

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
Direktor: Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt

# Einfluss von Simvastatin auf die Strahlensensibilität von Normalgewebs- und Tumorzellen der Brust

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
**Doktor der Medizin**  
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von  
Paul Fischer, geboren am 01.04.1988 in Berlin

Berlin, August 2021



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen  
4.0 International Lizenz.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie am Klinikum Südstadt Rostock  
Universitätsmedizin Rostock
  
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Toralf Reimer  
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock  
Universitätsmedizin Rostock
  
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel  
Klinik für Strahlentherapie und Onkologie  
Universitätsklinikum Frankfurt

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Katrin Manda angefertigt (Klinikdirektor: Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt).

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Das Mammakarzinom .....	1
1.2.1 Epidemiologie .....	1
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.2.3 Früherkennung.....	3
1.2.4 Pathologie.....	4
1.2.5 Klinik .....	4
1.2.6 Therapie.....	5
1.3 Strahlentherapie.....	7
1.3.1 Grundlagen der Strahlentherapie .....	7
1.4 Kombinierte Strahlentherapie und Radiosensitivierung .....	8
1.5 Statine .....	9
1.5.1 Simvastatin .....	11
1.6 Zielstellung.....	12
<b>2. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung .....	13
2.1.1 MCF-7-Zellen .....	13
2.1.2 MCF-10A-Zellen.....	14
2.1.3 Zellkultivierung .....	14
2.2 Simvastatin .....	16
2.3 Bestrahlung durch Linearbeschleuniger .....	16
2.4 Versuche.....	17
2.4.1 Wachstumskurve .....	17
2.4.2 Koloniebildungstest.....	19
2.4.3 LDH-Zytotoxizitätsassay.....	21
2.4.4 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	23
2.4.5 Zellzyklusanalyse .....	25
2.5 Verwendete Materialien .....	28

---

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1 Wachstum der Tumor- und Normalgewebszellen.....	31
3.2 Zytotoxizität.....	33
3.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	36
3.4 Klonogenes Überleben.....	37
3.5 Zellzyklusanalyse .....	39
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>44</b>
4.1 Wachstum der Tumor- und Normalgewebszellen.....	44
4.2 Zytotoxizität.....	46
4.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	49
4.4 Klonogenes Überleben.....	53
4.5 Zellzyklus .....	55
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>67</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>68</b>

---

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle .....	2
Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung der MCF-7-Zellen.....	13
Abbildung 3: Mikroskopische Darstellung der MCF-10A-Zellen .....	14
Abbildung 4: Versuchsaufbau Wachstumskurven .....	17
Abbildung 5: Versuchsaufbau Koloniebildungstest .....	20
Abbildung 6: Versuchsaufbau LDH-Zytotoxizitätstest .....	22
Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Bestimmung der LDH- Aktivität .....	23
Abbildung 8: Lebenszyklus einer Zelle .....	25
Abbildung 9: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen.....	31
Abbildung 10: Wachstumskurven der MCF-10A-Zellen. ....	32
Abbildung 11: LDH-Zytotoxizität der MCF-7 und MCF-10A-Zellen 24 Stunden.....	34
Abbildung 12: LDH- Zytotoxizität der MCF-7 und MCF-10A- Zellen 48 Stunden.....	35
Abbildung 13: $\gamma$ H2AX Foci in MCF-7-Zellen .....	36
Abbildung 14: $\gamma$ -H2AX Foci in MCF-10A- Zellen .....	37
Abbildung 15: Klonogenes Überleben MCF-7-Zellen .....	38
Abbildung 16: Klonogenes Überleben MCF-10A-Zellen.....	39
Abbildung 17: Zellzyklus MCF-7-Zellen, 24 Stunden .....	40
Abbildung 18: Zellzyklus der MCF-7-Zellen, 72 Stunden .....	41
Abbildung 19: Zellzyklus der MCF-10A-Zellen, 24 Stunden.....	42
Abbildung 20: Zellzyklus der MCF-7-Zellen, 72 Stunden .....	43
Tabelle 1: Verdünnungsreihe Wachstumskurven.....	18
Tabelle 2: Pipettierschema ein Milliliter.....	18
Tabelle 3: Verdünnungsreihe Koloniebildungstest .....	19
Tabelle 4: Pipettierschema fünf Milliliter.....	20
Tabelle 5: Verdünnungsschema LDH-Zytotoxizitätstest .....	22
Tabelle 6: Kontrolllösungen LDH-Zytotoxizitätsassays .....	22
Tabelle 7: Pipettierschema des $\gamma$ H2Ax Test .....	24
Tabelle 8: Pipettierschema Zellzyklusanalyse .....	27

---

AGO	Arbeitsgemeinschaft Onkologie
BET	brusterhaltende Therapie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelial growth factor (Endothelwachstumsfaktor)
et. al.	und andere
FBS	Foetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
G	Gewichtskraft
Gy	Gray
GnRH	Gonadotropin-Freisetzung-Hormon
H2AX	Phosphorylierte Histonvariante
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
KBT	Koloniebildungstest
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
µM	Mikromol
M	Molare Masse
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
SVA	Simvastatin
VL	Verdünnungslösung
WHO	Weltgesundheitsorganisation

---

## **1. Einleitung**

### **1.1 Tumorerkrankungen**

---

Als Tumor wird die krankhafte Anschwellung eines Organs oder Organteils bezeichnet. Damit ist zum einen im weitesten Sinn eine Schwellung während eines entzündlichen Prozesses und zum anderen, im Rahmen einer Krebserkrankung, eine fehlregulierte Teilung oder Neubildung von entarteten Zellen im Ursprungsgewebe des Tumors gemeint. Je nach biologischem Verhalten werden gutartige, benigne von bösartigen, malignen Tumoren unterschieden. Ihnen ist gemeinsam, dass durch die Neubildung von Zellen, die Neoplasie, gesundes Gewebe verdrängt und zerstört werden kann. Tumorerkrankungen werden anhand des Ursprungsgewebes eingeteilt. Es werden zum Beispiel epitheliale Tumoren, sogenannte Karzinome, von mesenchymale Tumoren, den Sarkomen, abgegrenzt.

Tumorerkrankungen gehören zusammen mit den Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und haben einen entschiedenen Einfluss auf die Lebenserwartung. 2019 waren Krebserkrankungen hierzulande für ein Viertel aller Todesfälle verantwortlich. In der Altersgruppe der 45- bis 65-jährigen ist Krebs die häufigste Todesursache (Destatis, 2021).

### **1.2 Das Mammakarzinom**

---

#### **1.2.1 Epidemiologie**

Rund 70.000 jährliche Neuerkrankungen, allein in Deutschland, machen das Mammakarzinom zu der mit Abstand häufigsten Krebserkrankung der Frau (Robert Koch - Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Nicht nur hierzulande, sondern auch weltweit ist der Brustkrebs, laut Weltgesundheitsorganisation (WHO; "The Global Cancer Observatory," 2019) die häufigste Krebstodesursache der Frau. Männer hingegen sind sehr selten betroffen. Jährlich erkranken in Deutschland rund 700 von ihnen. Die Statistiken verdeutlichen, dass die Behandlung des Mammakarzinoms, insbesondere für Frauen, eines der dringendsten medizinischen Probleme der heutigen Zeit darstellt. Zurzeit erkrankt etwa jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen von Frauen betreffen allein die Brustdrüse. Jährlich versterben etwa 18.000 Patientinnen in Deutschland daran. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken steigt mit dem Alter an und dennoch sind drei von zehn Frauen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt (Robert Koch - Institut & Gesellschaft der epidemiologischen

Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Insgesamt konnten jedoch die diagnostischen und therapeutischen Fortschritte der letzten Jahre die Überlebenschancen der Betroffenen insgesamt verbessern, was sich in einem kontinuierlichen Rückgang der Sterberaten äußert, s. Abb. 1. (Robert Koch - Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

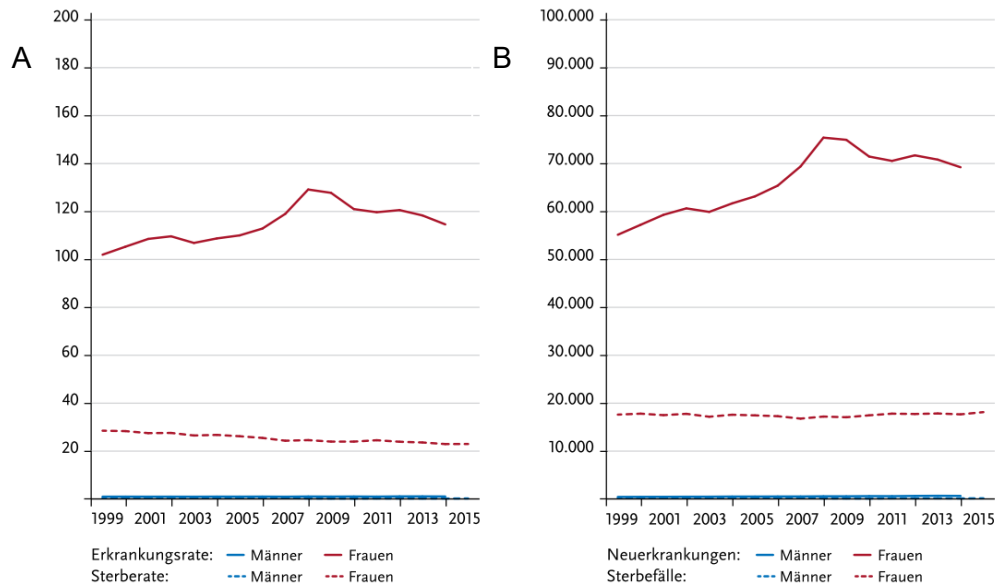


Abbildung 1: A: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, in Deutschland, je 100.000 Einwohner, B: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, Deutschland, (Robert Koch - Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

## 1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz der hohen Zahl an Betroffenen und der damit verbundenen Dringlichkeit, die mit einer intensiven Anstrengung in der Forschung einhergeht, ist die Ätiologie des Mammakarzinoms bisher weitgehend unbekannt. Bekannt sind jedoch verschiedene, sogenannte modifizierbare und nicht modifizierbare Risikofaktoren, die zur Entstehung der Krankheit beitragen ("AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer" 2020). Zu den modifizierbaren Risikofaktoren für Brustkrebs zählen zum Beispiel der westliche Ernährungsstil, die damit einhergehende Adipositas, Diabetes mellitus Typ II, Nikotin und Alkoholabusus, verminderte körperliche Aktivität, Schlafmangel, wenig Stillen sowie postmenopausale Hormontherapie. Nicht-modifizierbare Risikofaktoren sind hohes Alter, genetisches Risiko, familiäre Krebsanamnese, hohe Dichte des Brustgewebes, eine hohe Anzahl an Menstruationszyklen im Laufe des Lebens, hohes Alter bei der ersten Geburt sowie generell eine geringe Geburtenzahl oder gar keine erlebte Schwangerschaft

(“AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer” 2020).

Das genetische Risiko und die damit verbundene familiäre Häufung von Brustkrebs wird durch die Mutation der Risikogene BRCA1 und BRCA2 deutlich erhöht. Darüber hinaus gibt es noch weitere bekannte und unbekanntere genetische Prädispositionen, die für eine begünstigte Entstehung der Erkrankung verantwortlich sein sollen.

### 1.2.3 Früherkennung

Die bereits dargestellten epidemiologischen Daten zeigen die große Bedeutung des Mammakarzinoms für unsere Gesellschaft. Zur Bekämpfung dieser Erkrankung ist eine Früherkennung sinnvoll und notwendig. Durch diese ist es möglich, das Mammakarzinom nicht nur in früheren Stadien zu diagnostizieren, sondern damit einhergehend auch den Behandlungsaufwand- und die Kosten zu senken. Außerdem wird somit der Behandlungserfolg gesteigert und damit die Überlebenschancen verbessert.

Seit der Einführung des Mammografiescreenings und der Kostenübernahme des Screenings durch die gesetzlichen Krankenkassen für Frauen ab dem 50. Lebensjahr, stiegen, wie in Abb. 1 zu erkennen, die Neuerkrankungsraten typischerweise zunächst an, da mehr Erkrankungen detektiert wurden. Im Anschluss gingen die Zahlen langsam zurück. Außerdem war auch zu beobachten, dass seit der Einführung des Mammografiescreenings weniger Frauen zum Zeitpunkt der Diagnose an fortgeschrittenen Tumoren der Mamma litten, als vorher (Robert Koch - Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, dass die Senkung der Sterblichkeit um 15 % bis 25 % durch das Mammografiescreening eher schwächer ausgeprägt war (Njor *et al.*, 2012), während bis zu 30 % Überdiagnosen gestellt werden. Um eine einzige Frau zu retten, mussten überhaupt erst 2.000 Frauen mammografiert werden. Hinzukommend wurden dabei zehn gesunde Frauen, die gar keinen Brustkrebs aufwiesen, unnötigerweise einer Behandlung unterzogen (Gøtzsche & Jørgensen, 2013).

Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass nur 52 % der zur Mammografiescreening berechtigten Patientinnen auch daran teilgenommen haben (Kääb-Sanyal & Hand, 2017).

Die Früherkennung mittels Mammografie wird durch die klinische Brustuntersuchung und die sonografische Bildgebung ergänzt. (*Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF*, 2018). Eine Tastuntersuchung der Brust als

alleinige Screeningmethode hat sich in Studien nicht als mortalitätssenkend erwiesen (Brennan, 2016).

#### 1.2.4 Pathologie

Um eine wirksame, individuell auf die Patientin oder den Patienten zugeschnittene Therapie einzuleiten, ist heutzutage die genaue Charakterisierung der Tumorbilologie sowie das Ausmaß und der Fortschritt des Mammakarzinoms unerlässlich.

Zunächst ist entscheidend, dass verschiedene Risikoläsionen die Grundlage für die Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms bilden. Sie unterscheiden sich im Progressionsrisiko und den therapeutischen Ansätzen. Unterteilt werden sie in intraepitheliale Neoplasien vom duktalem und lobulären Typ, atypische duktales Hyperplasien, flache epitheliale Atypien und Milchgangspapillome. Zu 95 % und damit am häufigsten, tritt die duktales intraepitheliale Neoplasie auf. Aufgrund der guten therapeutischen Möglichkeiten liegt die Mortalität für diese Neoplasie bei nur 3,3 % (Narod *et al.*, 2015).

Durchbricht eine maligne, zelluläre Entartung die Basalmembran der atypischen Brustzellen und infiltriert das umliegende Gewebe, wird von einem invasiven Mammakarzinom gesprochen.

Die WHO unterscheidet das Mammakarzinom in ein invasives Karzinom ohne speziellen Typ (NST), das etwa 75 % aller Mammakarzinome ausmacht sowie das invasive Karzinom mit speziellem Typ. Zu diesem speziellen Typ werden, neben dem lobulären-, tubulären-, kribriormen-, muzinösen- und dem inflammatorischen Karzinom, auch der neuroendokrine Tumor gezählt (Sinn & Kreipe, 2013).

#### 1.2.5 Klinik

Da der Fortschritt des Tumors, seine Größe, der Lymphknotenbefall sowie eine stattgefundene Metastasierung direkt mit der Überlebenswahrscheinlichkeit zusammenhängen, ist eine frühe Diagnose der Erkrankung von immenser Bedeutung für den Behandlungserfolg. Erschwerend kommt hinzu, dass sich klinische Zeichen jedoch häufig erst im fortgeschrittenen Stadium des Tumorbefalls manifestieren.

Mitunter geht die maligne Entartung mit einer lokalen Bindegewebsvermehrung einher, die sich unter Ausbildung eines derben, unscharf begrenzten und nicht verschiebbaren Knotens

in der Brust tasten lässt. Dieser Befund stellt auch das klinische Leitsymptom für das Mammakarzinom dar. Tastbar ist eine solche tumoröse Veränderung allerdings, abhängig von der Lage innerhalb der Mamma und ihrer Struktur, erst ab einer Größe von ungefähr 2 cm (Schwab *et al.*, 2015).

Nachdem die Tumorzellen lokal die Bindegewebssepten und Milchgänge infiltriert haben, führt eine weitere Ausbreitung über die Lymphabflusswege, oder eine hämatogene Aussaat zu einer Metastasierung des Mammakarzinoms. Im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen metastasiert das Mammakarzinom sehr früh. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors, seiner Proliferationsfähigkeit und dem Befall der axillären Lymphknoten. Je größer der Tumor ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass bereits eine Lymphknotenmetastasierung stattgefunden hat. Eine hämatogene Aussaat der Tumorzellen findet sich mit absteigender Häufigkeit im Skelettsystem, in der Haut, Pleura, Leber, der Lunge oder im Gehirn.

Die einerseits weiterhin mangelhafte Teilnahme an der Früherkennung und ihre zudem weniger effektive Mortalitätssenkung sowie die andererseits rasche Metastasierung des Mammakarzinoms und das damit verbundene häufige Auftreten von Erkrankungen in fortgeschrittenen Stadien, machen die adäquate Weiterentwicklung einer wirksamen und gleichzeitig nebenwirkungsarmen Therapie enorm wichtig.

### 1.2.6 Therapie

Die hohe Inzidenz sowie die zurückhaltende Wahrnehmung von Vorsorgeuntersuchungen und der damit verbundenen hohen Anzahl an spät diagnostizierten und weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, stellt an die Wahl eines geeigneten Therapiekonzeptes eine große Herausforderung und unterliegt ständigen Anpassungen an die Ergebnisse neuer Studien.

Lange Zeit standen zwei kontrovers diskutierte Modelle zum Verständnis des Mammakarzinoms im Mittelpunkt. Zum einen das Konzept William Halsted's, eines US-Amerikanischen Chirurgen, welches besagt, dass das Mammakarzinom im Frühstadium eine lokal begrenzte Erkrankung sei und lokale Maßnahmen zur langfristigen Tumorkontrolle auch ausreichend wären (Halsted, 1894). Zum anderen die Aussage von Bernard Fisher, ebenfalls ein US-Amerikanischer Chirurg, dass das Mammakarzinom im Frühstadium eine weitgehend disseminierte Erkrankung sei, die eine systemische Therapie zur frühzeitigen Mikrometastasenbekämpfung erfordere (Fisher & Fisher, 1966). Heutzutage wird jedoch der Kombination- oder Spektrumschulung nach Samuel Hellman von 1997 gefolgt. Demnach kann das Mammakarzinom im Frühstadium entweder eine lokal begrenzte oder bereits disseminierte

Erkrankung sein und erfordert somit eine Kombination aus lokalen und systemischen Maßnahmen zur Behandlung (Hölzel *et al.*, 2001).

Die Therapieoptionen des Mammakarzinoms setzen sich heute aus der operativen Therapie, der (neo-) adjuvanten Strahlentherapie, der systemisch (neo-) adjuvanten medikamentösen Therapie und der Supportivtherapie zusammen.

Eine operative Komplettresektion mit tumorfreien Wundrändern, ist das übergeordnete Ziel der Behandlung von nicht- fernmetastasierten Formen des Mammakarzinoms. Die chirurgische Therapie hat sich in den vergangenen Jahren von radikalen Vorgehensweisen, wie der Mastektomie, hin zu brusterhaltenden, schonenden Verfahren gewandelt. Die Resektion muss, je nach Klassifikation des Tumors, mit adjuvanter Bestrahlung, (neo-) adjuvanter medikamentöser Therapie, einer gezielten Entfernung oder Bestrahlung der Lymphknoten einhergehen. Sowohl für die brusterhaltende Therapie (Vinh-hung & Verschraegen, 2004), als auch für die radikale Mastektomie (Clarke *et al.*, 2005), gilt die klare Empfehlung, eine adjuvante Strahlentherapie durchzuführen. Dadurch lässt sich das Risiko für lokale Rezidive senken und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreichen.

Die (neo-) adjuvante medikamentöse Therapie bietet Behandlungsmöglichkeiten mit Chemo-, Antihormon- oder Antikörpertherapeutika. Um eine Wirksamkeit zu gewährleisten, ist es unbedingt notwendig, sie an die individuelle Tumorbilogie anzupassen.

Die in der Behandlung des Mammakarzinoms angewandten Therapieoptionen wirken sich häufig nicht nur auf die Tumorzellen selbst, sondern auch auf den Stoffwechsel von intaktem Gewebe der Patientin aus. Um komplikationsbedingte Therapielimitierungen zu verhindern, wird durch die Supportivtherapie versucht therapiebegleitende Symptomatik, wie Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen zu lindern.

---

## 1.3 Strahlentherapie

---

Im onkologischen Therapiekonzept nimmt die Strahlentherapie als lokoregionäre Behandlung eine zentrale Stellung zwischen operativ-chirurgischer und systemisch-medikamentöser Therapie ein (Wannenmacher *et. al.*, 2006). Neben einer lokalen Anwendbarkeit zur Zerstörung von Tumorzellen gibt es auch die Möglichkeit der Behandlung von Tumorausläufern. Weiterhin spielt sie auch eine große Rolle bei der palliativen Therapie, zur Linderung von Symptomen wie der Kontrolle von Schmerzen. Der stetigen Weiterentwicklung bildgebender Diagnostik, der Computertechnik sowie letztlich auch den epidemiologischen Daten der letzten Jahrzehnte verdanken wir die heutigen Bestrahlungstechniken und dem damit möglich gewordenen, gezielten Einsatz ionisierender Strahlung an einem Tumor, bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden Normalgewebes.

### 1.3.1 Grundlagen der Strahlentherapie

Die physikalische Grundlage der Strahlentherapie ist die Energieübertragung an das biologische Gewebe (Wannenmacher *et al.*, 2006). Das physikalische Maß für die Energieabgabe an Materie ist die Energiedosis Gray (Gy) und bildet sich aus dem Quotient von absorbierte Energie und der Masse des Materials, welches die Energie aufnimmt (Wannenmacher *et al.*, 2006). Für diese Energieübertragung können Partikelstrahlungen wie Elektronen, Protonen oder Neutronen verwendet werden. In der Klinik wird häufig durch Linearbeschleuniger hergestellte Photonenstrahlung verwendet. Charakterisiert werden die verschiedenen Strahlenarten durch die Tiefendosiskurven, die die Höhe der Dosis in Abhängigkeit von der Gewebetiefe beschreiben (Wannenmacher *et al.*, 2006).

Es wird die direkt ionisierende Strahlung von indirekt ionisierender Strahlung unterschieden. Die Wirkung der direkten Ionisierung entfaltet sich an der Desoxyribonukleinsäure (DNA), den Enzymen oder an Zellmembranbestandteilen. Durch die indirekt ionisierende Strahlung entstehen erst nach der Interaktion mit Materie geladene Teilchen, die einen Effekt auf das Gewebe haben. So kommt es durch die Strahlung zur Radiolyse des Wassers, bei der aus zellulärem Wasser reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) wie zum Beispiel Hydroxyradikale gebildet werden, welche zu Schäden auf zellulärer Ebene führen können.

Die Folgen der Strahlung sind Schäden an der DNA, wie Basenveränderungen, Einzelstrangbrüche, oxidative Phosphorylierungen, Lipidperoxidationen und Doppelstrangbrüche. Je nach Ausmaß der Schädigung sowie der vorhandenen Möglichkeiten der Zelle zur Repa-

ratur der DNA-Schäden, kommt es zum Erliegen der Teilungsfähigkeit der Zelle, zum Zelltod oder auch zu Mutationen. Eine Heilung von der Tumorerkrankung kann nur durch die Vernichtung sämtlicher Tumor- und Tumorstammzellen erreicht werden. Die benötigte Dosis ist vom Tumolvolumen abhängig. Außerdem wird sich an der aus klinischen Studien bekannten, lokalen Rezidivrate, für die entsprechende Dosis gerichtet (Wannenmacher et al., 2006). Mit zunehmender Dosis steigt aber auch das Risiko der Schädigung des gesunden Gewebes. Um die therapeutische Breite zu erhöhen, wird die Zieldosis fraktioniert, das heißt in mehreren Sitzungen, verabreicht. Eine übliche Strahlendosis pro Sitzung sind 2 Gy, während die Zieldosen für die verschiedenen Tumorentitäten aufgrund der unterschiedlichen Strahlensensibilität zwischen 20 Gy und über 60 Gy liegen. Das gesunde Gewebe kann sich zwischen den Fraktionen durch verschiedene Reparaturmechanismen regenerieren, während die Tumorzellen in ihrer Reparaturkapazität beschränkt sind (Wannenmacher et al., 2006).

