesetzt wird, welche daraufhin durch komplexe Verfahren mit dem Strahlenmaterial „nachgeladen“ wird. Die Entfernung des Fremdkörpers muss nach der zuvor ermittelten Zeit erfolgen.¹⁰⁶

Die häufigere Methode ist die der Teletherapie, bei der die Bestrahlung von außen erfolgt. Da hierbei je nach Lokalisation des Tumors unterschiedlich dicke Haut- und Weichteilschichten durchdrungen werden müssen, wird auch die Art der Bestrahlung individuell angepasst, um das Krebsgewebe maximal zu treffen. Es wird zwischen Tiefen- und Oberflächentherapie unterschieden.¹⁰⁶ Als häufigste Strahlenquelle wird ein Linearbeschleuniger verwendet, in dem Elektronen beschleunigt werden, um radioaktive Strahlung zu erzeugen.

Einen Hybrid stellt der Arzneistoff Ibritumomab-Tiuxetan dar. Ibritumomab ist ein monoklonaler muriner Antikörper gegen das CD-20 Antigen auf B-Zellen, welches vermehrt bei CLL (*chronisch lymphatische Leukämie*) gebildet wird. Daran ist der Chelator Tiuxetan gebunden, welcher ein ⁹⁰Yttrium-Radionuklid stabil bindet. Die vorrangige Aufgabe von Ibritumomab ist nun keine direkte zytostatische, sondern nur jene, den β -Strahler ⁹⁰Y an die Krebszellen zu koppeln, wodurch diese der radioaktiven Strahlung direkt ausgesetzt sind. Da murine Antikörper von Immunsystem bald als körperfremd erkannt und aus dem Körper ausgeschleust werden, hält die Wirkung nur kurz an und die Toxizität bleibt in vertretbaren Grenzen.^{58,79,107}

Strahlentherapie wird üblicherweise nicht einzeln, sondern in Kombination mit Chemo- oder chirurgischer Therapie durchgeführt.¹⁰⁵ Da es sich wie bei der Resektion um eine lokale Behandlung handelt, sind die Nebenwirkungen auf die direkte Umgebung begrenzt. Sie sind sehr individuell und von der Lage und Strahlenempfindlichkeit des betroffenen Gewebes abhängig, aber in der Regel sind schwerwiegende und bleibende Nebenwirkungen eher die Ausnahme.

2.5.4 Therapieresistenz

Ein großes Problem mit dem die Krebsforscher und Onkologen zu kämpfen haben ist jenes der Therapieresistenz, welche dazu führt, dass seitens des Tumors ein Weg gefunden wird ein anfangs wirkungsvolles Zytostatikum unwirksam zu machen. Die Mechanismen, die dazu führen können, sind vielfältig und noch nicht gänzlich erforscht, doch spielt die Dedifferenzierung der Krebszelle und die damit verbundene Wandelbarkeit eine wichtige Rolle.

Ein Abwehrmechanismus, der gut erforscht ist, ist jener der ABC-Transporter. Es handelt sich um membranständige Proteine, die unter ATP-Verbrauch bestimmte Substanzen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum pumpen können.⁵⁸ Die Substratspezifität ist hierbei oft relativ gering, sodass jeder Transporter eine Vielzahl verschiedener Stoffe ausschleusen kann. Physiologisch werden sie einerseits in Organen exprimiert, die mit Resorption und Ausscheidung von Substanzen in Verbindung gebracht werden, wie Leber, Darm, Galle oder Niere um bereits resorbierte toxische Substanzen möglichst rasch wieder zu entfernen. Andererseits sind sie funktioneller Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta, die jeweils als Barrieren wirken, um das ZNS bzw. das ungeborene Kind zu schützen.

Doch Krebszellen machen sich diese Proteine durch Überexpression zunutze, um die intrazelluläre Zytostatikakonzentration herabzusetzen. Von den fast 50 bekannten ABC-Transportern sind besonders gut erforscht:

- **ABCB₁**: P-gp für P(ermeability)-glycoprotein, früher auch MDR I
- **ABCG₂**: BCRP für Breast cancer resistance protein und
- **ABCC₁**: MRPI für multidrug resistance protein I.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

2.6 Angiogenese

Die Bildung von Blutgefäßen spielt nicht nur bei der Embryonalentwicklung und Wundheilung eine physiologisch wichtige Rolle im Körper, sondern wird auch von wachsenden Tumoren genutzt, um den gestiegenen Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff zu decken, sobald dies aufgrund ihrer Größe nicht mehr durch Diffusion möglich ist. Die Erforschung von Angiogenesehemmern ist ein modernes Konzept in der Krebstherapie mit der Hoffnung, auf diese Weise den Tumor auszuhungern, ihn mikroskopisch klein und dadurch symptomlos – in einem Status der „*tumor dormancy*“ – zu halten. Es wird angenommen, dass solche Tumore sehr häufig auch in gesunden Menschen vorkommen und dort das gesamte Leben verweilen ohne bemerkt zu werden.¹¹¹ Angiogenese steht auch in

einem engen Zusammenhang mit Metastasenbildung, da die Blutgefäße den Krebszellen das Herauslösen aus dem Zellverband und den Abtransport erleichtern und eine direkte Verbindung mit dem Gefäßsystem des Körpers darstellen.¹¹²⁻¹¹³

Die Regulation der Angiogenese erfolgt durch verschiedene (Wachstums-)Faktoren, wie zum Beispiel VEGF (*v*ascular *e*ndothelial *g*rowth *f*actor), FGF (*f*ibroblast *g*rowth *f*actor), PDGF (*p*latelet *d*erived *g*rowth *f*actor), EGF und Angiogenin, die sich damit teilweise auch als Angriffspunkt für die antiangiinöse Therapie eignen. So ist Bevacizumab – ein VEGF-Hemmer – bei Darm-, Lungen-, Nierenzell-, Brust- und Eierstockkrebs indiziert.¹¹⁴⁻¹¹⁶

VEGF besitzt mehrere Isoformen – die wichtigste ist VEGF-A – welche mit unterschiedlicher Affinität an die VEGF-Rezeptoren VEGFR 1 (auch flt-1), VEGFR 2 (auch flk-1) und VEGFR 3 binden. Es handelt sich um Tyrosinkinasen, die nach Ligandenbindung dimerisieren und verschiedene nachgeschaltete Proteine rekrutiert, darunter auch Grb2, welches den MAPK/ERK-Pathway aktiviert (siehe 2.2. Proteinkinasen). Über die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 kann die PLC- γ aktiviert werden, welche PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet, zwei wichtige second messenger, die zu Zellproliferation und Angiogenese führen. Ein alternativer Pathway erhöht über PI₃K die Überlebensfähigkeiten der Zelle.^{57,82,117-118}

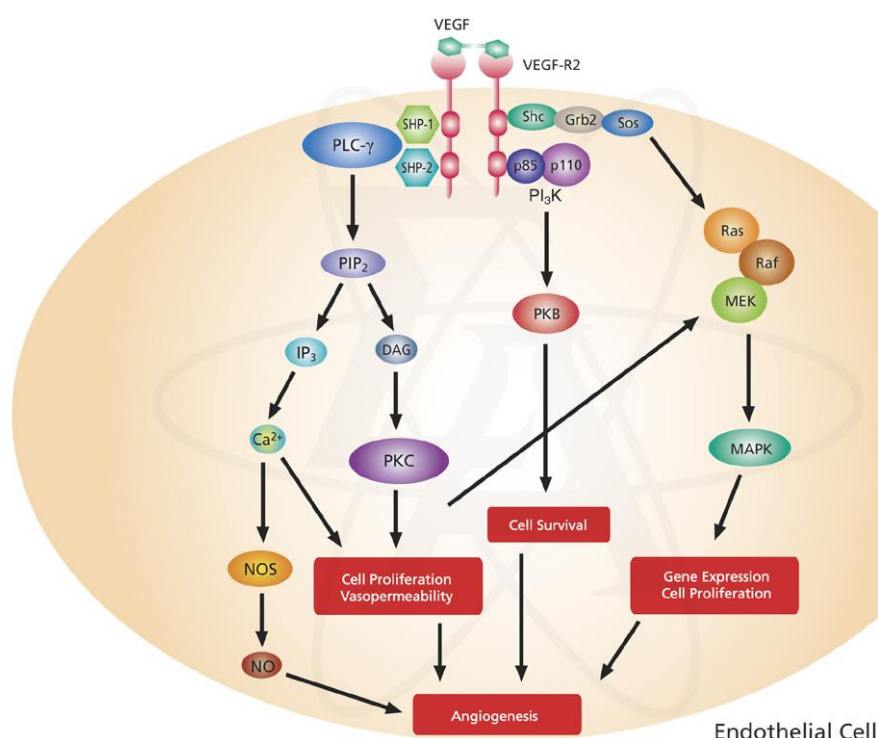


ABBILDUNG 11: SIGNALWEGE DES VEGF-REZEPTORS.⁵⁷

3. Ziel der Diplomarbeit

Diese Diplomarbeit sollte die bereits vorhandenen Daten über ENN und BEA, deren Forschung in den letzten Jahren deutlich anstieg, ergänzen. Das Augenmerk wurde hierbei vor allem auf Zytotoxizität und antikarzinogene Wirkung gerichtet.

Grundsätzlich wurde hierbei auf drei Gesichtspunkte Wert gelegt. Nämlich erstens auf antiangiogene und migrationshemmende Effekte, die durch jüngste Forschungsergebnisse als vielversprechende Aspekte hervorgestochen sind, sowie zweitens auf den UPR-Apoptose-Signalweg, der möglicherweise bei ENN B- bzw. BEA-induziertem-Zelltod eine Rolle spielt.

Da die meisten medikamentösen Behandlungsstrategien in der Krebstherapie auf Kombinationen setzen, sollten die Testsubstanzen drittens in Verbindung mit etablierten Zytostatika analysiert werden. Erfolgreiche Experimente sollten mithilfe speziellerer Assays genauer untersucht werden.

Als konkrete Ziele für die Diplomarbeit wurde also folgendes festgelegt:

- Dosis-Wirkungs-Kurven für ENN B, BEA und ENN mix (einer Mischung unterschiedlicher Enniatine) erstellen, deren IC_{50} -Werte ermitteln und vergleichen;
- Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix auf Angiogenese und Migration ergründen;
- Molekulare Mechanismen von ENN B, BEA und ENN mix, die schließlich zum Zelltod führen, untersuchen, mit speziellem Augenmerk auf ER-Stress;
- Kombination von ENN B und BEA mit bereits etablierten Zytostatika zur Entwicklung möglicher neuer Therapiestrategien;
- Synergistische Effekte mittels Proteinanalyse, Apoptose- und Zellzyklusassays genauer erforschen und erklären.

4. Material und Methoden

4.1 Zelllinien

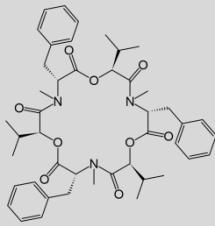
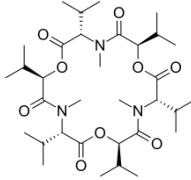
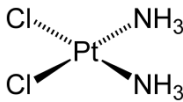
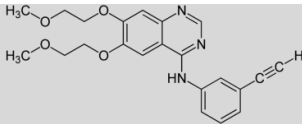
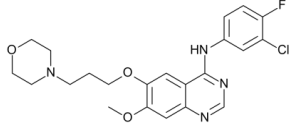
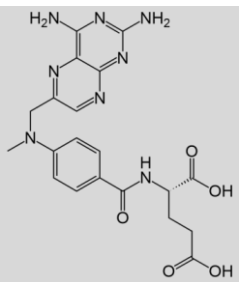
Die verwendeten Zelllinien und wichtige genetische Charakteristika sind in Tabelle 4 angeführt. Alle Zellen wurden in entsprechendem Medium mit Zusatz von 10 % FCS (*fetales Rinderserum*) bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Zelllinie	Histologie	Besonderheit	Kulturmedium	Firma
A2780	Ovar	-	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
A2780cis	Ovar	Resistent gegen Cisplatin ⁵⁷	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
A549	Lunge (NSCLC)	-	RPMI 1640	ATCC
Calu6	Unbekannt, wahrscheinlich Lunge (NSCLC)	-	MNP	ATCC
Calu6Sora	Unbekannt, wahrscheinlich Lunge (NSCLC)	Resistent gegen Sorafenib	MNP	Institut für Krebsforschung, Wien
KB-3-I (HeLa)	Gebärmutterhals	p53 downreguliert von HPV-18 ⁷⁷	RPMI 1640	Dr. D. W. Shen, Bethesda, MD, USA
KBC-I	Gebärmutterhals	Resistent gegen Colchicin, P-gp überexprimiert ¹¹⁹	RPMI 1640	Dr. D. W. Shen, Bethesda, MD, USA

TABELLE 4: ZELLINIEN UND ZELLKULTUR.

4.2 Chemikalien, Gifte und Arzneistoffe

Die verwendeten Chemikalien, Gifte und Arzneistoffe sind in Tabelle 5 angeführt. Je 1 mg BEA, ENN B und ENN mix wurden in 1 mL DMSO gelöst. Die verwendeten Konzentrationen lagen für alle drei Testsubstanzen zwischen 0.5 μ M und 10 μ M.

Substanz	Beschreibung	Target	Chemische Struktur	Firma
Beauvericin	Cyclohexadepsipeptid	Zellmembran (Ionophor)		Sigma-Aldrich
Enniatin B	Cyclohexadepsipeptid	Zellmembran (Ionophor)		Sigma-Aldrich
Enniatin mix	Cyclohexadepsipeptid	Zellmembran (Ionophor)	3 % ENN A, 20 % ENN A ₁ , 19 % ENN B, 54 % ENN B ₁ ^{13,57}	Sigma-Aldrich
Cisplatin	Platinkomplex	DNA (Intra-strangbrücken)		Sigma-Aldrich
Erlotinib	Proteinkinase-inhibitor	HER I/EGFR		LC Laboratories
Gefitinib	Proteinkinase-inhibitor	HER I/EGFR ⁴⁹		LC Laboratories
Methotrexat	Folsäure-Antagonist, Antimetabolit	Dihydrofolat-reduktase		Sigma-Aldrich

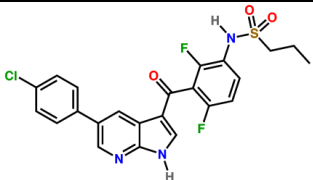
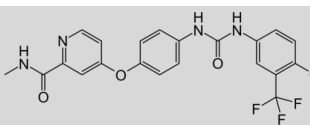
PLX4032 Vemurafenib	Proteinkinase- inhibitor	B-Raf		Roche
Sorafenib	Proteinkinase- inhibitor	C-Raf, B-Raf, KIT, FLT-3, Ret, VEGFR 1-3, PDGFR β ⁴⁹		LC Laboratories

TABELLE 5: CHEMIKALIEN, GIFTE UND ARZNEISTOFFE.

4.3 Methoden

4.3.1 Zellkultur

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich ausschließlich um adhärenente Krebszellen, also Zellen, die sich mithilfe von Zelladhäsionsmolekülen in ihrer unmittelbaren Umgebung niedersetzen. *In vivo* bilden diese Zellen solide Tumoren, *in vitro* setzen sie sich an der Oberfläche der Zellkulturflasche ab und verändern dabei Gestalt und Habitus. Deswegen wartet man, bis die Zellen adhärenent sind – dies dauert in der Regel weniger als 24 Stunden –, bevor man sie mit der Testsubstanz behandelt, um möglichst reale Bedingungen zu simulieren.

Mithilfe der Endopeptidase Trypsin können die Zelladhäsionsmoleküle durch Spaltung nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin wieder inaktiviert werden.

Trypsin zählt wie Plasmin und Thrombin zu den Serinproteasen, deren Charakteristikum die katalytische Triade – bestehend aus Serin, Histidin und Asparat – im aktiven Zentrum ist. Ihm ist EDTA zur Chelatierung von zweiwertigen Ionen zugesetzt, die für die Adhäsion notwendig sind. Trypsin wiederum wird durch in FCS enthaltene Stoffe inaktiviert, da es bei längerer Einwirkdauer zytotoxisch ist.

Die Auszählung der Zellen erfolgte mikroskopisch mithilfe des anionischen Diazofarbstoffs Trypanblau. Dieser bindet an Zellproteine, kann allerdings die Zellwand von vitalen Zellen nicht durchdringen. In toten Zellen oder Zellen mit geschädigter Zellmembran gelangt der Farbstoff ins Zellinnere und färbt das Zytosol tiefblau, während gesunde Zellen leuchtend hell erscheinen. Aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffs muss die Auszählung unmittelbar nach Zugabe des Farbstoffs erfolgen.

4.3.2 Zytotoxizitätstest

Die Untersuchung der Zytotoxizität ist womöglich die wichtigste Methode in der *in vitro*-Krebsforschung. Ist eine Substanz im ausgewählten Konzentrationsbereich nicht toxisch genug für Krebszellen bzw. zu toxisch für gesunde Zellen, ist das Erfolgsrisiko gering. Je höher die Selektivität für entartete Zellen desto besser.

4.3.2.1 MTT

Hintergrund

Die Zytotoxizität einzelner und der Kombinationen mehrerer Substanzen wurde mit MTT-Assays überprüft. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium

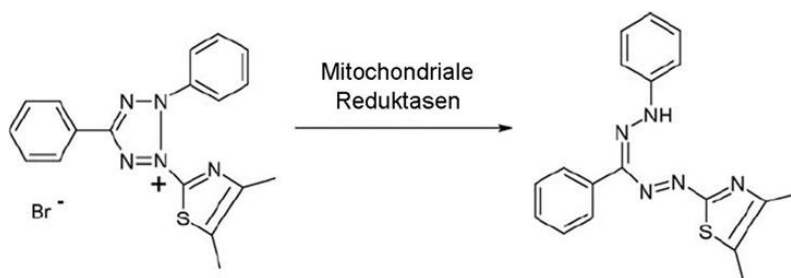


ABBILDUNG 12: REDUKTION VON MTT ZU SEINEM FORMAZANDERIVAT.¹²⁰

bromid) ist ein strohgelber Farbstoff, der nur von lebenden Zellen zu einem orange-roten Derivat reduziert wird. Die Reduktion erfolgt über mitochondriale Enzyme, die in toten Zellen nicht mehr verfügbar sind.

Durchführung

Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten abhängig von der Zelllinie in einer Dichte von 2.5×10^4 Zellen/mL in Triplets angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Danach wurde der Assay mit dem EZ4U-Kit (Biomedica), welcher auf dem originalen MTT-Assay basiert, durchgeführt. Dazu wurde zuerst das komplette Medium entfernt und 100 μ L Untersuchungslösung in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 4 Stunden – abhängig von der Stoffwechselkapazität der untersuchten Zellen – wurde die Absorption mittels Photometer bei 450 nm gemessen, wobei 620 nm als Referenzwellenlänge diente. Weiters wurde ein Leerwert (Untersuchungslösung ohne Zellen) gemessen.

Mit dem Programm *Graph Pad Prism 5* wurden Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt und IC_{50} -Werte als Maß für die zytotoxische Potenz berechnet. Für die synergistische Wirkung von Kombinationsversuchen wurde mit *CalcuSyn 2.1* der Combination Index (CI) ermittelt. CI-Werte von > 1 wurden als antagonistisch, < 1 als synergistisch angenommen.¹²¹

4.3.2.2 Höchst – PI – Färbung

Hintergrund

Höchst 33258 ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der sowohl die DNA vitaler als auch toter Zellen anfärbt. Er erlaubt eine mikroskopische Betrachtung von in Ruhephase oder in Mitose befindlichen Zellen, sowie apoptotischen Körperchen, die sich wegen ihres kondensierten Chromatins durch Gestalt, Größe und Farbintensität von lebenden, nicht in Mitose befindlichen Zellen unterscheiden.

Propidiumiodid (PI) ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der ebenfalls in die DNA interkaliert, allerdings intakte Zellmembranen nicht passieren kann, sondern nur jene toter Zellen – bei Nekrose oder fortgeschrittener (später) Apoptose.

Bei der „HöPI“-Färbung ist es also durch Kombination dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe möglich, lebende und tote Zellen zu unterscheiden und zu quantifizieren sowie weiters noch Informationen über Mitose und frühe Apoptosestadien (Zellen fluoreszieren nur mit Höchst-Reagens und die DNA ist bereits kondensiert) zu erhalten.

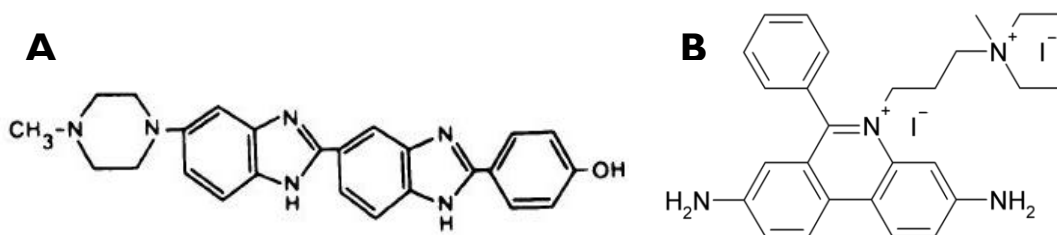


ABBILDUNG 13: CHEMISCHE STRUKTUREN VON (A) HÖCHST 33258¹²² UND (B) PROPIDIUMIODID⁵⁹.

Durchführung

Die Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde 2 $\mu\text{L/mL}$ HöPI mix (entsprechend 0.5 mg/mL Höchst und 1.25 mg/mL PI) direkt in jedes Well pipettiert und für 1-2 Stunden inkubiert. Mit dem Mikroskop *Nikon Eclipse Ti* wurden mittels verbundener Kamera *Nikon Camera DS* jeweils 3 Fotos pro Stelle (Höchst-DAPI- Filter, PI-Cy3-Filter und ein Durchlichtbild als Kontrolle) mit 40-facher Vergrößerung gemacht, wobei in

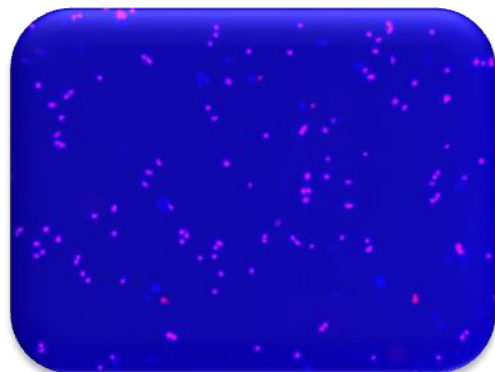


ABBILDUNG 14: HÖPI-FÄRBUNG. DIESES BILD ENTSTEHT DURCH ÜBERLAGERUNG DER BEIDEN BILDER MIT DAPI- UND CY3-FILTER.

4. Material und Methoden

jedem Well 3 verschiedene repräsentative Stellen ausgesucht wurden.

Die Fotos wurden nach dem Schema aus Tabelle 6 mit dem Programm ImageJ ausgezählt und mit *Graph Pad Prism 5* wurde ein Graph angefertigt.

Population	Höchst (blaue Fluoreszenz)	PI (rote Fluoreszenz)
Lebende oder früh apoptotische Zellen	+	-
Nekrotische oder spät apoptotische Zellen	+	+

TABELLE 6: SCHEMA ZUR AUSWERTUNG DER HÖPI-FÄRBUNG.

4.3.3 Proteinanalyse via Western Blot

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Chemotherapeutika ist die Erforschung des Wirkmechanismus. Hierzu sind in der Regel viele verschiedene Verfahren notwendig, die Standardmethode ist der Western Blot. Eine Proteinanalyse kann Aufschluss über vielfältige Prozesse in der Zelle geben wie beispielsweise nekrotische oder apoptotische Signale, Metabolismus, Wachstumsprozesse, Stressfaktoren und Schutzmechanismen.

Hintergrund und Durchführung

Die Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 3.5×10^5 Zellen/Well angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 6 oder 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Reagentien

BSA Standard:

2 mg/mL in 0.9 % wässriger
natriumazidhaltiger NaCl-Lösung

Blockierlösung:

1 % Milchpulver
0.5 % BSA
Lösen in TBST

Lysepuffer A:

50 mM Tris 7.6 (0.606 g/100 mL)
300 mM NaCl (1.753 g/100 mL)
0.5 % Triton X-100
Lösen in Wasser

Bjerrumpuffer mit Methanol:

5.82 g Tris
2.93 g Glycin
200 mL Methanol
Auffüllen auf 1 L mit A.bidest

Lysepuffer B:

500 µL Lysepuffer A
 5 µL PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid -
 Proteaseinhibitor)
 12.5 µL Complete (Proteaseinhibitor)
 25 µL Phospho-Stop (Phosphataseinhibitor)

Bjerrumpuffer mit SDS:

5.82 g Tris
 2.93 g Glycin
 0.375 g SDS
 Lösen in 1 L A.bidest.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:

18.2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in
 80 mL H₂O lösen
 Mit HCl auf pH 8.8 bringen
 Auffüllen auf 100 mL mit A.bidest

4xSample Loading Buffer:

4 mL Glycin (10 %)
 2 mL 2-Mercaptoethanol
 0.92 g SDS
 2.5 mL Tris-HCl (1 M, pH 6.8)
 Auffüllen auf 10 mL mit A.bidest

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8:

3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in
 35 mL H₂O lösen
 Mit HCl auf pH 6.8 bringen
 Auffüllen auf 50 mL mit A.bidest

10xTBS:

120 g Tris
 90 g NaCl
 Lösen in 1 L A.bidest
 Auf pH 7.6 einstellen

10xLämmli-Elektrophorese Puffer:

30 g TRIS
 144 g Glycin
 10 g SDS
 Lösen in 1 L A.bidest.

1xTBST:

100 mL 10xTBS
 900 mL A.bidest
 1 mL Tween

Isolierung der Proteine

Die Zellen wurden vom Boden abgekratzt und mit eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*) einmal gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurde danach mit 30-50 µL Lysepuffer B – je nach Größe des Zellpellets – 10 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin 3 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach der Zentrifugation bei 4 °C befand sich das gewünschte Proteinlysate im Überstand, welcher bei -80 °C gelagert werden kann. Das Pellet – bestehend aus den Zellkernen – wurde verworfen.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben erfolgte mit dem Micro BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*). Es wurden 2.5 µL Proteinlösung mit zweifach destilliertem Wasser auf 500 µL verdünnt und in Triplets zu je 150 µL in eine 96-Well-Mikrotiterplatte übergeführt. Da zur Berechnung der Proteinkonzentration eine Standardkurve benötigt wird, wurde eine BSA(*bovine Serumalbumin*)-Verdünnungsreihe in 8 verschiedenen Konzentrationen (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12.5 µL/mL, 6.3 µL/mL, 3.1 µL/mL, 1.6 µL/mL und 0 µL/mL) in gleicher Menge und ebenfalls in Triplets erstellt. Dazu wurden 150 µL BCA-Lösung des BCA Protein Assay Kits (bestehend aus 25 Teilen Lösung A, 24 Teilen Lösung B und 1 Teil Lösung C) je Well hinzugefügt. Die Lösung ist anfangs knallgrün. Es erfolgt eine proteinabhängige Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ im alkalischen Milieu, welches mit 2 Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten wasserlöslichen Komplex bildet. Je mehr Protein vorhanden ist, desto schneller und stärker erfolgt die Farbänderung.¹²³

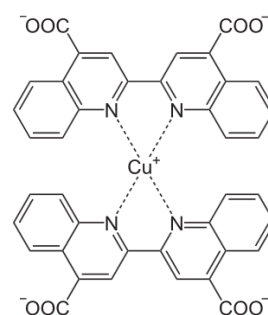


ABBILDUNG 15: VIOLETER
BICINCHONINSÄURE-KUPFER-KOMPLEX.

Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Platte mit dem Spektrophotometer bei 620 nm vermessen und über die BSA-Kontrolle eine Eichgerade ermittelt. Die Proteinkonzentration kann so errechnet werden.

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

In diesem Schritt erfolgt die Auftrennung der Proteine im Proteingemisch mittels Gelelektrophorese. Hierzu muss zuerst ein Polyacrylamidgel hergestellt werden. Dieses besteht aus zwei horizontalen Schichten, einem Sammelgel oben, welches als erstes durchlaufen wird und die Proteine möglichst bis zur Front des Trenngels konzentriert, und einem Trenngel unten, welches eine möglichst optimale Auftrennung der Proteine ermöglichen soll.

Die Mischung des Trenngels wurde mit den Polymerisationskatalysatoren APS (Ammoniumperoxidsulfat) und TEMED (Tetramethylethylendamin) versetzt und zwischen zwei Glasplatten, die unten und seitlich dicht verschlossen sind – die Dichtheit wurde vorher mit Wasser überprüft – zu circa 70 % gefüllt. Es wurde mit Ethanol überschichtet, um Unebenheiten auszugleichen und Luftblasen zu entfernen, und gewartet, bis das Gel fest war.

