

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor : Prof. Dr. med. H. L. Fehm

---

# **Auswirkungen des Chloracetaldehyd auf den Zellmetabolismus und die DNA-Synthese von Tumorzellen**

## **Ein Vergleich der Toxizität des Ifosfamid-Metaboliten durch zwei in vitro Chemosensitivitätsassays**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt vom Kirsten Braasch  
aus Lübeck

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Nat. Stefan. Uhlig

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2007

zum Druck genehmigt, Lübeck, den 14.03.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# **Inhaltsverzeichnis**

## **I. Einleitung**

## **II. Material und Methoden**

### **1. Zellen**

1.1. Zelllinien

1.2. Zellkulturen und Versuchsvorbereitungen

### **2. BrdU-Assay**

2.1. Material

2.2. Prinzip und Durchführung

2.3. Versuchsaufbau der Einzelversuche

### **3. MTT-Assay/ SDI-Test**

3.1. Material

3.2. Prinzip und Durchführung

3.3. Versuchsaufbau der Einzelversuche

### **4. Zytostatika**

4.1. verwendete Zytostatika

4.2. Zytostatika-Zubereitung

4.3. Aufbereitung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen

### **5. Biometrie**

## **III. Ergebnisse**

### **1. Etablierung des BrdU-Assays**

1.1. Standardisierung der BrdU-Inkubationszeiten

1.2. Wachstumskinetiken der MX-1 und S117 Tumorzellen

### **2. Ermittlung äquitoxischer Zytostatikakonzentrationen**

### **3. Verhalten der Tumorzellen unter Zytostatikatherapie**

### **4. Verhalten der Tumorzellen nach Abschluß der Zytostatikatherapie**

## **IV. Diskussion**

## **V. Zusammenfassung**

## **VI. Anhang**

### **1. Verzeichnis der Abkürzungen**

### **2. Ergänzende Abbildungen im Text beschriebener Vorversuche**

### **3. Protokolle der Versuchsdurchführung**

- 3.1. MTT-Verstoffwechslung bei MX-1 Tumorzellen während und nach Behandlung mit Melphalan, Mafosfamid, CAA u. 4-OOH-Ifosfamid (in  $IC_{50}$ -Konzentration)
- 3.2. BrdU-Einbau bei MX-1 Tumorzellen während und nach Behandlung mit Melphalan, Mafosfamid, CAA u. 4-OOH-Ifosfamid (in  $IC_{50}$ -Konzentration)
- 3.3. BrdU-Einbau und MTT-Verstoffwechslung bei S117 Tumorzellen während und nach der Behandlung mit Melphalan, Mafosfamid, CAA u. 4-OOH-Ifosfamid ( $IC_{50}$ -Konzentration) in Eppendorf-Cups

## **VI. Literaturverzeichnis**

## **VII. Danksagung**

## **VIII. Lebenslauf**

## **I. Einleitung**

In Deutschland erkranken jährlich 424 250 Menschen an Krebs [7]. Die Chirurgie sowie Strahlen-, Chemo- und Immuntherapien bilden in Abhängigkeit von Tumorart, -stadium und -differenzierung die Grundlage der tumorgerichteten medizinischen Versorgung. Obwohl die meisten der in der Chemotherapie eingesetzten Substanzen schon in den sechziger und siebziger Jahren entwickelt wurden, sind bis heute deren Wirkmechanismus, die Ursache von Nebenwirkungen oder die Bedeutung der bei der Verstoffwechslung der Muttersubstanzen entstehenden Metabolite nicht vollständig verstanden. Die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Chemotherapie kann gegenwärtig immer noch nicht individuell patientenbezogen vorhergesagt werden. Prognostische Aussagen basieren überwiegend auf den Ergebnissen klinischer Studien. Bei identischer Tumorphistologie, identischem Tumorstadium und -grading sowie Primärmanifestation werden daher mit dem gleichen Therapieprotokoll unterschiedliche Krankheitsverläufe beobachtet.

Aufgabe zurzeit noch in Entwicklung befindlicher sog. In vitro Tumor Chemosensitivity Assays soll es werden, anhand von patienteneigenem Tumormaterial (Biopsie, OP-Präparat) ein den „Bedürfnissen“ des Tumors angepasstes patientenindividuelles Therapiekonzept zu erstellen [2;43;54]. Hierfür ist das Verstehen von Wirkmechanismen von Zytostatika sowie das Erkennen und Begreifen von Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber Zytostatika grundlegend bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Unter den verschiedenen Substanzklassen der Zytostatika wie z.B. Antimetabolite, Antitumor-Antibiotika und Alkaloide sind die Alkylantien nach wie vor die am häufigsten eingesetzten Substanzen und unverzichtbar in der Behandlung von soliden Tumoren und hämatologischen Systemerkrankungen. Hierzu gehören u.a. die Stickstofflost-Derivate inklusive der Oxazaphosphorine und des Melphalans sowie die Nitrosoharnstoffderivate und die Platinderivate. Substanzen dieser Stoffklasse zeichnen sich durch ihre gemeinsame Eigenschaft aus, positiv geladene Alkylgruppen zu bilden. Anschließend sind sie dann in der Lage, mit elektrophilen Regionen anderer Moleküle (z.B. Proteinen der DNA) zu reagieren und sie in ihrer Funktion erheblich zu beeinflussen. Innerhalb der DNA-Helix entsteht so eine Interkalation zwischen zwei benachbarten Basenpaaren. Diese führt dann sekundär zur Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Basenpaare. Einzelstrangbrüche mit Störungen der Replikation, Transkription und Translation sind die

Folge. Substanzen mit zwei Chlorethylgruppen sind zusätzlich in der Lage, Quer- und Längsvernetzungen der DNA-Stränge zu verursachen [27;49;84]. Diese werden auch als „intra- und interstrand cross-links“ bezeichnet. Sie verhindern ein Entwinden der DNA-Doppelhelix und blockieren somit den ersten Schritt der Replikation und Transkription. Der nicht alkylierende Anteil entscheidet über ihr Bindungsverhalten, über ihre substanzspezifischen pharmakologischen Eigenschaften sowie über ihre Toxizität im Sinne von Neben- und Wechselwirkungen.

Ein Stickstofflost-Abkömmling ist das Phenylalanin-Derivat Melphalan (L-PAM) (Abb. 1). Es wirkt als bifunktionelles Alkylanz und verknüpft in der dsDNA jeweils zwei Guaninbasen miteinander [42].

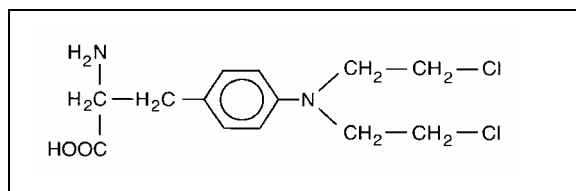


Abb. 1: Melphalan (L-PAM)

Auf der Suche nach nebenwirkungsärmeren und tumorselektiveren Substanzen entdeckten Brock et al. Ende der 50er Jahre die Gruppe der Oxazaphosphorine. Der erste Vertreter dieser Gruppe war das Cyclophosphamid (CPM) (Abb. 2a). Es ist ein Prodrug, das selbst keine zytotoxische Wirkung besitzt. Erst nach seiner Metabolisierung durch mischfunktionelle Oxidasen der Leber - und nicht selektiv des Tumors, wie es bei seiner Entwicklung erhofft wurde -, erlangt es seine zytotoxischen Eigenschaften [16;84]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mafosfamid (MAFO) ist ein Cyclophosphamidderivat, welches spontan zu aktivem 4-OH-CPM und Mesna zerfällt.

Ein Strukturisomer des CPM ist das Ifosfamid (IFO) (Abb. 2b). Es wurde 1965 in den ASTA-Forschungslaboratorien entwickelt. Im Unterschied zum CPM besitzt das IFO an jedem seiner beiden Stickstoffatome eine Chlorethylgruppe. Die Stoffwechselschritte bei seiner Metabolisierung sind qualitativ dieselben wie beim CPM. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Quantität [17;26;46;77;87].

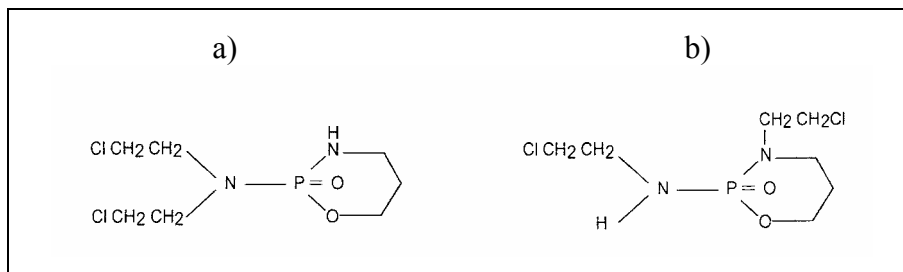


Abb. 2 a) CPM und b) IFO

Die Aktivierung beider Oxazaphosphorinen erfolgt über verschiedene Isoenzyme des Cytochrom P450 der Leber, insbesondere über das Isoenzym P450 3A4 [10;14;21;40;95]. Nach Oxidation an der C4-Position entstehen 4-Hydroxy-IFO bzw. 4-Hydroxy-CPM. Beide Substanzen stehen im Gleichgewicht zu ihren azyklischen Tautomeren Aldo-IFO und Aldo-CPM. Das 4-Hydroxy-IFO und das Aldo-IFO werden anschließend entweder reversibel zu 4-Thio-IFO oder irreversibel zu 4-Keto- und Carboxy-IFO deaktiviert, oder es erfolgt unter Freisetzung von Acrolein C die Bildung des hoch toxischen Stickstoff-Lost-Phosphorsäureamids. Der pharmakologische Unterschied beruht auf der Existenz eines zweiten alternativen Stoffwechselweges, der bei der Aktivierung des IFO quantitativ bedeutsam ist und für CPM beim Menschen quantitativ kaum eine Rolle spielt. Durch Seitenkettenoxidation am zyklischen, quantitativ im geringeren Umfang auch am extrazyklischen Stickstoff kommt es unter Dechloroethylierung zur Freisetzung des Chloracetaldehyds (CAA) und zur Bildung von inaktivem 2- bzw. 3-Dechloroethyl-IFO [66;95]. Der zuletzt beschriebene alternative Stoffwechselweg erklärt die unterschiedlichen pharmakologischen Profile der beiden Oxazaphosphorine. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass aufgrund der Seitenkettenoxidation u.U. nur 50% des IFO einer Toxifikation zu 4-Hydroxy-IFO zur Verfügung stehen [11]. Diese Ergebnisse bieten eine Erklärung für die klinische Beobachtung, weshalb IFO wesentlich höher als CPM dosiert werden muss, um eine vergleichbare Tumortoxizität zu erreichen.

1997 erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe erstmals der Nachweis einer eigenständigen in vitro Zytotoxizität des CAA in klinisch relevanter Konzentration. Im Jahre 2000 konnten die Ergebnisse am Tiermodell bestätigt werden. [11;18]. Durch diese Ergebnisse könnte sich das unterschiedliche zytotoxische Potenzial der beiden Oxazaphosphorine gegenüber verschiedenen Tumorarten [13;15;28;35;88] und das Fehlen einer kompletten Kreuzresistenz sowie das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil erklären [15;71]). CAA könnte diejenige Substanz sein, welche die gegenüber CPM auftretenden Resistenzen überwindet. Bei in vitro Versuchen mit CPM wurde an resistenten Tumorzelllinien eine erhöhte S-Transferase-Aktivität - deren Coenzym das GSH ist - und eine

Konzentrationszunahme des intrazellulären GSH beobachtet. Der Resistenzmechanismus wird in einer gesteigerten enzymatischen Deaktivierung des Phosphoramidmustards durch das GSH vermutet [60]. Die Tatsache, dass CAA eine Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentration verursacht, ist bereits mehrfach von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt worden [24;55;61;79;82;89]. Ein Zusammenhang zwischen der Glutathion-Konzentration der Zelle und der Funktion des sog. „multidrug resistance-associated protein“ ist ebenfalls publiziert [1;58].

Dass das CAA für die Ifosamid-spezifischen nephro- und neurotoxischen Nebenwirkungen verantwortlich ist, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt [9;29;37;38;76;94]. Mesna und Natriumbikarbonat bzw. Methylenblau werden deshalb in den Standardtherapieprotokollen in der Klinik zur Deaktivierung des CAA eingesetzt. In der Entwicklung befinden sich weitere Substanzen, welche über eine selektive Hemmung der oben genannten Cytochrom P450 Isoenzyme die Entstehung des CAA blockieren sollen. Metyrapone und Troleandomycin (TAO) gehören zu diesen Substanzen [93]. Solange die Bedeutung des CAA bei der zytotoxischen Wirkung des IFO aber nicht endgültig geklärt ist, sollte der Nutzen dieser Substanzen, welche die Ausbildung des CAA komplett blockieren würden, kontrovers diskutiert werden.

Die vorliegende Arbeit soll ergänzend zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe, in welchen eine eigenständige in vitro und in vivo Zytotoxizität des CAA an verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen wurde [11;18], zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus führen. Unter Berücksichtigung der nachgewiesenen zahlreichen Interaktionsmöglichkeiten des CAA mit dem Zellmetabolismus wurden die Auswirkungen des CAA auf die DNA-Synthese und die energetische Situation von Tumorzellen untersucht. Die zu überprüfende Arbeitshypothese war, dass CAA in erster Linie Einfluss auf die Stoffwechselsituation der Zellen nimmt. Bei der Planung der vorliegenden Arbeit stellten wir die Theorie auf, dass sich Mängel in der Energieversorgung der Zelle zeitlich vor Störungen der DNA-Synthese bemerkbar machen müssten. Zur Beurteilung der energetischen Situation wählten wir den MTT-Assay, zur Quantifizierung der DNA-Synthese den BrdU-Assay. Die zum Vergleich mitgeführten Zytostatika 4-OH-IFO, 4-OH-CPM und Melphalan sind alle bifunktionelle Alkylantien. Eine Veränderung des Verhaltens der Tumorzellen durch eine dieser Referenzzytostatika, gleichgültig in welchem der beiden Assays, dokumentiert den Beginn einer DNA-Synthesestörung und definiert den Zeitpunkt, ab welchem Ergebnisse des MTT-Assays nicht als primäre



Beeinflussung der Stoffwechselaktivität gedeutet werden dürfen. Der Bearbeitung der Aufgabenstellung ging eine Evaluation der Versuchsdurchführung der beiden Assays an die spezielle Fragestellung voraus. Der im Prinzip bekannte BrdU-Assay wurde von mir neu im Labor etabliert und seine Anwendbarkeit auf die verwendeten Zelllinien geprüft.

## **II. Material und Methoden**

### **1. Zellen**

#### **1.1. Zelllinien**

S117 und MX-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Beide wurden von H. Löhre im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in vitro etabliert. Als Primärtumor diente ein humanes polymorphzelliges Schilddrüsenkarzinom (S117) bzw. ein humanes Mammakarzinom (MX-1). Die MX-1 Tumorzelllinie findet u.a. Verwendung im Tumorpanel des NCI.

#### **1.2. Zellkulturen und Versuchsvorbereitungen**

Beide Tumorzelllinien wurden als subkonfluierende Monolayer in 80 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen (Nunclon, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland) unter Standardkulturbedingungen (37°C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die Zellen wurden zweimal (MX-1) bzw. dreimal (S117) pro Woche subkultiviert bzw. mit neuem Medium (RPMI 1640, BioWhittaker, Verviers, Belgien) versorgt, dem 10% fetales Kälberserum (FKS; Biochrom KG, Deutschland), 100IU/l Penizillin und 100µg/l Streptomycin (Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland) zugesetzt waren.