#### **1.4 Kombinierte Strahlentherapie und Radiosensitivierung**

---

Das Ziel aktueller Forschungen ist es, für eine Optimierung der Therapiepläne die Effektivität der Behandlungsoptionen zu steigern und somit Nebenwirkungen zu vermindern, um letztendlich das Überleben der Patientinnen und Patienten zu steigern. Dabei wird der Radiosensitivierung ein großes Potential zugeschrieben. Untersucht werden beispielsweise Mikro- und Makromoleküle, Nanopartikel oder Wirkstoffe auf ihre radiosensibilisierenden Eigenschaften. Der Einsatz von Radiosensitizern in der Strahlentherapie scheint vielversprechend, da sie das Tumorgewebe, beispielsweise durch Beschleunigung der DNA-Schädigung oder Erzeugung von freien Radikalen, verringern sollen, ohne dass dabei Substanz selbst zytotoxisch wirkt (Rhombert & Dunst, 2006).

Bereits 1921 wurde von Hermann Holthausen beobachtet, dass Sauerstoff die Strahlenempfindlichkeit von Zellen beeinflusst. Dieser sogenannte Sauerstoffeffekt zeigt, dass bei Röntgen- oder  $e^-$ -Strahlen gut oxygenierte Zellen strahlenempfindlicher sind, als hypoxische Zellen, welche zum Beispiel in einem Stickstoffmilieu gehalten wurden. Sauerstoff gilt bis heute als der potenteste bekannte Radiosensibilisator (Wannenmacher et al., 2006). Da viele solide Tumoren hypoxische Areale aufweisen, ist eine verminderte Strahlensensibilität gegenüber dem gesunden, besser oxigeniertem Gewebe, ein weiterhin zu lösendes Problem in der Strahlentherapie.

Heutzutage ist eine ganze Reihe von weiteren chemischen Modulatoren bekannt, die einen Einfluss auf die Strahlensensibilität von Zellen zeigen. Jede durchgeführte medikamentöse, antineoplastische Therapie kann einen Einfluss auf eine gleichzeitig durchgeführte Strahlen-

behandlung, also eine radiomodulierende Wirkung haben. Bei einer kombinierten Radio-Chemotherapie können die einzelnen Modalitäten additive, supraadditive sowie subadditive Effekte erzielen. Deutlich wird das durch die Änderung des Steilheitsgrades in den Dosis-Effekt-Kurven im Vergleich zur Kurve der alleinigen Strahlung (Wannenmacher *et al.*, 2006). Bei einem additiven Effekt entspricht die Wirkung der einfachen Addition der Einzeleffekte der beiden Modalitäten. Ein subadditiver Effekt hingegen kommt einer Radioprotektion durch einen chemischen Modulator gleich, es liegt im Zusammenspiel eine verminderte Wirkung vor. Eine supraadditive Wirkung (= Strahlensensibilisierung) liegt vor, wenn die Summationswirkung letztendlich größer ist, als die reine Addition der Teileffekte von einem chemischen Modulator und Bestrahlung erwarten lassen würde (Dunst *et al.*, 2006).

Zu der übergeordneten Gruppe der Radiomodulatoren gehören zum Beispiel synergistisch zur Strahlentherapie wirkende Zytostatika, antiproliferative Substanzen, biologische Substanzen, wie zum Beispiel Interferon, außerdem antiangiogene Substanzen oder Radioprotektoren der Normalgewebe.

Eine weitere Untergruppe der Radiomodulatoren sind die Radiosensitizer. Bei ihnen steht im Vordergrund, dass ein strahlenpotenzierender Effekt erzielt wird, obwohl die Medikamente nicht notwendigerweise in einer zytotoxischen Dosis verabreicht werden.

Zu der Gruppe der Radiosensitizer gehören Thiolmodulatoren, DNA-Sensitizer, wie zum Beispiel halogenierte Pyrimidine, außerdem Imitatoren des O<sub>2</sub>-Effektes, oder hyperbarer Sauerstoff, elektronenaffine Substanzen und multifunktionale Radiosensitizer, wie zum Beispiel Razoxan, welches den Zellzyklus in der G2/M-Phase, der strahlensensibelsten Phase, blockiert. Die Klassifikation der Radiomodulatoren untersteht einem steten Wandel und berücksichtigt teilweise noch nicht die neuesten Forschungsergebnisse (Rhomberg & Dunst, 2006). Ein vielversprechendes neues Forschungsgebiet scheint sich mit der Wirkstoffklasse der Statine zu ergeben, die in klinischen Studien kanzeropräventive Eigenschaften aufzeigten (Chan *et al.*, 2003).

## 1.5 Statine

---

Nach der Entdeckung und Isolation des ersten Statins „Mevastatin“, im Jahre 1976 von Akira Endo, und spätestens nach der auf seiner Arbeit aufbauenden Vergabe des Nobelpreises für Physiologie und Medizin an Michael Brown und Joseph Goldstein für ihre Entdeckungen zur Regulierung des Cholesterin-Stoffwechsels, wurde das Potential der Statine, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, deutlich.

Nachdem der Cholesterinsenker Lovastatin als erstes Statin 1987 auf dem Markt der Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen wurde, folgten verschiedene klinische Studien zum Risiko und zur Langzeitsicherheit des Lovastatins. Aufgrund des geringen Nebenwirkungsprofils, der einfachen Einnahme und der günstigen Herstellung, wurde das Medikament schnell zum Cholesterinsenker der ersten Wahl. Verunsicherung schürte eine Studie zur Langzeitsicherheit (Jacobs *et al.*, 1992), die einen Zusammenhang zwischen erniedrigtem totalem Cholesterinwert und Nicht-Herzerkrankungen, im Speziellen eine Karzinogenese, nicht ausschließen konnte (Steinberg, 2006). Im Folgenden erschienen mehrere groß angelegte klinische Studien mit tausenden Teilnehmern, die Zweifel und Unsicherheiten ausräumen konnten und die Langzeitsicherheit der Statine untermauerten (Pedersen *et al.*, 1994; Steinberg, 2006; Ford *et al.*, 2016).

Besonders interessant war eine Studie zur Langzeitsicherheit und der Assoziation von Karzinogenese und der Nutzung von Statinen. Sie kam überraschenderweise zu dem Ergebnis, dass Patienten und Patientinnen, die mit Statinen, also  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, behandelt wurden, im Vergleich zu mit Gallensäurebindern behandelten Menschen, eine insgesamt 28 % geringere Wahrscheinlichkeit haben an Krebs zu erkranken. Alle speziell untersuchten Krebsarten waren nicht, oder wenn überhaupt, nur invers mit den Statinen assoziiert (Chan *et al.*, 2003). Nachfolgende epidemiologische Studien waren zunächst nicht eindeutig. Es gab Untersuchungen, die keinerlei Effekt der Statine, weder positiv noch negativ, auf Krebs darlegten (Dale *et al.*, 2006). Andere konnten, wie Chan *et al.*, 2003, eine signifikant verminderte Krebsmortalität von 15 % aufzeigen (Nielsen *et al.*, 2012). Aktuellere epidemiologische Studien deuten weiter in die Richtung, dass Statine bei der Behandlung von Brustkrebs, aufgrund ihrer Mortalitätsenkung, hilfreich sein können (Liu *et al.*, 2017). Es wurde zwar kein Zusammenhang zwischen der Verwendung eines Statins und einer verringerten Inzidenz von Brustkrebs gefunden, jedoch ein unterstützender, protektiver Effekt und verringerte Rezidivraten, insbesondere von Simvastatin, während der Behandlung von Brustkrebs. Es wird sich ausdrücklich für eine klinische Studie mit Simvastatin als adjuvantes Medikament ausgesprochen (Ahern *et al.*, 2014).

Eine der ersten zu dem Thema durchgeführten *in vitro* Studien von Denoyelle *et al.*, 2001, führte zu dem Ergebnis, dass Cerivastatin bei MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen eine Inhibierung der Zellproliferation und Invasion durch das Matrigel induziert (Denoyelle *et al.*, 2001).

Eine Studie von Liu *et al.* setzt sich mit der Wirkungsweise von Simvastatin auseinander und beschreibt eine Unterdrückung der Proliferation von MCF-7 und ZR-75 Brustkrebszellen durch Wirkung auf Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen (S. Liu *et al.*, 2016).

Kombinierend dazu, zeigten Studien zu dem Simvastatin verwandten Lovastatin, dass es eine strahlenprotektive Wirkung von Lovastatin durch Zyto- und Genoprotektivität auf intaktes Gewebe zu geben scheint. Dies wurde für Fibroblasten in der Lunge und für Keratinozyten untersucht. Es scheint eine Wirkung auf den Rho-Signalweg und Caspasekaskaden zu geben sowie eine beschleunigte Beseitigung von Doppelstrangbrüchen (Ziegler *et al.*, 2016; Ziegler *et al.*, 2017).

### 1.5.1 Simvastatin

Simvastatin, aus der Wirkstoffklasse der Statine, greift als Medikament in die Biosynthese des Cholesterins ein, indem es das für die Synthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase ( $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase) kompetitiv hemmt. Dadurch wird die Bildung von Cholesterin vermindert.

Die  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase reduziert HMG-CoA zu Mevalonat. Alle Statine besitzen eine dem HMG-ähnliche Struktur. Lovastatin und der aus ihm synthetisch hergestellte Abkömmling Simvastatin gehören zu den lipophilen Statinen und werden in den Hepatozyten von einer inaktiven in eine aktive Form umgewandelt. Die aktive Form überlagert durch ihre HMG-Struktur analogie die Bindungsstelle an der HMG-CoA-Reduktase und hemmt sie letztendlich (Aktories *et al.*, 2013).

Die gehemmte Cholesterinbiosynthese führt zu einer verminderten intrazellulären Cholesterinkonzentration. Daraufhin wird kompensatorisch, mittels gesteigerter Expression zellulärer Lipoprotein niedriger Dichte (LDL-) Rezeptoren, LDL-Cholesterin aus dem Blutplasma in die Zelle aufgenommen. Dies führt zu einer dosisabhängigen Senkung des Gesamt-, und LDL-Cholesterinwertes im Blutplasma und ist letztendlich gewünschter therapeutischer Effekt, der als „Cholesterinsenker“ bezeichneten Statine (Aktories *et al.*, 2013).

---

## 1.6 Zielstellung

---

Die Optimierung der multimodalen Behandlungskonzepte der Mammakarzinomerkrankung bleibt auch weiterhin eine große Herausforderung für die moderne Medizin. Die Motivation der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zu dem umfassenden Therapiekonzept dieser weiterhin durch hohe Inzidenz und Mortalität gekennzeichneten Krankheit zu leisten.

Ist es in Zukunft möglich Simvastatin als Radiomodulator, insbesondere Radiosensitizer und (neo-)adjuvantes Medikament, in die Behandlung des Mammakarzinoms zu integrieren? Aufbauend auf der dargelegten, vielversprechenden Datenlage zur Wirksamkeit der Statine auf Tumorzellen und Zellen des gesunden Gewebes, sollte in einer experimentellen Untersuchung gezeigt werden, ob Simvastatin als ein Vertreter dieser Medikamentengruppe das Potential besitzt, die Brustkrebszelllinie MCF-7 für die Strahlenbehandlung zu sensibilisieren. Dem gegenüberstehend sollte geprüft werden, ob Simvastatin auf nicht entartete Brustgewebszellen unter der Strahlentherapie schützend, also strahlenprotektiv, wirkt. Hierfür wurde die Normalgewebszelllinie MCF-10A untersucht.

Mithilfe von Wachstumskurven sollte für die gewählten Zellen zunächst dargestellt werden, ob Simvastatin in unterschiedlichen Konzentrationen unabhängig von einer Bestrahlung ein zytotoxisches Potential aufweist. Um radiomodulierende Effekte des Simvastatins auf die MCF-7- und MCF-10A-Zellen nachzuweisen, war es geplant, zum einen ein Zytotoxizitätsassay durchzuführen, zum anderen das klonogene Überleben der Zellen zu untersuchen. Daran sollte sich die Überprüfung des Einflusses von Simvastatin auf die zellulären Reparaturvorgängen mithilfe des  $\gamma$ H2AX-Tests sowie eine Analyse des Zellzyklus der malignen und nichtmalignen Brustzellen anschließen.

## 2. Material & Methoden

Die experimentelle Arbeit wurde im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie in Rostock durchgeführt.

### 2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

#### 2.1.1 MCF-7-Zellen

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde mit der Tumorzelllinie MCF-7 gearbeitet (s. Abb. 2). Die Zellen stammten von der American Type Culture Collection (ATCC: Firma LGC-Standards Teddington, UK). Die Zelllinie MCF-7 wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau isoliert. Der Pleuraerguss trat nach einer Mastektomie und Lymphknotenentfernung in Folge eines malignen Adenokarzinoms der Mamma und mehrjähriger Radio- und Hormontherapie auf. Aus einem Gerinnsel des punktierten Pleuraergusses wurden Tumorzellen mit charakteristischen Eigenschaften von differenziertem Mammaepithel extrahiert. Neben zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren besitzen die MCF-7 Zellen die Eigenschaft der Dombildung. Voraussetzung für die Dombildung ist ein konfluentes Wachstum (Soule *et al.*, 1973). Das Akronym MCF-7 leitet sich von der Michigan Cancer Foundation, einem Institut in Detroit, ab, welches diese Zelllinie etabliert hat.

Die Populationsverdopplungszeit wird in der Literatur mit circa 24 Stunden angegeben (Sutherland *et al.*, 1983).

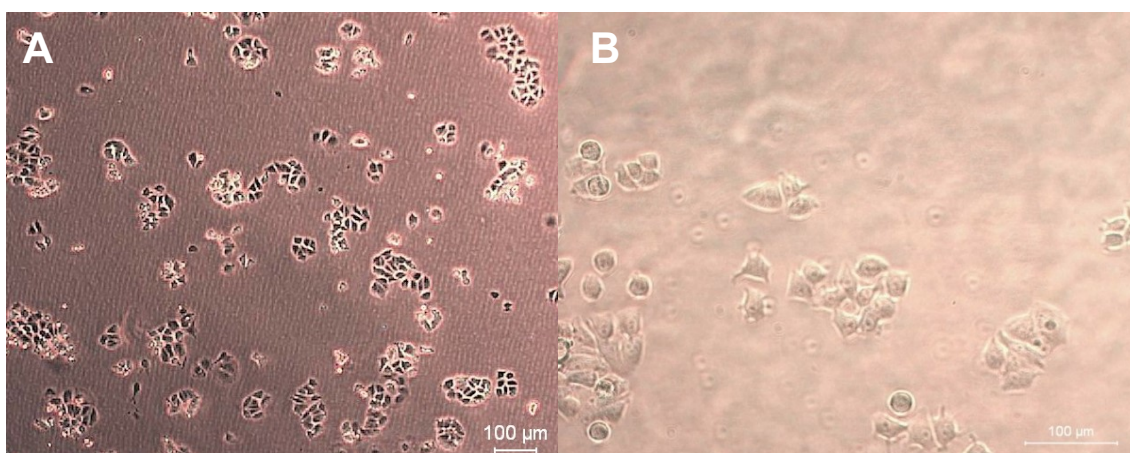


Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung der MCF-7 Zellen bei einer (A) 40-fachen Vergrößerung und (B) 200-fachen Vergrößerung.

### 2.1.2 MCF-10A-Zellen

Neben den Tumorzellen wurden in der vorliegenden Arbeit Epithelzellen der humanen Brust, die nicht tumorigene MCF-10A Zelllinie, verwendet (s. Abb. 3). Auch die Zelllinie MCF-10A wurde nach dem Ort ihrer Etablierung benannt, der Michigan Cancer Foundation in Detroit. Sie wurde aus dem mastektomierten Gewebe einer prämenopausalen, 39-jährigen, kaukasischen Frau gewonnen und weist die Charakteristika von normalem Brustepithel auf. Die histopathologische Diagnose des entnommenen Gewebes schloss eine maligne Entartung aus. Die Patientin litt an einer fibrozystischen Veränderung in der Brust. Weiterhin bietet sich diese Zelllinie mit nicht-malignem Ursprung durch die Eigenschaft der Immortalität an, um für *in vitro* Versuche benutzt zu werden (Soule *et al.*, 1990).

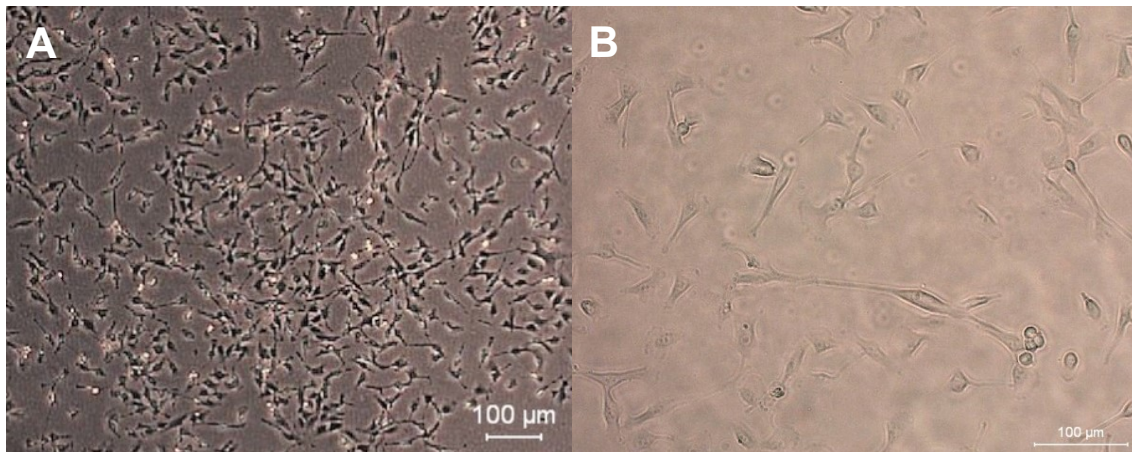


Abbildung 3: Mikroskopische Darstellung der MCF-10A Zellen bei einer (A) 40-fachen Vergrößerung und (B) 200-fachen Vergrößerung.

### 2.1.3 Zellkultivierung

Die untersuchten Zelllinien MCF-7 und MCF-10A, wurden in Zellkulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Einsaatdichte betrug für MCF-7-Zellen je nach Dauer bis zur nächsten Passage 2 – 3,5 x 10<sup>5</sup> Zellen. MCF-10A-Zellen, mit deutlich schnellerem Wachstumsverhalten als die MCF-7-Zellen, wurden mit 0,5 – 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Zellkulturflasche inkubiert. Ein konfluentes Wachstum wurde bei beiden Zelllinien zu jeder Zeit vermieden. Die Subkultivierung erfolgte stets bei einer maximalen Wachstumsdichte von ca. 80 % der den Zellen als Substrat zur Verfügung stehenden Wachstumsfläche. Damit wurden Veränderungen der Wachstumskinetik durch Kontakthemmung sowie Dombildung der Zellen vermieden.

MCF-7-Zellen wurden mit 12 ml Dulbecco's modified Eagle's-Medium (DMEM), welches Fetales bovines Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin und 4,5 g/l Glucose enthielt, kultiviert. MCF-10A-Zellen wurden mit 12 ml DMEM/F12, mit Pferdeserum, endothelialelem Wachstumsfaktor (EGF), Hydrocortison, Cholera-toxin, Insulin und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, damit sie nicht konfluieren.

Vor der Passagierung wurden alle verwendeten Lösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. In einem ersten Arbeitsschritt wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen vorsichtig durch Abgießen verworfen und der Zellrasen mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nun folgte die Addition von 3 ml 0,05 %igem Trypsin mit 0,02 % Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA). Trypsin ist eine Serinprotease, die die Spaltung von Proteinen und Peptiden katalysiert und damit die adhärenen Zellen von der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche ablöst. EDTA als Komplexbildner bindet zweiwertige Ionen, und destabilisiert damit zusätzlich zellbindende Membranproteine (Schmitz, 2011). Die Trypsininkubation der MCF-7-Zellen erfolgte für fünf Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> und die der MCF-10A-Zellen für zehn Minuten. Nach optischer Kontrolle der erfolgreichen Ablösung des Zellrasens von der Wachstumsfläche, wurde die Aktivität der Protease, unter Hinzugabe von 7 ml des jeweiligen serumhaltigen Mediums, abgestoppt. Die sich nun in Lösung befindenden Zellen wurden mithilfe einer Pipette abgesaugt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine fünf minütige Zentrifugation bei 250 x g. Der Überstand, bestehend aus Medium und Trypsinlösung, wurde vorsichtig abgegossen und verworfen. Das Zell-Pellet verblieb dabei am Boden des Falcon-Röhrchens. Nun wurden die Zellen in 10 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert und durch auf- und ab Pipettieren wieder vereinzelt und in Lösung gebracht. Anschließend wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Die sich in der Zellsuspension befindlichen Zellen wurden durch mehrfaches Schwenken abermals gleichmäßig in der Lösung verteilt. Danach wurden mittels einer Pipette 200 µl Zellsuspension entnommen und mit 9,8 ml Elektrolytlösung in ein Probengefäß zur Zellzahlbestimmung überführt. Durch den Coulter Counter wurde ein definiertes Volumen der 1:50 verdünnten Zellsuspension aus dem Probengefäß durch eine Messkapillare gesaugt, an der eine Spannung angelegt ist. Jede Zelle, die durch die Messspore tritt, löst durch Widerstandsveränderung ein elektrisches Signal aus (Schmitz, 2011). Mit diesem Prinzip wurde die Zellkonzentration in Zellen pro Milliliter, der zuvor hergestellten Zellsuspension, ermittelt. Eine absolute Zellzahl ergibt sich aus Multiplikation der Zellen / Milliliter mit dem Volumen der Zellsuspension in Milliliter.

---

## 2.2 Simvastatin

---

Das verwendete Simvastatin wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH geliefert und lag in Pulverform vor. Es wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und eine 2 mM Stammlösung hergestellt. Diese wurde aliquotiert und bis zur experimentellen Verwendung bei -20°C im Kühlschrank gelagert.

---

## 2.3 Bestrahlung durch Linearbeschleuniger

---

Zur Bestrahlung der Zellen wurden Linearbeschleuniger vom Typ VersaHD (Elekta AB, Stockholm, Schweden) sowie Siemens Oncor Expression (Siemens AG, Erlangen) verwendet.

Die Linearbeschleuniger bestehen neben Spannungs- und Stromversorgungen auch aus den Kontrollelementen sowie einem feststehenden Teil („stand“) und einem beweglichen Teil („gantry“). In einem Linearbeschleuniger werden Elektronen durch ein hochfrequentes, elektrisches Feld in einer Röhre stark beschleunigt. Am Ende dieser Röhre treten die Elektronen aus und werden durch ein Magnetfeld umgelenkt und auf eine Schwermetallanode als Bremsstrahltarget geschossen. Dies erzeugt ultraharte Röntgenstrahlung. Durch Lamellen aus Blei, einem sogenannten Kollimator, lässt sich das Strahlenfeld individuell anpassen. (Wannenmacher *et al.*, 2006)

Die Zellkulturen wurden, abhängig von dem jeweiligen Versuchsaufbau, entweder in Wellplatten (Wachstumskurven, LDH-Aktivitätsmessung), T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen (Koloniebildungstest), T<sub>75</sub>-Zellkulturflaschen (Zellzyklusanalyse) oder Vierkammerobjektträgern (γH2AX-Assay) auf einer Plexiglasscheibe, die sich auf dem Stand des Linearbeschleuniger befand, der Strahlendosis von 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy ausgesetzt. Die Strahlendosis wurde über die Dauer der Bestrahlungseinheit reguliert. Die Dosisleistung betrug 3,75 Gy/min. Als Kontrollen wurden jeweils scheinbestrahlte Proben mitgeführt.

## 2.4 Versuche

### 2.4.1 Wachstumskurve

Wachstumskurven dienen der Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Zellpopulationen unter verschiedenen Bedingungen. Um die Wachstumskinetik der Zellen beurteilen zu können, wurden in dem vorliegenden Versuch Zellen in wirkstofffreiem Nährmedium als Kontrolle sowie unter Zugabe von vorher definierten Wirkstoffkonzentrationen kultiviert und ihr Wachstum anschließend miteinander verglichen. Die alle 24 Stunden durchgeführten Messungen der absoluten Zellzahl in den jeweiligen Ansätzen erlaubt die Darstellung und Beurteilung im Verlauf über mehrere Tage bis zum Ende des Versuchsaufbaus (s. Abb.4).

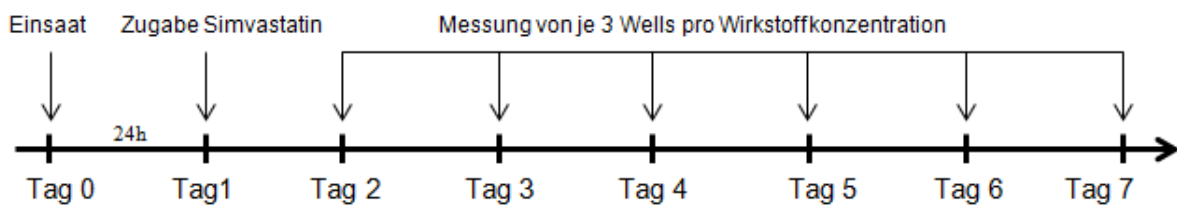


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau zur Ermittlung der Wachstumskurven.