Nach Entfernung des Ethanols mit Filterpapier wurde auf gleiche Weise mit dem Sammelgel verfahren.

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	3.65 mL	1.56 mL
Acrylamid	1.875 mL	0.281 mL
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	1.875 mL, 1.5 M, pH 8.8	0.625 mL, 0.5 M, pH 6.8
SDS (20 %)	75 µL	25 µL
APS (10 %)	25 µL	12.5 µL
TEMED	5 µL	2.5 µL

TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNINGEL.

Die Platten wurden bis oben hin befüllt und schließlich ein spezieller Kamm eingesetzt, um den das Gel – je nach Form – entweder 10 oder 15 Aussparungen (*slots*) zum Befüllen mit Proben formte.

Nach der Verfestigung wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer überführt und diese mit Lämmli-Elektrophorese-Puffer befüllt. Es handelt sich um ein Glycin-TRIS-Puffersystem. Bei pH 6.8 im Sammelgel ist Glycin zwitterionisch und bewegt sich im elektrischen Feld nur sehr langsam (*Folge-Ionen*), während Chloridionen negativ geladen sind und vorauslaufen (*Leit-Ionen*). Dazwischen befinden sich die Proteine, welche auf diese Weise zusammengeschoben werden. Bei pH-Änderung auf 8.8 im Trenngel wird Glycin anionisch und bewegt sich nun auch schnell im elektrischen Feld wodurch den Proteinen mehr Platz für eine ausreichende Auftrennung gegeben wird.¹²⁵

Die Probenlösung wurde wie in Tabelle 8 beschrieben hergestellt. Der

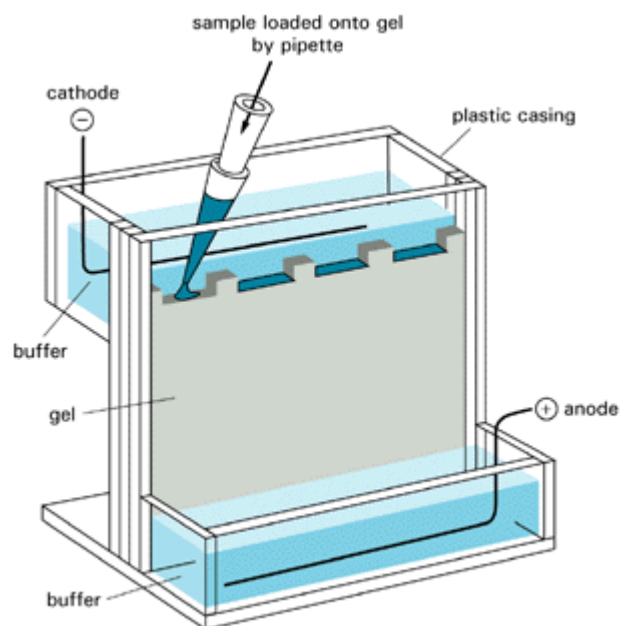


ABBILDUNG 16: AUFBAU EINER SDS-PAGE.¹²⁴

Sample Loading Buffer enthält 2-Mercaptoethanol, welches zur besseren sterischen Verfügbarkeit Disulfidbrücken bricht, und Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die Proteine einerseits aufgrund von seinen tensidischen Eigenschaften denaturiert und sich andererseits proportional zur Größe anlagert, um dadurch für alle Proteine ein beinahe gleich großes Masse/Ladungs-Verhältnis herzustellen. Die Eigenladung der Proteine wird durch SDS

überdeckt, deshalb wandern alle Proteine im elektrischen Feld gleich schnell. Eine Auftrennung erfolgt einzig durch die Größe, da kleine Proteine sich schneller durch das engmaschige Polyacrylnetz in Richtung Anode bewegen können als große. Dieses Prinzip wird Molekularsiebeffekt genannt.^{52,126}

Mindestens ein Slot wurde mit dem Markerproteingemisch *Precision Plus Protein All Blue* von *Bio-Rad* versetzt, welches durch einen blauen Farbstoff markiert war und so einen Vergleich der Molekülgrößen erlaubte.¹²⁶

Bestandteil	Volumen
Proteinlösung	Äquivalent 20 µg Proteingemisch
Sample Loading Buffer	1/4 des Gesamtvolumens
Lysepuffer A	Auffüllen auf Gesamtvolumen
Gesamtvolumen	12, 16 oder 20 µL

TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DER PROBENLÖSUNG. JEDER SLOT – AUCH DIE LEEREN – MUSS MIT DEM GLEICHEN VOLUMEN BEFÜLLT SEIN, UM EIN VERSCHIEBEN DER BANDEN AUFGRUND UNTERSCHIEDLICHER SALZKONZENTRATIONEN ZU VERHINDERN.

Apparatur entfernt, das Sammelgel abgetrennt, verworfen und das Trenngel weiterverwendet.

Nun wurde die Elektrophorese bei konstanten 90 Volt gestartet und gewartet, bis die ersten Banden das untere Ende der Western Blot Kammer erreichten. Danach wurde das Gel aus der

Western Blotting

Nun erst folgte der eigentliche Western Blot, also das Übertragen der Proteine aus dem Gel auf eine mit Methanol aktivierte *Polyvinylidenfluorid*(PVDF)-Membran (VWR). Das Verfahren wurde als „*semi-dry blot*“ im halbtrockenen Zustand durchgeführt. Der Transfer erfolgt hier über Filterpapiere, die vorher in Pufferlösungen getränkt wurden. Membran und Gel wurden dazwischen gelegt – dies erinnert optisch an ein Sandwich, daher auch die Bezeichnung Blot-Sandwich – und die Proteine wiederum eins zu eins bei 0.08 mA pro Membran vom Gel innerhalb von 45 Minuten in Richtung Anode überführt. Als Puffer wurden Bjerrumpuffer mit SDS und Bjerrumpuffer mit Methanol verwendet.

Ponceau-S-Färbung

Nach erfolgtem Blotting wurde die Membran einmal mit Aqua bidestillata gewaschen und dann kurz mit Ponceau-S-Lösung (0.1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure-Lösung) – einem roten Farbstoff, der die bis dahin nicht sichtbaren Proteine reversibel anfärbt – behandelt um die erfolgreiche und

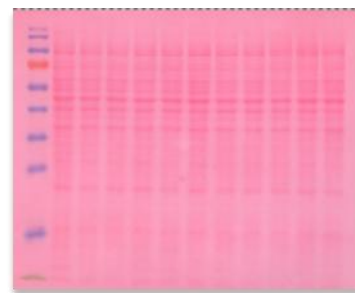


ABBILDUNG 17: PONCEAU-S-GEFÄRBTE MEMBRAN ZUM NACHWEIS DER GLEICHMÄSSIGEN LADUNG.

vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Der Farbstoff wurde mit TBST (*IRIS-buffered-saline* + *TWEEN*) wieder ausgewaschen.

Blockierung

Um bei der folgenden Detektion unspezifische Bindungen weitestgehend zu verhindern, muss vorher eine Blockierung aller möglicher Kontaktstellen auf der Membran vorgenommen werden. Dazu wurde 1 Stunde in einer Blockierlösung (0.5 % BSA und 1 % Milchpulver in TBST) inkubiert. Diese enthält unspezifische Proteine, die sich an der ganzen Membran anhaften und nur von hochaffinen Antikörper-Antigen-Reaktionen verdrängt werden können.

Detektion

Diese Potenz besitzen primäre Antikörper, die zusammen mit 3 % BSA (um die Blockierung wieder aufzufrischen) in TBST gelöst wurden und an bestimmte Epitope des Zielproteins binden. Ohne Blockierung würde der Antikörper auch an viele andere Proteine auf der Membran binden, für die die Affinität zwar nur schwach aber ausreichend ist. In der Folge wäre der Blot aufgrund einer unüberschaubaren Menge an Banden nicht auswertbar. Es wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag mit TBST dreimal gewaschen.

Da die primären Antikörper nun noch nicht direkt detektiert werden können – es wäre zu kompliziert und kostenintensiv, jeden der unzähligen verschiedenen primären Antikörper mit einem Signalteil zu versehen –, muss nun ein zweiter (sekundärer) Antikörper eingesetzt werden. Dieser ist spezifisch für sämtliche Antikörper, die aus dem gleichen Tier stammen. Da es nur wenige übliche Organismen gibt, aus denen primäre Antikörper gewonnen werden – Maus, Hase und Ziege –, ist es auch deutlich weniger aufwendig, diese mit einer Signalstelle zu versehen, die zur Detektion benutzt werden kann.

Es wurde mindestens 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (gelöst in TBST mit 1 % BSA) inkubiert und wiederum dreimal gewaschen.

Primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung	Molekulargewicht	Firma
β-Aktin	Maus	1:5.000	42 kDa	Cell Signaling Tech.
BIP	Hase	1:1.000	78 kDa	Cell Signaling Tech.
Calnexin	Hase	1:1.000	90 kDa	Cell Signaling Tech.
eiF-2α	Maus	1:1.000	38 kDa	Cell Signaling Tech.
p-eiF2α	Hase	1:1.000	37 kDa	Cell Signaling Tech.
ERK 1/2 (p44/42)	Hase	1:1.000	42, 44 kDa	Cell Signaling Tech.
pERK (Phospho-p44/42 MAPK alias phospo-ERK)	Hase	1:1.000	42, 44 kDa	Cell Signaling Tech.
Ero1-α	Hase	1:1.000	60 kDa	Cell Signaling Tech.
IRE1α	Hase	1:1.000	130 kDa	Cell Signaling Tech.
p38	Hase	1:1.000	43 kDa	Cell Signaling Tech.
pp38 (Phospho-p38 MAPK)	Hase	1:1.000	43 kDa	Cell Signaling Tech.
PARP	Hase	1:1.000	24, 89, 116 kDa	Cell Signaling Tech.
cl. PARP (Cleaved PARP)	Hase	1:1.000	89 kDa	Cell Signaling Tech.
PDI	Hase	1:1.000	57 kDa	Cell Signaling Tech.
pJNK (Phospho-JNK alias p-SAPK/JNK)	Hase	1:1.000	46, 54 kDa	Cell Signaling Tech.

TABELLE 9: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.

Sekundäre Antikörper	Quelle	Verdünnung	Firma
Anti-Rabbit IgG, HRP gelinkt	Ziege	1:10.000	Cell Signaling Tech.
Anti-Mouse IgG, HRP gelinkt	Ziege	1:10.000	Cell Signaling Tech.

TABELLE 10: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.

An den sekundären Antikörper ist das Enzym HRP (*horse radish peroxidase*) – eine aus dem Kren isolierte Peroxidase – gekoppelt, welches bei der nun folgenden Chemolumineszenzreaktion (ECL – *enhanced chemoluminescence*) als Katalysator fungiert. Luminol reagiert mit H_2O_2 zu einem zweifach anionischen Phthalsäurederivat, während der Reaktion wird Licht emittiert. Dieses kann mit freiem Auge nicht wahrgenommen werden, aber durch Belichtung eines Films unter Ausschluss von sonstigem Licht kann ein Abdruck gemacht werden.

Jede Membran wurde auf einer Glasplatte mit einer Mischung aus 2 mL Luminolreagens und 0.6 μL H_2O_2 ausgiebig bedeckt und nach

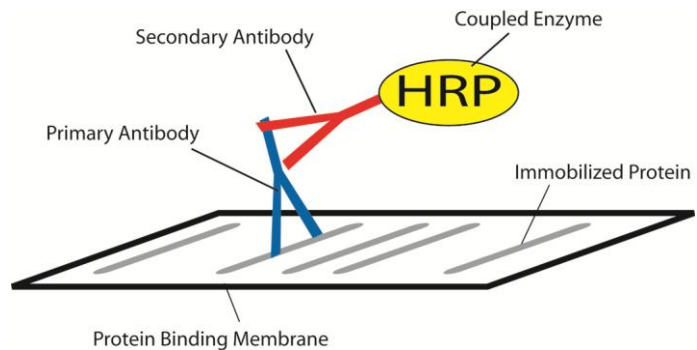


ABBILDUNG 18: LICHTREAKTION ÜBER HORSE RADISH PEROXIDASE.¹²⁷

leichtem Abtupfen in einer Fotokassette mit einem Film (*Amersham HyperfilmTM ECL* von *GE Healthcare*) entwickelt.

4.3.4 Zellzyklus

Auch der Zellzyklus ist ein weiterer Faktor innerhalb der komplexen Organisation einer einzelnen Zelle. Könnte man den Zellzyklus in sämtlichen Tumorzellen anhalten (indem man sie in die G_0 -Phase schickt), so würde der Tumor zwar nicht zerstört, aber am weiteren Wachstum gehindert werden.

4.3.4.1 Zellzyklusanalyse via Propidiumiodid-Färbung

Hintergrund

Diploide Zellen durchlaufen während eines kompletten Zellzyklus mehrere Phasen, wobei sich die Menge der DNA in Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle befindet, unterscheidet. In der G_2/M -Phase liegen 2 Chromatiden pro Chromosom vor ($2n$), welche nach der Mitose in der G_0/G_1 -Phase auf 2 Zellen aufgeteilt sind. Jede besitzt also nur noch 1 Chromatid pro Chromosom ($1n$). In der S-Phase liegt die Menge an DNA dazwischen.

Propidiumiodid (PI) ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert (siehe 4.3.2.2 Höchst – PI – Färbung). Da PI intakte Zellmembranen nicht passieren kann, müssen die Zellen während der Aufbereitung chemisch behandelt werden, um die Durchlässigkeit für den Farbstoff zu gewährleisten.

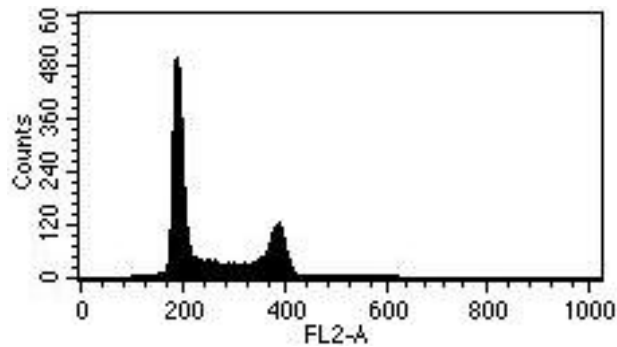


ABBILDUNG 19: MITTELS DURCHFLOSSZYTOMETRIE BESTIMMTES HISTOGRAMM. DER PEAK BEI 200 ENTSpricht DEN ZELLEN IN DER G₀/G₁-PHASE, DER PEAK BEI 400 DEN ZELLEN IN DER G₂/M-PHASE, DIE MENGE DAZWISCHEN DEN ZELLEN IN DER S-PHASE.

Abhängig von der vorhandenen Menge an Nukleinsäuren pro Zelle kann auch eine unterschiedliche Menge PI interkalieren, wodurch angezeigt wird, in welcher Phase des Zellzyklus sie sich befindet.

Durchführung

Die Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 3.5×10^5 Zellen/Well angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie in Röhrchen überführt, in 100 μ L 0.9 % NaCl suspendiert und in 70%igem eiskalten Ethanol für 1 h bei 4 °C gelagert, um die Zelle zu fixieren und die Permeabilität für PI zu ermöglichen. Anschließend wurde der Alkohol durch PBS ersetzt und 2 μ L RNase (10 μ L/mL) hinzugefügt, um eine Interkalation von PI in vorhandene RNA-Stücke zu verhindern, was das Ergebnis verfälschen würde. Zuletzt wurden 5 μ L PI (1 mg/mL in PBS) hinzugefügt und nach 30 Minuten bei 4 °C mit dem Durchflusszytometer gemessen (siehe 4.3.5 Durchflusszytometrie).

Die Auswertung erfolgte mit *Graph Pad Prism 5*.

4.3.4.2 DNA-Synthese via ^3H -Thymidin-Einbau

Hintergrund

Eine Krebszelle benötigt für einen Replikationsschritt im Durchschnitt zirka 24 Stunden. In dieser Zeit wird der komplette Zellzyklus durchlaufen und in der S-Phase die DNA repliziert. Hierzu werden die Nukleinbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin verwendet, die in der Zelle auf verschiedene Weise bereitgestellt werden. Sie werden zu ihren jeweiligen 2'-Desoxynukleosidderivaten umgewandelt. Stellt

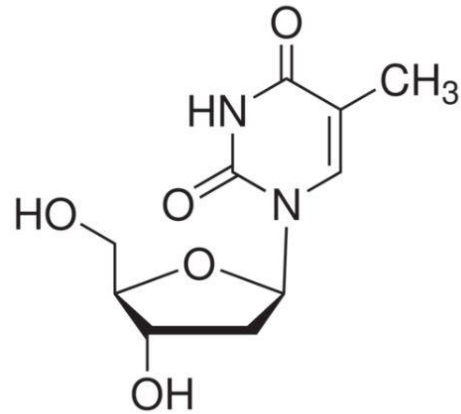


ABBILDUNG 20: CHEMISCHE STRUKTUR VON 2'-DESOXYTHYMIDIN.⁵⁷

man der Zelle Tritium-markiertes Desoxythymidin – ein β -Strahler – im Überschuss zur Verfügung, wird dieses statt 2'-Desoxythymidin in die DNA eingebaut und die emittierte Strahlung kann als Maß für die Fähigkeit der Zelle, DNA zu synthetisieren, gemessen werden.¹²⁸

Auch eine erhöhte Aktivität von Reparaturmechanismen infolge einer DNA-Schädigung kann auf diese Weise detektiert werden.¹²⁹

Durchführung

Da bei diesem Versuch mit radioaktivem Material gearbeitet wird, muss während des ganzen Versuchs penibel auf die Sicherheit, Dokumentation und Entsorgung der verwendeten Einmalgeräte geachtet werden.

Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/mL in Tripletts angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und ^3H -Thymidin-Lösung von PerkinElmer (40 $\mu\text{L/mL}$ in Kulturmedium) hinzugefügt. Die Lösung wurde nach 4 Stunden entfernt, die Wells 3 Mal mit PBS gewaschen und am Schluss 100 μL Lysepuffer pro Well zugesetzt. Das Zelllysat wurde nach mikroskopischer Kontrolle in Szintillator-Röhrchen überführt, 2 mL Szintillator-Lösung hinzugefügt und die Radioaktivität mit dem Szintillationsanalysegerät Tri-Card 1900TR gemessen.

Parallel wurde ein MTT-Assay mit denselben Grundbedingungen angesetzt, um zu sehen, ob die Testsubstanz in dieser Konzentration auch zytotoxisch wirksam ist.

Reagentien

10x PBS:

95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

32 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

44 g NaCl

Lösen in 1 L H_2O

Lysepuffer:

1.2 g Tris-HCl (pH 7.8)

10 g SDS

Lösen in 1 L H_2O

4.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine wichtige biologische Methode, um Zellen zu zählen, zu vermessen und zu kategorisieren. Weiters ist es auch möglich, sie mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und nach bestimmten Gesichtspunkten zu sortieren.

Eine fertig aufbereitete Zellsuspension wird in das Durchflusszytometer und dort in eine Kapillare eingesaugt, wo einzeln hintereinander bis zu 1000 Zellen pro

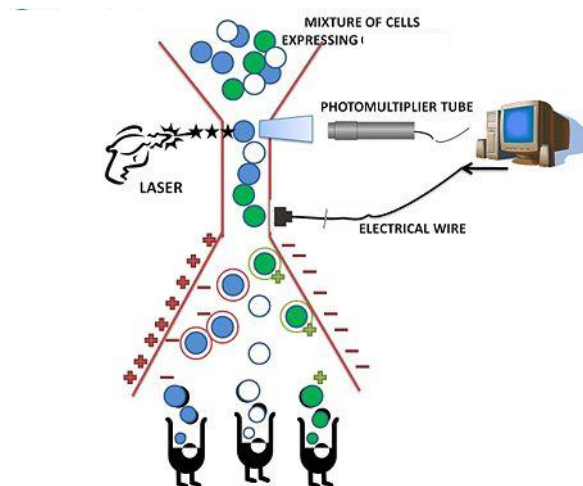


ABBILDUNG 21: SCHEMATISCHES FUNKTIONSPRINZIP EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS.¹³⁰

Sekunde vermessen werden können. Basale Eigenschaften der Zelle werden über das Streulicht bestimmt. Ein Laserstrahl verläuft im rechten Winkel zur Kapillare. Zwischen zwei Zellen geht der Strahl direkt durch ohne abgelenkt zu werden. Trifft der Laser allerdings auf eine Zelle, streut diese den Strahl in verschiedene Richtungen. Das gestreute Licht wird üblicherweise in 2 Winkeln gemessen, dem

- **forward scatter (FSC)** – Vorwärtsstreulicht: Misst jenes Licht, das nur leicht gebeugt wird, also fast so verläuft wie der ursprüngliche ungestreute Strahl. Wird auf der X-Achse aufgetragen und ist vor allem abhängig von der Größe der Zelle. Je größer die Zelle, desto größer das Signal. Und dem
- **side scatter (SSC)** – Seitwärtsstreulicht: Misst jenes Licht, das sehr stark abgelenkt wird, also fast im 90°-Winkel zum ursprünglichen Strahl verläuft. Wird auf der Y-Achse aufgetragen und ist neben der Größe der Zelle auch von der Granularität (Körnigkeit) der Zelle abhängig. Je größer die Granula, desto stärker das Signal.¹³¹

Aus den erhaltenen Werten von FSC (X-Achse) und SSC (Y-Achse) wird in einem Diagramm, einem sogenannten Dot-Plot aufgetragen, wobei jede Zelle einem Punkt (*dot*) entspricht. Ähnliche Zellen nehmen ähnliche Plätze im Graphen ein. Auf diese Weise können Zellpopulationen gut grafisch sichtbar gemacht werden.

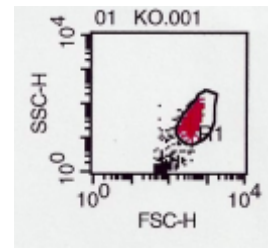


ABBILDUNG 22: „GATING“ IN EINEM DOT-PLOT.

Will man nun spezifisch eine einzelne Population untersuchen oder Störfaktoren, wie Zellfragmente und Luftblasen, ausschließen, kann man einen bestimmten Bereich („Regionen“) seines Diagramms auswählen, sodass nur Zellen, auf die die gewünschten Eigenschaften zutreffen, untersucht werden. Dieser Vorgang wird „gaten“ genannt und die ausgewählten Regionen werden mit R1, R2 usw. nummeriert.¹³¹

In dieser Diplomarbeit wurden auch zwei Assays mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt: die JC-1-Färbung und die Propidiumiodid-Färbung. Hierzu müssen die Zellen zuvor mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Durch die Anregung eines entsprechenden Laserstrahls emittiert der Farbstoff Licht, welches von Detektoren gemessen wird. Eine Unterscheidung zwischen markierten und nicht-markierten Zellen ist möglich. Moderne Durchflusszytometer können mindestens 4 verschiedene Fluoreszenzfarben gleichzeitig untersuchen.

4.3.5.1 JC-1-Färbung

Hintergrund

JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodid) ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff. Abhängig vom mitochondrialen Potential ($\Delta\psi_m$) bildet er in gesunden Zellen sogenannte J-Aggregate, was gleichzeitig einen Shift der Emissionswellenlänge von 490 nm (grün) auf 590 nm (rot) zur Folge hat.¹³² Wurden hingegen bereits erste frühe Mechanismen zu Beginn einer Apoptose eingeleitet, so depolarisiert das mitochondriale Membranpotential und JC-1 liegt weiterhin als Monomer vor.

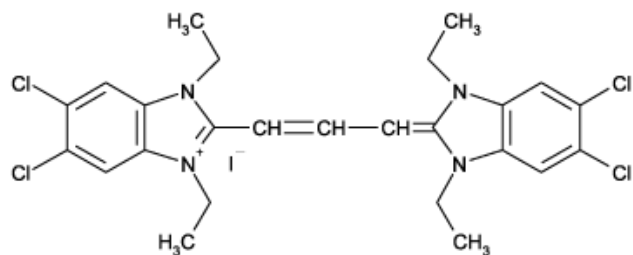


ABBILDUNG 23: CHEMISCHE STRUKTUR VON JC-1.

Der Fluoreszenzshift wird via Durchflusszytometrie mit 2 unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und gesunde von früh-apoptotischen Zellen unterschieden.^{57,133}

Durchführung

Die Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Well angesetzt und nach 24 Stunden mit Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie in Röhrchen überführt, das Medium entfernt und mit JC-1-Lösung von Sigma-Aldrich ($10 \mu\text{g}/1 \text{ mL}$ je Röhrchen) 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, die Zellen gewaschen und in FACS-PBS in FACS-Röhrchen mit dem Durchflusszytometer vermessen.

Die Auswertung erfolgte mit *Graph Pad Prism 5*.

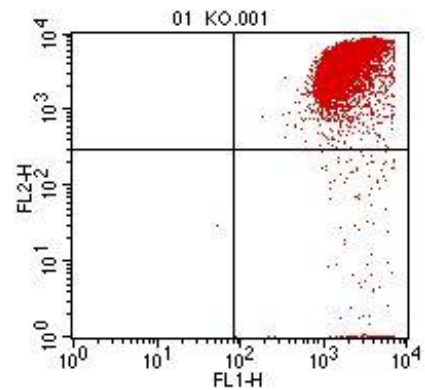


ABBILDUNG 24: DOT-PLOT EINES JC-1-ASSAYS. AUF DEN ACHESEN SIND DIE BEIDEN WELLENLÄNGEN (GRÜN UND ROT), NACH AUFSTEIGENDER WELLENLÄNGE GEORDNET, AUFGETRAGEN.

4.3.5.2 PI

Siehe 4.3.4.1 Zellzyklusanalyse via Propidiumiodid-Färbung.

4.3.6 Angiogenese

Auch die antiangiogene Wirkung von Substanzen kann *in vitro* erforscht werden. Sie ist aus dem breiten Spektrum von Chemotherapeutika heute nicht mehr wegzudenken und ein zentraler Angriffspunkt der modernen Krebsforschung.

4.3.6.1 Endothelial-Cell-Tube-Formation-Assay

Der Endothelial-Cell-Tube-Formation-Assay (kurz Tube-Formation-Assay) ist ein weit verbreiteter Test zur Untersuchung der Fähigkeit von Zellen, Angiogenese zu betreiben. Endothelzellen werden mit Wachstumsfaktoren stimuliert und bilden röhrenartige Gebilde (*tubes*) untereinander aus. Nach Zusatz von Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen wird die Potenz der Endothelzellen, diese Strukturen zu bilden, untersucht. Hierzu werden Fotos unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht, vermessen und verglichen.

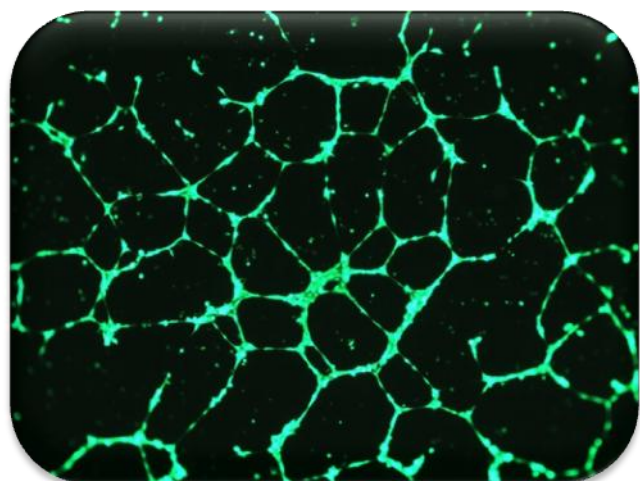


ABBILDUNG 25: TUBE-FORMATION-ASSAY.

Dieser Assay wurde in Kooperation mit DI Thomas Mohr vom Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien

durchgeführt, der auch die Auswertung der Daten und die Erstellung des Graphen mit *Graph Pad Prism 5* übernommen hat.