Für die Versuchsdurchführung wurden während der exponentiellen Wachstumsphase (MX-1: 3 Tage; S117: 2 Tage) die Zellen aus den Kulturflaschen abtrypsiniert und vereinzelt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zähl-kammer bestimmt. Die gewünschte Zellkonzentration wurde eingestellt. MX-1 Zellen wurden für alle Versuche 24 Stunden zuvor in Mikrotiterplatten (MTP, 96-well, Nunclon, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland) eingesät. Durch dieses Vorgehen sollte sichergestellt werden, dass sich die Zellen bei der anschließenden Chemotherapie wieder im exponentiellen Wachstum befinden. Dieses zweizeitige Vorgehen war bei den S117 Zellen nicht möglich. Wir mussten daher auf diese Art „Vorkultur“ verzichten und behandelten statt dessen die Zellen als Suspension vorliegend in Eppendorfcups. Die S117 Tumorzellen wurden nach Entfernung der Zytostatika für die Kultur und die Messung am ELISA-Reader wieder in Mikrotiterplatten gesät.

Bei der Wahl der pro Vertiefung (well) der Mikrotiterplatten eingesäten Zellzahl griffen wir auf Erfahrungen und Publikationen unserer Forschungsgruppe zurück [18;92] und kontrollierten lediglich die Durchführbarkeit bei modifiziertem Versuchsaufbau.

## **2. BrdU-Assay**

### **2.1. Material**

- **Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Cat. No. 1 647 229 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)**
- **1 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

### **2.2. Prinzip und Durchführung**

Das Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon. Seine Molekularstruktur unterscheidet sich nur in der c5-Stelle des Pyrimidins (Abb. 3). Anstelle einer Methylgruppe besitzt das BrdU dort ein Brommolekül. BrdU wird während der Synthesephase [30] des Zellzyklus kompetitiv [83] zum Thymidin in die zelluläre DNA eingebaut. Die Detektion des eingebauten BrdU erfolgt über eine Antikörperreaktion. Hierfür muss die DNA in Einzelstrangform vorliegen [36]. Dieses wird durch eine chemische Denaturierung der DNA erreicht. Die verwendeten Antikörper sind hochspezifisch für BrdU und mit einer Peroxidase konjugiert. Nach Abschluss dieser Reaktion wird der ungebundene Antikörperanteil ausgewaschen. Durch Zugabe einer chromogenen Lösung wird durch die Peroxidase eine Indikator-Reaktion ausgelöst (Enzym-Substrat-Reaktion). Die resultierende Farbentwicklung wird spektral fotometrisch am ELISA-Reader gemessen. Die Höhe der Extinktion ist direkt proportional zur DNA-Synthese und zur Zellkonzentration [70]. Sie wird außerdem durch die BrdU- und Antikörperkonzentration, durch deren Inkubationsdauer sowie durch die Dauer der Enzym-Substrat-Reaktion bestimmt.

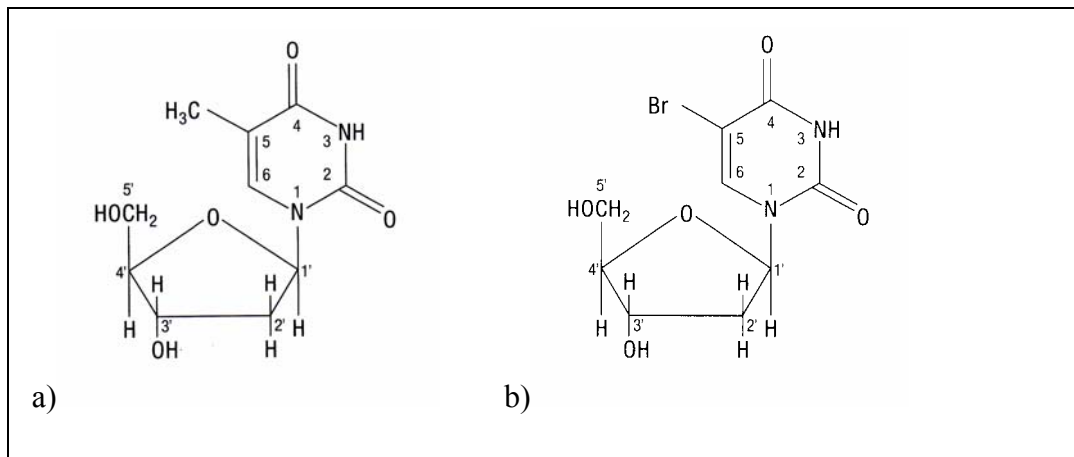


Abb. 3: Molekularstruktur des a) Thymidin und des b) BrdU

Bei unseren Versuchen verwendeten wir ein von Roche Molecular Biochemicals® in Anlehnung an Magaud fertig zusammengestelltes Komplettpaket. Eine Kreuzreaktivität des darin verwendeten Antikörper-Klons (BMG 6H8) zu endogenen zellulären Komponenten wie Thymidin, Uridin oder DNA war ausgeschlossen worden [86]. In Vorversuchen prüften wir die Durchführbarkeit unseres Versuchsaufbaus. Dafür variierten wir die eingesetzte Zellkonzentration (50.000/ml bis 500.000/ml), die Dauer der BrdU-Inkubation (0,5-2h) und die Länge der Enzym-Substrat-Reaktion (5-30min). In Einzelversuchen schlossen wir eine unspezifische Bindung der Antikörper gegen die Tumorzellen (sog. Background) aus, indem die Zellen ohne vorherige BrdU-Inkubation mit den Antikörpern in Kontakt gebracht wurden. Es folgten standardisierte Waschprozeduren und Messungsschritte.

Die Antikörper ließen wir konstant über alle Versuche 90 Minuten inkubieren. Auf eine Variation verzichteten wir, da wir bei dem von Roche Molecular Biochemicals® empfohlenen Standard eine ausreichend hohe Absorption der Kontrolle erhielten und eine Verkürzung der Inkubationszeit gleichzeitig eine Verminderung der Sensitivität bedeutet hätte [64].

### 2.3. Versuchsaufbau der Einzelversuche

(Versuchsprotokolle im Anhang)

Die Dauer und der Zeitpunkt der Zytostatikabehandlung sowie die Länge der BrdU-Inkubation (Labeling-Phase) variierte je nach Versuchsaufbau. Zur Bestimmung der BrdU-Einbaurate bei MX-1 Tumorzellen (50.000 und 500.0000/ml) unter Zytostatikatherapie erfolgte die Behandlung mit je einem Zytostatikum in Konzentration für ein, zwei, drei

oder vier Stunden unter Standardkulturbedingungen. Jeweils in der letzten Stunde der Zytostatikainkubation pipettierten wir 20µl/well BrdU (Endkonzentration 10µM) hinzu. Die Messung des BrdU-Einbaus erfolgte also parallel zur letzten Stunde der Zytostatikaexposition.

Für die Bestimmung der BrdU-Einbaurrate bei MX-1 Tumorzellen (50.000/ml) nach Zytostatikatherapie wurden die Zellen über vier Stunden mit den Zytostatika aber ohne BrdU unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das mit den Zytostatika versetzte Medium durch 200µl/well frisches RPMI 1640 Medium ersetzt. 24, 48 und 72 Stunden später folgte für zwei Stunden die Inkubation mit BrdU (20µl/well; 10µM).

Die sich der Labeling-Phase anschließenden Schritte wurden bei allen Versuchen identisch durchgeführt. Nach Entfernung des BrdU-haltigen Überstandes wurden 200µl/well FixDenat® pipettiert und die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur 30 Minuten lang ruhen gelassen. Anschließend wurde das FixDenat® abgesaugt und durch 100µl/well Antikörperlösung ersetzt. Die Platten wurden für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatten mit washing-solution® (250µl/well) über mindestens 15 Minuten wurden 100µl Substrat-solution® (Tetramethylbenzidin) pro Vertiefung vorpipettiert. Die Dauer der Indikatorreaktion (5, 10 oder 20 Minuten) war abhängig von der erzielten Farbentwicklung. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Zugabe von 25µl/well H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Messung am ELISA-Reader (Spektralfotometer, Titerek Multiscan Plus, Flow, Irvine, UK) erfolgte spätestens fünf Minuten nach Zugabe des H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei einer Wellenlänge von 450nm.

Um die BrdU-Einbaurrate bei S117 Tumorzellen unter Zytostatikatherapie zu messen, wurden gleichzeitig 500µl der S117 Tumorzellsuspension (50.000/ml), 500µl Zytostatikum (IC<sub>50</sub>-Konzentration) bzw. Medium und 100µl BrdU (10µM) pro Eppendorfcup vorpipettiert. Die Cups wurden anschließend für vier Stunden in geöffnetem Zustand unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Mithilfe eines Thermomixers wurde eine möglichst homogene Zellsuspension der normalerweise adhären wachsenden Zellen hergestellt. Diese wurde dann in die Mikrotiterplatten eingesät (200µl/well), und die Zellen bei 300xg über 10 Minuten an zentrifugiert (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech). Anschließend wurde

der Überstand vorsichtig aspiriert und das Zellsediment mithilfe eines Haarföns über 15 Minuten getrocknet.

Zur Bestimmung der BrdU-Einbaurrate bei S117 Tumorzellen (50.000/ml) nach Zytostatikatherapie wurden die Zellen in Eppendorfcups vorpipettiert (500µl/Cup), mit Zytostatikalösung (IC<sub>50</sub>-Konzentration) ohne BrdU behandelt und über vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zytostatikalösung abzentrifugiert und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und die Zellen wurden in Mikrotiterplatten eingesät (100µl/well). Nach 24, 48 und 72 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen für zwei Stunden mit BrdU inkubiert. Nach dem jeweils letzten Schritt der Labeling-Phase folgten die standardisierten Antikörperinkubation-, Wasch- und Messprozeduren.

Bei jedem Versuch führten wir parallel eine Kontrollgruppe unbehandelter Tumorzellen und einen Leerwert mit. Ein Versuchsansatz bestand aus jeweils drei gleich befüllten Vertiefungen (well). Die Messergebnisse wurden nach Abzug des Leerwerts in Relation (treated/ control (TC) -ratio) zueinander gewertet.

### **3. MTT-Assay**

#### **3.1. Material**

- **3- (4, 5-Dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma Aldrich)**
- **Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany)**

#### **3.2. Prinzip und Durchführung**

Der MTT-Assay ist erstmals 1983 von Mosmann beschrieben worden [62]. Er wurde in einer von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen Modifikation verwendet [90]. Der Assay stellt eine kolorimetrische Messung der Stoffwechselaktivität lebender Zellen in Korrelation zur Zellzahl dar. Gemessen wird die Aktivität der Succinatdehydrogenase, eines mitochondrialen, zur Atmungskette zählenden NADH<sup>+</sup>-abhängigen Enzyms [78].

Mittels MTT-Assay sind in Abhängigkeit von der Kulturdauer sowohl Aussagen über kurzfristig den Energiehaushalt der Zelle betreffende Effekte möglich (z.B. i. S. einer Störung der mitochondrialen Atmungskette) als auch über längerfristige Auswirkungen auf das Zellüberleben und die Zellproliferation (i. S. einer zur Kontrolle reduzierten Zellanzahl/Populationsgröße) möglich [62]. Das Tetrazoliumsalz wird durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase reduziert und sein Tetrazoliumring gespalten. Hierdurch entsteht ein wasserunlösliches blaufarbenes Formazankristall, welches durch DMSO gelöst und dessen Extinktion spektral fotometrisch bei 540nm bestimmt werden kann. Die Höhe der Extinktion ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und zur eingesetzten Zellzahl [62].

Bei dem MTT-Assay handelt es sich um ein bereits für viele verschiedene Zelllinien etabliertes Verfahren. Wachstumsstudien über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien waren bereits 1996 von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden [92]. Bei der Wahl der Zellkonzentration bzw. der pro Vertiefung der Mikrotiterplatten eingesäten Zellzahl griffen wir auf diese Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe zurück [18]. Zellkonzentrationen von 50.000/ml hatten sich für beide Zelllinien als optimal erwiesen. Da es ein Ziel der Arbeit war, möglichst kurz nach Beginn der Therapie auftretende Veränderungen zu messen, verkürzten wir vorübergehend zu Beginn der Arbeit die MTT-Inkubationsdauer auf eine Stunde und erhöhten gleichzeitig, um trotzdem eine ausreichend hohe Extinktion zu erreichen, die Zellkonzentration auf 500.000/ml. Im Verlauf der Arbeit wechselten wir aufgrund erster Zwischenergebnisse wieder auf 50.000 Zellen/ml und kehrten zu der vierstündigen Inkubation zurück.

### **3.3. Versuchsaufbau der Einzelversuche**

(Versuchsprotokoll im Anhang)

Der MTT Assay wurde zunächst zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Konzentrationen der Zytostatika eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen (MX-1 und S117) trypsiniert und eine Zellkonzentration von 50.000/ml eingestellt. S117 Zellen wurden noch am selben Tag in Cups, MX-1 Zellen 24 Stunden später in Mikrotiterplatten für vier Stunden mit je einer der Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe im Brutschrank behandelt. Im nächsten Schritt wurden die Zytostatika entfernt. Hierfür wurden die Cups (S117) zentrifugiert (3500 U/min, 3 Minuten; Biofuge A, Haereus), der Überstand vorsichtig dekantiert und die übrig gebliebenen Zellpellets nach Zugabe von Medium

(1ml/Cup) auf einem Thermomixer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Mikrotiterplatte eingesät (200µl/well). Bei den MX-1 Zellen wurde der Überstand nach vier Stunden vorsichtig abgesaugt und durch Medium (200µl/well) ersetzt.

Anschließend wurden die Zellen unter Standardkulturbedingungen drei Tage inkubiert. Das Tetrazoliumsalz (MTT) wurde vor Gebrauch in Aqua dest gelöst (2mg/ml), steril filtriert und in 10ml Aliquots bei -20°C gelagert (Konzentration: 414,3 mol/l bzw. 2mg/ml). Anschließend wurden von dieser Lösung zu jeder Vertiefung 25µl hinzupipettiert und die Platten für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig aspiriert und die sich gebildeten Formazankristalle mittels DMSO (100µl/well) gelöst. Die Extinktion des gelösten Formazans wurde bei 540nm am Spektralfotometer (Titerek Multiscan Plus, Flow, Irvine, UK) quantifiziert. Die Zellüberlebensrate wurde nach folgender Formel berechnet (Werte leerwertbereinigt):

$$\text{Zellüberlebensrate in \%} = \frac{\text{Mittelwert der optischen Dichte (OD) eines Testansatzes}}{\text{Mittelwert (OD) der unbehandelten Zellen}} * 100$$

Konzentrations-Wirkungskurven wurden im Grafikprogramm Graph Pad Prisma erstellt. Die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen, d.h. diejenigen Zytostatikakonzentrationen, welche eine Wachstumshemmung der behandelten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe von 50% erwarten lassen, wurden anschließend für jede Substanz einzeln errechnet. Sie werden bei der Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als äquitoxische Zytostatikakonzentrationen bewertet werden.

Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität unter und nach Zytostatikatherapie wurden die Versuche mit MX-1 Tumorzellen über die gesamte Versuchsdurchführung von der Kultur bis zur Auswertung am ELISA-Reader in Mikrotiterplatten (200µl Zellsuspension/well) durchgeführt. Für die Versuche mit S117 Tumorzellen wurde die Zellsuspension (500µl/Cup) in Eppendorfcups vorpipettiert und hierin den Zytostatika ausgesetzt. Die Behandlung der Tumorzellen (MX-1 50.000 und 500.000/ml; S117 50.000/ml) erfolgte mit je einer von vier Zytostatika in IC<sub>50</sub>-Konzentration für vier Stunden unter Standardkulturbedingungen.



Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität unter Zytostatikatherapie wurde den Zellen gleichzeitig MTT (25µl/well; 125µl/Eppendorfcup) zugesetzt. Bei den Versuchen mit MX-1 wurde nach Abschluss der Zytostatikaexposition der Überstand vorsichtig abgesaugt, bei den S117 Versuchen wurden die Cups zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die übrig gebliebenen Formazankristalle wurden in DMSO (100µl/well; 500µl/Cup) gelöst. Die Suspension der Cups (S117) wurde für die Auswertung am ELISA-Reader wiederum in Mikrotiterplatten pipettiert (100µl/well). Die Messung erfolgte bei 540nm am Spektralfotometer.