Nach Anfertigung einer Zellsuspension, wie zuvor in Kapitel 2.1.3 beschrieben, wurden in die Wells je  $1 \times 10^4$  Zellen in ein Volumen von 1 ml Nährmedium gegeben. Die Ermittlung der hierfür benötigten Menge Zellsuspension wird in Formel 1 erläutert.

$$a \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} : b \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} * 1 \text{ ml} = \underline{\underline{c \mu\text{l} \text{ Zellsuspension}}}$$

a = gewünschte Zellzahl

b = gemessene Zellzahl der Zellsuspension

c = zu pipettierendes Volumen

Formel 1: Rechnung zur Ermittlung des Zellsuspensionsvolumens für die Einsaat der Wachstumskurve.

In jedes Well wurde Medium abzüglich des zu pipettierenden Volumens vorgelegt. Anschließend wurde das errechnete Zellsuspensionsvolumen hinzugegeben. Währenddessen wurde eine gleichmäßige Verteilung, der sich in Lösung befindenden Zellen, durch das wiederholte Invertieren der Zellsuspension, gewährleistet. Danach wurden die Platten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über 24 Stunden in einem Brutschrank inkubiert.

An Tag 1, s. Abb. 4, erfolgte die Addition des Wirkstoffes Simvastatin. Zunächst wurden dafür Verdünnungsreihen aus der Stammlösung angesetzt (s. Tab. 1). Da das zu verdünnende Simvastatin in DMSO gelöst vorlag, wurde in diesem, so wie in allen folgenden Versuchen,

eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Sie entsprach der maximalen DMSO-Konzentration in der höchsten verwendeten Simvastatinkonzentration. So ließ sich eine eventuelle Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch das Lösungsmittel DMSO darstellen.

Tabelle 1: Verdünnungsreihe der Wirkstoffe zur Ermittlung der Wachstumskurven.

Lösung	Konzentration	Herstellung
Simvastatin-Stammlösung	2 mM	8,37 mg in 10 ml DMSO
Verdünnungslösung ①	200 µM	50 µl Simvastatin-Stammlösung + 450 µl Medium
Verdünnungslösung ②	20 µM	10 µl Verdünnungslösung ① + 90 µl Medium
DMSO	10 %	40 µl DMSO-Lösung + 360 µl Medium

Um die zu untersuchenden Simvastatin- und DMSO-Konzentrationen in jedem Well zu erreichen, wurden folgende Volumina nach oben erläuterten Prinzip zum Medium hinzugefügt:

Tabelle 2: Pipettierschema der verschiedenen Simvastatinkonzentrationen, um die gewünschten Endkonzentrationen in einem Milliliter pro Well zu erreichen.

Endkonzentration im Ansatz	Pipettierschema
0 µM-Kontrolle	Keine Wirkstoffzugabe
DMSO-Kontrolle	15 µl DMSO (10 %)
3 µM	15 µl Verdünnungslösung ① (200 µM)
1 µM	5 µl Verdünnungslösung ① (200 µM)
0,5 µM	2,5 µl Verdünnungslösung ① (200 µM)
0,1 µM	0,5 µl Verdünnungslösung ① (200 µM)
0,05 µM	2,5 µl Verdünnungslösung ② (20 µM)

24 Stunden nach der Einsaat erfolgte, vor der Zugabe von Simvastatin, eine Messung der Zellzahl, welche den Ausgangspunkt der Wachstumskurven bildete.

Eine Probengewinnung wurde folgendermaßen vorgenommen: Zunächst wurde das alte Nährmedium mithilfe einer Pipette vorsichtig aus dem Well abgesaugt und verworfen. Nun

wurde in jedes Well 300 µl 0,25 %iges Trypsin + EDTA gegeben und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. MCF-7- Zellen benötigten ca. 5 Minuten, MCF-10A- Zellen etwa 10 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank, bis sich die Zellen vom Boden des Wells gelöst hatten. Im Anschluss wurden die Zellen in der Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weiter vereinzelt und noch am Wellboden anhaftende Zellen mechanisch vom Grund gelöst. Zum Schluss wurden 200 µl Trypsin-Zellsuspensionsgemisch in ein Messgefäß mit 9,8 ml Elektrolytlösung überführt und am Coulter Counter die Zellzahl gemessen.

### 2.4.2 Koloniebildungstest

Mithilfe des Koloniebildungstests wird das klonogene Überleben einer Zellpopulation ermittelt. Von klonogenem Zellüberleben wird in diesem Zusammenhang gesprochen, wenn eine Zelle, die ihre Zellteilungsfähigkeit nicht verloren hat, in der Lage ist, eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden. Dieses Testverfahren zur Analyse des Koloniebildungsverhaltens kann hinreichend genutzt werden, um die Auswirkungen von Noxen auf das Überleben einer Zellpopulation zu untersuchen (Puck & Marcus, 1956). Dieser Test gilt auch heute noch als „Goldstandard“ in der Zellkultur (Schmitz, 2011) zur Bestimmung der Abtötungseffizienz von beispielsweise Substanzen und den Einfluss von Strahlung.

Für diesen Versuch wurden  $1 \times 10^3$  MCF-7- bzw. MCF-10A-Zellen in Zellkulturflaschen mit je 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche und 5 ml des jeweiligen Mediums transferiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Wachstumsfläche zu erreichen, wurden die Flaschen nach dem Pipettieren stets der Form einer Acht folgend, ungefähr eine Minute, auf der Arbeitsfläche bewegt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach folgte die Wirkstoffzugabe nach dem in den Tabellen 3 und 4 dargestellten Schemata.

Es wurden zunächst Verdünnungslösungen aus der Simvastatin- und DMSO- Stammlösung hergestellt:

Tabelle 3: Verdünnungsreihe der Wirkstoffe für den Koloniebildungstest. VL = Verdünnungslösung.

Verdünnungslösung ① (200 µM)	250 µl Simvastatin 2 mM + 2250 µl Medium
Verdünnungslösung ② (20 µM)	15 µl VL ① + 135 µl Medium
DMSO-Lösung	100 µl DMSO (10 %) + 900 µl Medium

Für den Koloniebildungstest wurden die Wirkstoffkonzentrationen 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  gewählt. Zudem wurden eine Kontrolle ohne Simvastatin und eine DMSO-Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 4: Pipettierschema der verschiedenen Simvastatinkonzentrationen, um die gewünschten Endkonzentrationen in 5 mL Volumen zu erreichen. VL = Verdünnungslösung.

Endkonzentration im Ansatz	Pipettierschema
0 $\mu\text{M}$ - Kontrolle	Keine Zugabe von Simvastatin
DMSO-Kontrolle	75 $\mu\text{l}$ DMSO-Lösung (10 %)
0,05 $\mu\text{M}$ Simvastatin	12,5 $\mu\text{l}$ VL $\text{\textcircled{2}}$ (20 $\mu\text{M}$ )
0,1 $\mu\text{M}$ Simvastatin	2,5 $\mu\text{l}$ VL $\text{\textcircled{1}}$ (200 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{M}$ Simvastatin	12,5 $\mu\text{l}$ VL $\text{\textcircled{1}}$ (200 $\mu\text{M}$ )
1 $\mu\text{M}$ Simvastatin	25 $\mu\text{l}$ VL $\text{\textcircled{1}}$ (200 $\mu\text{M}$ )
3 $\mu\text{M}$ Simvastatin	75 $\mu\text{l}$ VL $\text{\textcircled{1}}$ (200 $\mu\text{M}$ )

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 0,5; 2; 4 und 6 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt (s. Abb. 5). Unbestrahlte Proben wurden als Kontrollen mitgeführt. Alle Ansätze in ihrer jeweiligen Konzentration und Bestrahlungsdosis erfolgten als Duplikate.

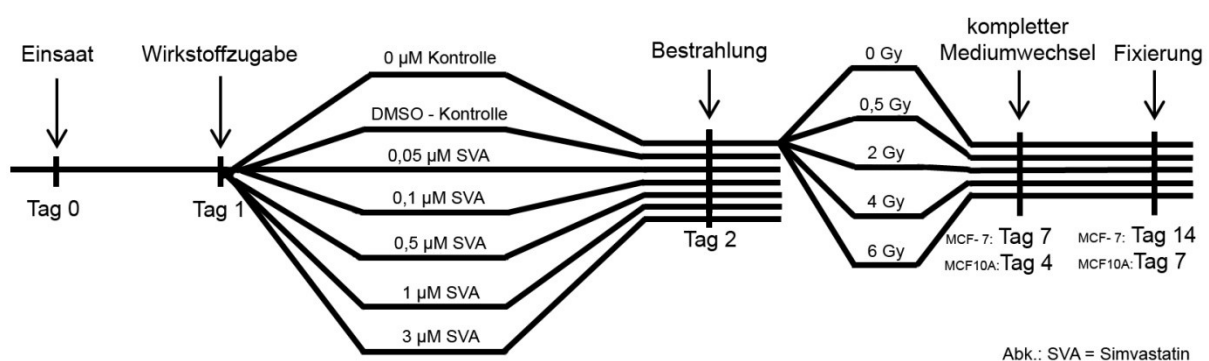


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Koloniebildungstests. Die Zeitpunkte für die Bestrahlung, den Mediumwechsel und die Fixierung waren für alle Ansätze identisch.

Die Dauer des Versuches wurde für beide Zellen angepasst, da sie auf der einen Seite ausreichend Zeit brauchten um mindestens sechs Mitosen durchführen zu können, damit die Kolonien, der noch teilungsfähigen Zellen, aus mindestens 50 Zellen bestand. Dies ist die

Voraussetzung für eine im Koloniebildungstest zählbare Kolonie (Schmitz, 2011). Auf der anderen Seite galt es zu beachten, dass die Kolonien nicht zu groß werden, da sich sonst ihre Wachstumsflächen überlagern und sie bei der optischen Auszählung nur noch sehr mühsam voneinander abgrenzbar gewesen wären. Um die adhärennten Zellen an der Wachstumsfläche nicht abzulösen, wurde das alte Medium für den Mediumwechsel vorsichtig über Kopf abgegossen. Die neuen-, vorher im Wasserbad erwärmten, 5 ml Medium wurden ebenfalls durch vorsichtiges Pipettieren an der zellfreien Oberfläche, hinzugegeben. Danach wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu ihrer Fixierung inkubiert.

Für die Fixierung der Zellen wurde zunächst das Medium verworfen. Danach wurden die Zellen 20 Minuten in 70 %igem Ethanol fixiert. Die Färbung erfolgte fünf bis zehn Minuten mit einer 1 %igen Kristallviolett-Lösung. Das überschüssige Kristallviolett wurde nach der Färbung mit Leitungswasser abgespült und die fixierten und gefärbten Zellen getrocknet. Die Auszählung der Kolonien erfolgte für die MCF-10A-Zellen am Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Die besser voneinander abzugrenzenden Kolonien der MCF-7-Zellen wurden über einer Lichtplatte ausgezählt.

### 2.4.3 LDH-Zytotoxizitätsassay

Die Ermittlung der Zytotoxizität in Folge des Einflusses von Simvastatin sowie der Einwirkung ionisierender Strahlung auf die Zellen, erfolgte über die indirekte Darstellung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität, mithilfe von gekoppelten enzymatischen Reaktionen und anschließender Photometrie.

Die LDH ist Bestandteil der Milchsäuregärung und katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, um reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) als Cofaktor für die anaerobe Glukosegewinnung zu regenerieren. Sie befindet sich in jedem Gewebe aller Lebewesen und liegt bei vitalen Zellen obligat intrazellulär vor (Schmitz, 2011). In Folge einer Zellschädigung kommt es zum Stabilitätsverlust der Zellplasmamembran. Sie wird für große Moleküle, wie zum Beispiel der LDH, durchlässig. Die in das Kulturmedium freigesetzte LDH kann nun über gekoppelte enzymatische Reaktionen bestimmt werden und steht im Verhältnis zur Zytotoxizität.

Zunächst wurde in Vorversuchen die für die Versuchsdauer optimale Zellzahl für beide Zelllinien ermittelt, um ein konfluentes Wachstum der Zellen im Verlauf des Versuchs zu vermeiden.

Nach Herstellung einer Zellsuspension, wie in 2.1.3 beschrieben, wurden pro Well  $2 \times 10^3$  MCF-10A-Zellen, beziehungsweise  $7,5 \times 10^3$  MCF-7-Zellen in 90 µl Medium ausgesät. Nach

24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde in jedes Well 10 µl verdünnte Simvastatinstammlösung, wie in Tabelle 5 dargestellt, pipettiert, um die gewünschten Endkonzentrationen von 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM, 0,05 µM Simvastatin zu erreichen.

Tabelle 5: Übersicht über das Verdünnungsschema des LDH-Zytotoxizitätstests um die gewünschten Endkonzentrationen in 100 µL Volumen zu erreichen; SVA = Simvastatin.

Endkonzentration SVA in 100 µl	Verdünnung der 2 mM SVA-Stammlösung
1 µM	1:200 = 10 µM
0,5 µM	1:400 = 5 µM
0,1 µM	1:2.000 = 1 µM
0,05 µM	1:4.000 = 0,5 µM

Zudem erfolgte die Aussaat (s. Tab. 6) von einer wirkstofffreien-, einer DMSO-, maximalen LDH-, Medium- und Serumkontrolle. Für beide Zelllinien wurden pro Versuchsansatz Triplikate angefertigt.

Tabelle 6: Übersicht über die eingesäten Kontrolllösungen des LDH-Zytotoxizitätsassays.

Bezeichnung	Im Ansatz enthalten
Kontrolle	Zellen + Medium, kein Wirkstoff
DMSO-Kontrolle	Zellen + Medium, mit 10 µM DMSO
Maximalkontrolle	Zellen, Medium, zur Messung Lyse mit TritonX
Mediumkontrolle	Keine Zellen, nur jeweiliges Medium
Serumkontrolle	Keine Zellen, Medium ohne Serum

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte, mit Ausnahme der unbestrahlten Kontrolle, die Bestrahlung am Linearbeschleuniger mit den Dosen von 0,5 Gy; 2 Gy; 4 Gy und 6 Gy.

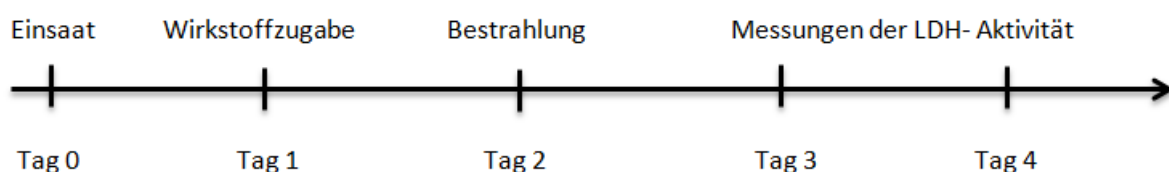


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus LDH-Zytotoxizitätstests.

Sämtliche Substanzen und Lösungen zur Messung der Zytotoxizität mittels LDH-Test waren in dem von der Firma Thermo Scientific verwendeten Test-Kit enthalten und wurden gemäß den Angaben des Herstellers genutzt.

Die Messungen erfolgten 24 Stunden und 48 Stunden nach der Bestrahlung. Dafür wurde zunächst der Maximalkontrolle eine Positivkontrolllösung hinzugefügt und 45 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde allen Proben eine Reagenzmixlösung hinzugefügt. Diese schaffte ein Überangebot an Laktat, welches, durch das sich nun extrazytosolisch befindende LDH, zu Pyruvat umgewandelt wurde. Dabei wird NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert, welches im zweiten Schritt benötigt wird, um das in der Reagenzmixlösung enthaltene farblose Tetrazoliumchlorid zu dem rotgefärbten Formazan umzuwandeln (s. Abb. 7). Dies kann photometrisch bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 680 nm bestimmt werden. Der gemessene Farbstoff des Formazans ist direkt proportional zur freigegebenen Menge an LDH, welche wiederum ein Indikator für die Zytotoxizität darstellt.

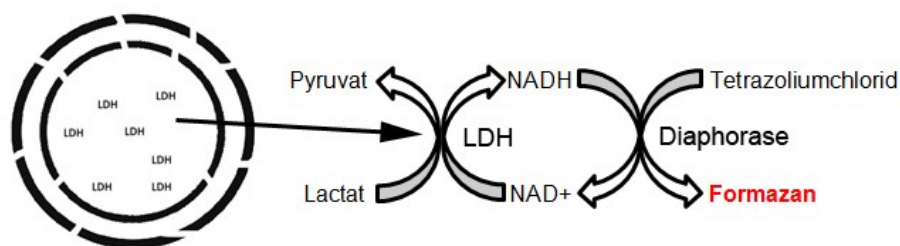


Abbildung 7: Schematische Darstellung der gekoppelten enzymatischen Vorgänge zur Bestimmung der LDH-Aktivität.

#### 2.4.4 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

Der  $\gamma$ H2AX-Test bietet eine Möglichkeit Doppelstrangbrüche in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Zellen zu detektieren und zu quantifizieren.

Nicht nur chemische Wirkstoffe, auch beispielsweise ionisierende Strahlen, verursachen in Zellen exogene DNA-Schäden, welche zum Zelltod führen können. Diese Kausalität wird unter anderem genutzt, um malignes, entartetes Gewebe zu behandeln. Eine Methode, um DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung *In vitro* zu bestimmen, ist die Darstellung der DNA-Doppelstrangbrüche.

Die DNA-Doppelstrangbrüche werden stets von der Phosphorylierung eines bestimmten Histons, dem Histon H2AX, begleitet. Das H2AX-Histon ist ein Abkömmling der H2A Proteinfamilie und ist damit Teil des Histonoktamers in den Nukleosomen, die die kleinste Verpackungseinheit von Chromosomen darstellen. Histone sind unter anderem für die Organisati-

on des eukaryotischen Genoms zuständig. Die DNA mit ihren negativ geladenen Phosphatresten wickelt sich in charakteristischer Weise, je nach Kondensationsgrad, um die positiv geladenen Histonoktamere und kann somit die DNA zum einen für die Zellteilung stark verdichten und zum anderen für die Proteinbiosynthese auflockern (Horn, 2005).

Zusätzlich zu dieser Funktion wird in Gegenwart einer DNA-Schädigung in direkter räumlicher Beziehung zum Schaden ein Serin-Rest am H2AX-Histon durch eine Kinase phosphoryliert. Das entstandene, phosphorylierte  $\gamma$ H2AX-Histon ist maßgeblich an der Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen und Lokalisierung von Doppelstrangschäden beteiligt (Rogakou *et al.*, 1998). Es fungiert in diesem Test nach Darstellung durch Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörpern, als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und kann somit zur Quantifizierung dieser genutzt werden.

Nach der Herstellung einer Zellsuspension, wie unter 2.1.3 beschrieben, wurden in 1 ml des jeweiligen Nährmediums  $5 \times 10^4$  MCF-7-, beziehungsweise  $2,5 \times 10^4$  MCF-10A-Zellen, in jede Wachstumskammer einer Vierkammerplatte pipettiert. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M Simvastatin in die Wachstumskammern gegeben sowie eine DMSO-Kontrolle und eine wirkstofffreie Kontrollprobe erstellt. Die pipettierten Volumina können der Tabelle 7 entnommen werden. Die 2 mM Simvastatin- sowie DMSO-Stammlösung wurden vorher 1:100 auf 20 $\mu$ M verdünnt.

Tabelle 7: Pipettierschema des  $\gamma$ H2AX Tests; SVA = Simvastatin.

Konzentration SVA in der Wachstumskammer	Pipettiertes Volumen der 20 $\mu$ M Stammlösung SVA
1 $\mu$ M	50 $\mu$ l
0,5 $\mu$ M	25 $\mu$ l
0,1 $\mu$ M	5 $\mu$ l

Alle Ansätze wurden als Duplikat für jede Wirkstoffkonzentration angelegt. Nach 24 Stunden erneuter Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen, mit Ausnahme der unbestrahlten Kontrolle, mit 2 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt.

Ein Teil der Proben wurde 30 Minuten, ein weiterer 24 Stunden nach der Bestrahlung fixiert. Dabei wurde zunächst das Medium verworfen, danach die Zellen mit einer Fixierlösung behandelt und anschließend mit PBS gespült. Daraufhin wurde eine Permeabilisierungslösung auf die Zellen gegeben, um Zellkernmembranproteine aus ihrer Konformation zu lösen und den Zellkern für Antikörper und Färbung zugänglich zu machen. Nach einer Blockierungslö-

sung wurden die Zellen mit einem murinen Antikörper gegen das H2AX-Histon behandelt. Sie wurden in einer befeuchteten Kammer über Nacht im Kühlschrank gelagert. Nach Spülung der überschüssigen Antikörper am nächsten Tag mit PBS, wurden den Proben fluoreszierende Ziegen-Sekundärantikörper gegen den murinen Antikörper hinzugegeben. Nach erfolgter Spülung mit PBS wurde der Objektträger mit ein bis zwei Tropfen 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) eingedeckt, mit einem Deckglas versehen und versiegelt. Die Proben wurden in einer Dunkelkammer im Kühlschrank gelagert und innerhalb von drei Tagen bei 1000-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Pro Probe wurde die Anzahl der fluoreszierenden Punkte (Foci) von 50 Zellen ausgezählt.

#### 2.4.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung des zellulären DNA-Gehaltes nach Permeabilisierung der Zellkernmembran und Färbung der DNA mit Propidiumiodid.

Der Lebenszyklus der Zellen setzt sich aus verschiedenen Phasen zusammen (s. Abb. 8). Übergeordnet sind die Inter-, und Mitosephase. Während der Mitosephase kommt es zur eigentlichen Zell- und Kernteilung sowie der damit zusammenhängenden Chromosomenverdoppelung. Die Interphase bezeichnet die Phase zwischen zwei Zellteilungen und wird in die Lückenphase (Gap-Phase, bzw.  $G_1$ -,  $G_0$ -,  $G_2$ -Phase) und Synthesephase (S-Phase) gegliedert. Charakteristisch für die einzelnen Abschnitte der Interphase ist, neben den verschiedenen Vorgängen zur Vor- und Nachbereitung der Zellteilung während der Mitosephase, ein unterschiedlicher Gehalt an DNA. Dieses Merkmal wird für die Zellzyklusanalyse genutzt. Zellen in der S-Phase haben mehr DNA als in der postmitotischen  $G_1$ -Phase. In der  $G_2$ -Phase ist am meisten DNA-Material vorhanden.

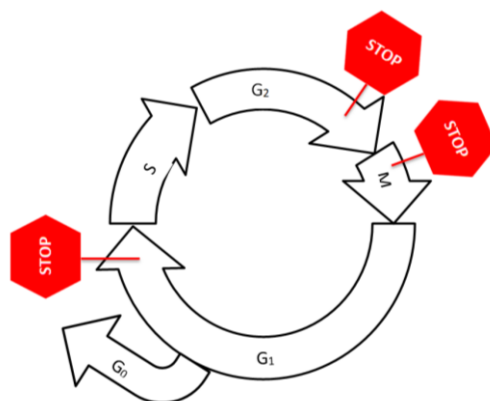


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Lebenszyklus' einer Zelle. M: Mitose-Phase, S: Synthese-Phase,  $G_0$ -,  $G_1$ -,  $G_2$ : Gap-phase.

Der Mitose schließt sich die G<sub>1</sub>-Phase an. Sie ist geprägt vom Zellwachstum, der Bildung fehlender Kompartimente und die Proteinbiosynthese. Um in die nächste Phase überzugehen, durchlaufen die Zellen am Ende dieser Phase einen sogenannten Checkpoint, einen Kontrollpunkt. Dieser reguliert den Zellzyklus. Es wird entschieden, ob die Zelle in die nächste Phase, die Synthesephase eintritt, oder in die G<sub>0</sub>-Phase übergeht. Oft ist der Übergang reversibel, manche Zellen können sehr lange in dieser Phase verharren. Dauerhaft differenzierte Zellen, wie zum Beispiel Nervenzellen, verbleiben für immer in der G<sub>0</sub>-Phase. Die G<sub>0</sub>-Phase wird auch als Ruhephase bezeichnet. Häufig sind Kontakthemmung, DNA-Schäden oder unzureichendes Nährstoffangebot Gründe für einen sogenannten Zellzyklusarrest. Unbeschädigte und unbeeinträchtigte Zellen treten in die, der G<sub>1</sub>-Phase folgende, S-Phase ein. In dieser findet die Replikation der DNA statt. In der prämitotischen G<sub>2</sub>-Phase bereiten sich die Zellen auf die nahende Zellteilung vor. Auch hier existiert ein Checkpoint, an dem festgestellt wird, ob die Zelle bereits teilungsfähig ist. Bei Abweichungen kann es auch hier zum Zellzyklusarrest kommen (Schmitz, 2011).