4.3.6.2 Hen's egg test on chorio-allantoic membrane

Hintergrund

Der Hen's egg test on chorio-allantoic membrane (kurz HET-CAM-Assay) wurde als Alternativmethode zum Tierversuch entwickelt. Da der Embryo im Hühnerei bis zum 11. Tag kein vollständiges ausgebildetes Nervensystem besitzt, weil das Neuralrohr noch nicht verschlossen ist, kann er bis zu diesem Zeitpunkt keine Schmerzen empfinden. Deshalb kann der HET-CAM-Assay in vielen Fällen als grausam empfundene Tierversuche, wie zum Beispiel den Draize-Augenreizungstest, ersetzen, bei dem Chemikalien durch Einbringen in ein Kaninchenauge auf ihre Reizwirkung untersucht werden.¹³⁵

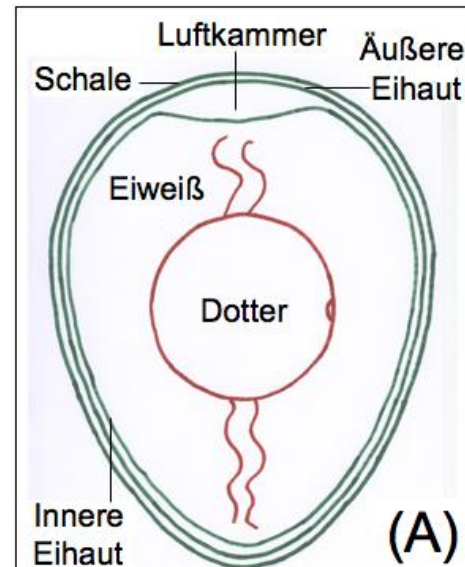


ABBILDUNG 26: AUFBAU EINES HÜHNEREIES.¹³⁴

Die Testsubstanz wird auf ein durch einen kleinen Ring abgegrenztes Areal auf der CAM – der mit Blutgefäßen durchlaufenen Aderhaut des Eies, die gewissermaßen als Äquivalent zur Plazenta gesehen werden kann – aufgetragen und in zeitlichen Abständen werden Fotos gemacht. Eine antiangiogene Wirkung äußert sich durch Minderung der Gefäße in diesem Areal.¹³⁴⁻¹³⁶

Durchführung

Dieser Assay wurde in Kooperation mit Mag. Markus Mandl vom Institut für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Wien durchgeführt.

Das Hühnerei wurde am spitzen Pol aufgestochen, Flüssigkeit entfernt, um das Luftloch im Ei zu vergrößern, und das Loch mit Wachs verschlossen. Durch das vergrößerte Volumen konnte nun die stumpfe Seite mit einer Pinzette geöffnet werden,

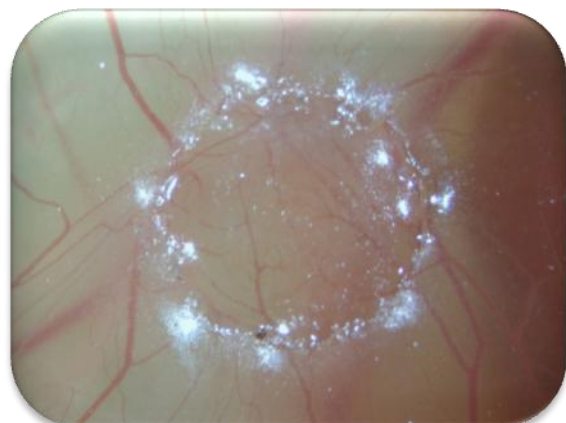


ABBILDUNG 27: HET-CAM. DER KLEINE RING VERHINDERT EIN VERTEILEN DER FLÜSSIGKEIT AUSSERHALB.

ohne die innere Eihaut – die CAM – zu verletzen, da sich diese von der Schale und der äußeren Eihaut, welche noch der Schale anliegt, gelöst hat. Die Substanzen konnten nun direkt mittels Pipette auf die durchsichtige CAM aufgetragen werden.

Danach wurde mit Alufolie umwickelt und im Brutschrank inkubiert. Es wurden Fotos zu Beginn und nach 10 Tagen gemacht und die Entwicklung von Blutgefäßen im untersuchten Areal verglichen.

4.3.7 Migration via Scratch-Assay

Hintergrund

Viele Krebszellen besitzen die Fähigkeiten zu migrieren, also zu wandern. Dies kann *in vivo* schwerwiegende Konsequenzen haben, wenn sich etwa einzelne Zellen aus ihrem festen Zellverband lösen und über die Blut- oder Lymphbahn zu anderen Organen wandern, um dort Metastasen zu bilden, was die häufigste Ursache für krebsbedingten Tod ist.⁹⁶⁻⁹⁸

Der Scratch-Assay ist ein einfaches *in vitro*-Modell, um Migration darzustellen. Eine migrationshemmende Wirkung von den Testsubstanzen in Konzentrationen deutlich unter der IC_{50} sollte gezeigt werden.

Durchführung

Die Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 8×10^5 Zellen/Well angesetzt und nach 24 Stunden wurde die Konfluenz, welche für diesen Assay Voraussetzung ist, überprüft. Mit einer Pipettenspitze wurden mit zwei Kratzern (*scratches*) im rechten Winkel zueinander die Zellen am Boden entlang dieser Rille mechanisch entfernt wie in Abbildung 28 gezeigt, sodass ein Mittelkreuz entsteht, welches leicht wieder gefunden werden kann. Danach wurde vorsichtig

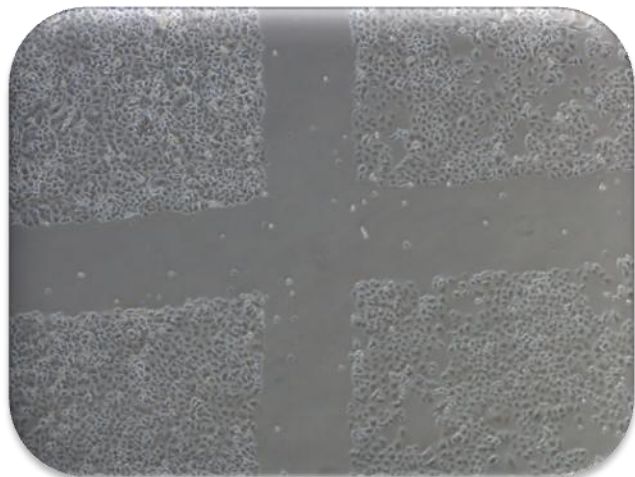


ABBILDUNG 28: SCRATCH-ASSAY NACH BEREITEN DES KRATZERS.

gewaschen, um ein weiteres Absetzen der abgekratzten und nun im Medium frei schwimmenden Zellen zu verhindern. Es wurde Testsubstanz in unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt und das Mittelkreuz mithilfe des Mikroskops zu unterschiedlichen Zeitpunkten fotografiert. Der Zeitpunkt 0 diente dabei als Kontrolle um die individuellen Unterschiede in der Breite der Kratzer zu berücksichtigen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Zytotoxische Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix

Zuerst wurde die zytotoxische Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix in diversen Zelllinien unterschiedlicher Herkunft untersucht und anhand der ermittelten IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte miteinander verglichen (Tab. 11-13).

Die Zytotoxizität und Zellproliferation sowohl von ENN B^{5,24,29,35,137}, als auch von BEA^{11,35,138-139} und ENN mix^{13,35} wurden bereits mehrfach an einer großen Vielfalt verschiedener humaner und nicht-humaner Zelllinien mit malignem und nicht-malignem Charakter untersucht. Alle drei Substanzen wirken beim Großteil der getesteten Tumorzelllinien unabhängig von deren histologischem Hintergrund im niedrigen mikromolaren Bereich zytotoxisch. ENN B weist meist höhere IC_{50} -Werte als die parallel untersuchten anderen Enniatine auf^{5,24}, während BEA in einer vergleichenden Studie etwas schwächer als ENN mix, aber stärker als ENN B ist³⁵.

In dieser Arbeit wurden neben den bereits untersuchten Zelllinien KB-3-I, KBC-I und A549^{13,35} auch die Zelllinien A2780, A2780cis, Calu6 und Calu6Sora, über die noch keine Daten vorlagen, auf ihre Sensitivität gegenüber den Testsubstanzen getestet. Vergleicht man die IC_{50} -Werte der einzelnen Zelllinien, so zeigten sich A549- und KB-3-I als besonders sensitiv gegenüber ENN B bzw. BEA, während Calu6Sora gegen beide Substanzen die höchste Resistenz vorwies. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der Zytotoxizität der einzelnen Substanzen, verglichen anhand ihrer 72 h IC_{50} -Werte (Tab. 12), mit den bereits publizierten Daten übereinstimmten. Grundsätzlich sind BEA und ENN mix etwa gleich stark wirksam, während ENN B eine etwas schwächere Zytotoxizität aufweist.

Weiters wurde die zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen in diversen Resistenzmodellen, nämlich in A2780 und der Cisplatin-resistenten Zelllinie A2780cis, Calu6 und der Sorafenib-resistenten Zelllinie Calu6Sora, KB-3-I und der Colchicin-resistenten Zelllinie KBC-I, untersucht. Dornetshuber *et al.*³⁵ fanden für ENN B nur eine 1.2-fache, für BEA eine 1.3-fache Resistenz der ABCB₁-überexprimierenden Zelllinie KBC-I gegenüber ihrer Mutterlinie KB-3-I, trotz der Tatsache, dass beide Substanzen Substrate von ABCB₁ (P-gp) sind.³⁵ Übereinstimmend mit den genannten Daten wurde in dieser Arbeit für ENN B eine 1.1-fache, für BEA ebenfalls eine 1.3-fache relative Resistenz beobachtet (Tab. 12). Einen signifikanten Einfluss von ABCB₁ konnte von Dornetshuber *et al.* nur in anderen Versuchen wie dem Clonogenic-Assay mit 7-tägiger Inkubation gezeigt werden.

Auch in den anderen Resistenzmodellen unterschieden sich die IC_{50} -Werte im Vergleich zu den Mutterlinien nur geringfügig (Tab. 12). Calu6Sora war zwar gegen alle 3 Substanzen resistenter als Calu6, allerdings nur um 4 % (ENN B), 7 % (BEA) und 8 % (ENN mix). Hingegen wurde A2780cis sogar sensitiver gegenüber allen 3 Testsubstanzen. Während bei ENN B (5 %) und ENN mix (6 %) nur eine geringe Zunahme der Toxizität gezeigt werden konnte, stieg sie bei BEA um 23 %. Der Resistenzmechanismus von A2780cis gegenüber Cisplatin beruht auf verbesserten DNA-Reparaturfähigkeiten⁵⁷ und auf gesenkter Platinakkumulation¹⁴⁰. Da Cisplatin durch Intra- und Interstrangbrücken die DNA direkt schädigt, führen diese Anpassungsmechanismen zu einer höheren Resistenz gegenüber Platinverbindungen und verwandten Substanzen. Allerdings profitieren davon möglicherweise Zytostatika mit anderen Wirkmechanismen, wie die Cyclodepsipeptide, die weder strukturell verwandt sind, noch direkten DNA-Schaden ausüben^{29,33}, indem bei dieser genetischen Umstellung andere Schutzmechanismen vernachlässigt werden. Worauf die leicht erhöhte BEA-Resistenz beruht, ob sie wie bei KB-3-I/KBC-I³⁵ in anderen Assays zunimmt und ob sie auch bei anderen Resistenzmodellen wie der Doxorubicin-resistenten Zelllinie A2780adr oder der Cisplatin-resistenten Zelllinie HeLaCK auftritt, muss erst in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

Der größte Unterschied zwischen ENN B und BEA war in der Cervixkarzinomzelllinie KB-3-I zu sehen, die mit den Testsubstanzen auch schon früher eingehend untersucht wurde.^{13,35} Sie wurde deshalb für weitere Assays herangezogen.

Zelllinie	ENN B	BEA	ENN mix
A2780 (72 h)	3.30 μ M	2.45 μ M	3.03 μ M
A2780cis (72 h)	3.26 μ M	2.05 μ M	3.04 μ M
A549 (72 h)	3.11 μ M	2.40 μ M	-
Calu6 (96 h)	3.21 μ M	2.99 μ M	2.84 μ M
Calu6Sora (96 h)	3.39 μ M	3.29 μ M	3.28 μ M
KB-3-I			
→ 24 h	3.75 μ M	3.48 μ M	-
→ 48 h	3.13 μ M	2.96 μ M	-
→ 72 h	3.34 μ M	2.36 μ M	-
KBC-I (72 h)	3.48 μ M	2.78 μ M	-

TABELLE 11: IC_{25} -WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN.

Zelllinie	ENN B	BEA	ENN mix
A2780 (72 h)	3.98 μM	3.64 μM	3.80 μM
A2780cis (72 h)	3.81 μM	2.95 μM	3.59 μM
A549 (72 h)	3.48 μM	3.08 μM	-
Calu6 (96 h)	3.94 μM	3.77 μM	3.75 μM
Calu6Sora (96 h)	4.10 μM	4.04 μM	4.05 μM
KB-3-1			
→ 24 h	4.74 μM	4.29 μM	-
→ 48 h	3.67 μM	3.45 μM	-
→ 72 h	3.73 μM	2.71 μM	-
KBC-I (72 h)	3.90 μM	3.45 μM	-

TABELLE 12: IC₅₀-WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN.

Zelllinie	ENN B	BEA	ENN mix
A2780 (72 h)	4.76 μM	4.70 μM	4.67 μM
A2780cis (72 h)	4.87 μM	4.46 μM	4.49 μM
A549 (72 h)	3.85 μM	3.82 μM	-
Calu6 (96 h)	4.69 μM	4.55 μM	4.66 μM
Calu6Sora (96 h)	4.81 μM	4.79 μM	4.82 μM
KB-3-1			
→ 24 h	>10 μM	>10 μM	-
→ 48 h	4.72 μM	3.92 μM	-
→ 72 h	4.32 μM	3.21 μM	-
KBC-I (72 h)	4.61 μM	4.06 μM	-

TABELLE 13: IC₇₅-WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN.

5.2 Wirkung von ENN B und BEA auf ER-Stress

Der tatsächliche Wirkungsmechanismus von ENN B und BEA ist noch nicht aufgeklärt. Als gesichert gilt unter anderem, dass ENN und BEA den Elektrolythaushalt, infolge der Bildung von Poren in der Zellmembran, die besonders für Ca^{2+} durchlässig sind, beeinflussen. Das Endoplasmatische Retikulum ist ein wichtiger Speicherort für Calcium-Ionen, daher ist der intrazelluläre Calciumlevel eng mit ER-Stress, dem UPR und Apoptose verbunden. Typische Apoptosezeichen, wie die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, die Erhöhung der proapoptotischen Proteine Bax, Bak und p-Bad, die Erniedrigung des

antiapoptotischen Bcl-2, die Freisetzung von Cytochrom c, Aktivierung von Caspase 3, Zellschrumpfung, DNA-Abbau, Chromatinkondensation und die Bildung von apoptotischen Körperchen, deuten darauf hin, dass die Cyclohexadepsipeptide Mitochondrien-vermittelte Apoptose induzieren.^{13,21-23} Um zu eruieren, inwieweit ER-Stress eine Rolle spielt, wurde der Effekt auf das Expressionsmuster wichtiger ER-Stress-Proteine, wie Chaperone und mitochondriale Membranproteine, mittels Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 29).

Während nach 6-stündiger Inkubation mit beiden Testsubstanzen bei den meisten UPR-Proteinen (die Chaperone Calnexin und BIP und der Katalysator Ero1- α) keine klaren Expressionsunterschiede zu erkennen waren, zeigte eIF-2 α eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme bei BEA, nicht aber bei ENN B.

Dieses Protein wird über den PERK-Pathway durch Phosphorylierung zu p-eIF2 α deaktiviert, wodurch die mRNA-Produktion und der Proteinlevel des ER gesenkt werden. Konträr dazu werden einzelne Proteine, wie ATF4, unter diesen Bedingungen vermehrt translatiert, was wiederum zur vermehrten Expression von UPR- und ERAD-Proteinen führt.⁸⁷ Weiters kommt es zur Aktivierung des apoptosefördernden CHOP, weshalb der PERK-Signalweg proapoptotisch ist. Zellen ohne PERK könnten Defizite in der Induktion des Zelltodes haben.¹⁴¹ Interessanterweise nahm auch die deaktivierte, phosphoryliert Form mit steigender Konzentration etwas ab. Der Grund für die Erniedrigung des eIF2 α -Spiegels bei BEA bleibt also unklar und könnte zum Teil auf erniedrigte Aktivierung, aber auch auf eine verminderte Expression oder den erhöhten Abbau dieser beiden Proteine zurückzuführen sein. Für eine genauere Aussage muss noch das Membranprotein PERK bestimmt werden, welches erst die Phosphorylierung von eIF2 α bewirkt.

Das Transmembranprotein IRE1 α zeigte mit ENN B eine konzentrationsabhängige Abnahme. Auch das Expressionsmuster unter BEA-Inkubation war verändert und zeigte eine tendenzielle Runterregulierung von IRE1 α (Abb. 29). Die Beteiligung vom IRE1 α -Signalweg scheint daher als unwahrscheinlich, sollte aber noch durch eine Messung der Spaltung von XBPI bekräftigt werden. Diese wird von IRE1 α induziert und hat – ähnlich wie ATF4 – die Aktivierung von CHOP und Expression von UPR- und ERAD-Genen zur Folge.⁸⁷

Zusammenfassend kann anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten eine wichtige Rolle des ER-Stress in ENN B- und BEA-induzierter Zytotoxizität also als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Bekräftigt wird dies durch die Untersuchung von Dornetshuber *et al.*, dass das von CHOP und JNK aktivierte proapoptotische Bim sowie das ebenfalls am ER-Stress beteiligte Bcl-2 unter Inkubation mit bis zu 10 μ M ENN mix weitgehend

unverändert bleibt. Weiters konnte eine Zunahme von Caspase 9 – der Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalweges – detektiert werden.¹³ Aufgrund dessen läuft ENN B- und BEA-induzierte Apoptose wohl vorrangig über den intrinsischen Signalweg ab.

Für eine endgültige Abklärung müssen allerdings noch die Expressionslevel anderer Regulatoren, wie CHOP, XBPI-Spaltung, PERK und Caspase 12 bestimmt werden.

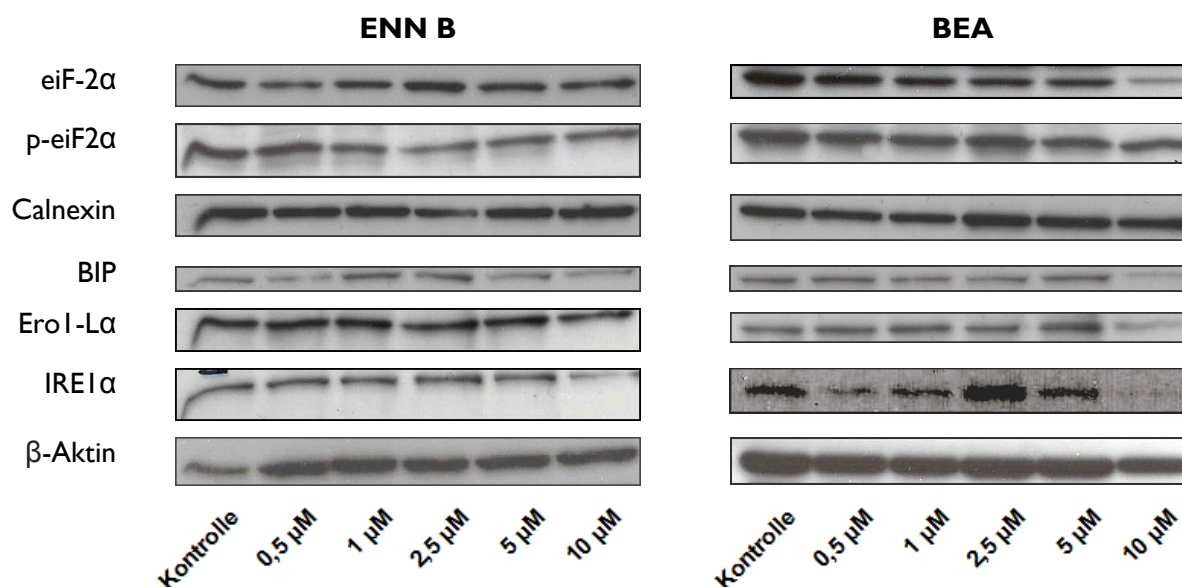


ABBILDUNG 29: WESTERN BLOTS VON UPR-MARKERN.

5.3 Kombinationsversuche mit ENN B, BEA und anderen Zytostatika

Die zytotoxische Wirkung von ENN B und BEA wurde in Kombination mit bereits zugelassenen Substanzen untersucht. Die Kombinationstherapie ist in der medikamentösen Krebstherapie eine häufig gewählte Strategie, um eine optimale Wirkung zu erreichen. Generell können Kombinationen synergistisch, additiv oder antagonistisch sein. Da sich in der klinischen Praxis einige Therapiestrategien bestehend aus verschiedenen Wirkstoffen als synergistisch herausgestellt haben, wird nun auch schon in den ersten Phasen der Arzneimittelforschung – also in den zahlreichen *in vitro*-Assays – ausgiebig danach gesucht. Auf diese Weise können außerdem Resistenzen umgangen werden, wenn die Substanzen auch verschiedene Angriffspunkte besitzen.

Da ENN B und BEA noch in einer sehr frühen Phase ihrer Erforschung stehen und nur einige wenige Forschungsgruppen mit ihnen arbeiten, ist die publizierte Menge an Kombinationsversuchen noch überschaubar. Die meisten davon wurden mit anderen Lebensmittelkontaminanten, wie z.B. Ochratoxin A, Fumonisin B₁, Desoxynivalenol und dem Toxin T-2, durchgeführt.^{22,138,142} Ruiz et al. berichteten über synergistische Effekte von BEA mit T-2 nach 24, 48 und 72 Stunden und kamen zu dem Schluss, dass eine gleichzeitige

Exposition von mehreren Toxinen durch Nahrungsaufnahme die Entwicklung diverser Krankheiten auslösen könnte.¹³⁸

5.3.1 Zytotoxizitätsassays mit diversen Zytostatika

Als Kombinationspartner wurden die Proteinkinasehemmer Sorafenib, Gefitinib, Erlotinib und Vemurafenib gewählt, da diese eine relativ neue, sehr wirkungsvolle Substanzklasse darstellen. Die Wirkungsmechanismen sind weitgehend geklärt, die genauen Moleküle, die inhibiert werden und ihre Signalwege sind bekannt. Sämtliche Proteinkinasehemmer, die verwendet wurden, greifen in EGF-Rezeptor-Pathways ein, die zu den am besten erforschten Signaltransduktionswegen zählen und auch eindeutig mit dem Entstehen von Krebs in Verbindung gebracht werden können. Sorafenib im Speziellen, bindet als Multikinasehemmer an vielfältige Zielstrukturen, sodass eine Wirkungsverstärkung über verschiedene Wege möglich ist.

Schließlich wurde noch die Kombination mit Cisplatin, einem der bekanntesten und wichtigsten Zytostatika, untersucht.

5.3.1.1 Zytotoxizitätsassay mit Sorafenib

Die zytotoxische Wirkung wurde mittels MTT-Assay untersucht. Dafür wurden die Testsubstanzen (je 1, 2, 3, 4 und 5 μM) mit Sorafenib (0.5, 1, 2.5, 5 und 10 μM) für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen wurden vorher in unabhängigen Versuchen ermittelt. CI-Werte von > 1 wurden als antagonistisch, < 1 als synergistisch angenommen.¹²¹

Bei allen Tests konnte bereits nach 24 h eindeutig ein synergistischer Effekt gezeigt werden, der sich mit steigender Inkubationsdauer verstärkte. Nach 24 h Inkubation mit ENN B wurde bereits punktuell ein CI-Wert von 0.60 (2 μM ENN B + 5 μM Sorafenib) erreicht. Für BEA hingegen waren die synergistischen Effekte hier mit $\text{CI}=0.95$ in der stärksten Kombination nur schwach ausgeprägt. Nach 48 h und 72 h Inkubationszeit kam es vor allem mit 2 oder 3 μM beider Testsubstanzen und 2.5 oder 5 μM Sorafenib zu einer stark synergistischen Wirkung. Die stärksten Effekte zeigten 3 μM ENN B + 5 μM Sorafenib ($\text{CI}=0.57$) und 2 μM BEA + 5 μM Sorafenib ($\text{CI}=0.53$) (Abb. 30, 31).

Diese Verdünnungen wurden in Folge auch für die weiteren Kombinationsassays der Substanzen verwendet. Während die IC_{50} für ENN B bei 3.73 μM lag, konnte sie durch Zusatz von 2.5 μM Sorafenib (IC_{50} : 6.58) auf 1.59 μM gesenkt werden, durch Zusatz von 5 μM gar auf 0.27 μM . Die Kombination von BEA und 5 μM Sorafenib senkte die IC_{50} von 2.71 μM auf 1.03 μM (Tab. 14).

IC50-Werte (KB-3-1)	ENN B (μM)	BEA (μM)
ohne Sorafenib	3.73	2.71
0.5 μM Sorafenib	3.44	2.60
1 μM Sorafenib	3.38	2.47
2.5 μM Sorafenib	1.59	2.24
5 μM Sorafenib	0.27	1.03
10 μM Sorafenib	-	-
nur Sorafenib	6.58	

TABELLE 14: IC₅₀-WERTE VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.

Als mögliche zukünftige Indikation für die getestete Kombination würden sich die derzeitigen Anwendungsgebiete für Sorafenib, nämlich Nieren- und Leberkrebs, anbieten, mit der Hoffnung, dass dadurch die hohe kardiovaskuläre Nebenwirkungsrate gesenkt werden könnte.¹⁴³⁻¹⁴⁴ Unter anderem wegen seiner Toxizität wurde Sorafenib auch schon vielfach *in vitro* und *in vivo* in Kombination mit vielen anderen Stoffen, wie Everolimus¹⁴⁵, Erlotinib¹⁴⁶ und Gemcitabin¹⁴⁷ – um nur einige aktuelle Beispiele zu nennen –, hinsichtlich eines synergistischen Effektes untersucht.

Da der tatsächliche Wirkungsmechanismus von ENN B und BEA noch weitgehend ungeklärt ist und die Targets von Sorafenib vielfältig sind, gestaltet sich die Suche nach der Ursache des Synergismus als schwierig.

Sowohl die Cyclodepsiptide als auch Sorafenib⁶² wurden als Substrate, ENN B und vor allem BEA auch als Hemmer³⁵ von P-Glykoprotein identifiziert. Denkbar wäre also entweder eine kompetitive Sättigung dieses ABC-Transporters mit der Folge einer gegenseitigen Wirkungssteigerung oder ein durch Antagonismus induzierter erhöhter intrazellulärer Sorafenib-Spiegel.

Um die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären, können auch spezifische Hemmer für die jeweiligen Zielstrukturen von Sorafenib eingesetzt werden. Ein erster Ansatz hierzu wurde in dieser Diplomarbeit bereits gemacht, indem der B-Raf-Inhibitor Vemurafenib mit den Testsubstanzen kombiniert wurde (siehe 5.3.1.3 Zytotoxizitätsassay mit Vemurafenib: Abb. 36).

Als nächstes wäre vor allem eine Kombination mit dem VEGF-Hemmer Bevacizumab in zweierlei Hinsicht sehr interessant: einerseits würde hier eine weitere antiangiogene Substanz in der Kombination getestet, andererseits könnte – durch die Erforschung der

Rolle von VEGF und VEGFR – ein nächster Schritt zur Aufklärung des Wirkmechanismus gemacht werden. Allerdings legen Daten von Wätjen *et al.* von ENN B und anderen Enniatinen den Verdacht nahe, dass auch die Hemmung der VEGF-Rezeptoren nicht der entscheidende Faktor für die synergistischen Effekte mit den Testsubstanzen ist. Sie untersuchten die Wirkung von Enniatinen auf einige Angiogenese-assoziierte Proteine, darunter VEGFR 2 und VEGFR 3, mit dem Ergebnis, dass keine signifikante Inhibierung stattfindet.²⁴ Natürlich muss diese Vermutung noch durch entsprechende Versuche bekräftigt werden, da in der angesprochenen Studie das von Sorafenib gehemmte VEGFR I sowie die zugehörigen Liganden nicht untersucht wurden. Außerdem liegen keine entsprechenden Daten für die Zervixkarzinomzelllinien KB-3-I und KBC-I vor, in denen der Effekt beobachtet wurde.

Der Zytotoxizitätsassay wurde außerdem in der Zelllinie KBC-I wiederholt, welche im Gegensatz zu KB-3-I Colchicin-resistent gezüchtet wurde. Die entstandene Resistenz begründet sich auf einer erhöhten Expression von P-gp (ABCB₁). Sowohl ENN B als auch BEA wurden als Substrate und Inhibitoren für diese Effluxpumpe identifiziert³⁵⁻³⁶, doch weichte das Muster der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht wesentlich voneinander ab (Abb. 30-32). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass P-Glykoprotein nur geringen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der untersuchten Substanzen besitzt und die beschriebenen Wechselwirkungen das zytotoxische Potential der Substanzen nicht beeinträchtigen.

