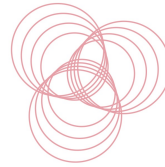


Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. GUIDO HILDEBRANDT

*IN-VITRO-UNTERSUCHUNG DER KOMBINATION
VON MITOCHONDRIEN-TARGETED DRUGS
UND IONISIERENDER STRAHLUNG*



INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

ANN-SOPHIE ZIMMERMANN | GEB. AM 16.09.1997 IN DUDERSTADT

AUS LEINEFELDE-WORBIS

ROSTOCK | 23.09.2024

GUTACHTER:

ERSTGUTACHTER: Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt

EINRICHTUNG: Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin
Rostock

ZWEITGUTACHTER: PD Dr.-Ing. Dr. habil. med. Benjamin Frey

EINRICHTUNG: LEITER DER Strahlenklinik der Universitätsmedizin Erlangen

DRITTGUTACHTER: PD Dr. rer. nat. Nadja Engel

EINRICHTUNG: Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitäts-
medizin Rostock

DATUM DER EINREICHUNG: 23.09.2024

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 15.04.2025

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Manda K, Baake J, **Zimmermann AS**, Hildebrandt G (2021): Einfluss ionisierender Strahlung auf die Mitochondrien von Tumor- und Normalgewebszellen. 27. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) – virtuelle Posterpräsentation P15-29. <https://doi.org/10.1007/s00066-021-01791-4>.

INHALTSVERZEICHNIS

	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
	TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1	EINLEITUNG	1
1.1	MITOCHONDRIEN.....	1
1.2	FUNKTIONSWEISE DER ATMUNGSKETTE	2
1.3	MITOCHONDRIEN-ASSOZIIERTE FORMEN DES ZELLTODES.....	3
1.4	MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION UND DESSEN REGULATION DURCH ANTIOXIDATIONS-SYSTEME	6
1.5	EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE ZELLE - INSBESONDERE AUF MITOCHONDRIEN.....	7
1.5.1	WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE DNA UND DEREN REPARATUR.....	7
1.5.2	EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DAS MITOCHONDRIALE GENOM.....	8
1.6	MITOCHONDRIAL-TARGETED DRUGS	8
1.6.1	Bz-423	13
1.6.2	MYXOTHIAZOL.....	14
1.7	ZIEL DER DISSERTATION.....	16
2	MATERIAL & METHODEN	17
2.1	ZELLKULTUREN	17
2.1.1	ZELLINIE A549	17
2.1.2	ZELLINIE HT-29.....	17
2.2	WIRKSTOFFE: MITOCHONDRIEN-TARGETED DRUGS.....	18
2.2.1	Bz-423	18
2.2.2	MYXOTHIAZOL.....	18
2.3	BESTRAHLUNG	18
2.4	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	19
2.4.1	AUSFRIEREN DER ZELLEN.....	19
2.4.2	ZELLKULTIVIERUNG	20

2.4.3	ZELLZAHLBESTIMMUNG.....	20
2.5	BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT MITTELS WACHSTUMSKURVEN	21
2.5.1	WACHSTUMSKURVEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423	21
2.5.2	WACHSTUMSKURVEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	21
2.6	ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS MITTELS KOLONIEBILDUNGSTEST	22
2.6.1	KOLONIEBILDUNGSTEST UNTER EINFLUSS VON BZ-423	22
2.6.2	KOLONIEBILDUNGSTESTS UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	23
2.7	BESTIMMUNG DER ZYTOTOXIZITÄT MITTELS WST-1-TESTS.....	23
2.8	ANALYSE VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN UND DEREN REPARATURKAPAZITÄT MITTELS γ H2AX-ASSAY	24
2.9	STATISTISCHE ANALYSEN.....	25
2.10	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	26
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	EINFLUSS VON BZ-423 AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER A549- ZELLEN.....	29
3.2	EINFLUSS VON BZ-423 AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER HT-29- ZELLEN.....	34
3.3	EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER A549-ZELLEN	39
3.4	EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER HT-29-ZELLEN.....	45
3.5	VERGLEICH DES WACHSTUMS DER A549- UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL	51
3.6	ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG	52
3.7	ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG	54
3.8	ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG.....	56
3.9	ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG.....	58

3.10	VERGLEICH DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL	60
3.11	BESTIMMUNG DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT DER A549- UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 UND BESTRAHLUNG.....	61
3.12	BESTIMMUNG DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT DER A549- UND HT-29-ZELLEN VON MYXOTHIAZOL UND BESTRAHLUNG	66
3.13	VERGLEICH DER METABOLISCHEN AKTIVITÄTEN DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL	69
3.14	UNTERSUCHUNG DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN IN A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL.....	70
3.15	UNTERSUCHUNG DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN IN HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL.....	73
3.16	VERGLEICH DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL.....	76
4	DISKUSSION.....	78
4.1	WACHSTUM	78
4.1.1	WACHSTUM UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN.....	78
4.1.2	WACHSTUM UNTER EINFLUSS VON BZ-423	79
4.1.3	WACHSTUM UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	81
4.2	KLONOGENES ÜBERLEBEN	83
4.3	METABOLISCHE AKTIVITÄT.....	86
4.4	REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	AUSBLICK.....	93
	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
	THESEN	
	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	
	LEBENS LAUF	
	DANKSAGUNG.....	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: ÜBERSICHT ÜBER DEN AUFBAU DER ATMUNGSKETTE (MODIFIZIERT NACH LÖFFLER <i>et al.</i> , 2014).....	2
ABB. 2: ÜBERSICHT DER APOPTOSEAKTIVIERUNGSWEGE (MODIFIZIERT NACH BAMBERG <i>et al.</i> , 2009).....	4
ABB. 3: ÜBERSICHT MTD ALS INHIBITOREN DER ATMUNGSKETTE, SOWIE CITRATZYKLUS (SAINERO-ALCOLADO <i>et al.</i> , 2022).	11
ABB. 4: STRUKTURFORMEL VON Bz-423 (JOHNSON <i>et al.</i> , 2005).....	13
ABB. 5: ÜBERSICHT ÜBER DEN WIRKMECHANISMUS VON Bz-423 AN DER ATMUNGSKETTE (MODIFIZIERT NACH LÖFFLER <i>et al.</i> , 2014; BLATT <i>et al.</i> , 2009).....	14
ABB. 6: STRUKTURFORMEL VON MYXOTHIAZOL (THIERBACH & REICHENBACH, 1981).....	15
ABB. 7: MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER A549-ZELLEN, 10X-VERGRÖßERUNG (LINKS) UND 20X-VERGRÖßERUNG (RECHTS) MIT PHASENKONTRASTMIKROSKOP	18
ABB. 8: MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER HT-29-ZELLEN, 10X-VERGRÖßERUNG (LINKS) UND 20X-VERGRÖßERUNG (RECHTS) MIT PHASENKONTRASTMIKROSKOP	19
ABB. 9: VERSA HD-LINEARBESCHLEUNIGERS DER FIRMA ELEKTA LTD, CRAWLEY / GROßBRITANNIEN, IN GESAMTDARSTELLUNG IN DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK.....	19
ABB. 10: WACHSTUM DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423.	29
ABB. 11: ANTEIL VITALER A549-ZELLEN AN DER GESAMTZELLZAHL UNTER EINFLUSS VON Bz-423.	31
ABB. 12: MITTLERER DURCHMESSER LEBENDER A549-ZELLEN WÄHREND DES WACHSTUMS UNTER EINFLUSS VON Bz-423.	32
ABB. 13: MITTLERER DURCHMESSER TOTER A549-ZELLEN WÄHREND DES WACHSTUMS UNTER EINFLUSS VON Bz-423..	33
ABB. 14: WACHSTUM DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423.....	34
ABB. 15: ANTEIL VITALER HT-29-ZELLEN AN DER GESAMTZELLZAHL UNTER EINFLUSS VON Bz-423.	36
ABB. 16: MITTLERER DURCHMESSER LEBENDER HT-29-ZELLEN WÄHREND DES WACHSTUMS UNTER EINFLUSS VON Bz-423.	37
ABB. 17: MITTLERER DURCHMESSER TOTER HT-29-ZELLEN WÄHREND DES WACHSTUMS UNTER EINFLUSS VON Bz-423	38
ABB. 18: WACHSTUMSKURVE DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	39
ABB. 19: ANTEIL VITALER A549-ZELLEN AN DER GESAMTZELLZAHL UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL.....	42
ABB. 20: DURCHMESSER VITALER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL.....	43
ABB. 21: DURCHMESSER TOTER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL.....	44

ABB. 22: WACHSTUMSKURVE HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL.....	45
ABB. 23: VITALITÄT DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL.....	48
ABB. 24: DURCHMESSER VITALER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	49
ABB. 25: DURCHMESSER TOTER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL	50
ABB. 26: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423, NORMIERT.....	53
ABB. 27: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423.....	55
ABB. 28: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL, NORMIERT.	57
ABB. 29: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL, NORMIERT.	59
ABB. 30: ÜBERSICHT ÜBER DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN DER A549 UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS DER MTD Bz-423 UND MYXOTHIAZOL SOWIE BESTRAHLUNG, NORMIERT.....	60
ABB. 31: METABOLISCHE AKTIVITÄT DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND BESTRAHLUNG	62
ABB. 32: METABOLISCHE AKTIVITÄT DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND BESTRAHLUNG.....	64
ABB. 33: METABOLISCHE AKTIVITÄT DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL UND BESTRAHLUNG	66
ABB. 34: METABOLISCHE AKTIVITÄT DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL UND BESTRAHLUNG	68
ABB. 35: „FOCI“ IN A549-ZELLEN, UNBESTRAHLT UND NACH BESTRAHLUNG MIT 6 GY UND UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND MYXOTHIAZOL NACH EINER REPARATURZEIT VON 30 MIN.....	70
ABB. 36: „FOCI“ IN A549-ZELLEN, UNBESTRAHLT UND NACH BESTRAHLUNG MIT 6 GY UND UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND MYXOTHIAZOL NACH EINER REPARATURZEIT VON 24 H.	71
ABB. 37: ANZAHL DER DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE (γ -H2AX-FOCI) DER A549 ZELLEN NACH BESTRAHLUNG UND UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND MYXOTHIAZOL.....	72
ABB. 38: „FOCI“ IN HT-29-ZELLEN, UNBESTRAHLT UND NACH BESTRAHLUNG MIT 6 GY UND UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND MYXOTHIAZOL NACH EINER REPARATURZEIT VON 30 MIN.....	73
ABB. 39: „FOCI“ IN HT-29-ZELLEN, UNBESTRAHLT UND NACH BESTRAHLUNG MIT 6 GY UND UNTER EINFLUSS VON Bz-423 UND MYXOTHIAZOL NACH EINER REPARATURZEIT VON 24 H.	74
ABB. 40: γ -H2AX - UNTERSUCHUNG DER HT-29-ZELLEN UNTER BEHANDLUNG MITTELS Bz- 423 UND MYXOTHIAZOL.....	75

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: ÜBERSICHT VON MITOCHONDRIEN-TARGETED DRUGS (NACH NEUZIL <i>et al.</i> , 2013; SAINERO-ALCOLADO <i>et al.</i> , 2022).	12
TAB. 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANGESETZTEN VERDÜNNUNGEN FÜR BZ-423 AUS DER STAMMLÖSUNG.....	21
TAB. 3: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANGESETZTEN VERDÜNNUNGEN FÜR MYXOTHIAZOL AUS DER STAMMLÖSUNG	22
TAB. 4: ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKSTOFFZUGABE BZ-423 AUS DER STAMMLÖSUNG ZU DEN KOLONIEBILDUNGSTESTS.	23
TAB. 5: ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKSTOFFZUGABE MYXOTHIAZOL AUS DER STAMMLÖSUNG ZU DEN KOLONIEBILDUNGSTESTS BEIDER ZELLINIEN.	23
TAB. 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN MATERIALIEN UND GERÄTE, SOWIE DEREN HERSTELLER.....	26
TAB. 7: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZELLPOPULATIONSVERDOPPLUNGSZEITEN DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS DES WIRKSTOFFS BZ-423 BESTIMMT DURCH EXPONENTIELLE REGRESSIONSANALYSE DER TAGE 3-6.	30
TAB. 8: ÜBERSICHT DER IC ₅₀ -WERTE DER A549-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER BEI EINMALIGER BZ-423-ZUGABE.	31
TAB. 9: ÜBERSICHT ZELLPOPULATIONSVERDOPPLUNGSZEITEN DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS DES WIRKSTOFFS BZ-423 BESTIMMT DURCH EXPONENTIELLE REGRESSIONSANALYSE.....	35
TAB. 10: ÜBERSICHT DER IC ₅₀ -WERTE DER HT-29-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER BEI EINMALIGER BZ-423-ZUGABE	36
TAB. 11: ÜBERSICHT ZELLPOPULATIONSVERDOPPLUNGSZEITEN DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL BESTIMMT DURCH EXPONENTIELLE REGRESSIONSANALYSE DER TAGE 2.-4.	40
TAB. 12: ÜBERSICHT DER IC ₅₀ -WERTE DER A549-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER BEI EINMALIGER MYXOTHIAZOL-ZUGABE	41
TAB. 13: ÜBERSICHT ZELLPOPULATIONSVERDOPPLUNGSZEITEN DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL BESTIMMT DURCH EXPONENTIELLE REGRESSIONSANALYSE DER TAGE 2.-4.....	46
TAB. 14: ÜBERSICHT DER IC ₅₀ -WERTE DER HT-29-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER BEI EINMALIGER MYXOTHIAZOL-ZUGABE	47
TAB. 15: PLATTIEREFFIZIENZEN DER A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 UND BESTRAHLUNG.....	52
TAB. 16: PLATTIEREFFIZIENZ DER HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 UND UNTERSCHIEDLICHEN BESTRAHLUNGSDOSEN.....	54

TAB. 17: PLATTIEREFFIZIENZEN DER A549-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MYXOTHIAZOL SOWIE VERSCHIEDENEN BESTRAHLUNGSDOSEN.....	56
TAB. 18: PLATTIEREFFIZIENZEN DER HT-29-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MYXOTHIAZOL SOWIE VERSCHIEDENER BESTRAHLUNGSDOSEN.....	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIF	Apoptose induzierender Faktor (engl. apoptosis inducing factor)
ANT	Adenin-Nucleotid Translokator (ADP/ATP-Translokase)
APAF-1	Apoptose-auslösender Faktor-1
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ASK1	Apoptose regulierende Kinase 1 (engl. apoptosis signal-regulating kinase 1)
ASM	Acid-Shingomyelinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated; Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	TM- und Rad3-abhängige Kinase
Bad	proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie (engl. Bcl-2-Antagonist of Cell Death)
Bak	proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie
Bax	Bcl-2-assoziiertes X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, antiapoptotisches Protein
Bid	proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie
Bim	proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie
CHK1 und CHK2	Checkpoint-Kinasen 1 & 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. Dulbecco Phosphate buffered Saline)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lat. et alia)
F ₁ F ₀ -ATPase	Synonym: ATP-Synthase; Tranmembranprotein, welches ATP synthetisiert
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (engl. flavin adenine dinucleotide)
Fas-R.	Membranprotein der Tumor-Nekrose-Rezeptor-Familie, Synonym: CD95, APO-1
FBS	fetales Rinderserum (engl. Fetal Bovine Serum)

Gy	Gray
IR	ionisierende Strahlung (engl. ionizing radiation)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Mcl-1	engl.: myeloid cell leukemia-1, antiapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie
MDM2 und MDM4	engl.: mouse double minute 2 and 4 homolog, Regulator des p53-Tumorsuppressors
MEF	mouse embryonic fibroblast cells
MIM	innere Mitochondrienmembran (engl. mitochondrial inner membrane)
MOM	äußere Mitochondrienmembran (engl. mitochondrial outer membrane)
MTD	Mitochondrial-targeted Drug
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (engl. Nicotinamide adenine dinucleotide)
nDNA	nukleäre DNA
Nrf2	NF-E2-related factor-2
OSCP	oligomycin-sensitivity conferring protein
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p53	(Tumor)protein 53
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. Revolutions per minute)
SF2	Überlebensfraktion bei 2 Gy (eng. survival fraction)
TNF-R.	Tumornekrosefaktor-Rezeptor, Ligand: TNF- α
VDAC	Membranpore an der äußeren Mitochondrienmembran (engl. Voltage-dependent anion channel)

1 EINLEITUNG

Tumoren sind die zweithäufigste Todesursache trotz intensiver Forschung und der Entwicklung neuer Therapiestrategien. Dabei führt das Lungenkarzinom bei Männern als häufigste und bei Frauen als zweithäufigste Krebstodesursache. Darmkrebs stellt sowohl für Männer als auch für Frauen die dritthäufigste Krebstodesursache dar (ROBERT-KOCH INSTITUT, 2018). Ein Problem in der Tumorthherapie besteht in der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika sowie Bestrahlung. Aus diesem Grund ist die Suche nach molekularen Ursachen, sowie nach Ansätzen, diese Resistenzmechanismen zu umgehen, von essentieller Bedeutung.

In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mitochondrien einen guten Angriffspunkt für die Tumorthherapie darstellen, da sie essentiell für das Überleben der Zelle sind.

1.1 MITOCHONDRIEN

Mitochondrien werden auch als „Kraftwerke“ der Zellen bezeichnet. Sie kommen in fast allen Zellen ausgenommen den Erythrozyten ubiquitär vor. Mitochondrien besitzen eine Länge von ca. 5 µm und bestehen aus einer äußeren (MOM, mitochondrial outer membrane) und einer inneren Membran (MIM; mitochondrial inner membrane). Der Zwischenraum wird als Matrixraum bezeichnet. Die MOM enthält viele Transportproteine, wo hingegen die MIM stark gefaltet und kaum permeabel ist. Ihre Struktur ähnelt der von Bakterien, was durch die Endosymbiontentheorie erklärt werden kann. Die Endosymbiontentheorie besagt, dass Mitochondrien in der Evolution der Zelle durch eine Symbiose von Ur-Eukaryoten mit aeroben Prokaryoten entstanden sei. Dabei wurden die Prokaryoten von den Eukaryoten phagozytotisch aufgenommen, wodurch die späteren Mitochondrien ihre Doppelmembran erhielten (PROTASONI & ZEVIANI, 2021). Die MIM enthält anstelle von Cholesterin Cardiolipin und weist ein höheres Protein/Lipid-Verhältnis als die MOM auf (PROTASONI & ZEVIANI, 2021). Anhand der Faltung der MIM werden drei Mitochondrienformen beschrieben: Mitochondrien vom Sacculustyp, vom Tubulustyp und Mitochondrien des Cristae-Typs.

Mitochondrien enthalten evolutionsbedingt ein mitochondriales Genom, sowie Ribosomen für die Proteinbiosynthese. Das humane mitochondriale Genom besteht aus einem schmalen, doppelsträngigen, zirkulären DNA-Molekül mit 16.569 Basenpaaren, welche für 37 Gene kodieren (mtDNA, mitochondriale Desoxyribonukleinsäure). Davon kodieren 13 Gene für Proteinheiten der Atmungskette und des oxidativen Phosphorylierungssystem (OXPHOS, oxida-

tive Phosphorylierung), weitere 24 Gene für zwei ribosomale RNAs und 22 tRNAs. Der Großteil der Proteine wird im nukleären Genom kodiert und anschließend über spezifische mitochondriale Transporter zur Replikation mtDNA, dessen Transkription und Reparatur, importiert (AVERBECK & RODRIGUEZ-LAFRASSE, 2021).

Eine Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP für den Metabolismus der Zelle. Hierfür läuft der Citratzyklus im Matrixraum ab. Dabei werden Reduktionsäquivalente (NADH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid) synthetisiert, welche Protonen und Elektronen für die Atmungskette liefern. Diese ist an der MIM lokalisiert und baut einen Protonengradient auf, der zur Synthese von ATP an der F₁F₀-ATPase (Synonym: Komplex V, ATP-Synthase) durch oxidative Phosphorylierung dient. Die Atmungskette besteht aus vier Komplexen (I, II, III und IV), welche als Angriffsorte für Medikamente dienen können (PROTASONI & ZEVIANI, 2021). Die Funktionsweise der Atmungskette wird im Kapitel 1.2 erläutert. Ein weiterer Stoffwechselweg zur Energiegewinnung stellt die β-Oxidation von C18-Fettsäuren in der mitochondrialen Matrix dar (LÖFFLER *et al.*, 2014). Des Weiteren besitzen Mitochondrien eine wesentliche Regulator-Funktion in der Induktion verschiedener Zelltodarten, die im Kapitel 1.3 erläutert werden.

1.2 FUNKTIONSWEISE DER ATMUNGSKETTE

Als mögliche molekulare Angriffsstruktur für Wirkstoffe dienen die einzelnen Komponenten der Atmungskette, welche an der MIM lokalisiert sind. Wie bereits beschrieben, besteht die Atmungskette aus vier Komplexen und dient der Produktion von ATP durch Aufbau eines Redoxpotentials (Abbildung 1).

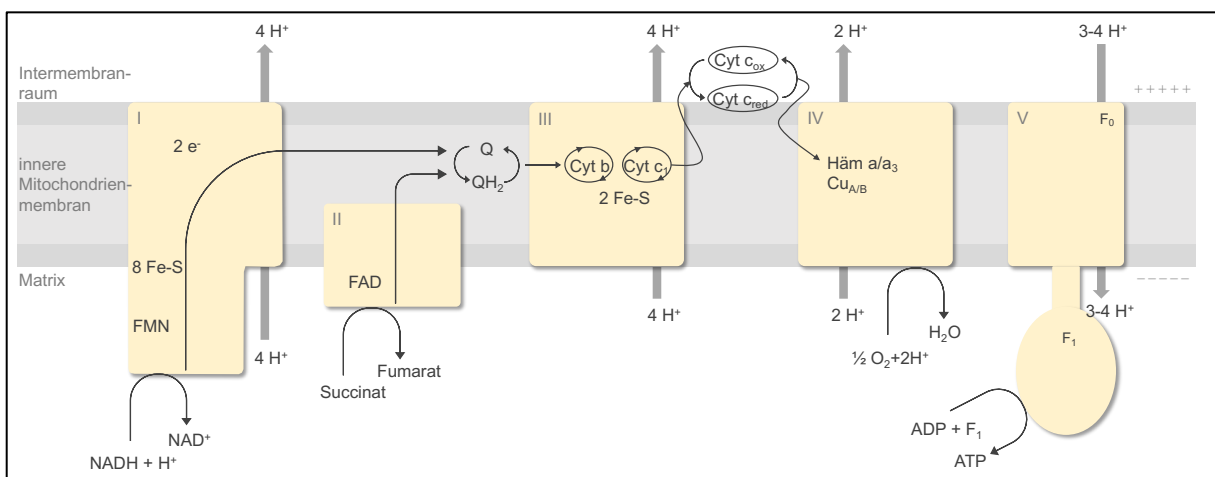


Abbildung 1: Übersicht über den Aufbau der Atmungskette (modifiziert nach LÖFFLER *et al.*, 2014): Über die Substrate Ubichinon (Q, QH₂) und Cytochrom c erfolgt der Elektronentransport über die vier Komplexe (I, II, III, IV). Im Komplex V wird ATP synthetisiert. ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, Cyt: Cytochrom, e⁻: Elektron, FAD: Flavinadenindinukleotid, FeS: Eisen-Schwefel-Zentrum, FMN: Flavinmononukleotid, H⁺: Proton.

Wie in Abbildung 1 ersichtlich ist, nimmt der Komplex I (Synonym: Mitochondriale Dehydrogenase) Elektronen von NADH auf und überträgt diese über ein Flavinmononucleotid (FMN) und 8 Eisen-Schwefel-Zentren auf Ubichinon (Coenzym Q). Dadurch wird Ubichinol (QH₂) gebildet. Im Komplex II werden wiederum Elektronen von Succinat über FAD, 3 Eisen-Schwefel-Zentren und Häm b auf Ubichinon übertragen. Dieser Komplex bietet die Möglichkeit, zusätzlich durch Seiteneinstiege (Succinatdehydrogenase, ETF:Ubichinon-Oxidoreduktase, Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase) Elektronen in die Atmungskette aufzunehmen, um das Redoxpotenzial aufrechtzuerhalten. Im Komplex III werden Elektronen unter Beteiligung der Cytochrome b und c₁ und eines Eisen-Schwefel-Zentrums von Ubichinol auf das oxidierte Cytochrom c übertragen, welches dadurch reduziert wird. Der Komplex IV überträgt 2 Elektronen von Cytochrom c über Kupferionen des CuA-Zentrums, Häm a, Häm a₃ und das CuB-Zentrum auf ein Sauerstoffatom, sodass zusammen mit zwei Protonen aus der Matrix ein Wassermolekül entsteht. Der Komplex V (auch ATP-Synthase, F₁F₀-ATPase) nutzt mittels oxidativer Phosphorylierung ADP und anorganisches Phosphat (P_i) zur Synthese von ATP. Die hierfür benötigte Energie stammt aus dem zuvor aufgebauten elektrochemischen Protonengradienten (LÖFFLER *et al.*, 2014).

Die Atmungskette sowie deren Produkte ATP und Elektronen dienen nicht nur allein der Energiegewinnung, sondern können auch indirekt Mitochondrien-assoziierte Formen des Zelltodes auslösen.

1.3 MITOCHONDRIEN-ASSOZIIERTE FORMEN DES ZELLTODES

Ziel jeder Tumorthherapie ist es, in den Krebszellen den Zelltod auszulösen und dessen Proliferation zu hemmen. Hierfür sind eine Mehrzahl biochemischer Mechanismen und verschiedene Zelltodformen beschrieben worden. Zu den bekanntesten Zelltodmechanismen gehören die Nekrose und die Apoptose. Bei der Nekrose handelt es sich um einen ungeplanten Zelltod, der mit einer Zellschwellung beginnt, dann über Auflösung von Zellkern und Zellmembran seinen Inhalt unkontrolliert in die Umgebung freigibt und eine Entzündungsreaktion hervorruft. Die Apoptose, auch der programmierte Zelltod genannt, stellt einen zentralen Ansatzpunkt von Mitochondrien in der Tumorthherapie dar. Hierbei wird ein extrinsischer von einem intrinsischen Weg in Abhängigkeit von der Aktivierung unterschieden; beide sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Durch Modulation der Mitochondrien mittels spezifischer Wirkstoffe könnte der intrinsische Apoptosesignalweg induziert werden und stellt somit einen möglichen Angriffspunkt für eine Therapie dar.

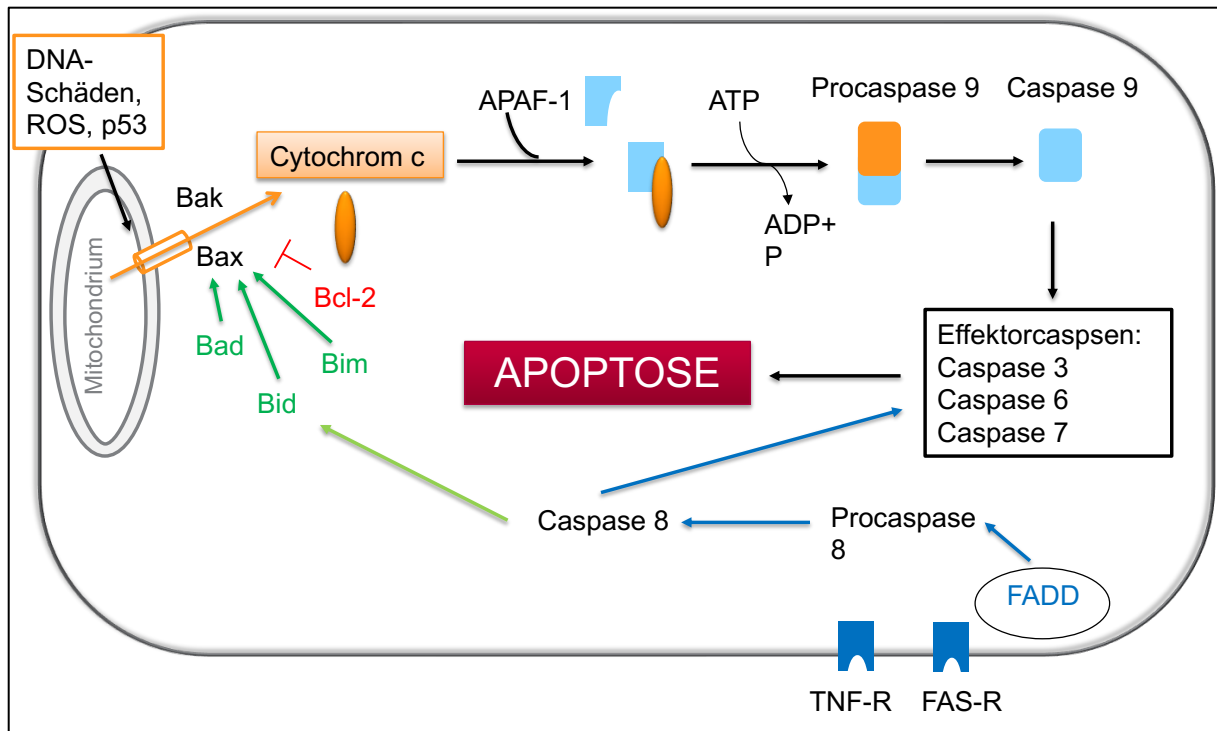


Abbildung 2: Übersicht der Apoptoseaktivierungswege (modifiziert nach BAMBERG *et al.*, 2009). Der intrinsische Aktivierungsweg wird über DNA-Schäden, ROS, p53 aktiviert. Der extrinsische Weg wird durch Bindung der Liganden TNF- α und FAS an ihre jeweiligen Rezeptoren aktiviert. APAF-1: Apoptose-auslösender Faktor-1; ATP: Adenosintriphosphat; Bad: Proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie (engl. Bcl-2-Antagonist of Cell Death) Bak/Bax: Bcl-2-associated X protein; Bid: Proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie, Bim: Proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; p53: (Tumor)protein 53; P: Phosphat; FADD: Fas-associated protein with death domain, Adapterprotein; Membranprotein der Tumor-Nekrose-Rezeptor-Familie, Synonym: CD95, APO-1; TNF-R.: Tumornekrosefaktor-Rezeptor, Ligand TNF- α .

Der intrinsische Weg wird durch DNA-Schäden (z. B. durch eine Strahlenbehandlung), einen Anstieg des Levels an reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) oder durch p53 aktiviert. Die beiden proapoptotischen Proteine Bax (Bcl-2-associated X protein) und Bak bilden eine Pore in der MOM, durch welche Cytochrom c freigesetzt wird. Daraufhin bindet APAF-1 und bildet mit Cytochrom c einen Komplex. Unter Spaltung von dATP wird die Procaspase 9 aktiviert, welche wiederum durch limitierte Proteolyse die Caspase 9 aktiviert. Daraufhin werden weitere Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7) aktiviert, welche dann die Apoptose einleiten (BAMBERG *et. al.*, 2009). Reguliert wird dieser Mechanismus im Schritt der Porenbildung, durch die Proteine Bak und Bax. Proapoptotisch wirken die Proteine Bad, Bid und Bim. Auf die Apoptose hemmend wirkt das Protein Bcl-2. Durch die Pore kann neben Cytochrom c, auch der Faktor AIF (Apoptose induced factor) diffundieren, der einen caspaseunabhängigen Zelltod einleitet. Dieser wird auch als apoptoseähnlicher Zelltod beschrieben (BAMBERG *et. al.*, 2009).

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung der Liganden FAS und TNF- α an Ihre jeweiligen Rezeptoren aktiviert. Dadurch wird FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) an den

Rezeptor rekrutiert, worauf die Procaspase 8 aktiviert wird. Diese wiederum setzt die Caspase 8 durch limitierte Proteolyse frei. In Folge werden weitere Effektorcaspasen aktiviert, wodurch letztendlich die Apoptose eingeleitet wird. Die Caspase 8 verknüpft den extrinsischen mit dem intrinsischen Weg, indem sie das proapoptotische Protein Bid aktiviert. Aufgrund dieses Mechanismus ist es möglich, bei Resistenzen eine Apoptose auszulösen (BAMBERG *et al.*, 2009). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Mechanismen kommt es unter Einfluss ionisierender Strahlung (IR) zur vermehrten Ceramidbildung, wodurch eine saure Sphingomyelinase (acid sphingomyelinase, ASM) aktiviert wird, welche die Apoptose einleitet. Zusätzlich kommt es zur vermehrten Expression von TNF- α - und FAS-Rezeptoren, wodurch der programmierte Zelltod induziert wird (BAMBERG *et al.*, 2009).

Weitere Zelltodmechanismen sind unter anderem die Ferroptosis, Mitotische Katastrophe, sowie Nekrose - bedingt durch mitochondriale Permeabilisation (MPT; GALLUZZI *et al.*, 2018). Bei der Ferroptosis handelt es sich um eine Form des Autophagie-Zelltods (GAO *et al.*, 2016) verursacht durch eine unkontrollierte eisenabhängige Lipidperoxidation (STOCKWELL *et al.*, 2017), wodurch es zu einer Anhäufung von ROS kommt (TANG *et al.*, 2021). Auf Zellebene zeigt sich, dass die Ferroptosis gewöhnlich mit mitochondrialen Veränderungen wie Kondensation oder Schwellung, erhöhter Membranpermeabilität oder Ruptur der äußeren Membran einhergeht (TANG *et al.*, 2021). Die Rolle der Mitochondrien als wichtige ROS-Quelle wird in der Literatur als Induktor für Ferroptose diskutiert. Die mitochondriale ROS-Produktion, DNA-Stress und metabolische Reprogrammierung sollen für die Lipidperoxidation erforderlich sein, um in Schlussfolgerung die Ferroptosis zu induzieren (GAO *et al.*, 2019).

Die mitotische Katastrophe ist ein regulierter krebshemmender Mechanismus. Dieser verhindert die Proliferation bzw. Vermehrung von Zellen, welche nicht in der Lage sind eine komplette Mitose auszuführen aufgrund von DNA-Schäden, Problemen im Ablauf der Mitose oder Versagen der mitotischen Checkpointe. Dadurch kann eine p53 unabhängige Aktivierung der Caspase 2 erfolgen. Morphologisch zeigen sich nukleäre Veränderungen (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Eine Sonderform des Zelltods ist die zelluläre Seneszenz. Dabei verliert die Zelle die Fähigkeit zu proliferieren, allerdings bleibt sie lebendig und metabolisch aktiv. Morphologisch weisen diese Zellen charakteristische Veränderungen auf: eine Abflachung, vermehrt intrazelluläre Vakuolen, zelluläre/nukleäre Erweiterungen und alternde Chromatinstrukturen. Biochemisch sind Seneszenzzellen charakterisiert durch einen Anstieg an lysosomaler Galactosidase- β 1, Inhibierung von Signalwegen der Kontrolle des Zelltodes durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und konsequente Dephosphorylierung von Mitgliedern der Retinoblastomfamilie, sowie Anwesenheit von sog. „Seneszenz-verbundenen heterochromatischen Foci“ (GALLUZZI *et*

al., 2018). Molekular liegt der Seneszenz die Aktivierung durch zellulären Stress wie ROS-Produktion, DNA-Schäden zugrunde. Der p53–p21 und p16INK4A (Biomarker der zellulären Seneszenz) Zellzyklusarrest-Signalweg wird aktiviert durch Inhibierung der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK2), CDK4 und CDK6. Die Resistenz von seneszenten Zellen gegen Mitochondrien-vermittelte Apoptose ist durch einen Anstieg an BCL-2 gekennzeichnet. Des Weiteren umgehen senescente Zellen auch den extrinsischen Apoptoseweg durch Überexpression des Decoy Rezeptor (DCR2), welche die FAS-Liganden Expression in zytotoxischen Immunzellen unterbrechen sollen (CHILDS *et al.*, 2017).

Ein Anstieg der ROS-Produktion in den Mitochondrien spielt eine wesentliche Rolle in der Aktivierung des Zelltodes. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel die mitochondriale ROS-Produktion sowie dessen Regulation durch Antioxidations-Systeme erläutert.

1.4 MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION UND DESSEN REGULATION DURCH ANTIOXIDATIONS-SYSTEME

Obwohl die Mitochondrien eine innere und äußere Membran zum Schutz besitzen, gelangen während der oxidativen Phosphorylierung 1-5 % der Elektronen in das Zytoplasma. Diese reagieren mit Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoffspezies in Form von Superoxid-Radikalen, Hydroxyl-Radikalen und Peroxynitrit-Anionen (AZZAM *et al.*, 2012). In der mitochondrialen Matrix ist die Konzentration an ROS im Vergleich zum Zytosol zweifach erhöht. Eine weitere ROS-Quelle der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum, welches insgesamt 25 % der gesamten ROS-Produktion ausmacht (AVERBECK & RODRIGUEZ-LAFRASSE, 2021). Anzumerken ist weiterhin, dass viele Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen eine höhere ROS-Produktion aufweisen, verursacht durch einen vermehrten mitochondrialen oxidativen Metabolismus, mtDNA-Mutationen und gesättigte Antioxidations-Systeme (PAYEN *et al.*, 2019).

Ein Anstieg an ROS wurde im Zusammenhang mit Hypoxie, Induktion von Mutationen, Zelltransformation und Zelltod beschrieben. Ein exzessiver ROS-Anstieg hat zur Folge, dass eine mitochondriale Dysfunktion entsteht, sowie verschiedene Signalwege und Immunantworten induziert werden (IPPOLITO *et al.*, 2020).

Deshalb sind Mitochondrien mit einem Antioxidations-Schutzsystem ausgerüstet, welches aus der Glutathion-Peroxidase, der Superoxid-Dismutase und der Katalase besteht, um freie Radikale und reaktive Spezies zu inaktivieren (IPPOLITO *et al.*, 2020). Hohe ROS-Level aktivieren einen spezifischen Antioxidans-Signalweg, den Nrf2-KEAP1. ROS ändern die Proteinkonformation von Keap1, was dazu führt, dass im Zytosol Nrf2 (NF-E2-related factor-2) freigesetzt

wird. Dieser transloziert in den Nucleolus und induziert die Transkription von Genen des antioxidativen Systems. Nrf2 kann auch aufgrund einer Stressantwort durch p62/SQSTM1 (Sequestosom 1) aktiviert werden (IPPOLITO *et al.*, 2020). Diese antioxidativen Systeme sind von wesentlicher Bedeutung, um freie Radikale, welche beispielsweise durch IR freigesetzt worden sind, zu bekämpfen.

Ein therapeutischer Ansatz um in Tumorzellen einen ROS-Anstieg und DNA-Schäden zu induzieren, um den Zelltod auszulösen, stellt die Strahlentherapie dar. Deren molekularer Einfluss wird im nächsten Kapitel erläutert.

1.5 EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE ZELLE - INSBESONDERE AUF MITOCHONDRIEN

Die Strahlentherapie ist ein essentieller Bestandteil in der Tumorthherapie. Ein Haupteffekt der Bestrahlung ist die Induktion von DNA-Schäden. Zahlreiche Studien zeigten, dass der Erfolg der Strahlentherapie stark abhängig ist von dem Vorhandensein molekularer Regulatoren des Zelltodes sowie der energetischen Kapazität der Zelle um proliferieren zu können (AVERBECK & RODRIGUEZ-LAFRASSE, 2021). Deshalb ist davon auszugehen, dass Mitochondrien als Organellen eine zentrale Rolle als Target für die Strahlentherapie einnehmen könnten, da sie den zellulären Metabolismus sowie den Energiehaushalt regulieren und weiterhin für strahleninduzierte Signalwege, Zelltod und im Hervorrufen immunologischer Antworten eine Rolle spielen.

1.5.1 WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE DNA UND DEREN REPARATUR

IR wirkt überwiegend indirekt auf die Zelle. Sie führt durch Ionisation und Spaltung von Wassermolekülen zur Bildung von freien Radikalen. Diese können mit allen Zellkomponenten, insbesondere nukleäre und mitochondriale DNA (nDNA, mtDNA), Lipide und Proteine reagieren. Dabei hängt der induzierte Schaden von der Art der Strahlung, der Energie und der absorbierten Dosis ab. IR mit niedrigem linearem Energietransfer (LET), wie Photonen, Röntgen- und Gammastrahlung, ist bei gleicher Dosis gewöhnlich weniger schädigend als Hoch-LET-Strahlung wie Protonen, α -Strahlung und schwere Ionen. Niedrige LET-Strahlung verursacht DNA-Schäden die aufgrund oxidativen Stresses entstehen, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie vereinzelt DNA-Cluster Läsionen. Hoch-LET-Strahlung wird auch als dicht-ionisierende Strahlung bezeichnet und ruft komplexe DNA-Cluster-Läsionen hervor (AVERBECK & RODRIGUEZ-LAFRASSE, 2021). Als zelluläre Antwort auf die DNA-Schädigung werden sogenannte DNA-Damage-Response-Pathways aktiviert. Vor allem DNA-Doppelstrangbrüche, die unter Strahlenbelastung entstehen, stellen eine besondere Bedrohung für die genomische Stabilität der Zelle dar (WAGENER & MÜLLER, 2010). Bei der Erkennung und Reparatur von DNA-

Doppelstrangbrüchen besitzen verschiedene Kinasen eine entscheidende Bedeutung. Dazu zählen die ATM-Kinase (ATM: Ataxia teleangiectasia), die ATR-Kinase (ATR: AT and Rad3 related) und die DNA-PKcs-Kinase, sowie die Checkpoint Kinasen 1 und 2 (CHK1 und CHK2). Die ATM-Kinase phosphoryliert viele Substrate als Antwort auf DNA-Schäden (u. a. Histonprotein H2AX) nachdem es zum Chromatin rekrutiert worden ist (WAGENER & MÜLLER, 2010). Die CHK2 ist ebenfalls ein Substrat der ATM, welche für die Regulation des Zellzyklus und die Apoptose verantwortlich ist. ATR ist vor allem für die Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen zuständig, kann aber auch DNA-Doppelstrangbrüche nach IR erfassen (SUN *et al.*, 2020). Nach Identifikation der DNA-Doppelstrangbrüche erfolgt die Reparatur hauptsächlich mittels homologer Rekombination und die Überwindung von DNA-Brücken durch direkte End-zu-End-Verbindungen (sog. Non-homologous end-joining; WAGENER & MÜLLER, 2010).