Um die Stoffwechselaktivität nach Beendigung der Zytostatikaexposition zu beurteilen, wurden die Zellen zunächst vier Stunden unter Standardkulturbedingungen mit jeweils einem Zytostatikum behandelt. Danach wurde der Überstand entfernt und durch frisches Medium ersetzt. S117 Tumorzellen wurden nach erneutem Resuspendieren als Triplets in vorbereitete 96-well Mikrotiterplatten eingesät (200µl/well). Beide Zelllinien wurden für 24, 48 und 72 Stunden im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Am Tage der Messung folgte die vierstündige Inkubation mit MTT-Reagenz (25µl/well). Im Anschluss wurde bei beiden Versuchsreihen der Überstand wiederum aspiriert, das Formazan in DMSO (100µl/well) gelöst und die Extinktion bei 540nm am Spektralfotometer gemessen.

Bei jedem Versuch führten wir parallel eine Kontrollgruppe unbehandelter Tumorzellen und einen Leerwert mit. Ein Versuchsansatz bestand aus jeweils drei gleich befüllten Vertiefungen. Die Messergebnisse wurden nach Abzug des Leerwerts in Relation (treated/control (TC) -ratio) zueinander gewertet.

## **4. Zytostatika**

### **4.1. verwendete Zytostatika**

- **Chloracetaldehyd** (CAA; Aldrich Chemical Co., Steinheim, Deutschland)
- **Melphalan** (Alkeran® 50; Wellcome GmbH, Burgwedel, Deutschland)

Die folgenden drei Substanzen wurden uns freundlicherweise von Dr. J. Pohl (ASTA Medica AG, Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

- **4-Hydroxyperoxy-Ifosfamid:** 3- (2-chlorethyl)-2- ((2-chlorethyl) amino) tetrahydro-2-oxid-2 H-1, 3, 2-oxazaphosphorin-4-yl-hydroperoxid (4-OOH-IFO)
- **MAfosfamid:** cis-2- (bis (-2-chlorethyl) amino) tetrahydro-2-oxid-2 H-1, 3 ,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio-ethansulfonsäure, Cyclohexylaminsalz; Molekulargewicht: 500,5 (MAFO)

## 4.2. Zytostatika-Zubereitung

CAA wurde vor dem Gebrauch in 0,9% NaCl (CO<sub>2</sub> begast), 4-OOH-IFO, MAFO und Melphalan in RPMI 1640 Medium aufgelöst. Die so angefertigten Stammlösungen hatten eine Konzentration von 400µmol/l. 4-OOH-IFO zerfällt im Medium spontan zu 4-Hydroxy-Ifosfamid (4-OH-IFO) ([61]). Bei der Verstoffwechslung von MAFO entstehen in äquimolar Mengen 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (4-OH-CP) und Mesna.

## 4.3. Aufbereitung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen

IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der Zytostatika MAFO, CAA und 4-OOH-IFO waren für S117 Tumorzellen von unserer Forschungsgruppe bereits zuvor bestimmt und teilweise veröffentlicht worden [18]. Wir beschränkten uns darauf, ihre Aktualität in Einzelversuchen stichprobenartig zu revalidieren. Nach der Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen wurden Standardverdünnungsschemata erstellt. Da wir die 100µl/well bzw. 500µl/well Zytostatikum jeweils zu den 100µl/well bzw. 500µl/well Zellsuspension hinzupipettierten (1:1 Verdünnung), wurde die doppelte IC<sub>50</sub>-Konzentration hergestellt und eingesetzt.

## 5. Biometrie

Zum Vergleich der Ergebnisse wurde der Mann-Whitney U Test benutzt.

### III. Ergebnisse

#### 1. Etablierung des BrdU-Assays

Zu Beginn der Arbeit wurden in Vorversuchen die Zellzahl, die Inkubationsdauer der Zytostatika sowie die einzelnen Arbeitsschritte des BrdU-Assays so aufeinander abgestimmt, dass eine ungestörte Proliferation der Zellen über den gewählten Zeitraum angenommen werden konnte. Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit des Assays auf die Tumorzelllinien geprüft und insbesondere eine unspezifische Kreuzreaktivität der Anti-BrdU-Antikörper mit den Tumorzellen ausgeschlossen.

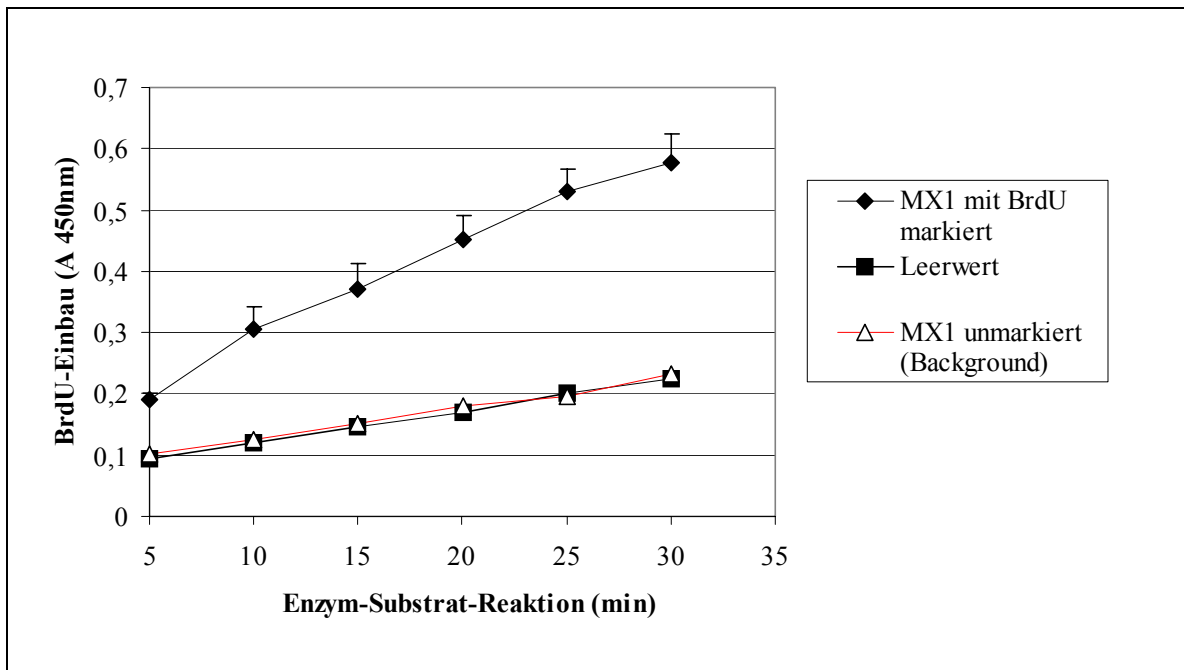


Abb. 4: Absorption mit BrdU-markierter und unmarkierter MX-1 Tumorzellen (50.000/ml) sowie des Leerwertes nach einstündiger BrdU-Inkubation

Abb. 4 zeigt einen deutlichen Extinktionsunterschied zwischen den mit BrdU markierten und den unmarkierten Zellen (Background). Die Kurven des Backgrounds und des Leerwertes (mit BrdU und Antikörpern inkubiertes zellfreies Medium) verlaufen identisch, sodass eine unspezifische Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber anderen Zellbestandteilen ausgeschlossen werden kann. Die Absorption verhält sich linear zu der Dauer der Enzym-Substrat-Reaktion. Die Tumorzelllinie MX-1 ist somit für Untersuchungen mit dem BrdU-Assay geeignet. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit S117 Tumorzellen erzielt (s. Anhang Abb. 16).

Bei der Betrachtung der Enzym-Substrat-Reaktion im Lichtmikroskop fiel eine ausschließlich in Projektion auf den Zellkern lokalisierte Indikatorfärbung auf. Das Zytoplasma inklusive der Zellorganellen blieb farblos. Hinweise auf einen BrdU-Einbau in extranukleäre RNA fanden sich nicht.

### **1.1. Standardisierung der BrdU-Inkubationszeiten**

Der Fragestellung meiner Arbeit entsprechend wurde versucht mit einer minimalen BrdU-Inkubationsdauer zu arbeiten, um möglichst frühzeitig die Zytostatika induzierten Veränderungen der Zellproliferation aufzeigen zu können. Deshalb wurden bei MX-1 Tumorzellen Vorversuche mit unterschiedlicher BrdU-Inkubationsdauer (einer halben, einer und zwei Stunden) an verschiedenen Zeitpunkten der Enzym-Substrat-Reaktion durchgeführt (s. Anhang Abb. 15). Es zeigte sich eine Absorptionzunahme in Abhängigkeit von der BrdU-Inkubationsdauer. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine BrdU-Inkubationsdauer von einer Stunde und eine zehnminütige Enzym-Substrat-Reaktion als Standard für die nachfolgenden Versuche gewählt. Das bedeutet, dass die früheste Beurteilung der Zytostatika-Wirkung erst nach einstündiger Behandlungsdauer erfolgen konnte. Versuche mit S117 Tumorzellen wurden nach Abschluss der Versuchsreihe mit MX-1 Tumorzellen durchgeführt. Ausgehend von den zu diesem Zeitpunkt bereits gewonnenen Ergebnissen wurde der Versuchsumfang reduziert und auf eine einzelne Messung am Ende der vierstündigen Zytostatikaexposition beschränkt. Parallel zu der Versuchsdurchführung des MTT-Assay wurde eine BrdU-Inkubationszeit von vier Stunden gewählt. Mit einer zehnminütigen Enzym-Substrat-Reaktion wurden ausreichend hohe Absorptionswerte erreicht (s. Anhang Abb. 16).

### **1.2. Wachstumskinetiken der MX-1 und S117 Tumorzellen**

Anhand von Wachstumskinetiken konnte über drei Tage für MX-1 Zellen bei einer initialen Zellkonzentration von 50.000/ml orientierend eine ungestörte Proliferation durch eine Absorptionzunahme in Abhängigkeit zur Kulturdauer dokumentiert werden (Abb. 5). Hinweise auf eine Dichteinhibition oder einen Nährstoffmangel lagen nicht vor. Bei den S117 deutete sich dagegen bei einer Zellkonzentration von 50 000/ml eine Plateaubildung ab. Bei einer Zellkonzentration von 100 000/ml nahm aber unerwartet die Absorption über

72 Stunden trotzdem zu. Hier dokumentierten sich möglicherweise vor allem Zellkultur bedingte Probleme bei der Versuchsdurchführung mit S117, welche nicht durch die Wahl der Zellkonzentration verursacht worden waren. Für die Versuchsdurchführung über drei Tage standardisierten wir hieraufhin die Zellkonzentration für beide Tumorzelllinien auf 50 000/ml.

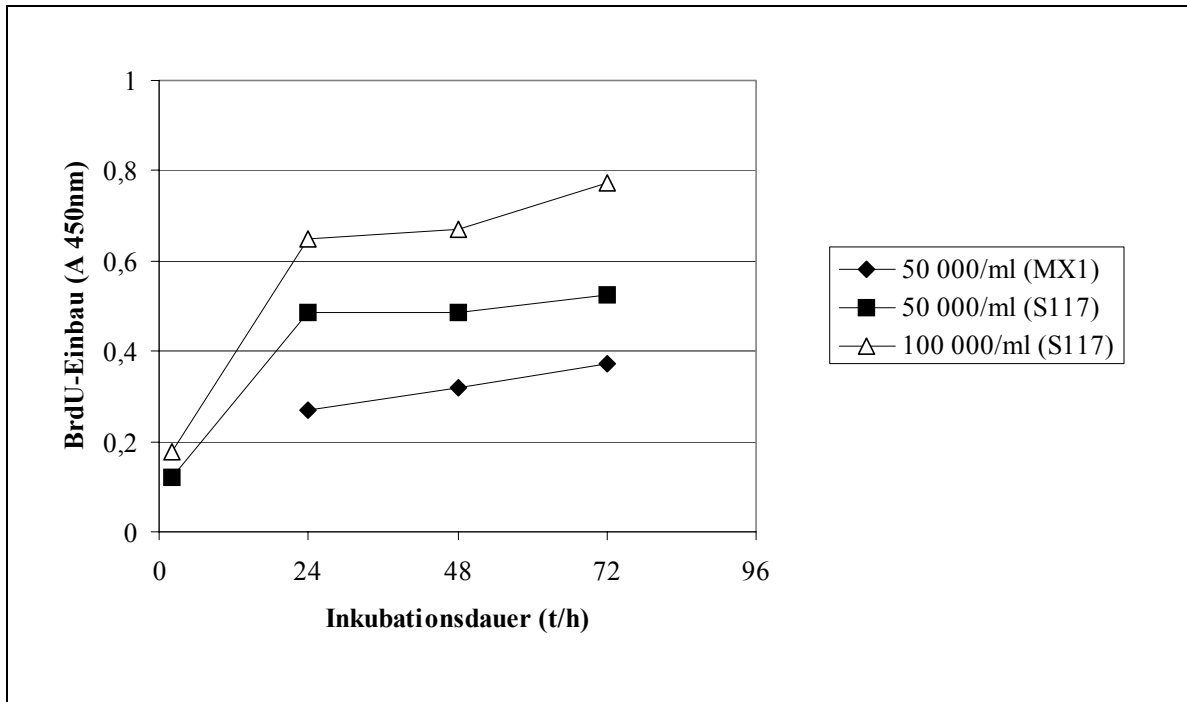


Abb. 5: Absorption in Abhängigkeit von der initial eingesetzten Zellkonzentration und der Inkubationsdauer (0-3 Tage) der Zellen: S117 Zellen in Eppendorfcups (2hBrdU/10min E-S-R), MX-1 Zellen in Mikrotiterplatten (2hBrdU Einbau/10min E-S-R)

In Wachstumskinetiken über vier Stunden am Tag1 der Versuche konnte für MX-1 (Zellkonzentrationen von 50.000 und 500.000/ml) ebenfalls eine Zunahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Dauer des BrdU-Einbaus als Hinweis auf eine ungestörte Zellproliferation gezeigt werden (Abb. 6).