Aufgrund des in Zytotoxizitätsassays gefundenen, vielversprechenden synergistischen Effekts von ENN und BEA mit Sorafenib, sollte dieser noch eingehender untersucht werden (siehe 5.3.2 Weitere Kombinationsversuche mit ENN B, BEA und Sorafenib).

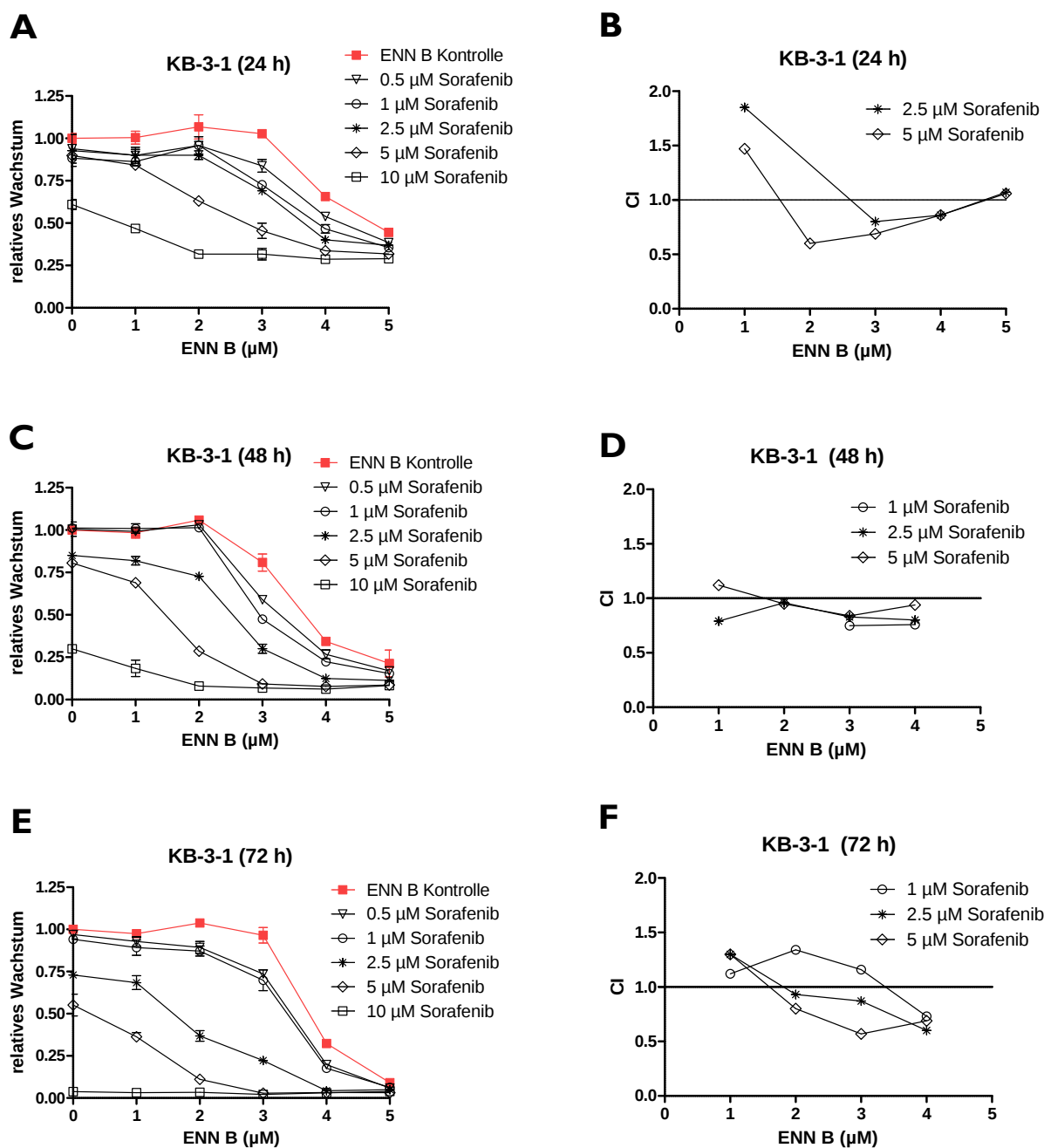


ABBILDUNG 30: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B MIT SORAFENIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN UND DAZUGEHÖRIGE CI-WERTE NACH (A,B) 24 h, (C,D) 48 h UND (E,F) 72 h INKUBATION. DIE SORAFENIB-KONTROLLE DER KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN IST AUF DER ORDINATE ANGEZEIGT.

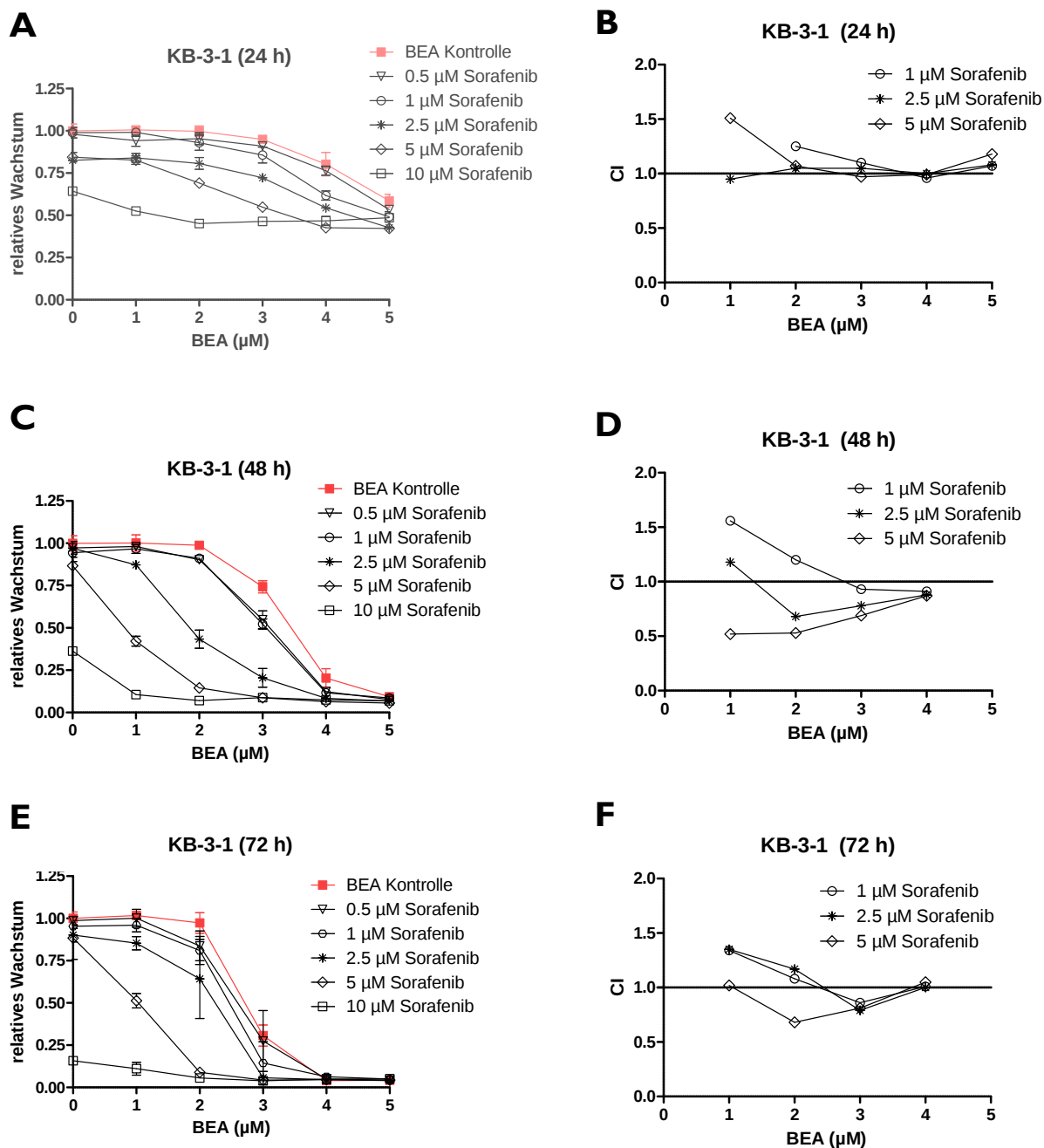


ABBILDUNG 31: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON BEA MIT SORAFENIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN UND DAZUGEHÖRIGE CI-WERTE NACH (A,B) 24 h, (C,D) 48 h UND (E,F) 72 h INKUBATION. DIE SORAFENIB-KONTROLLE DER KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN IST AUF DER ORDINATE ANGEZEIGT.

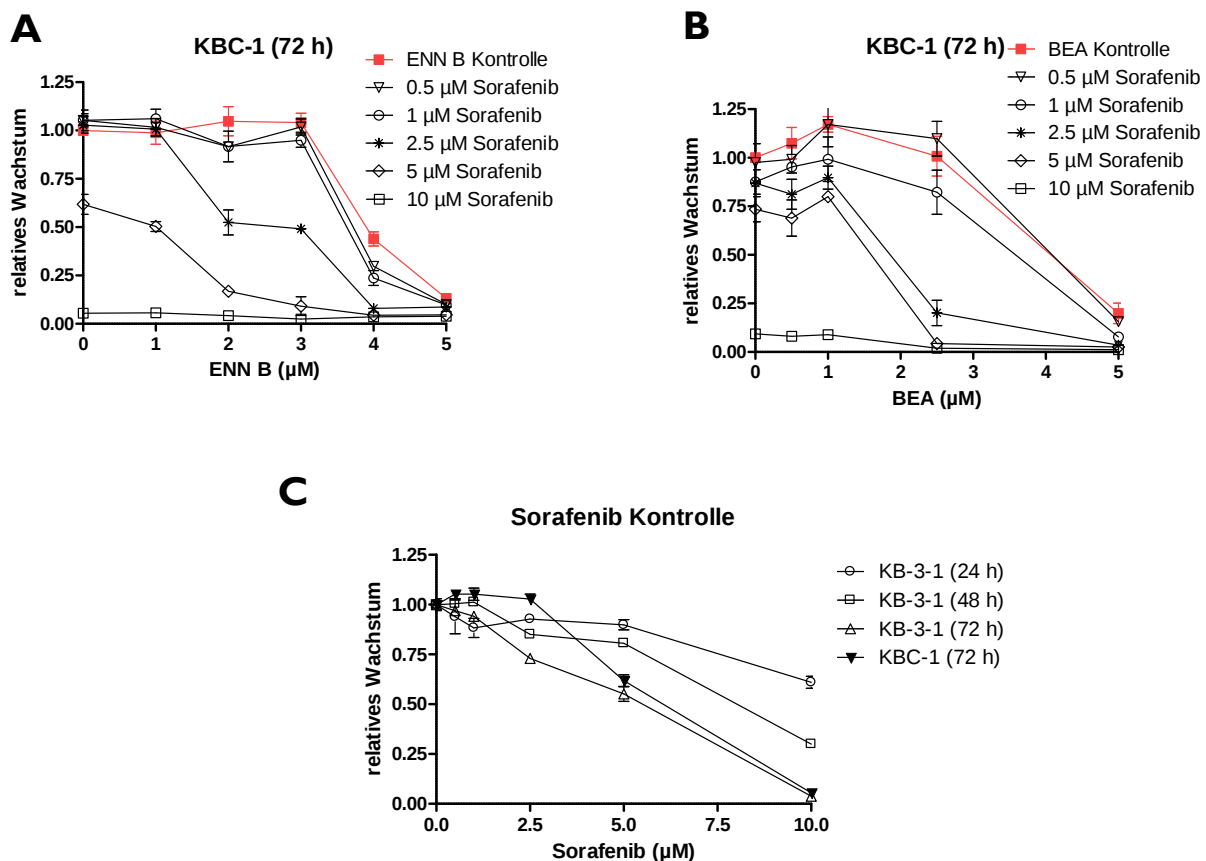


ABBILDUNG 32: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON (A) ENN B BZW. (B) BEA IN KOMBINATION MIT SORAFENIB AUF KBC-1-ZELLEN NACH 72 h INKUBATION. (C) KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON SORAFENIB AUF KB-3-1- UND KBC-1-ZELLEN NACH UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSZEIT.

5.3.1.2 Zytotoxizitätsassay mit Gefitinib und Erlotinib

Mittels MTT-Assay wurde hier nach fast demselben Schema wie bei Sorafenib die Zytotoxizität getestet. Die Testsubstanzen (je 1, 2, 3, 4 und 5 µM) wurden mit Gefitinib (1, 2.5, 5, 10 und 25 µM) für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen wurden wiederum vorher in unabhängigen Versuchen ermittelt. Auch hier war der Effekt nach 48 Stunden stärker als nach 24 Stunden, während nach 72 Stunden kaum Wirkungszunahme zu erkennen war (Abb. 33).

Da es sich bei Calcusyn um ein Programm handelt, welches auf mathematischen Operationen beruht, kann in manchen Fällen kein CI-Wert berechnet werden, so auch bei den Kombinationsversuchen von ENN B bzw. BEA mit Gefitinib. Rein optisch waren nur additive bis maximal leicht synergistische Effekte zu sehen, die allerdings deutlich schwächer als beim Kombinationsversuch mit Sorafenib ausfielen, weswegen auf weitere Versuche verzichtet wurde.

Gefitinib wirkt vor allem bei bestimmten Mutationen am EGF-Rezeptor zytotoxisch,

5. Ergebnisse und Diskussion

daher ist der Effekt als Einzelsubstanz bei KB-3-1 relativ schwach. Die Kombination mit ENN B bzw. BEA kann die Wirkung auch nicht verstärken.

Da die entsprechende Mutation hauptsächlich bei NSCLC-Zellen auftritt, ist Gefitinib bei Lungenkrebs zugelassen.^{49,63} Daher wurde der Versuch mit der Bronchialkarzinomzelllinie A549 wiederholt. Die Substanz wirkte in dieser Zelllinie zwar stärker als bei KB-3-1, doch zeigten sich hier nicht einmal additive Effekte (Abb. 34).

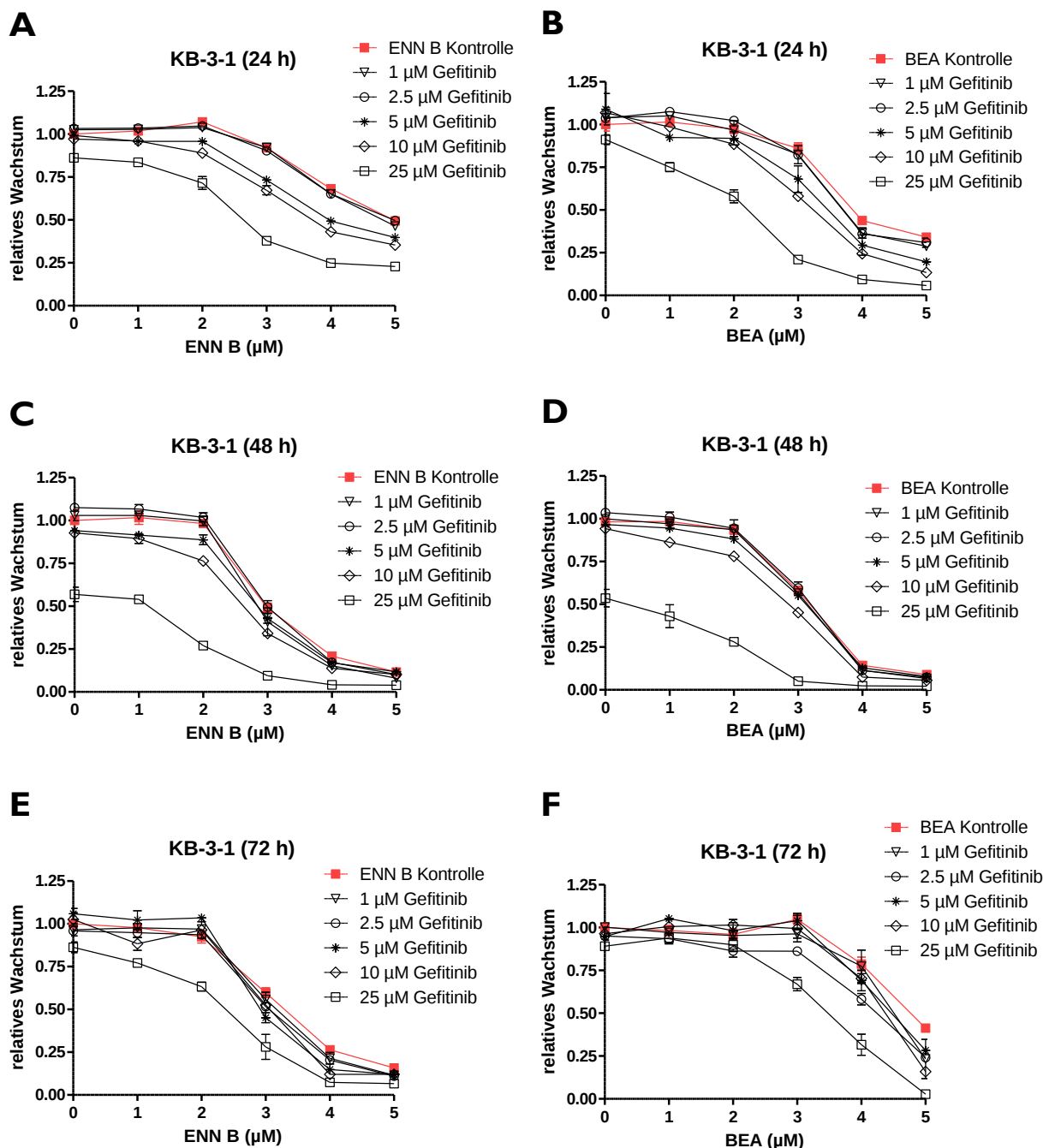


ABBILDUNG 33: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT GEFITINIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON ENN B BZW. BEA IN KOMBINATION MIT GEFITINIB AUF KB-3-1-ZELLEN NACH (A,B) 24 h, (C,D) 48 h UND (E,F) 72 h INKUBATION.

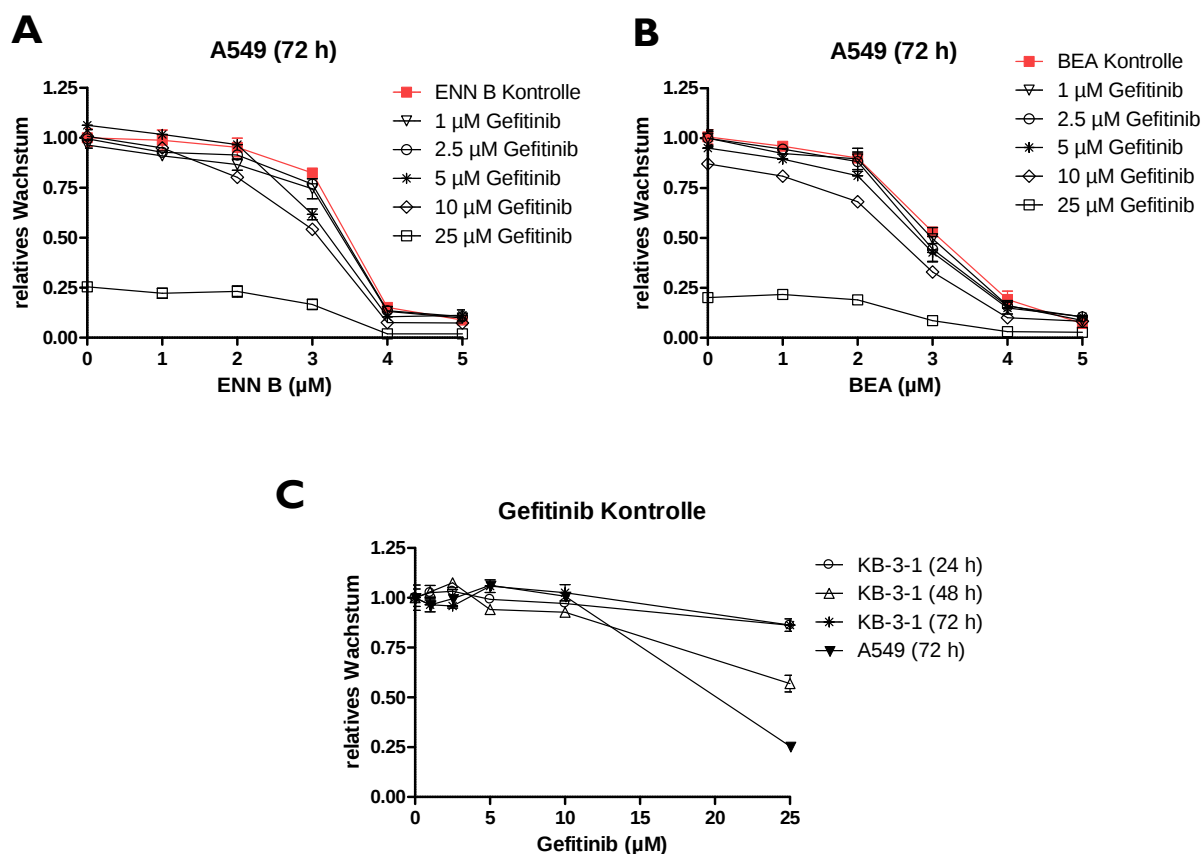


ABBILDUNG 34: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT GEFITINIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON (A) ENN B BZW. (B) BEA IN KOMBINATION MIT GEFITINIB AUF A549-ZELLEN NACH 72 h INKUBATION. (C) KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON SORAFENIB AUF KB-3-1- UND A549-ZELLEN NACH UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSZEIT.

Derselbe Versuch wurde nun auch noch mit Erlotinib wiederholt. Die Inkubation der Testsubstanzen (je 1, 2, 3, 4 und 5 μM) mit Erlotinib (1, 2.5, 5, 10 und 20 μM) erfolgte vorerst über 72 Stunden und sollte nur bei einem positiven Effekt weiter variiert werden. Hier wurden ebenfalls die beiden unterschiedlichen Zelllinien KB-3-1 und A549 verwendet.

Erlotinib ist als EGFR-Hemmer sehr nahe mit Gefitinib verwandt und auch Wirkmechanismus und klinisches Anwendungsspektrum sind beinahe gleich. Doch die Kombination zeigt in allen 4 Versuchen so gut wie keinen Effekt. Erlotinib selbst wirkte überhaupt nicht toxisch, höhere Konzentrationen können aufgrund der Löslichkeitsgrenze nicht untersucht werden – Erlotinib würde kristallin ausfallen. Auch die Toxizität von ENN B bzw. BEA wurde durch die zusätzliche Substanz weder verstärkt noch abgeschwächt (Abb. 35).

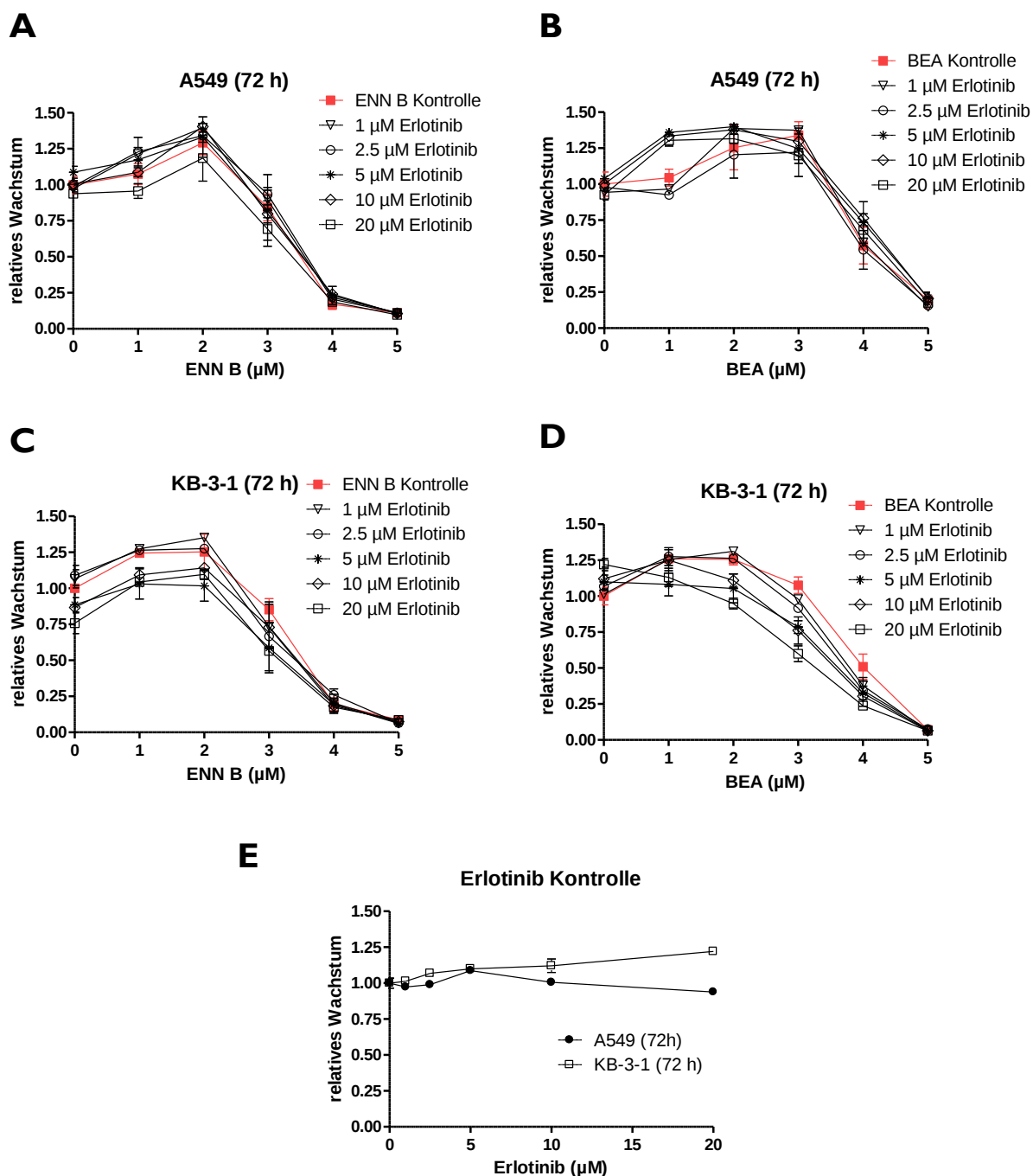


ABBILDUNG 35: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT ERLOTINIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON (A,C) ENN B BZW. (B,D) BEA IN KOMBINATION MIT ERLOTINIB AUF A549- UND KB-3-1-ZELLEN NACH 72 H INKUBATION. (E) KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON ERLOTINIB AUF A549- UND KB-3-1-ZELLEN NACH 72 H INKUBATIONSZEIT.

Sowohl Gefitinib als auch Erlotinib wurden bereits aussichtsreich in Kombination mit dem von der FDA zugelassenen Cyclodepsipeptid Romidepsin getestet. Copland *et al.* wiesen additive Effekte mit Gefitinib nach, in der Dreifachkombination mit Paclitaxel wurden die stärksten synergistischen Zellproliferation-inhibierenden Ergebnisse dieser Studie an der aus Lymphknotenmetastasen stammenden Schilddrüsenkrebszelllinie LAMI beobachtet.¹⁴⁸

Zhang *et al.* zeigten in einer Studie an neun verschiedenen NSCLC-Zelllinien synergistische Effekte von Erlotinib mit Romidepsin.¹⁴⁹ An einer Reihe weiterer Zelllinien wurde die Kombination von Erlotinib und dem synthetischen Kahalalid F-Derivat Elisidepsin, welches sich im Moment in Phase II-Studien befindet, getestet. Im Gegensatz zu ENN B und BEA konnten für Elisidepsin in Kombination mit Erlotinib bei A549-Zellen synergistische Effekte gezeigt werden.^{121,150}

Allerdings wird die Wirkung von Romidepsin und Elisidepsin auf andere molekulare Mechanismen zurückgeführt als jene von ENN B und BEA, die nach derzeitigen Wissensstand vorrangig als Ionophor wirken. Romidepsin wird der Klasse der Histondeacetylase(HDAC)-Hemmer zugerechnet. HDAC führt zur Freilegung von Histonen und ist somit an zellulären Prozessen, wie Genregulation und Zelldifferenzierung, beteiligt. Es ist bei einigen Tumoren fehlreguliert.^{45,151} Die Kahalalid-Familie wiederum, zu der Elisidepsin zählt, scheint seine zytotoxische Wirkung durch Beeinflussung von Signalwegen, wie der PI3K/AKT-Kaskade, zu erzielen, welche unter anderen über ErbB3 aktiviert wird.¹²¹

Über diese Mechanismen liegen für ENN B und BEA noch keine Daten vor. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Synergismusversuche mit Erlotinib scheinen jedoch vermutlich auf unterschiedlichen Wirkmechanismen der Cyclodepsipeptide zurückzuführen zu sein.