1.5.2 EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DAS MITOCHONDRIALE GENOM

Niedrig-LET IR bewirkt in der mtDNA laut AVERBECK & RODRIGUEZ-LAFRASSE (2021) eine Deletion von Basen, welche für die ATPase, die Mitochondriale Dehydrogenase (Komplex I) und die Cytochrom-c-Oxidase kodieren. Allerdings zeigen Tumorzellen nach Bestrahlung weniger Deletionen als normale Zellen (AZZAM *et al.*, 2012). Interessanterweise unterscheiden sich die Reparaturmechanismen zwischen mtDNA (mitochondriale DNA) und nDNA (nukleäre DNA) in ihrer Effizienz und Funktionsweise, obwohl die ATPase, die Mitochondriale Dehydrogenase und die Cytochrom-c-Oxidase eine wesentliche Bedeutung im Zellmetabolismus haben. So ist die mtDNA-Reparatur ineffizienter als die nDNA-Reparatur. Das mtDNA-Reparatursystem beinhaltet vor allem das Basenexzisionsystem, Komponenten des Mismatch-Reparatursystems und alternativ das Nicht-homologe End-joining (MUFTUOGLU *et al.*, 2014).

In Zusammenschau der zentralen Rolle der Mitochondrien für den Metabolismus sowie das Überleben von Tumorzellen, sowie der Wirkung von IR auf die mtDNA stellen Mitochondrien ein vielversprechendes Target in der Anti-Tumor-Therapie dar und stehen deshalb im Mittelpunkt des Forschungsinteresses.

1.6 MITOCHONDRIAL-TARGETED DRUGS

Mitochondrial-targeted Drugs (MTD) sind Wirkstoffe, die gezielt in den mitochondrialen Stoffwechsel eingreifen. Dort können sie unterschiedliche Signalwege modulieren, die Atmungskette beeinflussen oder den intrinsischen apoptotischen Signalweg aktivieren bzw. hemmen. Des Weiteren weisen Krebszellen einen erhöhten oxidativen Stress auf, sodass durch Reduktion oder Erhöhung über einen Schwellenwert die Progression des Tumors verlangsamt werden könnte.

Vorteile des Einsatzes von MTD sind zum einen die gezielte Wirkung auf Mitochondrien. Die Mitochondrienaktivität ist in Tumorzellen oft gesteigert, sodass hierdurch mitunter gesunde Zellen geschont werden könnten (WEINBERG & CHANDEL, 2015). Ein weiterer Grund für die Verwendung von MTDs ist, dass sie den Energiestoffwechsel hemmen. In Folge dessen löst der Energiemangel letztendlich ein Absterben der Krebszelle aus (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Durch einen kombinierten Einsatz von MTD zusammen mit Chemotherapie und / oder Bestrahlung könnte es durch synergistische Effekte zu niedrigeren Dosierungen und in Schlussfolgerung dessen zu einer Nebenwirkungsreduzierung kommen. Aus diesen Gründen soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob durch Kombination von MTD und Bestrahlung ein Absterben der Tumorzellen bewirkt werden kann.

Allerdings gibt es verschiedene Gründe warum sich die Entwicklung von MTD als schwierig gestaltet. So gibt es verschiedene Isoformen der Enzyme des Energiestoffwechsels mit hoher struktureller Ähnlichkeit, beispielsweise die Glutaminasen 1 und 2, sowie die Pyruvatkinasen 1 und 2. Des Weiteren besitzen viele Enzyme einen hydrophoben Anteil an ihrer Aktivitätsseite, sodass sie schwierig zu adressieren sind (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Ein weiterer erschwerender Aspekt stellt dar, dass Krebszellen ihren Metabolismus reprogrammieren können. Somit kann es durch Inhibierung des einen Signalweges zur Aktivierung eines anderen Signalweges kommen, sodass es zur Wirkungsreduzierung der MTD kommen kann. Zu beachten ist weiterhin, dass es durch Inhibierung von Schlüsselenzymen im Metabolismus der Zelle zu verschiedenen Effekten in gesunden Zellen kommen kann, was wiederum mit einem erheblichen Nebenwirkungspotenzial einhergeht. Dennoch gibt es trotz der Schwierigkeiten in der Entwicklung von MTDs eine Anzahl von Wirkstoffen, die spezifische metabolische Enzyme adressieren. Des Weiteren existieren verschiedene MTD in klinischen Studien sowohl für die Behandlung von soliden Tumoren als auch für hämatologische Tumore (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Beispielsweise befindet sich derzeit (2023) ein Inhibitor des Citratzyklusses CPI-613[®] in klinischer Phase I Studie um dessen Nebenwirkungsprofil in Kombination mit Radiochemotherapie für das pankreatische Adenokarzinom (PDAC) zu testen (clinicaltrials.gov; 2023). Weiterhin wird CPI-613[®] in klinischen Phase I und II Studien untersucht zur Behandlung von Leukämien, Lymphomen und kleinzelligem Bronchialkarzinomen (SCLC; SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Ein weiterer MTD - MitoQ, welcher die mitochondriale Membran vor oxidativem Stress schützt, befindet sich in Phase II-Studien bei neurologischen Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung und der Multiplen Sklerose (clinicaltrials.gov; 2023).

MTD können verschiedene Enzyme und Komponenten der Mitochondrien beeinflussen, was in der Arbeit von SAINERO-ALCOLADO *et al.* (2022) übersichtlich dargestellt wurde. So ist ein therapeutischer Ansatzpunkt der Citratzyklus, welcher in der äußeren Matrix lokalisiert ist. Dieser liefert Substrate (NADH und FADH₂), welche Elektronen für die Atmungskette bereitstellen. Eine Besonderheit in den meisten Krebszellen ist, dass sie unter Hypoxie Pyruvat in Laktat

umwandeln und den Citratzyklus mit Glutamin füllen können (FAN *et al.*, 2013). Es gibt verschiedene therapeutische Strategien den Citratzyklus zu inhibieren, beispielsweise die Inhibierung von mutierter Isocitrat-Dehydrogenase durch AGI-5198 zur Reduktion von 2-Hydroxyglutarat (2-HG) und Induktion der Differenzierung von Glioblastom-Zellen (ROHLE *et al.*, 2014). Weiterhin sind AG-221 und AG-881 in klinischen Studien zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie bei Inhibierung einer mutierten Isocitrat-Dehydrogenase-2 (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt von MTD stellen die Komplexe der Atmungskette dar. Die mtDNA kodiert 13 Untereinheiten der Komplexe I bis V. Einige Tumoren (Kolon- & Rektum-Adenokarzinom, Ovarialkarzinom, Akute myeloische Leukämie, sowie das Glioblastom) zeigen somatische Mutationen in der mtDNA, welche die Funktionen der Komplexe I (NADH-Dehydrogenase), III (Cytochrom b) oder IV (Cytochrom c-Oxidase) verändern. Mutationen in Komplex II führen zu einem Anstieg an ROS. Des Weiteren führt eine Akkumulation von Succinat zur Inhibition von HIF-Prolyl-Hydroxylase, was wiederum den HIF-Signalweg aktiviert (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Einzelne Inhibitoren der Komplexe der Atmungskette sind schon lange erforscht. Komplex I kann beispielsweise gehemmt werden durch Tamoxifen, welches zur Behandlung von prämenopausalen Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs verwendet wird. Des Weiteren inhibiert Metformin den Komplex I. Dieses Medikament ist zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 im Einsatz und wird in mehreren klinischen Studien für die Anwendung in kolorektalem Karzinom, in Brustkrebs und Prostatakarzinom erforscht (KAMARUDIN *et al.*, 2019). Ein weiterer Komplex I-Inhibitor ist IACS-010759, welcher sich in klinischen Studien für Akute myeloische Leukämie, sowie verschiedenen soliden Tumoren befindet (MOLINA *et al.*, 2018). Inhibitoren des Komplexes II, wie z.B. 3-Bromopyruvat, α -Tocopherol-Succinat und Vitamin E-Derivate werden in experimentellen Untersuchungen erforscht. Als Komplex III-Hemmer sind Antimycin A und Myxothiazol experimentell im Einsatz (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Resveratrol hemmt ebenfalls den Komplex III und befindet sich in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Tumore (SASSI *et al.*, 2014, SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Atovaquon ist erprobt in der Behandlung von Pneumocystis Pneumonie, sowie Malaria, weil es den Komplex III sowohl in Parasiten als humanen Zellen inhibiert. Des Weiteren wird es in klinischen Studien in Kombination mit Chemotherapeutika bei Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (NSCLC) untersucht (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Der Komplex IV kann inhibiert werden durch Doxorubicin, ein Chemotherapeutikum als DNA-Alkylanz, oder Photofrin (ein Porphyrin Photosensitizer), welcher zugelassen auf das Ösophaguskarzinom und NSCLC ist. Für den Komplex V, der ATP-Synthase gibt es keinen bisher berichteten Inhibitor, ausgenommen von Oligomycin in experimenteller Anwendung (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022).

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt um die mitochondriale Atmungskette zu beeinträchtigen, sind mitochondriale Entkoppler, wie z.B. Niclosamide, Oxyclozanide und FCCP/CCCP (SHRESTHA *et al.*, 2021).

Eine Übersicht über verschiedene Inhibitoren des Citratzyklus und der Atmungskette sind in Abbildung 3 aus der Arbeit von SAINERO-ALCOLADO *et al.* (2022) dargestellt.

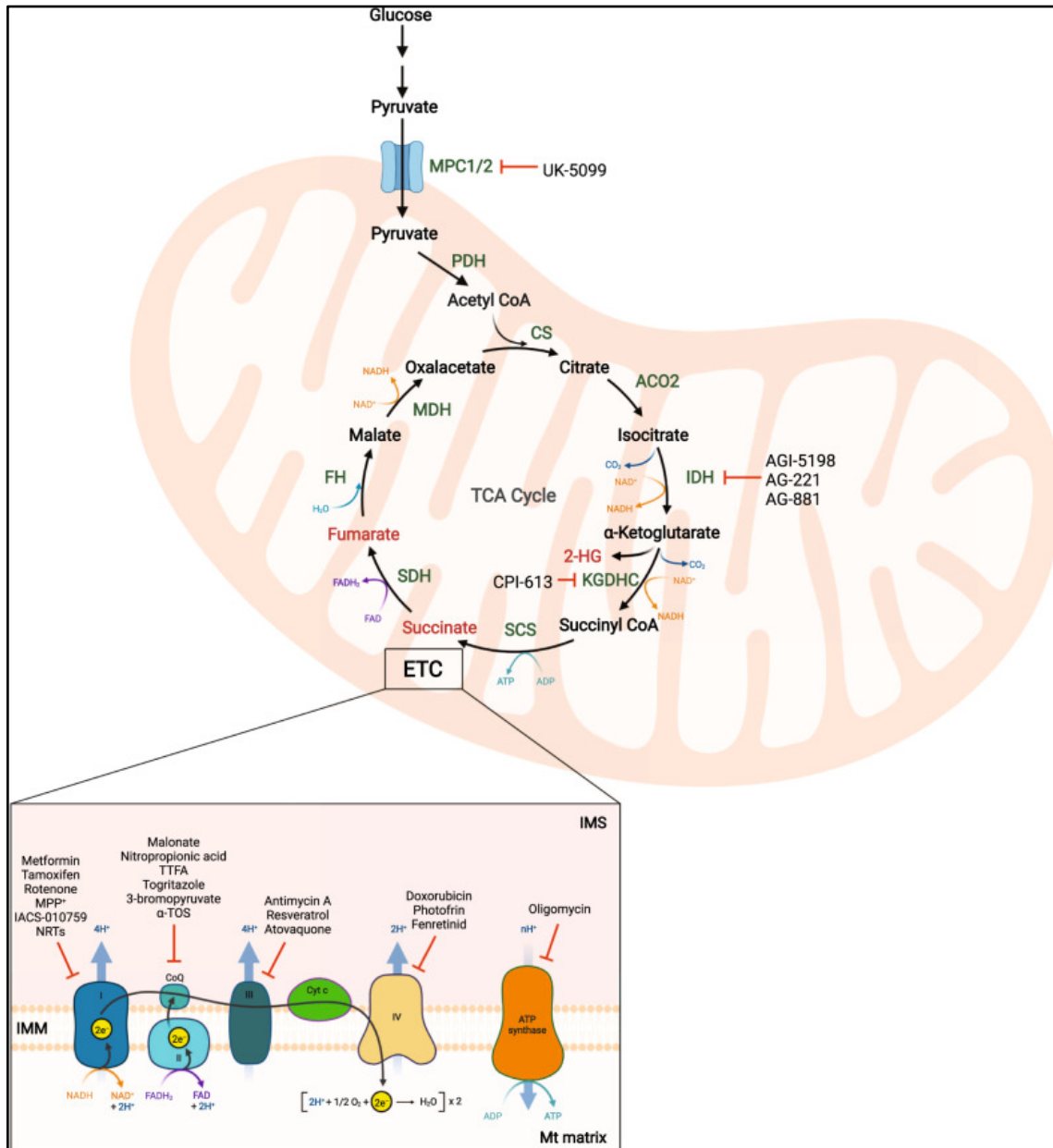


Abbildung 3: Übersicht über Mitochondrial-targeted Drugs (MTD) als Inhibitoren der Atmungskette, sowie Citratzyklus (SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022). Aus Glucose entstandenes Pyruvat gelangt in das Mitochondrium über MPC1/2 Transporter und wird in Acetyl-CoA durch die PDH umgewandelt. Die Hemmung dieses Transporters durch Verwendung von UK5099 beeinflusst die oxidative Phosphorylierung. Veränderungen in Enzymen des Citratzyklus bewirken eine Produktion von Onkometaboliten. Diese beinhalten 2-HG, Fumarat, und Succinat (dunkelrot). Inhibitoren dieser Enzyme sind AGI-5198, AG-221, und AG-881 für IDH, und CPI-613 für KGDHC. NADH und FADH₂ produzieren im Citratzyklus Elektronen für Komplex I und II.

Abkürzungen: ETC Atmungskette (engl. electron transport chain), MPC1/2: Mitochondrialer Pyruvat-Transporter 1/2 (Engl. mitochondrial pyruvate carrier 1/2), PDH: Pyruvat-Dehydrogenase, CS: Citratsynthase, ACO2: Aconitase 2, IDH: Isocitrat- Dehydrogenase, KGDHC: α -Ketoglutarat Dehydrogenase Komplex, SCS: Succinyl-CoA Synthetase, SDH: Succinat- Dehydrogenase, FH: Fumarat-Hydratase, MDH: Malat-Dehydrogenase, 2-HG: 2-Hydroxyglutarat, IMS: innere mitochondriale Matrix (engl. intermembrane mitochondrial space), IMM: innere mitochondriale Membran (engl. inner mitochondrial membrane), FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid (engl. flavin adenine dinucleotide), NADH: Nicotinamidadenindinukleotid (engl. Nicotinamide adenine dinucleotide), Mt matrix: mitochondriale Matrix, TCA: Citratzyklus (engl. tricarboxylic acid).

Eine Übersicht therapeutischer Angriffspunkte von MTD mit Beispielen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht von Mitochondrien-targeted Drugs (NEUZIL *et al.*, 2013; SAINERO-ALCOLADO *et al.*, 2022).

Wirkungsweise	Mitochondrien-targeted Drug
Atmungsketteinhibitoren	Myxothiazol, Tamoxifen, Metformin, IACS-010759, MitoVES, Resveratol, Doxorubicin
Bcl-2-Familie-Modulatoren	Bz-423, ABT-737, Antimycin
Carbon-Metabolismus	Methotrexat, 4-cloro-L-Threonin
Citratzyklusmodulatoren	CPI-613, AG-5198, AG-221, AG-881
Fettsäureoxidation	Etomoxir, Perhexiline, C75-CoA
Hexokinaseinhibitoren	2-Desoxyglucose, 3-Bromopyruvat
Inhibitoren des Thioredoxinsystems	Isothiocyanide
Lipophile Kationen, die die innere Mitochondrienmembran beeinflussen	Rhodamine-123
Mitochondriale DNA-Modulatoren	Vitamin K3, MitoVES
VDAC/ANT-Modulatoren	Arsenide, Lonidamine

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Vertreter aus verschiedenen Gruppen Mitochondrien-targeted Drugs ausgewählt. Aus der Gruppe der Bcl-Familien-Modulatoren wurde die strahlenbiologische Wirkung von **Bz-423** untersucht und aus der Gruppe der Atmungsketteninhibitoren **Myxothiazol**.

1.6.1 Bz-423

Der Wirkstoff Bz-423 ($C_{27}H_{21}ClN_2O_2$; Molekulargewicht: 440,92 g/mol) ist ein lipophiles Molekül, welches unkompetitiv die F_1F_0 -ATPase der Atmungskette über das Protein OSCP (oligomycin-sensitivity conferring protein) hemmt (BLATT *et al.*, 2009). Er gehört zur Klasse der 1,4-Benzodiazepine. Die Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.

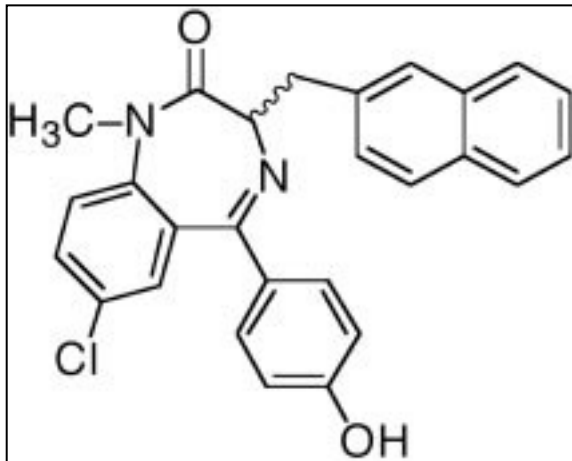


Abbildung 4: Strukturformel von Bz-423 (JOHNSON *et al.*, 2005).

Bz-423 wird bereits vielversprechend in (NZZ × NZW) F_1 -Mäusen zur Therapie des Systemischen Lupus und der Psoriasis eingesetzt, da es selektiv zytotoxisch auf überreaktive Lymphozyten reagiert (BLATT *et al.*, 2008). Des Weiteren wies es zytotoxische Effekte gegen maligne B-Zell-Linien, unabhängig von deren EBV-Level oder deren Bcl-2-Status auf (BOITANO *et al.*, 2003). Die zytotoxischen Effekte beruhen auf Zellschrumpfung, Kernkondensation, zytoplasmatische Vakuolisierung, sowie Membranbläschenbildung und nDNA-Fragmentierung (hypodiploide DNA; BLATT *et al.*, 2002).

Weiterhin ist bekannt, dass Bz-423 antiproliferativ wirkt, indem es unabhängig vom p53-Spiegel bewirkt, dass die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert (BOITANO *et al.*, 2003). Der Wirkmechanismus des Bz-423 ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

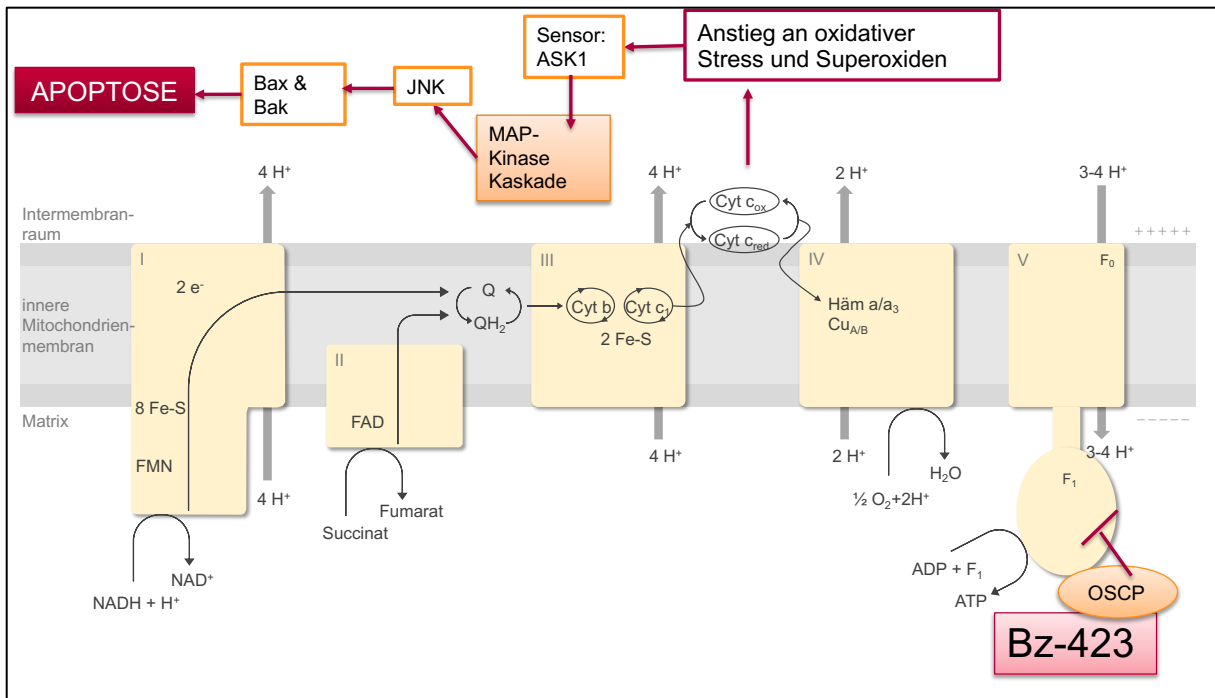


Abbildung 5: Übersicht über den Wirkmechanismus von Bz-423 an der Atmungskette (modifiziert nach Löffler *et al.*, 2014; Blatt *et al.*, 2009). Über die Substrate Ubichinon (Q, QH₂) und Cytochrom c erfolgt der Elektronentransport über die vier Komplexe (I, II, III, IV). Im Komplex V wird ATP synthetisiert. Bz-423 bindet an OSCP, welches den Komplex V hemmt. Zusätzlich bewirkt Bz-423 einen Anstieg an Superoxiden über den Komplex III und führt über weitere Signalkaskade zur Apoptose. ADP: Adenosindiphosphat, ASK1: apoptosis signal-regulating kinase 1, ATP: Adenosintriphosphat, Bak/Bax: Bcl-2-associated X protein, Cyt: Cytochrom, e⁻: Elektron, FAD: Flavinadeninucleotid, FeS: Eisen-Schwefel-Zentrum, FMN: Flavinmononucleotid, H⁺: Proton, JNK: Januskinase, OSCP: Oligomycin-sensitivity conferring protein.

Wie in Abbildung 5 ersichtlich wird, bewirkt Bz-423 einen raschen Anstieg an Superoxiden und oxidativem Stress, welches durch das Sensor-Protein ASK1 erkannt wird. Dieses aktiviert eine MAP-Kinase-Kaskade und diese wiederum eine spezifische Januskinase, welche die proapoptischen Proteine Bax und Bak aktivieren. Dadurch wird die Apoptose eingeleitet. Die MAP-Kinase-Kaskade und die Januskinase werden allerdings nicht in allen Zellen exprimiert (BLATT *et al.*, 2009).

Weiterhin ist anzumerken, dass Bz-423 als Benzodiazepin nicht an zentralen Benzodiazepin-Rezeptoren bindet, sodass angenommen wird, dass es nicht anxiolytisch bzw. sedierend wirkt (BLATT *et al.*, 2002).

1.6.2 MYXOTHIAZOL

Myxothiazol (C₂₅H₃₃N₃O₃S₂; Molekulargewicht: 487,68 g/mol) ist ein Antibiotikum, welches aus dem Mycobakterium *Myxococcus fulvus* isoliert wurde (THIERBACH & REICHENBACH, 1981). Es wird vor allem in Studien zur Untersuchung der Atmungskette *in vitro* als auch *in vivo* genutzt (DAVOUDI *et al.*, 2014). Die Strukturformel ist in Abbildung 6 dargestellt.

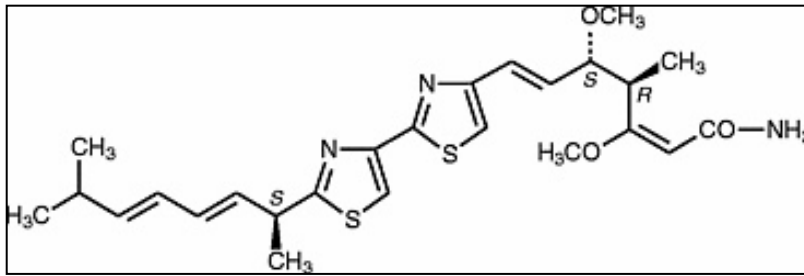


Abbildung 6: Strukturformel von Myxothiazol (THIERBACH & REICHENBACH, 1981).

Myxothiazol ist ein lipophiles Molekül, welches den Komplex III der Atmungskette hemmt. Spezifisch wird die Cytochrom-c-Reduktase der Atmungskette gehemmt. Die Cytochrom-c-Reduktase ist neben Cytochrom b als auch dem Eisen-Schwefel-Protein ein wichtiger Bestandteil des Cytochrom-bc₁-Komplexes (Ubiquinol–cytochrome-c Oxidoreductase; EC 1.10.2.2; DAVOUDI *et al.*, 2014). Dieser katalysiert den Elektronentransfer vom Ubichinol zum Cytochrom c aus dem Matrixraum in den Intermembranraum der Mitochondrien. Der resultierende elektrochemische Gradient ist essentiell für den Antrieb der ATP-Produktion (KIM *et al.*, 1998). Myxothiazol verhindert die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (AHMAD *et al.*, 2005). Dadurch wird der Elektronenfluss der Atmungskette unterbrochen. Dies hat zur Folge, dass der elektrochemische Protonengradient zusammenbricht, was folglich in einer verminderten ATP-Produktion resultiert.

1.7 ZIEL DER DISSERTATION

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln dargestellt, sind Mitochondrien aufgrund ihrer zentralen Funktionen im Metabolismus der Zelle, sowie der Wirkung von IR auf mtDNA ein guter Angriffspunkt in der Anti-Tumor-Therapie. Die Arbeiten von NEUZIL *et al.* (2013), SAINERO-ALCOLADO *et al.* (2022) als auch von MCCANN *et al.* (2021) zeigten, dass der Einsatz von MTD ein vielversprechender Ansatz ist, da sie Strahlenresistenzmechanismen verringern und den Zelltod auslösen können.

Aus diesen Gründen sollte es Ziel dieser Arbeit sein zu untersuchen, inwieweit die beiden MTD Bz-423 und Myxothiazol humane Tumorzellen beeinflussen und ob deren kombinierter Einsatz mit Bestrahlung *in vitro* zur Strahlensensibilisierung führt und damit ein Potenzial zur Verbesserung in der Tumorthherapie hat. Da sowohl das Lungenkarzinom als auch das Kolonkarzinom einer der häufigsten Krebstodesursachen darstellt, war in dieser Arbeit die Verwendung der beiden humanen Zelllinien A549 (Adenokarzinom der Lunge) und HT-29 (Adenokarzinom des Kolons) geplant.

Um die Wirkung von Bz-423 sowie Myxothiazol auf beide Zelllinien genauer zu charakterisieren, sollten verschiedene Endpunkte *in vitro* analysiert werden. Zunächst war geplant, Wachstumskurven zu erstellen, um einen möglichen Einfluss der MTD auf das Wachstum feststellen zu können. Anschließend sollte das klonogene Überleben mittels Koloniebildungstests bestimmt werden, indem die mit MTD-behandelten Zellen zusätzlich mit Dosen von 0 Gy - 8 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt werden. Um eine Aussage über die metabolische Aktivität unter Zugabe von Bz-423 bzw. Myxothiazol mit und ohne Bestrahlung treffen zu können, sollten WST-1-Analysen durchgeführt werden. Letztendlich waren γ H2AX-Analysen geplant, um das Auftreten von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur unter Wirkstoffeinfluss beurteilen zu können.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 ZELLKULTUREN

2.1.1 ZELLINIE A549

Die Zelllinie A549 stammte aus einem Adenokarzinom der Lunge. Sie war epithelialer, humaner Herkunft und wies ein adhärentes Wachstum auf (siehe Abbildung 7). Diese Karzinomzellen zeigten einen hypotriploiden Karyotyp mit 8 % Polyploidie. Des Weiteren wiesen die A549-Zellen eine Bad-Überexpression (ein Protein der Bcl-2 Familie) auf (HUANG *et al.*, 2012).

Die Zellen stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig.

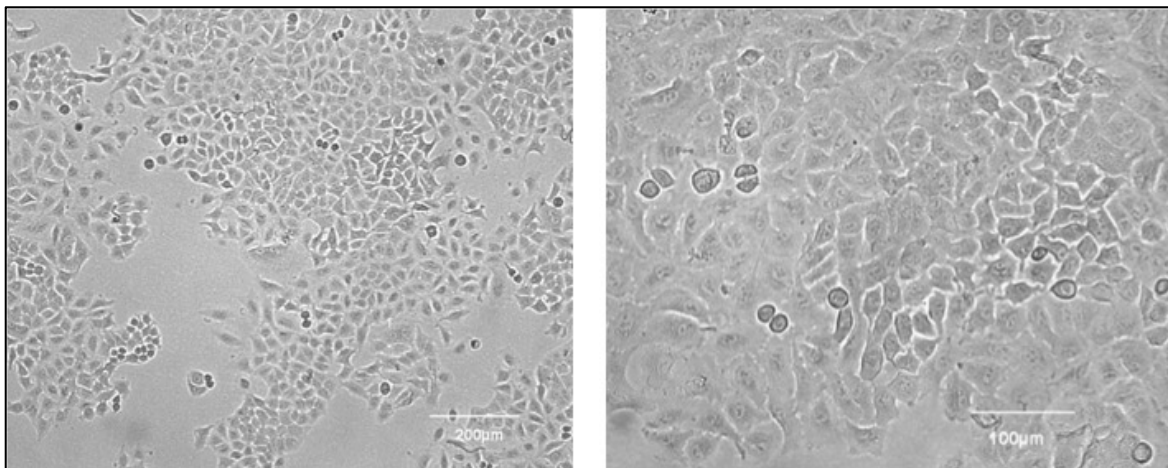


Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der A549-Zellen, 10x-Vergrößerung (links) und 20x-Vergrößerung (rechts) mit Phasenkontrastmikroskop.

2.1.2 ZELLINIE HT-29

Die ebenfalls aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig stammende Zelllinie HT-29 (siehe Abbildung 8) wurde aus einem kolorektalen Karzinom humaner Herkunft isoliert. Die Zellen zeigten ebenfalls epitheliale Eigenschaften und wiesen eine Mutation im p53 kodierenden Gen, eine sogenannte p53-R273H Kontakt-Mutation auf (VILLARINI *et al.*, 2021).

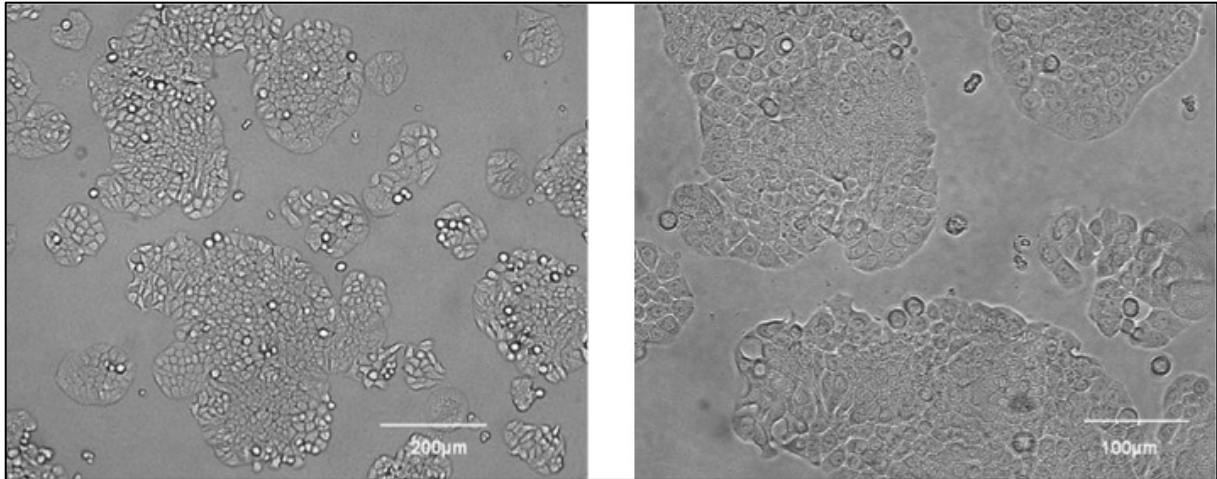


Abbildung 8: Mikroskopische Darstellung der HT-29-Zellen, 10x-Vergrößerung (links) und 20x-Vergrößerung (rechts) mit Phasenkontrastmikroskop.

2.2 WIRKSTOFFE: MITOCHONDRIEN-TARGETED DRUGS

2.2.1 Bz-423

Bz-423 wurde als lyophilisiertes, weißes Pulver geliefert. Zur Herstellung der Stammlösung wurde das Pulver (5 mg) in 2,5 ml DMSO gelöst, sodass die Endkonzentration 2 g/l betrug. Die Stammlösung wurde im Kühlschrank bei 2°C - 8°C aufbewahrt.

2.2.2 MYXOTHIAZOL

Die Stammlösung des Myxothiazols wurde aus lyophilisiertem, weißem Pulver hergestellt. Dazu wurde 1 mg des Pulvers in 1 ml DMSO bzw. 5 mg Myxothiazol in 5 ml DMSO gelöst, sodass die Endkonzentration 1 g/l betrug. Die Stammlösung wurde im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

2.3 BESTRAHLUNG

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in T₂₅-Flaschen (Koloniebildungstest) oder Wellplatten (WST-1-Versuch) oder auf Objektträgern (γ H2AX-Untersuchungen) mit Hilfe des Versa HD-Linearbeschleunigers der Firma Elekta Ltd, (Crawley, Großbritannien) an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock (Abbildung 9). Die Bestrahlung erfolgte mit einer nominellen Photonenenergie von 6 MV und einer Dosisleistung von 6,6 +/- 0,6 Gy/min mit Dosen von 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy oder 8 Gy. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen (0 Gy) mitgeführt um gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Die Funktionsweise des Linearbeschleunigers besteht darin, dass Elektronen durch ein elektromagnetisches Feld beschleunigt werden. Die zu beschleunigenden Elektronen werden in einem Elektronen-Injektor erzeugt und in der Beschleunigungsröhre auf sehr hohe Energien beschleunigt. Anschließend verlassen diese über ein Austrittsfenster die Beschleunigungsröhre. Damit der Elektronenstrahl senkrecht auf das Target trifft, sind Umlenkmagneten notwendig. Im Strahlerkopf eines Beschleunigers wird der Elektronenstrahl so aufgearbeitet, dass die gewünschte Dosisleistung erzielt wird (BAMBERG *et. al.*, 2009). Während des Bestrahlungsvorganges befanden sich die zu bestrahlenden Zellkulturflaschen auf einer 40 x 40 cm² großen Plexiglasscheibe oberhalb des Strahlenaustritts und wurden von unten bestrahlt.



Abbildung 9: Versa HD-Linearbeschleunigers der Firma Elekta Ltd, Crawley / Großbritannien, in Gesamtdarstellung in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock.

2.4 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

2.4.1 AUSFRIEREN DER ZELLEN

Die Zelllinien A549 und HT-29 wurden in einem Kryomedium, bestehend aus 10 % DMSO, 20 % FBS und 70 % Medium, bei -152°C gelagert. Die beiden Zelllinien wurden in einem Wasserbad bei 37°C ein bis zwei Minuten rasch aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit 6 ml Medium (DMEM mit 10 % FBS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin) gegeben. Die Suspension wurde auf eine T₂₅-Zellkulturfläche (mit 5 ml Medium) und eine T₇₅-Zellkulturflasche (mit 15 ml Medium) überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 24 h im Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und 37°C. Schließlich erfolgte ein Mediumwechsel, um die Zellen 24 h später zu splitten (siehe Kapitel 2.4.2).

2.4.2 ZELLKULTIVIERUNG

Die beiden Zelllinien wurden im Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modified Eagle's-Medium (DMEM) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zelllinie A549 wurde in T₇₅-Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium kultiviert, die HT-29 in T₂₅-Zellkulturflaschen mit 5 ml Medium. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, damit sie nicht konfluieren.

Vor dem Splitten wurden die benötigten Chemikalien im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt. Das Medium aus den Zellkulturflaschen wurde abgegossen und mit 5 ml Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (DPBS) gespült. Anschließend wurden die A549-Zellen mit 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA behandelt und für 10 min im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die HT-29-Zellen wurden mit 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA behandelt und ebenfalls für 10 min im Begasungsbrutschrank inkubiert. Trypsin löst die adhärenen Zellen vom Flaschenboden durch proteolytische Spaltung von Proteinen der Zell-Zell und Zell-Matrix-Verbindungen (POLAK-CHARCON & BENSCHAU, 1979). Ethylendiamintetraacetat (EDTA) unterstützt als Komplexbildner den o.g. Prozess und wirkt gleichzeitig stabilisierend auf Membranproteine und hemmt Adhäsionsmoleküle reversibel. Anschließend nach mikroskopischer Kontrolle der erfolgten Ablösung, wurden zu den A549-Zellen 7 ml Medium und zu den HT-29 8 ml Medium hinzugegeben sowie vermischt, um die Trypsinierung abzustoppen. Danach wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 250 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Zu dem Pellet wurden 5 ml Medium hinzugefügt und resuspendiert, sodass sie für die Zellzahlbestimmung einzeln vorlagen. Nach der Zellzahlbestimmung erfolgte die Einsaat für die A549-Zellen mit einer Dichte von $0,375 \times 10^6$ Zellen/75cm² Kulturflasche und für die HT-29-Zellen mit einer Dichte von $0,25 \times 10^6$ Zellen/25cm² Kulturflasche. Der nächste Zeitpunkt für die Zellsplittung erfolgte bei einer 80%igen Konfluenz.

2.4.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte automatisiert mittels Zellzählgerät CASY. Dazu wurden 10 ml CASYton und $0,05 \times 10^{-3}$ ml Zellsuspension in einer Küvette vermischt. Wenn die Zellen die Messkapillare mit einer definierten Zellgröße passieren, erzeugen sie einen elektrischen Impuls, indem sie die Puffer-Elektrolyte verdrängen. Dieser individuelle Puls wird als „Count“ gemessen. Das Signal mit welcher eine Zelle die Pore passiert, wird mit einem Signal von 1 MHz aufgelöst, sodass das Integral mit der Zellgröße proportional ist. CASY benutzt keine mathematischen Annäherungen, sondern jede einzelne Zelle bzw. Partikel wurde als eigenständiges Messereignis gezählt.

2.5 BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT MITTELS WACHSTUMSKURVEN

In 24-Wellplatten wurden pro Vertiefung 1×10^4 Zellen/ $1,9 \text{ cm}^2$ in 1 ml Medium ausgesät. Danach wurden diese 24 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden 3 Wells mittels Zellzählgerät CASY ausgezählt. Dazu wurden sie mit jeweils 300 μl 0,25 % Trypsin/EDTA behandelt, damit sich die Zellen vom Boden und untereinander lösen. Daraufhin erfolgte eine Inkubationszeit für 10 min im Begasungsbrutschrank. Auf die restlichen Wells wurde 24 h nach Aussaat der Wirkstoff hinzugegeben. Die Zellzahlbestimmung jeder Wirkstoff-Konzentration, sowie der unbehandelten Kontrollen erfolgte dann alle 24 h acht Tage lang als Dreifachbestimmung. Dabei wurde die Gesamtzellzahl/ml, die Anzahl viabler Zellen/ml sowie deren Durchmesser, die Anzahl toter Zellen/ml sowie deren Größe und die Anzahl der Debris gemessen.

2.5.1 WACHSTUMSKURVEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423

Die Wachstumsversuche unter Einfluss von Bz-423 wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben ausgeführt. Der Wirkstoff Bz-423 wurde in den Konzentrationen 2 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM hinzugegeben. Außerdem wurde eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine Lösungsmittel-Kontrolle mit DMSO mitgeführt (Tabelle 2). DMSO wurde in einer Verdünnung von 1:10 mit 44,1 μl in die jeweiligen Wells pipettiert.

Tabelle 2: Übersicht über die angesetzten Verdünnungen für Bz-423 aus der Stammlösung (2 g/l).

Wirkstoffkonzentration Bz-423	Angesetzte Verdünnung	pipettiertes Volumen pro ml
2 μM	1:100	44,1 μl
5 μM	1:10	11 μl
10 μM	1:10	22 μl
15 μM	1:10	33 μl
20 μM	1:10	44,1 μl

2.5.2 WACHSTUMSKURVEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL

Die Wachstumsversuche unter Einfluss von Myxothiazol wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben ausgeführt. Der Wirkstoff Myxothiazol wurde in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM hinzugegeben. Außerdem wurde eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine Lösungsmittel-Kontrolle mit DMSO erstellt (Tabelle 3). DMSO wurde in einer Verdünnung von 1:10 mit 73,1 μl in die jeweiligen Wells pipettiert.

Tabelle 3: Übersicht über die angesetzten Verdünnungen für Myxothiazol aus der Stammlösung [1 g/l].