Es wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die optimale Einsaatdichte zu ermitteln. Da für die Durchflusszytometrie eine sehr große Zellmenge nötig war und konfluierendes Wachstum vermieden werden sollte, mussten die Aussaatdichten an die unterschiedliche Dauer der Messpunkte angepasst werden. Für die Proben 24 Stunden nach Bestrahlung wurden  $7,5 \times 10^4$  MCF-10A- und  $3,75 \times 10^5$  MCF-7-Zellen ausgesät. Für die Proben 72 Stunden nach Bestrahlung wurden  $1,5 \times 10^5$  MCF-10A- und  $5 \times 10^5$  MCF-7-Zellen in die Zellkulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche pipettiert. Es wurde stets in 10 ml des jeweiligen Mediums in die Zellkulturflaschen pipettiert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und durch serumfreies Medium ersetzt. Durch diesen Nährstoffentzug gelang eine Synchronisation der Zellzyklen. Die Zellen verharren durch Unpassierbarkeit des ersten Checkpoints in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit wurde das serumfreie Medium verworfen und wieder Medium mit Serum hinzugegeben. Den synchronisierten Zellen wurden, die in der Tabelle zu entnehmenden Mengen, Simvastatinlösungen hinzugegeben. Es wurden die bisher in den anderen Versuchen verwendeten Konzentrationen von 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM gewählt.

Die 2 mM Simvastatinstammlösung wurde für die Verdünnungslösung 1 (VL1) im Verhältnis von 1:10, die Verdünnungslösung 2 (VL 2) im Verhältnis von 1:100 verdünnt und nach dem in der Tabelle 8 durchgeführten Pipettierschema hinzugefügt. Die 2 mM DMSO- Stammlösung wurde 1:10 verdünnt. Es wurden davon jeweils 50 µl den DMSO- Kontrollen hinzugegeben.

Tabelle 8: Pipettierschema Zellzyklusanalyse

Endkonzentration in Probe	Pipettierte Menge pro Probe
1 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{l}$ Verdünnungslösung 1
0,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{l}$ Verdünnungslösung 1
0,1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{l}$ Verdünnungslösung 1
0,05 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{l}$ Verdünnungslösung 2

24 Stunden nach der Wirkstoffzugabe wurden die Proben, abgesehen von einer unbestrahlten Kontrolle, bei 2 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt.

Die Fixierung und Präparation der Zellen wurde zum einen 24 Stunden-, zum anderen 72 Stunden nach der Bestrahlung vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, zwei Mal mit PBS gespült, in Medium resuspendiert, nochmals mit 250 x g, 5 min bei 4°C abzentrifugiert und in 200  $\mu\text{l}$  PBS gelöst. Dies wurde zu 2 ml Ethanol (70 %ig) gegeben. So wurden die fixierten Zellen bei -20°C gelagert. Nach erneuter Spülung mit PBS wurden die Zellen mit gelöster Ribonuklease permeabilisiert. Nach dem Abzentrifugieren mit 250 g, 5 min bei 4°C wurden die permeabilisierten Zellen mit einer Propidiumiodid (PI)-Lösung über Nacht im Kühlschrank gefärbt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Abzentrifugation der überschüssigen PI-Lösung in einer mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) gepufferten Salzlösung (HBS) resuspendiert und am Durchflusszytometer bei einer Anregung von 488 nm mit einer Emission von 575 – 620 nm gemessen.

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem die Zellen in hoher Geschwindigkeit an einem Lichtstrahl vorbeifließen. Die Art der Lichtstreuung gibt in diesem Fall Aufschluss über die Menge an mit PI markierter DNA innerhalb der Zellen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software von der Firma Beckman Coulter Inc.

## 2.5 Verwendete Materialien

---

### Geräte

---

CO <sub>2</sub> – Inkubator CB 160	Binder, Tuttlingen
SAutoflow Water Jacketed CO <sub>2</sub> Incubator	NuAIRE, , Plymouth, USA
4er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)	Nikon, Düsseldorf
10er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)	Nikon, Düsseldorf
100er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)	Nikon, Düsseldorf
Kappa ImageBase Metreo	Opto-electronics GmbH, Gleichen
Sterilbank HeraSafe KSP	ThermoFisher, Hennigsdorf
Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Laborzentrifuge, Hettich Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Variomag, Electronicrührer Monotherm	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Autoclave- Steam Sterilizer, 2540EL N	Tuttnauer, Heidolph, Schwabach, Germany
Autoklav T6	Heraeus Instruments, Hanau
Cytometer Cytomics FC 500	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Kaiser Leuchtplatte (prolite basic)	Genius TechnoConsult, München
Microplate reader Anthos Zenyth 340r	Anthos Mikrosysteme, Berlin

### Verbrauchsmaterialien

---

TPP, tissue culture test plates, 24 Well	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Cell Culture Slide, 4well	SPL Life Sciences, Süd- Korea
Zellkulturflaschen Cellstar TC, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen

---

**Chemikalien allgemein**

---

Gepufferte Salzlösung (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 %; 0,25 %/0,02 %	Biochrom GmbH, Berlin
Coulter Isoton-II- Dilution	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 %, vergällt mit Methylethylketon	Walter CMP GmbH, Kiel

---

**Chemikalien Zellzyklusanalyse**

---

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Destilliertes Wasser	Wasseraufbereiter Clear-Plus, Siemens AG, München
Propidiumiodid (PI)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ribonuclease A (RNase)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

---

**Chemikalien Koloniebildungstest**

---

Kristallviolett	Serva, Heidelberg
-----------------	-------------------

---

**Chemikalien  $\gamma$ H2AX**

---

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphatdihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TritonX- 100	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

---

Ziegenserum	PAA Laboratories, Cölbe
Rinderserum Albumin	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, United States
Tween 20	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Primärantikörper MS mAb to gamma H2A.X	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper Alexa fluor 594 Ziege Anti Maus GG	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, United States

### **Testkit**

---

LDH - Zytotoxizitätsassay - Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, United States
---------------------------------	---

### **Zellkulturmedium & Zusätze**

---

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Basel, Schweiz
Fetales Rinder Serum (FBS) superior	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ F12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Insulin, human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pferdeserum	
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich

### **Wirkstoff**

---

Simvastatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
-------------	--

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wachstum der Tumor- und Normalgewebszellen

Mithilfe der Wachstumskurven wurde der Einfluss des Wirkstoffs Simvastatin auf die Wachstumskinetik der MCF-7- und MCF10-A-Zellen, ohne Einfluss von Strahlung, dargestellt (s. Abb. 9 und 10). Es sollten, als Grundlage für die noch folgenden Untersuchungen, Wirkstoffkonzentrationen ermittelt werden, die das Wachstumsverhalten nicht signifikant verändern.

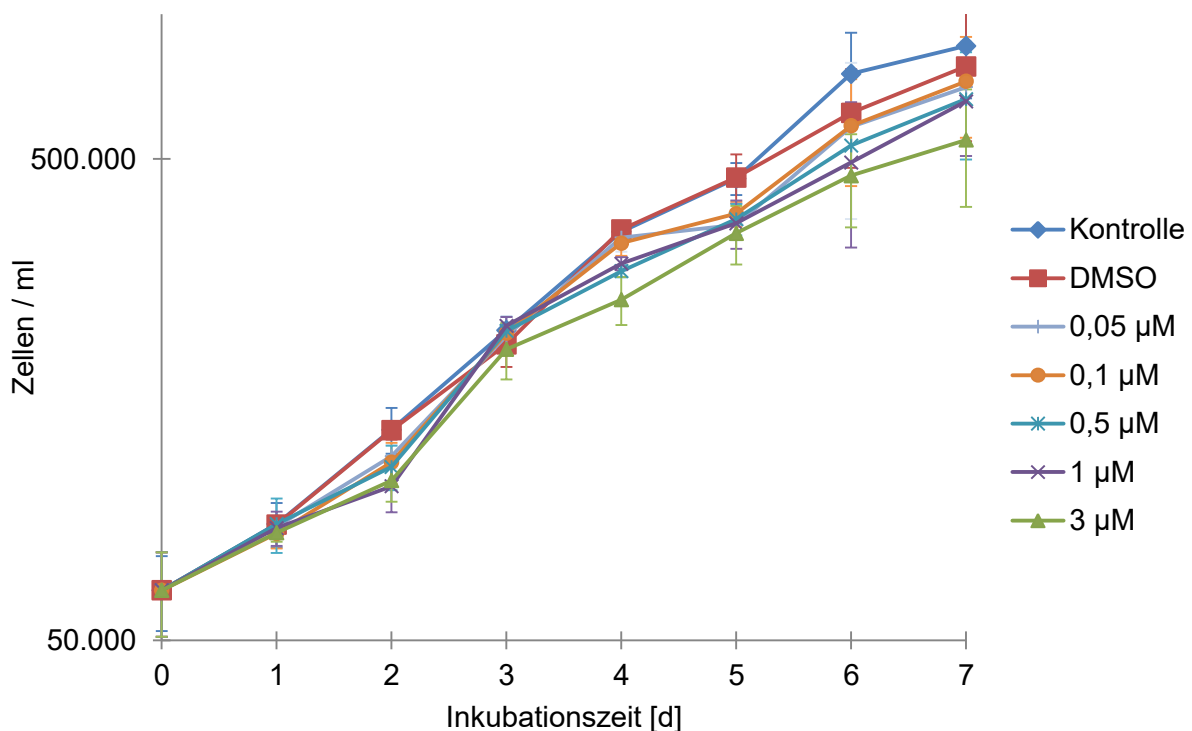


Abbildung 9: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen, behandelt mit Simvastatin sowie einer Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe und einer Lösungsmittelkontrolle (DMSO), dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 5$ .

Typischerweise unterteilt sich eine Wachstumskurve in vier Phasen: Die lag-Phase, die log-Phase, die stationäre Phase sowie die Absterbephase. In Abb. 9 ist zu sehen, dass die MCF-7-Zellen diesen charakteristischen Verlauf unter den gewählten Bedingungen nicht aufzeigten. Weder das verlangsamte, einer lag-Phase entsprechende Wachstum nach Einsaat der Zellen, noch eine eindeutige Plateau- und Absterbephase konnten beobachtet werden. Ab dem sechsten Tag verlangsamte sich zwar das Wachstum aller Proben, jedoch nicht eindeutig einer Plateauphase entsprechend. Eine Absterbephase konnte aufgrund der kurzen Zeit des Versuchsaufbaus nicht dargestellt werden. Insgesamt zeigten alle Kurven der einzelnen Proben bis zum dritten Tag nach der Inkubation einen sehr ähnlichen Verlauf. Danach war

mit zunehmender Simvastatinkonzentration auch ein tendenziell abgeschwächter Anstieg der Zellzahlen, beziehungsweise stärkere Abflachung der Wachstumskurve zu erkennen. Die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen bis 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin haben jedoch nicht ausgereicht, um im Vergleich zur Kontrollprobe eine signifikante, dosisabhängige Wachstumshemmung hervorzurufen.

In der Abb. 10 ist der Einfluss der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen des Simvastatins auf die MCF-10A-Zellen gezeigt:

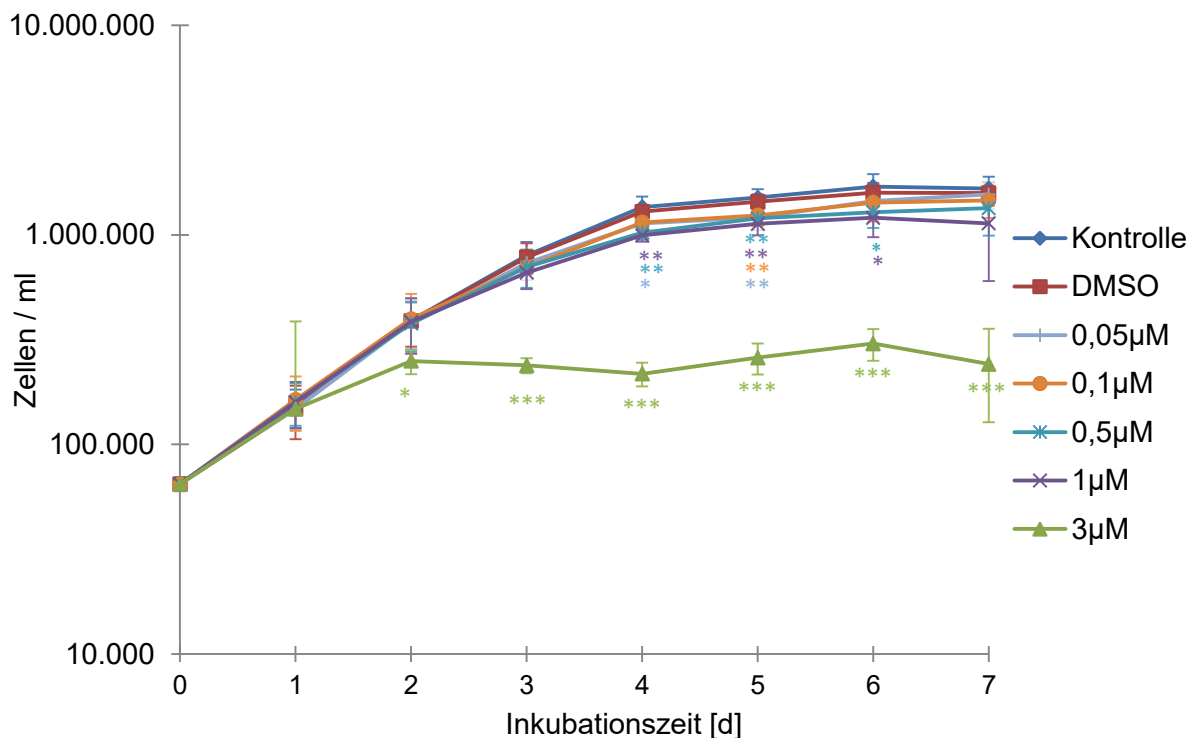


Abbildung 10: Wachstumskurven der MCF-10A-Zellen, behandelt mit Simvastatin sowie einer Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe und Lösungsmittelkontrolle (DMSO), dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 5$ , \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Auch hier war bei allen Zellen keine lag-Phase darstellbar. Am vierten Tag nach dem Versuchsbeginn traten alle Zellen in die stationäre Phase ein. Eine Ausnahme bilden die Zellen, die mit 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelt wurden. Das Wachstum war schon ab dem zweiten Tag signifikant geringer in Bezug auf die Kontrolle. Am vierten und fünften Tag, nach der Inkubation, fiel das Wachstum von allen Proben, außer der DMSO-Kontrolle, signifikant geringer aus, als das der wirkstofffreien Kontrollprobe. Am sechsten und siebenten Tag nähern sich die Kurven wieder einander an. Sieben Tage nach Inkubationsbeginn waren die Zellen der Proben mit 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin signifikant, beziehungsweise hoch signifikant weniger gewachsen, als die Kontrollproben.

Insgesamt waren bei den MCF-10A-Zellen, viel deutlicher als bei den MCF-7-Zellen, dosisabhängige Unterschiede, insbesondere am vierten und fünften Tag nach der Inkubation zu erkennen. Je höher die Konzentration des Simvastatins war, desto geringer war die Zellzahl der Probe.

### 3.2 Zytotoxizität

---

Anhand des LDH-Assays und der Quantifizierung der LDH-Aktivität war es möglich, zelltoxische Auswirkungen von Simvastatin auf die untersuchten Zelllinien zu beurteilen.

Alle in den Abb. 11 und 12 dargestellten Werte beziehen sich prozentual auf die mit Lyse-Reagenz behandelte, als 100 % definierte LDH-Maximalkontrolle. In diesen Proben wurde die maximal mögliche Menge LDH aus den Zellen freigesetzt. Außerdem wurde der Maximalkontrolle die LDH-Aktivität der wirkstofffreien, unbestrahlten Kontrollprobe als Negativkontrolle abgezogen. Die Berechnung der Werte für die Zytotoxizität wurde anhand der Formel 2 durchgeführt.

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{(\text{Aktivität der behandelten Probe}) - (\text{Aktivität der Kontrolle})}{(\text{maximale Aktivität}) - (\text{Aktivität der Kontrolle})} \times 100$$

Formel 2: Ermittlung der LDH-Zytotoxizität

Die experimentell ermittelten und nachfolgend in Abb. 11 graphisch dargestellten Werte zeigen also das Verhältnis der LDH-Aktivität zur maximal möglichen LDH-Ausschüttung in Prozent der mit der jeweiligen Bestrahlungsdosis behandelten Zellen.

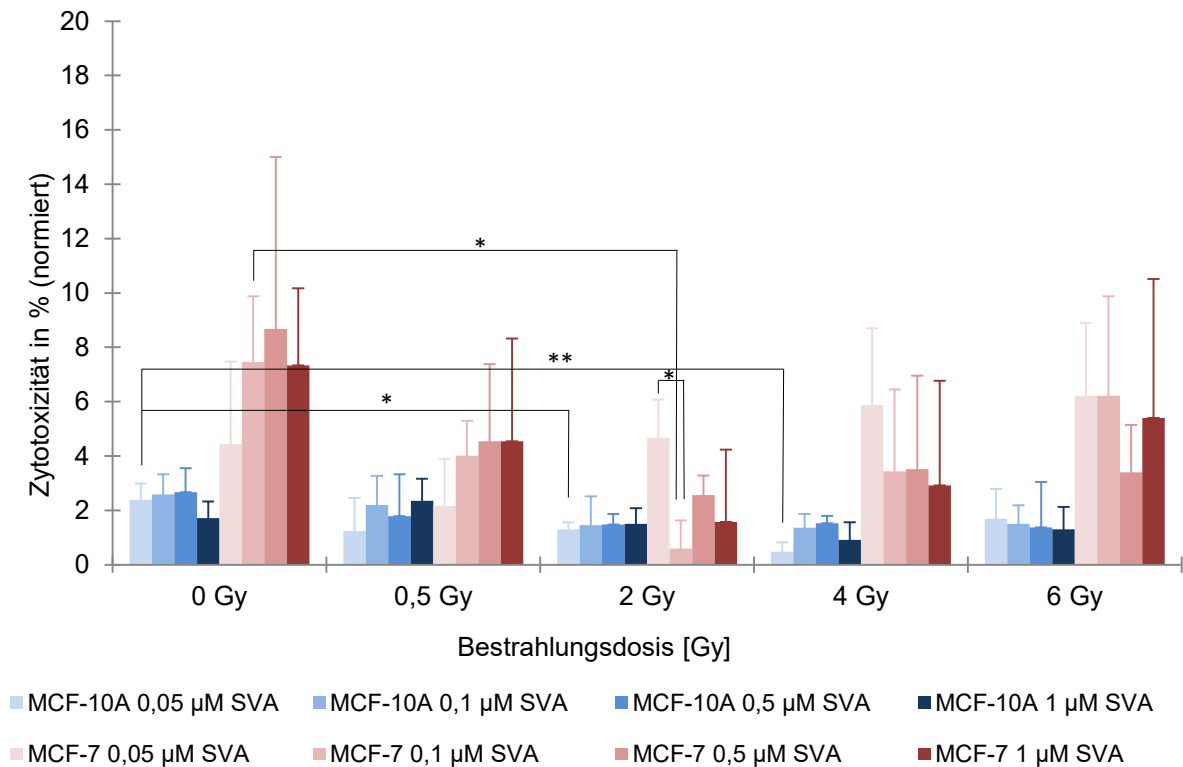


Abbildung 11: LDH-Zytotoxizität von Simvastatin (SVA) auf die MCF-7 und MCF-10A-Zellen, Messzeitpunkt: 24 Stunden nach der Bestrahlung, normiert auf die maximal mögliche LDH-Aktivität (TritonX-Positivkontrolle = 100 %), dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 4$  (MCF-10A),  $n = 3 \pm$  SD (MCF-7), \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ .

Vergleicht man die Gruppe der Proben mit gleicher Bestrahlungsdosis untereinander, fällt zunächst auf, dass es bei den MCF-7-Zellen, außer bei 2 Gy, mit zunehmender Wirkstoffkonzentration, keine signifikante Änderung der Zytotoxizität gab. Tendenziell nahm allerdings die Zytotoxizität bei 0 Gy und 0,5 Gy mit steigender Wirkstoffkonzentration zu, während ab 2 Gy die Zytotoxizität mit steigender Konzentration eher abnahm. Weiterhin gab es bei dem Vergleich von der nicht bestrahlten 0,1  $\mu$ M SVA - Probe, mit der mit 2 Gy bestrahlten 0,1  $\mu$ M SVA - Probe eine signifikant verringerte Zytotoxizität, ansonsten gab es keinen signifikanten Unterschied bei den MCF-7-Zellen.

Bei den MCF-10A-Zellen konnte eine signifikant verminderte Zytotoxizität von Proben gleicher Wirkstoffkonzentration, verglichen mit den nicht bestrahlten Zellkulturen, beobachtet werden (0,05  $\mu$ M, 2 Gy: signifikant; 0,05  $\mu$ M, 4Gy: sehr signifikant).

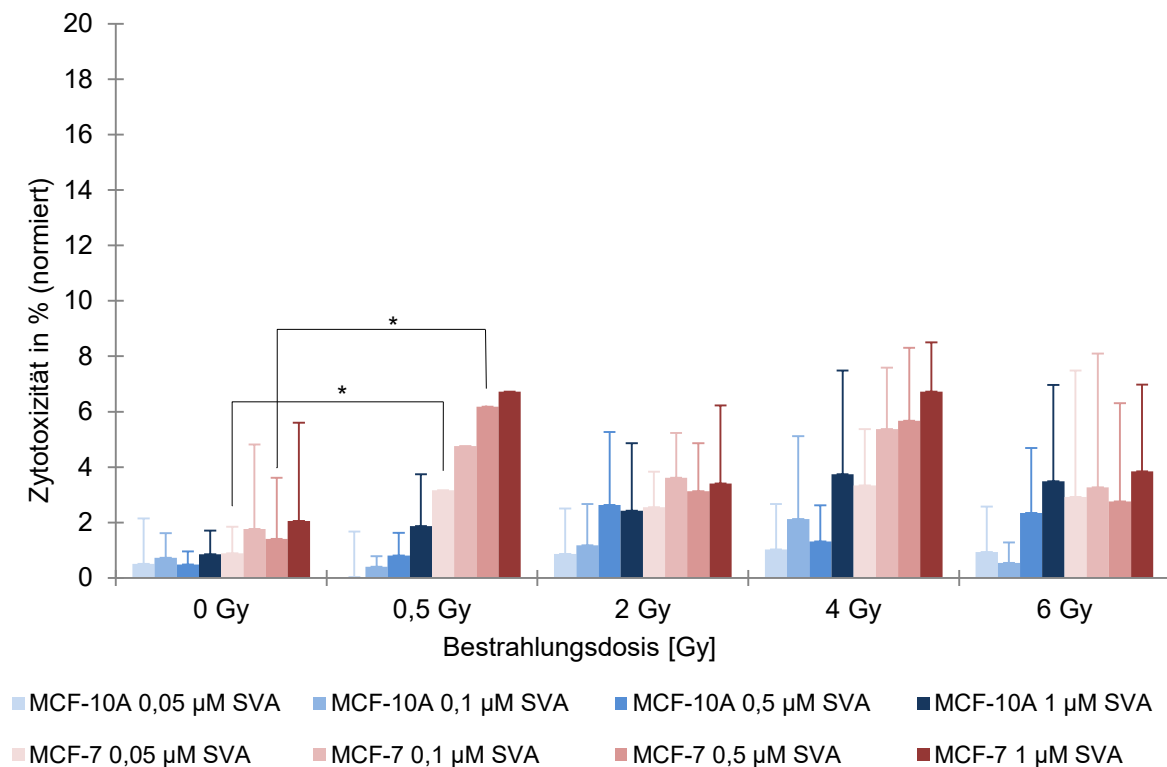


Abbildung 12: LDH- Zytotoxizität der MCF-7 und MCF-10A-Zellen, Messzeitpunkt ist 48 Stunden nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy sowie nicht bestrahlten Proben bei Wirkstoffzugaben von 0,05 µM bis 1 µM, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 4$  (MCF-10A)  $n = 3 \pm$  SD (MCF-7), \*  $p \leq 0,05$ .

48 Stunden nach der Bestrahlung zeigte die Messung der Zytotoxizität, wie in Abb. 12 zu sehen ist, für die MCF-7-Zellen im Bereich der niedrigen Bestrahlungsdosen bei 0,5 Gy eine signifikant erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu den gleichen, nicht bestrahlten Zellen unter Simvastatin-Behandlung mit Konzentrationen von 0,05 µM und 0,5 µM. Weiterhin war ein Anstieg der Zytotoxizität innerhalb einer Bestrahlungsdosis mit steigender Simvastatinkonzentration erkennbar. Dieser war nicht signifikant.