5.3.1.3 Zytotoxizitätsassay mit Vemurafenib

Vemurafenib, ein spezifischer B-Raf-Inhibitor, auch unter der Bezeichnung PLX4032 bekannt, wurde gewählt, um zu zeigen, ob der Synergismus der Kombinationsversuche mit dem Multikinasehemmer Sorafenib auf einer Hemmung von B-Raf beruht. Wenn dies der Fall ist, müsste hier der gleiche oder aber zumindest ein deutlich ausgeprägter Synergismus zu erkennen sein.

Dafür wurden KB-3-I-Zellen für 72 Stunden mit Vemurafenib (10, 100, 500, 1000 und 2000 nM) in Kombination mit ENN B und BEA (je 1, 2, 3, 4 und 5 μ M) inkubiert. Wie in Abbildung 36 ersichtlich, zeigte Vemurafenib auch bei der sehr hohen Konzentration von 2 μ M keine Zytotoxizität – ganz im Gegenteil wurde das Wachstum sogar geringfügig stimuliert. In Kombination mit den Testsubstanzen wurde dieser zellproliferierende Effekt sogar noch verstärkt. Der stärkste wachstumssteigernde Effekt (1.5-fache Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle) wurde bei der Behandlung mit 1 μ M PLX4032 und 2 μ M ENN B beobachtet.

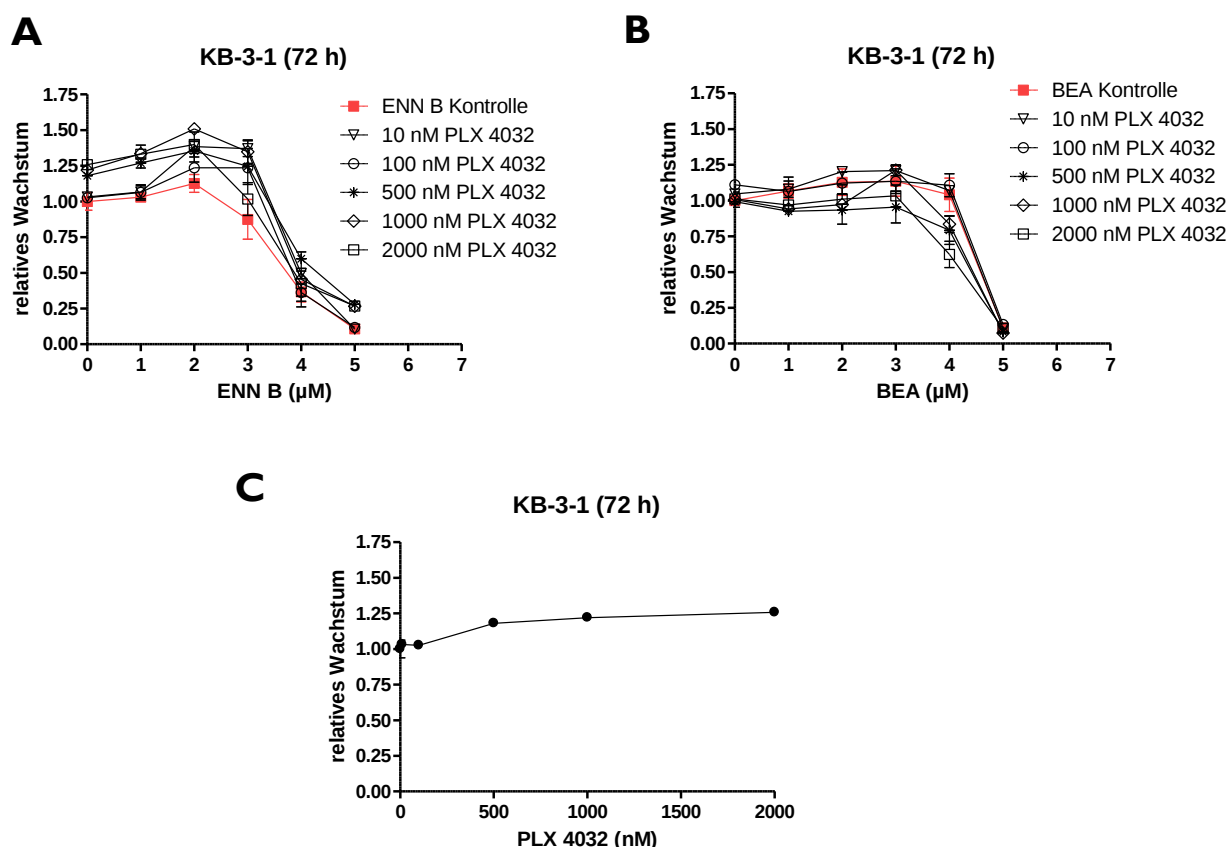


ABBILDUNG 36: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT VEMURAFENIB. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON (A) ENN B BZW. (B) BEA IN KOMBINATION MIT VEMURAFENIB AUF KB-3-1-ZELLEN NACH 72 H INKUBATION. (C) KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVE VON VEMURAFENIB AUF KB-3-1-ZELLEN NACH 72 H INKUBATIONSZEIT.

Wätjen et al. stellten bereits die Vermutung an, dass die zelluläre Wirkung von ENN B, wie auch jene von ENN A₁ und ENN B₁, auf der Beeinflussung von Proteinen des EGF-Rezeptor-Signalweges beruht, und zwar *downstream* von EGF und B-Raf, aber *upstream* von ERK und MEK.²⁴ Wenn sich diese Annahme bestätigt und ENN B und auch BEA tatsächlich in den MAP-Kinase-Signalweg eingreifen, liegt der Verdacht nahe, dass der Synergismus in der Tat auf dieser Kaskade beruht, auch wenn B-Raf nicht ursächlich dafür verantwortlich ist.

Da in diesem Versuch weder ein synergistischer noch additiver Effekt nachgewiesen werden konnte, kann B-Raf als Ursache des Synergismus bei der Kombinationstherapie mit Sorafenib weitestgehend ausgeschlossen werden.

Um den Wirkungsmechanismus zusätzlich einzuschränken, sollten weitere spezifische Hemmer – soweit vorhanden – für die anderen Targets von Sorafenib, nämlich VEGFR 1-3, PDGFR β , KIT, C-Raf, FLT-3 und Ret, getestet werden. So eignet sich beispielsweise Imatinib als Hemmer von PDGF, c-Kit und Ret.^{49,151} Aber auch Bevacizumab, ein VEGF-Hemmer, bietet sich an, da dieser wie Sorafenib auch ein Angiogenesehemmer ist und möglicherweise ebenfalls stark synergistisch wirkt.

5.3.1.4 Zytotoxizitätsassay mit Cisplatin

Nach den erfolgreichen Versuchen mit Gefitinib und vor allem Sorafenib sollte zuletzt auch noch das etablierte und bekannte Zytostatikum Cisplatin (0.25, 0.5, 1, 2.5 und 5 μM) in Kombinationsversuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau auf seine Zytotoxizität untersucht werden.

Für diesen Versuch wurde die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 gewählt, da die Testsubstanzen in ihr, verglichen mit der für die meisten Assays verwendeten Zelllinie KB-3-1, eine gleichwertige Zytotoxizität aufweisen und da außerdem mit A2780cis bereits eine etablierte Cisplatin-resistente Tochterzelllinie existiert, die bei einem synergistischen Effekt für weitere Versuche herangezogen werden hätte können. Außerdem wurde in einer aktuellen Studie die Wirkung von Cisplatin in Kombination mit dem Cyclodepsipeptid Romidepsin in Ovarialkarzinomzelllinien untersucht.⁴⁷ Auch für Elisidepsin wurde jüngst eine synergistische Wirkung mit Cisplatin beschrieben.¹⁵²

Doch wie schon bei Gefitinib und Erlotinib fielen die Effekte mit ENN B und BEA schwächer aus als für die oben erwähnten strukturverwandten Substanzen (Abb. 37). Es konnte weder eine additive noch eine synergistische Wirkung festgestellt werden, im Bereich von 2 μM beider Cyclodepsipeptide war die Kombination sogar eher antagonistisch. Da Cisplatin seine Wirkung vor allem über DNA-Strangbrüche entfaltet und ENN B und BEA zu einem Zellzyklusarrest führen, schützen diese möglicherweise die Zelle sogar vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität.

Aufgrund des Ausbleibens eines vielversprechenden Ergebnisses wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

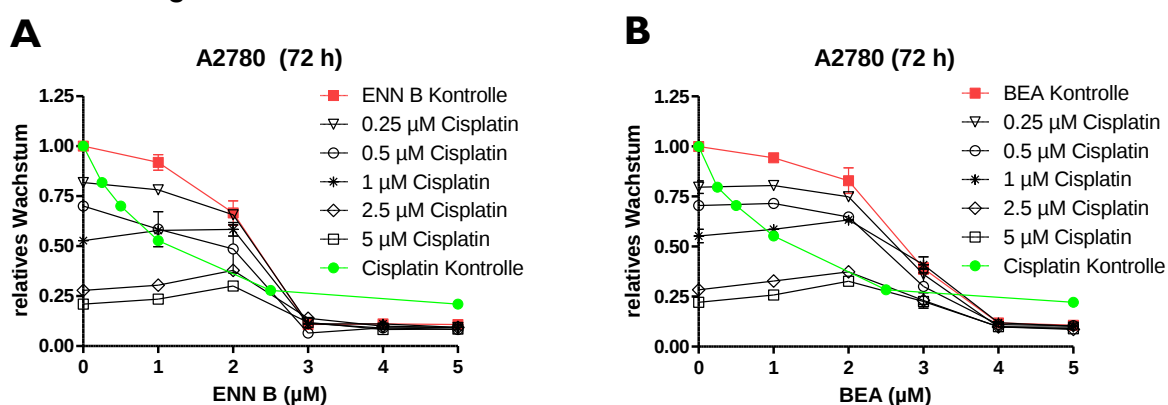


ABBILDUNG 37: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT CISPLATIN. KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON (A) ENN B BZW. (B) BEA IN KOMBINATION MIT CISPLATIN AUF A2780-ZELLEN NACH 72 h INKUBATION.

5.3.2 Weitere Kombinationsversuche mit ENN B, BEA und Sorafenib

Zusammenfassend kann aus den vorangegangenen Versuchen gesagt werden, dass Sorafenib von allen fünf in Zytotoxizitätsassays untersuchten Substanzen die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte. Um den zugrunde liegenden Wirkmechanismus eingehender zu untersuchen, wurden noch vertiefende Versuche mit dieser Kombination durchgeführt.

5.3.2.1 Proteinanalyse

Um den synergistischen Effekt auf zellulärer Ebene zu ergründen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden KB-3-1-Zellen für 24 h mit drei verschiedenen ENN B- bzw. BEA-Konzentrationen (1, 2 und 3 μM) und Sorafenib (2.5 und 5 μM) behandelt. Die verwendeten Konzentrationen wurden anhand der zuvor durchgeführten Zytotoxizitätstests gewählt. Dieses Schema wurde auch für sämtliche weitere Assays mit diesen Substanzen beibehalten. Die aus den Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden für die in dieser Arbeit gezeigten Western-Blot-Analysen verwendet.

Die Spaltung und damit Deaktivierung des Reparaturproteins PARP (*Poly-ADP-Ribose-Polymerase*) zu „cleaved PARP“ ist ein maßgeblicher Zwischenschritt beim programmierten Zelltod und wird daher in der Molekularbiologie als Marker für Apoptose herangezogen. Wie in Abbildung 38 ersichtlich, kam es zu einer Veränderung im Expressionsmuster von PARP. ENN B, BEA und Sorafenib führten als Einzelsubstanzen konzentrationsabhängig zu einem Anstieg von cleaved PARP, der durch Kombination der Testsubstanzen mit Sorafenib noch wesentlich verstärkt wurde. Dementsprechend nahm auch PARP zugunsten von cl. PARP ab. Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Spaltung von PARP wurde bereits für ENN mix berichtet.¹³ Vor allem für BEA wurden apoptotische Prozesse, wie die Aktivierung diverser Caspasen und die Erhöhung verschiedener proapoptotischer Proteine, nachgewiesen.^{13,21-23} Daher wurde vermutet, dass der synergistische Effekt einer verstärkten Apoptoseinduktion zugrunde liegt.

Deswegen wurden in dieser Diplomarbeit auch noch eine JCI- und eine HöPI-Färbung gemacht, um die durch die Spaltung von PARP gefundenen Anzeichen einer Apoptose der Kombination ENN B/BEA mit Sorafenib zu bekräftigen.

Weiters wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf pJNK, ERK und p38 untersucht. Es handelt sich bei allen dreien um verschiedene MAP-Kinasen, die auch von unterschiedlichen Proteinen aktiviert werden und in ihrer phosphorylierten Form vor allem zu Wachstum und Differenzierung führen.¹⁵³

Die Aktivierung von JNK zeigte keine wesentliche Änderung und wurde nur durch Kombinationen der Testsubstanzen mit 5 μM Sorafenib etwas abgeschwächt. Durch die Inhibition des Wachstumsfaktors in diesem Bereich kann eine zytostatische Wirkung erklärt werden.

Die Konzentrationen von pp38 und pERK stiegen besonders bei Behandlung mit ENN B an. Bei BEA war dieser Trend zumindest bei pp38 auch erkennbar. Durch Zugabe von Sorafenib sank die Konzentration von pp38 und pERK wieder ab (Abb. 38). Der Level der inaktiven Formen, nämlich p38 und ERK, blieb gleich. Das heißt, dass die Änderung in der Konzentration der beiden phosphorylierten Proteine nicht auf eine geringere Konzentration des Proteins zurückzuführen ist, sondern auf eine Hemmung der Aktivierung. Dies wiederum bedeutet möglicherweise, dass diese beiden Wachstumsfaktoren die Zelle bei Exposition mit ENN B schützen. Durch die Zugabe von Sorafenib wird der Schutz aufgehoben. Außerdem könnte dadurch die beobachtete wachstumsstimulierende Wirkung der Cyclohexadepsipeptide in niedrigen Konzentrationen bis zu maximal 3 μM durch die Zunahme dieses Wachstumsfaktors erklärt werden.

Interessant wäre hierbei, ob eine Kombination von ENN B mit dem p38-Inhibitor SB203580^{82,154} oder dem ERK-Inhibitor PD098059^{82,154} vergleichbare synergistische Effekte wie die Kombination mit Sorafenib zeigt. Dadurch könnten die molekularen Prinzipien, die hinter der beobachteten Wirkung der Kombination dieser beider Substanzen stecken, weiter erforscht werden. ERK wird von der MAP-Kinase-Kinase MEK aktiviert, die wiederum unter der Regulation von unterschiedlichen anderen Faktoren, unter anderem Raf, steht.¹⁵³ Da die Kombination des B-Raf-Inhibitors Vemurafenib mit den Testsubstanzen die Zytotoxizität nicht verstärken konnte, wurde eine ursächliche Beteiligung dieses Proteins an der synergistischen Wirkung zwischen den Cyclopeptide und Sorafenib ausgeschlossen. Dass der ERK-Signalweg aber trotzdem beeinflusst wird, zeigte die Abnahme von pERK in der Kombination.

MAP-Kinasen führen zu Wachstum und sind deswegen in vielen Tumoren vermehrt aktiviert. Die Inhibierung von MAP-Kinase-Signalwegen ist daher auch ein wichtiges Instrument der modernen Chemotherapie. Auch der Multikinasehemmer Sorafenib greift über mehrere seiner Zielstrukturen regulierend ein.^{49,155} Die Veränderungen im Expressionsmuster von pp38 und pERK könnten tatsächlich eine Erklärung für den synergistischen Effekt der Cyclohexadepsipeptide mit Sorafenib sein.

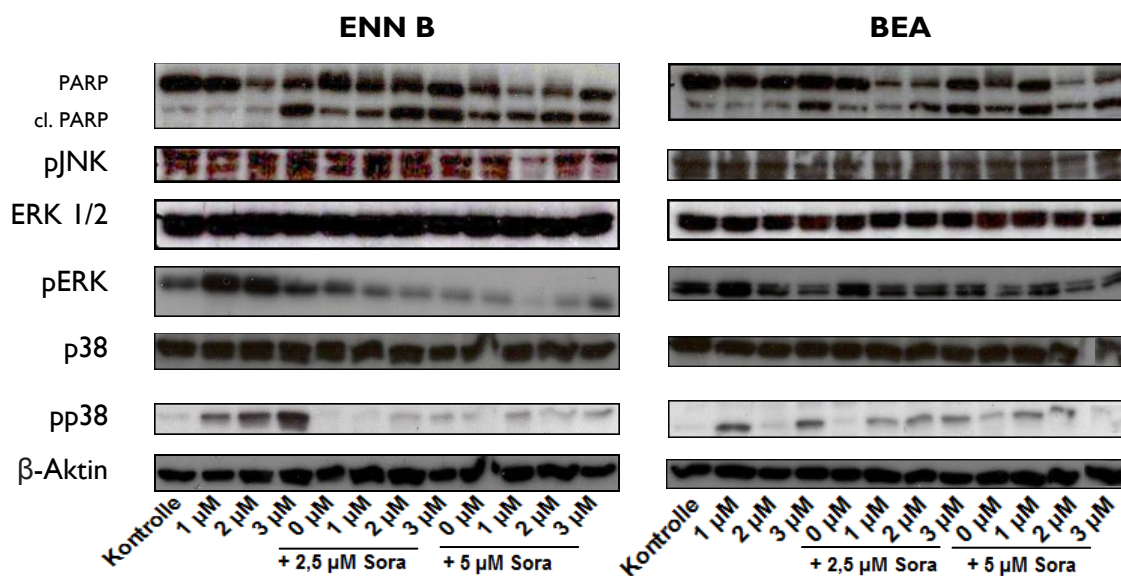


ABBILDUNG 38: WESTERN BLOTS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.

5.3.2.2 Zellzyklusanalyse

In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss von ENN B und BEA in Kombination mit Sorafenib auf den Zellzyklus untersucht werden. Hier wurde eine Zellzyklusanalyse nach 24 und 48 Stunden durchgeführt.

Während bei allen Versuchen der prozentuale Anteil der in der G_0/G_1 -Phase befindlichen Zellen, die nur mit einer der drei Substanzen behandelt wurden, tendenziell eher zunahm, sank der entsprechende Anteil bei den höchsten Konzentrationen der Kombinationsversuche merklich. Im Gegensatz dazu kam es in den Kombinationsversuchen zu einem Anstieg der Zellpopulation in der G_2/M -Phase. Der Trend war schon nach 24 Stunden zu erkennen und verstärkte sich nach 48 Stunden (Abb. 39, 40). Die Zahl der in der S-Phase befindlichen Zellen blieb mehr oder weniger konstant.

Passend zu den in dieser Diplomarbeit ermittelten Daten berichteten kürzlich auch Gammelsrud *et al.* über eine mit ENN B verringerte Cyclin D_1 -Konzentration und einen Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase¹⁵⁶. Für ENN mix wurde nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 2.5 μM und höher eine Verschiebung der Zellen in die S- und mit steigender Konzentration in die G_2/M -Phase beschrieben. Dies geht einher mit veränderter Cyclin-Expression.¹³

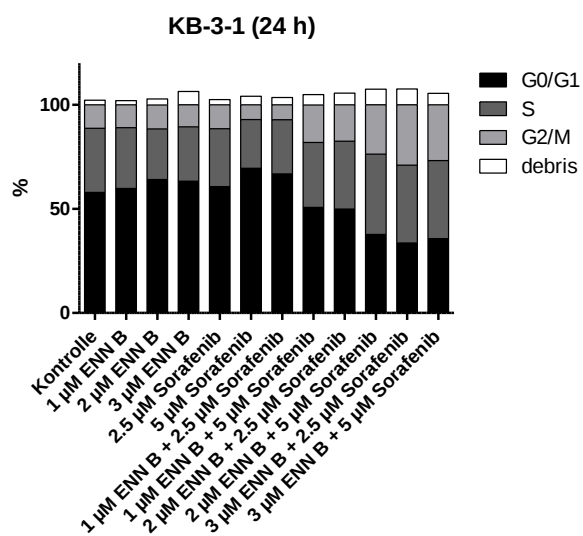
Die leichte Änderung im Verteilungsmuster bei den Einzelsubstanzen liegt womöglich an einem Stopp an einem Kontrollpunkt in der G_1 -Phase oder an einer Verschiebung der Zellen

in eine Ruheperiode (G_0 -Phase). Ähnliche zytostatische Effekte wurden für Sorafenib bereits beschrieben¹⁵⁷⁻¹⁵⁸, mit der Überlegung, dass dadurch zytotoxische Stoffe, die in der S-Phase wirken, antagonisiert werden.¹⁵⁹ Dass die Cyclodepsipeptide ihre Wirkung also während der Synthese entfalten, scheint eher unwahrscheinlich.

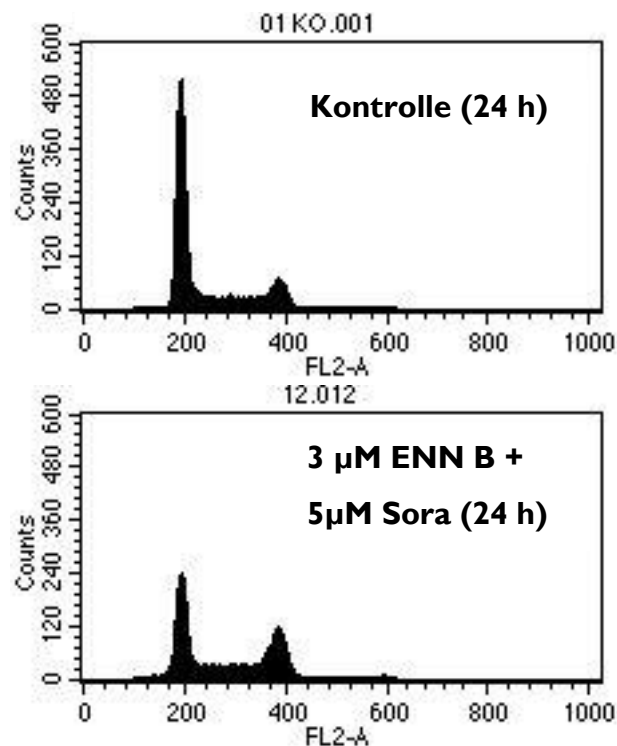
Bei der Kombination drehte sich das Muster um. Die Zellen wurden vermehrt in die S- und dadurch in die G_2 -Phase befördert. Diese lief dann normal ab, wodurch eine Akkumulation in der G_2 /M-Phase stattfand. Eine andere Möglichkeit wäre eine normal ablaufende S-Phase, aber eine abgeschwächte Mitose. Es wird Bestandteil zukünftiger Studien sein müssen, inwieweit ENN B und BEA mit Sorafenib tatsächlich die Mitose beeinflussen und wodurch dieser Effekt, der bei den einzelnen Substanzen nicht gesehen werden kann, hervorgerufen wird.

In einem ersten Ansatz könnten hierfür erst einmal der Proteinlevel verschiedener Cycline ermittelt werden. Zum Beispiel wurde sowohl für Sorafenib¹⁶⁰ als auch für ENN B¹⁵⁶ in höheren Konzentrationen eine Abnahme von Cyclin D_1 beschrieben. Es wäre interessant, ob sich dieser Effekt in der Kombination potenziert. Da im Kombinationsversuch ein Zellzyklusarrest im der G_2 /M-Phase festgestellt wurde, bietet sich auch Cyclin B für eine Untersuchung an, da jenes in diesen beiden Phasen aktiv ist und den Zellzyklus in der Zelle vorantreibt.⁵² Cyclin B_1 sinkt bei hohen ENN mix-Konzentrationen (10 μ M) sehr stark.¹³

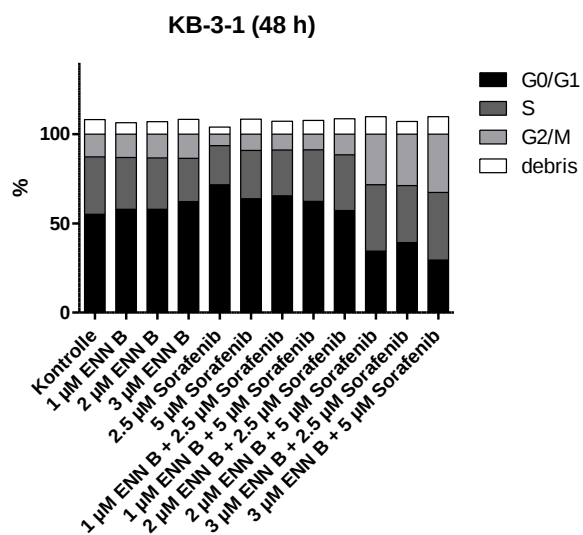
A



B



C



D

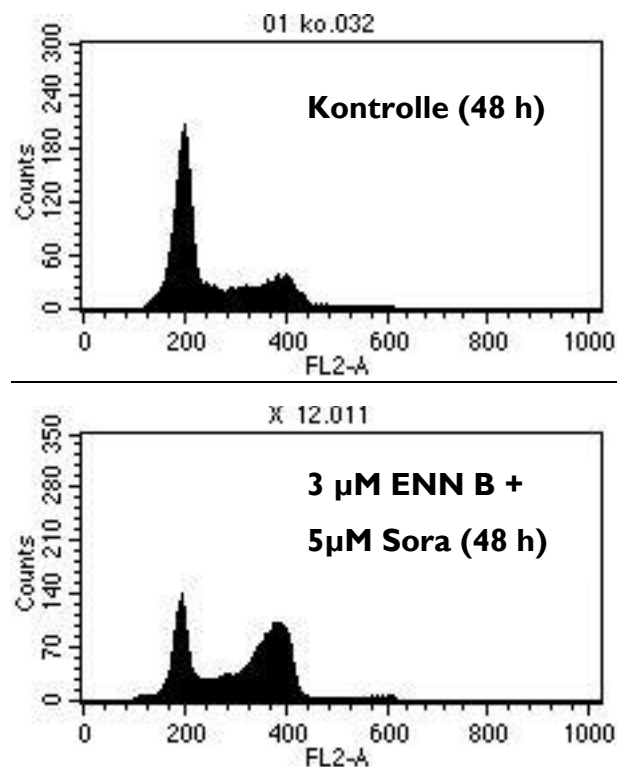


ABBILDUNG 39: ERGEBNISSE DER ZELLYKLUSANALYSE VON ENN B MIT SORAFENIB NACH 24 h UND 48 h INKUBATION. (A,C) AUSWERTUNG DER HISTOGRAMME ALS BALKENDIAGRAMM. (B,D) HISTOGRAMME DER KONTROLLE UND NACH BEHANDLUNG MIT DEN HÖCHSTEN KONZENTRATIONEN DER VERWENDETEN SUBSTANZEN.