Wirkstoffkonzentration Myxothiazol	Angesetzte Verdünnung	pipettiertes Volumen pro ml
0,1 µM	1:100	4,88 µl
1 µM	1:100	48,8 µl
2 µM	1:10	9,75 µl
5 µM	1:10	24,4 µl
10 µM	1:10	48,8 µl
15 µM	1:10	73,1 µl

2.6 ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS MITTELS KOLONIEBILDUNGSTEST

2.6.1 KOLONIEBILDUNGSTEST UNTER EINFLUSS VON Bz-423

In Zellkulturflaschen wurden jeweils 1×10^3 Zellen/25 cm² in 5 ml Medium ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde der Wirkstoffstoff Bz-423 hinzugegeben (Tabelle 4). Des Weiteren wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. 24 h nach der Wirkstoffzugabe wurden die Zellen am Linearbeschleuniger mit Dosen von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy bestrahlt. Parallel zu den mit Bz-423 behandelten Zellen (Konzentrationen siehe Tabelle 4), wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Sieben Tage nach Aussaat erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Vierzehn Tage nach Aussaat wurde der Überstand verworfen und die Kolonien mit 3 ml Krystallviolett (1 %) angefärbt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Krystallviolett abgegossen und die Zellkulturflaschen mittels Leitungswassers gespült. Nach einer Trocknungszeit der gefärbten Kolonien für ca. 2 Tage an der Luft wurden sie mittels Mikroskops ausgezählt. Dabei wurden nur die Kolonien gezählt, welche mindestens 50 Zellen besaßen. Alle unabhängigen Versuche wurden als Duplikat durchgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die Wirkstoffzugabe Bz-423 aus der Stammlösung [2 g/l] zu den Koloniebildungstests.

Zelllinie	Wirkstoffkonzentration Bz-423	Angesetzte Verdünnung	pipettiertes Volumen pro T-25-Flasche
A549	10 µM	1:10	110 µl
	15 µM	1:10	165 µl
HT-29	15 µM	1:10	165 µl
	17,5 µM	1:10	193 µl
	20 µM	1:10	221 µl

Die DMSO-Lösungsmittelkontrolle wurde aus der Verdünnung 1:10 durchgeführt, wo das höchste zu pipettierende Volumen pro T₂₅-Zellkulturflasche des Wirkstoffs Bz-423 als Richtwert diente. Der A549-Zellkultur wurde als Lösungsmittelkontrolle 165 µl DMSO der Verdünnung 1:10 hinzugegeben, wohingegen der HT-29-Zellkultur 193 µl DMSO der Verdünnung 1:10 dienten.

2.6.2 KOLONIEBILDUNGSTESTS UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL

Die Erstellung der Koloniebildungstest unter Einfluss von Myxothiazol erfolgte im gleichen methodischen Ablauf wie unter Einfluss von Bz-423 (siehe Kapitel 2.6.1). Die Wirkstoffzugabe Myxothiazol aus der Stammlösung [1 g/l] erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse der Wachstumskurven in 5 µM bzw. 15 µM Myxothiazol für beide Zelllinien (Tabelle 5). Des Weiteren wurde eine DMSO-Kontrolle der Verdünnung 1:10 und 366 µl pro T₂₅-Zellkulturfläche erstellt.

Tabelle 5: Übersicht über die Wirkstoffzugabe Myxothiazol aus der Stammlösung [1 g/l] zu den Koloniebildungstests beider Zelllinien.

Wirkstoffkonzentration Myxothiazol	Angesetzte Verdünnung	pipettiertes Volumen pro T-25-Zellkulturflasche
5 µM	1:10	122 µl
15 µM	1:10	366 µl

2.7 BESTIMMUNG DER ZYTOTOXIZITÄT MITTELS WST-1-TESTS

Die Durchführung des WST-1-Tests erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Es wurden A549-Zellen der Dichte 1×10^3 /Well und HT-29-Zellen der Dichte $1,5 \times 10^3$ in 96-Wellplatten ausgesät. Einen Tag später erfolgte die Wirkstoffzugabe, wie in der Tabelle 6 dargestellt. Am dritten Tag der Inkubation wurden die Zellen am Linearbeschleuniger mit den Dosen 0 Gy und

6 Gy bestrahlt. Die erste Zugabe des WST-1-Reagenzes in Höhe von 20 µl erfolgte 1 h nach Bestrahlung. Anschließend wurden die Proben 3,5 h inkubiert und letztendlich erfolgte die Extinktionsmessung am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 420 nm. In einem weiteren Versuchsansatz wurde 24 h nach der Bestrahlung 20 µl WST-1-Reagenz hinzugegeben und wiederum nach 3,5-stündiger Inkubation die Extinktion gemessen. Dabei korrelierte die Absorptionsänderung mit der Stoffwechselaktivität der Zellen. Die einzelnen Ansätze sowie mitgeführten Kontrollen pro unabhängiges Experiment wurden als 4-Fach-Messung durchgeführt und für die Auswertung anschließend jeweils der Mittelwert gebildet.

Tabelle 6: Übersicht über die Verdünnungen und die pipettierten Volumina der Wirkstoffe Bz-423 und Myxothiazol für den WST-1-Versuch.

Wirkstoff	Wirkstoffkonzentration	Angesetzte Verdünnung	pipettiertes Volumen pro Well
Bz-423	2 µM	1:100	8,8 µl
	5 µM	1:10	2,2 µl
	10 µM	1:10	4,4 µl
	15 µM	1:10	6,6 µl
	20 µM	1:10	8,8 µl
	DMSO-Kontrolle	20 µM	1:10
Myxothiazol	0,1 µM	1:100	0,97 µl
	1 µM	1:100	9,75 µl
	2 µM	1:10	1,95 µl
	5 µM	1:10	4,87 µl
	10 µM	1:10	9,75 µl
	15 µM	1:10	14,6 µl
	DMSO-Kontrolle	15 µM	1:10

2.8 ANALYSE VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN UND DEREN REPARATURKAPAZITÄT MITTELS γ H2AX-ASSAY

Um die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen der Zellen unter Kombinationstherapie zu untersuchen, wurden γ H2AX-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^4 Zellen in

1 ml Medium je Kammer in 4-Kammer-Objektträgern ausgesät und anschließend im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Wirkstoffzugabe. Bz-423 und Myxothiazol wurden in den Konzentrationen von 15 μ M (Verdünnung 1:10) hinzugegeben. Des Weiteren wurden eine unbehandelte Kontrolle und eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Bestrahlung mittels 6 Gy (0 Gy als Kontrolle) am Linearbeschleuniger. 30 min und 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Fixierung 20 min lang in 2 %iger Formaldehyd-Lösung. Anschließend wurden die Objektträgerkammern zweimal 5 min lang unter leichtem Schwenken mittels 1X PBS gespült. Daraufhin wurden die Kammern vorsichtig vom Objektträger getrennt. Hiernach permeabilisierten die Zellen 15 min lang in einer Lösung bestehend aus 0,1 % Glycin und 0,25 % Triton X-100 in 1X PBS. Anschließend erfolgte die Blockierung 1 h lang in einer Lösung aus 2 % Goat-Serum, 1 % BSA, 0,1 % Tween-20 gelöst in 1X PBS. Hierauf fand die Zugabe des Primärantikörpers verdünnt mit Blockierungslösung (1:500) statt. Pro Kammer wurden 2 Tropfen der Primärantikörperverdünnung hinzugegeben. Die Objektträger wurden 1 h lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger wiederum zweimal 5 min lang unter leichtem Schwenken in PBS gespült. Daraufhin erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte im Dunkeln, da der Sekundärantikörper sehr lichtempfindlich ist. Dieser Sekundärantikörper wurde 1:400 verdünnt auf die Objektträger getropft. Die Zellen wurden wiederum eine Stunde lang in der Feuchtkammer mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut zweimal unter leichtem schwenken mittels PBS gespült. Die Objektträger wurden zur Färbung der Zellkerne hiernach mit 2-3 Tropfen Vectashield mit DAPI (1 μ g/ml) bearbeitet und mit einem Deckglas versehen. Die Auszählung erfolgte schnellstmöglich unter Fluoreszenzlicht. Dabei stellten sich die Zellkerne blau und die Doppelstrangbrüche rot da. Es wurden die Foci von 50 Zellkernen ausgezählt. Daraus wurde dann die mittlere Anzahl von Doppelstrangbrüchen pro Zellkern errechnet. Zur Fotodokumentation wurde zusätzlich die Kamera Kappa DX 40 C genutzt. Es wurden insgesamt drei unabhängigen Versuche durchgeführt.

2.9 STATISTISCHE ANALYSEN

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Hierfür wurden mindestens drei unabhängige Versuche mit unterschiedlichen Passagen der Zelllinien durchgeführt. Die Wachstumskurven wurden als Triplikate pro unabhängigem Versuch durchgeführt. Die Koloniebildungstests wurden als Duplikate je Versuch geführt; die WST-1 Analysen als 4-fach-Bestimmung und die γ H2AX-Untersuchungen als einfache Ausführung durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde zunächst auf Normalverteilung getestet und bei Vorlage dieser anschließend für alle Versuche der Zweistichproben-*t*-Test angewandt. Ein *p*-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.10 VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

In Tabelle 7 sind alle für die Experimente verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sowie ihre Herkunft zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte, sowie deren Hersteller.

Zellkulturmedium	Hersteller, Ort
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Walkersville, MD USA
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Subkultivierung und Zellzahlbestimmung	Hersteller, Ort
Phosphate buffered Saline (DPBS) - Dulbecco	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin / EDTA (0,05%)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
CASY Ton	OLS OMNI Life Science, Bremen
Wachstumskurven	Hersteller, Ort
Trypsin / EDTA (0,25%)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Koloniebildungstests	Hersteller, Ort
Ethanol (70%), vergällt	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Rostock
Kristallviolett-Lösung (1%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
WST-1-Assay	Hersteller, Ort
WST-1-Testkit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

γH2AX-Assay	Hersteller, Ort
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovine Serum Albumin Fraction V	PAA Laboratoriuues GmbH
Glycine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mab, Primärantikörper (HisH2Ax)	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Mab, Sekundärantikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAPI/Antifade (0,1 μ g/ml)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Wirkstoffe	Hersteller, Ort
Bz-423	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Myxothiazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Ort
Falconröhrchen (15ml oder 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T ₂₅ - und T ₇₅ -Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nalgene Labware, VWR International GmbH, Darmstadt
24er und 96er Wellplatten	TPP (Techno Plastic Products AG) Tarsadingen, Schweiz
Objektträger mit Kammern	Nalge Nunc Int., Naperville, USA
Plastik-Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig

Geräte	Hersteller, Ort
Begasungsbrutschrank I	Zapf Instruments, Sarstedt
Begasungsbrutschränke II und III	Binder, Tuttlingen
ELISA-Reader anthos zenyth 340 r	anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe
Sicherheitswerkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbod
Zellzählgerät CASY	OLS OMNI Life Science, Bremen
Tiefstühltruhe Ultra Flow	Sayno, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nennendorf
Laborzentrifuge I, Hettich Universal 16 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Phasenkontrast-Mikroskop Eclipse	Nikon, Düsseldorf
Versa HD-Linearbeschleuniger	Elektro Ltd, Crawley, Großbritannien
Vortex Genie 2T	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 EINFLUSS VON Bz-423 AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖBE DER A549-ZELLEN

Um die Toxizität des Wirkstoffes Bz-423 auf die Zelllinie A549 zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen (Abbildungen 10 bis 13) dargestellt.

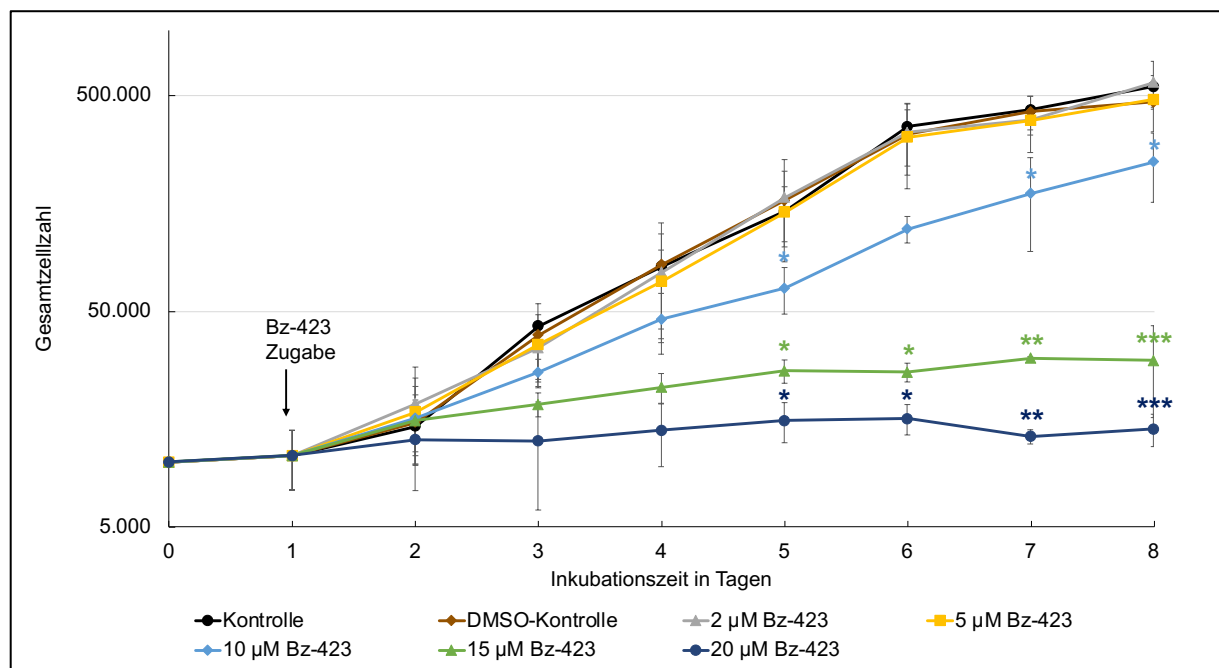


Abbildung 10: Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423; Gesamtzellzahl: lebend + tot; Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind MW ± SD (n=3), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In Abbildung 10 ist die Gesamtzellzahl bei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen an Bz-423 in Abhängigkeit der Inkubationszeit abgebildet. Die Ansätze der DMSO-Kontrolle verhielten sich ähnlich der Kontrollen. So betragen die Mittelwerte der Gesamtzellzahl z. B. am Tag 4 145.933 (Kontrolle) und 164.203 (DMSO-Kontrolle), sowie am Tag 8 1.297.927 (Kontrolle) und 1.318.667 (DMSO-Kontrolle). Bei Bz-423-Konzentrationen von 2 µM und 5 µM konnte kein wachstumshemmender Effekt nachgewiesen werden. Dementsprechend ergaben die Werte beispielsweise am Tag 7 577.433 (2 µM Bz-423), 481.533 (5 µM Bz-423) zu 552.700 (Kontrolle). Ab einer Konzentration von 10 µM Bz-423 und höher zeigte sich ein signifikant wachstumshemmender Einfluss auf die A549-Zellen. So lagen die Gesamtzellzahlen z. B. am

Tag 8 bei 552.700 (Kontrolle), 247.457 (10 μ M Bz-423, $p < 0,05$), 29.539 (15 μ M Bz-423, $p < 0,01$) und 14.236 (20 μ M Bz-423, $p < 0,01$).

Durch exponentielle Regressionsanalysen im Bereich des exponentiellen Wachstums wurden die Zellpopulationsverdopplungszeiten bestimmt und in Tabelle 8 aufgeführt. Dabei sind Absterbezeiten als Zellpopulationsverdopplungszeiten mit negativem Vorzeichen definiert.

Tabelle 8: Übersicht über die Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen unter Einfluss des Wirkstoffs Bz-423 bestimmt durch exponentielle Regressionsanalyse der Tage 3-6.

Ansätze	Zellpopulationsverdopplungszeiten und Absterbezeiten in h
Kontrolle	28,1
DMSO-Kontrolle	29,7
2 μ M Bz-423	29,9
5 μ M Bz-423	27,9
10 μ M Bz-423	35,7
15 μ M Bz-423	180,6
20 μ M Bz-423	-924,2

In Tabelle 8 sind die Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423 dargestellt. Die Zellpopulationsverdopplungszeit der DMSO-Kontrolle lag mit 29,7 h im gleichen Bereich wie die der Kontrolle mit 28,1 h. Eine Zunahme der Zellpopulationsverdopplungszeit mit steigenden Bz-423-Konzentrationen war ab einer Konzentration von 15 μ M Bz-423 zu erkennen. So lag die mittlere Zellpopulationsverdopplungszeit der Kontrolle bei 28,1 h, wohingegen sie durch den Wirkstoff deutlich auf 180,6 h (15 μ M Bz-423) anstieg. Unter 20 μ M Bz-423 konnte eine Absterbezeit von 924,2 h ermittelt werden.

Anschließend wurden IC_{50} -Werte ermittelt, welche in Tabelle 9 dargestellt sind. Diese nahmen mit jedem Inkubationstag kontinuierlich ab. Nach einer Inkubationszeit von 24 h betrug der IC_{50} -Wert 3,85 μ M. Nach einer Inkubationszeit von 96 h waren nur noch 0,77 μ M Bz-423 notwendig, dass 50 % der Zellen abstarben.

Tabelle 9: Übersicht der IC₅₀-Werte der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei einmaliger Bz-423-Zugabe; Einsaatdichte: 1 x 10⁴ Zellen/ml.

Inkubationsdauer mit Bz-423 [h]	IC ₅₀ -Werte (Bz-423-Konzentration in µM)
24	3,85
48	2,53
72	1,24
96	0,77
120	0,37

Um die Vitalität der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423 zu beurteilen, wurden der Anteil der lebenden Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl in Abbildung 11 dargestellt.

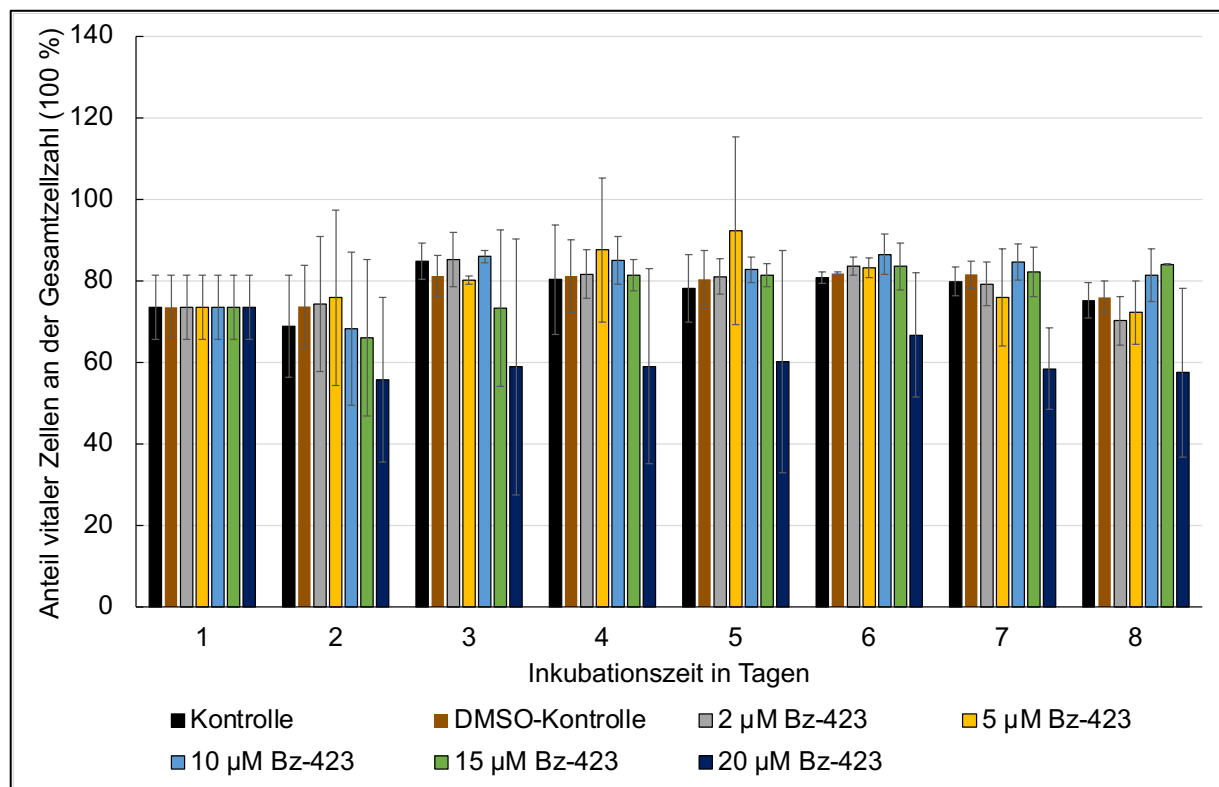


Abbildung 11: Anteil vitaler A549-Zellen an der Gesamtzellzahl unter Einfluss von Bz-423. Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind MW ± SD (n=3).

Aus Abbildung 11 wird deutlich, dass bei einer Konzentration von 20 μM Bz-423 die Vitalität der A549-Zellen sank. So betrug der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl z. B. am Tag 7 nur noch 58 % (20 μM Bz-423) anstatt 80 % (Kontrolle). Allerdings zeigten die Werte, insbesondere der Ansätze mit 20 μM Bz-423 eine sehr hohe Standardabweichung, sodass keine Signifikanz der Ergebnisse ermittelt werden konnte. Die DMSO-Kontrollen verhielten sich ähnlich der Kontrollen. Weiterhin zeigten die Ansätze der 10 μM und 15 μM Bz-423 an den Tagen 5 bis 7 eine geringe Zunahme der Vitalität. Dementsprechend ergaben die Werte am Tag 6 81 % (Kontrolle), 82 % (DMSO-Kontrolle), 87 % (10 μM Bz-423) und 84 % (15 μM Bz-423).

Um einen Hinweis auf die Art des Zelltodes zu bekommen, wurde in Abbildung 12 die Größe der lebenden Zellen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration als mittlerer zellulärer Durchmesser dargestellt.

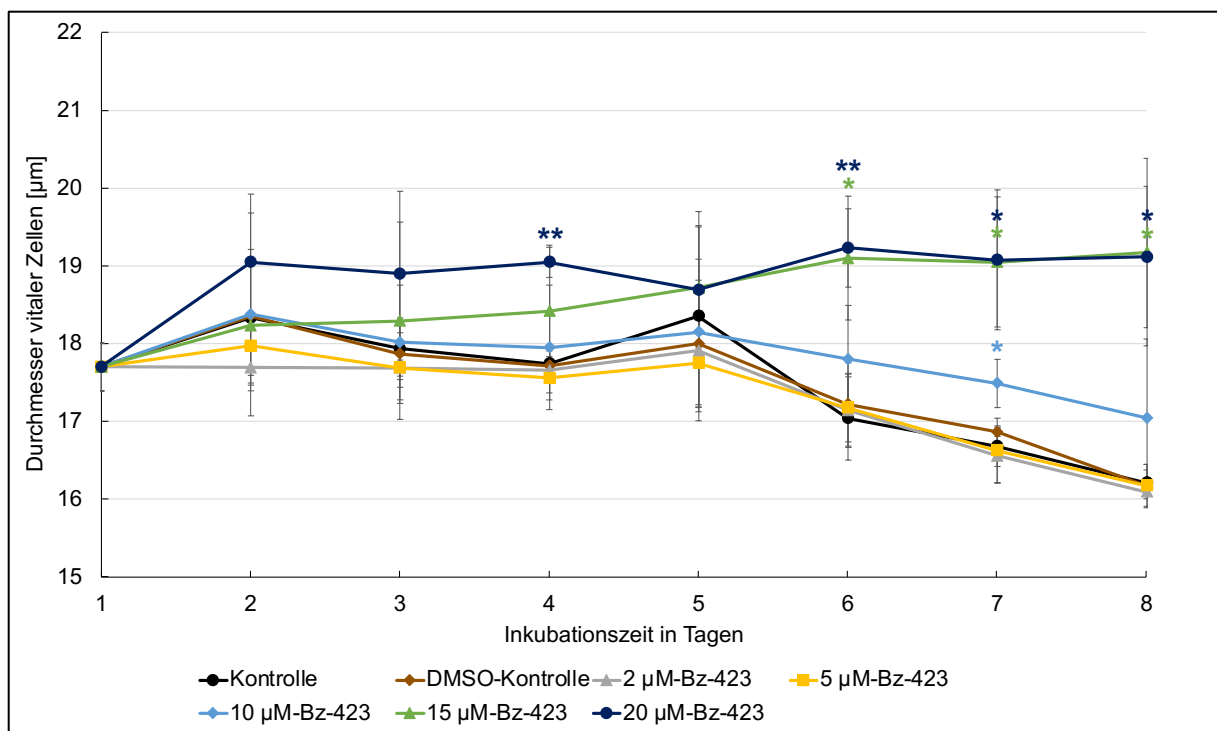


Abbildung 12: Mittlerer Durchmesser lebender A549-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von Bz-423. Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=3$), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Der mittlere Durchmesser vitaler A549-Zellen der Ansätze mit Konzentrationen bis 5 μM Bz-423 lag bis zum Tag 5 unter den Ansätzen der Kontrolle, wie in Abbildung 12 zu sehen ist. So betrug der Durchmesser vitaler Zellen z.B. am 5. Tag 17,8 μm (5 μM Bz-423) im Vergleich zu 18,3 μm (Kontrolle). Nach dem 5. Tag kam es zu einem Abfall des mittleren Durchmessers vitaler Zellen der Kontroll- und Wirkstoff-Ansätze bis 10 μM Bz-423. Bei den Ansätzen der

höheren Wirkstoff-Konzentrationen 15 μM Bz-423 und 20 μM Bz-423 war eine signifikante Zunahme des mittleren Durchmessers zu sehen. Dementsprechend zeigten die A549-Zellen einen mittleren Durchmesser am 7. Tag von 16,6 μm (5 μM Bz-423) und 19,1 μm (20 μM Bz-423, $p < 0,05$) im Vergleich zu 16,7 μm (Kontrolle).

Analog zu der Größe der vitalen Zellen, wurde der mittlere zelluläre Durchmesser der toten Zellen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration in Abbildung 13 dargestellt.

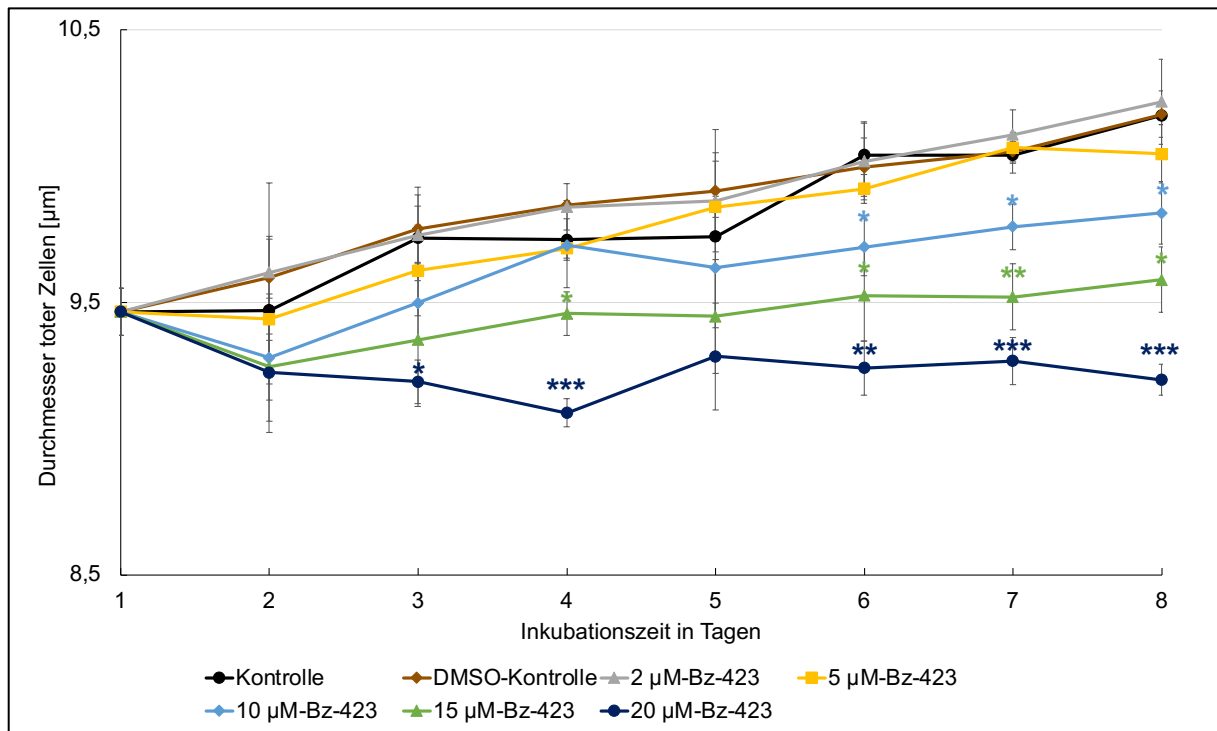


Abbildung 13: Mittlerer Durchmesser toter A549-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von Bz-423. Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=3$), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der mittlere Durchmesser toter A549-Zellen sank signifikant ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423 im Vergleich zur Kontrolle, wie in Abbildung 13 ersichtlich ist. So lag der mittlere Durchmesser toter A549-Zellen z. B. am Tag 7 bei 9,8 μm (10 μM Bz-423, $p < 0,05$), 9,6 μm (15 μM Bz-423, $p < 0,01$) und 9,22 μm (20 μM Bz-423, $p < 0,001$) anstelle von 10,19 μm (Kontrolle). Bis Tag 4 zeigten die toten Zellen der Ansätze mit 2 μM Bz-423 und der DMSO-Kontrolle einen höheren mittleren Durchmesser als die Kontrolle. So betrug z. B. am Tag 3 der mittlere Durchmesser toter A549-Zellen 9,85 μm (2 μM Bz-423) und 9,86 μm (DMSO-Kontrolle) im Vergleich zu 9,73 μm (Kontrolle).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der A549-Zellen ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423 gehemmt wurde. Hierzu entsprechend, konnte eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler Zellen ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423

bzw. eine Abnahme des mittleren Durchmessers toter A549-Zellen beobachtet werden. Der IC_{50} -Wert betrug nach 24 h Inkubationszeit $3,85 \mu\text{M}$. Die Vitalität der A549-Zellen wurde nicht signifikant unter Behandlung mit Bz-423 verändert. Die Zellpopulationsverdopplungszeit nahm ab einer Konzentration von $15 \mu\text{M}$ Bz-423 wesentlich zu.

3.2 EINFLUSS VON Bz-423 AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER HT-29-ZELLEN

Um die Toxizität des Wirkstoffes Bz-423 auf die HT-29-Zellen zu analysieren, wurde analog zu den A549-Zellen Wachstumskurven aufgenommen. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Diagrammen (Abbildungen 14 - 17) dargestellt.

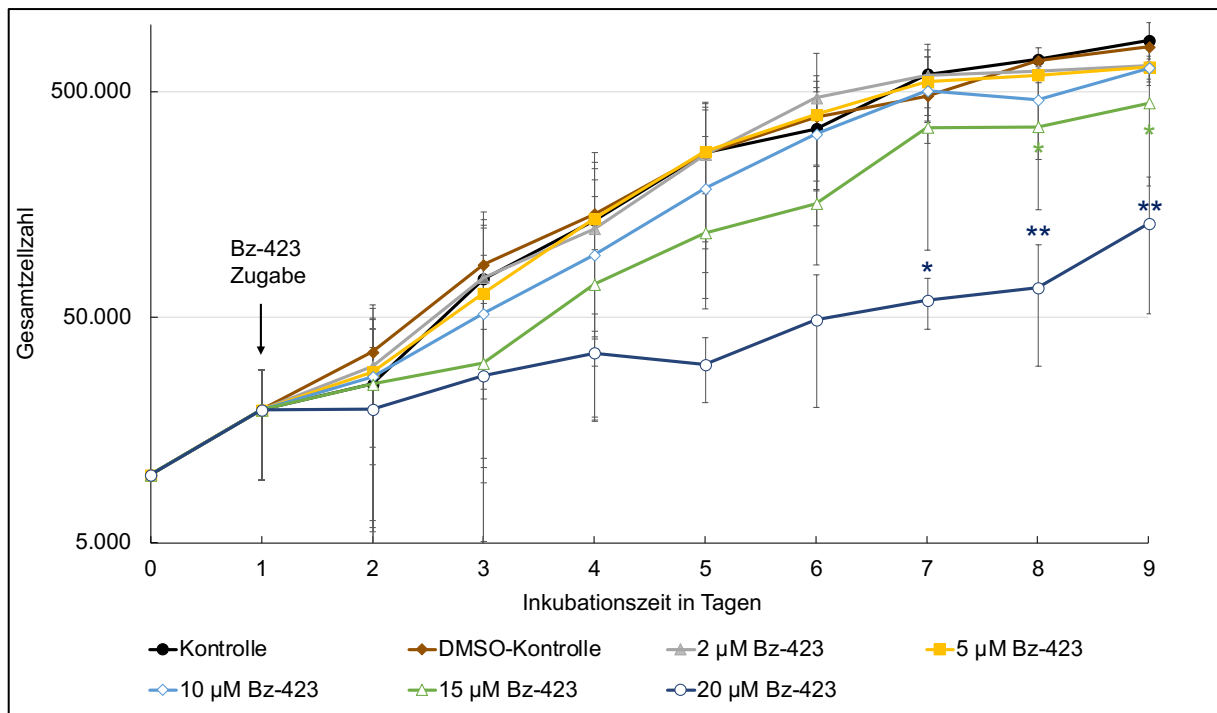


Abbildung 14: Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423. Gesamtzellzahl: lebend + tot; Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3$), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

In Abbildung 14 ist die Gesamtzellzahl der unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen an Bz-423 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit abgebildet. Die Ansätze der DMSO-Kontrolle schwankten um die gleichen Werte wie die der Kontrollen. So betrug die Gesamtzellzahl z. B. am Tag 7 693.673 (Kontrolle) und 684.130 (DMSO-Kontrolle). Ab einer Konzentration von $15 \mu\text{M}$ Bz-423 zeigte sich ein wachstumshemmender Einfluss auf die HT-29-Zellen. So lag die Gesamtzellzahl beispielsweise am Tag 8 bei 273.049 ($15 \mu\text{M}$ Bz-423, $p<0,05$), 67.492 ($20 \mu\text{M}$ Bz-423, $p<0,01$) anstelle von 693.673 (Kontrolle).

Auch hier wurden die Zellpopulationsverdopplungszeiten berechnet, um die Wachstumskinetik der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 besser beurteilen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen unter Einfluss des Wirkstoffs Bz-423 bestimmt durch exponentielle Regressionsanalyse.

Ansätze	Zellpopulationsverdopplungszeit [h]
Kontrolle	25,8 (Tage 2-4)
DMSO-Kontrolle	23,6 (Tage 1-3)
2 μM Bz-423	26,5 (Tage 2-4)
5 μM Bz-423	31,3 (Tage 3-5)
10 μM Bz-423	33,4 (Tage 4-6)
15 μM Bz-423	37,6 (Tag 3-5)
20 μM Bz-423	292,4 (Tage 2-4)

In Tabelle 10 sind die Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 dargestellt. Ab 5 μM Bz-423 konnte eine geringfügige Zunahme der Zellpopulationsverdopplungszeiten beobachtet werden. So betragen diese 31,3 h (5 μM Bz-423) und 37,6 h (15 μM Bz-423) im Vergleich zu 25,8 h (Kontrolle). Eine weitere Verlängerung der Zellpopulationsverdopplungszeit war bei einer Konzentration von 20 μM Bz-423 zu erkennen. So lag die mittlere Zellpopulationsverdopplungszeit bei 292,4 h (20 μM Bz-423) im Vergleich zu 25,8 h (Kontrolle).

Anschließend wurden die IC_{50} -Werte des Bz-423 auf die HT-29-Zellen bestimmt und in Tabelle 11 dokumentiert. Dabei war nach 24 h Inkubationszeit ein IC_{50} -Wert von 3,21 μM zu ermitteln, welcher nach 96 h Inkubationszeit auf 0,82 μM absank.

Tabelle 11: Übersicht der IC₅₀-Werte der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei einmaliger Bz-423-Zugabe; Einsaatdichte: 1 x 10⁴ Zellen/ml.

Inkubationsdauer mit Bz-423	IC ₅₀ -Werte (Bz-423-Konzentration in µM)
24 h	3,21
48 h	1,72
72 h	1,08
96 h	0,82

Um die Vitalität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 zu untersuchen, wurde der Anteil der lebenden Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl prozentual in Abbildung 15 dargestellt.

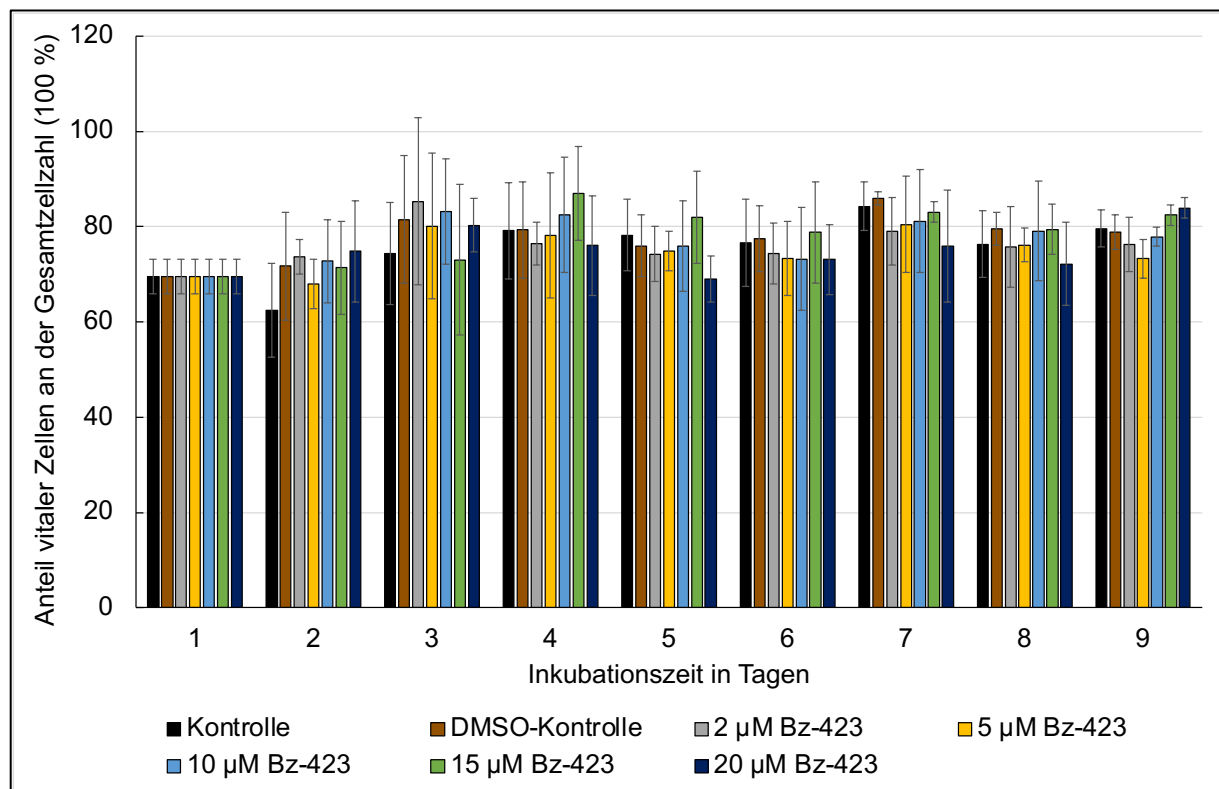


Abbildung 15: Anteil vitaler HT-29-Zellen an der Gesamtzellzahl unter Einfluss von Bz-423. Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind MW ± SD (n=3).

In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass kein Effekt des Wirkstoffes Bz-423 auf den Anteil der vitalen HT-29-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Analog zu den A549-Zellen, wurde, um einen Hinweis auf die Zelltodart zu bekommen, die Größe der vitalen HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration in Abbildung 16 als mittlerer zellulärer Durchmesser dargestellt.