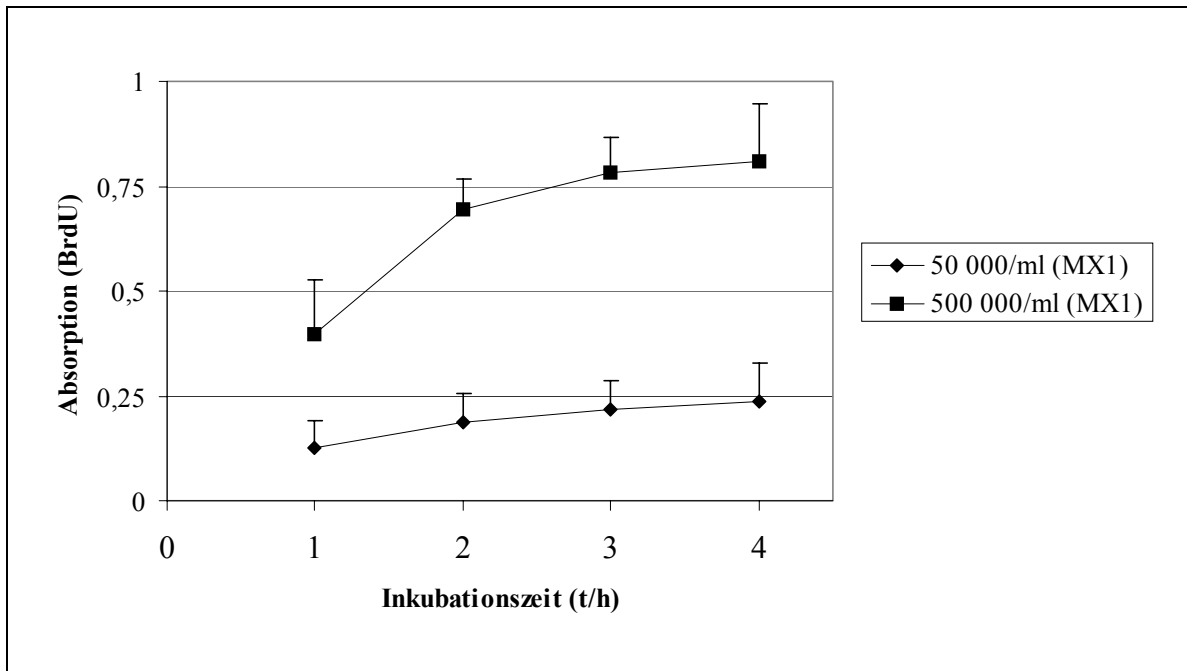


Abb. 6: Absorption in Abhängigkeit von der initial eingesetzten Zelldichte (50.000 und 500.000 Zellen/ml) und der Inkubationsdauer (1-4h): MX-1 (1hBrdU/10min E-S-R)

## 2. Ermittlung äquitoxischer Zytostatikakonzentrationen

Um eine Vergleichbarkeit der mit den vier verschiedenen Zytostatika gewonnenen Ergebnisse zu erreichen, mussten zunächst Zytostatikakonzentrationen bestimmt werden, welche bei konstanter Behandlungsdauer an einem von uns definierten Zeitpunkt (drei Tage) zu einer vergleichbaren Wachstumshemmung führten; nachfolgend als äquitoxische Zytostatikakonzentrationen bezeichnet. Unterschiedliche Halbwertszeiten oder andere die Pharmakokinetik bestimmende Faktoren konnten nicht berücksichtigt werden. Unter Beachtung der von unserer Arbeitsgruppe in Patientenserum bestimmten Halbwertszeiten von CAA und 4-OH-IFO [18] wurde die maximale Inkubationsdauer der Zytostatika auf vier Stunden limitiert.

Zur Bestimmung der äquitoxischen Zytostatikakonzentrationen wurden mithilfe des MTT-Assays 72 Stunden nach vierstündiger Zytostatikainkubation Wachstumskurven erstellt. Anschließend wurden die Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) berechnet, welche eine Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle von 50% der behandelten Zellen bewirkt hatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Tab. 1). S117 Sarkomzellen zeigten gegenüber allen vier Chemotherapeutika eine im Vergleich zu den MX-1 Zellen deutlich geringere Chemosensitivität.

Tab. 1: ermittelte IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der Zytostatika für MX-1 und S117

Zytostatika	IC <sub>50</sub> - Konzentration (µmol/l)	
	MX-1	S117
Mafosfamid	8,61	18,67
Melphalan	68,95	114,51
CAA	7,48	9,25
4-OH-IFO	15,00	25,79

### 3. Verhalten der Tumorzellen unter Zytostatikatherapie

Der erste Teil der Versuchsreihe untersuchte das Zellverhalten im BrdU- und MTT-Assay während der Zytostatikatherapie über die ersten vier Stunden. Alle eingesetzten Substanzen bewirkten innerhalb dieses kurzen Zeitraumes eine Abnahme des BrdU-Einbaus. Nur für CAA konnte allerdings eine signifikante Reduzierung des BrdU-Einbaus innerhalb der ersten Stunde gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). CAA, Mafosfamid und 4-OH-IFO reduzierten den BrdU-Einbau im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nach vier Stunden um 50%. Melphalan bewirkte dagegen im gleichen Zeitraum lediglich eine Abnahme des BrdU-Einbaus um etwa 25%. (Abb. 7).

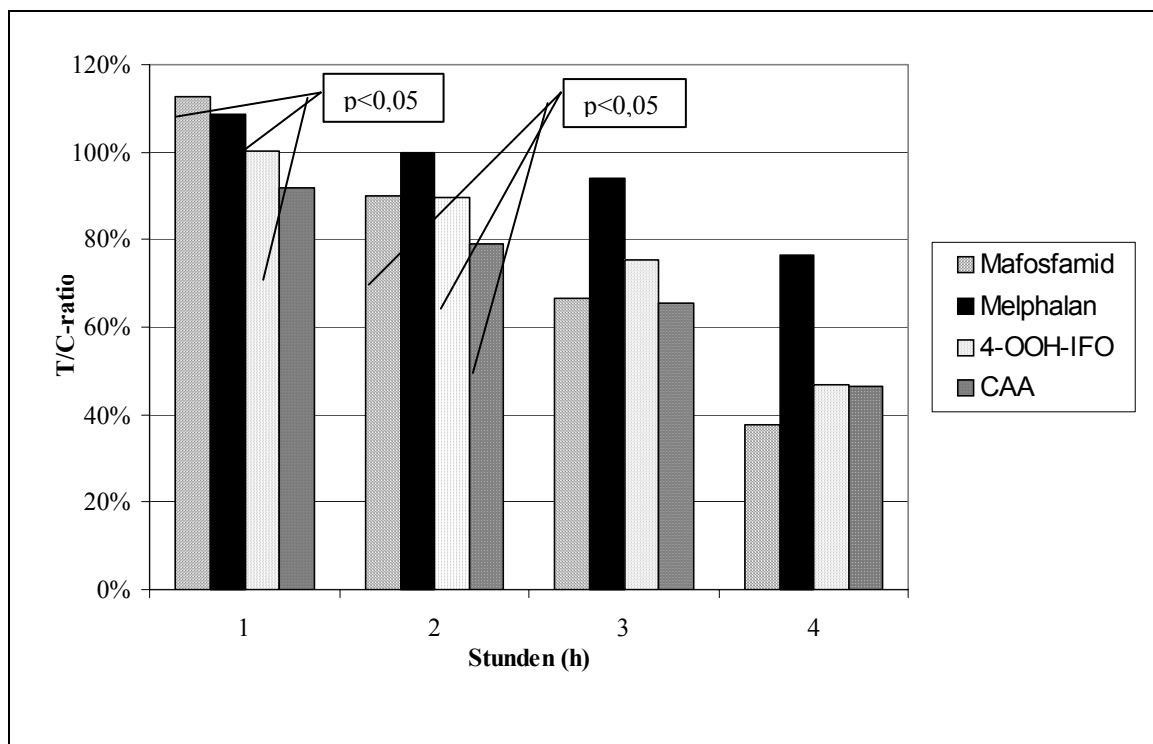


Abb. 7: relativer BrdU-Einbau unter Zytostatikatherapie: MX-1 Tumorzellen, 50.000/ml

Im MTT-Assay konnte weder nach vier- noch nach sechsständiger Zytostatikainkubation eine signifikante Veränderung der MTT-Verstoffwechslung im Sinne einer Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 8).

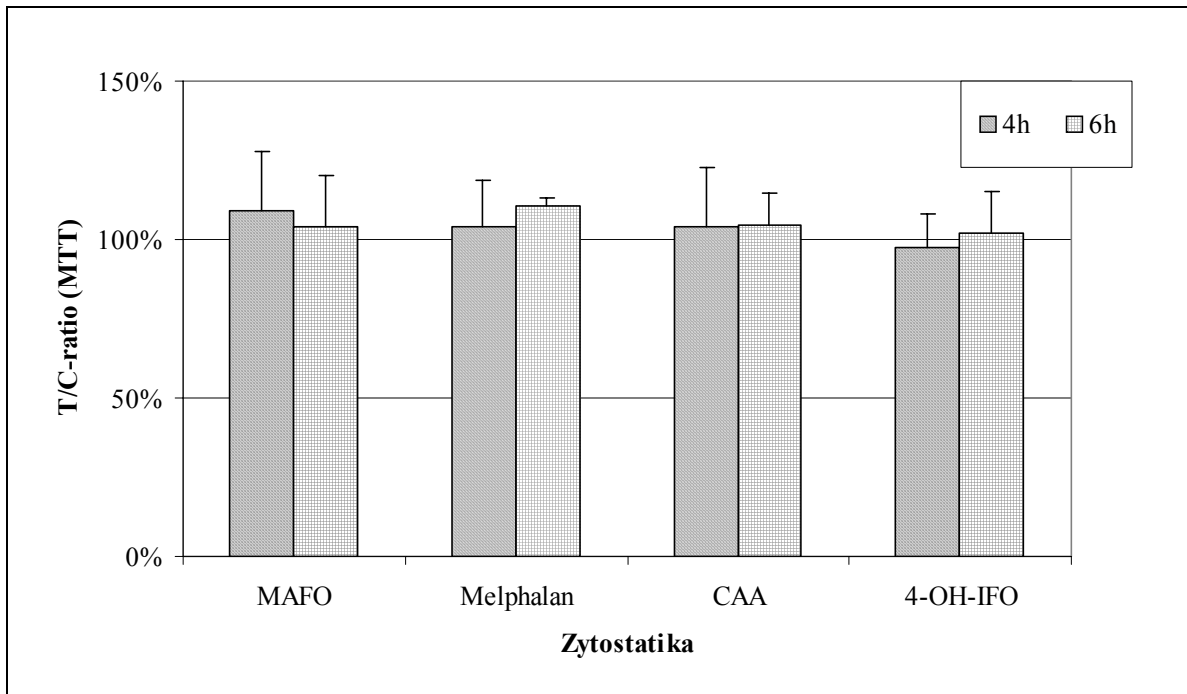


Abb. 8: relative MTT-Verstoffwechslungsrate während einer vier- und sechsständigen Zytostatikatherapie: MX-1

Bei der Gegenüberstellung der Versuche mit MX-1 Zellen muss berücksichtigt werden, dass die Messung der Stoffwechselaktivität (MTT) über einen Zeitraum von vier Stunden erfolgte, während die Originaldaten des BrdU-Assays im Abb. 7 nur das Verhalten der MX-1 Tumorzellen in der jeweils letzten Stunde der Zytostatikainkubation wiedergeben. Um diesen Unterschied in der Versuchsdurchführung auszugleichen, wurde zusätzlich eine BrdU-Einbaurrate (T/C-ratio) über vier Stunden errechnet (die einzelnen T/C-ratios der Messpunkte 1, 2, 3 u. 4h wurden hierfür aufsummiert und durch 4 dividiert.). Auch bei dieser Darstellung wird nur der BrdU-Einbau und nicht die MTT-Verstoffwechslung von allen vier Substanzen behindert, wobei Melphalan weiterhin die geringste Reaktion hervorrief (Abb. 9).



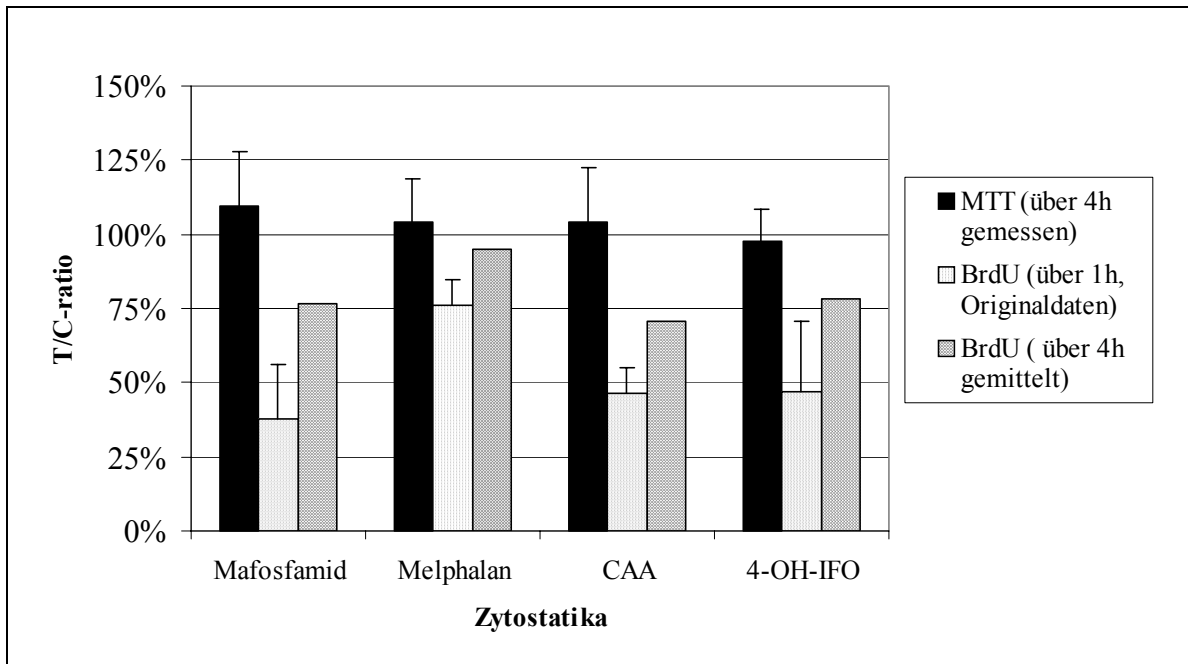


Abb. 9: Vergleich der BrdU-Einbauraten und der MTT-Verstoffwechslungsrate während vierstündiger Zytostatikainkubation: MX-1

Für S117 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. CAA beeinflusste als einzige Substanz bereits während der Zytostatikaexposition signifikant die DNA-Synthese. Der BrdU-Einbau wurde innerhalb dieser Zeitspanne um 46% gesenkt ( $p < 0,05$ ). Die Inkubation mit Melphalan führte dagegen sogar zu einer signifikanten Zunahme des BrdU-Einbaus als möglichen Hinweis auf Reparaturmechanismen (Abb. 9). Im MTT-Assay wurden keine Veränderungen im Zellverhalten dokumentiert.

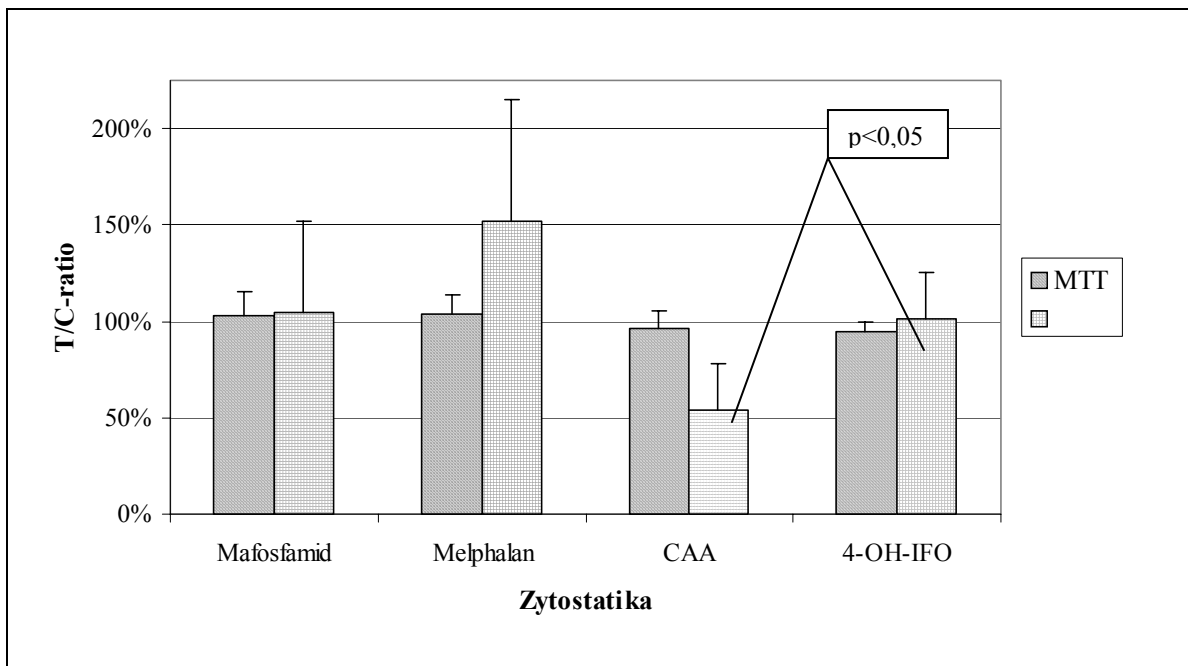


Abb. 10: Vergleich der BrdU-Einbauraten und der MTT-Verstoffwechslungsrate während vierstündiger Zytostatikainkubation: S117

Eine Beeinflussung des Zellverhaltens durch Zytostatika, welche sich zeitlich gesehen zuerst im MTT-Assay und später im BrdU-Assay dokumentierte, konnte für beide Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Arbeitshypothese, dass CAA primär die Stoffwechsellistung der Zellen beeinflusst, fand keine Bestätigung. CAA stört genauso wie die anderen drei Referenzzytostatika die Zellproliferation auf Ebene der DNA-Synthese. Es scheint sich dabei aber unter Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufs der Zellschädigung doch im Wirkmechanismus von ihnen zu unterscheiden.