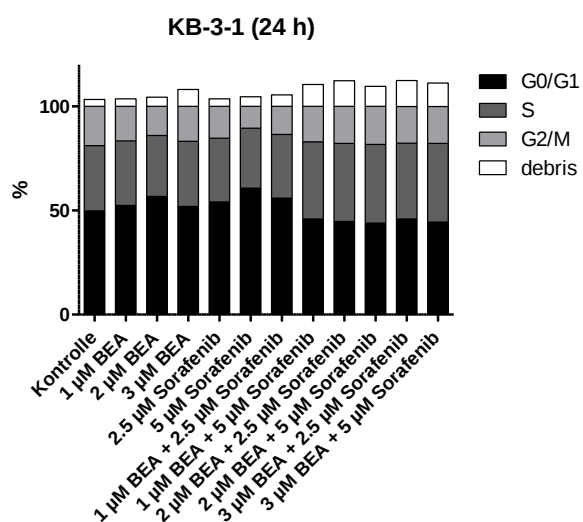
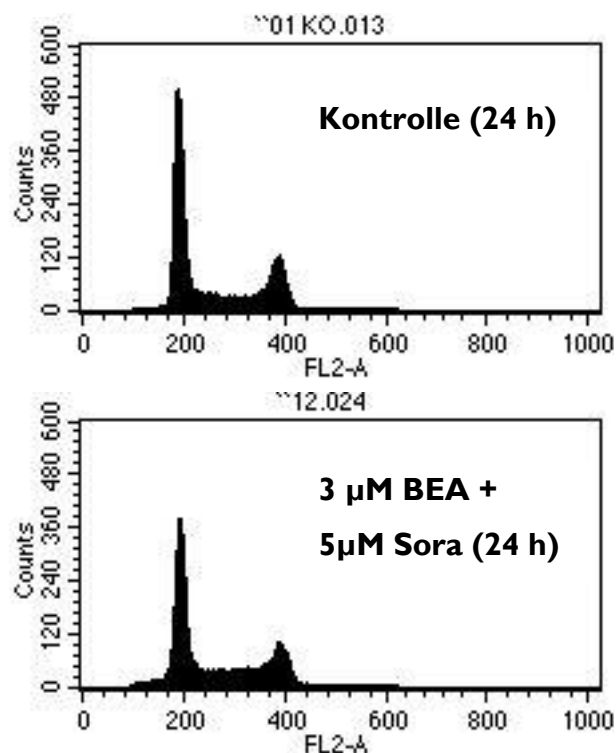
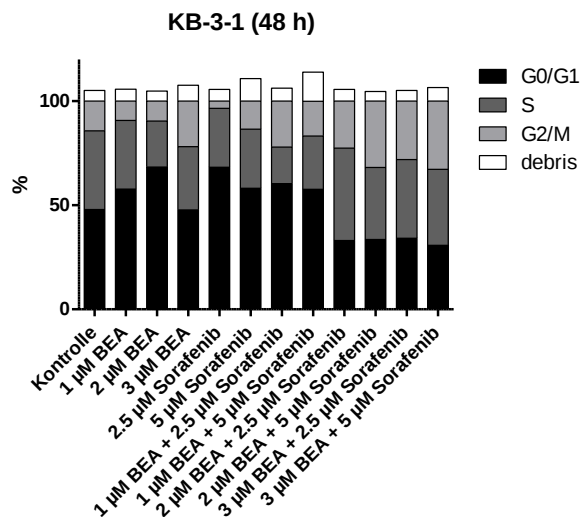
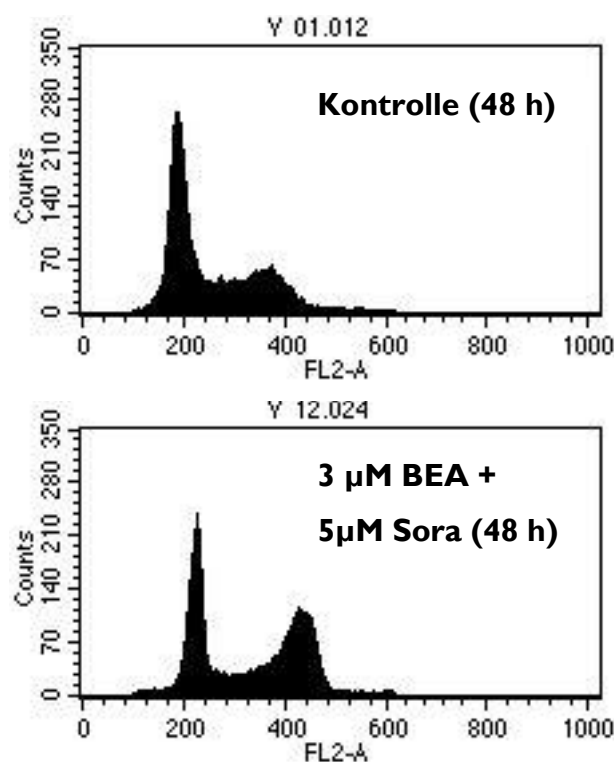
A**B****C****D**

ABBILDUNG 40: ERGEBNISSE DER ZELLZYKLUSANALYSE VON BEA MIT SORAFENIB NACH 24 h UND 48 h INKUBATION. (A,C) AUSWERTUNG DER HISTOGRAMME ALS BALKENDIAGRAMM. (B,D) HISTOGRAMME DER KONTROLLE UND NACH BEHANDLUNG MIT DEN HÖCHSTEN KONZENTRATIONEN DER VERWENDETEN SUBSTANZEN.

5.3.2.3 ^3H -Thymidin-Einbau

Anknüpfend an die Analyse des Zellzyklus wurde mit den gleichen Konzentrationen auch ein ^3H -Thymidin-Einbau durchgeführt. Die Zellen erhalten den Tritium-markierten β -Strahler Desoxythymidin als Substrat, der in der S-Phase zur Verdoppelung der DNA eingebaut wird. Die emittierte Strahlung wird als Maß für die Fähigkeit der Zelle, DNA zu synthetisieren, gemessen. Als Inkubationszeit wurden 24 Stunden gewählt, also genau jene Zeit, die für das Durchlaufen des Zellzyklus notwendig ist.

Die Einzelsubstanzen zeigten jeweils eine gleichbleibende bis erhöhte DNA-Syntheserate über 24 Stunden, wohingegen die Kombinationen analog zur Zellzyklusanalyse genau das Gegenteil ergaben, nämlich eine eindeutige Verminderung.

Die zytotoxischen Effekte des parallel durchgeführten MTT waren nach nur 24 Stunden Inkubation bei ENN B noch schwach, bei BEA höher und deckten sich weitestgehend mit den zuvor durchgeführten Zytotoxizitätsassays (Abb. 41).

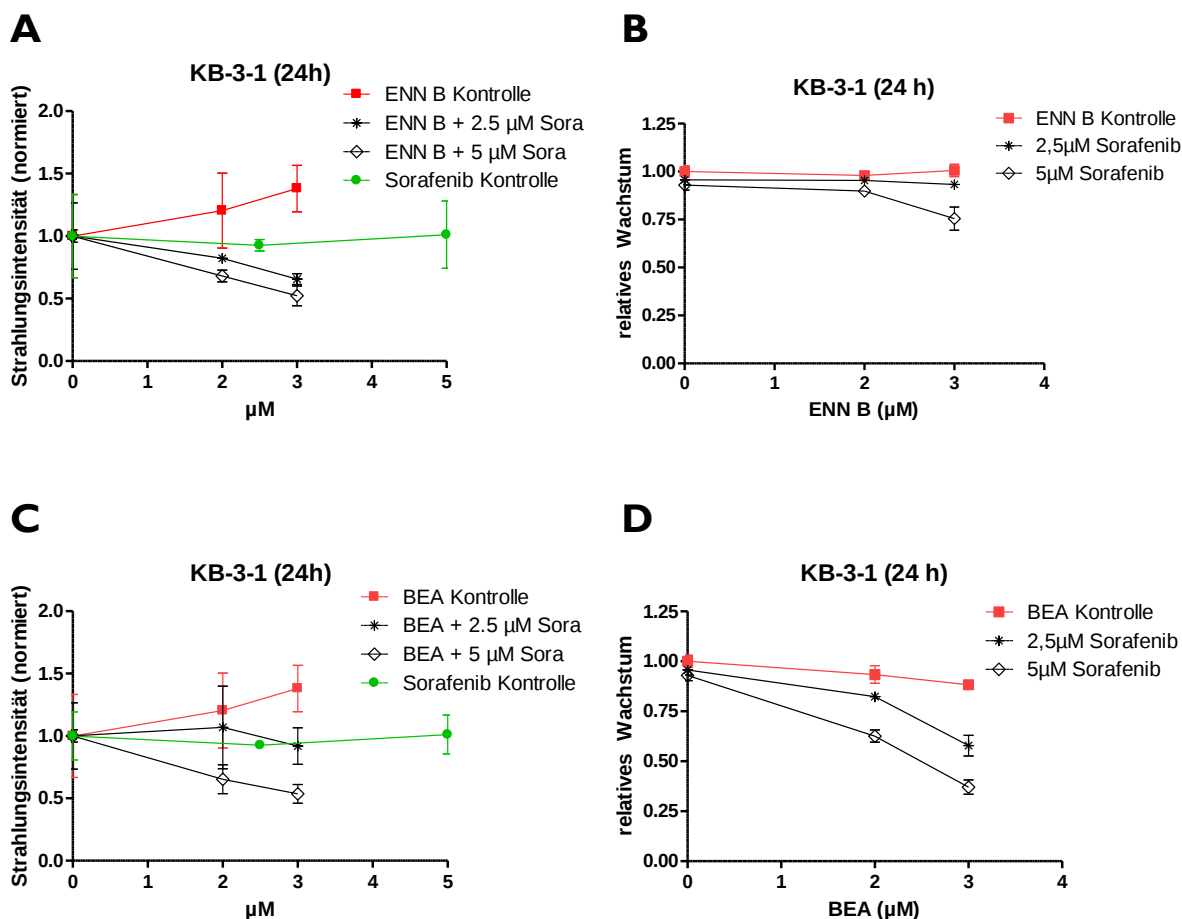


ABBILDUNG 41: ERGEBNISSE DES ^3H -THYMIDIN-ASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB. STRAHLUNGSINTENSITÄTEN VON ^3H -THYMIDIN ALS MASS FÜR DIE DNA-SYNTHESE RATE UND DAZUGEHÖRIGE KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN VON MIT (A,B) ENN B BZW. (C,D) BEA BEHANDELTEN KB-3-1-ZELLEN NACH 24 h INKUBATION. DIE SORAFENIB-KONTROLLE DER KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN IST AUF DER ORDINATE ANGEZEIGT.

Da ENN B und BEA in geringen Konzentrationen zu einer leichten Wachstumsstimulierung führen, ist auch die erhöhte Syntheserate nicht verwunderlich. Diese Effekte wurden bereits von Dornetshuber *et al.* beschrieben.¹³ Theoretisch kann dies auch auf eine erhöhte Aktivität von Reparaturmechanismen infolge einer DNA-Schädigung hinweisen. Da aber weder ENN B noch BEA diese in signifikantem Ausmaß herbeiführen, kann dies in diesem Fall ausgeschlossen werden.³³

In der Kombination nahm die Einbaurate nun kontinuierlich ab. Die Ergebnisse decken sich im Grunde mit jenen der zuvor durchgeführten Zellzyklusanalyse. Einerseits sistiert die Zelle ja in der G₂/M-Phase, wodurch auch weniger DNA in der S-Phase eingebaut werden kann. Andererseits bedeutet es womöglich eine generelle Verlangsamung des Zellzyklus.

5.3.2.4 Apoptose-Assays

In den in dieser Arbeit vorangegangenen Versuchen wurde im MTT-Assay eine verringerte Zellzahl festgestellt und im ³H-Thymidin-Einbau eine gesenkte DNA-Syntheserate ermittelt. Dies kann entweder auf einen verstärkten Zelltod (zytotoxisch) zurückzuführen sein, aber auch einfach durch eine verringerte Zellproliferation (zytostatisch) entstehen, während die unbehandelte Kontrolle weiter wächst und sich teilt. Dass letzteres stattfindet, wurde mit dem in der Zellzyklusanalyse gefundenen Zellzyklusarrest bereits festgestellt. Nun galt es herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß tatsächlich auch Zelltod an dem synergistischen Effekt beteiligt ist. Einen ersten starken Hinweis darauf ergab bereits die Spaltung von PARP.

Mittels JC-1-Assay wird das mitochondriale Membranpotential gemessen. Liegt eine Depolarisation vor, so gilt dies als Frühmarker für Apoptose. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert, daraufhin mit JC-1 angefärbt und mittels Durchflusszytometrie vermessen.

Der Anteil der Zellen mit depolarisiertem mitochondrialem Membranpotential betrug mit ENN B bis zu 7.73 %, mit BEA bis zu 6.65 % und mit Sorafenib bis zu 11.70 % (Abb. 42). Bei der Kombination stieg die Anzahl der depolarisierten Zellen stark an. BEA erreicht bei der Kombination mit den höchsten verwendeten Konzentrationen der beiden Substanzen 47.0 %, ENN B gar 70.9 %, obwohl sich BEA im Zytotoxizitätsassay als toxischer herausgestellt hat als ENN B.

Dieser Assay spiegelt allerdings nur eine sehr frühe Phase der Apoptose wider. Das heißt, dass durchaus noch viele Reparaturmechanismen – soweit sie bei der Krebszelle nach wie vor aktiv sind – zum Tragen kommen könnten und somit der Effekt auch deutlich geringer

sein könnte, als das Diagramm suggeriert. Deswegen wurde zusätzlich mit der HöPI-Färbung noch ein weiterer Apoptose-Assay mit anderer Funktionsweise durchgeführt.

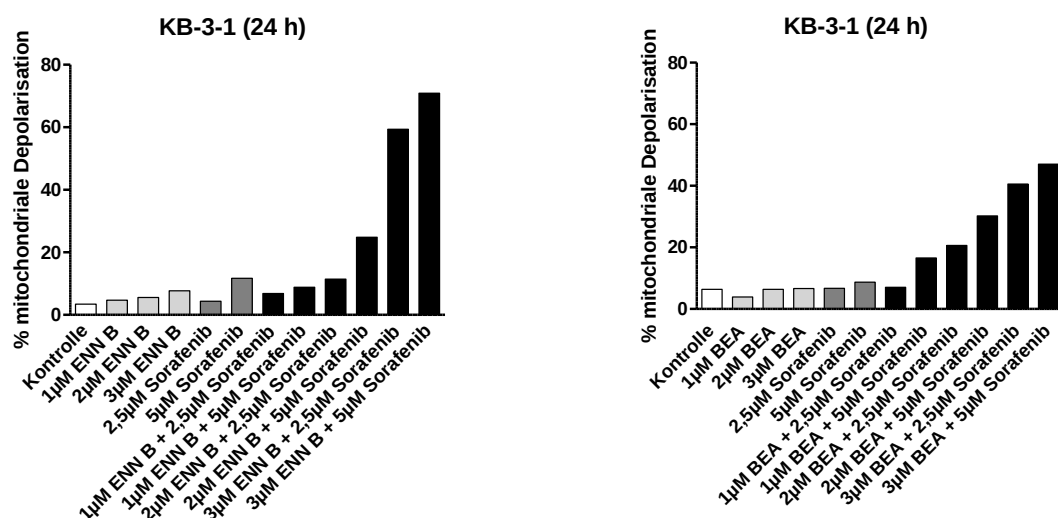


ABBILDUNG 42: ERGEBNISSE DES JC-I-ASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.

Die Zellen wurden wiederum für 24 Stunden inkubiert und danach mit den beiden Farbstoffen Höchst 33258, der sowohl lebende als auch tote Zellen blau färbt, und Propidiumiodid, der nur tote, nekrotische oder spät apoptotische Zellen rot färbt, behandelt. Es wurden Fotos gemacht und die Zellen ausgezählt.

Im Gegensatz zum JC-I-Assay kann hier nun wirklich eine Aussage getroffen werden, ob die jeweilige Zelle noch lebendig oder schon tot ist. Über die zellulären Prozesse, die im Vorder- und auch synchron im Hintergrund ablaufen, kann hier freilich nichts gesagt werden.

Die Graphen deckten sich im Grunde mit jenen vom JC-I-Assay. Die einzelnen Substanzen riefen jeweils bei unter 10 % der Zellen Apoptose hervor, während die Kombination mit den höchsten Konzentrationen von BEA und Sorafenib 39.1 %, jene von ENN B und Sorafenib sogar 43.5 % tote Zellen aufwiesen (Abb. 43). Obwohl BEA sich als toxischer herausgestellt hat, ist ENN B also wie beim JC-I-Assay auch hier stärker wirksam, der Unterschied ist aber gering, sodass sich die Ergebnisse von HöPI-Färbung und MTT-Assay durchaus vereinen lassen.

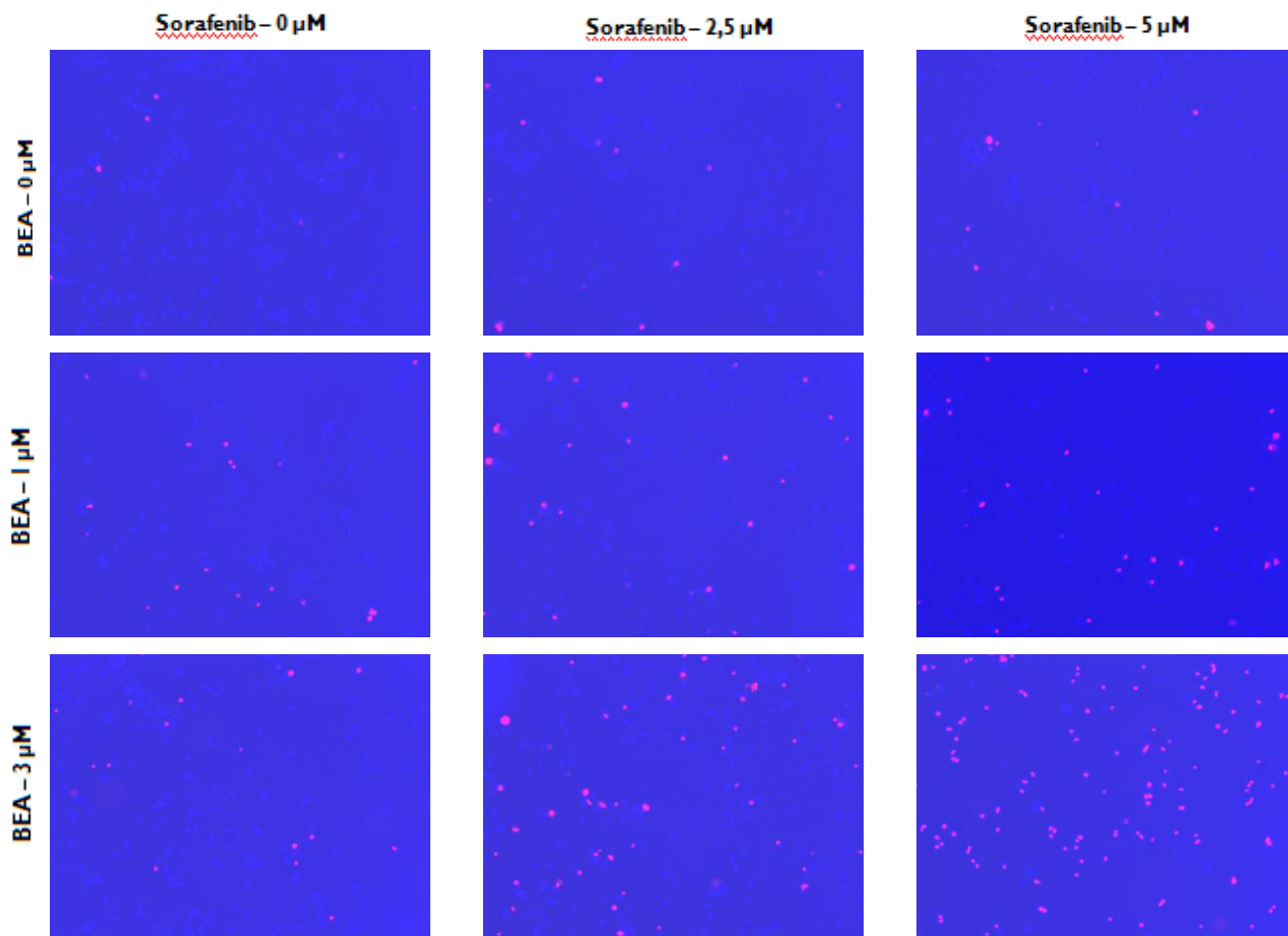
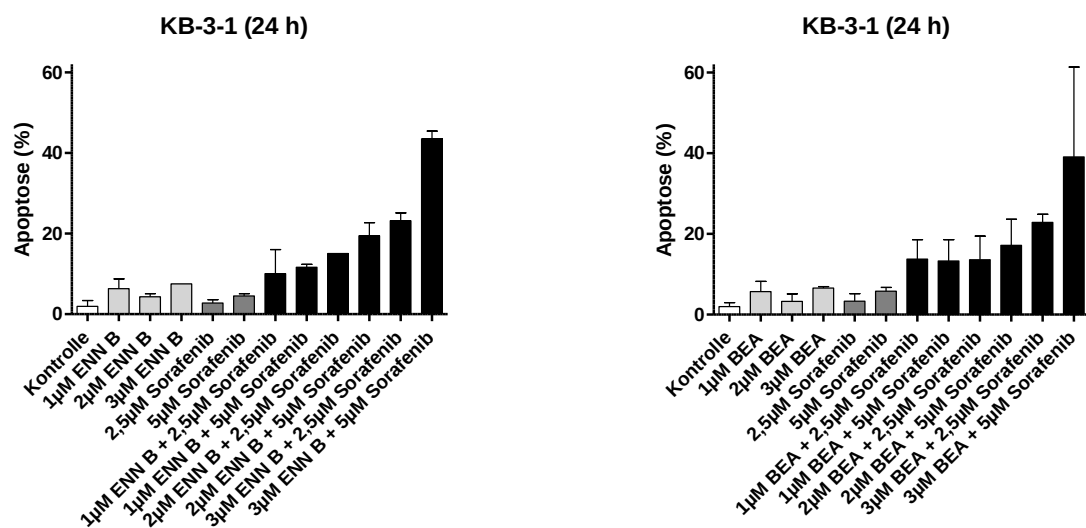
A**B**

ABBILDUNG 43: ERGEBNISSE DER HÖPI-FÄRBUNG VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB. (A) MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT HÖPI-REAGENS GEFÄRBTEN KB-3-1 ZELLEN NACH 24 h INKUBATION MIT BEA UND SORAFENIB. (B) BALKENDIAGRAMME NACH AUSZÄHLUNG DER BLAU (LEBENDE UND TOTE ZELLEN) UND ROT (NEKROTISCHE UND SPÄT APOPTOTISCHE ZELLEN) FLUORESZIERENDEN ZELLEN.

Die Ergebnisse von JC-1- und HöPI-Färbung bestätigen eindeutig, dass die Kombination von ENN B/BEA und Sorafenib in starkem Ausmaß apoptotische Prozesse in KB-3-1-Zellen auslöst. Der Synergismus ist also neben der zytostatischen auch auf eine zytotoxische Wirkung zurückzuführen. Es gilt nun weiter zu evaluieren, auf welchen molekularen Prozessen die Apoptose beruht. Die Spaltung von PARP wurde bereits detektiert, doch ist dies ein Mechanismus, der keine genauere Zuordnung gestattet, da er erst zu einem späten Zeitpunkt des Zelltodes in der gemeinsamen Endstrecke der verschiedenen Arten von Apoptose von Effektorcaspasen vollzogen wird.

Wie schon in 5.2 *Wirkung von ENN B und BEA auf ER-Stress* beschrieben, dürften die apoptotischen Effekte von ENN B und BEA in höherer Konzentration wohl hauptsächlich über den mitochondrialen Signalweg erfolgen.^{13,21,156} Fernando *et al.* berichten in einer aktuellen Studie an verschiedenen Leberzelllinien, dass auch die zytotoxische Wirkung von Sorafenib auf dem intrinsischen Signalweg beruht, genauer auf dem Protein PUMA, das von p53 aktiviert wird und wie Bax zur mitochondrialen Depolarisation führt. Andererseits wurde eine Aktivierung von der Effektorcaspase 8 und somit eine Apoptoseinduktion über den extrinsischen Weg ausgeschlossen.¹⁶⁰ Andere Studien berichten überdies von einer Abnahme des antiapoptotischen Proteins Mcl-1, einem Mitglied der Bcl-2-Familie.¹⁶¹⁻¹⁶²

Als sinnvoller nächster Schritt liegt es also nahe, den Effekt auf weitere an Apoptose beteiligte Proteine und zwar vor allem jene, die dem mitochondrialen Weg angehören, zu untersuchen. Dazu zählen Bax, Bcl-2, Cytochrom c, Initiator- (Caspase 9) und Effektorcaspasen (Caspasen 3 und 7), sowie das Zellzyklus- und Apoptose-regulierende Protein p53, welches schon in Verbindung mit ENN mix untersucht wurde.¹³

5.4 Antiangiogene und migrationshemmende Wirkung von ENN B, BEA und ENN mix

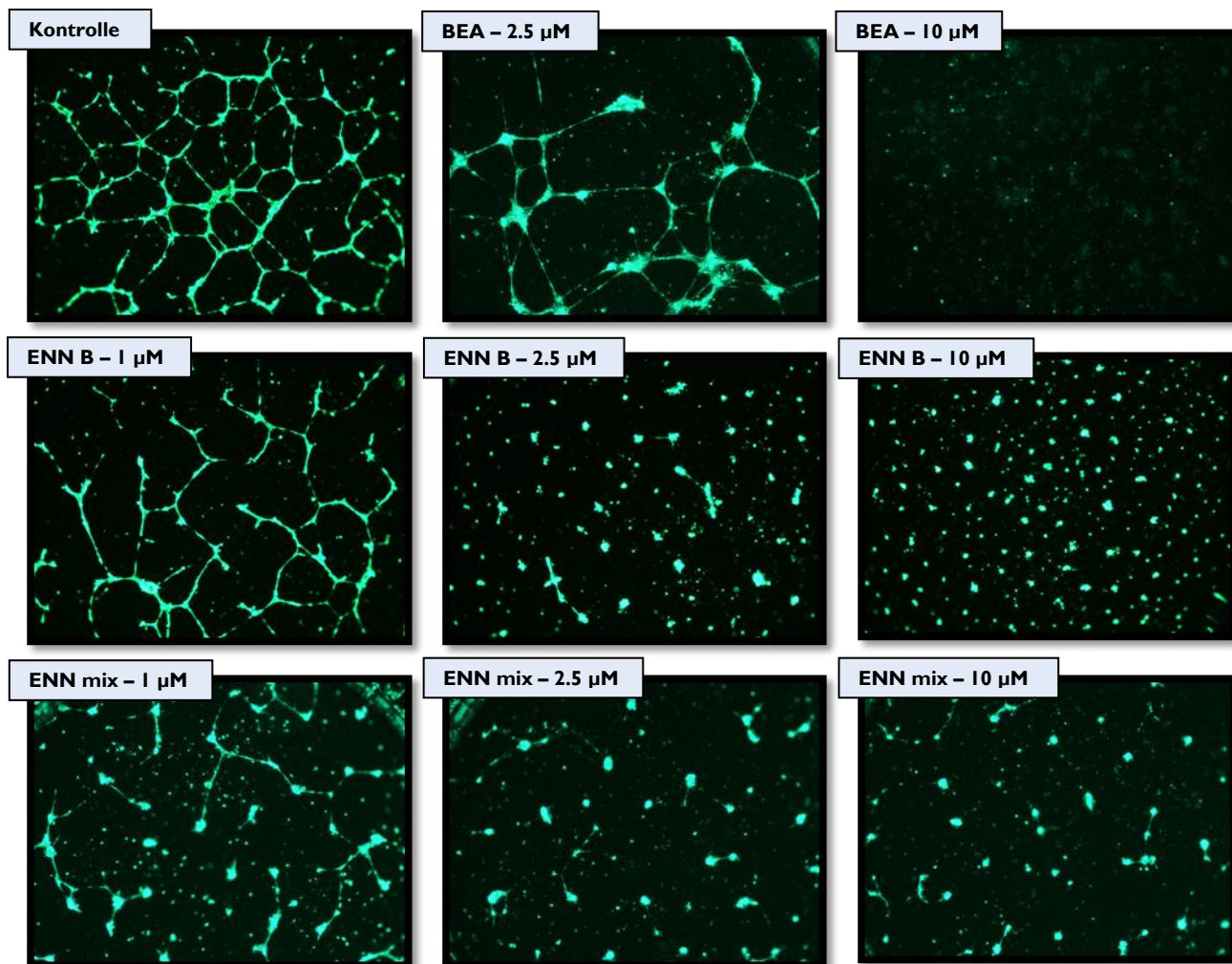
Angiogenese-unterdrückende Substanzen wie Bevacizumab und Sorafenib sind wichtige Medikamente bei der Bekämpfung von Krebs. Für BEA wurden bereits derartige Effekte in HUVEC-2 (*human umbilical vein endothelial cells*) nachgewiesen. Hinweise dafür, dass BEA antiangiogene Wirkung besitzt, liefern auch Versuche mit der Prostakarzinomzelllinie PC-3M und der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, bei denen BEA die Migrationsfähigkeit hemmte.²⁸

Angiogenese und Migration zeigen in ihren Regulationsprozessen eine enge Verbundenheit. Bei beiden Vorgängen zählen die Faktoren VEGF, FGF und Angiopoietin zu den wichtigsten Promotoren. Auch funktionell sind sie aneinander gekoppelt. Denn neben der Proliferation spielt auch Migration im Rahmen der Angiogenese eine wichtige Rolle, da bei dieser Endothelzellen wandern müssen, um Platz für einen neuen Abzweigungspunkt eines Blutgefäßes zu machen.^{118,163}

5.4.1 Tube-Formation-Assay

Um zu testen inwieweit ENN B und BEA einen Effekt auf die kapillar-ähnliche Röhrenformatierung haben, wurde der Tube-Formation-Assay durchgeführt. Die Inkubation mit ENN B und ENN mix führte konzentrationsabhängig zu einer ausgeprägten Reduktion der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen (Abbildung 44). Sowohl ENN B als auch ENN mix führten bei 2.5 μM zu einer Verringerung von Zell-Zell-Verbindungen, nämlich auf 34.7 % und 35.9 %. Die inhibierende Wirkung von BEA auf die Ausbildung von Röhren zeigte sich deutlich schwächer. Hier führte eine Inkubation mit 2.5 μM lediglich zu einer Reduktion auf 77.3 %. Höhere Konzentrationen ($> 2.5 \mu\text{M}$) zeigten bereits einen toxischen Effekt.