Die Messung der LDH-Aktivität ergab für MCF-10A-Zellkulturen 48 Stunden nach der Bestrahlung geringe Zytotoxizitäten zwischen 0,5 % und 3,8 %. Es konnte keine signifikante Änderung der Zytotoxizität, durch die Wirkstoffaddition, im Zusammenhang mit den verschiedenen Bestrahlungsdosen, dargestellt werden. Tendenziell war jedoch nach 48 Stunden für alle Strahlungsdosen eine Zunahme der Toxizität mit steigender Simvastatinkonzentration sichtbar.

### 3.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die markierten und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemachten phosphorylierten Serinreste der Histonvariante H2AX, bot die Möglichkeit, den Einfluss von Simvastatin auf DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen der Zellen nach einer erfolgten Bestrahlung zu detektieren und zu quantifizieren. Ebenso war es durch den Test möglich, 24 h nach erfolgter Strahlenexposition die Zahl der residualen DNA-Doppelstrangbrüche zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf den Einfluss von Simvastatin auf die Reparaturkapazität der Zellen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 (MCF-7) und Abb. 14 (MCF-10A) dargestellt.

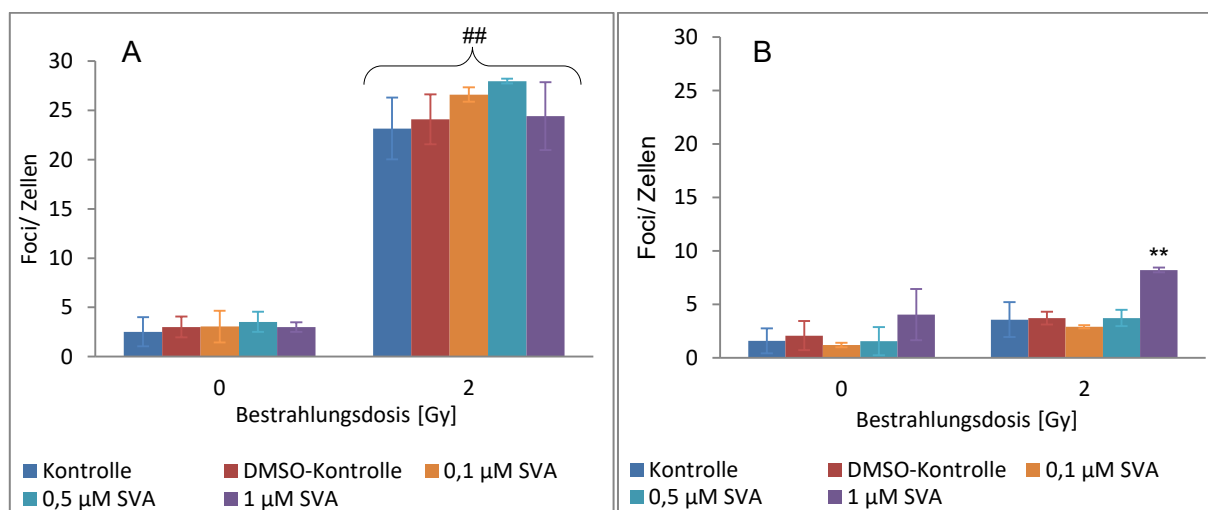


Abbildung 13: Zahl der  $\gamma$ H2AX Foci in MCF-7-Zellen nach der Behandlung mit Simvastatin (SVA) sowie wirkstofffreie und DMSO-Kontrollen, (A) 30 Minuten und (B) 24 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ , \*\*  $p \leq 0,01$  bezogen auf die jeweilige bestrahlte Kontrolle, ##  $p \leq 0,01$  bezogen auf die jeweilige unbestrahlte Kontrolle.

Dabei ist in Abb. 13 zu erkennen, dass sich die Anzahl der Foci in den MCF-7-Zellen, je nach Bestrahlungsdosis und Analysezeitpunkt, zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Vergleichsgruppen unterscheiden. 30 min nach der Strahlenexposition waren im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellkulturen, eine deutlich höhere Anzahl an Foci zu erkennen.

Verglichen dazu unterschied sich 24 Stunden nach der Bestrahlung das Auftreten der Foci der bestrahlten und nicht bestrahlten Versuchsgruppen nicht mehr so ausgeprägt. Bei der Betrachtung der mit verschiedenen Simvastatinkonzentrationen behandelten Proben innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe „bestrahlt“ und „unbestrahlt“, fällt auf, dass keine signifikanten Unterschiede der Focianzahlen im Vergleich zu den jeweiligen wirkstofffreien Kontrollen zu verzeichnen waren. Im Vergleich zur wirkstofffreien Probe war in den Tumorzellen bei kombinierter Bestrahlung und 1  $\mu$ M Simvastatin eine signifikante Erhöhung der residualen DNA-Doppelstrangbrüche nachweisbar.

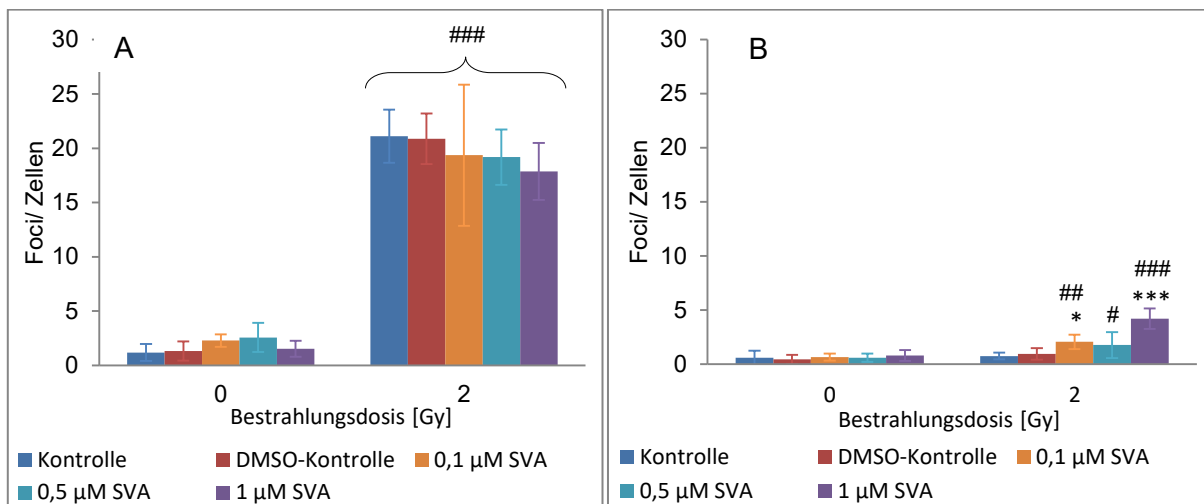


Abbildung 14: Zahl der  $\gamma$ -H2AX Foci in MCF-10A-Zellen nach der Behandlung mit Simvastatin sowie wirkstofffreie und DMSO-Kontrollen, (A) 30 Minuten und (B) 24 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 4$ , \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  bezogen auf die bestrahlte Kontrolle, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$  bezogen auf die jeweilige unbestrahlte Kontrolle.

Auch in der DNA der bestrahlten MCF-10A-Zellen waren 30 Minuten nach der radiologischen Behandlung unabhängig von der Wirkstoffkonzentration, mehr Foci bei den bestrahlten als bei den unbestrahlten Zellen zu quantifizieren, s. Abb. 14.

Der Abb.14 A ist außerdem zu entnehmen, dass bei der nicht bestrahlten Gruppe, mit Ausnahme der 1  $\mu$ M Probe, ein leichter Anstieg der Foci mit steigender Wirkstoffkonzentration, gegenüber der Kontrolle, zu verzeichnen ist. Entgegengesetzt dazu, sinkt mit steigender Wirkstoffkonzentration die Focianzahl gegenüber der wirkstofffreien, bestrahlten Kontrolle, in der bestrahlten Versuchsgruppe.

24 h nach Bestrahlung (Abb. 14 B) waren gegenüber der bestrahlten Kontrolle signifikante Anstiege der Focizahlen bei den Zellen, welche mit 0,5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Simvastatin behandelt wurden, nachweisbar.

### 3.4 Klonogenes Überleben

Mit der Darstellung des klonogenen Überlebens der MCF-7- und MCF-10A-Zellen sollte die Sensibilität dieser Zelllinien gegenüber ionisierender Strahlung untersucht werden. Zusätzlich wurden die Zellkulturen vor der Bestrahlungseinheit mit unterschiedlichen Konzentrationen von Simvastatin behandelt, um aufzuzeigen, ob sich deren Überleben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen unterscheiden (s. Abb. 15 und 16).

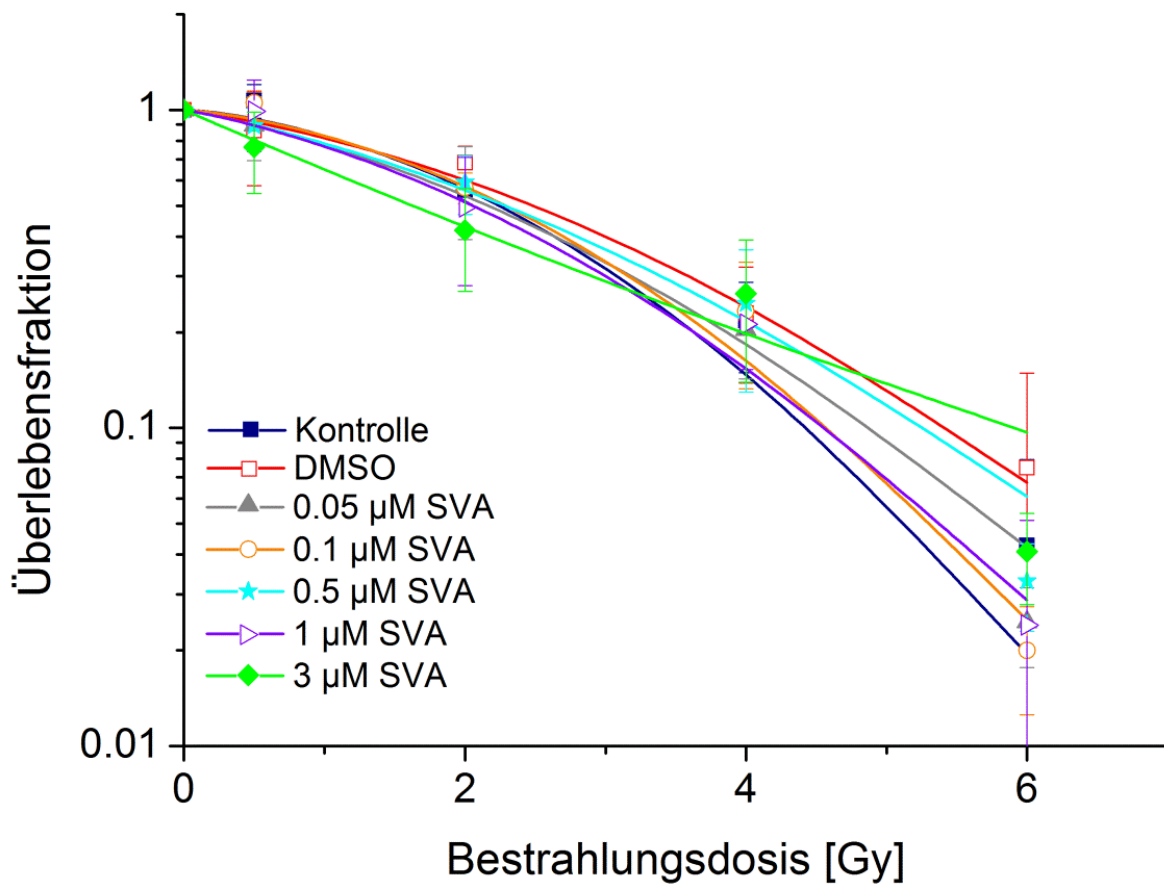


Abbildung 15: Klonogenes Überleben der MCF-7-Zellen unter Einfluss von Simvastatin (SVA) normiert auf die unbehandelte Kontrolle, die Anpassung erfolgte nach dem linear-quadratischen Modell; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ .

Die Abb. 15 zeigt das Überleben der MCF-7-Zellen. Es konnten keine signifikanten Änderungen des Zellüberlebens nach Wirkstoffbehandlung und Bestrahlung im Vergleich zur wirkstofffreien und äquivalent bestrahlten Kontrolle festgestellt werden. Die Kurven verlaufen alle zwischen der Kontrolle und der DMSO-Kontrolle. Somit war bei den Tumorzellen weder ein Strahlensensibilisierender noch ein -protektiver Effekt von Simvastatin nachweisbar.

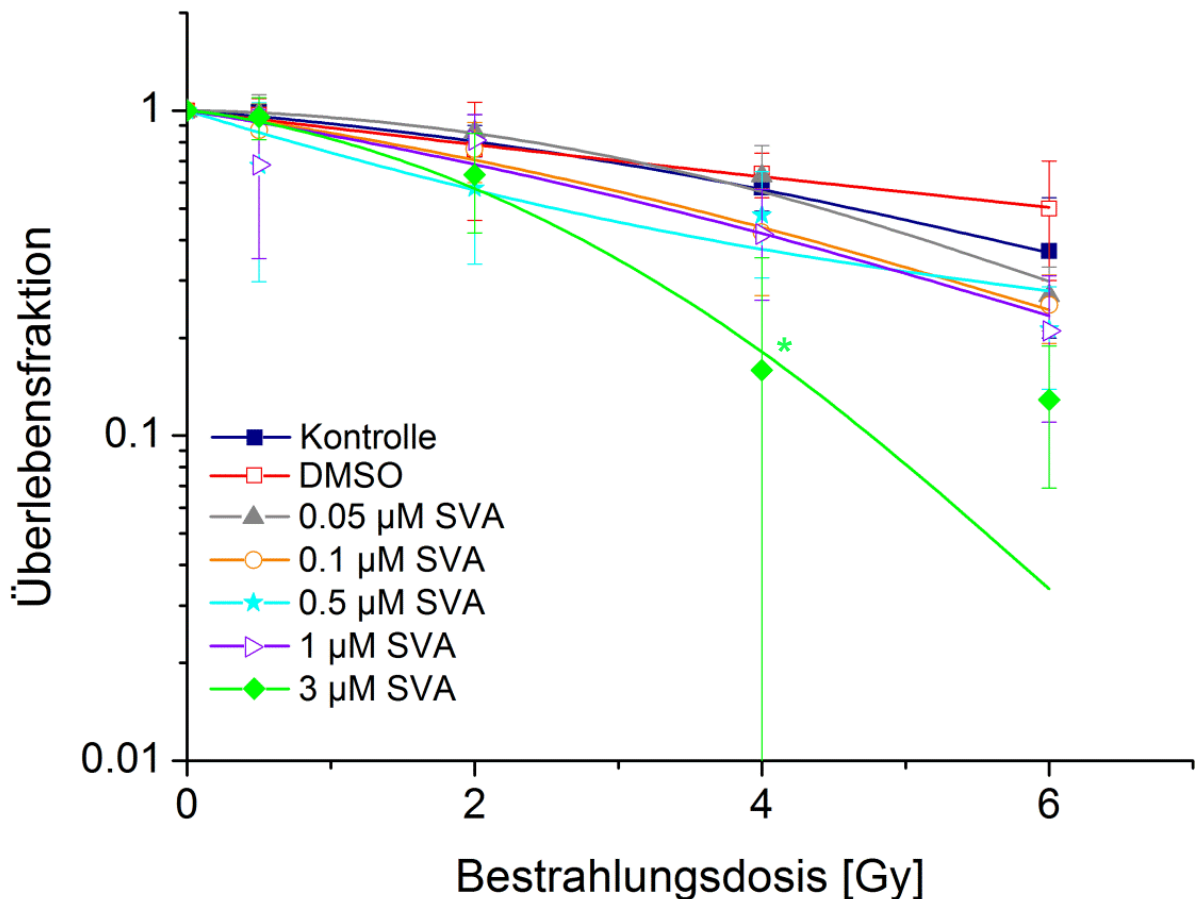


Abbildung 16: Klonogenes Überleben der MCF-10A-Zellen unter Einfluss von Simvastatin (SVA), normiert auf die unbehandelte Kontrolle, die Anpassung erfolgte nach dem linear-quadratischen Modell; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ , \*  $p \leq 0,05$ .

In der Abb. 16 ist zu sehen, dass die MCF10-Zellen nach der Behandlung ab einer Simvastatin-Konzentration von 0,1  $\mu$ M und höher eine kleinere Überlebensfraktion aufwiesen, als die Kontrollprobe. Damit konnte ein strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden, welcher bei 3  $\mu$ M Simvastatin und 4 Gy Bestrahlungsdosis signifikant war.

### 3.5 Zellzyklusanalyse

Um weitere Erkenntnisse über eventuelle mit der Bestrahlung assoziierte Auswirkungen von Simvastatin auf die MCF-7- und MCF-10A-Zellen zu gewinnen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Abb. 17 bis 20 dargestellt.

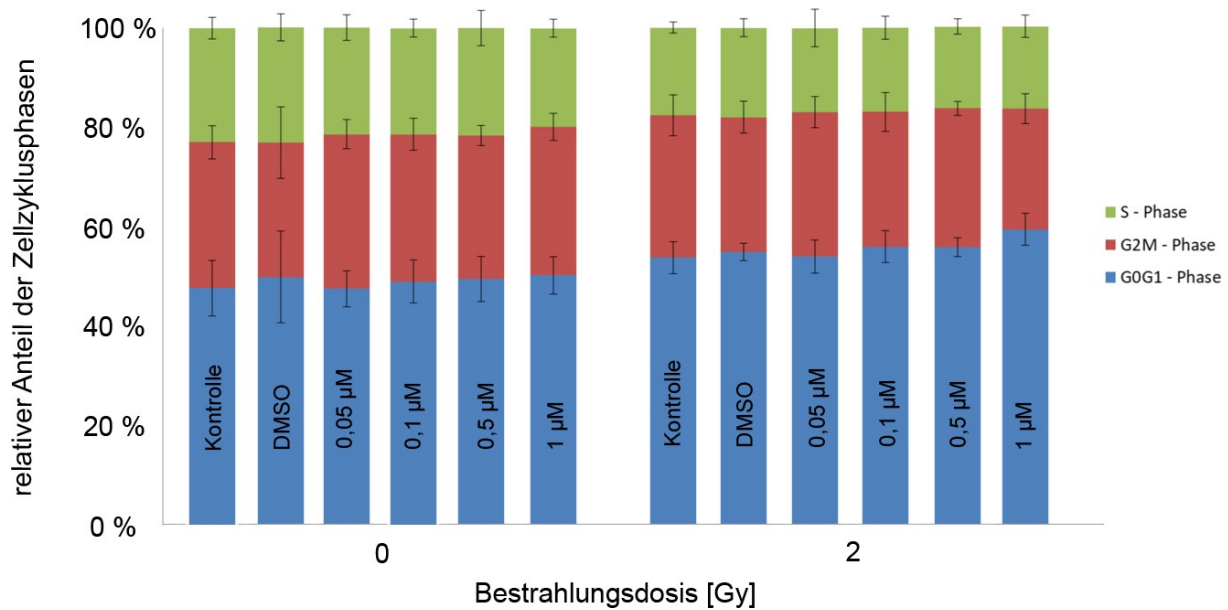


Abbildung 17: Zellzyklus der MCF-7-Zellen, 48 Stunden nach Behandlung mit Simvastatin, 24 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ .

Zunächst ist in Abb. 17 zu erkennen, dass eine Konzentrationssteigerung des Simvastatins eine Zunahme der in der G0G1-Phase arretierten Zellen zur Folge hatte. Im Bezug zur Kontrolle nahm der G0G1-Anteil um 1,92 % bei einer Simvastatinkonzentration von 1 µM zu. Bei 0,5 µM stieg der G0G1-Anteil um 1,38 % und bei 0,05 µM Simvastatin war der Anteil um 0,52 % kleiner als in der unbestrahlten Kontrolle. Weiterhin ist anhand der ermittelten Werte nachvollziehbar, dass auch eine Bestrahlung zu einer Zunahme der in der G0G1-Phase arretierten Zellen führte. Die bestrahlte Kontrolle hatte einen 5,73 % größeren G0G1-Anteil, als die nicht bestrahlte Kontrolle.

Außerdem ist zu erkennen, dass die von der Simvastatinkonzentration abhängige Zunahme des G0G1-Anteils stärker ausfiel, wenn die Zellen zusätzlich auch noch bestrahlt wurden. Beispielsweise nahm der G0G1-Anteil der mit 1 µM Simvastatin behandelten und bestrahlten Zellen um 5,58 % gegenüber der bestrahlten Kontrolle zu. Im Vergleich nahmen die unbestrahlten, mit 1 µM Simvastatin behandelten Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle nur 1,92 % zu. Die bestrahlten und mit 0,5 µM Simvastatin behandelten Zellen wiesen einen Zuwachs des G0G1-Anteils von 2,19 % gegenüber der bestrahlten Kontrolle auf. Dem gegenüber stand der G0G1-Anteil von 1,38 %, der mit 0,5 µM behandelten, unbestrahlten Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Auch die G0G1-Anteile der mit 0,1 µM und 0,05 µM behandelten Zellen waren nach der Bestrahlung gegenüber ihrer bestrahlten Kontrolle größer, als die unbestrahlten Vergleichsgruppen. Die mit 0,1 µM Simvastatin behandelten Zellen hatten 1,81 % und die mit 0,05 µM behandelten Zellen hatten 0,07 % mehr Zellen in der G0G1-Phase als die bestrahlte Kontrolle.

Unbestrahlt ist die Zunahme der in G0/G1 arretierten Zellen anteilmäßig vor allem auf eine Abnahme der Synthesephase zurückzuführen. Im Unterschied dazu, beruht nach der Bestrahlung die Zunahme der G0/G1-Anteile vor allem auf der anteilmäßigen Abnahme der G2M Phase. Am deutlichsten ist dies bei der 1  $\mu\text{M}$  - Probe erkennbar gewesen: Ohne Bestrahlung nahm die G2M-Phase 0,26 %, die Synthesephase 3,24 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle ab. Mit Bestrahlung nahm die G2M-Phase 4,2 % und die Synthesephase nur noch 1,1 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle ab.

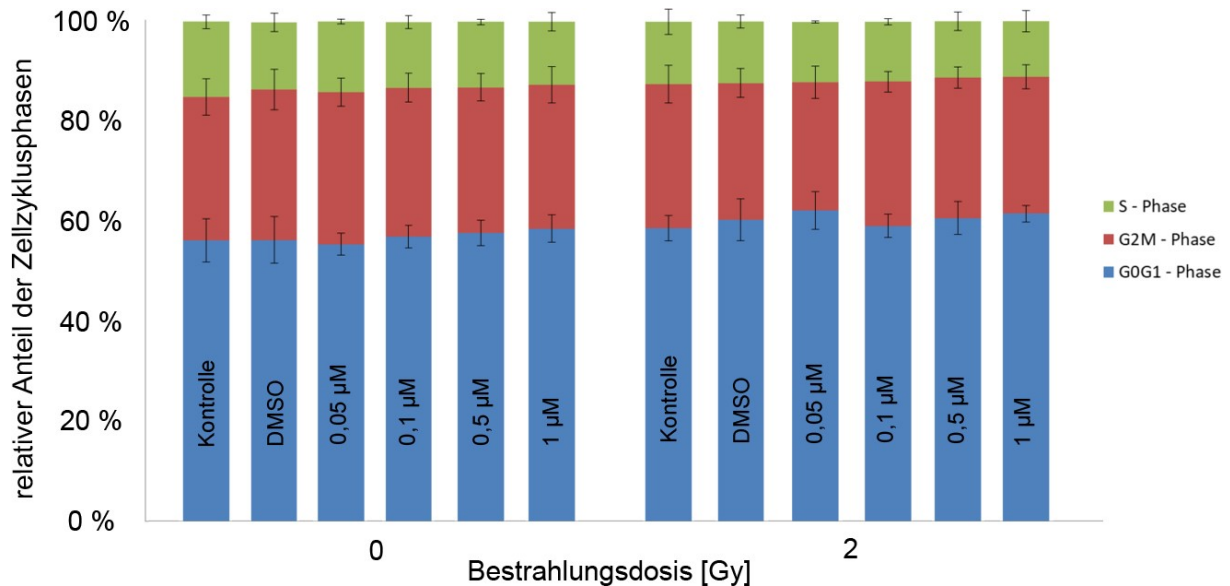


Abbildung 18: Zellzyklus der MCF-7-Zellen, 96 Stunden nach Behandlung mit Simvastatin, 72 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ .

72 Stunden nach der Bestrahlung (s. Abb. 18) waren die Unterschiede der Zellzyklusphasenanteile unter den verschiedenen Bedingungen geringer ausgeprägt als in der Untersuchung zum früheren Messzeitpunkt (48 h; s. Abb. 17). Dennoch nahm auch hier der Anteil an Zellen, die in der G0G1-Phase arretiert waren, abhängig von der Konzentration des Simvastatins, sowie zusätzlicher Bestrahlung zu. Im Bezug zur unbestrahlten Kontrolle stiegen die Anteile der mit 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelten Zellen leicht um 0,4 %, die mit 0,5  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen um 0,78 % sowie die mit 0,1  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen um 0,59 %. Die Zellen mit 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin im Zellmedium hatten einen mit 0,73 % kleinen Anteil in der G0G1-Phase als die Kontrolle. Nachdem die Zellen bestrahlt wurden, stiegen auch hier die Anteile der G0G1-Phase gegenüber ihrer bestrahlten Kontrolle stärker an, als die unbestrahlte Vergleichsgruppe: 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin wiesen mit 3,08 %, 0,5  $\mu\text{M}$  Simvastatin mit 1,22 %, 0,1  $\mu\text{M}$  Simvastatin mit 0,7 % einen höheren Anstieg als ohne Bestrahlung auf. Auffällig ist die G0G1-Phasen-Zunahme unter 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin, kombiniert mit der Bestrahlung von 2 Gy. Hier ließ sich ein Anstieg von 3,75 % feststellen.

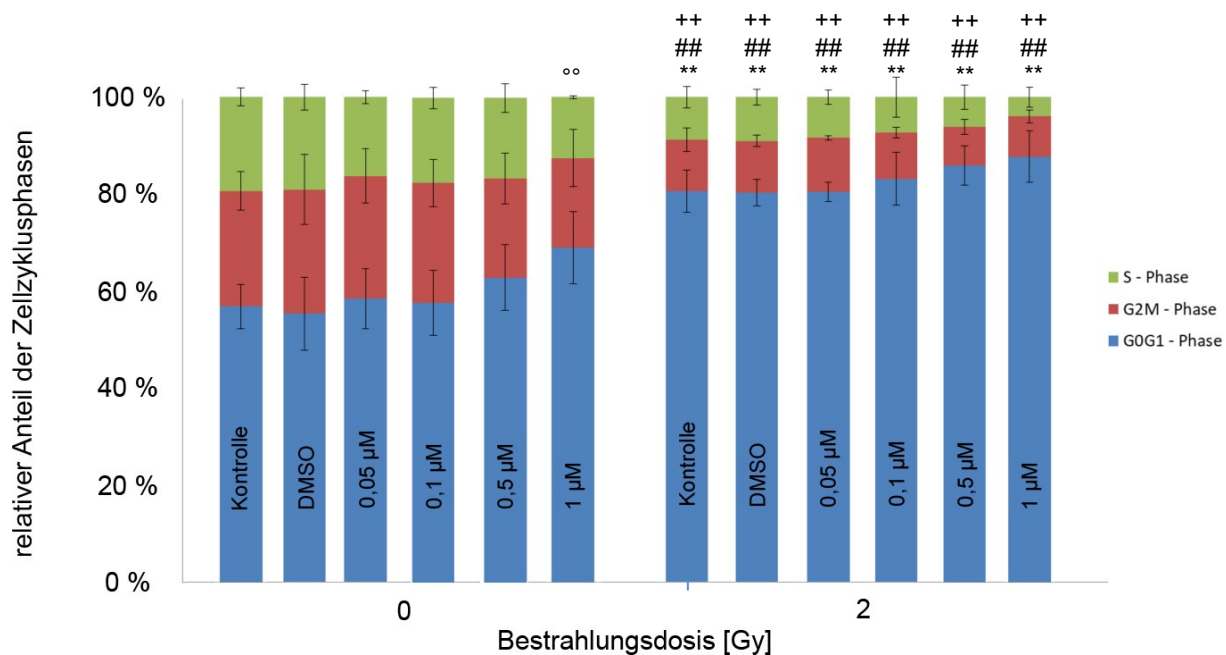


Abbildung 19: Zellzyklus der MCF-10A-Zellen, 48 Stunden nach Behandlung mit Simvastatin, 24 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$ , ##  $p \leq 0,01$  bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle gleicher Konzentration der G2M-Phase, \*\*  $p \leq 0,01$  bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle gleicher Konzentration der G0G1-Phase, ++  $p \leq 0,01$  bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle gleicher Konzentration der S-Phase, °°  $p \leq 0,01$  bezogen auf die unbestrahlte, Simvastatin-freie Kontrolle der S-Phase.

Abb. 19 zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen der MCF-10A-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung. Zum einen waren bei den MCF10A-Zellen ein Arrest in der G0G1-Phase sowie zum anderen eine Abnahme der Synthese- und G2/M-Phase mit zunehmender Simvastatin-konzentration sichtbar. Nach der Hinzugabe von 1 µM Simvastatin zeigte sich eine sehr signifikante Abnahme der Synthesephase.

Die Auswirkung der Bestrahlung auf die MCF-10A-Zelllinie war im Vergleich zu den nichtbestrahlten Kontrollen gleicher Konzentration durch eine sehr signifikante, vermehrte Arretierung der Zellen in der G0G1-Phase, bei einer gleichzeitig ebenso sehr signifikanten Abnahme der Synthese- und G2/M-Phase darstellbar gewesen.

Wurde der Effekt von Simvastatin auf die MCF10-A-Normalzellen ohne Einfluss von Strahlung betrachtet, so stieg ebenso der Anteil, der in der G0G1-Phase arretierten MCF-10A-Zellen zu Lasten des Anteils der Zellen in der Synthese- und G2M-Phase in Abhängigkeit von der Konzentration des Simvastatins an. Der Effekt des Simvastatins war bei den MCF10A-Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den MCF-7-Zellen. Mit 1 µM Simvastatin stieg der G0G1-Anteil um 11,49 %, mit 0,5 µM um 6,38 %, mit 0,1 µM 0,65 % sowie mit 0,05 µM um 1,15 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Jedoch zeigte sich, dass nach erfolgter Bestrahlung unter zunehmender Simvastatinkonzentration der G0G1-Anteil deutlich geringer gegenüber der ebenfalls bestrahlten, jedoch simvastatinfreien Kontrolle anstieg. Mit 1 µM Simvastatin stieg der Anteil um 6,69 %, mit 0,5 µM um 5,47 %, mit 0,1 µM um 2 % und mit

0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin im Zellmedium fiel der Anteil an Zellen in der G0G1-Phase sogar um 0,49 % gegenüber der bestrahlten Kontrolle.

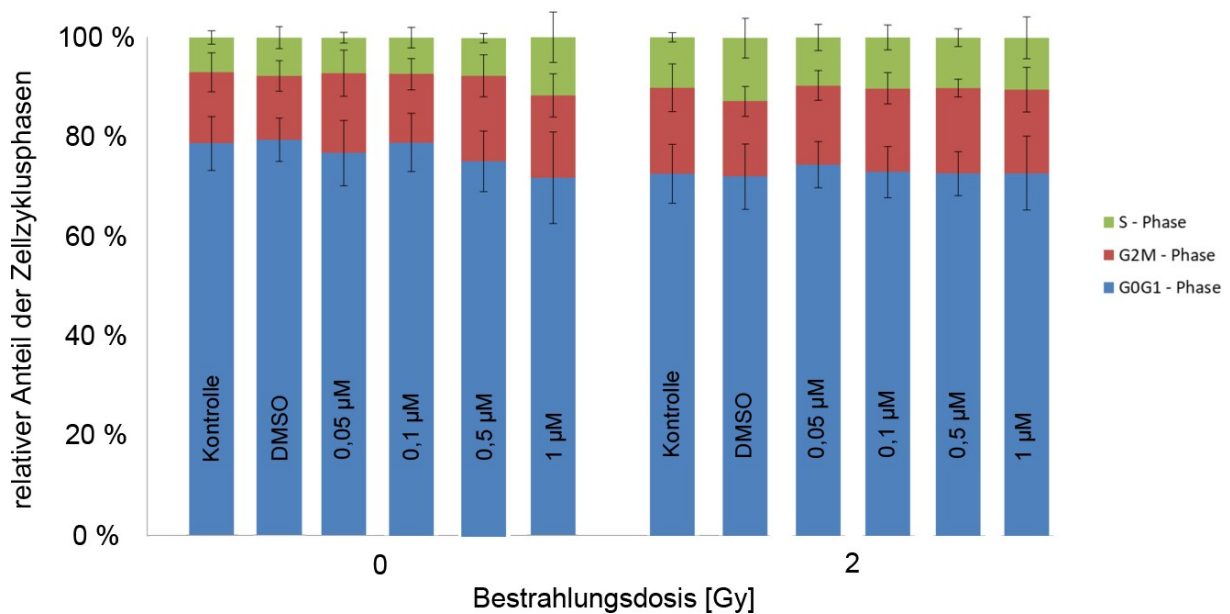


Abbildung 20: Zellzyklus der MCF10A-Zellen, 96 Stunden nach Behandlung mit Simvastatin, 72 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 4$ .

Bei den MCF-10A-Zellen waren, wie in Abb. 20 nachvollziehbar, 72 Stunden nach der Bestrahlung nur noch marginale Abweichungen der Untersuchungsergebnisse zu den Kontrollproben feststellbar. Hier schien, gegensätzlich zu den vorher dargestellten Versuchen, ohne zusätzliche Bestrahlung, der G0G1-Anteil kleiner zu werden, je höher die Konzentration von Simvastatin im Zellmedium war. Der Anteil an Zellen, welche sich nach der Hinzugabe von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin in der G0G1-Phase befanden, war nach 24 h 6,76 % kleiner als die der Kontrolle. Nach 0,5  $\mu\text{M}$  Simvastatin nahm der Anteil um 3,65 % ab. Nach der Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Simvastatin nahm er um 0,27 % zu, sowie nach 0,05  $\mu\text{M}$  um 1,27 % ab.

Die Bestrahlung schien die von der Simvastatinkonzentration abhängige Abnahme des G0G1-Anteils nicht weiter zu verstärken, sondern abzuschwächen. Die bestrahlten Zellen, welche mit 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  sowie 0,1  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelt wurden unterschieden sich kaum von der bestrahlten Kontrolle. Einzig die mit 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelten Zellen wiesen 2,73 % mehr Zellen in der G0G1-Phase auf, als die bestrahlte Kontrolle.

---

## 4. Diskussion

---

Die Frage nach dem Einfluss von Simvastatin auf die Strahlenantwort von gesunden Brustgewebszellen auf der einen - und Tumorzellen des Brustgewebes auf der anderen Seite, standen im Zentrum dieser Arbeit.

Die vorliegenden *In vitro*-Versuche wurden durchgeführt, um ein vermutetes strahlenmodulierendes Potential des Simvastatins präklinisch zu untersuchen. Damit könnte womöglich in Zukunft das Anwendungsgebiet für dieses häufig verschriebene und in der Regel gut verträgliche cholesterinsenkende Mittel erweitert werden.

### 4.1 Wachstum der Tumor- und Normalgewebszellen

---

Um zunächst den Einfluss von Simvastatin auf die Wachstumskinetik zu untersuchen, wurden Wachstumskurven erstellt. Die Ergebnisse zeigten eine leichte Abnahme der MCF-7-Zellzahl unter dem Einfluss von Simvastatin mit steigender Konzentration bis 3  $\mu$ M. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant. Die aus den Wachstumskurven errechnete Populationsverdopplungszeit der MCF-7-Zellen der unbehandelten Kontrolle, war mit 35,9 Stunden deutlich höher als die in der Literatur angegebenen 24 Stunden (Sutherland *et al.*, 1983). Ursachen für die, im Vergleich mit anderen Publikationen, verlängerte Populationsverdopplungszeit können abweichende äußere Bedingungen sein. Die genaue Zusammensetzung der dem Medium hinzugefügten Zusätze, wie zum Beispiel das fetale Kälberserum, unterscheidet sich je nach Hersteller und Charge. Unterschiedliche Einsaatdichten oder abweichende Wachstumsflächen könnten aufgrund von Kontakthemmungen oder nicht ausgeschütteten Wachstumshormonen Gründe für eine längere Populationsverdopplungszeit sein. Aber auch die Inkubationsbedingungen können sich leicht unterscheiden. Häufiges Öffnen des Brutschanks führt zu einem Absinken der Temperatur und der Erniedrigung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes. Eine inkonstante, von den Standardbedingungen abweichende Zellkultur, kann sich auf das Wachstum der Population auswirken (Schmitz, 2011).

Für die MCF-10A-Zellen ist in der Literatur eine Populationsverdopplungszeit von ca. 20 Stunden beschrieben (Soule *et al.*, 1990; Bessette *et al.*, 2015). Wie auch bei den MCF-7-Zellen lag die, aus den vorliegenden Daten errechnete, Populationsverdopplungszeit für die MCF-10A-Zellen höher. Sie betrug 26,7 Stunden. Die oben genannten, für die verlängerte Populationsverdopplungszeit der MCF-7-Zellen vermuteten Gründe, könnten auch für diese Zelllinie zutreffen.

Die wachstumshemmenden Eigenschaften bei den MCF10-A-Zellen waren unter Einfluss von Simvastatin deutlicher ausgeprägter, als bei den MCF-7-Zellen. Schon zwei Tage nach Versuchsbeginn lag das Wachstum der mit 3  $\mu$ M Simvastatin behandelten Zellen, verglichen

mit der Kontrolle, signifikant zurück. Sie erreichte zu diesem Zeitpunkt schon die Plateauphase. Die Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  wirkte auf die MCF-10A-Zellen deutlich wachstumshemmend. Nachdem die übrigen untersuchten Simvastatinkonzentrationen einem der Nativkontrolle äquivalenten Verlauf bis zum zweiten Tag nach Wirkstoffzugabe aufwiesen, fiel auf, dass am dritten und vierten Tag, nach der Inkubation das Simvastatin, eine deutlich signifikante Wachstumshemmung hervorgerufen wurde. Je niedriger die Simvastatinkonzentration, desto weiter näherte sich die absolute Zellzahl am siebenten Tag der Kontrolle an. Eine signifikante Wachstumshemmung nach sieben Tagen betraf die Proben mit der Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ . Eine Konzentration des Simvastatins unter 1  $\mu\text{M}$  führte zu einer gering ausgeprägten Wachstumshemmung des Simvastatins auf die MCF-10A-Zellen.

Ein Anhaltspunkt für die gewählten Konzentrationen war die klinische, bei Patienten übliche, Dosierung. Eine Übertragung der im therapeutischen Bereich verwendeten durchschnittlichen Konzentrationen im Blutserum von Simvastatin auf unsere Versuchsanordnungen, war jedoch nicht möglich. Die allgemeinen Dosierungsempfehlungen geben eine tägliche orale Einnahme von 40 mg Simvastatin vor (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2012). Bei dieser Form der Einnahme beträgt die mittlere Konzentration von Simvastatin im Blutserum 2,2- 4,3 nmol/ L (Björkhem-Bergman, Lindh, & Bergman, 2011). Obwohl klinische und epidemiologische Untersuchungen kanzeropräventive Eigenschaften von Simvastatin festgestellt haben, verwendeten die experimentellen *in vitro* Studien, an die diese Arbeit anknüpfen soll, allerdings viel höhere Wirkstoffkonzentrationen, als das im menschlichen Organismus möglich wäre. Es wurden in der Literatur Effekte, wie zum Beispiel die Inhibierung der Proliferation von MCF-7-Zellen von Simvastatin im Bereich von 1 - 50  $\mu\text{M}$  nachgewiesen (Sánchez et al., 2008; Seeger, et al., 2003). Tendenziell begann eine relevante Proliferationshemmung auf MCF-7-Zellen, allerdings in den Studien von Seeger et al., 2008 bei 5  $\mu\text{M}$  Simvastatin, also deutlich über den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Verschiedene Ursachen für die deutliche Diskrepanz zwischen der therapeutischen und *in vitro* wirksamen Dosen werden diskutiert. Unter anderem wird angenommen, dass das Simvastatin im Organismus in verschiedenen Organen oder Geweben akkumulieren könnte. Außerdem könnte *in vivo* die intrazelluläre Konzentration viel höher liegen als die des Blutserums und somit Effekte hervorrufen (Björkhem-Bergman et al., 2011).

Eine Erklärung für die dosisabhängige Wachstumshemmung in der vorliegenden Arbeit könnte sein, dass Simvastatin die intrazelluläre Cholesterinbildung verhindert. Dieses Cholesterin ist für die Bildung von Zellorganellen und der Zellwand unabdingbar. Eine Zellteilung und Vermehrung der Zellpopulation ist bei starkem Cholesterinmangel also denkbar unmöglich. Auch eine Exposition von zusätzlichen Cholesterintransportern in der Zellwand führt, wenn von außen - also aus dem Medium - kein neues Cholesterin hinzugefügt wird, zu einem Stillstand der Zellteilungen. Weiterhin ist bekannt, dass in Tumorzellen tendenziell ein

höherer Cholesterinspiegel nachweisbar ist und cholesterinsenkende Mittel, wie die Statine, einen Einfluss auf das Wachstum von Tumoren haben können (Kuzu, *et al.*, 2016).

Widersprüchlich zu den vorliegenden Quellen ist, dass die das gesunde Gewebe repräsentierende Zelllinie MCF-10A empfindlicher in Bezug auf ihr Wachstum auf höhere Dosen Simvastatin zu reagieren scheint, als die MCF-7-Zelllinie. Eine mögliche Erklärung wäre die deutlich kürzere Populationsverdopplungszeit der MCF-10A-Zellen. Dadurch, dass in kürzerer Zeit viel mehr Zellen entstehen, könnte sich ein Cholesterinmangel auch schneller auf das Wachstumsverhalten auswirken.

Bei der Recherche vergleichbarer Studien fiel auf, dass die maligne Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 auf eine niedrige Simvastatinkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  -  $1 \mu\text{M}$  deutlich sensibler reagierte, als die ebenso malignen MCF-7-Zellen. Es wurden bei den MDA-MB-231 mehr Apoptoseproteine und ein niedrigeres Zellüberleben als bei MCF-7 festgestellt (Wang *et al.*, 2016). MCF-10A-Zellen und MDA-MB-231 haben gegenüber der MCF-7-Zelllinie einen fehlenden Estrogenrezeptor gemeinsam (Subik *et al.*, 2010). Möglicherweise spielt dieser bei der Frage nach der empfindlicheren Reaktion auf das Wachstum der MCF-10A-Zellen gegenüber der malignen MCF-7-Zelllinie, eine Rolle.

Mithilfe der erstellten Wachstumskurven konnte ein Konzentrationsbereich ermittelt werden, der gerade noch nicht wachstumshemmend auf die untersuchten Zelllinien wirkte. Für die MCF-7-Zellen wurde keine Hemmung des Wachstums, bis einschließlich  $3 \mu\text{M}$  Simvastatin, festgestellt. MCF-10A war in seinem Wachstum ab  $1 \mu\text{M}$  gehemmt. Unterhalb dieser Konzentrationen schien in der vorliegenden Arbeit der optimale Bereich zu liegen, um eventuell vorhandene radiomodulierende Effekte nachzuweisen.

## 4.2 Zytotoxizität

---

Nachdem in den Wachstumskurven Konzentrationen von Simvastatin ermittelt wurden, die keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien hatten, wurde mit dem LDH-Assay weitergehend untersucht, ob in diesen Konzentrationsbereichen trotzdem zytotoxische Effekte zu ermitteln sind. Es wurden für die nicht bestrahlten Kontrollen, in den oben angegebenen Dosen, Zytotoxizitätswerte zwischen circa 1 % und 8 % gegenüber den unbehandelten, unbestrahlten Kontrollen für beide Zelllinien ermittelt. Die getesteten Konzentrationen wirkten also insgesamt betrachtet nicht oder in nur sehr geringem Maß zytotoxisch. Damit bestätigte sich die Schlussfolgerung, die auch schon aus den Wachstumskurven gezogen wurden: Die vorliegenden Konzentrationen waren nicht hoch genug, um einerseits signifikant in das Wachstum der Zellen einzugreifen, andererseits sie

so stark zu schädigen, dass ein signifikant erhöhter LDH-Ausstoß detektierbar gewesen wäre. Von einer Untersuchung mit 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelten Zellen wurde abgesehen, da die strahlenmodulierenden Effekte an nicht toxisch wirksamen Konzentrationen getestet werden sollte.

Wang *et al.* (2016) stellten ebenfalls fest, dass eine signifikante Absenkung der Lebensfähigkeit von MCF-7-Zellen bei einer Simvastatinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  beginnt. Dies deckte sich mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen, die im Zytotoxizitätstest auch einen hemmenden Effekt zeigten, jedoch aufgrund der teils sehr hohen Standardabweichungen nicht signifikant dargestellt werden konnte. Signifikant erhöhte Caspase 3 und 7 Proteasen, welche die Apoptose induzieren, sowie eine hoch signifikante Absenkung der Lebensfähigkeit, konnten jedoch erst bei 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2016).

Bei der Betrachtung der LDH-Aktivität der unbestrahlten, mit Simvastatin behandelten Zellen, und den bestrahlten, mit Simvastatin behandelten Äquivalenten, fällt auf, dass 24 Stunden nach der Bestrahlung für die MCF-7-Zellen keine signifikant steigende Zytotoxizität, auch unter zunehmender Simvastatinkonzentration, nachzuweisen war.

Eine signifikante Senkung der Zytotoxizität bei 2 Gy und 0,1  $\mu\text{M}$  Simvastatin, gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle, steht im Widerspruch zu unserer Annahme, dass Simvastatin MCF-7-Zellen sensibler für ionisierende Strahlung machen könnte und wurde so nicht erwartet. Es scheint hier nicht nur kein radiosensibilisierender Effekt nachweisbar gewesen zu sein, sondern eher das Gegenteil, eine Desensibilisierung der mit Simvastatin behandelten malignen Zellen. Es wurde auch deutlich, dass die nicht bestrahlten, mit Simvastatin behandelten Proben, tendenziell höhere zytotoxische Werte, als die bestrahlten Vergleichsgruppen hatten.

Verantwortlich für die zytotoxische Wirkung von Simvastatin auf MCF-7-Zellen ohne Einfluss von Strahlung ist, Kotamraju *et al.* zufolge, eine Induktion der NO-Synthase sowie eine Hemmung der Prenylierung von Proteinen, die eine Schlüsselrolle bei der Verstärkung der MCF-7-Zellapoptose spielen sollen. Ermittelt wurde dies mit einem colorimetrischen Assay, einem sogenannten „MTT- Test“ (Kotamraju, *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte bei 5 - 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin eine Zytotoxizität für die MCF-7-Zellen, nicht jedoch für die MCF-10A-Zellen, nachgewiesen werden. Dennoch nahmen wir an, dass die Zytotoxizität von bestrahlten, mit Simvastatin behandelten Zellen höher liegt, also eine Radiosensibilisierung stattfindet. Dies konnte besser in den Proben 48 Stunden nach Bestrahlung gezeigt werden.

48 Stunden nach der Bestrahlung konnte für die MCF-7-Zellen im Bereich von 0,5 Gy eine signifikant erhöhte Zytotoxizität bei 0,05  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden.

Eine gesteigerte Radiosensitivität von Lungenkrebszellen durch das, dem Simvastatin verwandten Lovastatin, wurde unter anderem durch die Aktivierung des AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK)-Signalweges beschrieben (Sanli *et al.*, 2011). Der AMPK werden Aufga-

ben als Tumorsuppressor zugesprochen (Mihaylova & Shaw, 2012; Shackelford & Shaw, 2009).

Weitere Studien zeigten, dass Statine beispielsweise Magen- und Darmkrebszellen gegenüber der Strahlentherapie durch die Modulation von Survivin (BIRC5) und Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF) sensibilisieren (Lim, *et al.*, 2015). Mögliche Eingriffe von Simvastatin in die Signalwege der MCF-7-Zellen sind auch in unserem Versuchsaufbau denkbar. Eine veränderte Expression von CTGF oder Survivin ließe sich durch die entsprechenden Antikörper mittels immunhistochemischer Überprüfung darstellen. Weiterhin wäre eine Quantifizierung von Survivin und CTGF in MCF-7-Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit Simvastatin durch einen Immunblot, wie dem Western Blot oder einem enzymatischen Immunadsorptionsverfahren, wie dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), möglich. Ein Erklärungsansatz dafür, dass nur bei den 48 Stunden-Messungen eine toxisitätsteigernde Wirkung für die MCF-7-Zellen nachgewiesen werden konnte, könnte die längere Einwirkzeit des Medikaments auf die Zellen sein. Vielleicht dauert die Modulation von intrazellulären Signalwegen, wie der der AMPK, länger als 24 Stunden.