#### **4. Verhalten der Tumorzellen nach Abschluss der Zytostatikatherapie**

Der zweite Teil der Versuchsreihe untersuchte die Auswirkungen auf den BrdU-Einbau und die MTT-Verstoffwechsellung nach Abschluss der vierstündigen Zytostatikatherapie. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Zytostatikaexposition wurde bei allen vier Substanzen eine BrdU-Einbaurrate von 53-66% beobachtet. Alle vier Substanzen führten zu einer weiteren Reduktion des BrdU-Einbaus. Während das CAA im Vergleich zu den übrigen drei Substanzen direkt unter Zytostatikaexposition die größte Absorptionsabnahme bewirkte, verursachte es 24 Stunden nach Abschluss der Behandlung die geringste Hemmung des BrdU-Einbaus. Dieser Trend setzte sich fort. 72 Stunden nach Abschluss der Zytostatikainkubation führte das CAA im Vergleich zu den anderen drei Zytostatika zu einer um 20% geringeren Wachstumshemmung ( $p < 0,05$ ). Das Zellverhalten unter Melphalan, Mafosfamid und 4-OH-IFO variierte gleichzeitig nur unwesentlich (Abb. 11). Bei der Auswertung der Ergebnisse, welche mithilfe des MTT-Assays gewonnen wurden, zeigte sich für alle vier Substanzen 24 Stunden nach Abschluss der Behandlung eine Abnahme der Stoffwechselaktivität. Hinweise auf Unterschiede bezüglich der Toxizitäten der vier Substanzen fanden sich bei dem Vergleich der Kurvenverläufe über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht. Insbesondere konnte für die mit CAA behandelten Zellen kein abweichendes Verhalten beobachtet werden. 72 Stunden nach Abschluss der Zytostatikaexposition, also zu dem Zeitpunkt, an dem im MTT-Assay die  $IC_{50}$ -Konzentration ermittelt worden war, wurde im MTT-Assay, wie auch zu erwarten, wiederum eine Wachstumshemmung von 50% gemessen (Abb. 12). Im BrdU-Assay dokumentierte sich zu dem gleichen Zeitpunkt eine Wachstumshemmung, welche für alle vier Substanzen mit 12-35% deutlich höher lag.

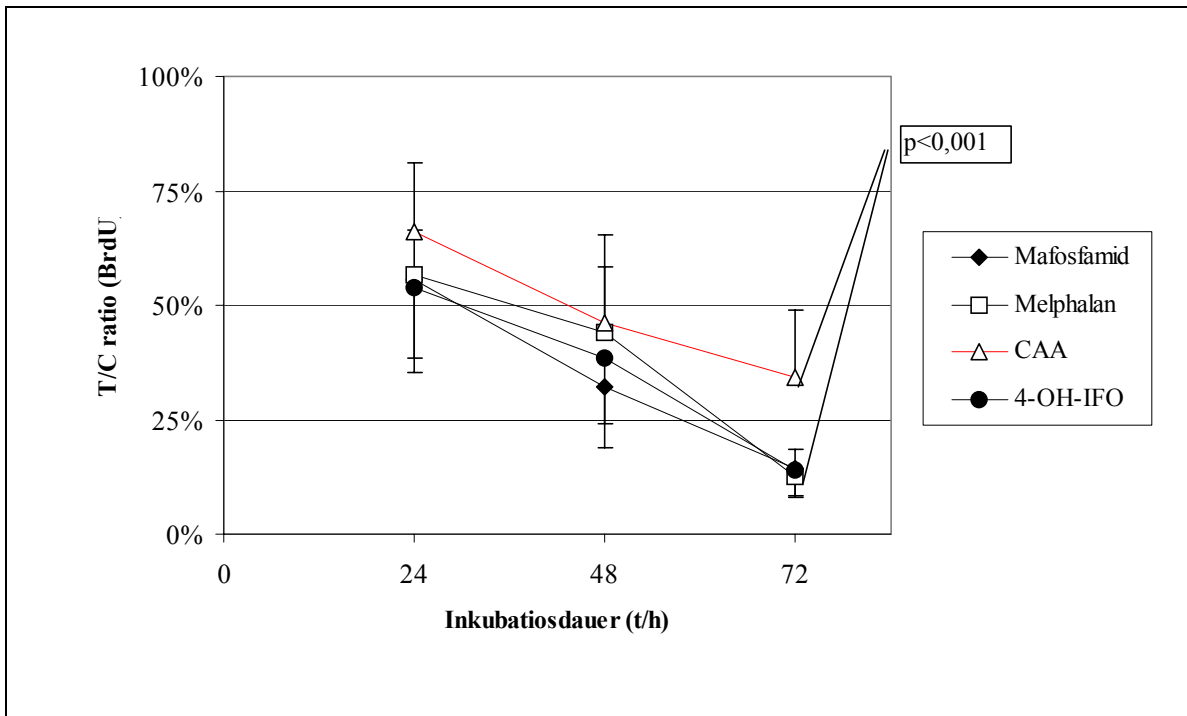


Abb. 11: BrdU-Einbau nach vierstündiger Zytostatikainkubation im Verlauf über drei Tage: MX-1 Zellen

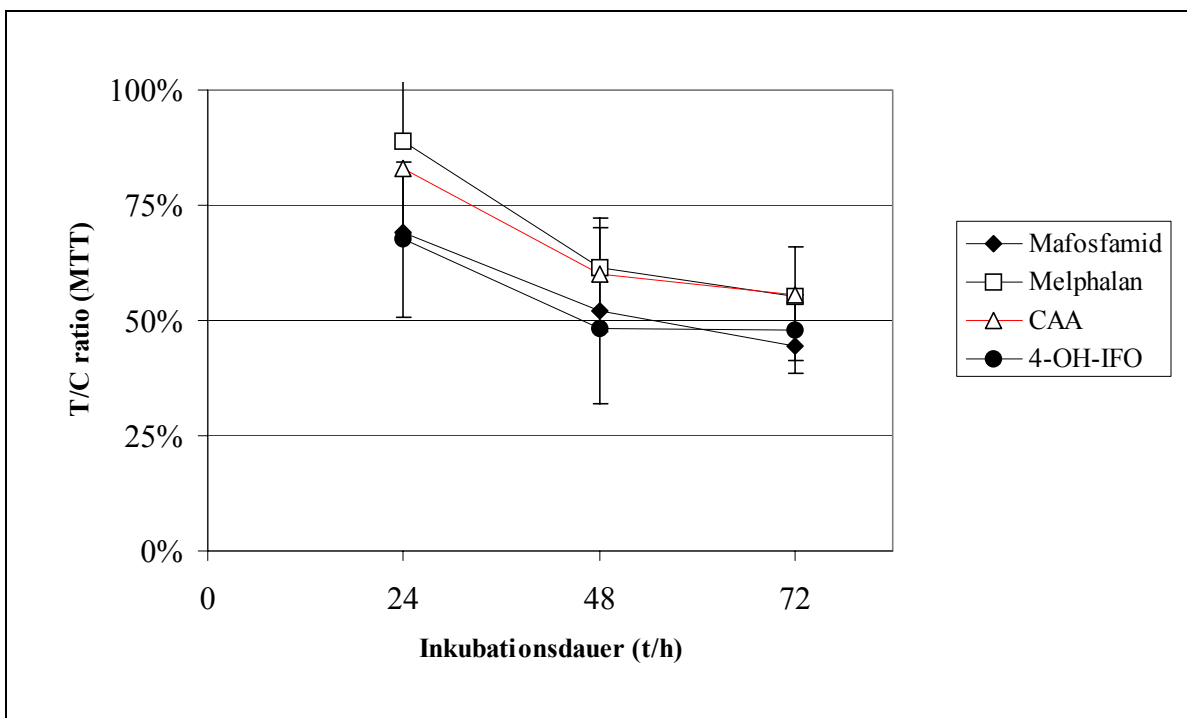


Abb. 12: MTT-Verstoffwechslungsrate nach vierstündiger Zytostatikainkubation im Verlauf über drei Tage: MX-1 Zellen

## IV. Diskussion

Oxazaphosphorine werden bei der Behandlung maligner Erkrankungen regelmäßig eingesetzt. Ein Metabolit der Oxazaphosphorine Ifosfamid und Cyclophosphamid ist das CAA [66;67]. Seine klinische Bedeutung wurde zunächst nur in seiner Nephro- und Neurotoxizität gesehen [3;31;52]. Mit dem Nachweis einer eigenständigen Zytotoxizität auch in klinisch relevanter Konzentration, durch unsere Arbeitsgruppe zunächst unter in vitro Bedingungen [18], später am Mausmodell [11], stellte sich die Frage nach der Art seines Wirkmechanismus. Da CAA und sein Alkohol, das Chloroethanol, als Metaboliten des Polyvinylchlorids in der chemischen Industrie {Richardson, 1975 553 /id;Freon, 1991 321 /id} ein breites Vorkommen aufweisen, standen beide Substanzen bereits wiederholt im Mittelpunkt von Forschungsarbeiten. Eine Übertragung der mit Chloroethanol gewonnenen Ergebnisse ist im Allgemeinen dabei möglich, da CAA via  $\text{NADH}^+$ -abhängiger Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen aus Chloroethanolen gebildet wird [44;80]. Im direkten Vergleich erwies sich CAA dabei allerdings 10-70mal toxischer als das Chloroethanol [80]. In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wurden bereits unterschiedliche Wirk- bzw. Schädigungsmuster der beiden Substanzen diskutiert. Ihre Mutagenität [4;41;57;59;72] und Kanzerogenität [53] wurden schon 1975/1976 beschrieben. Die weitere Differenzierung der genetischen Schäden führte später zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen [20] sowie DNA-Protein- und interstrand cross-links infolge einer Alkylierung der DNA [48;51;57;81]. Erste Hinweise auf einen zweiten Schädigungsmechanismus mit direkten Auswirkungen auf den Energiehaushalt der Zellen dokumentierten Ebina et al. 1980, als sie an isolierten Rattenlebermitochondrien eine Abnahme des ATP-Spiegels und gleichzeitig eine Stimulation der mitochondrialen Atmung unter Chloroethanol-Exposition nachwiesen. Später stellten sie anhand weiterer Forschungsergebnisse die Hypothese auf, dass das Chloroethanol eine Leckage der Protonen aus dem extra- in den intramitochondrialen Raum an der inneren Mitochondrienmembran hervorruft. Der ATP-Abfall wäre somit die direkte Folge einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung [32]. Diese Theorie Ebinas wurde später von Bhat et al. bestätigt. Sie lokalisierten die Störung vor dem Komplex II der Atmungskette [8]. Vergleichbare zytotoxische Effekte für CAA wiesen Sood et al. an isolierten Rattenhepatozyten nach [79].

Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich uns die Frage, welches der soeben beschriebenen Schädigungsmuster das CAA auf Tumorzellen ausübt. Hierzu stellten wir die Arbeitshypothese auf, dass CAA in klinisch relevanter Konzentration primär direkten Einfluss auf den Energiehaushalt von Tumorzellen nimmt. Diese Theorie sollte ihre Bestätigung finden, falls eine Beeinflussung des Zellmetabolismus mittels MTT-Assay nachweisbar würde, bevor sich eine DNA-Synthese-Störung im BrdU-Assay zeigen würde. Eine Störung der mitochondrialen Funktion im Sinne einer ATP-Depletion mit klinisch relevanter CAA-Konzentration konnte auch nach vierstündiger CAA-Inkubation durch die vorliegende Arbeit nicht dokumentiert werden. Gleichzeitig bewirkte CAA aber bereits in den ersten zwei Stunden eine Störung der DNA-Synthese. Die oben genannte Arbeitshypothese fand somit keine Bestätigung. CAA störte in klinisch relevanter Konzentration primär die DNA-Synthese.

Die Ergebnisse Soods und Ebinas, welche eine sehr frühe Störung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung bzw. des Sauerstoffverbrauches bereits nach 30 bzw. 60 Minuten durch CAA dokumentiert hatten, wurden bei den beiden untersuchten Tumorzelllinien nicht reproduziert [32;79;80]. Die Ursache der divergierenden Beobachtungen könnte dabei zum einen in der Verwendung von unterschiedlichen Zelllinien bzw. Zellkompartimenten gelegen haben. Sood und Ebina führten ihre Versuche ausschließlich an Hepatozyten bzw. deren isolierten Mitochondrien und an renalen Tubuluszellen durch. Diese Zellen bzw. Zellkompartimente unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Enzymsausstattung, ihrer Stoffwechsellage, ihrer primären Funktion oder ihrer Proliferationsaktivität deutlich von Tumorzellen, welche bei Bedarf ihre ATP-Synthese auch mitochondrienunabhängig über die anaerobe Glykolyse regeln können. Hinweise auf diese Theorie hatte unsere Arbeitsgruppe bereits in Untersuchungen gefunden, als sie im Zellversuch mit CAA einen ATP-Abfall im Biolumineszenz-Assay nur dann nachweisen konnten, wenn die anaerobe Glykolyse mittels Oxamat blockiert wurde [19]. Zum anderen könnte eine Dosisabhängigkeit des Wirkmechanismus vorliegen. Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung Motrescus beschreibt auch an Tumorzellen eine ATP-Depletion sowie Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials und des Sauerstoffverbrauches durch CAA ab einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$ . Bei  $10\mu\text{M}$  blieb der Zellstoffwechsel dagegen unbeeinflusst [63]. Im Serum von mit Ifosfamid behandelten Patienten waren von unserer Arbeitsgruppe CAA-Spitzenpegel von  $14,7\mu\text{M}$  (Ifosfamid  $5\text{g}/\text{m}^2$ ) bzw.  $5\mu\text{M}$  ( $1,5\text{g}/\text{m}^2$ ) gemessen worden [18]. Die in meiner Arbeit verwendeten CAA-Konzentrationen waren mit  $7,485\mu\text{M}$  (MX-1) und  $9,256\mu\text{M}$  (S117) bewusst an die

klinische Situation angepasst worden. Sowohl die von Motrescu u.a. gewählten 50 $\mu$ M als auch die von Sood und Ebina verwendeten CAA-Konzentrationen von 200 $\mu$ M und 500 $\mu$ M liegen dagegen ein bis zwei Zehnerpotenzen höher und können hierdurch bedingt zu anderen Ergebnissen geführt haben [32;63;80].