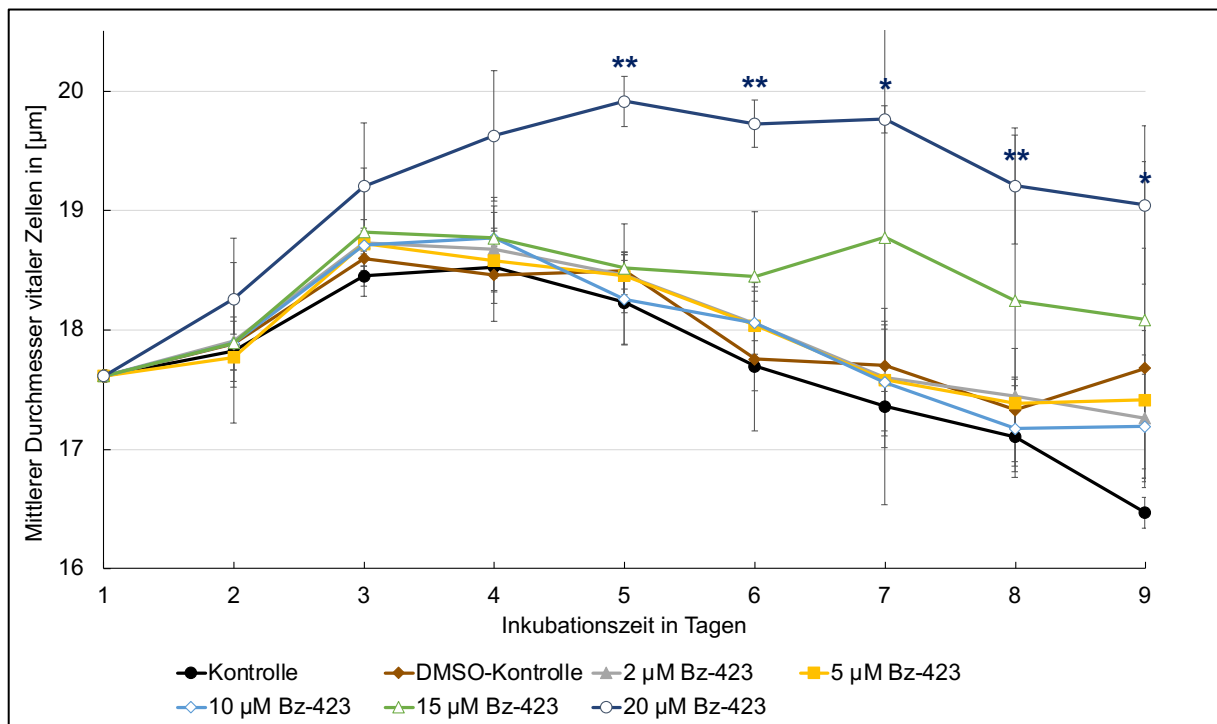


Abbildung 16: Mittlerer Durchmesser lebender HT-29-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von Bz-423. Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind MW± SD (n=3) sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: *p<0,5, **p<0,01.

Die Abbildung 16 zeigt, dass der mittlere Durchmesser vitaler Zellen der Kontrollen und Ansätze bis zum Tag 3 von ca. 17,11 µm (Tag 1) auf ca. 18,25 µm (Tag 3) stieg. Ab Tag 4 sank der mittlere Durchmesser der lebenden Zellen in den Kontrollen und Ansätzen bis 15 µM Bz-423 deutlich auf ca. 16,85 µm (Tag 9). Im Ansatz mit 20 µM Bz-423 zeigte sich bis Tag 5 eine Zunahme des mittleren Durchmessers der lebenden Zellen auf ca. 19,41 µm (Tag 5), um danach auf ca. 18,55 µm (Tag 9) abzusinken. Dabei war der mittlere Durchmesser unter Einfluss von 20 µM Bz-423 signifikant höher, als der Zellen der Kontrolle.

Der mittlere Durchmesser toter HT-29-Zellen in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration ist in Abbildung 17 dargestellt.

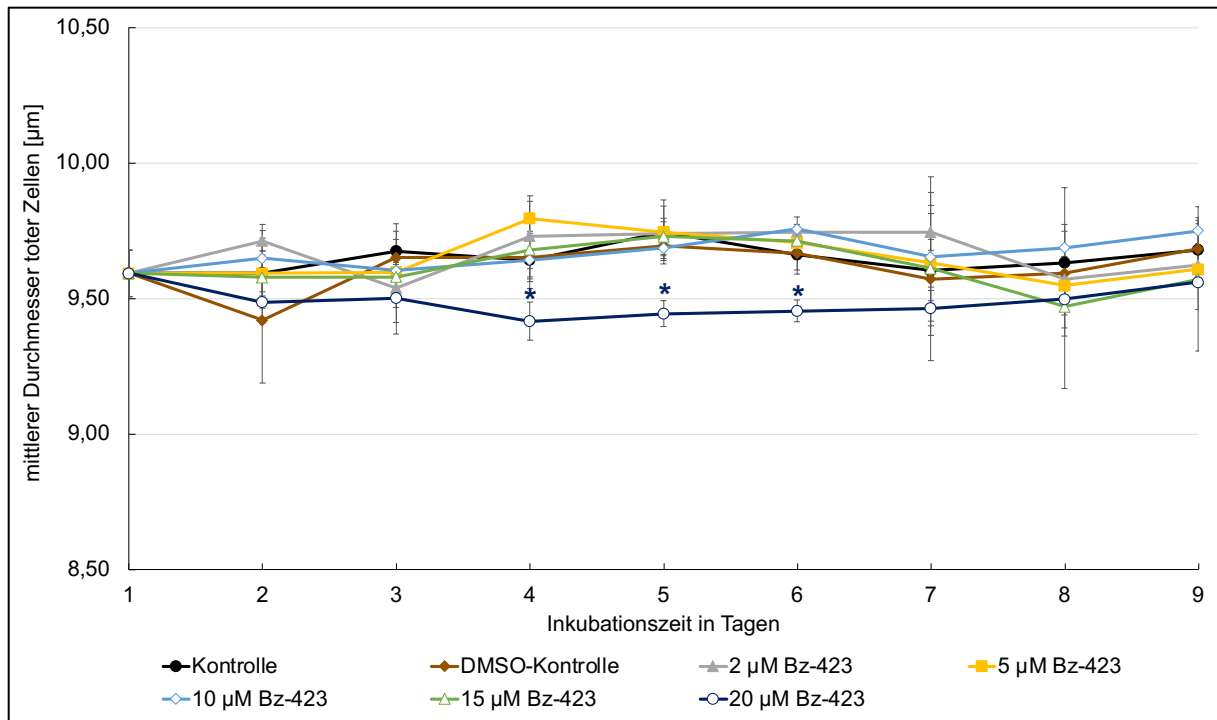


Abbildung 17: Mittlerer Durchmesser toter HT-29-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von Bz-423; Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3$), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: $*p < 0,05$.

Auf den mittleren Durchmesser toter HT-29 Zellen der Kontrollen und Ansätze bis 15 µM Bz-423 zeigte der Wirkstoff keinen wesentlichen Effekt, wie in Abbildung 17 ersichtlich wird. So betrug der mittlere Durchmesser der toten Zellen der Kontrollen am Tag 1 ca. 9,6 µm im Vergleich zu 9,7 µm am Tag 9. Der mittlere Durchmesser toter HT-29-Zellen unter Einfluss von 20 µM Bz-423 lag an den Tagen 4-6 signifikant unter der der Kontrolle. Dementsprechend betrug der mittlere Durchmesser am Tag 5 9,4 µm (20 µM Bz-423, $p < 0,05$) im Vergleich zu 9,8 µm (Kontrolle).

Die Untersuchung der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 zeigte, dass deren Wachstum ab einer Konzentration von 15 µM Bz-423 gehemmt wurde. Der IC_{50} -Wert betrug nach 24 h Inkubationszeit 3,21 µM. Die Vitalität der HT-29-Zellen wurde nicht signifikant verändert. Eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler Zellen konnte ab einer Konzentration von 20 µM Bz-423 bzw. eine Abnahme des mittleren Durchmessers toter HT-29-Zellen beobachtet werden. Hierzu entsprechend nahm die Zellpopulationsverdopplungszeit erst ab einer Konzentration von 20 µM Bz-423 wesentlich zu.

3.3 EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER A549-ZELLEN

Um die Toxizität eines weiteren Mitochondrien-targeted Drug zu untersuchen, wurden Wachstumskurven unter Einfluss von Myxothiazol erstellt. Die Ergebnisse für die Zelllinie A549 sind in den Abbildungen 18 – 21 dargestellt.

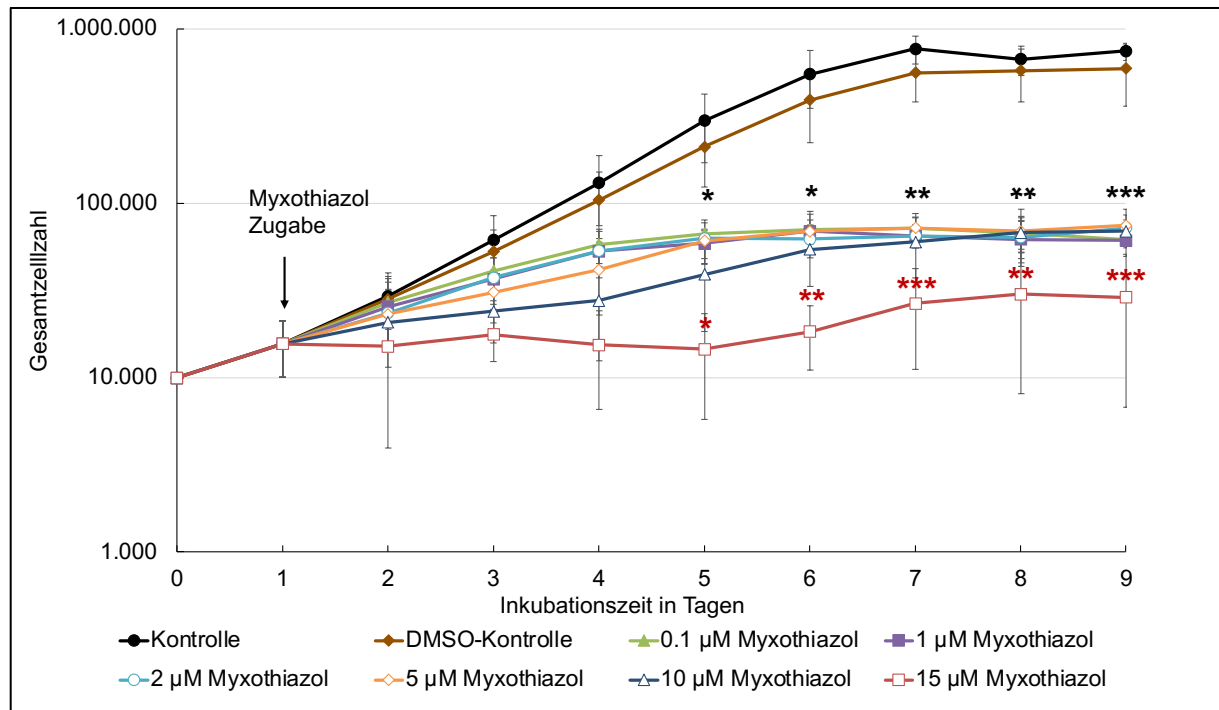


Abbildung 18: Wachstumskurve der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol, dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In Abbildung 18 ist das Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol in Abhängigkeit der Inkubationszeit dargestellt. Das Wachstum der Zellen der DMSO-Kontrolle lagen geringfügig unter dem der Kontrollzellen. So betragen die Gesamtzellzahlen z. B. am Tag 4 210.873 (DMSO-Kontrolle) zu 297.610 (Kontrolle). Bei Myxothiazol-Konzentrationen von 0,1 µM bis 10 µM konnte eine signifikante wachstumshemmende Wirkung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (ab Inkubationstag 5 p<0,05). Ab einer Konzentration von 15 µM Myxothiazol konnte eine weitere Zunahme der Wachstumshemmung nachgewiesen werden. So waren die Gesamtzellzahlen nach Zugabe von Myxothiazol deutlich reduziert. Dementsprechend betragen diese z. B. am Tag 8 69.233 (5 µM Myxothiazol, p<0,01), 67.999 (10 µM Myxothiazol, p<0,01) und 30.168 (15 µM Myxothiazol, p<0,01) im Vergleich zu 670.133 (Kontrolle).

In nachfolgender Tabelle 12 wurden die Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549 Zellen unter Einfluss von Myxothiazol dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol bestimmt durch exponentielle Regressionsanalyse der Tage 2.-4.

Ansätze	Zellpopulationsverdopplungszeiten und Absterbezeiten in h
Kontrolle	21,1
DMSO-Kontrolle	21,7
0,1 µM Myxothiazol	67,5
1 µM Myxothiazol	70,3
2 µM Myxothiazol	64,0
5 µM Myxothiazol	65,4
10 µM Myxothiazol	68,4
15 µM Myxothiazol	-171,5

Die Zellpopulationsverdopplungszeiten der Zellen der Kontroll-Ansätze lagen bei 21,1 (Kontrolle) sowie bei 21,7 (DMSO-Kontrolle). Bereits ab 0,1 µM Myxothiazol konnte eine deutliche Zunahme der Zellpopulationsverdopplungszeit beobachtet werden. Dementsprechend lag diese bei 67,5 h (0,1 µM Myxothiazol). Eine weitere Steigerung der Myxothiazol-Konzentration bis 10 µM Myxothiazol hatte keine Erhöhung der Zellpopulationsverdopplungszeit zur Folge. Ab einer Konzentration von 15 µM Myxothiazol konnte eine Absterbezeit von 171,5 h berechnet werden.

Anschließend wurden IC₅₀-Werte des Myxothiazols auf die A549-Zellen berechnet und in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Übersicht der IC₅₀-Werte der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei einmaliger Myxothiazol-Zugabe; Einsaatdichte: 1 x 10⁴ Zellen/ml.

Inkubationsdauer mit Myxothiazol	IC ₅₀ -Werte (Myxothiazol-Konzentration in µM)
24 h	4,48
48 h	2,50
72 h	1,90
96 h	1,64
120 h	1,57
144 h	1,55
168 h	1,55
192 h	1,54

Es zeigte sich, dass die IC₅₀-Werte von 4,48 µM Myxothiazol (nach 24-stündiger Inkubation) auf 1,55 µM Myxothiazol (nach 144-stündiger Inkubation) abfielen und ab diesem Zeitraum stagnierten (Tabelle 13).

Des Weiteren wurde die Vitalität der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol untersucht und in Abbildung 19 dargestellt.

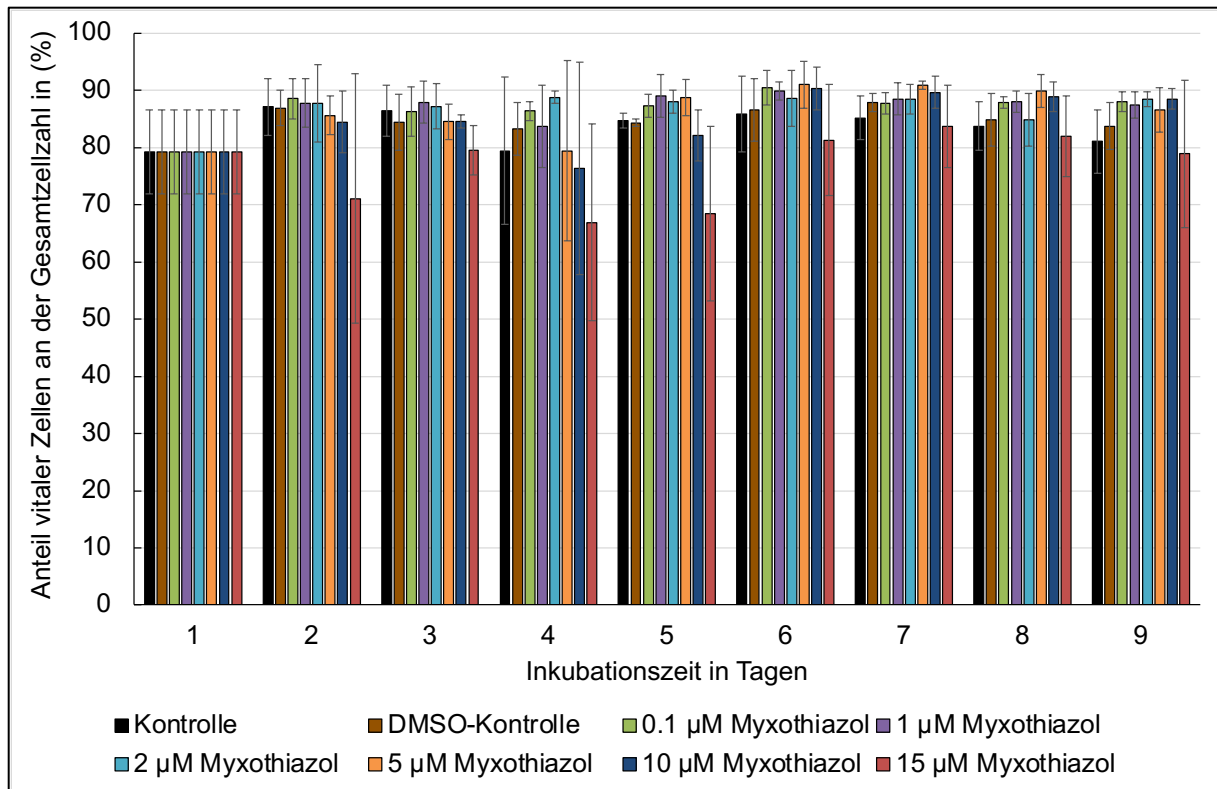


Abbildung 19: Anteil vitaler A549-Zellen an der Gesamtzellzahl unter Einfluss von Myxothiazol, Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind MW ± SD (n=3).

In Abbildung 19 ist ersichtlich, dass das Myxothiazol keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalität der A549-Zellen hatte. An den Tagen 2-6 konnte unter Einfluss von 15 µM Myxothiazol eine Abnahme der Vitalität beobachtet werden. So betrug am Tag 3 der Anteil an lebenden A549-Zellen 67 % (15 µM Myxothiazol) im Vergleich zu 79 % (Kontrolle). Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung waren die Ergebnisse nicht signifikant.

Anschließend wurden die Größenverhältnisse der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol untersucht. Hierfür wurden in Abbildung 20 der mittlere Durchmesser lebender und in Abbildung 21 toter A549-Zellen dargestellt.

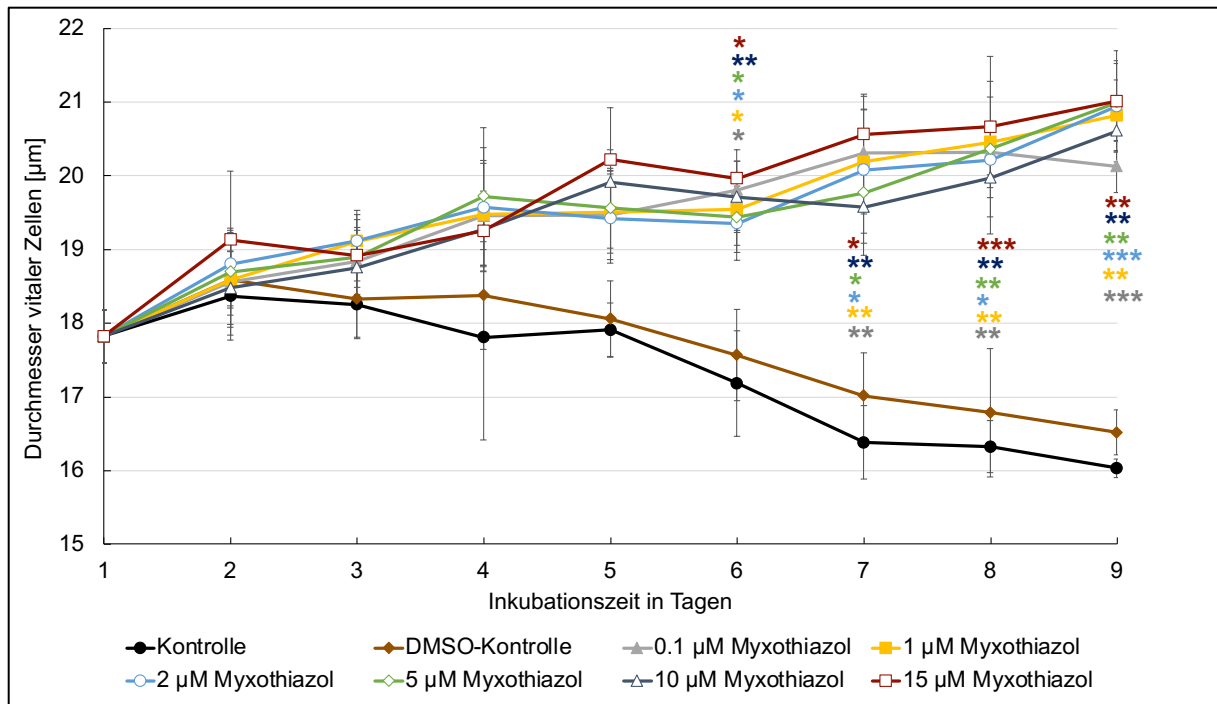


Abbildung 20: Durchmesser vitaler A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol, Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3$), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Inkubationstages: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die mittleren Durchmesser lebender A549-Zellen der Kontrolle und DMSO-Kontrolle nahmen im Laufe der Inkubationszeit ab (Abbildung 20). Die Abnahme der Kontrolle belief sich von $17,8 \mu\text{m}$ (Tag 1) auf $16,0 \mu\text{m}$ (Tag 9). Die Ansätze, welche mit Myxothiazol behandelt worden sind, zeigten eine signifikante Zunahme ihres mittleren Durchmessers ab Tag 5 im Gegensatz zur Kontrolle. So betragen die mittleren Durchmesser der A549-Zellen am Tag 8 $20,4 \mu\text{m}$ ($5 \mu\text{M}$ Myxothiazol, $p < 0,01$), $20,7 \mu\text{m}$ ($15 \mu\text{M}$ Myxothiazol, $p < 0,001$) im Vergleich zu $16,3 \mu\text{m}$ (Kontrolle).

Analog zur Abbildung 20 wurde in Abbildung 21 der mittlere Durchmesser der toten A549-Zellen unter Behandlung mit Myxothiazol in Abhängigkeit der Inkubationszeit dargestellt.

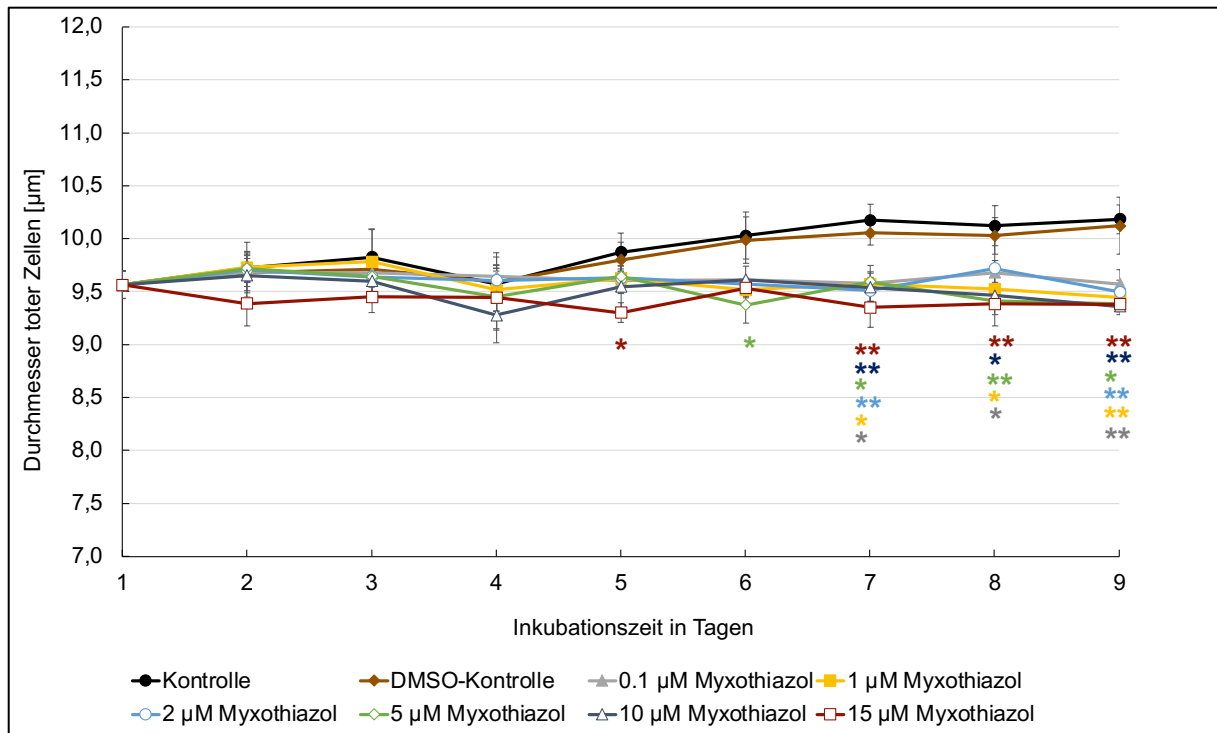


Abbildung 21: Durchmesser toter A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol, Wirkstoffzugabe am Tag 1; dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3$) sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Es zeigte sich in Abbildung 21, dass die toten A549-Zellen unter Behandlung mit Myxothiazol einen konstanten mittleren Durchmesser behielten während die Zellen der Kontrollansätze zunahmen. So betragen die mittleren Durchmesser am 8. Tag $9,7 \mu\text{m}$ ($2 \mu\text{M}$ Myxothiazol), $9,4 \mu\text{m}$ ($5 \mu\text{M}$ Myxothiazol, $p < 0,01$) und $9,3 \mu\text{m}$ ($15 \mu\text{M}$ Myxothiazol, $p < 0,01$) im Vergleich zu $10,1 \mu\text{m}$ (Kontrolle).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der A549-Zellen bereits ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Myxothiazol gehemmt wurde. Diese Hemmung blieb bis $10 \mu\text{M}$ konstant. Eine noch stärkere Wachstumshemmung wurde ab $15 \mu\text{M}$ Myxothiazol nachgewiesen. Hierzu entsprechend konnte eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler Zellen ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Myxothiazol bzw. eine Abnahme des mittleren Durchmessers toter A549-Zellen beobachtet werden. Der Anteil vitaler A549-Zellen war unter Behandlung mit Myxothiazol nicht signifikant verändert. Die Zellpopulationsverdopplungszeit nahm bereits ab $0,1 \mu\text{M}$ Myxothiazol wesentlich zu. Unter $15 \mu\text{M}$ Myxothiazol konnte eine Absterbezeit ermittelt werden. Die IC_{50} -Werte lagen zwischen $4,48 \mu\text{M}$ Myxothiazol bei 24-stündiger Inkubation bis $1,55 \mu\text{M}$ Myxothiazol nach 144-stündiger Inkubation.

3.4 EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL AUF WACHSTUM, VITALITÄT UND ZELLGRÖÖE DER HT-29-ZELLEN

Um die Toxizität von Myxothiazol auf HT-29-Zellen zu bestimmen, wurden wiederum Wachstumskurven erstellt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 22 – 25 dargestellt.

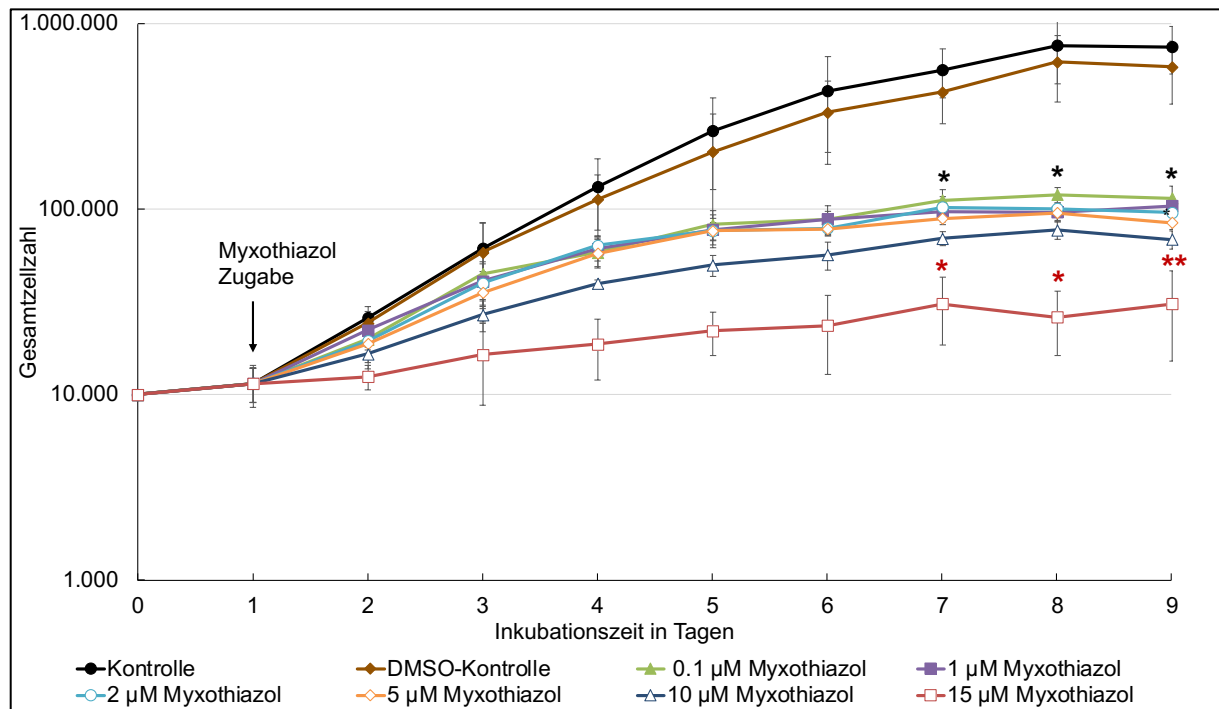


Abbildung 22: Wachstumskurve HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol, dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: *p<0,05, **p<0,01.

In Abbildung 22 ist das Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol dargestellt. Die Ansätze der DMSO-Kontrolle schwankten um die gleichen Werte wie die der Kontrollen. So betragen die Gesamtzellzahlen am Tag 7 621.900 (DMSO-Kontrolle) im Vergleich zu 764.333 (Kontrolle). Es ist zu erkennen, dass es bereits unter Einfluss von 0,1 µM Myxothiazol zu einer Verlangsamung des Wachstums kam. Eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration bis auf 10 µM Myxothiazol führte zu keinem Anstieg der Wachstumshemmung. Erst ab einer Konzentration von 15 µM Myxothiazol wurde eine Verstärkung des Effektes erkennbar. So betrug am Tag 7 die Gesamtzellzahl 119 996 (0,1 µM Myothiazol), 95 527 (5 µM Myxothiazol), 77 327 (10 µM Myxothiazol) und 26 144 (15 µM Myxothiazol) im Vergleich zu 764 333 (Kontrolle) bei einer Signifikanz von p<0,05.

Auch hier wurden die Zellpopulationsverdopplungszeiten berechnet, um die Wachstumskinetik der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol besser beurteilen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol bestimmt durch exponentielle Regressionsanalyse der Tage 2.-4.

Ansätze	Zellpopulationsverdopplungszeiten in h
Kontrolle	22,8
DMSO-Kontrolle	26,6
0,1 μM Myxothiazol	54,1
1 μM Myxothiazol	52,1
2 μM Myxothiazol	51,1
5 μM Myxothiazol	54,0
10 μM Myxothiazol	53,8
15 μM Myxothiazol	113,6

Bei der Betrachtung der Tabelle 14 zeigten sich ähnliche Zellpopulationsverdopplungszeiten der Kontroll-Ansätze von 22,8 h (Kontrolle) und 26,6 h (DMSO-Kontrolle). Die Ansätze von 0,1 μM -10 μM Myxothiazol wiesen einen Anstieg ihrer Zellpopulationsverdopplungszeit auf z.B. 51 h (2 μM Myxothiazol) im Vergleich zu 22,8 h (Kontrolle). Ein weiterer Anstieg zeigte sich unter Behandlung mit 15 μM Myxothiazol auf 113,6 h.

Weiterhin wurden auch hier die IC_{50} -Werte berechnet und in Tabelle 15 dargestellt. Diese lagen nach 24-stündiger Inkubation mit Myxothiazol bei 4,33 μM und nach 144-stündiger Inkubation bei 1,62 μM .

Tabelle 15: Übersicht der IC₅₀-Werte der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei einmaliger Myxothiazol-Zugabe; Einsaatdichte: 1 x 10⁴ Zellen/ml.

Inkubationsdauer mit Myxothiazol	IC ₅₀ -Werte (Myxothiazol-Konzentration in µM)
24 h	4,33
48 h	2,84
72 h	1,90
96 h	1,59
120 h	1,63
144 h	1,62
168 h	1,59
192 h	1,59

Wiederum wurde der Anteil der lebendigen Zellen an der Gesamtzellzahl untersucht und in Abbildung 23 dargestellt.

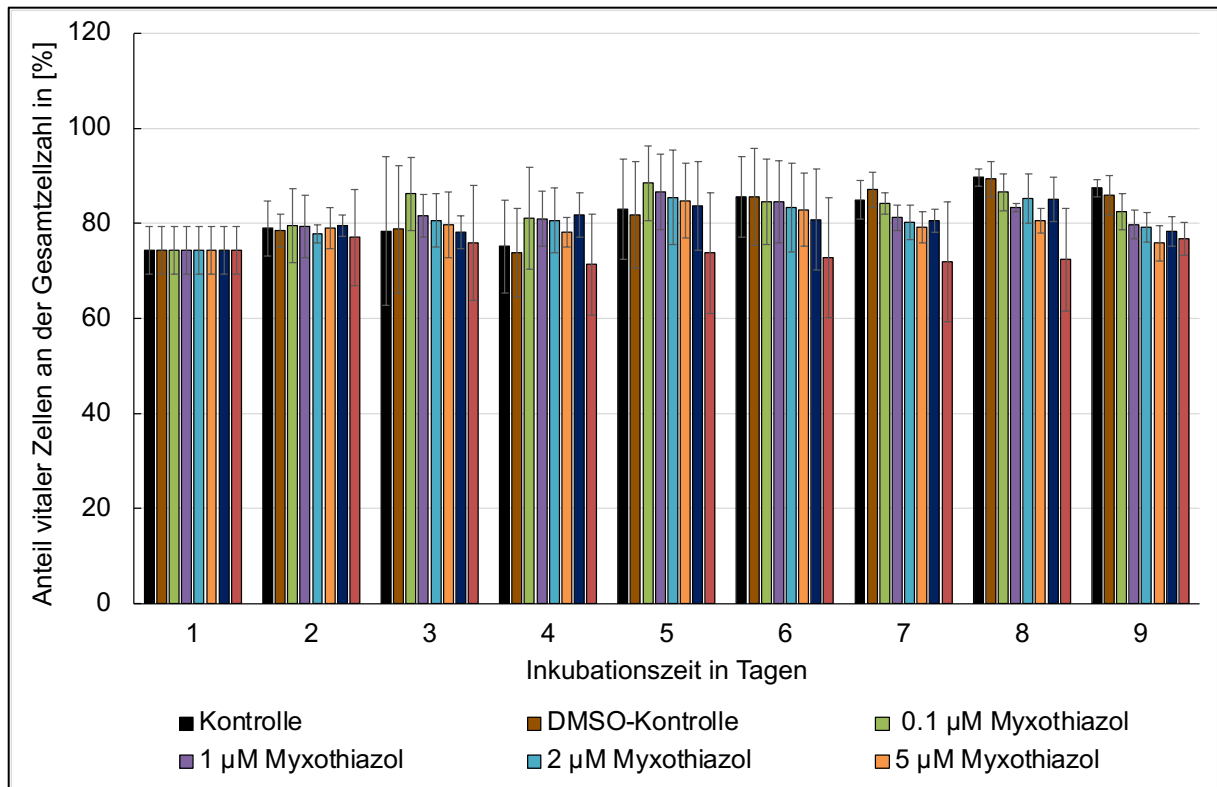


Abbildung 23: Vitalität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol, Wirkstoffzugabe erfolgte am Tag 1; dargestellt sind MW \pm SD (n=3).

In Abbildung 23 zeigte sich, dass die Ansätze mit 20 μ M Myxothiazol eine geringere Vitalität zeigten, als die Kontrollansätze. Allerdings waren die Standardabweichungen relativ hoch.

Analog zu den vorherigen Wachstumskurven, wurde das Größenverhältnis der HT-29 -Zellen unter Einfluss von Myxothiazol untersucht. In Abbildung 24 wurde der mittlere Durchmesser vitaler HT-29-Zellen unter Behandlung von verschiedenen Konzentrationen Myxothiazol in Abhängigkeit der Inkubationstage dargestellt.

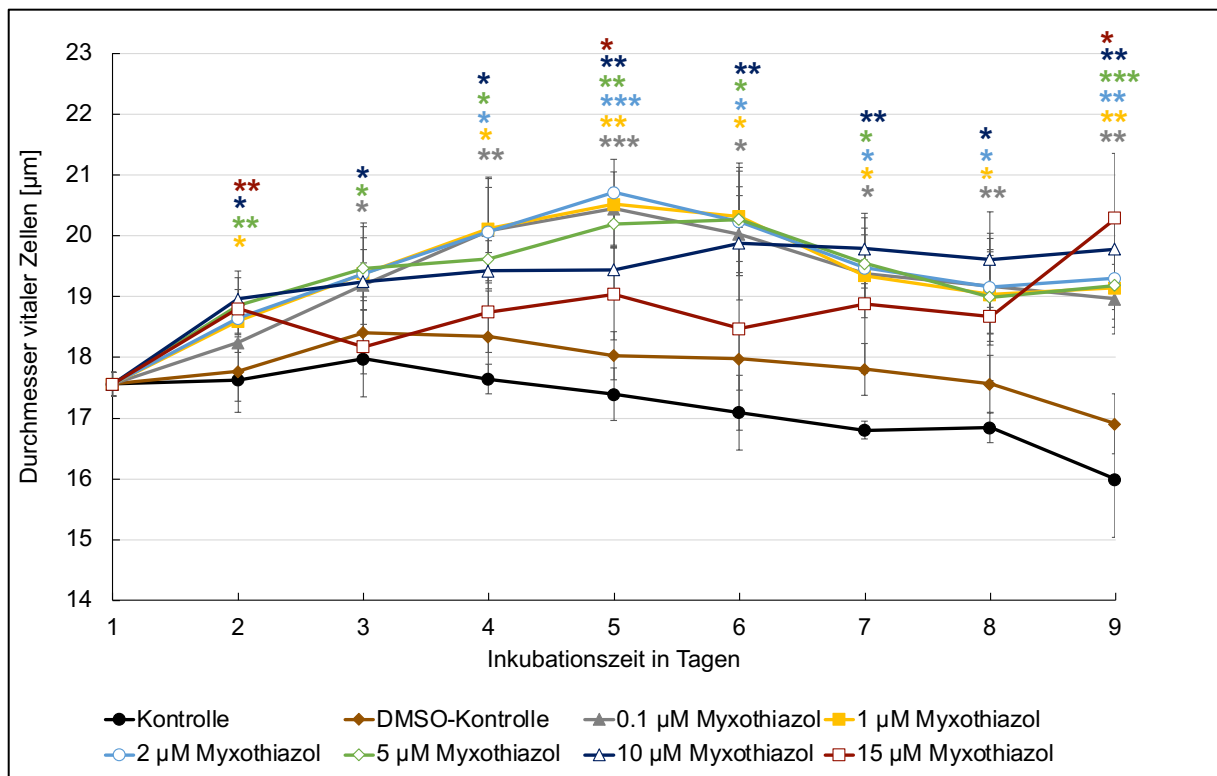


Abbildung 24: Durchmesser vitaler HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol: Wirkstoffzugabe an Tag 1; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3), sowie die Signifikanz bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In Abbildung 24 ist ersichtlich, dass unter Einfluss von Myxothiazol eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler HT-29-Zellen erfolgte. So betrug am Tag 8 der mittlere Durchmesser 19,2 μ m (0,1 μ M Myxothiazol, p<0,01), 19,0 μ m (5 μ M Myxothiazol) und 18,7 μ m (15 μ M Myxothiazol) im Vergleich zu 16,8 μ m (Kontrolle). Die Kontrollzellen nahmen an Durchmesser im Laufe der Inkubationszeit ab. Dementsprechend lagen die mittleren Durchmesser am 3. Inkubationstag bei 17,6 μ m (Kontrolle) und 18,3 μ m (DMSO-Kontrolle), sowie am 9. Inkubationstag bei 16,0 μ m (Kontrolle) und 16,9 μ m (DMSO-Kontrolle).

Der mittlere Durchmesser toter HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol ist in Abbildung 25 dargestellt.

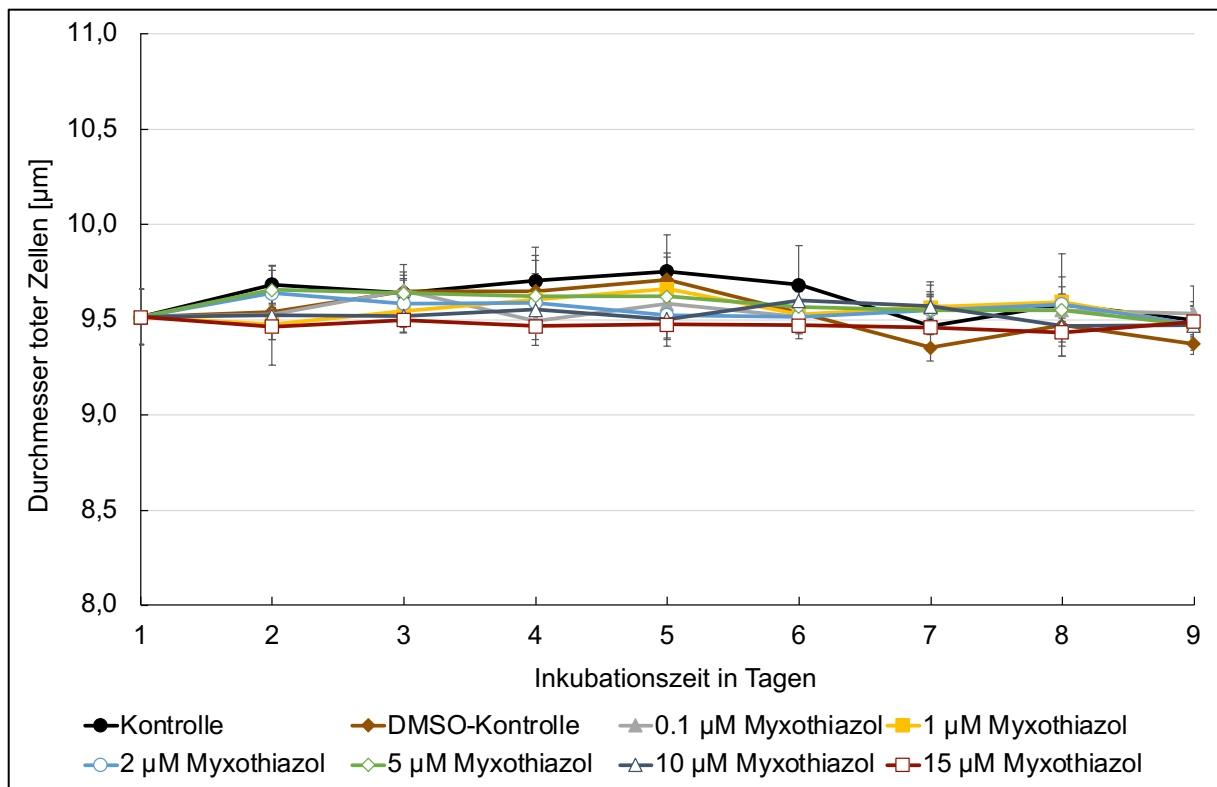


Abbildung 25: Durchmesser toter HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol Wirkstoffzugabe an Tag 1; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3).