Ein weiterer beeinflussender Faktor für das Ausbleiben einer Steigerung der Zytotoxizität 24 Stunden nach der Bestrahlung, könnte die lange Populationsverdopplungszeit der MCF-7-Zellen von ca. 30 Stunden sein. Weiterhin könnten Messfehler in diesem niedrigen skalierten Bereich deutlicher zu Tage getreten sein. Blasenbildung in den Wells war nur schwer zu vermeiden.

Für die MCF-10A-Zellen wurde vor den Untersuchungen eine strahlendesensibilisierende (protektive) Wirkung durch das Simvastatin vermutet, was somit eine verminderte Zytotoxizität in Folge der Radiation bedeutet. Vorangegangene Untersuchungen konnten protektive Auswirkungen von Cholesterinsenkenern wie Lovastatin, aber auch des Simvastatins selbst, auf gesundes, bestrahltes Gewebe zeigen. Es konnte festgestellt werden, dass Lovastatin Keratinozyten vor den zytotoxischen und genotoxischen Wirkungen von ionisierender Strahlung und Doxorubicin schützen kann. Dabei antagonisierte Lovastatin Stressreaktionen durch die selektive Blockade der Aktivierung von Chk1- und ATR-Kinasen (Ziegler *et al.*, 2016). CHK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase und vermittelt unter anderem den Zellzyklusarrest nach DNA-Schäden in der S-Phase und spielt eine bedeutende Rolle als Überwachungspunkt in einem intrazellulären Genom - Überwachungspfad (Zhang & Hunter, 2015). Ziegler *et al.* zufolge schützt das Lovastatin, aber auch nicht proliferierende Keratinozyten, vor strahlenbedingter Zytotoxizität (Ziegler *et al.*, 2016). Es scheint also auch zellzyklusunabhängige Schutzmechanismen zu geben. Weiterhin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Simvastatin die strahleninduzierten Gewebeschäden im Jejunum von Mäusen vermindert (Zhao *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte, im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen, nur 24 Stunden nach der Bestrahlung die erwartete Verringerung der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Signifikant erniedrigt, gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle, waren die Zellen nach 2 Gy Bestrahlungsdosis und unter Einfluss von 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin sowie nach einer Bestrahlung mit 4 Gy zuzüglich 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin. Für diese Probengruppen wurde nachgewiesen, dass die Zellen in Folge der Bestrahlung weniger LDH in den Extrazellulärraum abgegeben hatten, als die Simvastatin freien Kontrollproben.

Nach 48 Stunden stieg mit steigender Simvastatinkonzentration und Bestrahlung die Zytotoxizität auf die MCF-10A-Zellen an, statt, wie erwartet, den nicht mit Simvastatin behandelten Zellen gegenüber erniedrigt zu sein.

Bei den MCF-10A-Zellen, mit ihrer deutlich kürzeren Populationsverdopplungszeit, zeigte sich nach der Behandlung mit Simvastatin also deutlich früher als bei den MCF-7-Zellen ein Effekt. Dennoch waren die signifikanten Ergebnisse nicht konstant für alle Simvastatinkonzentrationen reproduzierbar, sondern traten nur im niedrigen Konzentrationsbereich auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Simvastatin in den untersuchten Konzentrationen ein sehr gering ausgeprägtes zytotoxisches Potential gegenüber den MCF-7- und MCF-10A-Zellen besaß. Außerdem konnte für die MCF-7-Zellen 48 Stunden nach der Bestrahlung eine gesteigerte Zytotoxizität, für die MCF-10A-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung eine abgeschwächte Zytotoxizität nachgewiesen werden.

### **4.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen**

---

Die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung auf Zellen beruht einerseits auf der Veränderung von Membranstrukturen, was zur Inflammation und der damit verbundenen Ausschüttung von Zytokinen führt (Fritz *et al.*, 2011). Andererseits kommt es zur Schädigung von zellulären Molekülen, wie zum Beispiel der DNA, dem Träger der Erbinformationen. Dies führt, je nach Ausmaß der Schädigung und Lokalisation des betroffenen DNA-Abschnitts, zur Mutation oder dem Verlust der Teilungsfähigkeit und einem darauf folgendem Zelltod (Wannenmacher *et al.*, 2006). Obwohl der DNA-Doppelstrangbruch den zahlenmäßig geringsten Anteil an den durch die ionisierender Strahlung verursachten DNA-Schäden darstellt (Powell & McMillan, 1990), so ist er doch aufgrund der Schädigung des Zucker-Phosphat Rückgrats beider DNA-Stränge die gravierendste Läsion. Der Schaden leitet mit einem Arrest des Zellzyklus die Apoptose der Zelle ein und führt in Folge der Strahlentherapie zum beabsichtigten Untergang des atypischen Gewebes (Roos *et al.*, 2013). Es stehen der Zelle jedoch verschiedene Mechanismen, wie die homologen Rekombination, das nichthomologe

Endjoining oder das Einzelstrang-Annealing zur Reparatur dieser Art von DNA-Schaden zur Verfügung (Schaaf *et al.*, 2008).

Da die Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche sowie die zelluläre Reparaturfähigkeit dieser Schäden eine große Bedeutung für die Effektivität der Strahlentherapie darstellt, sollte eine Quantifizierung der verursachten DNA-Schäden in MCF-7- und MCF-10A-Zellen Aufschluss über die strahlensensibilisierende oder protektive Wirkung von Simvastatin geben. Eine Überprüfung der DNA-Doppelstrangbrüche 30 Minuten und 24 Stunden nach der Bestrahlung, ermöglicht auf die Reparaturfähigkeit der Zellen mit und ohne Simvastatin zu schließen. Im Idealfall würde Simvastatin im Sinne eines klinisch nutzbaren, adjuvanten Medikaments einer strahlentherapeutischen Behandlung zum einen die malignen Zellen an der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche hindern und zum anderen das gesunde Gewebe, bei der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche, unterstützen.

Zunächst sollte die Auswirkung von Simvastatin auf die Vertreter der malignen MCF-7-Zelllinie betrachtet werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Prostatakarzinomzellen nach der Behandlung mit Simvastatin und Bestrahlung mit 2 Gy eine reduzierte Kapazität der DNA-Doppelstrangbruchreparatur aufwiesen und mehr Foci in den Zellen verblieben (Chen *et al.*, 2018). Allerdings wurde in dieser Untersuchung mit 100  $\mu\text{M}$  Simvastatin eine hundertfach höhere Konzentration benutzt als in der vorliegenden Arbeit.

Eine weitere Untersuchung zeigte für 10  $\mu\text{M}$  Plivastatin und Simvastatin eine Verzögerung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur von MCF-7-Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy (Efimova *et al.*, 2016).

Unsere Untersuchungsergebnisse sind zunächst ganz allgemein betrachtet zu entnehmen, dass nach der Bestrahlung insgesamt hoch signifikant mehr DNA-Doppelstrangbrüche aufgetreten waren als bei den nicht bestrahlten Kontrollen. Der Zusammenhang zwischen steigender Bestrahlungsdosis und einer Zunahme der zählbaren  $\gamma\text{-H2AX}$ -Foci, die 1:1 die DNA-Doppelstrangbrüche einer Zelle repräsentieren (Kuo & Yang, 2008), ist in der Literatur schon hinreichend beschrieben (Rogakou *et al.*, 1998; Valdiglesias *et al.*, 2013; Mariotti *et al.*, 2013).

30 Minuten nach der Bestrahlung konnte für die bestrahlten und mit Wirkstoff behandelten MCF-7-Zellen eine Steigerung der Focizahl gegenüber der bestrahlten Nativkontrolle ermittelt werden. Die nicht bestrahlte Kontrollgruppe unterschied sich in der Ausprägung ihrer DNA-Doppelstrangbrüche kaum voneinander. Dies war zu erwarten, da unsere vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, dass die untersuchten Konzentrationen nicht hoch genug waren, um eine dosisabhängige Zytotoxizität oder Wachstumshemmung hervorzurufen. Eine rein dosisabhängige Zytotoxizität war nicht Gegenstand der Untersuchung. Es sollte in einem nicht zytotoxischen Dosisbereich untersucht werden, ob additive Effekte auftreten.

24 Stunden nach der Bestrahlung hatte sich die Differenz der Anzahl der Foci von unbestrahlten und bestrahlten MCF-7-Zellen verringert und ähnelte quantitativ der nativen Leerkontrolle zum 30-Minuten-Zeitpunkt. Der Rückgang der Foci, der bestrahlten MCF-7-Zellen ist auf die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche zurückzuführen. Die weiterhin zu detektierenden Foci können auf eine  $\gamma$ H2AX-Hintergrundaktivität zurückzuführen sein. Verschiedene Zellarten, vor allem aber Zellen, die einer malignen Veränderung unterliegen, haben eine unterschiedlich hohe  $\gamma$ H2AX-Hintergrundaktivität (Firsanov, *et al.*, 2011). Weiterhin fiel 24 Stunden nach der Bestrahlung auf, dass sich die mit 1  $\mu$ M Simvastatin behandelte Probe hoch signifikant vom Rest der Gruppe unterschied. Hier schienen unter der Einwirkung von Simvastatin die Reparaturprozesse der Zellen behindert gewesen zu sein und hinterließen somit deutlich mehr residuale DNA-Doppelstrangbrüche. Die Schädigung, beziehungsweise Unterdrückung eines oder mehrerer Reparaturpfade ist für diese Konzentration an Simvastatin denkbar. Zum Beispiel wird diskutiert, dass Statine die nukleäre Rho GTPase Rac1 hemmen, welche an der Regulierung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt ist (Fritz *et al.*, 2015).

Dem gegenüber stand die Betrachtung der nicht malignen MCF-10A-Zellen. Der ursprünglichen Annahme nach, müssten diese bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung von der Behandlung mit Simvastatin profitieren. Diese Annahme basierte unter anderem auf den Erkenntnissen von Ziegler *et al.* (2017). Diese besagen, dass das dem Simvastatin verwandte Statin Lovastatin zu einer Protektion von nicht malignem Gewebe gegenüber von Strahlung führte. Die Behandlung von Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen der Lunge mit einer 1  $\mu$ M Lovastatinlösung führte nach einer fraktionierten Bestrahlung von 4 x 4 Gy zu einer signifikanten Abnahme von Foci, gegenüber der Kontrolle ohne Lovastatinbehandlung (Ziegler *et al.*, 2017). Möglicherweise ließen sich diese Effekte auch für die nicht malignen MCF-10A-Zellen beobachten und eine beschleunigte Reparatur der zur Apoptose führenden DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen.

Am Messzeitpunkt 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 2 Gy konnte zunächst gezeigt werden, dass die initiale Anzahl der aufgetretenen DNA-Doppelstrangbrüche bei den vom Simvastatin unbeeinflussten MCF-10A-Zellen ähnlich hoch waren wie die der MCF-7-Zellen. Somit kann für beide Zelllinien von einer vergleichbaren zellulären Antwort auf die ionisierende Strahlung ausgegangen werden. Interessanterweise zeigte sich, dass im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen die bestrahlten und mit Wirkstoff behandelten MCF-10A-Zellen, abhängig von der Simvastatinkonzentration, tendenziell weniger DNA-Doppelstrangbrüche aufwiesen, als die bestrahlte Kontrolle ohne Wirkstoff. Zudem war der Effekt konzentrationsabhängig. Dieser Verlauf ist auch äquivalent zu der Untersuchung von Ziegler *et al.*, bei der eine Stunde nach der Bestrahlung ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der DNA-

Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden konnte. Eine leicht unterstützende Wirkung des Simvastatins auf die MCF-10A-Zellen während der Frühphase der DNA-Doppelstrangbruchbeseitigung ist also anzunehmen.

Unerwartet war, dass trotz der in den vorangegangenen Versuchen gezeigten nicht vorhandenen Zytotoxizität und Wachstumshemmung der vorliegenden Konzentrationen 24 Stunden nach der Bestrahlung der MCF-10A-Zellen, die mit 0,5  $\mu\text{M}$  behandelte Probe sehr-, die mit 1  $\mu\text{M}$  behandelte Probe sogar hoch signifikant, mehr DNA-Doppelstrangbrüche aufwies als die bestrahlte Kontrolle ohne Wirkstoffeinfluss. Dies steht im Widerspruch zu unserer Annahme und anderen Untersuchungen, die besagen, dass nicht atypisches Gewebe von einer Behandlung mit Statinen unter Bestrahlung profitiert, wie zum Beispiel am Mausmodell mit Pravastatin gezeigt (Doi *et al.*, 2017). Scheinbar wirkte sich nach 24 Stunden das Simvastatin in diesem Versuch negativ auf die Eliminierung der DNA-Doppelstrangbrüche bei MCF-10A-Zellen aus. 24 Stunden nach Einwirkung der ionisierenden Strahlung sollte die DNA-Doppelstrangbruchreparatur abgeschlossen sein, deshalb ist an dieser Stelle von residualen Schäden auszugehen. Da diese Schädigung der Erbinformationen, wie schon erläutert, im weiteren Verlauf zur Apoptose, beziehungsweise Seneszenz der Zellen führt, muss davon ausgegangen werden, dass eine Behandlung der nicht malignen MCF10A-Zellen mit Simvastatin keinen radioprotektiven Effekt hat, sondern gegenteilig zu einer verstärkten Schädigung durch ionisierende Strahlung führt. Es zeigte sich, dass die MCF10A-Zellen unter Simvastatin signifikant weniger in der Lage waren, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren als ohne Simvastatin.

Während es sich in der vorliegenden Untersuchung so darstellt, als würden widererwartend die Reparaturprozesse der nicht malignen Zellen ineffizienter, so konnte zum Beispiel die *in vivo* Untersuchung zur Abschwächung von akuten und subchronischen Gewebeschäden durch Lovastatin (Ostrau *et al.*, 2009), trotz nachgewiesener Protektivität, überhaupt keinen Anhalt für einen Einfluss des Statins auf die Beseitigung der DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Ebenso zeigte eine Untersuchung, dass Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) weder die anfängliche DNA-Doppelstrangbruchbildung, noch die Zahl an verbleibenden DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Nachbestrahlungsperiode von 4 Stunden, durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin beeinflusst wurden (Nübel *et al.*, 2006).

Zusammenfassend war zu sehen, dass die Reparaturprozesse, sowohl der MCF-7-, als auch der MCF-10A-Zellen, nach 24 Stunden unter Simvastatin deutlich ineffektiver abliefen, als ohne Simvastatin. Für die MCF-10A-Zellen konnte durch das Simvastatin von einer anfänglichen Beschleunigung der Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen ausgegangen werden, letztendlich wurde das Schadensniveau aber eher nachteilig beeinflusst.

---

#### 4.4 Klonogenes Überleben

---

Die Untersuchungen zum klonogenen Überleben von MCF-7- und MCF-10A-Zellen sollten zeigen, ob durch die Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung in Kombination mit dem cholesterinbiosynthesehemmenden Simvastatin die Abtötungseffizienz moduliert werden kann. In diesem Versuch standen das Langzeitüberleben der beiden Zelllinien sowie die Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien im Mittelpunkt der Betrachtungen.

Ableitend von den klonogenen Überlebensfraktionen konnte ermittelt werden, dass bei alleiniger Bestrahlung ohne Einfluss von Simvastatin die MCF-7 Zellen radiosensitiver waren als die MCF-10A-Zellen. Dies stimmte mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen überein (Baaße *et al.*, 2017; Matthews *et al.*, 1989).

Den hier vorliegenden Ergebnissen war weiterhin zu entnehmen, dass in der Untersuchung der MCF-7-Zellen nach der Behandlung mit 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin und bei einer Bestrahlung von 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy, das Überleben mit steigender Strahlendosis zwar sank, Simvastatin jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen hatte. Marginal niedrigere Überlebensfraktionen der 3  $\mu\text{M}$  Simvastatinkonzentration gegenüber der Kontrolle, waren bei Bestrahlungsdosen von 0,5 Gy und 2 Gy nachweisbar. Die Erwartungen, die durch die positive *in vitro* Studienlage zur Radiosensibilisierung von malignen Zelllinien nach Behandlung mit Statinen geweckt wurden (Sanli *et al.*, 2011; Lacerda *et al.*, 2014; de Llobet *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2015; Karagkounis *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018) konnten durch die Ergebnisse des Koloniebildungstestes nicht erfüllt werden. Es ließ sich in Folge der Bestrahlung durch die Behandlung mit Simvastatin keine signifikante Senkung des Überlebens nachweisen.

Nach Lacerda *et al.* (2014) zeigten MCF-7-Zellen im 2D-Koloniebildungstest eine dosisunabhängige Radiosensibilisierung bei 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy nach Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  Simvastatin. Allerdings war hier die Inkubationszeit von vier Stunden, bevor die Zellen bestrahlt wurden, im Vergleich zu unserem Versuchsaufbau mit einer Bestrahlung 48 Stunden nach Aussaat und 24 Stunden nach der Behandlung mit Simvastatin deutlich kürzer. Außerdem wurde das Simvastatin direkt bei der Aussaat dem Medium hinzugefügt. Ein Wechsel des Mediums erfolgte nicht. Somit waren die Zellen bis zur Fixation dem Simvastatin ausgesetzt. In unserem Versuchsaufbau erfolgte ein kompletter Mediumwechsel am 7. Tag nach der Aussaat. Es ist somit fraglich, ob bei Lacerda *et al.* (2014) wirklich eine Radiosensibilisierung stattgefunden hat oder das Simvastatin durch die frühe Hinzugabe und den fehlende Mediumwechsel eine Koloniebildung verhindert hat.

Untersuchungen von Adenokarzinomzellen der Lunge (A549-Zellen) nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin zeigten eine dosisunabhängige Radiosensibilisierung bei 2 Gy bis 8 Gy (Sanli *et al.*, 2011). Signifikante dosisabhängige Absenkungen des Überlebens für

unterschiedliche Zellarten des Magen- und Kolorektalkarzinoms (AGS-, MKN1-, SW48-, HCT8-Zellen) nach Behandlung mit 0,2  $\mu\text{M}$  Simvastatin und 1 Gy bis 4 Gy Strahlungs-dosis konnten auch nachgewiesen werden (Lim *et al.*, 2015). Weitere Untersuchungen zum Kolo-rektalkarzinom bestätigten die Ergebnisse für 2  $\mu\text{M}$  und 2 Gy (Karagkounis *et al.*, 2018).

Bei den MCF-10A-Zellen war die vermutete Protektion, beziehungsweise Desensibilisierung von nicht malignen Zellen gegenüber ionisierender Strahlung, die sich in diesem Versuch also durch eine Erhöhung der Überlebensfraktion von mit Simvastatin behandelten und be-strahlten Zellen gegenüber den Kontrollen darstellen würde, in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar. Es war zwar bei niedriger Simvastatinkonzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  eine minimal erhöhte Überlebensfraktion nachweisbar, alle höheren Simvastatinkonzentrationen zeigten jedoch niedrigere Überlebensfraktionen als die ohne Wirkstoff behandelte Kontrolle. Nach Behandlung mit Simvastatinkonzentrationen ab 0,1  $\mu\text{M}$  war bei 4 Gy und 6 Gy Bestrahlungsdosis das Überleben geringer im Vergleich zur Kontrollprobe. Im Versuchsansatz mit 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin war dieser Effekt am stärksten ausgeprägt und signifikant. Dies deckte sich mit den Erkenntnissen aus den Wachstumskurven, wonach 3  $\mu\text{M}$  einen signifikant hemmenden Einfluss auf das Wachstum der MCF-10A-Zellen hatte.

Es konnte den Messwerten entsprechend jedoch kein radioprotektives Potential von Simvas-tatin gegenüber von MCF-10A-Zellen nachgewiesen werden. Die *in vitro* Studienlage zu pro-tektiven Effekten von Statinen gegenüber nicht malignen Zellen ist äußerst dünn und be-schränkt sich zur Zeit noch auf die Untersuchungsergebnisse von Ziegler *et al.*, die Lovasta-tin eine zytoprotektive Aktivität, basierend auf einem verzögerten Eintritt in die Synthesepha-se des Zellzyklus, attestiert (Ziegler *et al.*, 2016).

Warum ließ sich keine signifikante Modulation des Überlebens für die MCF-7- und für die MCF-10A-Zellen lediglich nach der Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin nachweisen? Natürlich muss für beide Zelllinien auch in Betracht gezogen werden, dass es Abweichungen bei der lichtmikroskopischen Auszählung von Kolonien gegeben haben könnte. Je mehr Kolonien in einer Zellkulturflasche wuchsen, desto schlechter war die Abgrenzung der Kolonien zueinan-der. Allerdings stammten die Ergebnisse aus mehreren, unabhängigen Versuchen mit darauf folgender Mittelung der Messwerte. Daher muss davon ausgegangen werden, dass Simvas-tatin unter den gewählten Bedingungen keinen strahlensensibilisierenden Effekt auf die MCF-7-, beziehungsweise protektiven Effekt auf die MCF-10A-Zellen auf das Langzeitüber-leben hatte. Bei den MCF10A-Zellen zeigte sich sogar eine Strahlensensibilisierung unter dem Einfluss von 3 $\mu\text{M}$  Simvastatin.

---

## 4.5 Zellzyklus

---

Eine zelluläre Möglichkeit auf äußere und innere Einflüsse zu reagieren und somit das Überleben der Zellpopulation zu sichern, ist die Regulation des Zellzyklus. Komplexe molekulare Kontrollmechanismen, wie zum Beispiel die vermehrte Expression des Tumorsuppressorgens p53 (Agarwal *et al.*, 1995), die Suppression durch das Retinoblastomgen oder eine Vielzahl von Cyklin-abhängigen Kinasen (CDK's), welche wiederum Cykline verschiedenster Typen regulieren, machen es möglich, die Zellen in Zellzyklusphasen zu arretieren (Neganova *et al.*, 2008; Wächtershäuser *et al.*, 2001). Eine längere Verweildauer in Zellzyklusphasen ist die Voraussetzung um beispielsweise auf DNA-Schäden zu reagieren und sie in angemessener Zeit adäquat reparieren zu können. Ist es für die Zelle nicht möglich, Kontrollpunkte, sogenannte Checkpoints, zu passieren, weil die DNA-Schädigung beispielsweise irreparabel ist, werden die Zellen daran gehindert sich zu teilen. Damit wird eine Übertragung des fehlerhaften Erbguts auf die Tochterzellen vermieden.

In der Literatur ist der Einfluss von Statinen auf den Zellzyklus vielfach vorbeschrieben worden. So wirken Statine, wie das Simvastatin oder das verwandte Lovastatin auf verschiedene Tumorzelllinien vermindern auf die Synthesephase bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteils der G1/G0-Phase (Jakobisiak *et al.*, 2006; Gauthaman *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2008; Keyomarsi *et al.*, 1991). Dies scheint ein Ausdruck der vermehrten DNA-Schäden und eines verlangsamten Reparaturvorganges zu sein, welches letztendlich zu einer Unterdrückung der Proliferation und damit einer Bekämpfung von Tumorzellen beiträgt.

Es war interessant zu überprüfen, ob Simvastatin außerhalb einer zytotoxischen Dosis das Potential besitzt, die DNA-schädigenden Eigenschaften ionisierender Strahlung entweder zu verstärken (MCF-7-Zellen) oder zu vermindern (MCF-10A-Zellen). Nachdem das Auftreten der DNA-Doppelstrangbrüche und die Beseitigung dieser mithilfe der  $\gamma$ -H2AX-Tests schon näher untersucht wurden, sollte nun auch die Verteilung der Zellzyklusphasen als zelluläre Stressreaktionen einen Eindruck auf das Wirkungsprofil von Simvastatin liefern.

Die Ergebnisse für die malignen MCF-7-Zellen zeigten, dass eine von der Konzentration des Simvastatin abhängige, nicht signifikante Abnahme der Synthesephase, zugunsten einer anteilmäßigen Zunahme der G0/G1-Phase, zu erkennen war. Dies ließ auf eine verlängerte Dauer der Reparaturprozesse oder gesteigerte Expression von Tumorsuppressoren schließen, die verhindern, dass die Zellen aus der postmitotischen G0/G1-Phase in die Synthesephase übertreten. Auch in vorangegangenen Untersuchungen konnte eine Änderung der Zellzyklusphasen für die malignen MCF-7-Zellen ermittelt werden. Bei Sanchez *et al.* (2008) wurde, wahrscheinlich auch durch die zum Teil deutlich höheren Simvastatinkonzentrationen von 2,5  $\mu$ M und 40  $\mu$ M bedingt, eine signifikante Änderung des Zellzyklus durch einen Arrest in der G1 Phase festgestellt (Sánchez *et al.*, 2008).

72 Stunden nach der Bestrahlung war ein Unterschied der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen den mit Simvastatin behandelten MCF-7-Zellen und den unbehandelten Kontrollen kaum noch nachweisbar. Dies ließ darauf schließen, dass etwaige Reparaturprozesse abgeschlossen und irreparable Zellen in die Apoptose gegangen waren und sich der photometrischen Bestimmung entzogen.