Der Versuch, die Ursache der DNA-Synthesestörung näher zu beschreiben, führt beim näheren Vergleich der vier Substanzen untereinander zu dem Ergebnis, dass sich das CAA deutlich von den drei Alkylantien unterscheidet. Im ersten Teil der Versuchsreihe führt CAA im BrdU-Assay zu der ausgeprägtesten „Akutzytotoxizität“, als einzige Substanz führt es innerhalb der ersten Stunde zu einer Reduktion des BrdU-Einbaus. Möglicherweise zeigen sich hier nur Unterschiede in der Permeabilität der Zellmembran gegenüber den Substanzen, welche z.B. durch Unterschiede in der chemischen Struktur und in der elektrischen Ladung bedingt sein könnten. Berücksichtigt werden müssen ebenfalls Unterschiede in der „primären Reaktionsfreudigkeit“ der eingesetzten Substanzen. Während CAA keine weiteren Giftungsschritte durchlaufen muss und sofort als aktives Alkylanz auf die Zellen einwirkt, besitzen MAFO und 4-OH-IFO keine eigenständigen zytotoxischen Eigenschaften. Sie müssen in den „phosphoramid mustard“ Metaboliten umgewandelt werden, bevor sie als hoch potentes Alkylanz wirksam werden können [33;87]. Im zweiten Teil der Versuchsreihe, also nach Abschluss der Zytostatikainkubation, kehrt sich dann der Vergleich um. CAA zeigt während des gesamten Nachbeobachtungsraumes die geringste Störung im BrdU-Einbau. Nach 72 Stunden, also zu einem Zeitpunkt, an dem im MTT-Assay für alle vier Zytostatika eine 50%-Wachstumshemmung gemessen wurde, zeigte sich für CAA im Vergleich zu den übrigen Substanzen eine um 20% geringere Reduktion des BrdU-Einbaus. Die Wachstumshemmung der Oxazaphosphorine und des Melphalans lagen bei über 85%, die des CAA nur bei ca 65% ( $p < 0,005$ ). Möglicherweise zeichnen sich hier Unterschiede in der Art der DNA-Schädigung ab. Die höhere Sensitivität des BrdU-Assays im Direktvergleich mit dem MTT-Assay [5;56;89] kann dabei nur einen Teil der Ergebnisse erläutern, das abweichende Verhalten der Tumorzellen unter CAA-Inkubation erklärt es nicht. Eine mögliche Theorie ist, dass in der mit CAA behandelten Zellreihe durch den BrdU-Assay vermehrt DNA-Reparaturvorgänge erfasst werden, welche dann nicht im MTT-Assay zu einem gesteigerten Zellüberleben führen. Die Tatsache, dass mit dem BrdU-Assay neben der DNA-Neusynthese auch Reparaturvorgänge erfasst werden, ist bekannt [6;25;34;68;74]. Diese sehr ausgeprägte Induktion von Reparaturmechanismen

könnte durch die Art der gesetzten DNA-Schäden verursacht sein, welche sich von denen der übrigen Alkylantien zu unterscheiden scheint. Eine wesentliche Bedeutung in diesem Zusammenhang könnte in der Ausbildung von cross-links liegen, welche nicht leicht repariert werden können. Während für Mafosfamid, Melphalan und 4-OH-Ifosfamid Veröffentlichung bezüglich einer Crosslinking Aktivität vorliegen [22;39;65], wies unsere Arbeitsgruppe im Comet-Assay diese für CAA nicht nach; lediglich die Ausbildung von Einzelstrangbrüchen wurde beobachtet [19].

Bei der genaueren Untersuchung der Interaktionsmöglichkeiten auf DNA-Ebene wurden zudem vor kurzem Replikationstörungen nachgewiesen, welche auch den durch die Alkylierung nicht beschädigten DNA-Strang betreffen [50]. Die Bedeutung und Art dieser Schäden ist bislang nicht weiter untersucht. Sie könnte aber ebenfalls bei der Interpretation des abweichenden Verhaltens der Tumorzellen unter und nach CAA-Inkubation weiterhelfen.

In diesem Zusammenhang soll zusätzlich die abweichende Wirkung des Melphalans diskutiert werden. Im Gegensatz zu den Oxazaphosphorinmetaboliten nimmt der BrdU-Einbau sowohl während der Behandlung als auch in den folgenden 72 Stunden kontinuierlich ab. Auch die „Akuttoxizität“ des Melphalans fällt deutlich geringer aus. Innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden kann überhaupt keine Veränderung des Zellverhaltens im BrdU-Assay dokumentiert werden. Nach vier Stunden war der BrdU-Einbau erst um 25% abgefallen. CAA, 4-OH-IFO und MAFO hatten gleichen Zeitpunkt eine ca. 50% Reduktion der BrdU-Inkorporation bewirkt. Auch können zytostatikainduzierter Reparaturmechanismen miterfasst worden sein. Da in der Literatur für Melphalan eine Störung im Wachstumsverhalten bereits nach einstündiger Inkubation beschrieben ist [91], erscheint eine verzögerte Proliferationshemmung als Ursache des abweichenden Zellverhaltens unter Melphalan unwahrscheinlich. Auch in meinen Versuchen muss innerhalb der ersten Stunden eine Wachstumshemmung angenommen werden, deren Darstellung aber aufgrund intensiver und sehr früher Reparaturmechanismen misslingt.

Gibt es nun ergänzend noch weitere methodische Probleme zu diskutieren, welche die Aussagefähigkeit der o.g. Ergebnisse möglicherweise einschränken? Ergebnisse über eine parallele Verwendung der beiden Assays zur vergleichenden Beurteilung von Einflüssen auf die Zellproliferation und die Stoffwechselaktivität von Zellen liegen in der Literatur

vor [47;85]. Bei der weiteren Literaturrecherche fand sich ein Artikel, welcher Wechselwirkungen zwischen BrdU und Cisplatin sowie Chlorambucil mit konsekutiver Wirkungsverstärkung beschrieb [69]. Für das Melphalan hatte die Arbeitsgruppe um Russo et al. eine verstärkte Zytotoxizität nach Kombination mit einem anderen Nucleotidanalogen als dem BrdU nachweisen können [73]. Da die von mir verwendete BrdU-Konzentration mit 10µM deutlich unterhalb der BrdU-Konzentrationen der zitierten Arbeitsgruppen (50 und 250µM) lag, halte ich eine Beeinflussung der Ergebnisse für unwahrscheinlich, zumal gleichzeitig eine Dosisabhängigkeit der Wechselwirkungen nachgewiesen worden war [69;73]. Das in der vorliegenden Arbeit dokumentierte Verhalten der Tumorzellen unter Melphalan kann zudem eine Wirkungsverstärkung durch das BrdU ebenfalls nicht nachweisen.

Die vorliegende Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass die eigenständige Zytotoxizität des CAA nicht durch eine direkte Interaktion mit dem Zellmetabolismus sondern durch eine Störung auf Ebene der DNA-Synthese verursacht wird. Unsere auf den Ergebnissen Singers, Ebinas et al. basierende Vermutung, eine Substanz bei der Behandlung solider Tumoren gefunden zu haben, welche als neues Wirkprinzip direkt am Mitochondrium angreift und somit auch eine zytotoxische Wirkung auf nicht proliferierende Zellen ausüben würde, wurde nicht bestätigt.

CAA selbst findet allerdings im klinischen Alltag als eigenständiges Zytostatikum weder als Einzelsubstanz noch als Kombinationspartner in Polychemotherapieprotokollen eine direkte klinische Verwendung. Sein zytotoxisches Potential ist immer an den Einsatz des Ifosfamid gekoppelt. Welche Wechselwirkungen das CAA zusätzlich verursacht ist nicht untersucht. Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang ein kürzlich erschienener Artikel sein, welcher sich mit den verschiedenen Resistenzmechanismen der Oxazaphosphorine beschäftigt [96]. U.a. wird dabei eine verstärkte intrazelluläre Inaktivierung der aktiven Metabolite via gesteigerter Glutathion-S-Transferase Aktivität oder eine Entgiftung durch erhöhte Thiol-Spiegel diskutiert. Da CAA sowohl eine Depletion von Proteinthiolen [23] als auch eine Hemmung der Glutathion-S-Transferase verursacht [31], könnte es zu einer teilweisen Überwindung von spezifischen Resistenzmechanismen möglicherweise beitragen. Auch durch eine Glutathion-Depletion [31] könnte CAA zu einer gesteigerten Toxizität führen. Eine Abhängigkeit des sog. „multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)“ von dem intrazellulären Glutathion-Spiegel ist nachgewiesen [1;58]. CAA könnte möglicherweise die Substanz sein, welche



die fehlende Kreuzresistenz zwischen Ifosfamid und Cyclophosphamid erklärt [12]. Bei der klinischen Anwendung des Ifosfamids müssen also aufgrund der hohen Reaktionsfreudigkeit des CAA neben den direkten Auswirkungen auf den Zellorganismus auch Wechselwirkungen mit anderen Substanzen z.B. im Rahmen von Polychemotherapien angenommen werden. Welche klinische Bedeutung CAA dabei einnimmt, ist nicht untersucht. Neue Kenntnisse über die Entstehung von malignen Erkrankungen sowie in die Funktion von Resistenzmechanismen werden helfen, die Bedeutung des CAA bei der Behandlung von Tumorerkrankungen weiter aufzuklären.

Ifosfamid besitzt bei der Behandlung von Weichteilsarkomen [75] sowie anderen soliden und hämatologischen Tumorentitäten nach wie vor einen hohen Stellenwert. Die Tatsache, dass es trotz der bekannten nephro- und neurotoxischen Nebenwirkungen nicht durch alternative Therapieprotokolle mit gleicher Effizienz ersetzt werden konnte, unterstreicht den aktuellen Stellenwert dieser Substanz und verlangt somit weitere Aufklärung über die Bedeutung seiner Metabolite. Insbesondere bei der Weiterentwicklung der Oxazaphosphorine ist das Wirkprofil des CAA zu berücksichtigen. Bestrebungen das CAA aus dem (Neben) -Wirkpektrum des Ifosfamid durch Enzymmodulation herauszunehmen, was durch den Einsatz von z.B. Troleandomycin gelänge [14], müssen kritisch hinterfragt werden. In Entwicklung befindliche Methoden der Genterapie, welche eine Giftung von Muttersubstanzen gezielt in der Tumorzelle ermöglichen, könnten dagegen eine Lösung hinsichtlich der Überwindung von Resistenzmechanismen sowie der Vermeidung der Nephro- und Neurotoxizität darstellen. Bezüglich der Oxazaphosphorine liegen Publikationen über eine gesteigerte Toxizität durch den Einsatz von Genterapie vor. Durch eine gentechnisch bedingte gesteigerte Cytochrom P450 2B6 Aktivität in den Tumorzellen war eine vermehrte 4-Hydroxylierung und somit Aktivierung des IFO und des CPM erzielt worden [45]. Mithilfe der somatischen Genterapie könnte ebenfalls eine Methode entwickelt werden, welche eine auf die Tumorregion oder die Tumorzelle isolierte gesteigerte Freisetzung des CAA aus IFO bewirken und dann höhere CAA-Konzentrationen klinisch relevant werden lassen könnte. Auch die bislang nur mit deutlich höheren CAA-Konzentrationen nachgewiesenen Interaktionen mit dem Zellstoffwechsel [32;63;80] könnten dann eine klinische Bedeutung erlangen.

## V. Zusammenfassung

Nachdem eine eigenständige Zytotoxizität des Ifosfamid-Metaboliten CAA in klinisch relevanter Konzentration durch unsere Arbeitsgruppe belegt worden war, wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt, um den Schädigungsmechanismus weiter abzuklären. Sowohl Störungen auf Ebene der DNA-Synthese als auch direkte Einflüsse auf die mitochondriale Atmungskette durch CAA sind in der Literatur beschrieben. Mithilfe des MTT-Assays und des BrdU-Assays untersuchten wir das Verhalten von Tumorzellen (MX-1 und S117) unter Inkubation mit CAA bezüglich Auswirkungen auf die mitochondriale Energiegewinnung und auf die DNA-Synthese. 4-OH-IFO, Mafosfamid und Melphalan wurden als Referenzzytostatika und „klassische“ Alkylantien mitgeführt.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass CAA in klinisch relevanter Konzentration nur Schäden auf Ebene der DNA-Synthese verursacht und eine direkte Beeinflussung der mitochondrialen Energiegewinnung nicht stattfindet. Trotzdem unterschied sich seine Wirkung von der der anderen drei Zytostatika. CAA führte im direkten Vergleich zu der frühesten Störung des BrdU-Einbaus. Nach Abschluss der vierstündigen Zytostatika-Inkubation und über die folgenden 72 Stunden wiesen die mit CAA behandelten Tumorzellen dagegen die geringste Hemmung im BrdU-Einbau auf, ohne dass parallel im MTT-Assay eine erhöhte Zellüberlebensrate dokumentiert wurde. Diese Ergebnisse werden nur teilweise durch pharmakokinetische Faktoren erklärt. Zusätzlich müssen hier Unterschiede in der Art der DNA-Schäden angenommen werden. Die geringere Beeinflussung des BrdU-Einbaus nach CAA-Inkubation könnte durch eine ausgeprägte Induktion von Reparaturmechanismen erklärt werden.

Da seine „Muttersubstanz“, das Ifosfamid, bislang nicht durch besserverträgliche Substanzen ersetzt werden konnte, besteht noch wie vor eine klinische Relevanz bezüglich der Erforschung seines zytotoxischen Potenzials. Aufgrund der ausgeprägten Reaktionsfreudigkeit des CAA sollte die Beurteilung seiner klinischen Bedeutung immer hinsichtlich seiner Wechselwirkungen und dem möglicherweise daraus resultierenden Einfluss auf die Gesamttoxizität einer Polychemotherapie erfolgen. Ebenso sind Auswirkungen auf Resistenzmechanismen zu berücksichtigen. Gentherapie und „molecular targeting“ eröffnen weitere Forschungsgebiete im Hinblick auf die Bedeutung des CAA im klinischen Alltag. Eine Reduktion seines klinischen Stellenwertes auf seine Eigenschaften als Alkylanz und seine nephro- und neurotoxischen Nebenwirkungen wird der Substanz auf jeden Fall nicht gerecht und birgt das Risiko, sein zytotoxisches Potenzial zu verkennen.