Der Durchmesser toter HT-29 Zellen zeigte keine wesentlichen Änderungen unter Einfluss von Myxothiazol, wie aus der Abbildung 25 zu entnehmen ist. So lagen die Durchmesser der toten HT-29-Zellen aller Ansätze im Mittel zwischen 9,5 μ m und 9,6 μ m.

Zusammenfassend zeigten die HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol eine Wachstumshemmung bereits ab 0,1 μ M Myxothiazol, welche erst ab 15 μ M Myxothiazol weiter zunahm. Dementsprechend nahm die Zellpopulationsverdopplungszeit bereits ab 0,1 μ M Myxothiazol deutlich zu, sowie erfolgte eine weitere Zunahme bei 15 μ M Myxothiazol. Der IC₅₀-Wert lag nach 24-stündiger Inkubation bei 4,33 μ M Myxothiazol. Auf die Vitalität der HT-29-Zellen zeigte das Myxothiazol keinen wesentlichen Einfluss. Der mittlere Durchmesser vitaler HT-29-Zellen nahm in dem Konzentrationsbereich von 0,1 μ M Myxothiazol bis 10 μ M Myxothiazol signifikant zu. Hingegen beeinflusste Myxothiazol den mittleren Durchmesser der toten HT-29-Zellen nicht.

3.5 VERGLEICH DES WACHSTUMS DER A549- UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Die HT-29 Zellen waren resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen. So zeigte sich bei den A549-Zellen bereits ab 10 μM Bz-423 eine Wachstumshemmung, bei den HT-29-Zellen erst ab 15 μM Bz-423. Dementsprechend war in der Untersuchung des mittleren Durchmessers zu sehen, dass dieser bei den vitalen HT-29-Zellen ab einer Konzentration von 20 μM Bz-423 stieg, wohingegen bei den A549-Zellen dieser bereits ab 10 μM Bz-423 zunahm. Weiterhin verlängerte sich die Zellpopulationsverdopplungszeit bei den A549-Zellen ab 15 μM Bz-423 und bei den HT-29-Zellen erst ab 20 μM Bz-423. Der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl wurde in beiden Zelllinien vom Bz-423 nicht signifikant beeinflusst. Die IC_{50} -Werte bei einer 24-stündigen Inkubationszeit betragen 3,21 μM Bz-423 für die HT-29-Zellen und 3,85 μM Bz-423 für die A549-Zellen.

Der Wirkstoff Myxothiazol zeigte bei beiden Zelllinien ähnliche Wachstumshemmungen im Bereich von 0,1 μM bis 10 μM Myxothiazol und einer weiteren Zunahme der Hemmung ab 15 μM Myxothiazol. Hierzu entsprechend konnte eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler A549-Zellen ab einer Konzentration von 0,1 μM Myxothiazol bzw. eine Abnahme des mittleren Durchmessers toter A549-Zellen beobachtet werden. Der mittlere Durchmesser der vitalen HT-29-Zellen nahm ähnlich zu den A549-Zellen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 μM Myxothiazol und 10 μM Myxothiazol zu. Hingegen änderte sich der mittlere Durchmesser toter HT-29-Zellen unter Behandlung mit Myxothiazol nicht wesentlich. Die Zellpopulationsverdopplungszeiten nahmen in beiden Zelllinien ab 0,1 μM Myxothiazol wesentlich zu. Unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol konnte bei den HT-29-Zellen eine weitere Zunahme der Zellpopulationsverdopplungszeit berechnet werden, wohingegen bei den A549-Zellen bereits eine Absterbezeit ermittelt wurde. Die IC_{50} -Werte lagen nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 4,33 μM Myxothiazol (HT-29-Zellen) bzw. 4,48 μM Myxothiazol (A549-Zellen). Auf den Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl hatte Myxothiazol in beiden Zelllinien keinen wesentlichen Einfluss. In Zusammenschau der Ergebnisse waren die HT-29-Zellen gegenüber Myxothiazol geringfügig resistenter als die A549-Zellen.

3.6 ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG

Um zu untersuchen, wie sich der Wirkstoff Bz-423 in Kombination mit ionisierender Strahlung auf die A549-Zellen auswirkt, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Als Grundlage dienten dazu die Wachstumskurven, bei welchen zu erkennen war, dass es zu einer Wachstumshemmung ab 10 µM Bz-423 kam. Aus diesem Grund wurden für die Erstellung von Koloniebildungstests der Zelllinie A549 Konzentrationen von 10 µM Bz-423 und 15 µM Bz-423 verwendet. Hierbei wurden zunächst die Plattiereffizienzen (PE) ermittelt, welche die Koloniebildungsfähigkeit beschreiben. Koloniebildungsfähigkeit definiert, wieviel von den eingesäten A549-Zellen fähig waren eine Kolonie von mehr als 50 Zellen zu bilden. Die ermittelten PE wurden in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Plattiereffizienzen der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423 und Bestrahlung: dargestellt sind MW± SD aus: Kontrolle: n=13; DMSO-Kontrolle, 15 µM Bz-423: n=4; 10 µM Bz-423: n=3, sowie Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle ohne Wirkstoff der jeweils gleichen Strahlendosis.

Strahlendosis in Gy	Plattiereffizienzen in % ± SD (Signifikanz)			
	Kontrolle	DMSO-Kontrolle	10 µM Bz-423	15 µM Bz-423
0	51,5 ± 19,8	54,2 ± 14,5	40,4 ± 5,2	25,8 ± 12,1 (p<0,05)
2	45,5 ± 18,1	45,4 ± 14,4	31,2 ± 4,3 (p<0,05)	12,7 ± 9,9 (p<0,001)
4	30,1 ± 13,9	29,3 ± 13,5	20,9 ± 5,7	8,1 ± 4,7 (p<0,001)
6	15,2 ± 8,1	14,9 ± 3,3	9,3 ± 1,4 (p<0,05)	3,5 ± 2,3 (p<0,001)
8	4,2 ± 2,8	7,1 ± 2,4	2,3 ± 0,6 (p<0,05)	1,1 ± 0,6 (p<0,01)

Bei Auswertung der Tabelle 16 wurde deutlich, dass eine steigende Bestrahlungsdosis zu einer Abnahme der PE führte. So sank diese in der Kontrolle ohne Wirkstoff von 51,5 % (0 Gy) auf 4,2 % (8 Gy). Auch bei Kombination von Bestrahlung und Wirkstoff war die PE der bestrahlten Ansätze niedriger als die der nur mit Bz-423 behandelten Ansätze. Beispielsweise lag die PE der A549-Zellen nach 2 Gy unter Einfluss von 10 µM Bz-423 mit 31,2 % signifikant unter dem des Ansatzes der Kontrolle (2 Gy, 0 µM) mit 45,5 %. Die geringste Koloniebildungsfähigkeit wurde unter dem kombinierten Einfluss von 15 µM Bz-423 und 8 Gy Bestrahlung be-

obachtet. Dabei betrug die PE 1,1 %. Aus den PE wurden anschließend die Überlebensfraktionen (survival fraction, SF) ermittelt, welche zusätzlich in Abbildung 26 normiert dargestellt sind. Die Normierung der Überlebensfraktionen auf den jeweiligen 0 Gy-Wert wurde durchgeführt, um eine eventuelle Strahlensensibilisierung besser darstellen zu können.

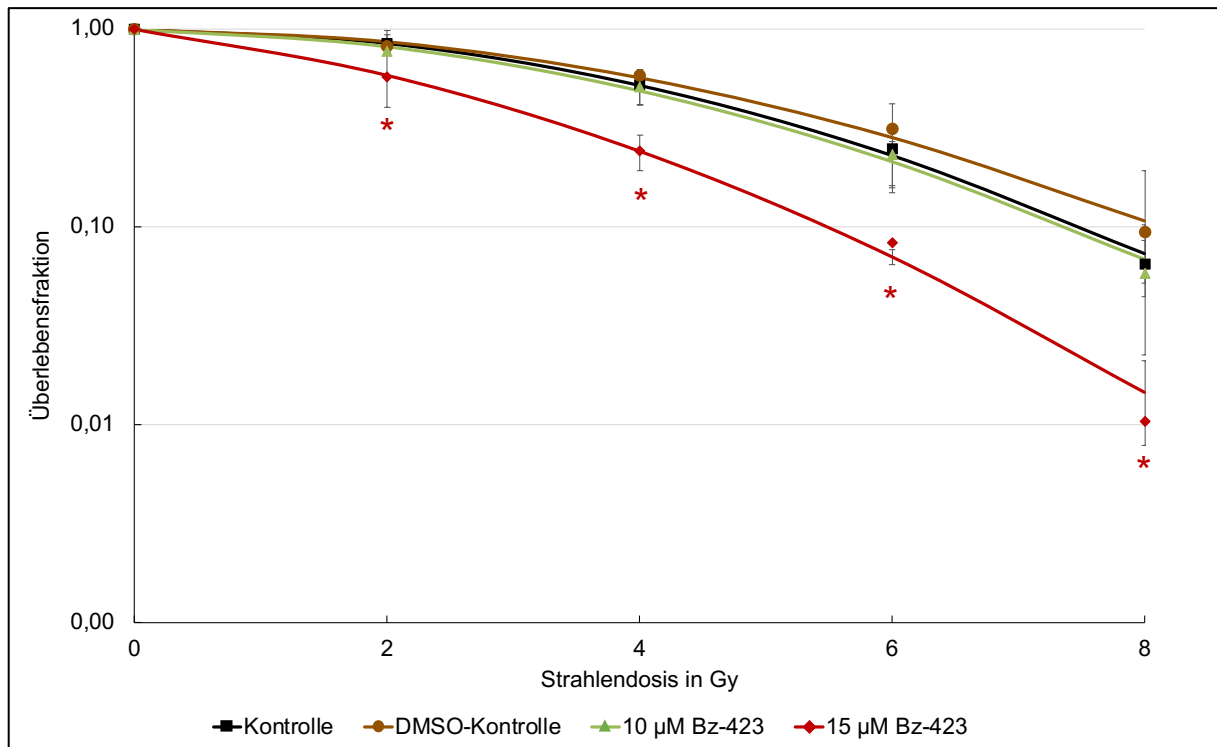


Abbildung 26: Klonogenes Überleben der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423, normiert; dargestellt sind $MW \pm SD$ (Kontrolle: $n=13$; DMSO-Kontrolle, 10 µM Bz-423: $n=3$; 15 µM Bz-423: $n=4$), sowie Signifikanzen bei 15 µM Bz-423 bezogen auf die unbehandelte Kontrolle gleicher Bestrahlungsdosis: * $p < 0,05$.

In Abbildung 26 wurde die Überlebensfraktion der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis unter Einfluss von Bz-423 dargestellt. Das klonogene Überleben aller Ansätze nahm mit steigender Strahlendosis ab. So sank die SF der Kontrolle ohne Wirkstoff von 1,0 (0 Gy) über 0,85 (2 Gy), 0,52 (4 Gy), 0,25 (6 Gy) auf 0,06 (8 Gy). Das Überleben der Zellen der DMSO-Kontrolle war geringfügig höher als das der Zellen der Kontrolle. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine signifikante Abnahme der SF in Bezug zur Kontrolle der jeweils gleichen Strahlendosis konnte unter 15 µM Bz-423 nachgewiesen werden. So betrug diese unter Einfluss von 4 Gy 0,24 (15 µM Bz-423) im Vergleich zu 0,52 (Kontrolle: 0 µM) bei einer Signifikanz von $p < 0,02$. Somit konnte eine konzentrationsabhängige Strahlensensibilisierung der A549-Zellen durch 15 µM Bz-423 nachgewiesen werden. Das klonogene Überleben der Zellen unter Einfluss von 10 µM Bz-423 lag geringfügig unterhalb der Kontrollzellen. So betrug die SF2 (SF nach 2 Gy) nur 0,77 (10 µM Bz-423) im Vergleich zu 0,85 (Kontrolle: 0 µM).

3.7 ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG

Analog zu den A549-Zellen wurde für die HT-29-Zellen ebenfalls Koloniebildungstests erstellt. Unter Einfluss von 20 µM Bz-423 konnten nach drei unabhängigen Versuchen keine Kolonien bzw. überlebende Zellen nachgewiesen werden, sodass im Folgenden die Koloniebildung unter Einfluss von 15 µM Bz-423 und 17,5 µM Bz-423 untersucht wurde; die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Plattiereffizienz der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 und unterschiedlichen Bestrahlungsdosen: dargestellt sind MW ± SD (Kontrolle: n=12; DMSO-Kontrolle, 17,5 µM Bz-423: n=3; 15 µM Bz-423: n=4;), sowie Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle ohne Wirkstoff der jeweiligen Strahlendosis.

Strahlendosis in Gy	Plattiereffizienzen in % ± SD (Signifikanz)			
	Kontrolle	DMSO-Kontrolle	15 µM Bz-423	17,5 µM Bz-423
0	57,7 ± 16,4	50,5 ± 14,3	30,7 ± 15,5 (p<0,05)	28,6 ± 4,1 (p<0,001)
2	46,7 ± 9,8	40,1 ± 11,3	25,2 ± 16,0 (p<0,05)	22,6 ± 5,6 (p<0,01)
4	30,6 ± 8,0	30,0 ± 14,6	16,3 ± 7,6	13,1 ± 5,0 (p<0,01)
6	15,7 ± 5,5	16,3 ± 11,4	6,6 ± 3,7 (p<0,01)	4,4 ± 5,4 (p<0,05)
8	4,3 ± 2,9	7,3 ± 6,9	2,1 ± 0,9 (p<0,05)	1,4 ± 1,5

Die Tabelle 17 zeigt, dass analog zu den A549-Zellen die PE mit zunehmender Strahlendosis in allen Ansätzen abnahm. So fiel die PE der Kontrolle ohne Wirkstoff von 57,7 % (0 Gy) auf 4,2 % (8 Gy) ab. Die PE der DMSO-Kontrollen verhielten sich ähnlich der PE der Kontrollen. Unter Einfluss von 15 µM Bz-423 kam es zu einer Abnahme der PE mit steigender Bestrahlungsdosis von 0 Gy (PE von 30,7 %) bis 6 Gy (PE von 6,6 %). Auch unter Einfluss von 17,5 µM Bz-423 nahm die PE im Bezug zur Kontrolle ohne Wirkstoff ab. Nach der Bestrahlung mit 2 Gy lag die PE bei 22,6 % (17,5 µM Bz-423) im Vergleich zu 46,7 % (Kontrolle 0 µM) mit einer Signifikanz von p<0,01. Die zusätzliche Gabe von Bz-423 vor der Bestrahlung beeinflusste somit die PE stärker als die alleinige Bestrahlung.

Auch hier wurden die Zellüberlebenskurven aus den PE ermittelt und in Abbildung 27 dargestellt.

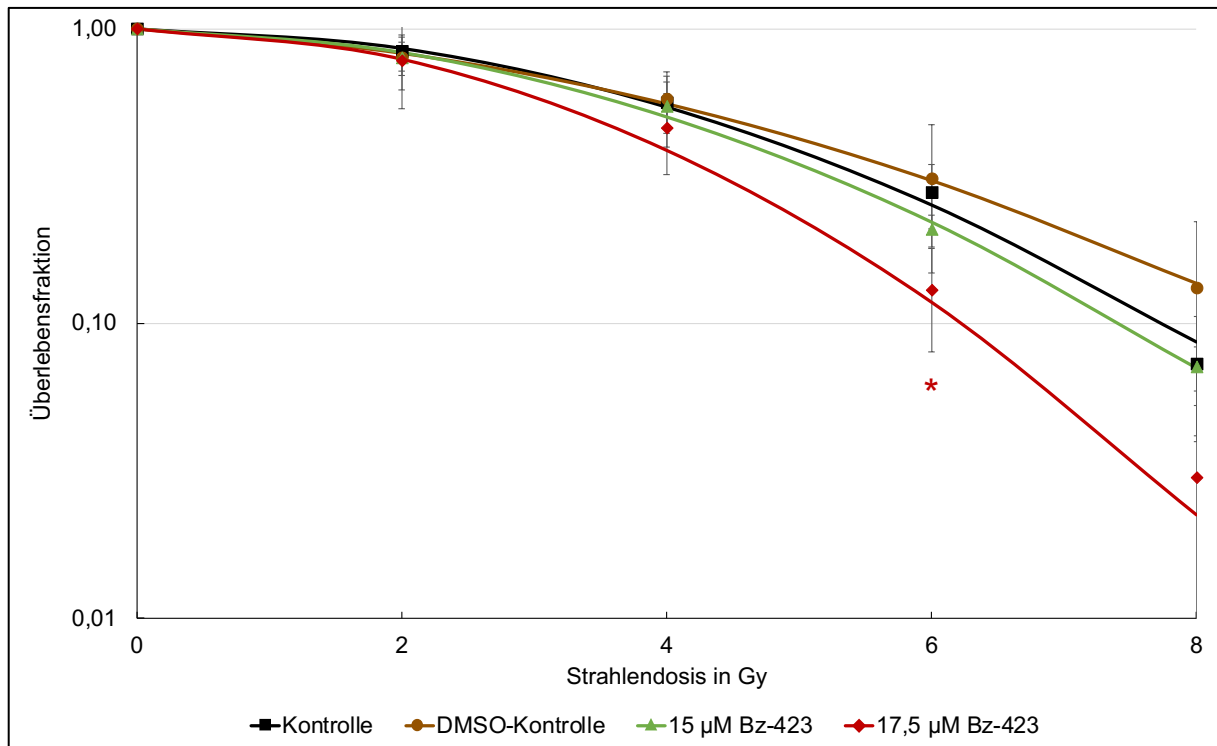


Abbildung 27: Klonogenes Überleben der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423; dargestellt sind $MW \pm SD$ (Kontrolle: $n=12$; DMSO-Kontrolle, 15 µM Bz-423: $n=4$; 17,5 µM Bz-423: $n=3$), sowie Signifikanzen von 17,5 µM Bz-423 bezogen auf die unbehandelte Kontrolle gleicher Bestrahlungsdosis: * $p < 0,05$.

In Abbildung 27 sind die Überlebensfraktionen der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis und unter Einfluss von Bz-423 dargestellt. Es zeigte sich, dass das klonogene Überleben in allen Ansätzen mit steigender Strahlendosis abnahm. So betragen beispielsweise die SF der Kontrollen ohne Wirkstoff 1,00 (0 Gy), 0,84 (2 Gy), 0,56 (4 Gy) und 0,28 (6 Gy) und 0,07 (8 Gy). Die Überlebenskurve der Zellen der DMSO-Kontrolle lag nicht signifikant oberhalb der Überlebenskurve der Kontrollzellen ohne Wirkstoff.

Weiterhin war bei der Auswertung der Abbildung 27 zu sehen, dass die Überlebenskurve der HT-29-Zellen nach Behandlung mit 15 µM Bz-423 keine signifikante Strahlensensibilisierung zeigte. Die SF lag beispielsweise unter 6 Gy Bestrahlung bei 0,21 (15 µM Bz-423) im Gegensatz zu 0,28 (Kontrolle).

Hingegen fiel die Überlebenskurve der mit 17,5 µM Bz-423 behandelten Zellen stärker ab, als die der Kontrollen. Beispielsweise betrug nach 6 Gy Bestrahlung die SF 0,13 (17,5 µM Bz-423) im Vergleich zu 0,28 (Kontrolle 0 µM, $p < 0,05$). Es wurde eine Strahlensensibilisierung unter Einfluss von 17,5 µM Bz-423 nachgewiesen.

3.8 ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG

Auch für den Wirkstoff Myxothiazol wurden Koloniebildungstests erstellt, um Informationen zum Verhalten der A549-Zellen unter kombinierter Behandlung (ionisierende Strahlung und Wirkstoff) zu bekommen. Zunächst wurde analog zum Wirkstoff Bz-423 die PE ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Plattiereffizienzen der A549-Zellen in Abhängigkeit von Myxothiazol sowie verschiedenen Bestrahlungsdosen. dargestellt sind $MW \pm SD$ (Kontrolle: n=13; DMSO-Kontrolle: n=4; 5 μM Myxothiazol, 15 μM Myxothiazol: n=3), sowie Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle ohne Wirkstoff der jeweiligen Strahlendosis.

Strahlendosis in Gy	Plattiereffizienzen in % \pm SD; (Signifikanzen)			
	Kontrolle	DMSO-Kontrolle	5 μM Myxothiazol	15 μM Myxothiazol
0	51,5 \pm 19,8	46,9 \pm 17,6	27,7 \pm 5,0 (p<0,01)	14,4 \pm 8,6 (p<0,001)
2	45,5 \pm 18,1	36,9 \pm 12,7	22,9 \pm 6,1 (p<0,01)	6,4 \pm 2,2 (p<0,001)
4	30,1 \pm 13,9	29,4 \pm 13,9	15,5 \pm 8,4	3,2 \pm 3,0 (p<0,001)
6	15,2 \pm 8,1	18,8 \pm 7,5	6,8 \pm 3,6 (p<0,05)	1,3 \pm 0,6 (p<0,001)
8	4,2 \pm 2,8	7,1 \pm 2,3	1,6 \pm 1,1 (p<0,05)	0,15 \pm 0,13 (p<0,001)

Auch für den Versuchsansätze mit Myxothiazol zeigte sich eine Abnahme der PE der A549-Zellen mit steigender Bestrahlungsdosis. So betrug die PE 51,5 % (0 Gy, Kontrolle 0 μM) im Vergleich zu 34,2 % (8 Gy, Kontrolle 0 μM). Die Zellen in den Ansätzen der DMSO-Kontrollen verhielten sich ähnlich der der Kontrollen ohne Wirkstoff, wie in Tabelle 18 zu sehen ist. Unter Einfluss mit Myxothiazol konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der PE beobachtet werden. Diese Abnahme war stärker als die in den Kontrollen ohne Wirkstoff. So sank die PE nach Behandlung mit 5 μM Myxothiazol von 27,7 % (0 Gy, p<0,01) über 22,9 % (2 Gy, p<0,01) auf 1,6 % (8 Gy, p<0,05). Ein stärkeres Absinken der PE erfolgte unter Zugabe von 15 Myxothiazol von 14,4 % (0 Gy) über 6,4 % (2 Gy) auf 0,15 % (8 Gy) bei einer Signifikanz von p<0,001.

Die Überlebenskurven der bestrahlten A549-Zellen mit und ohne Einfluss von Myxothiazol sind zusätzlich in Abbildung 28 dargestellt.

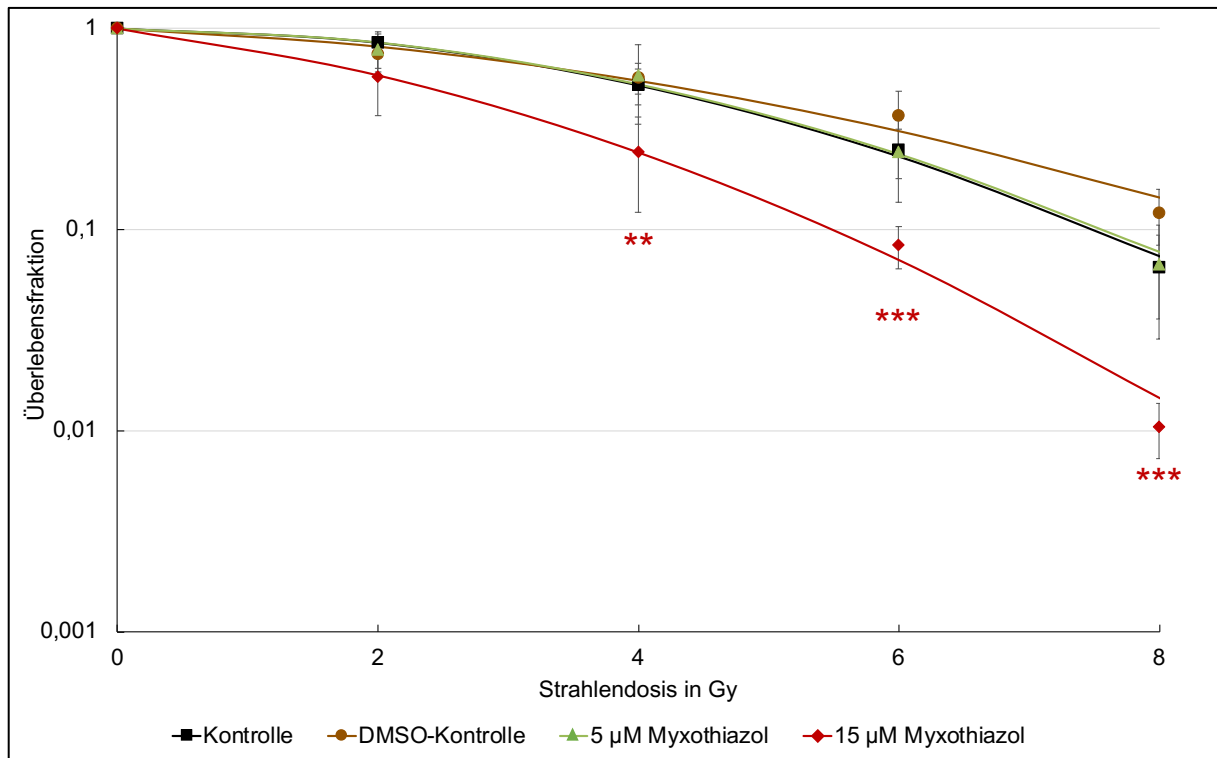


Abbildung 28: Klonogenes Überleben der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung, normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (Kontrolle: n=13; DMSO-Kontrolle, 5 µM Myxothiazol, 15 µM Myxothiazol: n=4), sowie Signifikanzen von 15 µM Myxothiazol in Bezug zur jeweils gleichen Strahlendosis der Kontrolle: **p<0,01, ***p<0,001.

Aus der Abbildung 28 wird ersichtlich, dass die Überlebenskurve der Zellen in der DMSO-Kontrolle nicht signifikant oberhalb der der Kontrolle ohne Wirkstoff verlief. So betrug die SF nach der Bestrahlung mit 6 Gy 0,37 (DMSO-Kontrolle) im Vergleich zu 0,25 (Kontrolle 0 µM). Die Zellüberlebenskurve der A549-Zellen mit Zugabe von 5 µM Myxothiazol zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die der Kontrolle ohne Wirkstoff. Beispielsweise lagen die SF nach einer Bestrahlung mit 4 Gy bei 0,58 (5 µM Myxothiazol) und 0,52 (Kontrolle 0 µM). Eine signifikante Strahlensensibilisierung der A549-Zellen konnte bei Inkubation mit einer Myxothiazol-Konzentration von 15 µM gezeigt werden. Die Strahlensensibilisierung zeigte sich auch in dem breiter werdenden Abstand zwischen den Zellüberlebenskurven der Kontrolle ohne Wirkstoff und der Kurve unter Einfluss von 15 µM Myxothiazol. So betrug die Überlebensfraktion nach 6 Gy 0,06 (15 µM Myxothiazol, p<0,01) im Vergleich zu 0,25 (Kontrolle 0 µM).

3.9 ANALYSE DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL IN KOMBINATION MIT BESTRAHLUNG

Simultan zu den A549-Zellen wurden für die HT-29-Zellen Koloniebildungstests unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung erstellt. Die berechneten PE sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Plattiereffizienzen der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Myxothiazol sowie verschiedener Bestrahlungsdosen. Dargestellt sind MW± SD (Kontrolle: n=13; DMSO-Kontrolle: n=4; 5 µM Myxothiazol, 15 µM Myxothiazol: n=3), sowie Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle ohne Wirkstoff der jeweiligen Strahlendosis.

Strahlendosis in Gy	Plattiereffizienzen in % ± SD; (Signifikanzen)			
	Kontrolle	DMSO-Kontrolle	5 µM Myxothiazol	15 µM Myxothiazol
0	57,7 ± 16,4	47,6 ± 13,7	49,1 ± 9,5	27,8 ± 7,3 (p<0,01)
2	46,7 ± 9,8	42,1 ± 13,5	39,4 ± 8,1	13,3 ± 5,7 (p<0,001)
4	30,6 ± 8,0	30,2 ± 8,9	25,9 ± 7,9	3,9 ± 1,8 (p<0,001)
6	15,7 ± 5,5	22,1 ± 6,7	11,3 ± 3,2	1,0 ± 0,4 (p<0,001)
8	4,3 ± 2,9	10,5 ± 4,9	3,6 ± 2,8	0,5 ± 0,02 (p<0,001)

Wie aus den bereits gezeigten Experimenten wird ebenfalls in Tabelle 19 ersichtlich, dass es unter Zunahme der Strahlendosis zu einer Abnahme der PE in allen Ansätzen kam. Dabei verlief die PE der Kontrolle (0 µM) von 57,7 % (0 Gy) über 30,6 % (4 Gy) bis zu 4,3 % (8 Gy). Unter Zusatz von 5 µM Myxothiazol konnte keine signifikante Abnahme der PE beobachtet werden. Hingegen nahm nach Behandlung mit 15 µM Myxothiazol die PE im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff signifikant ab. So betragen die PE beispielsweise nach 4 Gy Bestrahlung 25,9 % (5 µM Myxothiazol), 3,9 % (15 µM Myxothiazol, p<0,001) und 30,6 % (Kontrolle 0 µM).

Erneut wurden die Zellüberlebenskurven aus den PE ermittelt und in Abbildung 29 dargestellt.

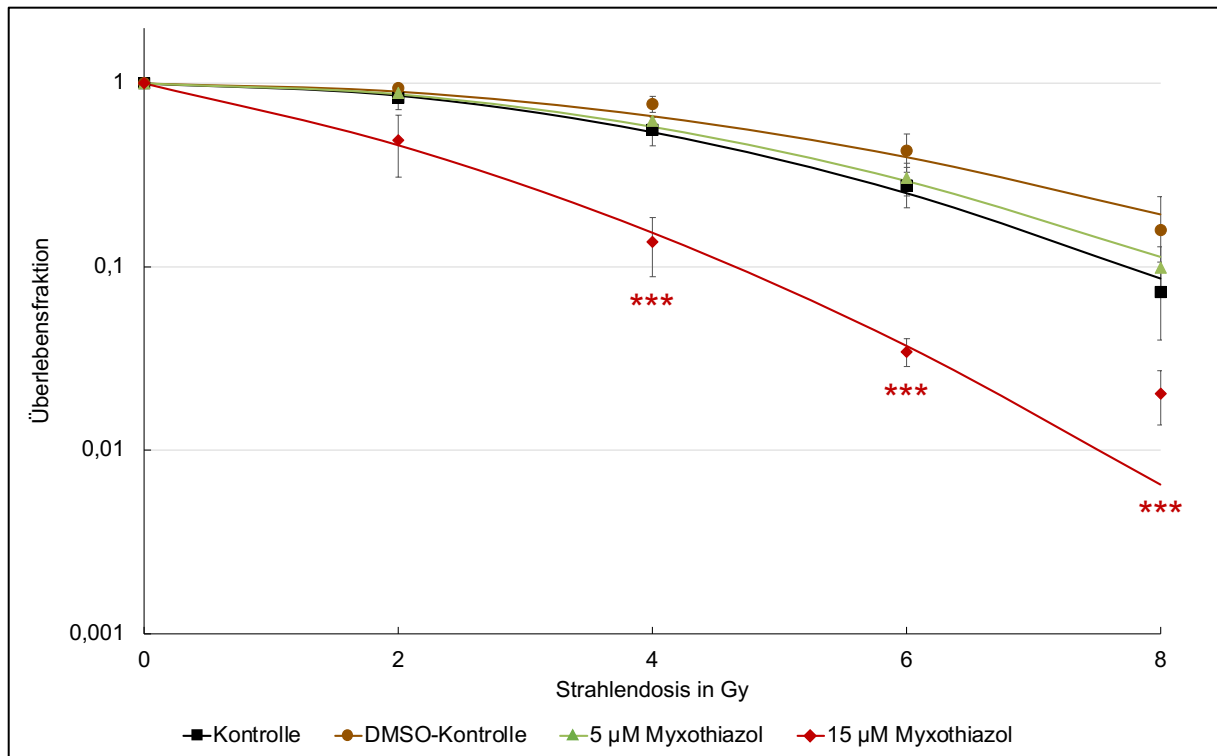


Abbildung 29: Klonogenes Überleben der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung, normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (Kontrolle: n=12; DMSO-Kontrolle: n=3; 5 μ M Myxothiazol: n=3; 15 μ M Myxothiazol: n=3), sowie Signifikanzen von 15 μ M Myxothiazol in Bezug zur jeweiligen Strahlendosis der Kontrolle: ***p<0,001.

Auch in Abbildung 29 zeigte sich, dass das klonogene Überleben der HT-29-Zellen in allen Ansätzen mit steigender Strahlendosis abnahm. Die Zellen in der DMSO-Kontrolle wiesen eine Zunahme der SF im Vergleich zu den Zellen der Kontrolle auf; diese war nicht signifikant. Das Überleben der HT-29-Zellen unter Einfluss von 5 μ M Myxothiazol verlief analog zur Kontrolle. Beispielsweise betrug die SF nach 6 Gy Bestrahlung 0,30 (5 μ M Myxothiazol) im Vergleich zu 0,28 (Kontrolle 0 μ M). Eine deutliche Abnahme des Überlebens zeigte sich zwischen den Ansätzen der Kontrolle ohne Wirkstoff und der mit 15 μ M Myxothiazol behandelten HT-29-Zellen. So wurde eine signifikante Strahlensensibilisierung unter Einfluss von 15 μ M Myxothiazol nachgewiesen. Die SF der HT-29-Zellen nach Behandlung mit 15 μ M Myxothiazol lagen bei 0,49 (2 Gy), 0,14 (4 Gy, p<0,001), 0,03 (6 Gy, p<0,001) und 0,02 (8 Gy, p<0,001) im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff 0,84 (2 Gy), 0,56 (4 Gy), 0,28 (6 Gy) und 0,07 (8 Gy).

3.10 VERGLEICH DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Um das klonogene Überleben beider Zelllinien unter Einfluss beider MTD direkt miteinander vergleichen zu können, wurden in Abbildung 30 die Überlebenskurven der A549- und HT-29-Zellen unter Zugabe der beiden MTD Bz-423 bzw. Myxothiazol zur besseren Übersicht gegenüberstellend dargestellt.

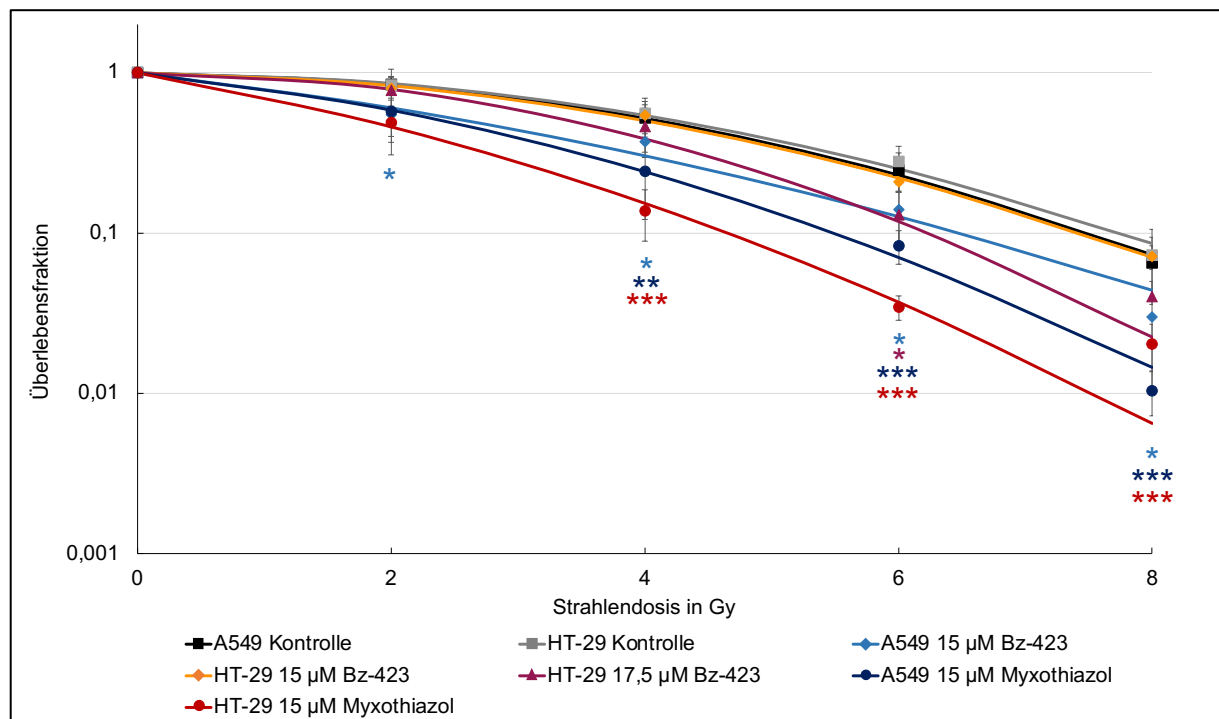


Abbildung 30: Vergleich des klonogenen Überlebens der A549 und HT-29-Zellen unter Einfluss der MTD Bz-423 bzw. Myxothiazol nach Bestrahlung, normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (A549 Kontrolle: n=13; HT-29 Kontrolle: n=12; A549 15 μ M Bz-423, A549 15 μ M Myxothiazol, HT-29 15 μ M Bz-423: n=4; HT-29 17,5 μ M Bz-423, HT-29 15 μ M Myxothiazol: n=3), sowie Signifikanzen von den Zellüberlebenskurven mit MTD in Bezug zur jeweiligen Strahlendosis der Kontrolle der entsprechenden Zelllinie: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die PE nahmen in allen Ansätzen sowohl bei den A549-Zellen als auch den HT-29-Zellen mit steigenden Bestrahlungsdosen ab. Bei zusätzlicher Gabe von Bz-423 nahm die PE der A549-Zellen sowohl unter Einfluss von 10 μ M Bz-423 als auch 15 μ M Bz-423 ab. Eine signifikante Strahlensensibilisierung konnte erst ab einer Konzentration von 15 μ M Bz-423 beobachtet werden. Die HT-29-Zellen zeigten PE-Abnahmen bei Einfluss von 15 μ M Bz-423 sowie bei 17,5 μ M Bz-423. Eine Strahlensensibilisierung zeigte sich bei den HT-29-Zellen erst ab 17,5 μ M Bz-423.

Unter Zugabe von Myxothiazol nahm die PE konzentrationsabhängig bei 5 μ M sowie 15 μ M Myxothiazol bei beiden Zelllinien ab. Eine signifikante Strahlensensibilisierung ließ sich bei

beiden Zelllinien unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol nachweisen. Dabei lag, wie in Abbildung 30 zu sehen ist, die Kurve des klonogenen Überlebens unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol der HT-29-Zellen unter der der A549 Zellen. Beispielsweise betrug die Überlebensfraktion unter 4 Gy Bestrahlung 0,24 (A549 15 μM Myxothiazol), 0,14 (HT-29 15 μM Myxothiazol) zu 0,52 (A549 Kontrolle 0 μM , $p < 0,01$) und 0,56 (HT-29 Kontrolle 0 μM , $p < 0,001$).

Bei der Auswertung der Abbildung 30 zeigte sich weiterhin, dass die Kurven des klonogenen Überlebens der mit Myxothiazol behandelten A549- als auch HT-29-Zellen unter denen der mit Bz-423 behandelten Zellen lagen.

3.11 BESTIMMUNG DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT DER A549- UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 UND BESTRAHLUNG

Bz-423 hemmt konzentrationsabhängig die Zellproliferation, da es als MTD in den Zellmetabolismus eingreift. Wenn die Zellen zusätzlich mit ionisierender Strahlung behandelt werden, hat dies ebenfalls einen Effekt auf deren metabolische Aktivität. Mit Hilfe des WST-1-Tests sollte dieser antineoplastische Effekt auf die Lungenkrebs- bzw. Darmkrebszellen durch die Bestimmung der metabolischen Aktivität untersucht werden, sowohl in Mono- als auch in Kombinationsbehandlung. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 31 (A549-Zellen) und 32 (HT-29-Zellen) dargestellt.

Die mittels ELISA-Reader gemessene Extinktion aller Ansätze wurde auf die Werte des Kontrollansatzes (unbehandelte Zellen, 0 μM , 0 Gy; 100 %) normiert.