A



B

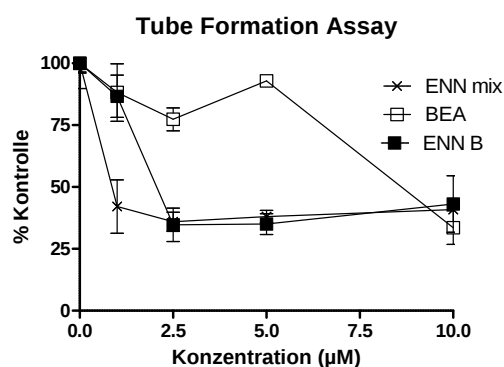


ABBILDUNG 44: ERGEBNISSE DES TUBE-FORMATION-ASSAYS. (A) MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER AUSBILDUNG VON RÖHRENARTIGEN STRUKTUREN ZWISCHEN ENDOTHELZELLEN NACH INKUBATION MIT ENN B, BEA UND ENN MIX. (B) GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER AUSGEBILDETEN RÖHREN.

5.4.2 HET-CAM-Assay

Basierend auf den Ergebnissen vom Tube-Formation-Assay wurde der etablierte HET-CAM-Assay durchgeführt. Dies ist eine gute Möglichkeit einen Schritt in Richtung Tierversuch zu gehen, da die CAM als vielzelliges Organ wesentlich komplexer aufgebaut ist als einzelne Zellen, die bei den anderen Versuchen verwendet wurden.

Die Schwierigkeit am HET-CAM-Assay war allerdings die Auswertung. Während bei *in vitro*-Assays Millionen bis Milliarden Zellen einen großen Stichprobenpool mit exaktem Mittelwert geben, ist hier jedes Ei unterschiedlich hinsichtlich der Größe und Ausprägung seiner morphologischen Merkmale und dadurch sind auch die Blutgefäße schwer zu vergleichen. Eine optische Betrachtung der Bilder weist jedoch auch hier auf eine antiangiogene Wirkung hin (Abb. 45).

Trotzdem kann der Versuch als Erfolg betrachtet werden. Denn während in der Kontrolle die Blutgefäße unbeeinflusst weiterwuchsen, so schien es bei den Eiern mit 5 μM ENN B bzw. BEA doch zu einer merklichen Abschwächung zu kommen. Analog zum Tube-Formation-Assay ist dies besonders deutlich bei ENN B zu sehen. Die Blutgefäße machen regelrecht einen Bogen um den Ring, der zufällig auf der CAM positioniert wurde.

Die in älteren Studien beschriebene antiangiogene Wirkung von BEA konnte also durchaus bestätigt werden, während ENN B und ENN mix sogar noch deutlich stärkere Effekte zeigten.

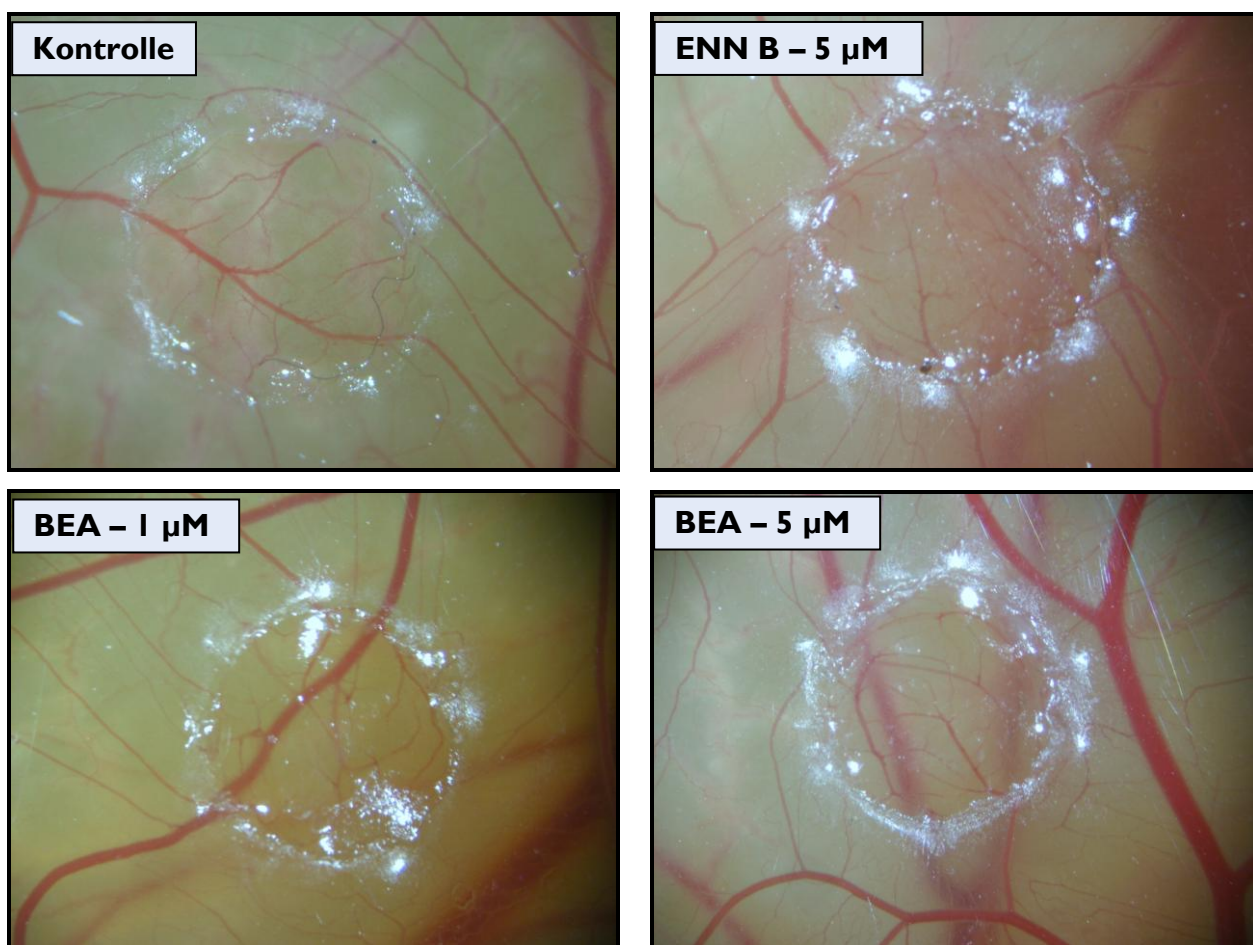


ABBILDUNG 45: ERGEBNISSE DES HET-CAM-ASSAYS.

5.4.3 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay ist ein Modell für Migration. Je besser eine konfluent gewachsene Zelllinie einen mechanisch angebrachten Kratzer wieder überbrücken kann, desto stärker ist auch ihre Fähigkeit zur Migration. Dies bedeutet *in vivo* fatale Folgen, denn Metastasen sind für bis zu 90 % aller Krebstode verantwortlich.⁹⁶⁻⁹⁸

Als Test-Zelllinie wurde in dieser Arbeit die besonders schnell und aggressiv wachsende Lungenkarzinomzelllinie A549 verwendet. ENN B und BEA wurden in 5 subtoxischen Konzentrationen bis 2 μM hinzugefügt. Während der künstlich herbeigeführte Spalt im Zellrasen in der Kontrolle innerhalb von 48 Stunden bereits vollständig geschlossen war, erzielten sowohl ENN B ($p < 0.01$ bei 1.5 und 2 μM ; $p < 0.05$ bei 0.25 – 1 μM) als auch BEA ($p < 0.001$ bei 1.5 und 2 μM ; $p < 0.01$ bei 0.25 – 1 μM) eine signifikante Minderung der Migrationsfähigkeit von A549-Zellen (Abb. 46, 47). Es zeigte sich eine lineare Steigerung der Effektivität mit der erhöhten Konzentration. Diese Wirkung ist bemerkenswert, da die Konzentrationen bewusst in einem niedrigen Bereich gewählt wurden, in dem im MTT-Assay kein zytotoxischer, sondern im Gegenteil sogar ein leicht wachstumsstimulierender Effekt festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Angiogenese-Assays ist die Wirkung von BEA nicht schwächer als jene von ENN B, sondern sogar etwas stärker. 2 μM BEA verringern das Zuwachsen des Kratzers im Vergleich zur Kontrolle nach 28 Stunden um rund 80 %.

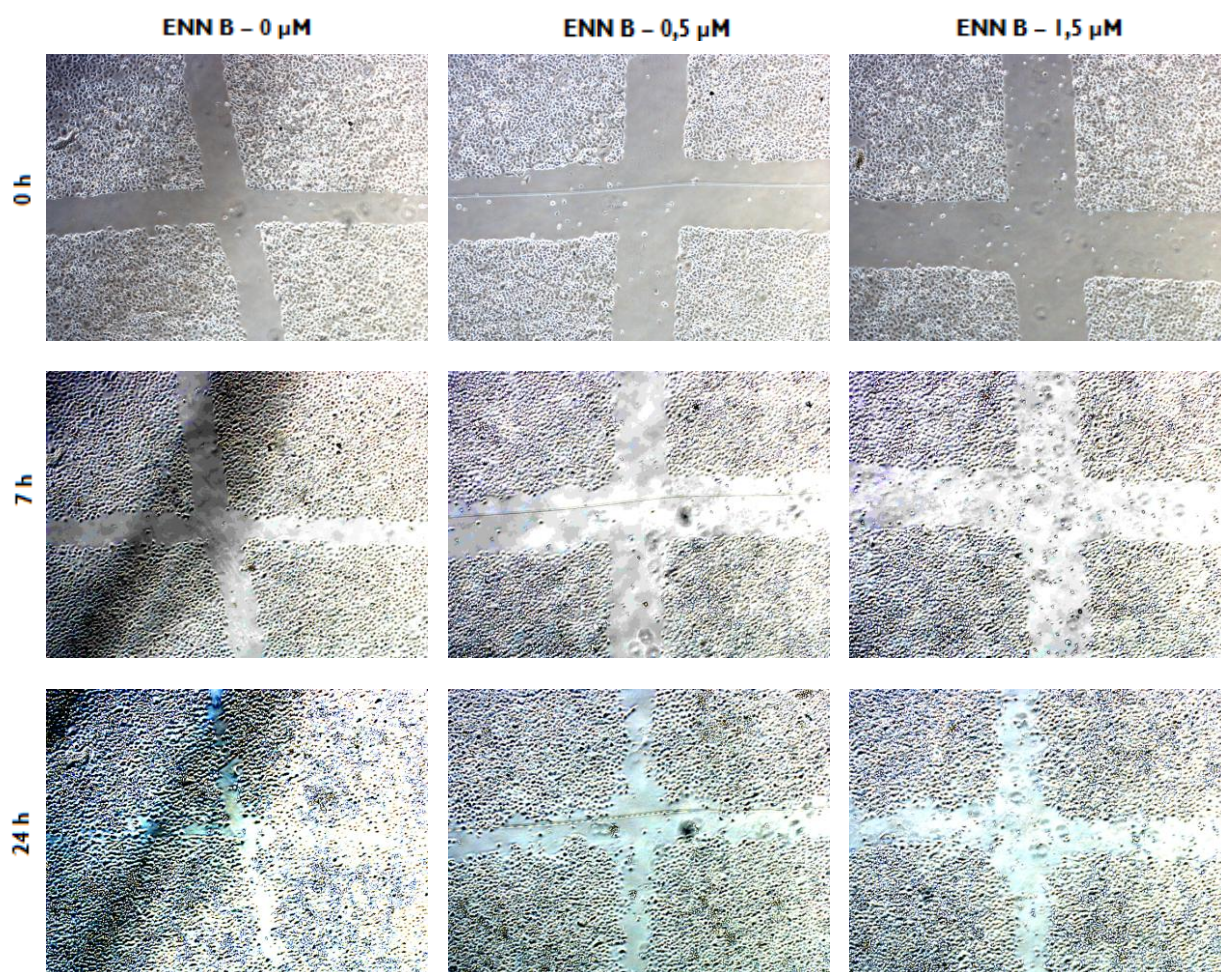
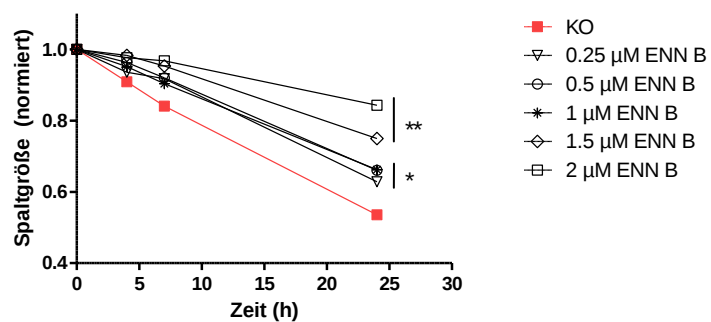
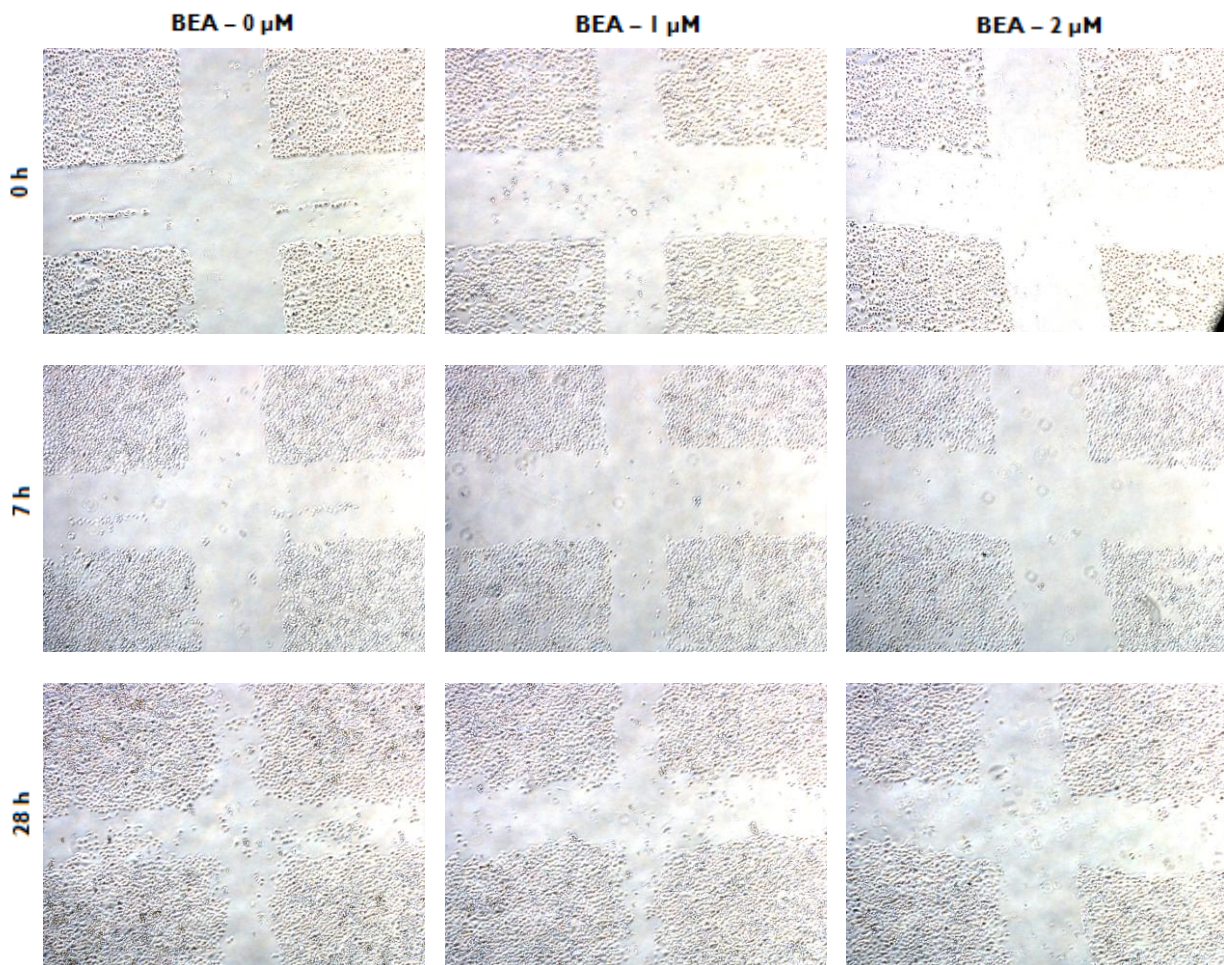
A**A549****B**

ABBILDUNG 46: ERGEBNISSE DES SCRATCH-ASSAYS MIT ENN B. (A) MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DES SPALTES IM ZELLRASEN NACH 0 h, 7 h UND 24 h BEI DER KONTROLLE UND MIT INKUBATION VON 0,5 µM UND 1,5 µM ENN B. (B) GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER SPALTGRÖSSE MIT INKUBATION VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON ENN B. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER MINDERUNG DER MIGRATIONSFÄHIGKEIT MIT UNGEPAARTEM T-TEST MIT KORREKTUR NACH WELCH ($p < 0.01$; * $p < 0.05$).**

A



B

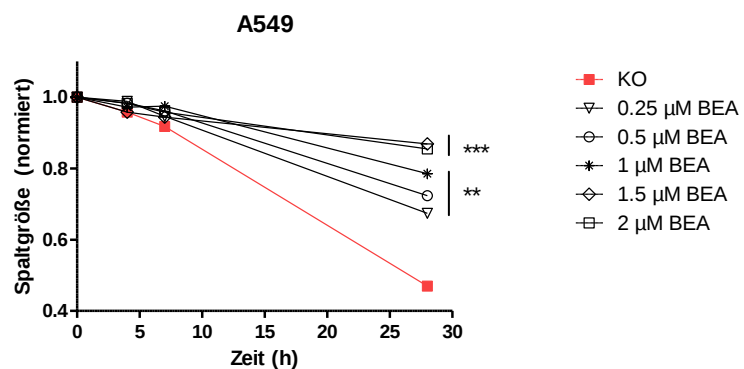


ABBILDUNG 47: ERGEBNISSE DES SCRATCH-ASSAYS MIT BEA. (A) MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DES SPALTES IM ZELLRASEN NACH 0 h, 7 h UND 28 h BEI DER KONTROLLE UND MIT INKUBATION VON 1 μM UND 2 μM BEA. (B) GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER SPALTGRÖSSE MIT INKUBATION VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON BEA. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER MINDERUNG DER MIGRATIONSFÄHIGKEIT MIT UNGEPAARTEM T-TEST MIT KORREKTUR NACH WELCH (*) $p < 0.001$; **) $p < 0.01$.**

Sowohl ENN B als auch BEA erwiesen sich in den durchgeführten Assays als antiangiogen und migrationshemmend. Hinsichtlich der antiangiogenen Wirkung konnte sowohl im Tube-Formation-Assay als auch im HET-CAM-Assay ein deutlicher Effekt im subtoxischen Bereich von ENN B und – wenn auch schwächer – ebenso von BEA festgestellt werden. Im Scratch-Assay wiederum, der vor allem zur Überprüfung der Migration dient, war BEA etwas stärker wirksam als ENN B, wobei die Unterschiede nur sehr gering ausfielen. Der hemmende Effekt von BEA auf die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde bereits in früheren Studien festgestellt.²⁸ Geringfügige Veränderungen an den Aminosäuren von BEA schwächen die migrationshemmende Potenz ab, während das Einbringen von ein, zwei oder drei Fluor-Atomen in den Aromaten der Benzylreste zwar die Zytotoxizität erhöht, den Einfluss auf Migration aber nicht verändert.¹⁶⁴

In dieser Arbeit wurde für ENN B (1, 2 und 3 μ M) und BEA (1 und 3 μ M) in geringer Konzentration ein deutlicher Anstieg von pp38 in KB-3-1-Zellen gezeigt. Dieses Protein wurde als fördernder Faktor für Angiogenese und Migration identifiziert und führt nach Aktivierung über VEGFR zur Aktinpolymerisation und somit zur Zellmigration.^{118,154} Beachtlicherweise kommt es trotz diesem Anstieg zu einer antiangiogenen Wirkung. Es muss also hier ein Effekt auftreten, der so stark ist, dass er sogar diesen gegensätzlichen Reiz kompensiert. Allerdings wurden sowohl für den Scratch- als auch für den Tube-Formation-Assay andere Zelllinien verwendet, da KB-3-1 für beide nicht geeignet war.

Der Grund sowohl für die antiangiogenen als auch für die migrationshemmenden Effekte wird Bestandteil zukünftiger Studien sein. Ein Ansatz dafür wäre beispielsweise eine Untersuchung der Wirkung der Testsubstanzen auf wichtige Faktoren, die bei Angiogenese- und Migration-assoziierten Prozessen eine Rolle spielen, wie FGF, EGF, PDGF, Angiogenin und ihre jeweiligen Rezeptoren. Verschiedene Proteinkinasen wurden bereits analysiert: Nach Behandlung mit ENN A₁, ENN B₁ und ENN B konnte keine signifikante Inhibierung der Angiogenesefaktoren EphB4, Tie2, VEGFR 2 und VEGFR 3, sowie der Migrationsfaktoren FAK, Met und SRC gefunden werden.²⁴

Auch andere Cyclodepsipeptide wurden schon auf antiangiogene und migrationshemmende Effekte untersucht. So wurde für Aplidin zwar eine Inhibierung der VEGF-Produktion publiziert¹⁶⁵, die antiangiogenen Eigenschaften werden aber vor allem auf direkte Effekte auf Endothelzellen und auf Inhibierung derer Produktion der *Matrix-Metalloproteasen* MMP-2 und MMP-9 zurückgeführt.¹⁶⁶ Auch für Romidepsin konnte eine Abnahme dieser beiden Enzyme sowie von MT-1 (*membrane type-1*)/MMP und eine Zunahme

ihrer Gegenspieler TIMP-1 und TIMP-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1* und 2) nachgewiesen werden.¹⁶⁷ Durch Auflösung von Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie Kollagen Typ IV, begünstigen MMPs die Angiogenese.^{4,168} Inwiefern der Proteinlevel dieser Endopeptidasen und ihrer Hemmer auch bei ENN B- und BEA-induzierter Antiangiogenese beeinflusst ist, muss noch erforscht werden.

Die vielversprechendsten Resultate dieser Diplomarbeit wurden bei Versuchen erzielt, die in Verbindung mit Migration und vor allem Angiogenese stehen, nämlich die synergistische Wirkung von ENN B und BEA in Kombination mit dem Angiogeneseinhibitor Sorafenib und die Untersuchung der migrationshemmenden und antiangiogenen Wirkung mit subtoxischen Konzentrationen der beiden Substanzen. Aufgrund dessen werden diese Themen in Zukunft wichtige und interessante Aspekte sein, die noch genauer erforscht werden müssen. Auch die Tatsache, dass die Testsubstanzen *in vitro* nicht nur einen, sondern mehrere für den Krebs essentielle Überlebensfaktoren, wie Angiogenese, Migration und Zellproliferation, hemmen, lässt darauf hoffen, dass sie zukünftig die Gruppe bereits klinisch getesteter Cyclohexadepsipeptide ergänzen könnten.

6. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl Enniatin B als auch Beauvericin auf alle in dieser Arbeit getesteten Krebszelllinien in einem niedrigen mikromolaren Bereich zytotoxisch wirken. BEA wirkt etwa gleich stark wie ENN mix und beide wirken stärker als ENN B. Auch der ABC-Transporter P-gp zeigt keinen Einfluss auf ihr zytotoxisches Potential.

Die Einwirkung von ER-Stress nach 6 Stunden in A549-Zellen wurde durch Western-Blot-Analyse eruiert. Die meisten der am ER-Stress beteiligten Proteine zeigten keine wesentlichen Veränderung ihres Expressionsmusters, IRE1 α und vor allem eIF-2 α sanken aber mit steigender Cyclopeptid-Konzentration. Die Ergebnisse legen nahe, dass ER-Stress und UPR keine primäre Bedeutung bei ENN B- und BEA-induzierter Zytotoxizität haben. Diese ist viel eher auf einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges zurückzuführen.

Um synergistische Kombinationspartner für mögliche zukünftige Therapieschemata zu erschließen, wurden Kombinationsversuche mit Sorafenib, Gefitinib, Erlotinib, Cisplatin und Vemurafenib durchgeführt. Der Angiogenesehemmer Sorafenib zeigte deutliche synergistische Effekte und wurde weiter untersucht. Im MTT-Assay konnte die IC₅₀ für ENN B in KB-3-1-Zellen von 3.73 μ M durch Zusatz von 2.5 μ M Sorafenib (IC₅₀: 6.58) auf 1.59 μ M gesenkt werden, durch Zusatz von 5 μ M gar auf 0.27 μ M. Die Kombination von BEA und 5 μ M Sorafenib senkte die IC₅₀ von 2.71 μ M auf 1.03 μ M. Als stärkste Kombination erwies sich 5 μ M Sorafenib mit 3 μ M ENN B (CI=0.57) bzw. mit 2 μ M BEA (CI=0.53).

Gefitinib wirkte in der Kombination nur additiv bis minimal synergistisch, Cisplatin und Erlotinib verhielten sich additiv. Vemurafenib wirkte sogar antagonistisch, womit eine ursächliche Beteiligung von B-Raf im Synergismus von ENN B bzw. BEA mit dem Multikinasehemmer Sorafenib auszuschließen ist. Da nur mit Sorafenib eine Verstärkung der Wirkung gefunden werden konnte, wurde dieses weiter untersucht.

In der Westernblot-Analyse wurde eine Abnahme von PARP und eine Zunahme des Apoptosemarkers cl. PARP festgestellt. Außerdem stieg bei alleiniger Behandlung mit ENN B die Expression der Wachstumsfaktoren pp38 und pERK deutlich – ein Effekt, der durch Zugabe von Sorafenib wieder komplett aufgehoben wurde. Dies deutet darauf hin, dass pp38 und pERK die Zelle vor ENN B schützen. Andererseits ist es eine Erklärung für die beobachtete wachstumsstimulierende Wirkung der Cyclohexadepsipeptide.

Weiters wurde die Wirkung der Testsubstanzen in Kombination mit Sorafenib auf den Zellzyklus untersucht. Während bei den einzelnen Substanzen eine Verschiebung der Zellen

in Richtung G_0/G_1 -Phase stattfand, wurde in der Kombination genau das Gegenteil, nämlich eine deutliche Zunahme der Zellen in der G_2/M -Phase, festgestellt. In der Kombination nahm außerdem die DNA-Syntheserate deutlich ab, was nur zum Teil durch die erhöhte Zytotoxizität erklärt werden kann und somit auf eine antiproliferierende Wirkung hindeutet.

Die zytotoxische Wirkung wurde außerdem mittels JC-I- und HöPI-Assay bestätigt. Während die Einzelsubstanzen bei maximal 10 % der Zellen apoptotisch wirkten, steigerte die Kombination die Rate auf bis über 40 %. ENN B wirkte jeweils etwas stärker als BEA.

Zuletzt wurden ENN B und BEA hinsichtlich ihrer angiogenese- und migrationshemmenden Effekte untersucht. Während ENN B in den beiden Angiogeneseassays Tube-Formation-Assay und HET-CAM-Assay deutlichere Erfolge zeigte, war BEA im Scratch Assay, der vor allem der Überprüfung der Migration dient, stärker wirksam.

Abschließend bleibt zu sagen, dass ein möglicher therapeutischer Nutzen von Enniatin B und Beauvericin in der Krebstherapie in Kombination mit Sorafenib eine vielversprechende Variante ist, die es in zukünftigen Studien zu evaluieren gilt.

7. Abkürzungen

ABC	ATP-binding-cassette
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
BEA	Beauvericin
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	cycline dependent kinases
CI	combination index
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemoluminescence
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
ENN/ENN B	Enniatin/Enniatin B
ER	Endoplasmatischer Retikulum
ERAD	ER-assisted degradation
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FGF(R)	fibroblast growth factor (receptor)
FSC	forward scatter
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa	Henrietta Lachs
HET-CAM	hen's egg test on chorio-allantoic membrane
HöPI	Höchst – PI – Färbung
HRP	horse radish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IC₍₅₀₎	(half maximal) inhibitory concentration
JC-I	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodid
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	matrix metalloproteinase
MT-1/MMP	membrane type-I matrix metalloproteinase

7. Abkürzungen

MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
P-gp	P-Glykoprotein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDGF(R)	platelet derived growth factor (receptor)
PI	Propidiumiodid
Rb	Retinoblastom
ROS	reactive oxygen species
Sora	Sorafenib
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	side scatter
TBST	TRIS-buffered-saline + TWEEN
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
UPR	unfolded protein response
VEGF(R)	vascular endothelial growth factor (receptor)

TABELLE 15: ABKÜRZUNGEN.