## VI. Anhang

### 1. Verzeichnis der Abkürzungen

4-OH-IFO	4-Hydroxy-Ifosfamid
ATP	Adenosintri-phosphat
BrdU	Bromodesoxyuridin
CAA	Chloroacetaldehyde
CE	Chloroethanole
CPM	Cyclophosphamid
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-S-R	Enzym-Substrat-Reaktion
GSH	Glutathion
IFO	Ifosfamid
L-PAM	L-Phenyl-Alanin Mustard
MAFO	Mafosfamid
MTP	Mikrotierplatten
MTT	3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
bromide	
OD	optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
T/C-ratio	treated/control ratio

## 2. Ergänzende Abbildungen im Text beschriebener Vorversuche

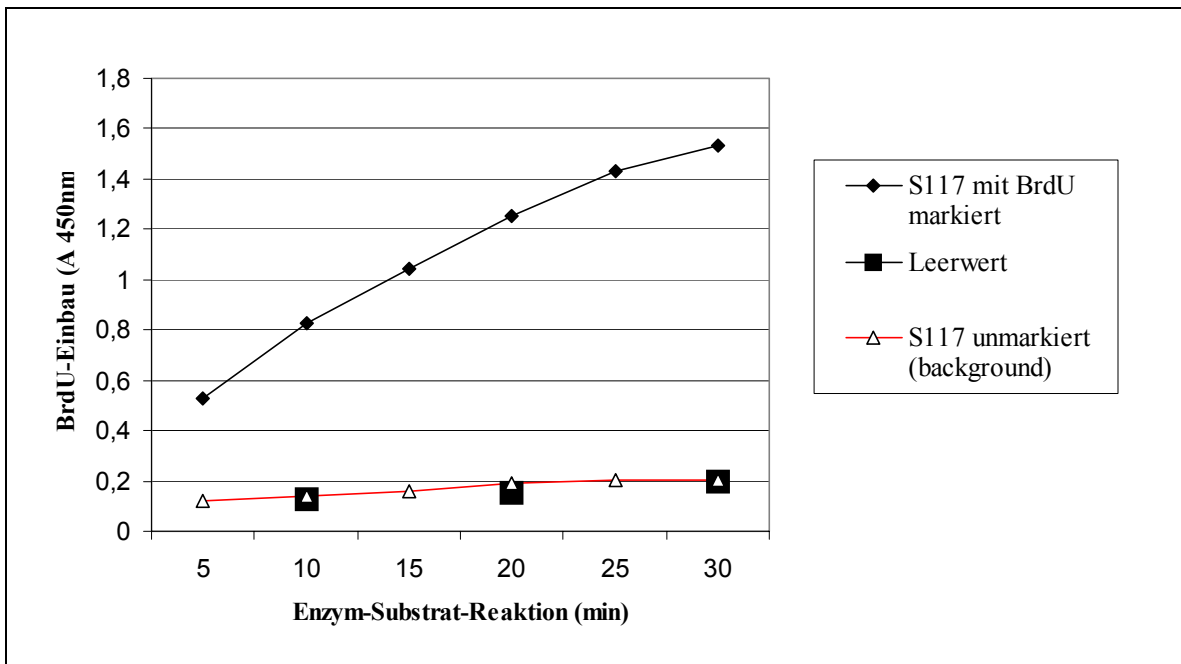


Abb. 15: Inkubation Absorption mit BrdU-markierter und unmarkierter S117 Tumorzellen (50.000/ml) sowie des Leerwertes nach zweistündiger BrdU-Inkubation

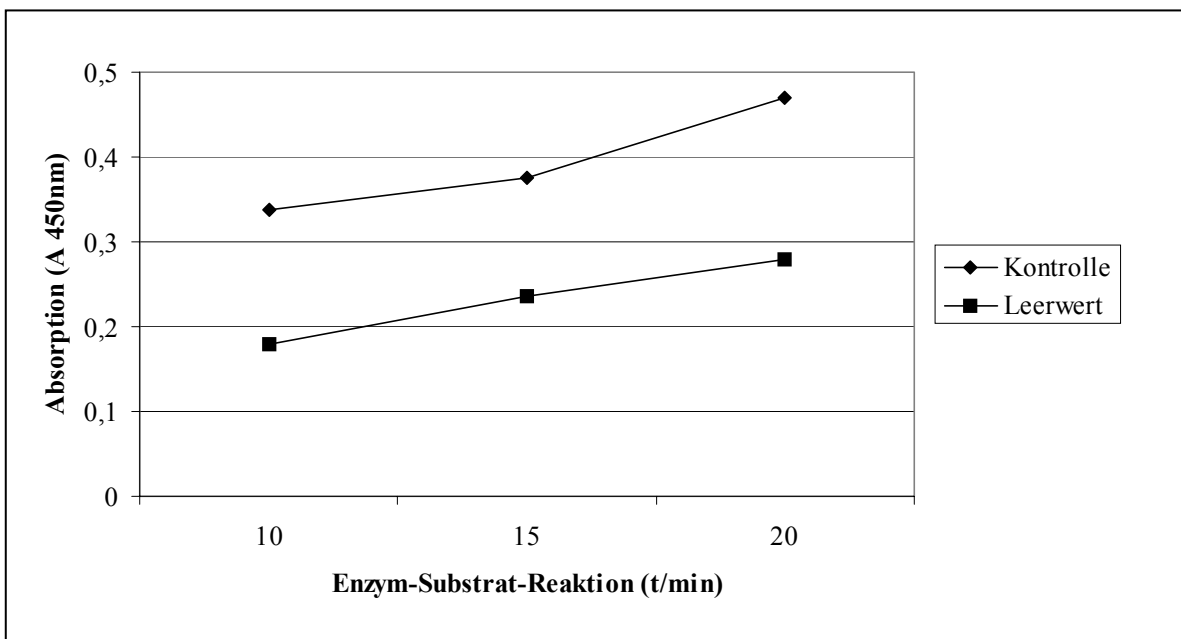


Abb. 16: Absorption in Abhängigkeit von Dauer der Enzym-Substrat-Reaktion (10, 15, 20min) bei zweistündiger BrdU-Inkubation: S117 Tumorzellen

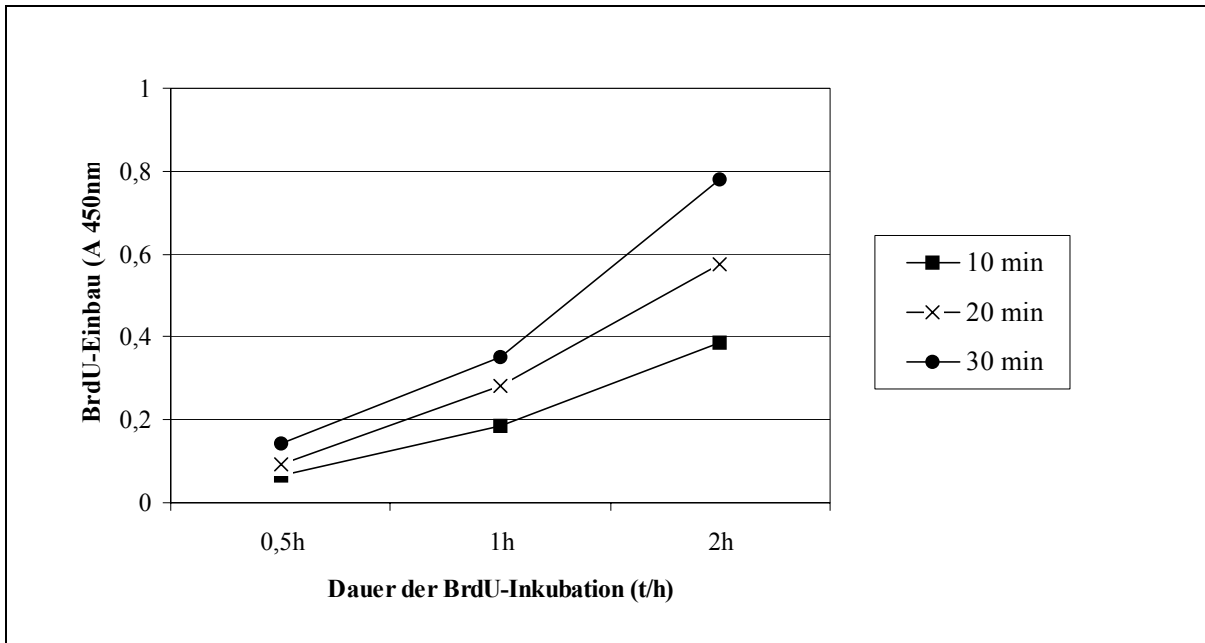


Abb. 17: Absorption in Abhängigkeit von der BrdU-Inkubationszeit und der Dauer der Enzym-Substrat-Reaktion ( 10, 20, 30 min): MX-1 Tumorzellen

### 3. Protokolle der Versuchsdurchführung

#### 4.1. MTT-Verstoffwechslung bei MX-1 Tumorzellen während und nach Behandlung mit Melphalan, Mafosfamid, CAA u. 4-OOH-Ifosfamid (in IC<sub>50</sub>-Konzentration)

Datum:

Zellpassage:

Messung nach:

Tag1 Einsäen der MX-1 Tumorzellen in MTP in der Konzentration.  $5 \cdot 10^4/\text{ml}$ . Dabei werden 100µl Zellsuspension pro well pipittiert. Für jede Zytostase, die Kontrolle und den Leerwert (100µl reines Medium) werden 3 bzw. 6 wells zur Errechnung des Mittelwertes verwendet.

Zellen hierzu abtrypsinieren und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration der Ausgangssuspension ermitteln:

4 große Felder der Neubauer-Zählkammer enthalten  $x = \dots$  Zellen  
 $x \cdot 2,5/1000 \cdot 10^6/\text{ml} = \dots \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml}$  (Konzentration der Ausgangssuspension)

#### $5 \cdot 10^4/\text{ml}$ durch Verdünnungsschritt einstellen:

Tag2

Herstellen der Zytostatikallösungen nach folgendem Schema:

	Primär hergestellte Konzentration (nmol/ml)	Verdünnungsschema bei 400nmol/ml Ausgangskonz. (Zytostat.lös. + RPMI in ml)	Endkonz. (nmol/ml) nach weiterer 1:1 Verdünnung im MTP
Mafosfamid 500,5	17,220	0,5+11,114	8,610
Melphalan	137,9	2+3,801	68,950
CAA	14,970	0,5+12,860	7,485
4-OOH-Ifosfamid	30	1+12,3	15

- hergestellte Zytostatikallösungen mithilfe einer 5-ml-Spritze und eines Millipore-Filters sterilfiltrieren
- 100µl Zytostatikallösung/well zu der Zellsuspension dazupipettieren, zu der Kontrolle und zu dem Leerwert 100µl/well reines Medium geben
- durch leichtes seitliches Beklopfen mischen
- a) für die Beurteilung des Zellverhaltens unter Zytostatikatherapie Protokoll am gleichen Tag mit „Durchführung des MTT-Assays“ fortsetzen (ohne vorher die Zytostatika zu entfernen!)
- b) für die Beurteilung des Zellverhaltens nach Zytostatikatherapie die Zytostatika nach 4h Inkubation im Brutschrank durch frisches RPMI-Medium ersetzen und die MTPs anschließend wieder in den Brutschrank zurückstellen, „Durchführung des MTT-Assay“ nach 24, 48 und 72h Zellkultur anschließen

### **Durchführung des MTT-ASSAY**

- 25µl/well MTT-Reagenz hinzupipettieren
- MTPs in den Brutschrank stellen
  - a) 4h MTT-Inkubationsdauer (parallele Inkubation des MTT mit den Zytostatika)
  - b) 4h MTT-Inkubationsdauer (nach 24, 48 und 72h Zellkultur)
- den Überstand mittels Wasserstrahlpumpe absaugen
- das Formazan mittels DMSO 100µl/well lösen
- bei 540nm im Elisa-Reader die Extinktion messen





### **Durchführung des BrdU-ASSAY**

- 20µl/well BrdU hinzupipettieren
- a) 1h BrdU-Inkubationsdauer (parallele Inkubation des BrdU mit den Zytostatika in der letzten Stunde der Zellkultur)
- b) 2h BrdU-Inkubationsdauer (nach 24, 48 und 72h Zellkultur)
- Überstand absaugen, 200µl/well FixDenat hinzugeben, für 30min bei RT stehen lassen
- in den letzten 5 min des Wartens anti-BrdU-working solution herstellen (1:100 Verdünnung),
- FixDenat absaugen und 100µl/well anti-BrdU-working solution vorpipittieren; MTPs 90 min bei RT stehen lassen
- Überstand absaugen und 3x mit 200-300µl/well washing solution spülen
- In die leeren wells 100µl/well Substrat pipittieren
- 10 min der Enzym-Substrat-Reaktion abwarten
- mittels 25µl/well H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> die Farbentwicklung abstoppen
- seitliches Beklopfen der MTP für 1 min
- anschließend sofort bei 450nm im Elisa-Reader die Extinktion messen.

**3.3. BrdU-Einbau und MTT-Verstoffwechslung bei S117 Tumorzellen während und nach der Behandlung mit Melphalan, Mafosfamid, CAA u. 4-OOH-Ifosfamid (IC<sub>50</sub>-Konzentration) in Eppendorf-Cups**

Datum:  
Zellpassage(n):  
Messung nach:

Vorbereitung:

1. acht 10-ml-Röhrchen für Zytostasenverdünnung beschriften und Zytostatikallösungen unsteril nach Verdünnungsschema (s.u. 3.Spalte) herstellen.
2. Pro Versuch werden Eppendorf-Cup- Ständer für 3\*6 Cups (steril!) benötigt. D. h. je 6 Cups (4 für die Zytostasen + 1 für die Kontrolle + 1 für den Leerwert) für den BrdU, für den MTT und für die Kontrolle der IC<sub>50</sub> Konz. am 3. Tag (MTT)
3. 3 MTPs beschriften: je eine MTP für den BrdU, den MTT und die IC<sub>50</sub>-Kontrolle

Verdünnungsschema	Primär hergestellte Konz. (nmol/ml)	Verdünnung bei 400nmol/ml Ausgangskonz. (Zytostat.lös + RPMI in ml)	Endkonz. (nmol/ml) nach weiterer 1:1 Verdünnung im E-Cup
Mafosfamid 547,5	37,342	1+9,712	18,671
Melphalan	229,022	2+1,494	114,511
CAA	18,512	0,5+10,304	9,256
4-OOH-Ifosfamid	51,586	1+6,754	25,793

Versuchsdurchführung:

Die Zellen abtrypsinieren, bei 1000U/min zentrifugieren, den Überstand vorsichtig absaugen, das zurückgebliebene Zellpellet mit ca. 7ml Medium resuspendieren, und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration dieser Ausgangssuspension ermitteln:

$$4 \text{ große Felder der Neubauer-Zählkammer enthalten } x = \frac{\text{Zellen}}{\text{Konzentration der Ausgangssuspension}}$$

$$x * 2,5 / 1000 * 10^6 / \text{ml} = * 10^6 \text{ Zellen/ml}$$

$$= * 10^4 \text{ Zellen /ml}$$

**5\*10<sup>4</sup>/ml durch Verdünnungsschritt einstellen:**

Jeweils 500µl Zellsuspension der Konz. 5\*10<sup>4</sup>/ml pro E-Cup vorpipettieren und sofort anschließend 500µl/Cup Zytostase bzw. Medium hinzugeben. Ein Cup wird als Leerwert mitgeführt (Inhalt: 1ml Medium).

Parallel:

1. Für den BrdU-Assay:

- pro Cup noch 100µl BrdU-labeling solution dazupipettieren
- Cups schließen und auf dem Rüttler kurz durchmischen
- Die Cups anschließend für 4h geöffnet in den Brutschrank stellen
- Cups schließen und die Zellen auf den Thermomixer gegeben (ca. 5min, die Zellen sollen danach vereinzelt vorliegen)
- In die vorbereitete MTP aus jedem Cup 3\*(200µl/well) Zellsuspension bzw. Leerwert „einsäen“
- Die MTP bei 300g (=1200U/min) 10min zentrifugieren und den Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- Anschließend die Zellen 15 min mittels Haarfön an den Boden der wells fixieren
- 200µl FixDenat/well vorpipettieren und 30 min bei RT inkubieren
- Überstand absaugen und 100µl/well Antikörper working-solution vorpipettieren, 90min bei RT inkubieren
- Überstand absaugen, 3\* mit 250µl/well washing-solution waschen und absaugen
- 100µl/well Substrat-solution pipettieren und 5(-10) min inkubieren (je nach Farbentwicklung)
- mit 25µl/well 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Enzym-Substrat-Reaktion abstoppen, durch seitliches Beklopfen gut mischen (1min)
- bei 450nm im ELISA-Reader die Extinktion messen.