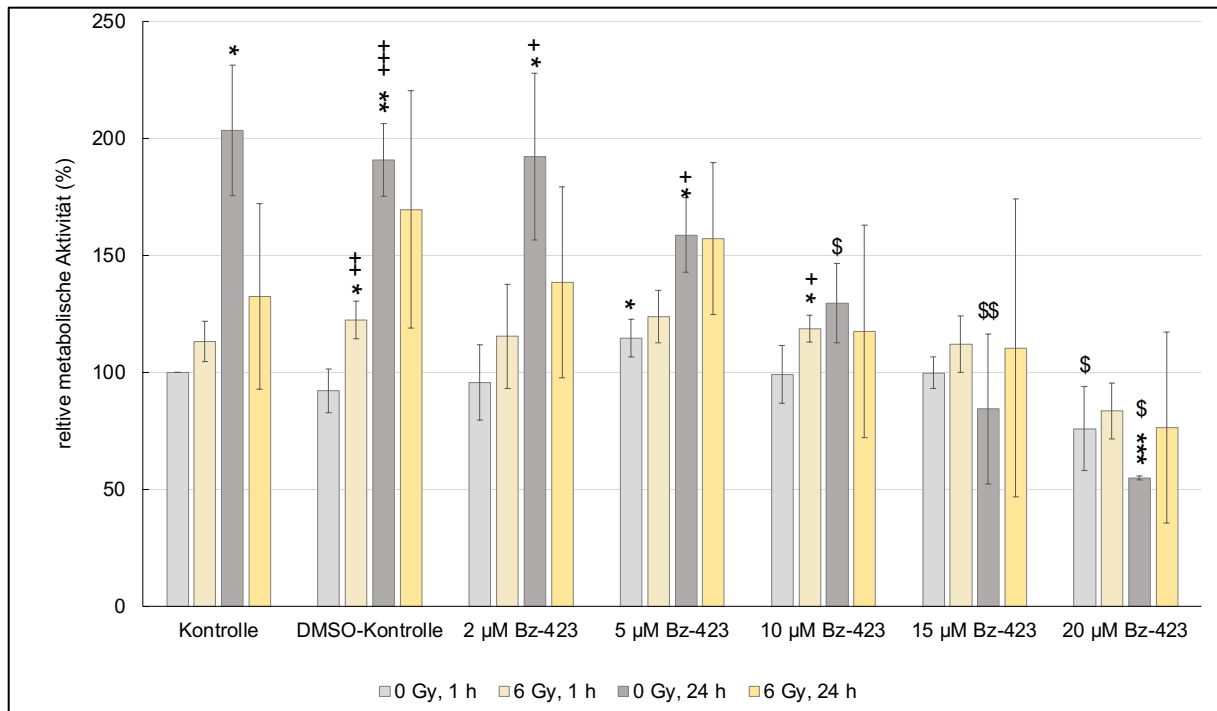


Abbildung 31: Metabolische Aktivität der A549-Zellen unter Einfluss von Bz-423 und Bestrahlung, normiert auf die Kontrolle (0 Gy, WST-1-Zugabe 1 h nach Bestrahlung); dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus $n=5$ (0 Gy, 1 h und 24 h); $n=3$ (6 Gy, 1 h und 24 h); Signifikanzen in Bezug zur Kontrolle unter 0 Gy, 1 h: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; Signifikanzen in Bezug ohne Wirkstoff behandelten Ansatz der jeweiligen gleichen Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung: \$ $p<0,05$, \$\$ $p<0,01$; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 1 h der gleichen Bz-423-Konzentration: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

In Abbildung 31 ist die relative metabolische Aktivität unter Einfluss von Bz-423 und Bestrahlung abgebildet. Es zeigte sich, dass zum 1 h-Zeitpunkt die metabolischen Aktivitäten in den unbestrahlten Zellen der Ansätze DMSO-Kontrolle, 2 μM Bz-423, 10 μM Bz-423 und 15 μM Bz-423 keinen Effekt im Bezug zur normierten Kontrolle (100 %, 0 Gy, 0 μM) aufwiesen. So betragen diese 92 % (DMSO-Kontrolle), 95 % (2 μM Bz-423), 99 % (10 μM Bz-423) und 100 % (15 μM Bz423). Unter Einfluss von 5 μM Bz-423 (0 Gy) konnte zum 1 h-Zeitpunkt eine signifikante Zunahme ($p<0,05$) der metabolischen Aktivität auf 114 % beobachtet werden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 Gy, 0 μM). Diese sank nach 1 h bei Zellen, die mit einer Konzentration von 20 μM Bz-423 behandelt wurden, auf 76 % ab.

Zum 24 h-Zeitpunkt zeigten die Ansätze der Kontrollen eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität auf 203 % (Kontrolle, 0 Gy, 0 μM , $p<0,05$) und 191 % (DMSO-Kontrolle, 0 Gy, $p<0,01$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 1 h. Eine Abnahme der Aktivität war nach 24 h bei den A549-Zellen ab einer Konzentration von 5 μM Bz-423 im Vergleich zur Kontrolle (24 h, 0 Gy, 0 μM) zu beobachten. So verlief diese von 203 % (0 μM) über 159 % (5 μM Bz-423), 130 % (10 μM Bz-423), 85 % (15 μM Bz-423, $p<0,05$) bis hin zu 55 % (20 μM Bz-423, $p<0,01$).

Die alleinige Behandlung mit 6 Gy führte 1 h nach der Bestrahlung zu einer Zunahme des WST-1-Umsatzes der Kontrolle auf 113 % und der DMSO-Kontrolle auf 122 % ($p < 0,05$). Nach Kombination von Bz-423 und 6 Gy Bestrahlung kam es zu einem metabolischen Aktivitätsanstieg im Vergleich zu den Zellen, welche nur Bz-423 erhielten. Eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität zeigte sich in den Zellen z.B. nach 10 μM Bz-423 (118 %, $p < 0,05$) im Bezug zu den Kontrollzellen.

24 h nach Bestrahlung zeigten die mit 6 Gy bestrahlten ohne Wirkstoff behandelten Zellen eine niedrigere metabolische Aktivität von 132 % (Kontrolle) als die des unbestrahlten Ansatzes (203 %: 0 Gy, 0 μM Bz-423). Auch unter Kombination zeigten die Zellen bis zu einer Konzentration von 10 μM Bz-423 eine Aktivitätsabnahme im Vergleich zu den nicht bestrahlten Ansätzen. Beispielsweise lag die ermittelte metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit 2 μM Bz-423 bei 157 % (6 Gy, 24 h, 2 μM Bz-423) im Vergleich zu 192 % (0 Gy, 24 h, 2 μM Bz-423). Ab Konzentrationen von 15 μM Bz-423 nahm der WST-1-Umsatz im Vergleich zu den Zellen der unbestrahlten Ansätze hingegen zu. So zeigte sich bei Vergleich der mit 0 Gy und 6 Gy behandelten Ansätze nach 24 h, dass die metabolischen Aktivitäten von 84 % (15 μM Bz-423, 0 Gy) auf 110 % (15 μM Bz-423, 6 Gy) stieg, sowie von 55 % (20 μM Bz-423, 0 Gy) auf 77 % (20 μM Bz-423, 6 Gy).

In nachfolgender Abbildung 32 ist der Einfluss des MTD Bz-423 und Bestrahlung auf den WST-1-Umsatz der HT-29 Zellen dargestellt.

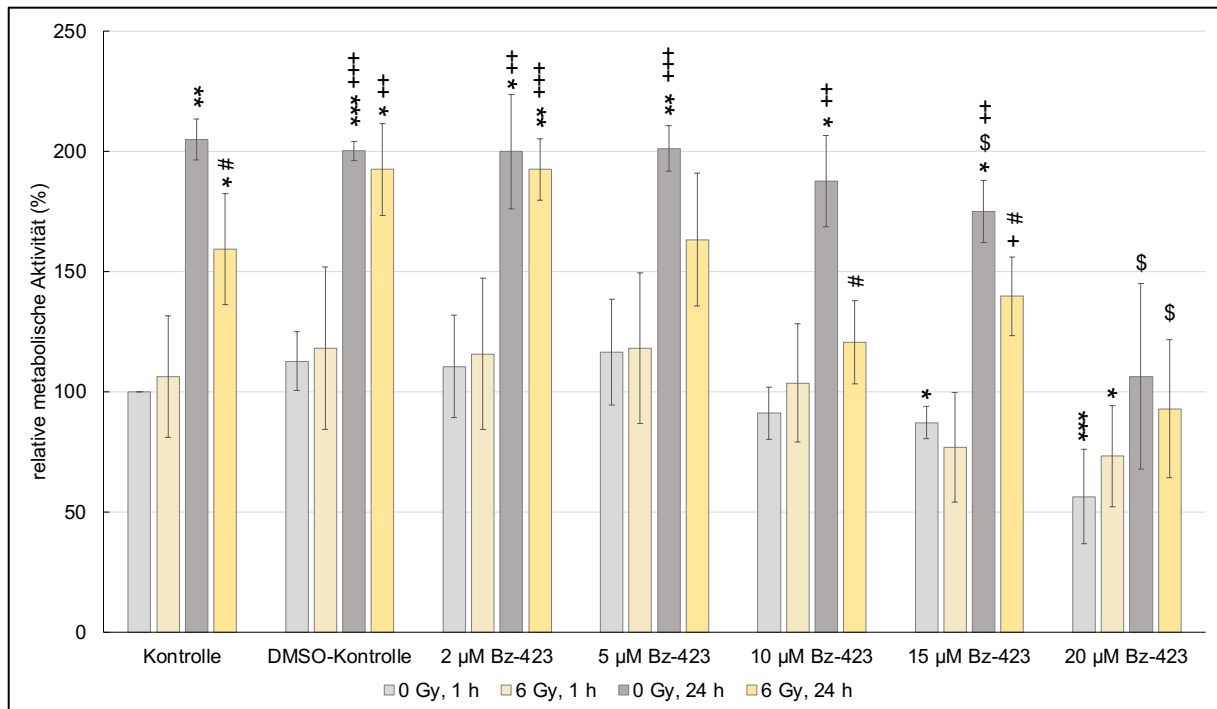


Abbildung 32: Metabolische Aktivität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 und Bestrahlung, normiert auf die Kontrolle (0 Gy, WST-1-Zugabe 1 h nach Bestrahlung); dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus: n=5 (0 Gy und 6 Gy, 1 h); n=3 (0 Gy und 6 Gy, 24 h); Signifikanzen in Bezug zur Kontrolle unter 0 Gy, 1 h: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Signifikanzen in Bezug ohne Wirkstoff behandelten Ansatz der jeweiligen gleichen Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung: \$p<0,05; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 1 h der gleichen Konzentration an Bz-423: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 24 h der gleichen Konzentration an Myxothiazol: #p<0,05.

In Abbildung 32 ist die relative metabolische Aktivität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Bz-423 und Bestrahlung dargestellt. Zum 1 h-Zeitpunkt kam es in den unbestrahlten Ansätzen bis 5 µM Bz-423 zu einer Zunahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur normierten Kontrolle (100 %, 0 Gy). Ab einer Konzentration von 10 µM Bz-423 hingegen kam es zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität. So betragen diese nach 1 h 116 % (5 µM Bz-423), 87 % (15 µM Bz-423, p<0,05) und 56 % (20 µM Bz-423, p<0,001).

Zum 24 h-Zeitpunkt zeigten die HT-29-Zellen ohne Bestrahlung eine deutliche Zunahme ihrer metabolischen Aktivität im Vergleich zur normierten Kontrolle. Beispielsweise betragen diese 201 % (5 µM Bz-423, p<0,01) und 174 % (15 µM Bz-423, p<0,01). Ab Konzentrationen von 15 µM Bz-423 konnte nach alleiniger Behandlung mit dem Wirkstoff eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität beobachtet werden. Dementsprechend lagen die ermittelten Werte nach 24 h bei 174 % (15 µM Bz-423, p<0,05) und 106 % (20 µM Bz-423, p<0,05) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (208 %, 0 Gy, 0 µM Bz-423).

Unter zusätzlicher Bestrahlung der Ansätze mit einer Dosis von 6 Gy zeigte sich 1 h nach der Bestrahlung bis zu Konzentrationen von 5 µM Bz-423 kein wesentlicher Effekt im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen, sowie zur normierten Kontrolle. Dementsprechend betragen die metabolischen Aktivitäten nach 6 Gy Bestrahlung 106 % (Kontrolle, 0 µM, 6 Gy) und 111 %

(2 μM Bz-423). Unter Einfluss von 10 μM Bz-423 zeigte sich 1 h nach Bestrahlung eine Zunahme der metabolischen Aktivität auf 104 % (6 Gy, 10 μM Bz-423) im Vergleich zu 91 % (0 Gy, 10 μM Bz-423), sowie nach Behandlung mit 20 μM Bz-423 auf 73 % (6 Gy, 20 μM Bz-423) von 56 % (0 Gy, 20 μM Bz-423). Unter Einfluss von 15 μM Bz-423 und 6 Gy Bestrahlung konnte eine Abnahme der metabolischen Aktivität von 87 % (0 Gy, 15 μM Bz-423) auf 75 % (6 Gy, 15 μM Bz-423) beobachtet werden. Die Abnahme der metabolischen Aktivität der bestrahlten Ansätze nach Behandlung mit 15 μM und 20 μM Bz-423 war 1 h nach Bestrahlung niedriger im Vergleich zur normierten Kontrolle. So betrug diese 77 % (6 Gy, 15 μM Bz-423) und 73 % (6 Gy, 20 μM Bz-423, $p < 0,05$).

24 h nach der Bestrahlung zeigte sich unter Kombinationsbehandlung eine Abnahme der metabolischen Aktivität ab 10 μM Bz-423 im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. So betrug die metabolischen Aktivitäten unter 6 Gy Bestrahlung 163 % (5 μM Bz-423), 121 % (10 μM Bz-423), 140 % (15 μM Bz-423) und 93 % (20 μM Bz-423) zu 159 % (Kontrolle 0 μM , 6 Gy). Weiterhin konnte eine Aktivitätsabnahme in den bestrahlten Ansätzen im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen nach 24 h der entsprechenden Konzentration beobachtet werden. Beispielsweise betrug die metabolische Aktivität der Zellen der Kontrolle 205 % (0 Gy, 0 μM Bz-423) und 159 % (6 Gy, 0 μM Bz-423), sowie unter Einfluss von 10 μM Bz-423 188 % (0 Gy) und 121 % (6 Gy).

3.12 BESTIMMUNG DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT DER A549- UND HT-29-ZELLEN VON MYXOTHIAZOL UND BESTRAHLUNG

In diesem Abschnitt der Arbeit werden analog zum vorherigen Kapitel die Ergebnisse des WST-1-Assays der A549- und HT-29-Zellen in den Abbildungen 33 – 34 dargestellt.

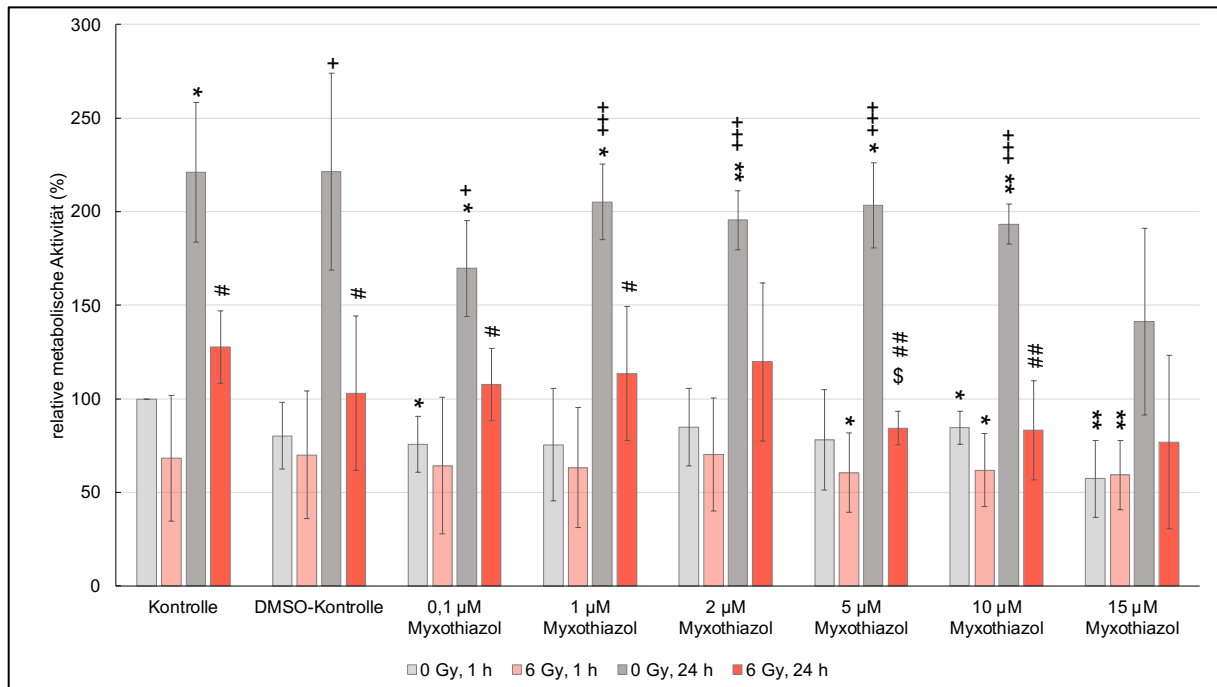


Abbildung 33: Metabolische Aktivität der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung, normiert auf die Kontrolle (0 Gy, WST-1-Zugabe 1 h nach Bestrahlung); dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus n=6 (0 Gy, 1 h); n=5 (0 Gy, 24 h); n=3 (6 Gy, 1 h und 24 h); Signifikanzen in Bezug zur Kontrolle unter 0 Gy, 1 h: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Signifikanzen in Bezug ohne Wirkstoff behandelten Ansatz der jeweiligen gleichen Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung: \$p<0,05; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 1 h der gleichen Konzentration an Myxothiazol: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 24 h der gleichen Konzentration an Myxothiazol: #p<0,05, ##p<0,01.

In Abbildung 33 wurde die metabolische Aktivität der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung dargestellt. Unter 0 Gy zum 1 h-Zeitpunkt konnte eine geringe Abnahme der metabolischen Aktivität der DMSO-Kontrolle als auch der Ansätze mit Myxothiazol im Vergleich zur normierten Kontrolle (100 %, 0 Gy, 0 µM) beobachtet werden. Beispielsweise betrug die metabolische Aktivität zum 1 h-Zeitpunkt 85 % (10 µM Myxothiazol, p<0,05), 57 % (15 µM Myxothiazol, p<0,01) im Vergleich zur normierten Kontrolle.

24 h nach der Bestrahlung kam es zu einer Zunahme der metabolischen Aktivität der Kontrollen, als auch der mit Myxothiazol behandelten A549-Zellen im Vergleich zur normierten Kontrolle. So stieg diese auf 221 % (Kontrolle, 0 Gy, p<0,05), 205 % (1 µM Myxothiazol, 0 Gy, p<0,05) und 193 % (10 µM Myxothiazol, p<0,01). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

(0 μM , 0 Gy) wiesen die A549-Zellen zum 24 h-Zeitpunkt eine Abnahme ihrer metabolischen Aktivität nach Behandlung mit Myxothiazol auf. Beispielsweise betrug die metabolische Aktivität 170 % (0,1 μM Myxothiazol), 193 % (10 μM Myxothiazol) und 141 % (15 μM Myxothiazol) im Vergleich zur Kontrolle (24 h, 0 μM , 0 Gy) von 221 %.

Nach Bestrahlung mit 6 Gy nahm die metabolische Aktivität sowohl in den Kontrollen als auch unter Kombinationsbehandlung nach 1 h im Vergleich zu den unbestrahlten A549-Zellen ab. So lag die metabolische Aktivität der Kontrolle 1 h nach Bestrahlung bei 68 % im Vergleich zur normierten Kontrolle. Nach zusätzlicher Gabe von Myxothiazol lag diese bei 63 % (1 μM Myxothiazol), 61 % (5 μM Myxothiazol, $p < 0,05$) sowie 59 % (15 μM Myxothiazol, $p < 0,01$).

Bei Betrachtung der bestrahlten Ansätze nach 24 h zeigten die A549-Zellen eine deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den nicht bestrahlten A549-Zellen. Dementsprechend ergab sich eine Differenz der metabolischen Aktivität von 94 % (Kontrolle, 0 μM , $p < 0,05$), 119 % (5 μM Myxothiazol, $p < 0,01$) und 64 % (15 μM Myxothiazol) nach 24 h. Unter Kombinationsbehandlung nach 24 h im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle (128 %, 0 μM Myxothiazol, 6 Gy) konnte lediglich nach Behandlung mit 5 μM Myxothiazol (84 %) eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 5 μM Myxothiazol nahm die metabolische Aktivität 24 h und 6 Gy Bestrahlung im Vergleich zur normierten Kontrolle ab. So wiesen die A549-Zellen eine metabolische Aktivität von 83 % (5 μM Myxothiazol) und 77 % (15 μM Myxothiazol) auf.

Letztendlich ist in nachfolgender Abbildung 34 wiederum die metabolische Aktivität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung dargestellt.

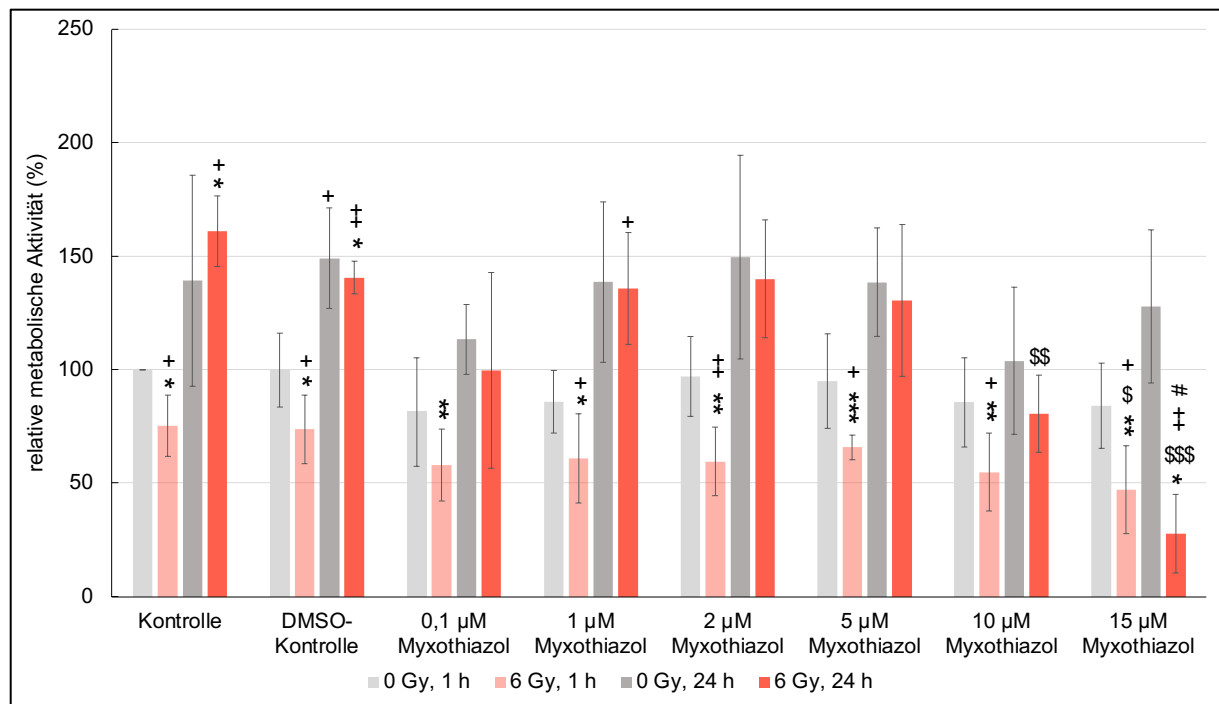


Abbildung 34: Metabolische Aktivität der HT-29-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol und Bestrahlung, normiert auf die Kontrolle (0 Gy, WST-1-Zugabe 1 h nach Bestrahlung); dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus $n=5$ (0 Gy, 1 h und 24 h); $n=3$ (6 Gy, 1 h und 24 h); Signifikanzen in Bezug zur Kontrolle unter 0 Gy, 1 h: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; Signifikanzen in Bezug ohne Wirkstoff behandelten Ansatz der jeweiligen gleichen Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung: \$ $p<0,05$, \$\$ $p<0,01$, \$\$\$ $p<0,001$; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 1 h der gleichen Konzentration an Myxothiazol: * $p<0,05$, ** $p<0,01$; Signifikanzen in Bezug zu 0 Gy nach 24 h der gleichen Konzentration an Myxothiazol: # $p<0,05$.

Die Behandlung der HT-29-Zellen mit Myxothiazol ohne Bestrahlung zeigte zum 1 h-Zeitpunkt eine geringe Abnahme der metabolischen Aktivität, wie in Abbildung 34 zu sehen ist. So betragen die metabolischen Aktivitäten 86 % (1 µM Myxothiazol, 0 Gy) sowie 84 % (15 µM Myxothiazol, 0 Gy) im Vergleich zur normierten Kontrolle (100 %, 0 Gy, 0 µM). Auch nach 24 h zeigte die Behandlung mit Myxothiazol keinen wesentlichen Effekt auf die metabolische Aktivität der HT-29-Zellen. Beispielsweise betrug die metabolische Aktivität nach 24 h 138 % (1 µM Myxothiazol, 0 Gy), 149 % (2 µM Myxothiazol, 0 Gy) und 128 % (15 µM Myxothiazol, 0 Gy) im Vergleich zu 139 % (Kontrolle 0 µM, 0 Gy).

Die Bestrahlung der HT-29-Zellen mit 6 Gy zeigte nach 1 h eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität. So betrug die Kontrolle (1 h, 0 µM Myxothiazol) nach 6 Gy Bestrahlung 75 % im Vergleich zur normierten Kontrolle bei einer Signifikanz von $p<0,05$. In Kombinationsbehandlung nahm die metabolische Aktivität 1 h nach Bestrahlung signifikant stärker ab als unter alleiniger Behandlung mit Myxothiazol. Dementsprechend lag die metabolische Aktivität bei 66 % (5 µM Myxothiazol, 6 Gy) im Vergleich zu 95 % (5 µM Myxothiazol, 0 Gy, $p<0,05$). Unter Einfluss von 6 Gy Bestrahlung und 15 µM Myxothiazol war die metabolische Aktivität nach 1 h mit 47 % nicht nur signifikant niedriger im Vergleich zur normierten Kontrolle,

sondern auch zusätzlich niedriger als die der Zellen der mit der 6 Gy bestrahlten Kontrolle von 75 % (0 μ M, $p < 0,05$).

24 h nach der Bestrahlung zeigte sich unter Kombinationsbehandlung bis 5 μ M Myxothiazol nur eine geringe Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur alleinigen Gabe von Myxothiazol als auch im Vergleich zur mit 6 Gy behandelten Kontrolle ohne Wirkstoff. Beispielsweise betrug die metabolische Aktivität nach 24 h 140 % (2 μ M Myxothiazol, 6 Gy) im Vergleich zu 150 % (2 μ M Myxothiazol, 0 Gy) sowie zu 161 % (Kontrolle 0 μ M, 6 Gy). Nach Behandlung mit 15 μ M Myxothiazol und 6 Gy Bestrahlung sank die metabolische Aktivität der HT-29-Zellen auf 28 % und lag somit signifikant unter der der Zellen der normierten Kontrolle ($p < 0,05$) und der Effekt war stärker sowohl gegenüber alleiniger Behandlung mit Myxothiazol ($p < 0,01$) als auch im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung ($p < 0,001$).

3.13 VERGLEICH DER METABOLISCHEN AKTIVITÄTEN DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Die metabolische Aktivität der A549-Zellen als auch HT-29-Zellen nahm in den bestrahlten Ansätzen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen nach 1 h leicht zu. Die alleinige Behandlung mit Bz-423 zum 1 h-Zeitpunkt führte bei den A549-Zellen unter Einfluss von 20 μ M Bz-423 zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur normierten Kontrolle. Die HT-29-Zellen zeigten nach 1 h eine leichte Zunahme ihrer metabolischen Aktivität bis 5 μ M Bz-423 im Vergleich zur normierten Kontrolle. Ab 10 μ M Bz-423 nahm die Aktivität konzentrationsabhängig ab.

Die alleinige Behandlung der A549-Zellen mit Bz-423 führte nach 24 h zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität ab 5 μ M Bz-423; die der HT-29-Zellen erst ab 15 μ M Bz-423. Unter zusätzlicher Bestrahlung konnten keine Effekte aufgrund hoher Standardabweichungen gezeigt werden. Dementsprechend waren die HT-29-Zellen auch in diesem Versuch resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen.

Bereits unter Einfluss von 0,1 μ M Myxothiazol zeigten die A549-Zellen nach 1 h eine Abnahme ihrer metabolischen Aktivität. Hingegen hatte die alleinige Behandlung mit Myxothiazol auf die HT-29-Zellen keinen wesentlichen Effekt. Die zusätzliche Bestrahlung mit 6 Gy führte in beiden Zelllinien nach 1 h zu signifikanten Abnahmen der Aktivitäten im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen.

24 h nach alleiniger Myxothiazol-Zugabe zeigten die A549-Zellen eine leichte Abnahme ihrer metabolischen Aktivität; bei den HT-29-Zellen konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Die zusätzliche Bestrahlung führte zu einer Abnahme der metabolischen Aktivitäten der

A549-Zellen sowohl in den Kontrollzellen, als auch der mit Myxothiazol behandelten Zellen. Ab einer Konzentration von 5 μM Myxothiazol und Bestrahlung nahm die metabolische Aktivität der A549-Zellen im Vergleich zu den ohne Wirkstoff behandelten und mit 6 Gy bestrahlten Zellen ab. Die HT-29-Zellen zeigten erst ab einer Konzentration von 10 μM Myxothiazol und Bestrahlung nach 24 h eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zu den Zellen der Kontroll-Ansätze.

3.14 UNTERSUCHUNG DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN IN A549-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON Bz-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Durch Bestrahlung kommt es vermehrt zu DNA-Doppelstrangbrüchen in Zellkernen. Aus diesem Grund wurden γH2AX -Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Zugabe eines MTD die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche erhöht und deren Reparaturfähigkeit in den Zellen verändert. Dazu wurden die A549-Zellen 30 min sowie 24 h nach Bestrahlung fixiert und die DNA-Doppelstrangbrüche mittels Antikörper markiert. In den folgenden Abbildungen 35 und 36 sind beispielhaft die fluoreszenzmikroskopischen Bilder 30 min sowie 24 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt dargestellt. Die zur Auswertung zu bestimmenden roten Foci sind deutlich zu erkennen und in ihre Anzahl direkt proportional zur Gesamtsumme der DNA-Doppelstrangbrüche (BONNER *et al.*, 2008).

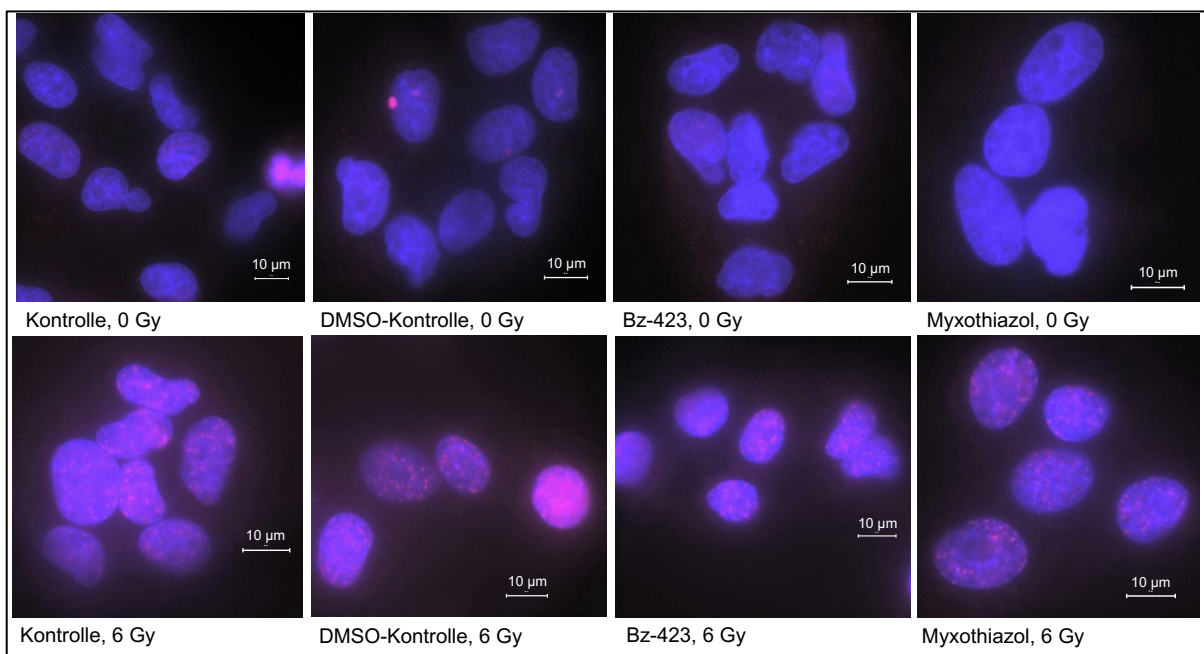


Abbildung 35: „Foci“ der mittels γH2AX -Assay gefärbten DNA-Doppelstrangbrüche in A549-Zellen, unbestrahlt und nach Bestrahlung mit 6 Gy und unter Einfluss von Bz-423 bzw. Myxothiazol nach einer Reparaturzeit von 30 min. 1.000-fache Vergrößerung. Darstellung der Zellkerne blau (DAPI-Färbung) und der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

In Abbildung 35 ist eine deutliche Zunahme der roten Foci pro Zellkern in den bestrahlten Ansätzen im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen nach 30-minütiger Reparaturzeit zu sehen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den mit MTD behandelten Ansätzen in Vergleich zu den Kontrollansätzen ist aus diesen Ausschnitten nicht erkennbar. Die nach 24-stündiger Reparaturzeit fixierten Ansätze sind beispielhaft in Abbildung 36 dargestellt.

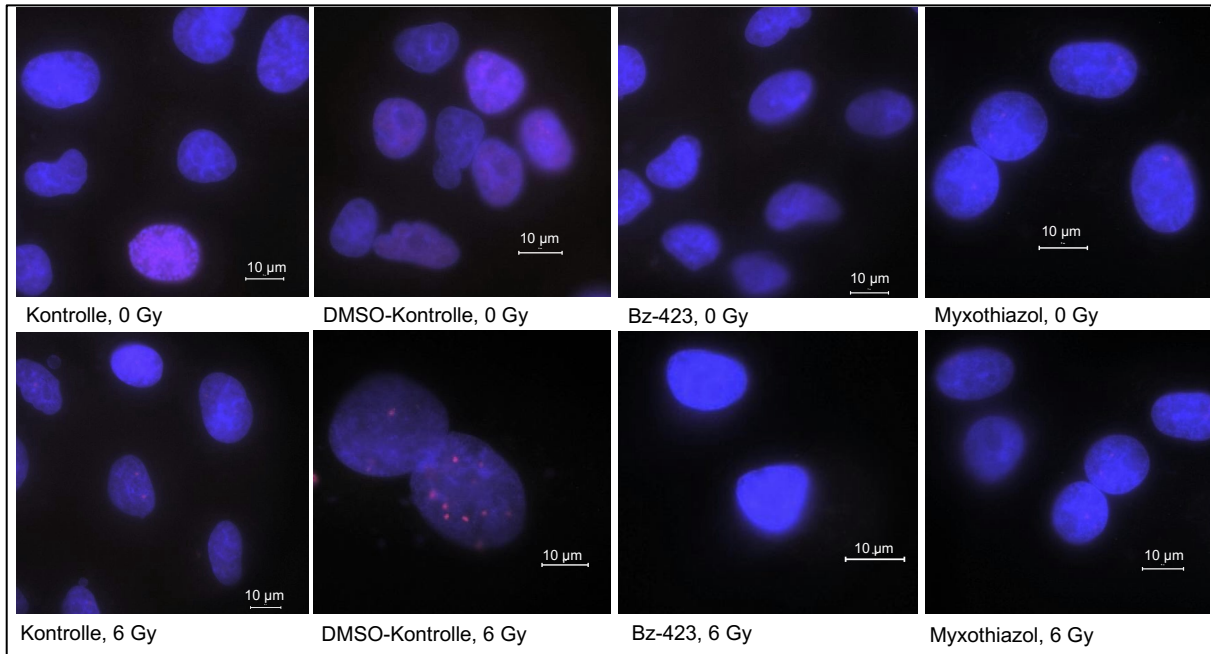


Abbildung 36: „Foci“ der mittels γ H2AX-Assay gefärbten DNA-Doppelstrangbrüche in A549-Zellen, unbestrahlt und nach Bestrahlung mit 6 Gy und unter Einfluss von Bz-423 bzw. Myxothiazol nach einer Reparaturzeit von 24 h. 1.000-fache Vergrößerung. Darstellung der Zellkerne blau (DAPI-Färbung) und der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

In Abbildung 36 ist nach 24-stündiger Reparaturzeit eine Abnahme der roten Foci pro Zellkern in den bestrahlten Ansätzen im Vergleich zu den bestrahlten Ansätzen nach 30-minütiger Reparaturzeit zu sehen (Vgl. Abbildung 35).

In nachfolgender Abbildung 37 sind die ermittelten mittleren Anzahlen an Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Reparaturzeit sowie der Wirkstoffbehandlung dargestellt.

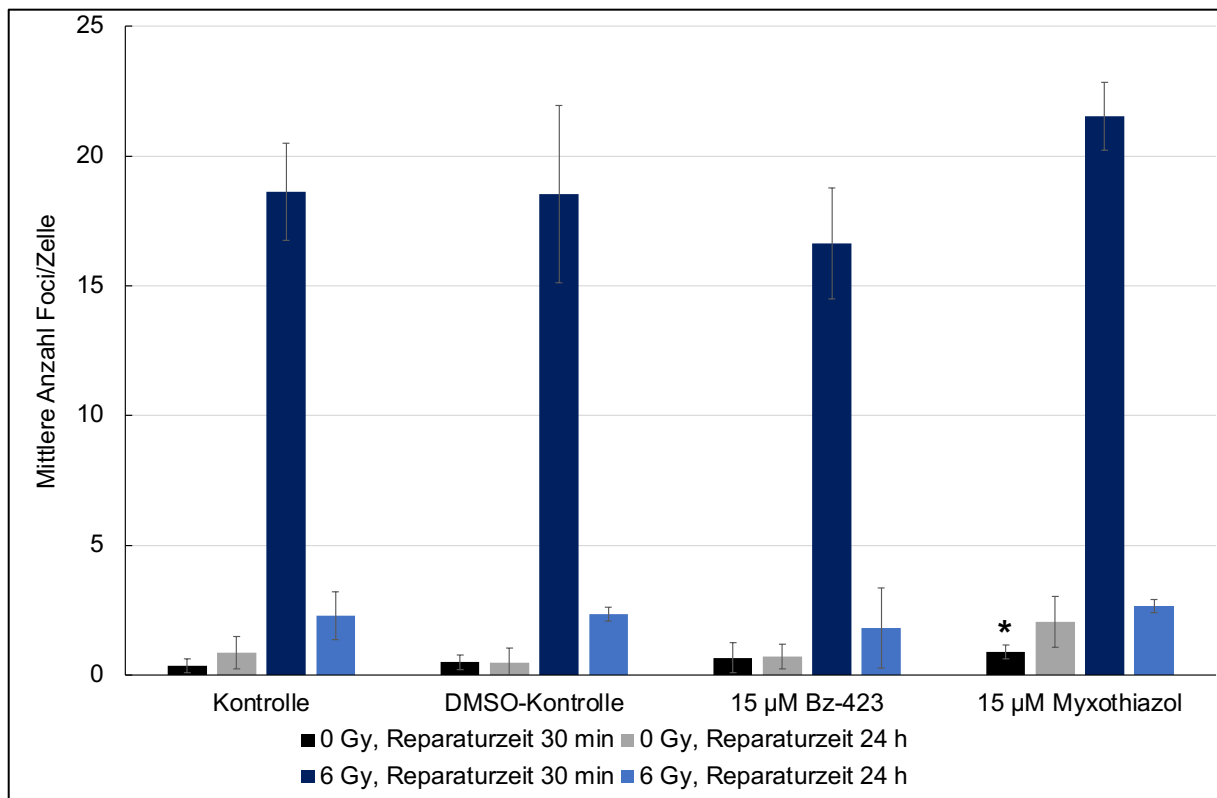


Abbildung 37: Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen (γ H2AX-Foci) der A549-Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von Bz-423 bzw. Myxothiazol; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus n=4, außer Ansätze 6 Gy, Reparaturzeit 30 min: n=3). Signifikanzen: *p<0,05 in Bezug zur Kontrolle (0 µM) der jeweiligen gleichen Bedingung.

Es zeigte sich in Abbildung 37, dass es in den ohne Wirkstoff inkubierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der mittleren Foci-Anzahl 30 min nach 6 Gy Bestrahlung von 0,35 (0 Gy) auf 18,63 mittlere Foci/Zelle kam. Nach einer Reparaturzeit von 24 h erholten sich die bestrahlten A549-Zellen zwar, jedoch nicht vollständig, sodass die mittlere Anzahl an residualen DNA-Doppelstrangbrüchen 2,28 betrug. Die Zellen der DMSO-Kontrolle verhielten sich ähnlich wie die der Kontrollen.