Die Zellzyklusanalyse der MCF-10A-Zellen, 24 Stunden nach der Bestrahlung, zeigte eine von der Konzentration des Simvastatins abhängige Arretierung der Zellen in der G0G1 Phase. Je höher die Konzentration des Simvastatin war, desto weniger Zellen waren in der Synthesephase. Bei der hohen Simvastatinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ , wurde für die unbestrahlten MCF-10A-Zellen eine sehr signifikante Abnahme der Synthesephase gegenüber der unbestrahlten Kontrolle festgestellt.

Außerdem war schon durch die alleinige Bestrahlung der Zellen, ohne die Zugabe von Simvastatin, ein deutlicher Effekt feststellbar. Sehr signifikant nahm der Anteil der Zellen in der G0G1-Phase zu, bei ebenfalls sehr signifikanter Abnahme der Synthese- und G2/M-Phase.

Dies ist auf die schon mehrfach angesprochene Organisation der zellulären Reparaturvorgänge zurückzuführen. Mit DNA-Schäden, welche durch die ionisierende Strahlung hervorgerufen werden können, ist es Zellen mit einem intakten Reparatursystem nicht möglich die Checkpoints zu durchlaufen, um zur Mitose- der Teilungsphase zu gelangen. In der Folge nimmt der Anteil der Zellen, die sich in der G0G1- Phase befinden, zu, um repariert zu werden.

Die signifikante Beeinflussung des Zellzyklus durch die Strahlung oder der Zugabe von Simvastatin, zeigt auch in diesem Versuch, dass die Normalzellen insgesamt sensibler auf äußere Einflüsse reagierten als die malignen MCF-7-Zellen.

Unter den bestrahlten Zellen nahm der Anteil, der sich in der Synthesephase befindenden Zellen ab, je höher die Konzentration des Simvastatins war. Jedoch konnte hier keine Signifikanz festgestellt werden.

In der Arbeit von Ziegler *et al.* wurde ein Lovastatin vermittelter radioprotektiver Effekt auf nicht maligne Keratinozyten unter anderem an der Senkung des sub-G1-Peaks festgemacht (Ziegler *et al.*, 2016). In einem sub-G1-Peak werden apoptotische Zellen identifiziert (Plesca *et al.*, 2008). Signifikant erniedrigte sub-G1-Werte wurden bei Ziegler *et al.* jedoch erst nach Strahlendosen von 10 Gy und 30 Gy ermittelt. Ein sub-G1-Peak war in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit durchweg nicht ermittelbar. Möglich ist, dass die einmalige Bestrahlung mit 2 Gy nicht ausreichte, um einen messbar großen sub-G1-Peak, verursacht durch apoptotische Zellen, zu ermitteln und damit eine Protektion gegenüber der Strahlung darzustellen. Weiterhin wurden die Simvastatinkonzentrationen gezielt ausgewählt, da sie nicht in einem zytotoxischen Bereich lagen.

---

72 Stunden nach der Bestrahlung waren die Änderungen der Zellzyklusphasenanteile der MCF-10A-Zellen gegenüber den jeweiligen Kontrollen deutlich kleiner als 24 Stunden nach der Bestrahlung. Hier wurde jedoch bei den unbestrahlten Zellen eine Zunahme des Syntheseanteils mit steigender Konzentration festgestellt, während bei den bestrahlten Zellen einzig bei den Zellen, die mit 0,05  $\mu\text{M}$  Simvastatin behandelt wurden eine leichte Zunahme gegenüber der bestrahlten Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

---

## 5. Zusammenfassung

---

Das Medikament Simvastatin, welches zur Unterdrückung der Cholesterinbiosynthese und der damit einhergehenden Senkung des LDL- und Gesamtcholesterinspiegels im klinischen Alltag häufig verschrieben wird, fiel bei der Betrachtung der epidemiologischen Daten zur Langzeitsicherheit durch seine unterschiedliche Wirksamkeit auf Tumor- und Normalgewebszellen auf. In der vorliegenden *In vitro*-Arbeit wurde der Einfluss von Simvastatin auf die Radiosensibilität von Tumorzellen aus Brustgewebe untersucht. Dabei kamen Zellen der Linie MCF-7 zum Einsatz. Außerdem wurde überprüft, ob nicht maligne Zellen des Brustgewebes, hier MCF-10A-Zellen, besser in der Lage sind, sich vor Strahlenschäden zu schützen, wenn sie mit Simvastatin behandelt wurden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Für die MCF-7- und MCF-10A-Zellen wurde ein nicht wachstumshemmender Konzentrationsbereich bis 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin ermittelt, um in den weiteren Versuchen die radiomodulierenden Effekte genauer untersuchen zu können. Die nicht malignen MCF-10A-Zellen reagierten deutlich sensibler auf Simvastatin als die MCF-7-Tumorzellen.
- Die Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels LDH-Assay zeigten, dass Simvastatin allein in den eingesetzten Konzentrationsbereichen nur in geringem Maße auf beide Zelllinien zytotoxisch wirkte. Leichte Effekte der Radiomodulation durch Simvastatin waren 24 Stunden nach der Bestrahlung für die nicht malignen MCF-10A-Zellen erkennbar. Die Zytotoxizität der Strahlung konnte durch Simvastatin gesenkt werden. Für die malignen Zellen war zu diesem Zeitpunkt keine Sensibilisierung erkennbar. 72 Stunden nach der Bestrahlung nahm die Zytotoxizität für beide Zelllinien konzentrationsabhängig zu, jedoch unabhängig von der Bestrahlungsdosis.
- Die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels  $\gamma\text{H2AX}$ -Assay, 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 2 Gy, zeigte eine deutliche Zunahme dieser DNA-Schäden in beiden Zelllinien. Bei den nicht malignen MCF-10A-Zellen nahm nach der Bestrahlung die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche mit zunehmender Simvastatinkonzentration tendenziell ab.
- 24 Stunden nach der Bestrahlung konnten in beiden Zelltypen gegenüber den wirkstofffreien Kontrollen erhöhte, residuale DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrü-

chen nachgewiesen werden, die in den MCF-7-Zellen nach 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin und in den MCF-10A-Zellen nach 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin signifikant waren.

- Der Koloniebildungstest zur Messung des klonogenen Überlebens erbrachte keinen Nachweis einer Radiosensibilisierung der Tumorzellen oder einer radioprotektiven Wirkung auf die Normalzellen durch Simvastatin. Ferner zeigte sich für die MCF-10A-Normalzellen ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  und höher eine Strahlensensibilisierung. Bei 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin und 4 Gy Bestrahlungsdosis war die Strahlensensibilisierung signifikant.
- In der Zellzyklusanalyse zeigte sich für die MCF-10A-Normalzellen, bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin, eine signifikante Abnahme der Synthesephase gegenüber der ebenfalls unbestrahlten Simvastatin-freien Kontrolle. Außerdem wurde bei dieser Zelllinie durch die Bestrahlung eine signifikante Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase, bei gleichzeitig signifikanter Abnahme der Synthese- und G2/M-Phase im Vergleich der bestrahlten- zu den unbestrahlten Kontrollen der gleichen Simvastatinkonzentration deutlich. Bei den MCF-7-Tumorzellen konnte keine signifikante Änderung des Zellzyklus ermittelt werden.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass es bei der Applikation von Simvastatin im nicht wachstumshemmenden Konzentrationsbereich bis 1  $\mu\text{M}$  weder zur Radiosensibilisierung der MCF-7-Tumorzellen noch zur Radioprotektion der MCF-10A-Normalzellen kommt. Daher konnten die Erwartungen an Simvastatin als eine potentielle, adjuvante Therapieoption zur Strahlenbehandlung eines Mammakarzinoms, bei gleichzeitig strahlendesensibilisierenden, schützendem Effekt auf gesundes Brustgewebe, durch diese Studie nicht erfüllt werden.

---

## 6. Ausblick

---

Die heutzutage weitverbreitete klinische Anwendung der nebenwirkungsarmen Statine als Cholesterinsenker sowie die zuversichtlichen epidemiologischen Daten zum Einfluss der Statine auf die verschiedenen Entitäten maligner Erkrankungen, machen die Statine auch weiterhin zu einem spannenden Forschungsobjekt.

Mit der Untersuchung der beiden Zelllinien MCF-7 und MCF-10A konnte an dieser Stelle nur ein kleiner Teil der potentiell möglichen Anwendungsgebiete überprüft werden. Eine Ausweitung der Untersuchungen auf andere Brustkrebszelllinien ist denkbar. Außerdem ist es weiterhin unklar, wie und ob die Simvastatinkonzentration nach der Einnahme im Gewebe akkumuliert und bei welchen Konzentrationen es, an welchen Zellen, eine potentielle Wirkung im Sinne der vorliegenden Untersuchung gibt.

Auch ist stark anzunehmen, dass die Kultivierungsbedingungen einen Effekt auf Untersuchungsergebnisse haben könnten. Weitere Erkenntnisse könnten beispielsweise durch eine dreidimensionale Zellkultivierung gewonnen werden.

Um die Therapiemöglichkeiten in der Onkologie mithilfe der Statine zu erweitern, ist zukünftig ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Medikamentengruppe notwendig. Um das mögliche Potential der Statine auszuschöpfen ist daher auch hier eine weitergehende Forschung zwingend notwendig.

---

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., & Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Cell Biology*, 92, 8493–8497.
- AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. (2020). *Breast Care*. Link: [https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/\\_leitlinien/kommission\\_mamma/2020/Updated\\_Guidelines\\_2020.pdf](https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2020/Updated_Guidelines_2020.pdf).
- Ahern, T. P., Lash, T. L., Damkier, P., Christiansen, P. M., & Cronin-Fenton, D. P. (2014). Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. *Lancet Oncol.*, 15(10).
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., & Starke, K. (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier GmbH, (Kapitel 25.2.2, Seite 576 -578)
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. (2012). Empfehlungen zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen. In *Arzneiverordnung in der Praxis* (Vol. 39, Seite 55–66).
- Baaße, A., Juerß, D., Reape, E., Manda, K., & Hildebrandt, G. (2017). Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy. *Cytotechnology*, 1–11.
- Bessette, D. C., Tilch, E., Seidens, T., Quinn, M. C. J., Wiegmanns, A. P., Shi, W., Chenevix-Trench, G. (2015). Using the MCF10A/MCF10CA1a breast cancer progression cell line model to investigate the effect of active, mutant forms of EGFR in breast cancer development and treatment using gefitinib. *PLoS ONE*, 10(5), 1–25.
- Björkhem-Bergman, L., Lindh, J. D., & Bergman, P. (2011). What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(1), 164–165.
- Brennan, M. E. (2016). The role of clinical breast examination in cancer screening for women at average risk : A mini review. *Maturitas*, 92, 61–63.
- Chan, K. K. W., Oza, A. M., & Siu, L. L. (2003). *The Statins as Anticancer Agents*. 9(January), 10–19.
- Chen, Y. A., Shih, H. W., Lin, Y. C., Hsu, H. Y., Wu, T. F., Tsai, C. H.,Lai, C. H. (2018). Simvastatin sensitizes radioresistant prostate cancer cells by compromising DNA double-strand break repair. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JUN), 1–9.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., MacKinnon, P., McGale, T., McHugh, R., Peto, C., Taylor, Y. W. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival : an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 366, 2087–2106.
- Dale, K. M., Coleman, C. I., Henyan, N. N., Kluger, J., & White, C. M. (2006). Statins and Cancer Risk: A Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 295,

74–80.

- de Llobet, L. I., Baro, M., Mesia, R., & Balart, J. (2014). Simvastatin enhances the effects of radiotherapy and cetuximab on a cell line (FaDu) derived from a squamous cell carcinoma of head and neck. *Translational Oncology*, 7(4), 513–522.
- Denoyelle, C., Vasse, M., Körner, M., Mishal, Z., Ganné, F., Vannier, J.-P., Soria, C. (2001). Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*, 22(8), 1139–1148.
- Destatis.(2021).[https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21\\_N010\\_231.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html)
- Doi, H., Matsumoto, S., Odawara, S., Shikata, T., Kitajima, K., Tanooka, M., Hirota, S. (2017). Pravastatin reduces radiation-induced damage in normal tissues. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 1765–1772.
- Dunst, J., Budach, V., & Schmoll, H. J. (2006). Kombination von Strahlen- und Chemotherapie. In *Kompendium Internistische Onkologie* (Seite 627–634). Springer Berlin Heidelberg.
- Efimova, E. V., Ricco, N., Labay, E., Mauceri, H. J., Flor, A. C., Ramamurthy, A., Kron, S. J. (2016). HMG-CoA reductase inhibition delays DNA repair and promotes senescence after tumor irradiation. *33(2)*, 557–573.
- Firsanov, D. V., Solovjeva, L. V., & Svetlova, M. P. (2011). H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clinical Epigenetics*, 2(2), 283–297.
- Fisher, B., & Fisher, E. R. (1966). Transmigration of Lymph Nodes by Tumor Cells. *Science*, 152, 1397–1398.
- Ford, I., Murray, H., Mccowan, C., & Packard, C. J. (2016). Long-Term Safety and Efficacy of Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Statin Therapy. *Circulation*, 1073–1080.
- Fritz, G., & Henninger, C. (2015). Rho gtpases: Novel players in the regulation of the DNA damage response? *Biomolecules*, 5(4), 2417–2434.
- Fritz, G., Henninger, C., & Huelsenbeck, J. (2011). Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *British Medical Bulletin*, 97(1), 17–26.
- Gauthaman, K., Manasi, N., & Bongso, A. (2009). Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 962–973.
- Gøtzsche, P. & Jørgensen, K. (2013). *Screening for breast cancer with mammography (Review)*. Cochrane Library.
- Halsted, W. S. (1894). *The results of operations for the cure of cancer of the breast*

- performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894.*
- Hölzel, D., Engel, J., Schmidt, M., & Sauer, H. (2001). *Modell zur primären und sekundären Metastasierung beim Mammakarzinom und dessen klinische Bedeutung*. *Strahlentherap Onkol* 177, 10–24.
- Horn, F. (2005). *Biochemie des Menschen* (5. Auflage), Georg Thieme Verlag, Seite 236–237.
- Jacobs, D., Blackburn, H., Higgins, M., Reed, D., Iso, H., McMillan, G., ... Yusuf, S. (1992). Report of the conference on low blood cholesterol-mortality associations. *Circulation*, 86, 1046–1060.
- Jakobisiak, M., Bruno, S., Skierski, J. S., & Darzynkiewicz, Z. (2006). Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3628–3632.
- Kääb-Sanyal, V., & Hand, E. (2017). Jahresbericht Evaluation 2015. *Deutsches Mammographie-Screening Programm*. Link: [http://www.mammo-programm.de/download/Factsheet\\_Eval2012.pdf](http://www.mammo-programm.de/download/Factsheet_Eval2012.pdf)
- Karagkounis, G., DeVecchio, J., Ferrandon, S., & Kalady, M. F. (2018). Simvastatin enhances radiation sensitivity of colorectal cancer cells. *Surgical Endoscopy*, 32(3), 1533–1539.
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, M., & Pardee, A. B. (1991). Synchronization of Tumor and Normal Cells from G1 to Multi Cell Cycles by Lovastatin. *Cancer Research*, 3602–3609.
- Kotamraju, S., Willams, C. L., & Kalyanaraman, B. (2007). Statin-induced breast cancer cell death: Role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways. *Cancer Research*, 67(15), 7386–7394.
- Kuo, L. J., & Yang, L. X. (2008).  $\gamma$ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22(3), 305–310.
- Kuzu, O. F., Noory, M. A., & Robertson, G. P. (2016). The role of cholesterol in cancer. *Cancer Res. Author Manuscript*, 76(8), 2063–2070.
- Lacerda, L., Reddy, J. P., Liu, D., Larson, R., Li, L., Masuda, H., Woodward, W. A. (2014). Simvastatin Radiosensitizes Differentiated and Stem-Like Breast Cancer Cell Lines and Is Associated With Improved Local Control in Inflammatory Breast Cancer Patients Treated With Postmastectomy Radiation. *STEM CELLS Translational Medicine*, 3(7), 849–856.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.1, 2018 AWMF Registernummer: 032-045OL.* (2018). (September), 32–45.
- Lim, T., Lee, I., Kim, J., & Kang, W. K. (2015). Synergistic Effect of Simvastatin Plus

- Radiation in Gastric Cancer and Colorectal Cancer: Implications of BIRC5 and Connective Tissue Growth Factor. *Radiation Oncology Biology*, 93(2), 316–325.
- Liu, B., Yi, Z., Guan, X., & Ma, F. (2017). The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(1), 1–11.
- Liu, S., Uppal, H., Demaria, M., Desprez, P.-Y., Campisi, J., & Kapahi, P. (2016). Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Scientific Reports*, 5(1), 17895.
- Mariotti, L. G., Pirovano, G., Savage, K. I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K. M., & Schettino, G. (2013). Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS ONE*, 8(11), 1–12.
- Matthews, J. H. L., Meeker, B. E., & Chapman, J. D. (1989). Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 16(1), 133–138.
- Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2012). The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol.*, 13(9), 1016–1023.
- Narod, S. A., Iqbal, J., Giannakeas, V., Sopik, V., & Sun, P. (2015). Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncology*, 1(7), 888–896.
- Neganova, I., & Lako, M. (2008). G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *Journal of Anatomy*, 213(1), 30–44.
- Nielsen, S. F., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2012). Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1792–1802.
- Njor, S., Nystrom, L., Moss, S., Paci, E., Broeders, M., Segnan, N., & Lynge, E. (2012). Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: A review of incidence-based mortality studies. *Journal of Medical Screening*, 19(SUPPL. 1), 33–41.
- Nübel, T., Damrot, J., Roos, W. P., Kaina, B., & Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clinical Cancer Research*, 12(3 I), 933–939.
- Ostrau, C., Hülsenbeck, J., Herzog, M., Schad, A., Torzewski, M., Lackner, K. J., & Fritz, G. (2009). Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 492–499.
- Pedersen, T. R., Kjekshus, J., Berg, K., Haghfelt, T., Faergeman, O., Thorgeirsson, G., Kristianson, K. (1994). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study ( 4S ). *The Lancet*, 344, 1383–1389.
- Plesca, D., Mazumder, S., & Almasan, A. (2008). DNA Damage Response and Apoptosis.

- Methods Enzymol.*, 446(08), 107–122.
- Powell, S., & McMillan, T. J. (1990). DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, 19(2), 95–108.
- Puck, T. T., & Marcus, P. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, (39).
- Rhomberg, W., & Dunst, J. (2006). Radiosensitizer. In *Kompendium internistische Onkologie*. Springer Verlag Heidelberg. Kapitel 13.10, Seite 619-625.
- Robert Koch - Institut, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013 / 2014. 11. Ausgabe*
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 \*. *273(10)*, 5858–5868.
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2), 237–248.
- Sánchez, C. A., Rodríguez, E., Varela, E., Zapata, E., Páez, A., Massó, F. A., López-Marure, R. (2008). Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Investigation*, 26(7), 698–707.
- Sanlı, T., Liu, C., Rashid, A., Hopmans, S. N., Tsiani, E., Schultz, C., Tsakiridis, T. (2011). Lovastatin Sensitizes Lung Cancer Cells to Ionizing Radiation. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(3), 439–450.
- Schaaf, C. P., & Zschocke, J. in *Basiswissen Humangenetik* (3. Auflage). Springer-Verlag GmbH, Kapitel 32.5, Seite 435-436.
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur* (3. Auflage). Kapitel 9, Seite 139, Kapitel 13, Seite 206, Kapitel 14.3, Seite 239-245, Kapitel 13.2.1, Seite 211, Kapitel 2.3., Seite 18, Kapitel 3.2.2., Seite 45
- Schwab, F. D., Huang, D. J., Schmid, S. M., Schötzau, A., & Güth, U. (2015). Self-detection and clinical breast examination : Comparison of the two “classical” physical examination methods for the diagnosis of breast cancer. *The Breast*, 24, 90–92.
- Seeger, H., Wallwiener, D., & Mueck, A. O. (2003). *Statins Can Inhibit Proliferation of Human Breast Cancer Cells in Vitro*. 47–48.
- Shackelford, D. B., & Shaw, R. J. (2009). *The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression*. 9(8), 563–575.
- Sinn, H.-P., & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition. *BreastCare*, 149–154.
- Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Line, E. C., Peterson, W. D., Brenz, R., Brooks, S. C. (1990). Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human

- Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer*, 6075–6086.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, a., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1409–1416.
- Steinberg, D. (2006). *An interpretive history of the cholesterol controversy , part V: The discovery of the statins and the end of the controversy*. 47.
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Tang, P. (2010). Breast Cancer: Basic and Clinical Research. 35–41.
- Sutherland, R. L., Hall, R. E., & Taylor, I. W. (1983). Cell Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Mammary Carcinoma Cells in. *Cancer Research*, 43, 3998–4006.
- The Global Cancer Observatory. (2019). *Globocan 2018*.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., & Bonassi, S. (2013). g H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research-Reviews*, 753(1), 24–40.
- Vinh-hung, V., & Verschraegen, C. (2004). *Breast-Conserving Surgery With or Without Radiotherapy: Pooled-Analysis for Risks of Ipsilateral Breast Tumor Recurrence and Mortality*. 96(2), 115–121.
- Wächtershäuser, A., Akoglu, B., & Stein, J. (2001). HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*, 22(7), 1061–1067.
- Wang, T., Seah, S., Loh, X., Chan, C.-W., Hartman, M., Goh, B.-C., & Lee, S.-C. (2016). Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget*, 7(3), 2532–2544.
- Wannenmacher, M., Debus, J., & Wenz, F. (2006). *Strahlentherapie*. Springer-Verlag GmbH, Kapitel 1-3, Seite 1-80.
- Zhang, Y., & Hunter, T. (2015). *Roles of Chk1 in Cell Biology and Cancer Therapy*. 1(5), 1–4.
- Zhao, X., Yang, H., Jiang, G., Ni, M., Deng, Y., Cai, J., Tao, X. (2014). Simvastatin attenuates radiation-induced tissue damage in mice. *Journal of Radiation Research*, 55(2), 257–264.
- Ziegler, V., Albers, A., & Fritz, G. (2016). Lovastatin protects keratinocytes from DNA damage-related pro-apoptotic stress responses stimulated by anticancer therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1082–1092.
- Ziegler, V., Henninger, C., Simiantonakis, I., Buchholzer, M., Ahmadian, M. R., Budach, W., & Fritz, G. (2017). Rho inhibition by lovastatin affects apoptosis and DSB repair of primary human lung cells in vitro and lung tissue in vivo following fractionated irradiation. *Cell Death and Disease*, 8(8), e2978.

---

## 8. Danksagung

---

Es war ein langer Weg vom ersten Kennenlernen in einem Seminar des strahlenbiologischen Labors, bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Es begleiteten mich viele Menschen, denen ich für ihre unermüdliche Hilfe und Geduld herzlich danken möchte:

**Herrn Prof. Dr. Guido Hildebrandt** für die Übernahme der Betreuung, die mir damit gegebene Möglichkeit in der Klinik für Strahlentherapie zu promovieren und das stetige Interesse an meiner Arbeit.

**Frau Dr. Katrin Manda** für die vielen Denkanstöße, die große Hilfe bei der Organisation, die wertvolle, aufgebrauchte Zeit für die Korrektur meiner Arbeit, den Ansporn, die Deadlines, das jeder Zeit offene Ohr sowie die äußerst nette und freundliche Zusammenarbeit.

Den **Mitarbeitern der Medizinphysik** für die Durchführung der Bestrahlung und Klärung fachlicher Fragen.

**Dajana Juerß** für die Idee und auch die Vorlage, die zur Erstellung dieser Arbeit geführt haben, für die Anstrengungen, die die Lehre der einfachsten Grundlagen in einem Zellkulturlabor mit sich bringt, die Geduld, die für die Lösung der kniffligen Probleme nötig war, die selbstlose Hilfsbereitschaft, die herzliche und angenehme Art und natürlich auch für die unvergessenen besten Pfannkuchen der Welt.

**Jana Baake, Annemarie Schröder, Anke Sund und Annelie Koenen** für die tolle Zusammenarbeit im Labor, die vielen Tipps und Tricks, den Beistand, wenn die Technik mal wieder nicht so wollte, wie sie soll, die Aufmunterungen, wenn nicht die Technik, sondern der Anwender die Ursache des Problems war, die Hilfe am Computer, die Diskussionen bei den AG-Seminaren und natürlich auch für die gute Zeit während der Wartezeiten zwischen den Versuchen.

**Meinen Eltern** und natürlich auch im Besonderen **meiner eigenen kleinen Familie** für den Rückhalt, die Unterstützung, die aufbauende Worte, das gegebene Vertrauen und letztlich auch für das Verständnis, wenn es wegen „dem Labor“ mal wieder später wurde.

**9. Eidesstattliche Versicherung**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Berlin, den 02.08.2021

Paul Fischer