8. Abbildungen und Tabellen

<u>ABBILDUNG 1: CHEMISCHE STRUKTUREN VON ENNIATIN B UND BEAUVERICIN</u>	9
<u>ABBILDUNG 2: MECHANISMUS DER AUTOPHOSPHORYLIERUNG AM BEISPIEL DES EGF-REZEPTORS</u> ...	13
<u>ABBILDUNG 3: DIE VERSCHIEDENEN PATHWAYS DES EGF-REZEPTORS</u>	15
<u>ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUREN VON SORAFENIB, GEFITINIB, ERLOTINIB UND VEMURAFENIB</u>	16
<u>ABBILDUNG 5: ZELLZYKLUS SCHEMATISCH</u>	20
<u>ABBILDUNG 6: NEKROSE</u>	22
<u>ABBILDUNG 7: DIE BILDUNG APOPTOTISCHER KÖRPERCHEN</u>	23
<u>ABBILDUNG 8: DIE DREI SIGNALWEGE DER APOPTOSE</u>	24
<u>ABBILDUNG 9: HAUPTSIGNALE IM „UNFOLDED PROTEIN RESPONSE“</u>	26
<u>ABBILDUNG 10: KREBSINZIDENZ IN ÖSTERREICH (2010)</u>	28
<u>ABBILDUNG 11: SIGNALWEGE DES VEGF-REZEPTORS</u>	35
<u>ABBILDUNG 12: REDUKTION VON MTT ZU SEINEM FORMAZANDERIVAT</u>	40
<u>ABBILDUNG 13: CHEMISCHE STRUKTUREN VON HÖCHST 33258 UND PROPIDIUMIODID</u>	41
<u>ABBILDUNG 14: HÖPI-FÄRBUNG</u>	41
<u>ABBILDUNG 15: VIOLETER BICINCHONINSÄURE-KUPFER-KOMPLEX</u>	44
<u>ABBILDUNG 16: AUFBAU EINER SDS-PAGE</u>	45
<u>ABBILDUNG 17: PONCEAU-S-GEFÄRBTE MEMBRAN ZUM NACHWEIS DER GLEICHMÄSSIGEN LADUNG</u>	46
<u>ABBILDUNG 18: LICHTREAKTION ÜBER HORSE RADISH PEROXIDASE</u>	49
<u>ABBILDUNG 19: MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE BESTIMMTES HISTOGRAMM</u>	50
<u>ABBILDUNG 20: CHEMISCHE STRUKTUR VON 2'-DESOXYTHYMIN</u>	51
<u>ABBILDUNG 21: SCHEMATISCHES FUNKTIONSPRINZIP EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS</u>	52
<u>ABBILDUNG 22: „GATING“ IN EINEM DOT-PLOT</u>	53
<u>ABBILDUNG 23: CHEMISCHE STRUKTUR VON JC-1</u>	53
<u>ABBILDUNG 24: DOT-PLOT EINES JC-1-ASSAYS</u>	54
<u>ABBILDUNG 25: TUBE-FORMATION-ASSAY</u>	54
<u>ABBILDUNG 26: AUFBAU EINES HÜHNEREIES</u>	55
<u>ABBILDUNG 27: HET-CAM</u>	55
<u>ABBILDUNG 28: SCRATCH-ASSAY NACH BEREITEN DES KRATZERS</u>	56
<u>ABBILDUNG 29: WESTERN BLOTS VON UPR-MARKERN</u>	61
<u>ABBILDUNG 30: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B MIT SORAFENIB</u>	65

<u>ABBILDUNG 31: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON BEA MIT SORAFENIB.</u>	66
<u>ABBILDUNG 32: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.</u>	67
<u>ABBILDUNG 33: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT GEFITINIB. (1).</u>	68
<u>ABBILDUNG 34: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT GEFITINIB. (2).</u>	69
<u>ABBILDUNG 35: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT ERLOTINIB.</u>	70
<u>ABBILDUNG 36: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT VEMURAFENIB.</u>	72
<u>ABBILDUNG 37: ERGEBNISSE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT CISPLATIN.</u>	73
<u>ABBILDUNG 38: WESTERN BLOTS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.</u>	76
<u>ABBILDUNG 39: ERGEBNISSE DER ZELLZYKLUSANALYSE VON ENN B MIT SORAFENIB.</u>	78
<u>ABBILDUNG 40: ERGEBNISSE DER ZELLZYKLUSANALYSE VON BEA MIT SORAFENIB.</u>	79
<u>ABBILDUNG 41: ERGEBNISSE DES ³H-THYMIDIN-ASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.</u> ..	80
<u>ABBILDUNG 42: ERGEBNISSE DES JC-I-ASSAYS VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.</u>	82
<u>ABBILDUNG 43: ERGEBNISSE DER HÖPI-FÄRBUNG VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB.</u>	83
<u>ABBILDUNG 44: ERGEBNISSE DES TUBE-FORMATION-ASSAYS.</u>	86
<u>ABBILDUNG 45: ERGEBNISSE DES HET-CAM-ASSAYS.</u>	87
<u>ABBILDUNG 46: ERGEBNISSE DES SCRATCH-ASSAYS MIT ENN B.</u>	89
<u>ABBILDUNG 47: ERGEBNISSE DES SCRATCH-ASSAYS MIT BEA.</u>	90
<u>TABELLE 1: STRUKTURMERKMALE WICHTIGER ENNIATINE UND BEAUVERICIN.</u>	9
<u>TABELLE 2: VERGLEICH GUTARTIGE UND BÖSARTIGE NEOPLASIEN.</u>	27
<u>TABELLE 3: ÜBERSICHT DER WICHTIGSTEN ZYTOSTATIKAGRUPPEN.</u>	31
<u>TABELLE 4: ZELLINIEN UND ZELLKULTUR.</u>	37
<u>TABELLE 5: CHEMIKALIEN, GIFTE UND ARZNEISTOFFE.</u>	39
<u>TABELLE 6: SCHEMA ZUR AUSWERTUNG DER HÖPI-FÄRBUNG.</u>	42
<u>TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNGEL.</u>	45
<u>TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DER PROBENLÖSUNG.</u>	46
<u>TABELLE 9: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.</u>	48

<u>TABELLE 10: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER</u>	48
<u>TABELLE 11: IC₂₅-WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN</u>	58
<u>TABELLE 12: IC₅₀-WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN</u>	59
<u>TABELLE 13: IC₇₅-WERTE VON ENN B, BEA UND ENN MIX AN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN</u>	59
<u>TABELLE 14: IC₅₀-WERTE VON ENN B BZW. BEA MIT SORAFENIB</u>	63
<u>TABELLE 15: ABKÜRZUNGEN</u>	96

9. Literaturverzeichnis

- 1 Hamann, M. T., Otto, C. S., Scheuer, P. J. & Dunbar, D. C. Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp.(1). *J Org Chem* **61**, 6594-6600 (1996).
- 2 Hinaje, M., Ford, M., Banting, L., Arkle, S. & Khambay, B. An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A. *Arch Biochem Biophys* **405**, 73-77 (2002).
- 3 Kouri, K., Lemmens, M. & Lemmens-Gruber, R. Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 203-210 (2003).
- 4 Lemmens-Gruber, R., Kamyar, M. R. & Dornetshuber, R. Cyclodepsipeptides - potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Curr Med Chem* **16**, 1122-1137 (2009).
- 5 Ivanova, L., Skjerve, E., Eriksen, G. S. & Uhlig, S. Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from *Fusarium avenaceum*. *Toxicon* **47**, 868-876 (2006).
- 6 Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R. & Ritieni, A. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl Environ Microbiol* **68**, 82-85 (2002).
- 7 Jestoi, M. et al. Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in finnish grain samples. *Food Addit Contam* **21**, 794-802 (2004).
- 8 Jestoi, M. Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**, 21-49 (2008).
- 9 Fotso, J., Leslie, J. F. & Smith, J. S. Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins b(1), b(2), and b(3) by fifteen ex-type strains of fusarium species. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5195-5197 (2002).
- 10 Uhlig, S., Jestoi, M. & Parikka, P. *Fusarium avenaceum* -- the North European situation. *Int J Food Microbiol* **119**, 17-24 (2007).
- 11 Prosperini, A., Meca, G., Font, G. & Ruiz, M. J. Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability in vitro on Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* **50**, 2356-2361 (2012).
- 12 Meca, G., Mañes, J., Font, G. & Ruiz, M. J. Study of the potential toxicity of enniatins A, A(1), B, B(1) by evaluation of duodenal and colonic bioavailability applying an in vitro method by Caco-2 cells. *Toxicon* **59**, 1-11 (2012).

-
- 13 Dornetshuber, R. et al. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. *Chem Res Toxicol* **20**, 465-473 (2007).
 - 14 Jestoi, M., Rokka, M. & Peltonen, K. An integrated sample preparation to determine coccidiostats and emerging Fusarium-mycotoxins in various poultry tissues with LC-MS/MS. *Mol Nutr Food Res* **51**, 625-637 (2007).
 - 15 Ovchinnikov, Y. A. et al. The enniatin ionophores. Conformation and ion binding properties. *Int J Pept Protein Res* **6**, 465-498 (1974).
 - 16 Zhang, L. et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4606-4611 (2007).
 - 17 Vey, A., Quiot, J. M. & Vago, C. [Demonstration and study of the action of a mycotoxin, beauvericine, on insect cells cultured in vitro]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **276**, 2489-2492 (1973).
 - 18 Meca, G. et al. Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. *Toxicon* **56**, 349-354 (2010).
 - 19 Kouri, K., Duchon, M. R. & Lemmens-Gruber, R. Effects of beauvericin on the metabolic state and ionic homeostasis of ventricular myocytes of the guinea pig. *Chem Res Toxicol* **18**, 1661-1668 (2005).
 - 20 Tonshin, A. A., Teplova, V. V., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. The *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. *Toxicology* **276**, 49-57 (2010).
 - 21 Lin, H. I. et al. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett* **230**, 248-259 (2005).
 - 22 Klaric, M. S., Rumora, L., Ljubanovic, D. & Pepelnjak, S. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch Toxicol* **82**, 247-255 (2008).
 - 23 Jow, G. M., Chou, C. J., Chen, B. F. & Tsai, J. H. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. *Cancer Lett* **216**, 165-173 (2004).
-

- 24 Watjen, W. et al. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Mol Nutr Food Res* **53**, 431-440 (2009).
- 25 Massini, P. & Naf, U. Ca²⁺ ionophores and the activation of human blood platelets. The effects of ionomycin, beauvericin, lysocellin, virginiamycin S, lasalocid-derivatives and McN 4308. *Biochim Biophys Acta* **598**, 575-587 (1980).
- 26 Hoornstra, D., Andersson, M. A., Mikkola, R. & Salkinoja-Salonen, M. S. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicol In Vitro* **17**, 745-751 (2003).
- 27 Lemmens-Gruber, R. et al. The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on electromechanical and -physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. *Mycopathologia* **149**, 5-12 (2000).
- 28 Zhan, J., Burns, A. M., Liu, M. X., Faeth, S. H. & Gunatilaka, A. A. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J Nat Prod* **70**, 227-232 (2007).
- 29 Behm, C., Degen, G. H. & Follmann, W. The *Fusarium* toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro. *Mol Nutr Food Res* **53**, 423-430 (2009).
- 30 Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A. A., Lopez Ade, C. & Bacha, H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* **232**, 294-302 (2007).
- 31 Ferrer, E., Juan-Garcia, A., Font, G. & Ruiz, M. J. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro* **23**, 1504-1509 (2009).
- 32 Paciolla, C., Dipierro, N., Guiuseppina, M., Logrieco, A. & Dipierro, S. The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 49-56 (2004).
- 33 Dornetshuber, R. et al. Oxidative stress and DNA interactions are not involved in Enniatin- and Beauvericin-mediated apoptosis induction. *Mol Nutr Food Res* **53**, 1112-1122 (2009).

-
- 34 McKee, T. C. et al. Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms. *J Nat Prod* **60**, 431-438 (1997).
- 35 Dornetshuber, R. et al. Interactions between ABC-transport proteins and the secondary Fusarium metabolites enniatin and beauvericin. *Mol Nutr Food Res* **53**, 904-920 (2009).
- 36 Hiraga, K., Yamamoto, S., Fukuda, H., Hamanaka, N. & Oda, K. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 1119-1125 (2005).
- 37 Tomoda, H. et al. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* **45**, 1626-1632 (1992).
- 38 Kroslak, M. Efficacy and acceptability of fusafungine, a local treatment for both nose and throat infections, in adult patients with upper respiratory tract infections. *Curr Med Res Opin* **18**, 194-200 (2002).
- 39 Levy, D., Bluzat, A., Seigneuret, M. & Rigaud, J. L. Alkali cation transport through liposomes by the antimicrobial fusafungine and its constitutive enniatins. *Biochem Pharmacol* **50**, 2105-2107 (1995).
- 40 Vesonder, R. F., Wu, W. & McAlpin, C. E. Beauvericin not an acute toxin to duckling bioassay. *American Phytopathology Society* **89**, 80 (1999).
- 41 Pardo, B. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of kahalalide F administered weekly as a 1-hour infusion to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **14**, 1116-1123 (2008).
- 42 Rademaker-Lakhai, J. M. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of kahalalide F in patients with advanced androgen refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 1854-1862 (2005).
- 43 Gomez, S. G., Bueren, J. A., Faircloth, G. T., Jimeno, J. & Albella, B. In vitro toxicity of three new antitumoral drugs (trabectedin, aplidin, and kahalalide F) on hematopoietic progenitors and stem cells. *Exp Hematol* **31**, 1104-1111 (2003).
- 44 Depenbrock, H. et al. In vitro activity of aplidine, a new marine-derived anti-cancer compound, on freshly explanted clonogenic human tumour cells and haematopoietic precursor cells. *Br J Cancer* **78**, 739-744 (1998).
- 45 Lech-Maranda, E., Robak, E., Korycka, A. & Robak, T. Depsipeptide (FK228) as a novel histone deacetylase inhibitor: mechanism of action and anticancer activity. *Mini Rev Med Chem* **7**, 1062-1069 (2007).
-

- 46 Schrump, D. S. et al. Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin. *Clin Cancer Res* **14**, 188-198 (2008).
- 47 Wilson, A. J., Lalani, A. S., Wass, E., Saskowski, J. & Khabele, D. Romidepsin (FK228) combined with cisplatin stimulates DNA damage-induced cell death in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **127**, 579-586 (2012).
- 48 FDA - U.S. Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/>.
- 49 Duckett, D. R. & Cameron, M. D. Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**, 1175-1193 (2010).
- 50 Manning, G. Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, 1-19, (2005).
- 51 Löffler G., Petrides P., Heinrich P.: Biochemie & Pathobiochemie (8. Auflage).
- 52 Müller-Esterl W.: Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler.
- 53 <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14old.html>.
- 54 Sibia, M. et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* **75**, 770-787 (2007).
- 55 Wells, A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 637-643 (1999).
- 56 Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H., Ruth P., Schäfer-Korting M.: Arzneimittelwirkungen (9. Auflage).
- 57 Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>.
- 58 Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (10. Auflage).
- 59 Wikipedia: <http://www.wikipedia.com/>.
- 60 EMA - Nexavar:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000690/human_med_000929.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124.
- 61 Chen, H. X. & Cleck, J. N. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 465-477 (2009).
- 62 Hu, S. et al. Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clin Cancer Res* **15**, 6062-6069 (2009).
- 63 EMA - Iressa:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001016/human_med_000857.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124.

-
- 64 Pascual, J. C., Belinchon, I., Sivera, F. & Yuste, A. Severe cutaneous toxicity following treatment with gefitinib (ZD1839). *Br J Dermatol* **153** (2005).
- 65 Inomata, S. et al. Acute lung injury as an adverse event of gefitinib. *Anticancer Drugs* **15**, 461-467 (2004).
- 66 Ohyanagi, F., Ando, Y., Nagashima, F., Narabayashi, M. & Sasaki, Y. Acute gefitinib-induced pneumonitis. *Int J Clin Oncol* **9**, 406-409 (2004).
- 67 Carlini, P. et al. Liver toxicity after treatment with gefitinib and anastrozole: drug-drug interactions through cytochrome p450? *J Clin Oncol* **24** (2006).
- 68 Ranson, M. et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* **20**, 2240-2250 (2002).
- 69 EMA: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000618/WC500033989.pdf.
- 70 EMA - Tarceva: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000618/human_med_001077.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124.
- 71 Bovenschen, H. J. & Alkemade, J. A. Erlotinib-induced dermatologic side-effects. *Int J Dermatol* **48**, 326-328 (2009).
- 72 EMA - Zelboraf: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002409/human_med_001544.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124.
- 73 Keating, G. M. & Lyseng-Williamson, K. A. Vemurafenib : a guide to its use in unresectable or metastatic melanoma. *Am J Clin Dermatol* **14**, 65-69 (2013).
- 74 Zambon, A., Niculescu-Duvaz, D., Niculescu-Duvaz, I., Marais, R. & Springer, C. J. BRAF as a therapeutic target: a patent review (2006 - 2012). *Expert Opin Ther Pat* **23**, 155-164 (2013).
- 75 Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K., Walter P.: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie (4. Auflage).
- 76 Universität Freiburg: <http://www.forstbotanik.uni-freiburg.de/Lehre/Skripten/Skript-Forstbotanik-I>.
- 77 ATCC: <http://www.atcc.org/>.
- 78 Stop Tabac: <http://stoptabac.ch/>.
- 79 Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch (261. Auflage).
-

- 80 Brown, J. M. Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol* **435**, 297-321 (2007).
- 81 GenScript: <http://www.genscript.com>.
- 82 Cell Signaling Technology: <http://cellsignal.com/>.
- 83 Vila, M. & Przedborski, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 365-375 (2003).
- 84 Pizzo, P. & Pozzan, T. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol* **17**, 511-517 (2007).
- 85 Tu, B. P. & Weissman, J. S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* **164**, 341-346 (2004).
- 86 Healy, S. J., Gorman, A. M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S. & Samali, A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* **625**, 234-246 (2009).
- 87 Kim, I., Xu, W. & Reed, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 1013-1030 (2008).
- 88 Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332 (2000).
- 89 Todd, D. J., Lee, A. H. & Glimcher, L. H. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 663-674 (2008).
- 90 Bernales, S., Papa, F. R. & Walter, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508 (2006).
- 91 Xu, C., Bailly-Maitre, B. & Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**, 2656-2664 (2005).
- 92 Egger, L. et al. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ* **10**, 1188-1203 (2003).
- 93 Puthalakath, H. et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337-1349 (2007).
- 94 So, A. Y., de la Fuente, E., Walter, P., Shuman, M. & Bernales, S. The unfolded protein response during prostate cancer development. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 219-223 (2009).
- 95 Hunnius - Pharmazeutisches Wörterbuch (9. Auflage).
- 96 Sporn, M. B. The war on cancer. *Lancet* **347**, 1377-1381 (1996).

-
- 97 WHO: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- 98 Yu, Y. & Zhu, Z. Cell Dormancy and Tumor Refractory. *Anticancer Agents Med Chem* (2012).
- 99 Holzel, D., Eckel, R., Emeny, R. T. & Engel, J. Distant metastases do not metastasize. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 737-750 (2010).
- 100 Statistik Austria: <http://www.statistik.at/>.
- 101 Österreichische Krebshilfe: <http://www.krebshilfe.net/>.
- 102 Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K. & Lowy, D. R. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* **113**, 3036-3046 (2008).
- 103 Russo, A. et al. Hereditary ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **69**, 28-44 (2009).
- 104 Ärzteblatt: <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/51128>.
- 105 Gnant M., Schlag P. M.: Chirurgische Onkologie - Strategien und Standards für die Praxis.
- 106 Österreichische Krebshilfe Wien: <http://www.krebshilfe-wien.at/>.
- 107 EMA - Zevalin:
http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000547/human_med_001178.jsp&mid=VVC0b01ac058001d124
- 108 Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48-58 (2002).
- 109 Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007-1017 (2001).
- 110 Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 3-29 (2003).
- 111 Almog, N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* **294**, 139-146 (2010).
- 112 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
- 113 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70, (2000).
- 114 Sandler, A. et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **355**, 2542-2550 (2006).
-

- I15 Escudier, B. et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370**, 2103-2111 (2007).
- I16 Hurwitz, H. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342 (2004).
- I17 Voelkel, N. F., Vandivier, R. W. & Tuder, R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L209-221 (2006).
- I18 Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* **100**, 782-794 (2007).
- I19 Shen, D. W. et al. Multiple Drug-resistant Human KB Carcinoma Cells Independently Selected for High-level Resistance to Colchicine, Adriamycin, or Vinblastine Show Changes in Expression of Specific Proteins. *J Biol Chem* **62**, 7762-7770 (1986).
- I20 Universität Hamburg: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/praktika/Zellbiologie.html>.
- I21 Ling, Y. H., Aracil, M., Jimeno, J., Perez-Soler, R. & Zou, Y. Molecular pharmacodynamics of PM02734 (elisidepsin) as single agent and in combination with erlotinib; synergistic activity in human non-small cell lung cancer cell lines and xenograft models. *Eur J Cancer* **45**, 1855-1864 (2009).
- I22 Latt, S. A., Stetten, G., Juergens, L. A., Willard, H. F. & Scher, C. D. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *J Histochem Cytochem* **23**, 493-505 (1975).
- I23 Thermo Scientific: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02020102>.
- I24 Leibniz Institute for Age Research: <http://imb-jena.de/>.
- I25 National Diagnostics: <http://www.nationaldiagnostics.com/>.
- I26 Bio-Rad: <http://www.bio-rad.com/>.
- I27 G-Biosciences: <http://gbiosciences.com/>.
- I28 Life Technologies: <http://www.lifetechnologies.com/>.
- I29 Keprtova, J. & Minarova, E. The effect of 3H-thymidine on the proliferation of in vitro cultured mammalian cells. *Gen Physiol Biophys* **4**, 81-92 (1985).
- I30 iGEM 2010: http://2010.igem.org/FACS_analysis_of_fluorescent_proteins.
- I31 University of Minnesota - Stem Cell Institute: Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. (2000).

-
- 132 Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G. & Franceschi, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 40-45 (1993).
- 133 Perelman, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* **3**, 11 (2012).
- 134 Medizinische Universität Wien - Besondere Einrichtung für Biomedizinische Forschung: <http://www.meduniwien.ac.at/center-biomed-research/>.
- 135 Barile, F. A. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *J Pharmacol Toxicol Methods* **61**, 136-145 (2010).
- 136 Liu, Y. et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem* **286**, 25007-25015 (2011).
- 137 Meca, G., Font, G. & Ruiz, M. J. Comparative cytotoxicity study of enniatins A, A(1), A(2), B, B(1), B(4) and J(3) on Caco-2 cells, Hep-G(2) and HT-29. *Food Chem Toxicol* **49**, 2464-2469 (2011).
- 138 Ruiz, M. J., Franzova, P., Juan-Garcia, A. & Font, G. Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells in vitro. *Toxicon* **58**, 315-326 (2011).
- 139 Ruiz, M. J., Macakova, P., Juan-Garcia, A. & Font, G. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food Chem Toxicol* **49**, 2718-2724 (2011).
- 140 Zisowsky, J. et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* **73**, 298-307 (2007).
- 141 Verfaillie, T. et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ* **19**, 1880-1891 (2012).
- 142 Ficheux, A. S., Sibiril, Y. & Parent-Massin, D. Co-exposure of Fusarium mycotoxins: in vitro myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors. *Toxicon* **60**, 1171-1179 (2012).
- 143 Morisaki, T. et al. Combining celecoxib with sorafenib synergistically inhibits hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* **33**, 1387-1395 (2013).
- 144 Almhanna, K. & Philip, P. A. Safety and efficacy of sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* **2**, 261-267 (2009).
-

- 145 Pawaskar, D. K. et al. Synergistic interactions between sorafenib and everolimus in pancreatic cancer xenografts in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**, 1231-1240 (2013).
- 146 Giovannetti, E. et al. Molecular mechanisms and modulation of key pathways underlying the synergistic interaction of sorafenib with erlotinib in non-small-cell-lung cancer (NSCLC) cells. *Curr Pharm Des* **19**, 927-939 (2013).
- 147 Li, J., Pan, Y. Y. & Zhang, Y. Synergistic interaction between sorafenib and gemcitabine in EGFR-TKI-sensitive and EGFR-TKI-resistant human lung cancer cell lines. *Oncol Lett* **5**, 440-446 (2013).
- 148 Copland, J. A. et al. Molecular diagnosis of a BRAF papillary thyroid carcinoma with multiple chromosome abnormalities and rare adrenal and hypothalamic metastases. *Thyroid* **16**, 1293-1302 (2006).
- 149 Zhang, W. et al. Histone deacetylase inhibitor romidepsin enhances anti-tumor effect of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *J Thorac Oncol* **4**, 161-166 (2009).
- 150 Serova, M. et al. Predictive factors of sensitivity to elisidepsin, a novel kahalalide f-derived marine compound. *Mar Drugs* **11**, 944-959 (2013).
- 151 Perez, C. A., Santos, E. S., Arango, B. A., Raez, L. E. & Cohen, E. E. Novel molecular targeted therapies for refractory thyroid cancer. *Head Neck* **34**, 736-745 (2012).
- 152 Teixido, C. et al. ErbB3 expression predicts sensitivity to elisidepsin treatment: in vitro synergism with cisplatin, paclitaxel and gemcitabine in lung, breast and colon cancer cell lines. *Int J Oncol* **41**, 317-324 (2012).
- 153 Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310 (2007).
- 154 Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. & Huot, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**, 2169-2177 (1997).
- 155 Lu, X., Tang, X., Guo, W., Ren, T. & Zhao, H. Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis of human chondrosarcoma cells by blocking the RAF/ERK/MEK pathway. *J Surg Oncol* **102**, 821-826 (2010).
- 156 Gammelsrud, A. et al. Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **261**, 74-87 (2012).

-
- 157 Plastaras, J. P. et al. Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation. *Cancer Res* **67**, 9443-9454 (2007).
- 158 Takezawa, K. et al. Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res* **69**, 6515-6521 (2009).
- 159 Zhang, X. H. et al. Synergistic antitumor efficacy of sequentially combined paclitaxel with sorafenib in vitro and in vivo NSCLC models harboring KRAS or BRAF mutations. *Cancer Lett* **322**, 213-222 (2012).
- 160 Fernando, J. et al. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* **227**, 1319-1325 (2012).
- 161 Huber, S. et al. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-I. *Leukemia* **25**, 838-847 (2011).
- 162 Rahmani, M., Davis, E. M., Bauer, C., Dent, P. & Grant, S. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-I through inhibition of translation. *J Biol Chem* **280**, 35217-35227 (2005).
- 163 Delgado, V. M. et al. Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB J* **25**, 242-254 (2011).
- 164 Xu, Y. et al. Cytotoxic and Antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *J Nat Prod* **70**, 1467-1471 (2007).
- 165 Broggin, M. et al. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia* **17**, 52-59 (2003).
- 166 Taraboletti, G. et al. Antiangiogenic activity of aplidine, a new agent of marine origin. *Br J Cancer* **90**, 2418-2424 (2004).
- 167 Klisovic, D. D. et al. Depsipeptide inhibits migration of primary and metastatic uveal melanoma cell lines in vitro: a potential strategy for uveal melanoma. *Melanoma Res* **15**, 147-153 (2005).
- 168 Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* **103**, 1237-1241 (1999).
-

Lebenslauf

Vor- und Zuname Markus Zlesak

Persönliche Fähigkeiten

Sprachen	Deutsch Englisch Italienisch (Grundkenntnisse) Latein
weitere Kenntnisse	Kenntnisse im Umgang mit MS Office, Open Office Führerschein Klasse B
Interessen	Sport Reisen Literatur

Ausbildung

1995 – 1999	Volksschule Quellenstraße, Wien
1999 – 2007	Wiedner Gymnasium, Wien <u>Abschluss:</u> Matura
2008 – 2013	Universität Wien Diplomstudium Pharmazie <u>Abschluss:</u> Mag. pharm.
2012 - heute	Medizinische Universität Wien Diplomstudium Humanmedizin

Berufserfahrung

2007-2008	Präsenzdienst Österreichs Bundesheer
2008-2011	Sales-Promotor Orange Austria Telecommunication GmbH