Unter alleinigem Einfluss von 15 µM Bz-423 nahmen die DNA-Doppelstrangbrüche in den unbestrahlten Zellen zum 30-min Zeitpunkt um fast das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) zu. So konnten nach Behandlung mit Bz-423 im Mittel 0,66 Focis/Zelle gezählt werden, im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) nur 0,35 Focis/Zelle. Nach 24 h konnte kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) beobachtet werden, da die mittlere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen unter Einfluss von 15 µM Bz-423 0,7 betrug im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) mit 0,86. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy kam es nach 30 min Reparaturzeit zu einem Anstieg der Focis/Zelle, welcher allerdings im Durchschnitt niedriger als die Kontrolle (0 µM, 6 Gy) lag. So betrug die mittlere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen nach Behandlung mit 15 µM Bz-423 und 6 Gy Bestrahlung 16,63 im Vergleich zur Kontrolle (0 µM, 6 Gy) von 18,63. Nach 24-stündiger Reparaturzeit sank die Anzahl der

DNA-Doppelstrangbrüchen auf 1,81 (15 μ M Bz-423) gering unter die der Kontrolle von 2,28 (6 Gy, 0 μ M).

Die Behandlung mit 15 μ M Myxothiazol zeigte eine Zunahme der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in allen Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff. So betrug die mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche 0,9 (15 μ M Myxothiazol, 0 Gy, 30 min, $p < 0,05$) im Vergleich zu 0,35 (0 μ M Kontrolle, 0 Gy, 30 min), sowie 2,66 (15 μ M Myxothiazol, 6 Gy, 24 h) zu 2,28 (0 μ M Kontrolle, 6 Gy, 24 h).

3.15 UNTERSUCHUNG DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN IN HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Analog zu den A549-Zellen wurden γ H2AX-Analysen mit den HT-29-Zellen in Kombination von Bz-423 bzw. Myxothiazol und 6 Gy Bestrahlung durchgeführt. Zunächst sind in Abbildung 38 mikroskopische Ausschnitte nach 30-minütigerer Inkubations- bzw. Reparaturzeit nach 0 Gy als auch 6 Gy Bestrahlung dargestellt.

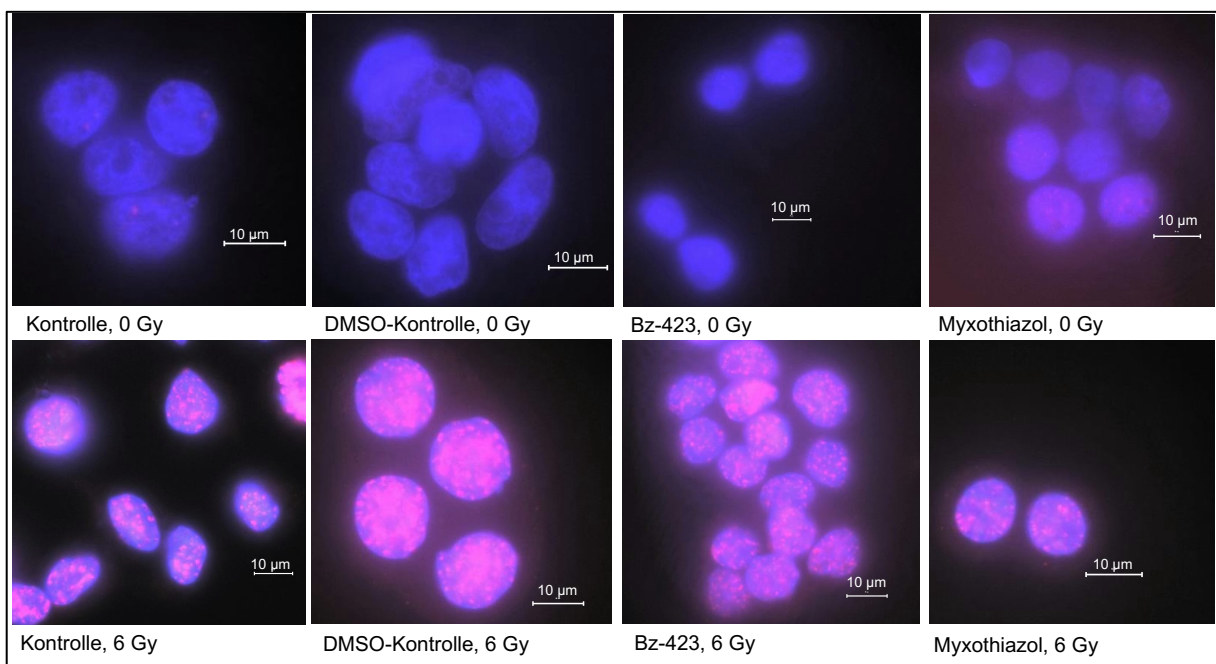


Abbildung 38: „Foci“ der mittels γ H2AX-Assay gefärbten DNA-Doppelstrangbrüche in HT-29-Zellen, unbestrahlt und nach Bestrahlung mit 6 Gy und unter Einfluss von Bz-423 bzw. Myxothiazol nach einer Reparaturzeit von 30 min. 1.000-fache Vergrößerung. Darstellung der Zellkerne blau (DAPI-Färbung) und der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

In Abbildung 38 zeigt sich, dass es nach 6 Gy Bestrahlung zu einer deutlichen Zunahme der Focizahl pro Zellkern kam. Diese waren teilweise nicht mehr auszählbar, wie in den Beispielen der 6 Gy-Ansätze zu sehen ist. In nachfolgender Abbildung 39 sind die HT-29-Zellen

nach 24-stündiger Inkubations-/ Reparaturzeit dargestellt. Bei Betrachtung dieser fiel auf, dass nach 6 Gy Bestrahlung nach 24 h erwartungsgemäß weniger Foci pro Zellkern zu erkennen waren als nach 30-minütiger Reparaturzeit (vgl. Abb. 38).

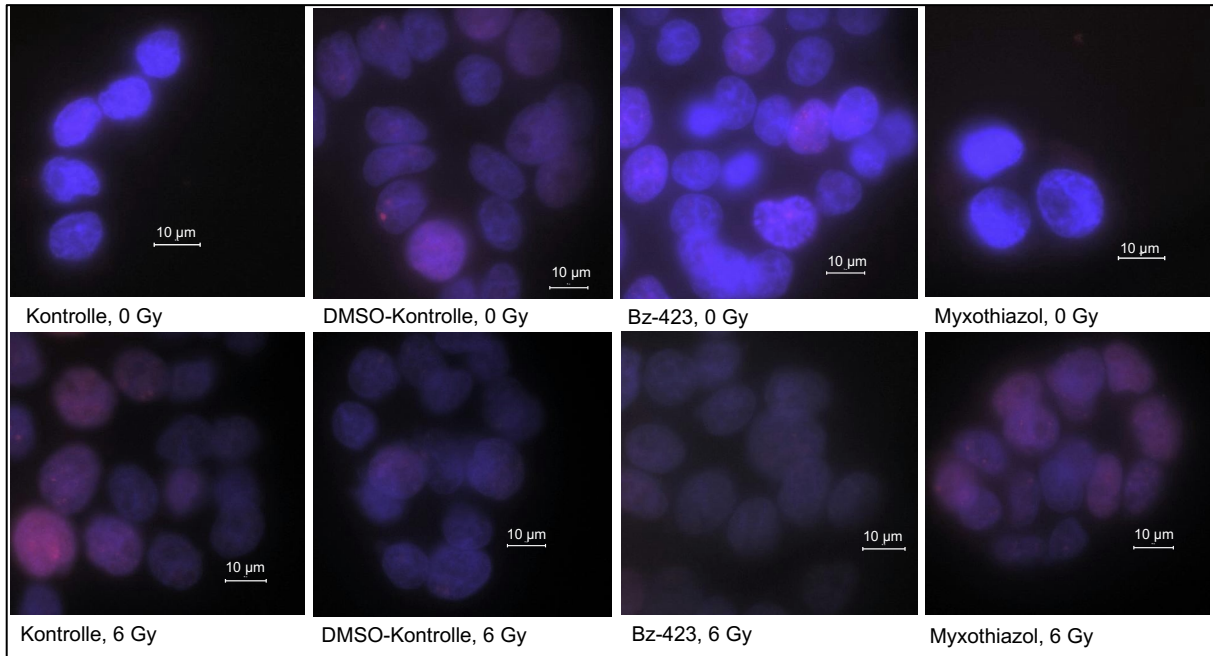


Abbildung 39: „Foci“ der mittels γ H2AX-Assay gefärbten DNA-Doppelstrangbrüche in HT-29-Zellen, unbestrahlt und nach Bestrahlung mit 6 Gy und unter Einfluss von Bz-423 bzw. Myxothiazol nach einer Reparaturzeit von 24 h. 1.000-fache Vergrößerung. Darstellung der Zellkerne blau (DAPI-Färbung) und der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

Zur quantitativen Auswertung sowie zum direkten Vergleich der verschiedenen Bedingungen sind in Abbildung 40 die mittleren gezählten Anzahlen an Foci pro Zelle der unterschiedlichen Ansätze dargestellt.

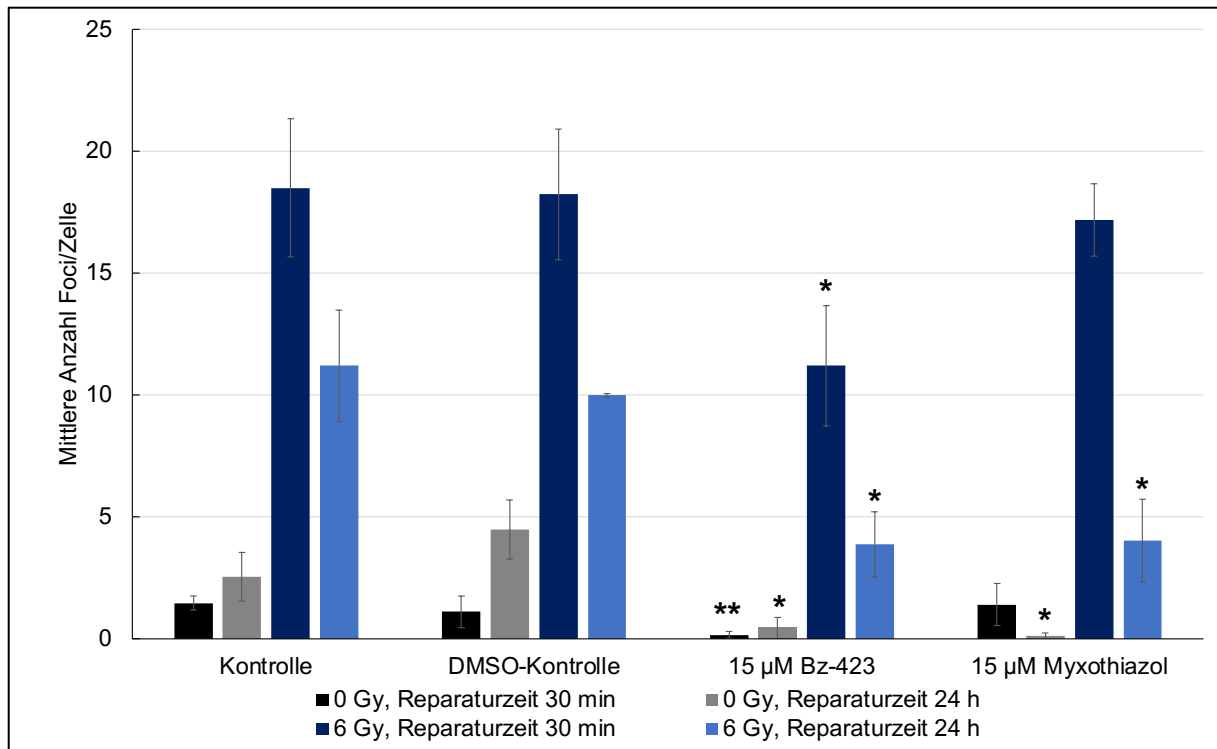


Abbildung 40: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche (γ H2AX-Foci) der HT-29 Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von Bz-423 und Myxothiazol; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus $n=3$. Signifikanzen: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ in Bezug zur Kontrolle (0 μ M) der jeweiligen gleichen Bedingung.

Die Abbildung 40 zeigt, dass die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in den unbehandelten HT-29-Zellen vom 30-min Zeitpunkt zum 24-h Zeitpunkt etwas zunahm; ebenso in den mit DMSO inkubierten Zellen.

In den unbestrahlten mit 15 μ M Bz-423 behandelten HT-29-Zellen wurden signifikant weniger DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen als in den ohne Wirkstoff behandelten HT-29-Zellen. So betrug die mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zum 30-min Zeitpunkt 0,15 (15 μ M Bz-423) im Vergleich zu 1,46 (Kontrolle, 0 μ M) bei einer Signifikanz von $p<0,01$, sowie nach 24 h 0,43 (15 μ M Bz-423, $p<0,05$) zu 2,53 (Kontrolle, 0 μ M).

Die Ansätze ohne Bestrahlung der mit 15 μ M Myxothiazol behandelten Proben zeigten zum 30-min Zeitpunkt keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24 h wiesen die Zellen dieser Ansätze allerdings auch eine signifikante Abnahme der DNA-Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle (0 μ M) von 2,53 auf 0,43 (15 μ M Myxothiazol, $p<0,05$) auf.

Die mit 6 Gy bestrahlten Zellen der Kontrolle wiesen mit 18,51 eine deutliche Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche nach 30 min auf im Vergleich zu den unbestrahlten HT-29 Zellen (0 μ M) zum 30-min Zeitpunkt mit 1,46. Nach 24 h nahmen die DNA-Doppelstrangbrüche der Kontrollen (0 μ M) von 18,51 (30 min) auf 11,20 (24 h) ab. Die bestrahlten Ansätze der DMSO-Kontrolle verhielten sich ähnlich der Kontrolle.

Bei den HT-29-Zellen, die mit 15 μM Bz-423 inkubiert wurden, nahm die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche 30 min nach der Bestrahlung im Vergleich zu den nur mit Bz-423 behandelten HT-29-Zellen zu, allerdings lagen sie im Vergleich zur Kontrolle (0 μM , 6 Gy, 30-min Zeitpunkt) signifikant unter dieser. Die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle lag nach 30-minütiger Reparaturzeit bei 11,20 (15 μM Bz-423) im Vergleich zu 18,51 (Kontrolle, $p < 0,05$). Nach 24-stündiger Reparaturzeit sank die mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche nach Bz-423-Behandlung deutlich auf 3,87 ab und lag somit auch signifikant ($p < 0,05$) unter der Kontrolle (0 μM , 6 Gy, 24-h Zeitpunkt) von 11,20.

Die Zellen, welche mit 15 μM Myxothiazol inkubiert wurden, zeigten 30 min nach der Bestrahlung eine Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche ähnlich des Kontrollansatzes (0 μM) von 1,40 auf 17,19. Nach 24 h Reparaturzeit sank die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche signifikant ($p < 0,05$) unter die der Kontrolle (0 μM) von 17,19 auf 4,03.

3.16 VERGLEICH DER REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN UNTER EINFLUSS VON BZ-423 BZW. MYXOTHIAZOL

Sowohl bei den A549-Zellen als auch bei den HT-29-Zellen konnte 30 min nach einer Bestrahlung mit 6 Gy eine signifikante Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet werden. Nach 24-stündiger Reparaturzeit zeigten die bestrahlten Zellen beider Zelllinien eine deutliche Abnahme der Focizahl pro Zellkern. Dabei wiesen die A549-Zellen eine deutlich bessere Reparaturkapazität auf als die HT-29-Zellen.

Bei Zugabe eines MTD wurde die Reparaturfähigkeit der A549-Zellen nicht signifikant beeinflusst, wohingegen es bei den HT-29-Zellen sowohl bei der Behandlung mit Bz-423 als auch mit Myxothiazol zu einer signifikant höheren Abnahme der Anzahl an residualen DNA-Doppelstrangbrüchen nach 6 Gy Bestrahlung und 24-stündiger Reparaturzeit kam als bei den Zellen ohne MTD-Einfluss.

Bei alleiniger Behandlung der A549-Zellen mit Bz-423 konnte keine Veränderung der Focizahl pro Zellkern beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu kam es bei den HT-29-Zellen unter Einfluss von 15 μM Bz-423 zu einer signifikanten Abnahme der Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche in allen Ansätzen.

Die alleinige Zugabe von 15 μM Myxothiazol führte bei den A549-Zellen nur zum 30-min-Zeitpunkt zur erhöhten Focizahl pro Zellkern; zum 24-h-Zeitpunkt konnte keine Veränderung der Zahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche bei den A549-Zellen beobachtet werden. Bei

den HT-29-Zellen konnte zum 30-min-Zeitpunkt unter Einfluss von Myxothiazol keine Veränderung der Focizahl pro Zellkern beobachtet werden; nach 24 h hingegen kam es zu einer signifikanten Abnahme der residualen DNA-Doppelstrangbrüche.

4 DISKUSSION

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung, ob der kombinierte Einsatz von den beiden Mitochondrial-targeted Drugs Bz-423 bzw. Myxothiazol mit Bestrahlung *in vitro* zur Strahlensensibilisierung führt und damit ein Potenzial zur Verbesserung in der Tumorthherapie hat. Sowohl die Resistenzen gegenüber bisherigen Chemotherapeutika als auch die Häufigkeit der Todesfälle bei Patienten mit Lungenkarzinomen und Darmkrebserkrankungen machen die Notwendigkeit der Forschung auf diesem Gebiet deutlich. Darum wurden die humanen Zelllinien A549 (Adenokarzinom der Lunge) und HT-29 (Adenokarzinom des Colons) verwendet.

4.1 WACHSTUM

Mit Hilfe der Wachstumskurven konnte das Wachstumsverhalten beider Zelllinien ohne und mit Einfluss von Bz-423 und Myxothiazol in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet werden.

4.1.1 WACHSTUM UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Die A549-Zellen benötigten in dieser Arbeit zur Verdopplung ihrer Zellpopulation im Durchschnitt 24,5 h. Damit lag die Populationsverdopplungszeit in etwa im gleichen Bereich wie in der Literatur beschrieben, in der Verdopplungszeiten von $21,3 \pm 1,5$ h (CHARY *et al.*, 2022) und 24,5 – 29,8 h (WARE *et al.*, 2007) angegeben wurden. Auch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) gab Werte von 20,0 – 30,0 h an.

Für die HT-29-Zellen wurde in dieser Arbeit eine Zellpopulationsverdopplungszeit von durchschnittlich 29,5 h ermittelt. Damit lag diese unter dem durch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) angegebenen Wert von 40 - 60 h. Grund hierfür könnte die Verwendung von unterschiedlichen Medien sein. So nutzte die DSMZ als Medium McCoy's 5A anstelle des in dieser Arbeit verwendeten DMEM. STOCKINGER *et al.* (2001) und WARE *et al.* (2007) erhielten ähnliche Populationsverdopplungszeiten wie in dieser Arbeit. So ermittelten STOCKINGER *et al.* (2001) eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 21 h. WARE *et al.* (2007) gaben für die HT-29-Zellen Zellverdopplungszeiten von 24,5 h - 29,8 h an.

Einfluss auf das Zellwachstum kann, wie bereits erwähnt, die Art und Zusammensetzung des verwendeten Mediums haben. So wurde beispielsweise für die HT-29-Zellen in der Arbeit von STOCKINGER *et al.* (2001) RPMI1640 als Medium verwendet. Weiterhin wurden in der Arbeit von WARE *et al.* (2007) andere Medienzusätze verwendet, wie Natriumbicarbonat.

Ursächlich für unterschiedliche Zellpopulationsverdopplungszeiten kann des Weiteren der CO₂-Gehalt im Brutschrank sein, als auch ob eine frühe oder späte Zellpassage verwendet wurde.

Wichtig für die Berechnung der Verdopplungszeiten war, dass die Zellen sich in der sog. Log-Phase befanden. Diese folgt nach der Lag- oder Latenzphase, in welcher die Zellen zunächst langsam wachsen, da sie sich zuerst an das neue Kulturmedium sowie die Umgebungsbedingungen gewöhnen müssen. Die Log-Phase ist die Phase des exponentiellen Wachstums, in welcher das Wachstum einer mathematischen Beziehung $N=N_02^n$ folgt. Dabei ist N_0 die Ausgangszahl, N die erreichte Anzahl der Zellen nach dem Wachstum und n die Anzahl der Verdopplungen. Anschließend folgt die Plateauphase, in welcher die Proliferationsrate der Sterberate entspricht. Daraufhin, wenn mehr Zellen absterben als Zellen sich teilen können, folgt die Absterbephase (SELBITZ *et al.*, 2011).

Die durch die nativen Wachstumsversuche ermittelten Werte konnten anschließend mit den jeweiligen Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten unter Wirkstoffzugabe verglichen werden.

4.1.2 WACHSTUM UNTER EINFLUSS VON Bz-423

Bei der Auswertung der Wachstumskurven war festzustellen, dass sich die HT-29-Zellen resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen verhielten. So zeigte sich bei den A549-Zellen bereits ab 10 µM Bz-423 eine Wachstumshemmung, bei den HT-29-Zellen erst ab 15 µM Bz-423. Auch verlängerte sich die Zellpopulationsverdopplungszeit bei den A549-Zellen ab 15 µM Bz-423 und bei den HT-29-Zellen erst ab 20 µM Bz-423. Ein Erklärungsansatz der erhöhten Resistenz der HT-29-Zellen gegenüber Bz-423 im Vergleich zu den A549-Zellen in dieser Arbeit ist, dass die A549-Zellen eine vermehrte Expression des proapoptotischen Proteins BAD aufweisen (HUANG *et al.*, 2012), sodass in den A549-Zellen wahrscheinlich eher Apoptose induziert wird, als in den HT-29-Zellen.

Der wachstumshemmende Effekt von Bz-423 kann durch Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax / Bak erklärt werden. So bewirkte Bz-423 in Fibroblasten und Ramos-B-Zellen eine gesteigerte Aktivität der Proteine Mcl-1, sowie Bax und Bak durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies und einer Depolarisation der mitochondrialen Membran (BLATT *et al.*, 2009). Weiterhin erhöhe Bz-423 durch Inhibierung der OXPHOS die Konzentration an ROS (BLATT *et al.*, 2008). Zudem besitzen Tumorzellen, wie schon in der Einleitung erwähnt, aufgrund ihres erhöhten Metabolismus eine höhere ROS-Konzentration (PAYEN *et al.*, 2019). Eine zu hohe Konzentration an ROS, sowie eine Sättigung des antioxidativen Schutzsystems führt zu irreparablen Schäden der Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen der Zelle und induziert in Folge dessen die Apoptose (PAYEN *et al.*, 2019). So konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass das Wachstum der A549-Zellen ab einer Konzentration von 10 µM Bz-423, sowie in

den HT-29-Zellen ab 15 μM Bz-423 gehemmt wurde. In der Arbeit von BLATT *et al.* (2002) wurde in Ramos-B-Zellen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung ab 10 μM Bz-423 beschrieben.

Auch die ermittelten Zellpopulationsverdopplungszeiten nach Bz-423-Zugabe bestätigten die konzentrationsabhängige Wachstumshemmung. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit eine Zellpopulationsverdopplungszeit für die A549-Zellen von 35,7 h (10 μM Bz-423), 180,6 h (15 μM Bz-423) und eine Absterbezeit von -924,2 h (20 μM Bz423) ermittelt. Für die HT-29-Zellen wurde eine Zunahme der Zellpopulationsverdopplungszeit erst unter Einfluss von 20 μM Bz-423 (292,4 h) ermittelt. Vergleichende Angaben zu den Zellpopulationsverdopplungszeiten konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Die IC_{50} -Werte nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Bz-423 betragen in dieser Arbeit 3,85 μM für die A549-Zellen und 3,21 μM für die HT-29-Zellen. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind widersprüchlich zu den ermittelten Zellpopulationszeiten als auch dem Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien in der vorliegenden Arbeit. So waren in diesen Versuchen die HT-29-Zellen im Vergleich zu den A549-Zellen resistenter gegenüber Bz-423. Allerdings wäre entsprechend der IC_{50} -Werte anzunehmen, dass zur Abtötung von 50% der A549-Zellen höhere Konzentrationen an Bz-423 notwendig seien, als für die HT-29-Zellen. Dennoch kann es möglich sein, dass die HT-29-Zellen resistenter gegenüber Bz-423 sind als die A549-Zellen, aber trotzdem einen niedrigeren IC_{50} -Werte aufweisen, aufgrund unterschiedlicher molekularer Mechanismen und Signalwege. So könnten eine höhere Expression an Membran-ATPasen (z.B. das p-Glykoprotein) der HT-29-Zellen ursächlich sein, welche bewirken, dass das Bz-423 effizienter aus der Zelle transportiert wird, was in einer allgemeinen Resistenz der HT-29-Zellen gegenüber Bz-423 resultieren würde. Bei niedriger Bz-423-Konzentration könnte die Membran-ATPase noch unvollständig aktiv sein, sodass die HT-29-Zellen einen niedrigeren IC_{50} -Wert aufweisen. Trotz der im direkten Vergleich unerwarteten Sensitivität der beiden Zelllinien sind die absoluten Werte insofern plausibel, dass BLATT *et al.* 2002 einen ähnlichen IC_{50} -Wert von 4 μM Bz-423 für Ramos-B-Zellen ermittelten.

Der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl der beiden Zelllinien wurde in der vorliegenden Arbeit vom Bz-423 nicht signifikant beeinflusst. Ursächlich hierfür könnte ein Pausieren des Zellzyklus durch Bz-423 sein (BOITANO *et al.*, 2003).

Die A549-Zellen zeigten eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler Zellen ab einer Konzentration von 15 μM Bz-423 und höher. Die Größenzunahme der vitalen A549-Zellen lässt einen Zelltod aus der Gruppe der nekrotischen Morphologie oder einen Eingang in die zelluläre Seneszenz vermuten. Im Gegensatz dazu steht, dass eine Abnahme des mittleren

Durchmessers unter den toten A549-Zellen ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423 zu beobachten war, was für einen apoptotischen Zelltod spricht. Die HT-29-Zellen zeigten ein analoges Verhalten. Allerdings zeigte sich eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler HT-29-Zellen erst bei 20 μM Bz-423 und eine Abnahme des Durchmessers toter HT-29-Zellen ebenfalls bei 20 μM Bz-423. Aufgrund der beobachteten Größenveränderungen der toten und lebenden Zellen, sowie des beschriebenen Wirkmechanismus des Bz-423 lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die lebenden Zellen in die Seneszenz und die toten Zellen durch Apoptose in den Zelltod gegangen sind. Für den Zelltod in Form der Apoptose würde der in der Literatur beschriebene Wirkmechanismus des Bz-423 sprechen. So inhibiert Bz-423 die F_1F_0 -ATPase der Atmungskette durch Herunterregulation des Oligomycin sensitiven Bindungsproteins, sodass es zu einem Anstieg reaktiver Zwischenprodukte (reduziertes Ubisemichinon, reaktive Sauerstoffspezies) kommt (GIORGIO *et al.*, 2013). Bz-423 aktiviere zellspezifisch in MEFs (engl. mouse embryo fibroblast cells) die ASK1, welche als zytosolischer Redoxsensor die Apoptose mittels einer mitogen activated protein (MAP) Kinase triggert. Diese MAP-Kinase wiederum phosphoryliert eine spezifische c-Jun N-terminal kinase (JNK), welche die proapoptotischen Proteine Bax und Bak aktiviere (BLATT *et al.*, 2008). Auch wurde in der Arbeit von BLATT *et al.*, (2008) in Ramos-B-Zellen ab 10 μM Bz-423 ein Cytochrom c – Austritt in das Zytosol nachgewiesen.

Für die Hypothese der Seneszenz spricht, dass es zu einer Zunahme der Zellgröße kam, sowohl der lebendigen HT-29-Zellen als auch der A549-Zellen. Des Weiteren bewirkt Bz-423, dass die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert (BOITANO *et al.*, 2003), welches den Signalweg der Seneszenz unterstützt (CHILDS *et al.*, 2017).

4.1.3 WACHSTUM UNTER EINFLUSS VON MYXOTHIAZOL

Analog zum Bz-423 wurden Wachstumskurven mit Myxothiazol erstellt. Dabei kam es in beiden Zelllinien zu einer Wachstumshemmung ab 0,1 μM Myxothiazol, welche ab 15 μM Myxothiazol weiter zunahm. Ursächlich hierfür ist die wesentliche Wirkung des Myxothiazols durch die Inhibierung des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette. In dessen Folge kommt es zu einem Anstieg an H_2O_2 (STARKOV & FISKUM, 2001). Dies führt zu einer verminderten ATP-Produktion und eines Zusammenbruchs des mitochondrialen Potenzials. Dieses kann letztendlich zur Apoptose bzw. Nekrose der Krebszelle führen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Arbeit von MARTÍNEZ-REYES *et al.* (2020). In dieser wurde gezeigt, dass eine funktionierende Atmungskette wichtig ist für das Tumorstadium *in vivo* und nicht durch Kompensationsmechanismen der Zelle ersetzt werden kann. Dabei nimmt der Komplex III eine zentrale Rolle ein, da dieser essentiell für die Funktion der Komplexe I und II ist.

Dementsprechend nahm in dieser Arbeit auch die Zellpopulationsverdopplungszeit bei beiden Zelllinien ab 0,1 μM Myxothiazol wesentlich zu. So benötigten die A549-Zellen in dieser Arbeit

zur Verdopplung ihrer Zellpopulation 67,5 h (0,1 μM Myxothiazol) und 68,4 h (10 μM Myxothiazol) im Vergleich zu 24,5 h (0 μM Myxothiazol). Unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol konnte bei den A549-Zellen eine Absterbezeit von -171,5 h nachgewiesen werden. Für die HT-29-Zellen betragen die Zellpopulationsverdopplungszeiten 54,1 h (0,1 μM Myxothiazol) und 113,6 h (15 μM Myxothiazol) im Vergleich zu 29,5 h (0 μM Myxothiazol). Vergleichende Zellpopulationsverdopplungszeiten wurden in der Literatur nicht angegeben.

Die IC_{50} -Werte lagen in dieser Arbeit nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 4,33 μM Myxothiazol (HT-29-Zellen) bzw. 4,48 μM Myxothiazol (A549-Zellen). In PINHO *et al.* (2013) wurden IC_{50} -Werte für Zerebrafish-Embryonalzellen von 0,06 μM Myxothiazol angegeben. SASSE *et al.* ermittelten 1999 einen IC_{50} -Wert von 0,004 μM für die Maus-Zelllinie L929. Demzufolge waren in dieser Arbeit höhere Konzentrationen von Myxothiazol notwendig, um mindestens 50 % der Zellen abtöten zu können.

Die genannten Ergebnisse können allerdings auch durch die Arbeit von STARKOV & FISKUM (2001) erklärt werden. Sie beschrieben eine Hemmung der Atmungskette in 98 % der isolierten Mitochondrien unter Einfluss von 0,2 μM Myxothiazol. Ergänzend wiesen ESPOSTI *et al.* (1993) eine konzentrationsabhängige zusätzliche Hemmung des Komplexes I ab 3 μM Myxothiazol nach.

Auf den prozentualen Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl hatte auch der MTD Myxothiazol in beiden Zelllinien in dieser Arbeit keinen wesentlichen Einfluss. Ein Erklärungsansatz hierfür ist wahrscheinlich die Inhibierung des Zellzyklus (CONRAD *et al.*, 1989) und ein Eintritt der Zellen in die Seneszenz.

In dieser Arbeit konnte eine Zunahme des mittleren Durchmessers vitaler Zellen ab einer Konzentration von 0,1 μM Myxothiazol bzw. eine Abnahme des mittleren Durchmessers toter A549-Zellen beobachtet werden. Die vitalen HT-29-Zellen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 μM Myxothiazol und 10 μM Myxothiazol zeigten ein ähnliches Verhalten wie die A549-Zellen. Hingegen hatte die Behandlung mit Myxothiazol auf den mittleren Durchmesser toter HT-29-Zellen keinen wesentlichen Effekt. Sowohl die Größenzunahme der vitalen A549-Zellen als auch der HT-29-Zellen lässt analog zum MTD Bz-423 den Eintritt in die Seneszenz vermuten. Die Hypothese der Seneszenz unterstützend, wurde in der Arbeit von DAVOUDI *et al.* (2014) gezeigt, dass Myxothiazol reversibel den Zellzyklus inhibieren kann. Die Abnahme des mittleren Durchmessers toter A549-Zellen hingegen lässt auf einen Zelltod durch Apoptose oder einen apoptoseähnlichen Zelltod vermuten.

Um ein umfassenderes Bild der MTD Bz-423 und Myxothiazol auf den Zelltodprozesses zu erhalten und die spezifische Art des Zelltodes zu bestimmen, sind weitere Analysen notwendig. Beispielsweise könnten fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt werden um apoptotische Marker wie Phosphatidylserin zu visualisieren. Aber auch Western Blott Analysen zum Nachweis von Proteinen wie Caspasen, PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) oder Bcl-2-Familienproteinen, wären zur Untersuchung des Zelltodes unter Einfluss von MTD geeignet. Weiterhin könnte auch die Cytochrom-c-Freisetzung als Indikator der mitochondrialen Apoptose bestimmt werden.

4.2 KLONOGENES ÜBERLEBEN

Zur Charakterisierung des durch Bestrahlung verursachten Effektes auf die A549- und HT-29-Zellen unter gleichzeitiger Zugabe von Bz-423 sowie Myxothiazol bzw. bei Verzicht auf Wirkstoffzugabe, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Die Methode diente zur Analyse des Langzeitüberlebens, als Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien, sowohl unter Bestrahlung als auch der Zugabe von Bz-423 oder Myxothiazol und der Kombination beider Behandlungen. In beiden Zelllinien kam es unter Zunahme der Strahlendosis zu einer Abnahme der Plattier-effizienzen (PE) in allen Ansätzen. Die PE der unbehandelten A549-Zellen (0 Gy, 0 μ M Wirkstoff) in der vorliegenden Arbeit entsprach mit 51,5 % der höchsten Koloniebildungsfähigkeit in diesem Experiment. Dementsprechend waren ohne Einfluss von Bestrahlung und Wirkstoff von $1,0 \times 10^3$ eingesäten A549-Zellen 51,5 % fähig, eine Kolonie (≥ 50 Zellen) zu bilden. WARE *et al.* (2007) ermittelten in ihren Untersuchungen eine PE von durchschnittlich 36,1 % für die unbehandelten A549-Zellen; Ji *et al.*, (2015) beschrieben eine PE im Mittel von 27,5 %. Somit war die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Koloniebildungsfähigkeit der unbehandelten A549-Zellen höher als die der Arbeiten von WARE *et al.* (2007) sowie Ji *et al.*, (2015). Grundlage hierfür könnte sein, dass in der Arbeit von Ji *et al.*, (2015) eine Inkubationszeit von 10 Tagen gewählt wurde. Hingegen inkubierten die A549-Zellen in dieser Arbeit 14 Tage. Weiterhin können die Umgebungsbedingungen, der Zeitpunkt des Mediumwechsels bzw. welche Passage verwendet wurde, Einfluss auf die PE haben. In der Arbeit von BRIX *et al.* (2020) wurden 50 verschiedene Zelllinien analysiert, unter anderem auch die A549-Zellen mittels Koloniebildungstests und verschiedenen Einsaatdichten. Auch sie kamen zu unterschiedlichen PE der A549-Zellen und begründeten dies damit, dass wahrscheinlich zelluläre Interaktionen, wie die Ausschüttung von epidermalen Wachstumsfaktoren, Einfluss auf das klonogene Überleben haben.

Die PE der unbehandelten HT-29-Zellen lag im Durchschnitt in dieser Arbeit bei 57,7 %. Damit war die PE in dieser Arbeit höher als die in der Arbeit von WARE *et al.* (2007), welche eine PE von 37,3 % für die HT-29-Zellen ermittelten. SMALLEY *et al.* (1991) ermittelten hingegen eine PE von 87 % für die HT-29-Zellen. Somit lag die PE der HT-29-Zellen in der vorliegenden Arbeit zwischen den ermittelten PE von WARE *et al.* (2007) und SMALLEY *et al.* (1991). Ursächlich für die verschiedenen PE der HT-29-Zellen werden wahrscheinlich wie bei den A549-Zellen Umgebungsbedingungen, sowie zelluläre Interaktionen sein.

In dieser Arbeit zeigte sich für die ohne Wirkstoff behandelten Kontrollen eine Abnahme des Zellüberlebens sowohl bei den A549- als auch bei den HT-29-Zellen mit zunehmender Strahlendosis. Auch in den Arbeiten von BUCH *et al.*, (2012) sowie CAI *et al.*, (2019) fielen die Überlebensfraktionen mit steigender Bestrahlungsdosis ab. Die in dieser Arbeit ermittelte Überlebensfraktion der A549-Zellen nach 2 Gy (SF2) betrug 0,85 und lag somit zwischen der von BUCH *et al.*, (2012) ermittelten SF2 von 0,76 für die A549-Zellen und der von CAI *et al.*, (2019) ermittelten SF2 von 0,91. Dabei gelten die A549-Zellen als strahlenresistente Zelllinie (WANG *et al.*, 2017) im Vergleich zu anderen Lungenkarzinomzelllinien wie H23 (Adenokarzinom) und H226 (Plattenepithelkarzinom; SCHÜTZ, 2020).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten SF2 der unbehandelten HT-29-Zellen betrug 0,84. ABBASIAN *et al.*, (2019) kamen auf eine ähnliche SF2 von 0,92. ARAB-BAFRANI *et al.*, (2016) ermittelten hingegen geringere Überlebensfraktionen als in dieser Arbeit. So betrug in ARAB-BAFRANI *et al.* (2016) die SF2 für die HT-29-Zellen 0,62. Ursächlich hierfür können unterschiedliche zelluläre Faktoren sein, wie z.B. die intrinsische Strahlenempfindlichkeit, Sauerstoffkonzentration (sog. Sauerstoffeffekt) sowie von der Zellzyklusphase, in welcher sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befindet (HERRMANN *et al.*, 2005).

Auch die HT-29-Zellen gelten als strahlenresistente Zelllinie im Vergleich zu HCT-116 in der Literatur (IMRAN & HUERTA, 2017) und wurden deshalb für diese Arbeit ausgewählt.

Unter Einfluss der MTD konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals signifikante Strahlensensibilisierungen nachgewiesen werden.

Es zeigte sich bei Gabe von 10 μM Bz-423 eine signifikante Abnahme der PE bei den A549-Zellen. Eine signifikante Strahlensensibilisierung konnte ab einer Konzentration von 15 μM Bz-423 beobachtet werden. Die HT-29-Zellen zeigten eine PE-Abnahme ab 15 μM Bz-423 sowie eine Strahlensensibilisierung ab 17,5 μM Bz-423. Somit waren die HT-29-Zellen nicht nur in den Wachstumskurven, sondern auch in den Koloniebildungstests resistenter gegenüber dem MTD Bz-423 als die A549-Zellen. Die Strahlensensibilisierung unter Einfluss von Bz-423 kann durch die Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (BOITANO *et al.*, 2003) bedingt

sein. So seien Zelllinien, welche in der G1-Phase arretiert sind, strahlensensibler (MCLWRATH *et al.*, 1994). Allerdings beschrieben die Autoren MCLWRATH *et al.* (1994) auch, dass eine p53-Mutation eine durch ionisierende Strahlung induzierte Pausierung der G1-Phase, aufgehoben werden könnte. Dies könnte die vermehrte Resistenz der HT-29-Zellen im Vergleich zu den A549-Zellen gegenüber Bz-423 und Bestrahlung erklären.

Die PE nahmen konzentrationsabhängig bei Inkubation mit 5 μM sowie 15 μM Myxothiazol in beiden Zelllinien ab. Eine signifikante Strahlensensibilisierung ließ sich unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol sowohl für die A549- als auch HT-29-Zellen erkennen. Dabei lag die Kurve des klonogenen Überlebens unter Einfluss von 15 μM Myxothiazol der HT-29-Zellen unter der der A549-Zellen.

Zu dem Einfluss von Bz-423 oder Myxothiazol in Kombination mit Bestrahlung auf die A549- und HT-29-Zellen sind in der Literatur bisher keine Angaben zu finden. Auch eventuelle Koloniebildungstests mit anderen Zelllinien wurden für diese Wirkstoffe bisher nicht beschrieben. Die in dieser Arbeit ermittelte Strahlensensibilisierung der A549- als auch HT-29-Zellen könnte auf eine vermehrte ROS-Produktion durch Bz-423 bzw. Myxothiazol zurückzuführen sein (BLATT *et al.*, 2008). So führt laut TANG *et al.*, (2018) ein Anstieg an ROS zu einer Strahlensensibilisierung.

Für den Effekt, dass die Strahlensensibilisierung erst bei höheren Konzentrationen an Bz-423 zu beobachten war, könnte eine zunächst nicht ausreichend hohe ROS-Konzentration ursächlich sein. So wurde in PAYEN *et al.*, (2019) beschrieben, dass es erst unter hohen Konzentration an ROS direkt zur Cytochrom c – Ausschüttung kommt, was zur Induktion des intrinsischen Apoptoseweges führte (PAYEN *et al.*, 2019). Weiterhin aktiviere ein Anstieg an ROS die ATM-Kinase (ataxia telangiectasia mutated), welche über verschiedene Signalwege das Level an oxidativen Stress in der Zelle senken kann (KHALIL *et al.*, 2012). So führt die Aktivierung der ATM über p53 zur Hochregulation des p21-Proteins. Dies bedingt eine nukleäre Akkumulation von Nrf2 (NF-E2-related factor-2) und in dessen Folge werden antioxidative Signalwege gesteigert. Weiterhin phosphoryliert die ATM-Kinase direkt den HIF- α (engl. Hypoxia inducing factor α), welcher indirekt zur Inhibierung von mTOR (engl. mechanistic Target of Rapamycin) führt. Dies hat zur Folge, dass die Zellproliferation gehemmt wird und der oxidative Stress der Zelle reduziert wird (KHALIL *et al.*, 2012).

4.3 METABOLISCHE AKTIVITÄT

In dieser Arbeit wurden WST-1-Untersuchungen durchgeführt, um die metabolische Aktivität unter Einfluss der beiden MTD Bz-423 oder Myxothiazol allein sowie in Kombination mit Bestrahlung besser charakterisieren zu können. Hierfür wurden die Strahlendosen von 6 Gy verwendet; die Auswertung erfolgte nach 1 h sowie nach 24 h.

Die metabolische Aktivität der A549-Zellen zeigte in dieser Arbeit zum 1 h-Zeitpunkt eine leichte Zunahme der Aktivität der bestrahlten Ansätze im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen. Die alleinige Bz-423-Zugabe führte zum 1 h-Zeitpunkt zu keiner wesentlichen Veränderung der metabolischen Aktivität außer bei den Zellen der Ansätze 5 μM Bz-423 und 20 μM Bz-423. So kam es in dieser Arbeit bei Zugabe von 5 μM Bz-423 zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,05$) der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 μM). Unter Einfluss von 20 μM Bz-423 sank die Aktivität hingegen im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 μM) ab. Zum 24 h-Zeitpunkt zeigten die Ansätze der Kontrollen (0 μM , 0 Gy) der A549-Zellen eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität auf im Vergleich zur Kontrolle nach 1 h. Eine Abnahme der Aktivität war konzentrationsabhängig 24 h nach Bestrahlung ab 5 μM Bz-423 im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Unter zusätzlicher Bestrahlung zum 24 h-Zeitpunkt konnten in dieser Arbeit keine Effekte aufgrund hoher Standardabweichungen gezeigt werden.

Die HT-29-Zellen verhielten sich in dieser Arbeit ähnlich der A549-Zellen. So war zum 1 h-Zeitpunkt bis 5 μM eine leichte Zunahme der metabolischen Aktivität der unbestrahlten HT-29-Zellen im Vergleich zur normierten Kontrolle (0 μM , 0 Gy, 100 %) zu erkennen. Ab 10 μM Bz-423 nahm die Aktivität ab. Bei zusätzlicher Bestrahlung war analog zu den A549-Zellen eine leichte Zunahme der metabolischen Aktivität zu beobachten, sowohl bei alleiniger Bestrahlung als auch bei kombinierter Behandlung. Zum 24 h-Zeitpunkt zeigten die HT-29-Zellen erst ab 15 μM Bz-423 eine Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur normierten Kontrolle. Dementsprechend waren die HT-29-Zellen auch in diesem Versuch resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen. Bei zusätzlicher Bestrahlung war nach 24 h nur eine geringfügige Hemmung der metabolischen Aktivität zu beobachten.

Vergleichbare Analysen zum Einfluss von Bz-423 auf die A549- oder HT-29-Zellen wurden in der Literatur nicht gefunden.

In Zusammenschau zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der Wachstumskurven sowie der Koloniebildungstests, war eine Abnahme der metabolischen Aktivität unter Einfluss von

Bz-423 zu erwarten. Denn Ziel des WST-1-Assays ist die mitochondriale Dehydrogenase (Komplex I), welche das rosa gefärbte, wasserlösliche Tetrazolium-Salz in rotes Formazan umwandelt. Allerdings können die Tetrazoliumsalze durch mehrere Oxidoreduktasen umgewandelt werden, die sich sowohl innerhalb als auch außerhalb der Mitochondrien befinden. So ist im Allgemeinen die Menge des Formazanproduktes proportional zur Anzahl metabolisch aktiver lebensfähiger Zellen. Die Abnahme der metabolischen Aktivität kann durch die retrograde Hemmung der Atmungskette durch das Bz-423 erklärt werden. Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass es unter geringen Konzentrationen an Bz-423 zu einer kompensatorisch vermehrten Aktivierung der Atmungskette kommen kann, um genügend Energie für die Zelle bereitzustellen.

Ein Erklärungsansatz für den vermehrten WST-1-Umsatz der A549-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit Bz-423 und Bestrahlung könnte die Arbeit von YAMAMORI *et al.*, (2012) geben. Hier zeigten die A549 ohne MTD eine vermehrte mitochondrialen ROS-Produktion unter Bestrahlung mit einem Maximum nach 12 h. Auch zeigten die A549-Zellen nach Bestrahlung einen Anstieg der ATP-Produktion, sowie eine vermehrte mitochondriale Depolarisation. Weiterhin konnte in der Arbeit von YAMAMORI *et al.* (2012) gezeigt werden, dass es durch Bestrahlung zu einem vermehrten G2/M-Arrest im Zellzyklus kam. Dabei zeigten die Zellen in der G2/M-Phase den höchsten zellulären oxidativen Stress, gefolgt von den Zellen der S-Phase, sowie der G1-Phase.

Die insgesamt relativ geringen Effekte des Bz-423 in Kombination mit Bestrahlung im WST-1-Assay auf die A549- sowie HT-29-Zellen vor allem nach 24 h könnten auch dadurch erklärt werden, dass Succinat nur eine geringe Rolle zur Reduktion von Tetrazolium besitzt und die zelluläre Reduktion hauptsächlich an der MOM stattfindet (TAN & BERRIDGE, 2000). Da WST-1 (ein Tetrazoliumsalz) einen Jodrest sowie zwei negativ geladene Sulfonatreste enthält, kann es die Zellmembran nicht passieren. Für die Reduktion an der Zelloberfläche wird ein intermediärer Elektronenakzeptor, beispielsweise mPMS (1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat) benötigt. Dieser ist abhängig von der NADPH-Produktion der Zellen (TAN & BERRIDGE, 2000). Des Weiteren kann eine Änderung des pH-Wertes Einfluss auf die Verstoffwechslung von WST-1 haben. Die Arbeit von TAN & BERRIDGE (2000) zeigte auch, dass die Anwesenheit von Xanthenen oder Superoxiddismutase Tetrazolium reduziert. Aus diesen Gründen war es sehr wichtig die Versuchsbedingungen konstant zu halten.

Nach alleiniger Behandlung mit Myxothiazol zeigten die A549-Zellen zum 1 h-Zeitpunkt bereits eine Abnahme ihrer metabolischen Aktivität ab 0,1 μM Myxothiazol im Vergleich zur normierten Kontrolle (0 μM , 0 Gy). Unter zusätzlicher Bestrahlung nahm diese nochmals ab. Zum 24 h-Zeitpunkt kam es zu einer Zunahme der metabolischen Aktivität der Kontrollen, als auch

der mit Myxothiazol behandelten A549-Zellen im Vergleich zur normierten Kontrolle. Ursächlich für den erhöhten Metabolismus der beiden Zelllinien nach 24 h ist wahrscheinlich die gestiegene Zellzahl, sodass höhere Extinktionen als zum 1 h Zeitpunkt gemessen wurden.

Sowohl unter alleiniger Bestrahlung als auch unter Kombinationsbehandlung kam es zu signifikanten Abnahmen der Aktivitäten im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen.

Die HT-29-Zellen hingegen zeigten unter Monotherapie mit Myxothiazol keinen wesentlichen Effekt, weder 1 h noch 24 h nach Bestrahlung. Bei zusätzlicher Bestrahlung kam es in den HT-29-Zellen nach 1 h zu einer signifikanten Abnahme ihrer metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. 24 h nach Bestrahlung führte erst die Zugabe von 10 μM Myxothiazol zu einer signifikanten Abnahme des Metabolismus in den HT-29-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen.

Auch WST-1-Analysen mit Myxothiazol wurden in der Literatur nur einmal beschrieben. Lediglich in der Arbeit von THEODOSSIOU *et al.* (2012) wurde ein MTT-Test mit Myxothiazol in MCF7-Zellen (menschliche Adenokarzinom Zellen der Brust) und DU145 (menschliche Prostatakarzinomzellen) durchgeführt, in welchem die Zugabe von 1,2 μM Myxothiazol nach 24 h zur Abnahme der zellulären Stoffwechselaktivität führte (THEODOSSIOU *et al.*, 2012).

Die Abnahme des WST-1-Umsatzes der A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol war analog zum MTD Bz-423 in Zusammenschau der Ergebnisse der Wachstumskurven und Koloniebildungstest in dieser Arbeit zu erwarten. Denn zum einen hemmt Myxothiazol den Komplex III der Atmungskette, weshalb in Folge dessen die metabolische Aktivität sinken müsste. Zum anderen wirkte Myxothiazol zytotoxisch als auch wachstumshemmend, sodass von einer verminderten Aktivität auszugehen ist (vgl. Diskussion metabolische Aktivität unter Einfluss von Bz-423).

Ungewöhnlich ist hingegen, dass unter Monobehandlung der HT-29-Zellen mit Myxothiazol in dieser Arbeit keine wesentlichen Effekte nachzuweisen waren. Aufgrund der Wirkungsweise des Myxothiazols als auch der wachstumshemmenden Effekte in dieser Arbeit, würde analog zu den A549-Zellen eine Aktivitätsabnahme zu erwarten sein. Wie bereits im vorherigen Abschnitt zum Bz-423 diskutiert, haben verschiedene Faktoren auf die Reduktion der Tetrazoliumsalze einen Einfluss. So könnten die HT-29-Zellen eine verminderte NADPH-Produktion aufweisen oder niedrigere Spiegel an Superoxiddismutase, wodurch WST-1 nicht reduziert werden würde. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass es unter Einfluss von Myxothiazol zu einer Tumorzellschädigung kommt, in deren Folge zunächst eine Stoffwechselaktivierung der HT-29-Zellen erfolgt.

Um genauere Aussagen zum Metabolismus der beiden Tumorzelllinien unter den beiden MTD Myxothiazol und Bz-423 sowie zur Erklärung der Unterschiede zwischen den Zelllinien zu bekommen, könnten ergänzend weitere Untersuchungen zur Detektion von mitochondrialer ROS-Produktion mittels MitoSOX™ fluoreszenzmikroskopisch (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007) durchgeführt werden. Weiterhin würden eine durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Superoxidspiegel als auch des mitochondrialen Membranpotenzials helfen den Metabolismus der Tumorzellen unter Einfluss von MTD besser zu beurteilen.

4.4 REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN

In dieser Arbeit wurden γ H2AX-Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Zugabe eines MTD die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche erhöht und deren Reparaturfähigkeit in den A549- und HT-29-Zellen verändert. Hierfür wurden die Zellen 30 min bzw. 24 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt gefärbt um sie anschließend fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren. Ziel dieser Analysen ist das Histonprotein H2AX, welche nach strahleninduzierten Schäden am Serin 139 phosphoryliert wird (KUO *et al.*, 2008). Für die Phosphorylierung sind Proteine der PI3-Kinase-Familie verantwortlich, vor allem die Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), als auch die Proteinkinase des Typs ATR (ataxia telangiectasia RAD3-related) sowie andere DNA-PKs (DNA-Proteinkinasen; BONNER *et al.*, 2008). Dabei sind die sichtbaren γ H2AX mit der Anzahl der auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche direkt proportional (BONNER *et al.*, 2008), sodass diese Methode zur Untersuchung der Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen gut geeignet ist.

Sowohl bei den A549-Zellen als auch bei den HT-29-Zellen konnte 30 min nach 6 Gy Bestrahlung eine signifikante Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet werden. Nach 24-stündiger Reparaturzeit zeigten die mit 6 Gy bestrahlten Zellen beider Zelllinien eine deutliche Abnahme der Focianzahl pro Zellkern. Dabei wiesen die Kontrollen (0 μ M) der A549-Zellen eine bessere Reparaturkapazität auf als die der HT-29-Zellen. Grundlage für den Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist wahrscheinlich, dass die HT-29-Zellen eine p53-Mutation aufweisen (VILLARINI *et al.*, 2021). So beschreibt KUO *et al.* (2008), dass Zelllinien mit einem Verlust des p53-Proteins eine längere Zeit für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen benötigen, als Zellen mit intaktem p53-Protein.

Weiterhin stimmen die Ergebnisse mit Beobachtungen von MAH *et al.*, (2010) überein, welche das Maximum der Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX nach ca. 30 min beschrieben, und es anschließend zu einer Abnahme von γ H2AX kam.

Bei Zugabe eines MTD konnte 24 h nach Bestrahlung mit 6 Gy die Reparaturfähigkeit der A549-Zellen nicht signifikant beeinflusst werden, wohingegen es bei den HT-29-Zellen sowohl bei der Behandlung mit Bz-423 als auch mit Myxothiazol zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen kam. Fraglich ist, ob die Ursache hierfür aus der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen resultiert oder aus dem proteolytischen Abbau apoptotischer Zellen.

Bei alleiniger Behandlung der A549-Zellen mit Bz-423 konnte keine Veränderung der Anzahl an Focizahl pro Zellkern zum 30-min-Zeitpunkt beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu kam es bei den HT-29-Zellen unter Einfluss von 15 μM Bz-423 zu einer signifikanten Abnahme der DNA-Doppelstrangbrüche. Ein Erklärungsansatz für die Abnahme der DNA-Doppelstrangbrüche bietet die Arbeit von BHATT *et al.*, aus dem Jahre 2015. Die Inhibition der Atmungskette führte in dieser zu einem Anstieg der glykolytischen Rate. Die erhöhte Glukoserate erleichterte die Reparatur der strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche mittels homologer Rekombination und die Überwindung von DNA-Brücken durch End-zu-End-Verbindungen (BHATT *et al.*, 2015). Auch in der Arbeit von NILE *et al.* aus dem Jahr 2021 führte die Hemmung der Glykolyse sowie der mitochondrialen Respiration durch 2-Dexoglucose und Metformin in menschlichen Neuroblastomzellen SK-N-BE(2c) sowie in menschlichen Glioblastom-Zellen UVW zu einer Strahlensensibilisierung.

Die alleinige Zugabe von 15 μM Myxothiazol führte bei den A549-Zellen zum 30-min Zeitpunkt zur erhöhten Anzahl an Focizahl pro Zellkern; für die HT-29-Zellen konnten keine Veränderung beobachtet werden. Die Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche in den A549-Zellen unter Einfluss von Myxothiazol könnte durch eine vermehrte ROS-Produktion und Anstieg des oxidativen Stresses erklärt werden. So führte die Zugabe von 0,6 μM Myxothiazol in der Arbeit von YOUNG *et al.* aus dem Jahre 2002 nach 5 min zu einem starken Anstieg an ROS in Hepatozyten und isolierten Mitochondrien. Die vermehrte ROS-Produktion kann wiederum DNA-Doppelstrangbrüche induzieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der kombinierte Einsatz von Mitochondrial-targeted Drugs (MTD) mit Bestrahlung *in vitro* zur Strahlensensibilisierung führt und damit ein Potenzial zur Anwendung in der Tumorthherapie hat. Dazu wurden die beiden humanen Tumorzelllinien A549 (Lunge) und HT-29 (Colon) mit den Wirkstoffen Bz-423 oder Myxothiazol behandelt und gleichzeitig am Linearbeschleuniger bestrahlt. Die Ergebnisse sind in folgenden Abschnitten zusammengefasst:

- Anhand der Wachstumsversuche konnte eine Wachstumshemmung der A549-Zellen ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423 sowie der HT-29-Zellen ab 15 μM Bz-423 gezeigt werden. Die HT-29-Zellen waren resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen.
- Die IC_{50} -Werte nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Bz-423 betragen 3,85 μM für die A549-Zellen und 3,21 μM für die HT-29-Zellen.
- Der Wirkstoff Myxothiazol verursachte in beiden Zelllinien eine Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 0,1 μM .
- Die IC_{50} -Werte lagen nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 4,33 μM Myxothiazol (HT-29-Zellen) bzw. 4,48 μM Myxothiazol (A549-Zellen).
- Bei der Analyse der Koloniebildung war eine signifikante Strahlensensibilisierung der A549-Zellen ab 15 μM Bz-423 sowie der HT-29-Zellen ab 17,5 μM Bz-423 nachweisbar.
- Unter Einfluss von Myxothiazol zeigten beide Zelllinien im Koloniebildungstest eine signifikante Strahlensensibilisierung ab einer Konzentration von 15 μM .
- In den WST-1-Analysen führte die alleinige Behandlung der A549-Zellen mit Bz-423 nach 24 h zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität ab 5 μM Bz-423; die der HT-29-Zellen erst ab 15 μM Bz-423. Eine zusätzliche Bestrahlung mit 6 Gy bewirkte keinen signifikanten Effekt auf die A549-Zellen; allerdings eine geringfügige Hemmung der metabolischen Aktivität der HT-29-Zellen.

- Nach Kombinationsbehandlung mit Myxothiazol und Bestrahlung (6 Gy) kam es nach 1 h und 24 h zu signifikanten Abnahmen der metabolischen Aktivität der A549-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen. Die HT-29-Zellen zeigten 1 h nach alleiniger Bestrahlung, sowie unter Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Myxothiazol und Bestrahlung nach 24 h eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen.
- Die Auswertung der γ H2AX-Analysen ergab, dass die Zugabe eines MTD die Reparaturfähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen in den A549-Zellen nicht signifikant beeinflusst. Hingegen kam es unter Einfluss von Bz-423 sowie Myxothiazol in den HT-29-Zellen zu einer Abnahme der Anzahl residualer DNA-Doppelstrangbrüche.

6 AUSBLICK

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden Mitochondrial-targeted Drugs (MTD) Bz-423 und Myxothiazol einen wachstumshemmenden, zytotoxischen sowie strahlensensibilisierenden Effekt sowohl auf die A549-Zellen als auch HT-29-Zellen zeigten. Daher empfiehlt es sich an MTD als Ergänzung zur Strahlentherapie zunächst *in vitro* weiterhin zu forschen. Auch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Wirkung der beiden Substanzen vor einem komplexen Hintergrund ablaufen, sodass Analysen des zellulären Einflusses der MTD helfen den Stoffwechsel von Tumorzellen besser zu verstehen und neue Therapiestrategien zu entwickeln. *In-vitro* wären beispielsweise Zellzyklusanalysen, als auch Apoptose-Testungen mittels Durchflusszytometrie denkbar. Vielversprechend wären auch durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Superoxidspiegel, als auch des mitochondrialen Membranpotenzials um den Metabolismus der Tumorzellen unter Einfluss von MTD besser beurteilen zu können. So zeigten zahlreiche Studien eine enge Assoziation zwischen den Tumormetabolismus und der Strahlenresistenz. So konnte durch Hemmung der Glykolyse beispielsweise eine Strahlensensibilisierung nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden bisher zwei humane Tumorzelllinien untersucht und somit ist es schwierig die Ergebnisse für die Klinik einzuordnen. Aus diesem Grund sollten zunächst vergleichende Untersuchungen an Normalgewebszellen erfolgen, um die Toxizität von MTD besser beurteilen zu können. Da zum aktuellen Zeitpunkt auch keine vergleichbaren *In-vivo*-Daten existieren, wären tierexperimentelle Studien sinnvoll um Informationen zur Wirkung von MTD auf den Gesamtorganismus zu bekommen.

Es besteht ein großer Forschungsbedarf an Wirkstoffen, welche wachstumshemmend als auch strahlensensibilisierend auf Tumorzellen wirken, um den Therapieerfolg in der Radioonkologie zu verbessern. Zusammenfassend lässt sich aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse feststellen, dass MTD eine vielversprechende Option in der strahlentherapeutischen Behandlung sind, welche in der Zukunft durch weitere Untersuchungen erforscht werden sollten.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABBASIAN, M., BAHARLOUEI, A., ARAB-BAFRANI, Z., & LIGHTFOOT, D. A. (2019). Combination of gold nanoparticles with low-LET irradiation: an approach to enhance DNA DSB induction in HT29 colorectal cancer stem-like cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2769-3>.
- AHMAD, I. M., AYKIN-BURNS, N., SIM, J. E., WALSH, S. A., HIGASHIKUBO, R., BUETTNER, G. R., VENKATARAMAN, S., MACKEY, M. A., FLANAGAN, *et al.* (2005). Mitochondrial O₂- and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4254–4263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411662200>.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC): „A549 (ACC 107)“ abgerufen am 10.02.2024 von <https://www.dsmz.de/de/collection/catalogue/details/culture/ACC-107>.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC): „HT-29 (ACC 299)“, abgerufen am 10.02.2024 von <https://www.dsmz.de/de/collection/catalogue/details/culture/ACC-299>.
- ARAB-BAFRANI, Z., SHAHBAZI-GAHROUEI, D., ABBASIAN, M., & FESHARAKI, M. (2016). Multiple MTS assay as the alternative method to determine survival fraction of the irradiated HT-29 colon cancer cells. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 6(2), 112–116. <https://doi.org/10.4103/2228-7477.181040>.
- AVERBECK, D., & RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. (2021). Role of mitochondria in IR responses: Epigenetic, metabolic, and Signaling impacts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011047>.
- AZZAM, E. I., JAY-GERIN, J. P., & PAIN, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*, 327(1–2), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>.
- BAMBERG, M. *et al.* (2009) Radioonkologie Band 1 Grundlagen, S. 25-29, 207-215, 237-240, Auflage 2, W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York.
- BHATT, A. N., CHAUHAN, A., KHANNA, S., RAI, Y., SINGH, S., SONI, R., KALRA, N., & DWARAKANATH, B. S. (2015). Transient elevation of glycolysis confers radio-resistance by facilitating DNA repair in cells. *BMC cancer*, 15, 335. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1368-9>.
- BLATT, N. B., BEDNARSKI, J. J., WARNER, R. E., LEONETTI, F., JOHNSON, K. M., BOITANO, A., YUNG, R., RICHARDSON, B. C., JOHNSON, K. J., ELLMAN, J. A., *et al.*, (2002). Benzodiazepine-induced superoxide signals B cell apoptosis: mechanistic insight and potential therapeutic utility. *The Journal of clinical investigation*, 110(8), 1123–1132. <https://doi.org/10.1172/JCI16029>.
-

- BLATT, N. B., BOITANO, A. E., LYSSIOTIS, C. A., OPIPARI, A. W., & GLICK, G. D. (2008). Bz-423 superoxide signals apoptosis via selective activation of JNK, Bak, and Bax. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), 1232–1242. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.022>.
- BLATT, N. B., BOITANO, A. E., LYSSIOTIS, C. A., OPIPARI, A. W., & GLICK, G. D. (2009). Bz-423 superoxide signals B cell apoptosis via Mcl-1, Bak, and Bax. *Biochemical Pharmacology*, 78(8), 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.025>.
- BOITANO, A., ELLMAN, J. A., GLICK, G. D., & OPIPARI, A. W. (2003). The Proapoptotic Benzodiazepine Bz-423 Affects the Growth and Survival of Malignant B Cells. *Cancer Research*, 63(20), 6870–6876.
- BONNER, W. M., REDON, C. E., DICKEY, J. S., NAKAMURA, A. J., SEDELNIKOVA, O. A., SOLIER, S., & POMMIER, Y. (2008). γ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2523>.
- BRIX, N., SAMAGA, D., HENNEL, R., GEHR, K., ZITZELSBERGER, H., & LAUBER, K. (2020). The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiation Oncology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01697-y>.
- BUCH, K., PETERS, T., NAWROTH, T., SÄNGER, M., SCHMIDBERGER, H., & LANGGUTH, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-1>.
- CAI, Y., SHENG, Z., & LIANG, S. (2019). Radiosensitization effects of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells. *Oncology Letters*, 18(1), 529–534. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10364>.
- CHARY, A., GROFF, K., STUCKI, A. O., CONTAL, S., STOFFELS, C., CAMBIER, S., SHARMA, M., GUTLEB, A. C., & CLIPPINGER, A. J. (2022). Maximizing the relevance and reproducibility of A549 cell culture using FBS-free media. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 83, 105423. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105423>.
- CHILDS, B. G., GLUSCEVIC, M., BAKER, D. J., LABERGE, R. M., MARQUESS, D., DANANBERG, J., & VAN DEURSEN, J. M. (2017). Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718–735. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>.
- CLINICALTRIALS: „CPI-613 (Devimistat) in Combination With Chemoradiation in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma“ abgerufen am 27.10.2023 von <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT05325281?intr=mitochondrial%20target%20drug&page=3&rank=24>.
-

- CONRADT, P., DITTMAR, K. E., SCHLIEPHACKE, H., & TROWITZSCH-KIENAST, W. (1989). Myxothiazol: a reversible blocker of the cell cycle. *The Journal of antibiotics*, 42(7), 1158–1162. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.1158>.
- DAVOUDI, M., KALLIJÄRVI, J., MARJAVAARA, S., KOTARSKY, H., HANSSON, E., LEVÉEN, P., & FELLMAN, V. (2014). A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.058>.
- ESPOSTI, M. D., GHELLI, A., CRIMI, M., ESTORNELL, E., FATO, R., & LENZA, G. (1993). Complex I and Complex III of Mitochondria Have Common Inhibitors Acting as Ubiquinone Antagonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190(3), 1090–1096. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1993.1161>.
- FAN, J., KAMPHORST, J. J., MATHEW, R., CHUNG, M. K., WHITE, E., SHLOMI, T., & RABINOWITZ, J. D. (2013). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Molecular Systems Biology*, 9(712), 1–11. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.65>.
- GALLUZZI L., VITALE I., AARONSON SA., ABRAMS J.M., ADAM D., AGOSTINIS P., ALNEMRI E.S., ALTUCCI L., AMELIO I., ANDREWS D.W., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M., *et al* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- GAO, M., MONIAN, P., PAN, Q., ZHANG, W., XIANG, J., & JIANG, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26(9), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>.
- GAO, M., YI, J., ZHU, J., MINIKES, A. M., MONIAN, P., THOMPSON, C. B., & JIANG, X. (2019). Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Molecular cell*, 73(2), 354–363.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.042>.
- GIORGIO V., VON STOCKUM S., ANTONIEL M., FABBRO A., FOGOLARI F., FORTE M., GLICK G.D., PETRONILLI V., ZORATTI M., *et al*. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(15):5887-92. doi: 10.1073/pnas.1217823110.
- HERRMANN T., BAUMANN M., DÖRR W. *Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig*. Elsevier Urban & Fischer Verlag. München. 4. Auflage. 2005; 16-45.
- HUANG, N., ZHU, J., LIU, D., LI, Y. L., CHEN, B. J., HE, Y. Q., LIU, K., MO, X. M., & LI, W. M. (2012). Overexpression of Bcl-2-associated death inhibits A549 cell growth in vitro and in vivo. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 27(2), 164–168. <https://doi.org/10.1089/cbr.2011.1018>.
-

- IMRAN J., HUERTA S. (2017). Nitric Oxide in Rectal Cancer: From Mice to Patients. *Nitric Oxide as a Chemosensitizing Agent* 155 – 167. doi: 10.1016/B978-0-12-811020-1.00009-0.
- IPPOLITO, L., GIANNONI, E., CHIARUGI, P., & PARRI, M. (2020). Mitochondrial Redox Hubs as Promising Targets for Anticancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00256>.
- Ji, X., Ji, J., SHAN, F., ZHANG, Y., CHEN, Y., & LU, X. (2015). Cancer-associated fibroblasts from NSCLC promote the radioresistance in lung cancer cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(5), 7002–7008.
- JOHNSON, K. M., CHEN, X., BOITANO, A., SWENSON, L., OPIPARI, A. W., & GLICK, G. D. (2005). Identification and validation of the mitochondrial F₁F₀-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chemistry and Biology*, 12(4), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.02.012>.
- KHALIL HS, TUMMALA H & ZHELEV N. (2012). ATM in focus: A damage sensor and cancer target. *BioDiscovery*; 5: 1.; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.5.1
- KAMARUDIN, M. N. A., SARKER, M. M. R., ZHOU, J. R., & PARHAR, I. (2019). Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1495-2>.
- KIM, H., XIA, D., YU, C. A., XIA, J. Z., KACHURIN, A. M., ZHANG, L., YU, L., & DEISENHOFER, J. (1998). Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8026–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8026>.
- KUO, L. J., & YANG, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, 22(3), 305–309.
- LIEBL, M. C., & HOFMANN, T. G. (2021). The role of p53 signaling in colorectal cancer. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092125>.
- LÖFFLER, G. *et al.* (2014) Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie, S. 165, 235-249, Auflage 9, Berlin; Heidelberg: Springer.
- MAH L.J., EL-OSTA A. AND KARAGIANNIS T.C. (2010) gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4): 679-686.
- MARTÍNEZ-REYES I., CARDONA L.R., KONG H., VASAN K., MCELROY G.S., WERNER M., KIHSHEN H., RECZEK C.R., WEINBERG S.E., GAO P. *et al.* (2020). Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumor growth. *Nature*, 585(7824)(1), 288–292. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2475-6>.
-

- MCCANN, E., O'SULLIVAN, J., & MARCONE, S. (2021). Targeting cancer-cell mitochondria and metabolism to improve radiotherapy response. *Translational oncology*, 14(1), 100905. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100905>.
- MCILWRATH, A. J., VASEY, P. A., ROSS, G. M., & BROWN, R. (1994). Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer research*, 54(14), 3718–3722.
- MOLINA J.R., SUN Y., PROTOPOPOVA M., GERA S., BANDI M., BRISTOW C., MCAFOOS T., MORLACCHI P, ACKROYD J, AGIP AA, *et al.* (2018). An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med*. 24(7):1036-1046. doi: 10.1038/s41591-018-0052-4.
- MUFTUOGLU, M., MORI, M. P., & SOUZA-PINTO, N. C. D. (2014). Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 17, 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.007>.
- MUKHOPADHYAY P., RAJESH P., YOSHIHIRO K., HASKÓ G. AND PACHER P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 358(1):203-8.
- NEUZIL, J., DONG, L. F., ROHLENA, J., TRUKSA, J., & RALPH, S. J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, Vol. 13, pp. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112>.
- NILE D.L., RAE C., WALKER D.J., WADDINGTON J.C., VINCENT I., BURGESS K., GAZE M.N., MAIRS R.J., CHALMERS A.J. (2021). Inhibition of glycolysis and mitochondrial respiration promotes radiosensitisation of neuroblastoma and glioma cells. *Cancer Metab*. 19;9(1):24. doi: 10.1186/s40170-021-00258-5.
- PAYEN, V. L., ZAMPIERI, L. X., PORPORATO, P. E., & SONVEAUX, P. (2019). Pro- and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1–2), 189–203. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09789-2>.
- PINHO B.R., SANTOS M.M., FONSECA-SILVA A., VALENTÃO P., ANDRADE P.B., OLIVEIRA J.M. (2013). How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. *Br J Pharmacol*. 169(5):1072-90. doi: 10.1111/bph.12186.
- POLAK-CHARCON, S., & BEN-SHAUL, Y. (1979). Degradation of tight junctions in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of Cell Science*, Vol.35, 393–402. <https://doi.org/10.1242/jcs.35.1.393>.
- PROTASONI, M., & ZEVIANI, M. (2021). Mitochondrial structure and bioenergetics in normal and disease conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–55. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
-

- ROHLE D., POPOVICI-MULLER J., PALASKAS N., TURCAN S., GROMMES C., CAMPOS C., TSOI J., CLARK O., OLDRINI B., KOMISOPOULOU E., *et al.* (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6132), 626–630. <https://doi.org/10.1126/science.1236062>.
- SAINERO-ALCOLADO, L., LIAÑO-PONS, J., RUIZ-PÉREZ, M. V., & ARSENIAN-HENRIKSSON, M. (2022). Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death and Differentiation*, 29(7), 1304–1317. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01022-y>.
- SASSE, F., BÖHLENDORF, B., HERRMANN, M., KUNZE, B., FORCHE, E., STEINMETZ, H., HÖFLE, G., & REICHENBACH, H. (1999). Melithiazols, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 52(8), 721–729. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.721>
- SASSI, N., MATTAREI, A., AZZOLINI, M., SZABO', I., PARADISI, C., ZORATTI, M., & BIASUTTO, L. (2014). Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(10), 1781–1789. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.06.010>.
- SELBITZ, H.-J., TRUYEN U. & VALENTIN-WEIGAND P. (2011). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre Teil II Allgemeine Bakteriologie: 3 Grundlagen S.102-205. 11. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. DOI: 10.1055/b-0034-5362.
- SHRESTHA, R., JOHNSON, E., & BYRNE, F. L. (2021). Exploring the therapeutic potential of mitochondrial uncouplers in cancer. *Molecular Metabolism*, 51, 101222. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101222>.
- SCHÜTZ, E. (2020). Die Wirkung von Endotoxin auf die Ansprache auf Strahlentherapie im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Dissertation, Medizin), *Giessen: VVB Laufersweiler Verlag*. <http://dx.doi.org/10.22029/jlupub-14787>.
- SMALLEY S.R., KIMLER B.F., EVANS R.G. (1991). 5-Fluorouracil modulation of radiosensitivity in cultured human carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 20(2):207-11. doi: 10.1016/0360-3016(91)90091-h.
- STARKOV, A. A., & FISKUM, G. (2001). Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3), 645–650. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4409>.
- STOCKINGER, A., EGER, A., WOLF, J., BEUG, H., & FOISNER, R. (2001). Transcriptional Activity. *The Journal of Cell Biology*, 154(6), 1185–1196. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.94>.
- STOCKWELL B.R., FRIEDMANN ANGELI J.P., BAYIR H., BUSH A.I., CONRAD M., DIXON S.J., FULDA S., GASCÓN S., HATZIOS S.K., KAGAN V.E., *et al.* (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 171(2):273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
-

- SUN, X., WANG, Y., JI, K., LIU, Y., KONG, Y., NIE, S., LI, N., HAO, J., XIE, Y., XU, C., *et al.* (2020). NRF2 preserves genomic integrity by facilitating ATR activation and G2 cell cycle arrest. *Nucleic acids research*, 48(16), 9109–9123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa631>.
- TAN, A. S., & BERRIDGE, M. V. (2000). Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *Journal of Immunological Methods*, 238(1–2), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00156-3).
- TANG, D., CHEN, X., KANG, R., & KROEMER, G. (2021). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, 31(2), 107–125. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1>.
- TANG, L., WEI, F., WU, Y., HE, Y., SHI, L., XIONG, F., GONG, Z., GUO, C., LI, X., DENG, H., *et al.* (2018). Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 37(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0758-7>.
- THEODOSSIOU T.A., YANNAKOPOULOU K., AGGELIDOU C., HOTHERSALL J.S. (2012). Tamoxifen subcellular localization; observation of cell-specific cytotoxicity enhancement by inhibition of mitochondrial ETC complexes I and III. *Photochem Photobiol.* 88(4):1016-22. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01144.x
- THIERBACH, G., & REICHENBACH, H. (1981). Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(4), 504–507. <https://doi.org/10.1128/AAC.19.4.504>.
- VILLARINI, M., ACITO, M., DI VITO, R., VANNINI, S., DOMINICI, L., FATIGONI, C., PAGIOTTI, R., & MORETTI, M. (2021). Pro-Apoptotic Activity of Artichoke Leaf Extracts in Human HT-29 and RKO Colon Cancer Cells. *International journal of environmental research and public health*, 18(8), 4166. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084166>.
- WAGENER, CH. & MÜLLER, O. (2010) Molekulare Onkologie – Entstehung, Progression, klinische Aspekte S.119-123, 183-193; Auflage 3, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- WANG Y., HE J., ZHANG S., YANG Q. (2017). Intracellular calcium promotes radioresistance of non-small cell lung cancer A549 cells through activating Akt signaling. *Tumour Biol.* 39(3):1010428317695970. doi: 10.1177/1010428317695970. PMID: 28351325.
- WANG, Z., & SUN, Y. (2010). Targeting p53 for novel anticancer therapy. *Translational Oncology*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1593/tlo.09250>.
- WARE, J. H., ZHOU, Z., GUAN, J., KENNEDY, A. R., & KOPELOVICH, L. (2007). Establishment of human cancer cell clones with different characteristics: A model for screening chemopreventive agents. *Anticancer Research*, 27(1 A), 1–16.
-

- WEINBERG, S. E., & CHANDEL, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 9–15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712>.
- YAMAMORI, T., YASUI, H., YAMAZUMI, M., WADA, Y., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, H., & INANAMI, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033>.
- YOUNG, T. A., CUNNINGHAM, C. C., & BAILEY, S. M. (2002). Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Archives of biochemistry and biophysics*, 405(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00338-7)
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN UND DER GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (2019): „Krebs in Deutschland für 2019/2020“, 14. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin, S. 16. abgerufen am 11.02.2024, von https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile.

THESEN

Mitochondrien sind aufgrund ihrer zentralen Funktionen im Metabolismus sowie bei der Induktion von Signalwegen bzw. Regulation des Zelltodes ein guter Angriffspunkt in der Tumorthherapie. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der kombinierte Einsatz von Mitochondrial-targeted Drugs (MTD) mit Bestrahlung *in vitro* zur Strahlensensibilisierung führt und damit ein Potenzial zur Anwendung in der Tumorthherapie hat.

Dazu wurden die beiden humanen Tumorzelllinien A549 (Lunge) und HT-29 (Colon) mit den Wirkstoffen Bz-423 oder Myxothiazol behandelt und gleichzeitig am Linearbeschleuniger bestrahlt.

Anhand der Wachstumsversuche konnte eine Wachstumshemmung der A549-Zellen ab einer Konzentration von 10 μM Bz-423 sowie der HT-29-Zellen ab 15 μM Bz-423 gezeigt werden. Die HT-29-Zellen waren resistenter gegenüber Bz-423 als die A549-Zellen. Die IC_{50} -Werte nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Bz-423 betragen 3,85 μM für die A549-Zellen und 3,21 μM für die HT-29-Zellen.

Der Wirkstoff Myxothiazol verursachte in beiden Zelllinien eine Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 0,1 μM . Die IC_{50} -Werte lagen nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 4,33 μM Myxothiazol (HT-29-Zellen) bzw. 4,48 μM Myxothiazol (A549-Zellen).

Bei der Analyse der Koloniebildung war eine signifikante Strahlensensibilisierung der A549-Zellen ab 15 μM Bz-423 sowie der HT-29-Zellen ab 17,5 μM Bz-423 nachweisbar.

Unter Einfluss von Myxothiazol zeigten beide Zelllinien im Koloniebildungstest eine signifikante Strahlensensibilisierung ab einer Konzentration von 15 μM .

In den WST-1-Analysen führte die alleinige Behandlung der A549-Zellen mit Bz-423 nach 24 h zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität ab 5 μM Bz-423; die der HT-29-Zellen erst ab 15 μM Bz-423. Eine zusätzliche Bestrahlung mit 6 Gy bewirkte keinen signifikanten Effekt auf die A549-Zellen; allerdings eine geringfügige Hemmung der metabolischen Aktivität der HT-29-Zellen.

Nach Kombinationsbehandlung mit Myxothiazol und Bestrahlung (6 Gy) kam es nach 1 h und 24 h zu signifikanten Abnahmen der metabolischen Aktivität der A549-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen. Die HT-29-Zellen zeigten 1 h nach alleiniger Bestrahlung, sowie

unter Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Myxothiazol und Bestrahlung nach 24 h eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen.

Die Auswertung der γ H2AX-Analysen ergab, dass die Zugabe eines MTD die Reparaturfähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen in den A549-Zellen nicht signifikant beeinflusst. Hingegen kam es unter Einfluss von Bz-423 sowie Myxothiazol in den HT-29-Zellen zu einer Abnahme der Anzahl residualer DNA-Doppelstrangbrüche.

Ein großer Forschungsbedarf besteht im Bereich der MTD, da aufgrund der fehlenden Untersuchungen auf Normalgewebszellen und wenigen *in-vivo*-Daten weiterführende Untersuchungen nötig sind. Denn in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Bz-423 und Myxothiazol einen wachstumshemmenden, zytotoxischen sowie strahlensensibilisierenden Effekt sowohl auf die A549-Zellen als auch HT-29-Zellen hatte.

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. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.

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.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

LEBENS LAUF

Ann-Sophie Zimmermann

Wohnhaft: An der Hardt 10a, 37339 Leinefelde-Worbis

Geboren am 16.09.1997 in Duderstadt

Bildungsweg:

- 10/2023 Bestandener Abschnitt der Zweiten Ärztlichen Prüfung
- 02/2020 Bestandener Abschnitt der Ersten Ärztlichen Prüfung
- 10/2016 Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
- 06/2016 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Staatliches Gymnasium „Marie Curie“ Worbis

Berufliche Tätigkeiten

- 02-08/2024 Studentische Hilfskraft in der pflegerischen Nachtwache am Helios Klinikum Erfurt
- 12/2020 Studentische Hilfskraft in der Klinik für Palliativmedizin in Rostock
- 07-10/2019 Studentische Hilfskraft im Zentrum für Radiologie, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie in Rostock
- 08-09/2017 Studentische Hilfskraft in der Gemeinschaftspraxis für bildgebende Diagnostik
Dr. med. D. Wagner, M. Abdel-Rahman, Dr. med. E. Müller, T. Purrucker, Dr. med. B. W. Raab, Dr. med. U. Stalder, E. Kos

Promotion

- 04/2019 Beginn der Promotion im Bereich der Strahlentherapie, betreut durch PD Dr. rer. nat. habil. Manda und Prof. Dr. med. habil. Hildebrandt

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung und Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben. Dabei gilt mein besonderer Dank

... an Herrn **Prof. Dr. med. G. Hildebrandt** für die Ermöglichung dieser Arbeit,

... genauso wie an Frau **PD Dr. rer. nat. habil. K. Manda**. Ich bedanke mich von ganzem Herzen für die wertvolle Unterstützung, die Beantwortung aller Fragen sowie die unermüdliche Betreuung.

... an das **Team des Zellkulturlabors** für die Hilfestellungen beim Umgang mit Zellen, Pipetten und Geräten.

... ein weiterer Dank gilt dem **Team der Physik** ohne Durchführung der Bestrahlung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre,

... und der größte Dank gilt **meiner Familie** für eure stetige Geduld und euren unermüdlichen Zuspruch. Ihr habt mir während meines gesamten Studiums sowie bei der Verfassung dieser Arbeit immer den Rücken freigehalten und immer an mich geglaubt.

... und vor allem meiner Schwester **Marie-Theres Zimmermann**, für deine unermüdlichen kreativen Motivationsschübe.