2. Für den MTT-Assay:

- pro Cup noch 125µl MTT-Reagenz dazupipettieren
- die Cups schließen und auf dem Rüttler kurz durchmischen
- die Cups für 4h geöffnet in den Brutschrank stellen
- die Cups in der Heraeus Biofuge A bei 3500U/min 3min zentrifugieren
- den Überstand vorsichtig dekantieren und den Cup auf einer sterilen Kompresse abdrücken
- das Formazan mit 500µl DMSO/Cup mit Hilfe des Thermomixer lösen
- in die vorbereitete MTP aus jedem Cup 3\*100µl/well pipettieren
- bei 540nm im ELISA-Reader die Extinktion messen
- 

3. Für die IC<sub>50</sub>-Kontrolle (MTT):

- Cups ohne weiteren Zusatz in der Bank schließen
- auf dem Rüttler kurz durchmischen
- die Cups für 4h geöffnet in den Brutschrank stellen
- die Cups in der Heraeus Biofuge A bei 3500U/min 3min zentrifugieren
- den Überstand vorsichtig dekantieren und den Cup auf einer sterilen Kompresse abdrücken
- das zurückgebliebene Zellpellet in 1ml/Cup RPMI-Medium resuspendieren (Thermomixer 5min)
- aus jedem Cup 3\*200µl/well in die vorbereitete MTP pipettieren
- 3 Tage später werden 25µl/well MTT-Reagenz hinzugeben und vorsichtig mischen
- für 4h in den Brutschrank stellen
- anschließend den Überstand mittels Wasserstrahlpumpe absaugen
- das Formazan mit 100µl DMSO/well lösen
- bei 540nm im ELISA Reader die Extinktion messen

## VI. Literaturverzeichnis

1. Akan I, Akan S, Akca H, Savas B, and Ozben T, Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. *Cancer Cell Int.* 5: 22, 2005.
2. Akiyama S, [Genetic alterations and chemoresistance]. *Gan To Kagaku Ryoho* 32: 1895-1901, 2005.
3. Aleksa K, Ito S, and Koren G, Renal-tubule metabolism of ifosfamide to the nephrotoxic chloroacetaldehyde: pharmacokinetic modeling for estimation of intracellular levels. *J.Lab Clin.Med.* 143: 159-162, 2004.
4. Bartsch H, Malaveille C, Barbin A, Bresil H, Tomatis L, and Montesano R, Mutagenicity and metabolism of vinyl chloride and related compounds. *Environ.Health Perspect.* 17193-8: -8, 1976.
5. Bergler W, Petroianu G, and Schadel A, Feasibility of proliferation studies using the BrdU and MTT assays with a head and neck carcinoma cell line. *ORL J.Otorhinolaryngol.Relat Spec.* 55: 230-235, 1993.
6. Berton TR, Mitchell DL, Fischer SM, and Locniskar MF, Epidermal proliferation but not quantity of DNA photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis. *J.Invest Dermatol.* 109: 340-347, 1997.
7. Bertz J, Giersiepen K., Haberland J., Hentschel S., Kaatsch P., Katalinic A., Stabenow R., Stegmaier C., and Ziegler H. *Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und des RKI. Saarbrücken, 2006.*
8. Bhat HK, Asimakis GK, and Ansari GA, Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by chloroethanols. *Toxicol.Lett.* 59: 203-211, 1991.
9. Boddy AV, English M, Pearson AD, Idle JR, and Skinner R, Ifosfamide nephrotoxicity: limited influence of metabolism and mode of administration during repeated therapy in paediatrics [see comments]. *Eur.J.Cancer* 32A: 1179-1184, 1996.
10. Bohnenstengel F, Hofmann U, Eichelbaum M, and Kroemer HK, Characterization of the cytochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 51: 297-301, 1996.
11. Börner K, Kistro J, Bruggemann SK, Hagenah W, Peters SO, and Wagner T, Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab Dispos.* 28: 573-576, 2000.
12. Brade W, Seeber S, and Herdrich K, Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 18 Suppl 2S1-9: -9, 1986.

13. Brade WP, Herdrich K, and Varini M, Ifosfamide--pharmacology, safety and therapeutic potential. *Cancer Treat.Rev.* 12: 1-47, 1985.
14. Brain EG, Yu LJ, Gustafsson K, Drewes P, and Waxman DJ, Modulation of P450-dependent ifosfamide pharmacokinetics: a better understanding of drug activation in vivo. *Br.J.Cancer* 77: 1768-1776, 1998.
15. Bramwell VH, Mouridsen HT, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Verwey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, Sylvester R, and et a, Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 23: 311-321, 1987.
16. Brock N, Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 49: 1-7, 1989.
17. Brock N and Pohl J, The development of mesna for regional detoxification. *Cancer Treat.Rev.* 10 Suppl A33-43: -43, 1983.
18. Brüggemann SK, Kisro J, and Wagner T, Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Res.* 57: 2676-2680, 1997.
19. Brüggemann SK, Radike K, Braasch K, Hinrichs J, Kisro J, Hagenah W, Peters SO, and Wagner T, Chloroacetaldehyde: mode of antitumor action of the ifosfamide metabolite. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1-8, 2005.
20. Chang LW, Daniel FB, and DeAngelo AB, Analysis of DNA strand breaks induced in rodent liver in vivo, hepatocytes in primary culture, and a human cell line by chlorinated acetic acids and chlorinated acetaldehydes. *Environ.Mol.Mutagen.* 20: 277-288, 1992.
21. Chen CS, Lin JT, Goss KA, He YA, Halpert JR, and Waxman DJ, Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol.Pharmacol.* 65: 1278-1285, 2004.
22. Chen Q, Van der Sluis PC, Boulware D, Hazlehurst LA, and Dalton WS, The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 106: 698-705, 2005.
23. Chiang SY, Swenberg JA, Weisman WH, and Skopek TR, Mutagenicity of vinyl chloride and its reactive metabolites, chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde, in a metabolically competent human B-lymphoblastoid line. *Carcinogenesis* 18: 31-36, 1997.
24. Clewell HJ, Gentry PR, Gearhart JM, Allen BC, and Andersen ME, Comparison of cancer risk estimates for vinyl chloride using animal and human data with a PBPK model. *Sci.Total Environ.* 274: 37-66, 2001.

25. Cohn SM and Lieberman MW, The use of antibodies to 5-bromo-2'-deoxyuridine for the isolation of DNA sequences containing excision-repair sites. *J.Biol.Chem.* 259: 12456-12462, 1984.
26. Colvin M, The comparative pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Semin.Oncol.* 9: 2-7, 1982.
27. Colvin OM, An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr.Pharm.Des* 5: 555-560, 1999.
28. de Kraker J and Voute PA, Experience with ifosfamide in paediatric tumours. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 24 Suppl 1S28-9: -9, 1989.
29. DiMaggio JR, Brown R, Baile WF, and Schapira D, Hallucinations and ifosfamide-induced neurotoxicity. *Cancer* 73: 1509-1514, 1994.
30. Dordjevic B and Szybalski W, Genetics of human cell lines. III Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity. *J Exp Med* 112: 509-531, 1960.
31. Dubourg L, Taniere P, Cochat P, Baverel G, and Michoudet C, Toxicity of chloroacetaldehyde is similar in adult and pediatric kidney tubules. *Pediatr.Nephrol.* 17: 97-103, 2002.
32. Ebina S and Nagai Y, 2-Halogeno-ethanols as an uncoupler of phosphorylation in rat liver mitochondria. *Experientia* 36: 537-539, 1980.
33. Fleming RA, An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 17: 146S-154S, 1997.
34. Frum R and Deb SP, Flow cytometric analysis of MDM2-mediated growth arrest. *Methods Mol.Biol.* 234: 257-267, 2003.
35. Goldin A, Ifosfamid in experimental tumor systems. *Semin.Oncol.* 9: 14-23, 1982.
36. Gonchoroff NJ, Greipp PR, Kyle RA, and Katzmann JA, A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. *Cytometry* 6: 506-512, 1985.
37. Goren MP, Pratt CB, Meyer WH, Wright RK, Dodge RK, and Viar MJ, Mesna excretion and ifosfamide nephrotoxicity in children. *Cancer Res.* 49: 7153-7157, 1989.
38. Goren MP, Wright RK, Pratt CB, and Pell FE, Dechloroethylation of ifosfamide and neurotoxicity. *Lancet* 2: 1219-1220, 1986.
39. Hartley JM, Spanswick VJ, Gander M, Giacomini G, Whelan J, Souhami RL, and Hartley JA, Measurement of DNA cross-linking in patients on

- ifosfamide therapy using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Clin.Cancer Res.* 5: 507-512, 1999.
40. Huang Z, Roy P, and Waxman DJ, Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem.Pharmacol.* 59: 961-972, 2000.
  41. Huberman E, Bartsch H, and Sachs L, Mutation induction in Chinese hamster V79 cells by two vinyl chloride metabolites, chloroethylene oxide and 2-chloroacetaldehyde. *Int.J.Cancer* 16: 639-644, 1975.
  42. Huhn D and Herrmann R, Zytostatika. In: *Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen*,(Eds. Huhn D and Herrmann R), pp. 1-91. Gustav Fischer, Stuttgart; Jena; New York, 1995.
  43. Inoue T, Hibi K, Nakayama G, Komatsu Y, Fukuoka T, Koderia Y, Ito K, Akiyama S, and Nakao A, Expression level of thymidylate synthase is a good predictor of chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J.Gastroenterol.* 40: 143-147, 2005.
  44. Johnson PE, Metabolism of 2-chloroethanol in the rat. *Biochem.Pharmacol.* 16: 185-199, 1967.
  45. Jounaidi Y, Chen CS, Veal GJ, and Waxman DJ, Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11. *Mol.Cancer Ther.* 5: 541-555, 2006.
  46. Kaijser GP, Beijnen JH, Bult A, and Underberg WJ, Ifosfamide metabolism and pharmacokinetics (review). *Anticancer Res.* 14: 517-531, 1994.
  47. Kaspar D, Hedrich CM, Schmidt C, Liedert A, Claes LE, and Ignatius AA, [Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells]. *Unfallchirurg* 108: 18, 20-18, 24, 2005.
  48. Keller DA and Heck HD, Mechanistic studies on chloral toxicity: relationship to trichloroethylene carcinogenesis. *Toxicol.Lett.* 42: 183-191, 1988.
  49. Kohn KW, Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment. *Cancer Res.* 56: 5533-5546, 1996.
  50. Kowalczyk P, Ciesla JM, Saparbaev M, Laval J, and Tudek B, Sequence-specific p53 gene damage by chloroacetaldehyde and its repair kinetics in *Escherichia coli*. *Acta Biochim.Pol.* 53: 337-347, 2006.
  51. Kuchenmeister F, Schmezer P, and Engelhardt G, Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutat.Res.* 419: 69-78, 1998.

52. Kupfer A, Aeschlimann C, and Cerny T, Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 50: 249-252, 1996.
53. Lee CC, Bhandari JC, Winston JM, House WB, Dixon RL, and Woods JS, Carcinogenicity of vinyl chloride and vinylidene chloride. *J.Toxicol.EnvIRON.Health* 4: 15-30, 1978.
54. Letwin R, Chemosensitivity testing. *Clin.J.Oncol.Nurs.* 5: 195-200, 2001.
55. Lind MJ, McGown AT, Hadfield JA, Thatcher N, Crowther D, and Fox BW, The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular glutathione levels in vitro and in vivo. *Biochem.Pharmacol.* 38: 1835-1840, 1989.
56. Maghni K, Nicolescu OM, and Martin JG, Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J.Immunol.Methods* 223: 185-194, 1999.
57. Malaveille C, Bartsch H, Barbin A, Camus AM, Montesano R, Croisy A, and Jacquignon P, Mutagenicity of vinyl chloride, chloroethyleneoxide, chloroacetaldehyde and chloroethanol. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 63: 363-370, 1975.
58. Manzano RG, Wright KA, and Twentyman PR, Modulation by acrolein and chloroacetaldehyde of multidrug resistance mediated by the multidrug resistance-associated protein (MRP). *Clin.Cancer Res.* 2: 1321-1326, 1996.
59. Matsuda T, Yagi T, Kawanishi M, Matsui S, and Takebe H, Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors. *Carcinogenesis* 16: 2389-2394, 1995.
60. McGown AT and Fox BW, A proposed mechanism of resistance to cyclophosphamide and phosphoramidate mustard in a Yoshida cell line in vitro. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 17: 223-226, 1986.
61. Meier T, Allenbacher A, Mueller E, Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, and Issels R, Ifosfamide induced depletion of glutathione in human peripheral blood lymphocytes and protection by mesna. *Anticancer Drugs* 5: 403-409, 1994.
62. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* 65: 55-63, 1983.
63. Motrescu ER, Otto AM, Brischwein M, Zahler S, and Wolf B, Dynamic analysis of metabolic effects of chloroacetaldehyde and cytochalasin B on tumor cells using bioelectronic sensor chips. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 131: 683-691, 2005.



64. Muir D, Varon S, and Manthorpe M, An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal.Biochem.* 185: 377-382, 1990.
65. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, and Kawanishi S, Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic.Biol.Med.* 37: 793-802, 2004.
66. Norpoth K, Studies on the metabolism of isopnosphamide (NSC-109724) in man. *Cancer Treat.Rep.* 60: 437-443, 1976.
67. Norpoth K, Heger M, Muller G, Mohtashamipur E, Kemena A, and Witting C, Investigations on metabolism, genotoxic effects and carcinogenicity of 2,2'-dichlorodiethylether. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 112: 125-130, 1986.
68. Osieka R, Madreiter H, and Schmidt CG, The effect of hyperthermia on DNA repair. *Z.Krebsforsch.Klin.Onkol.Cancer Res.Clin.Oncol.* 88: 1-10, 1976.
69. Poot M, Schuster A, and Hoehn H, Cytostatic synergism between bromodeoxyuridine, bleomycin, cisplatin and chlorambucil demonstrated by a sensitive cell kinetic assay. *Biochem.Pharmacol.* 41: 1903-1909, 1991.
70. Porstmann T, Ternynck T, and Avrameas S, Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J.Immunol.Methods* 82: 169-179, 1985.
71. Rodriguez V, McCredie KB, Keating MJ, Valdivieso M, Bodey GP, and Freireich EJ, Isophosphamide therapy for hematologic malignancies in patients refractory to prior treatment. *Cancer Treat.Rep.* 62: 493-497, 1978.
72. Rosenkranz HS and Wlodkowski TJ, Mutagenicity of ethylene chlorohydrin. A degradation product present in foodstuffs exposed to ethylene oxide. *J.Agric.Food Chem.* 22: 407-409, 1974.
73. Russo A, DeGraff W, Kinsella TJ, Gamson J, Glatstein E, and Mitchell JB, Potentiation of chemotherapy cytotoxicity following iododeoxyuridine incorporation in Chinese hamster cells. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 12: 1371-1374, 1986.
74. Saffhill R and Ockey CH, Strand breaks arising from the repair of the 5-bromodeoxyuridine-substituted template and methyl methanesulphonate-induced lesions can explain the formation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 92: 218-224, 1985.
75. Siehl JM, Thiel E, Schmittel A, Hutter G, Deckert PM, Szelenyi H, and Keilholz U, Ifosfamide/liposomal daunorubicin is a well tolerated and active first-line chemotherapy regimen in advanced soft tissue sarcoma: results of a phase II study. *Cancer* 104: 611-617, 2005.

76. Skinner R, Sharkey IM, Pearson AD, and Craft AW, Ifosfamide, mesna, and nephrotoxicity in children. *J.Clin.Oncol.* 11: 173-190, 1993.
77. Sladek NE, Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol.Ther.* 37: 301-355, 1988.
78. Slater TF, Sawyer B, and Strauli U, Studies on a succinate-tetrazolium reductase System.III. Points os coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem.Biophys.Acta* 77: 383-393, 1963.
79. Sood C and O'Brien PJ, Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem.Pharmacol.* 46: 1621-1626, 1993.
80. Sood C and O'Brien PJ, Chloroacetaldehyde-induced hepatocyte cytotoxicity. Mechanisms for cytoprotection. *Biochem.Pharmacol.* 48: 1025-1032, 1994.
81. Spengler SJ and Singer B, Formation of Interstrand Cross-Links in Chloroacetaldehyde-treated DNA Demonstarted by Ethidium Bromide Flourescence. *Cancer Res.* 4804-4806, 1988.
82. Springate J, Chan K, Lu H, Davies S, and Taub M, Toxicity of ifosfamide and its metabolite chloroacetaldehyde in cultured renal tubule cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 35: 314-317, 1999.
83. Szybalski W, X-ray sensitization ba halopyrimidines. *Cancer Chemother.Rep.* 58: 539-557, 1974.
84. Teicher.B.A, Pharmacology og Cancer Chemotherapy. In: *Cancer. Principles and Practice of Oncology*,(Eds. Vincent T, DeVita J, Hellman S, and Rosenberg SA), pp. 405-418. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1997.
85. Tokuyama J, Kubota T, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Otani Y, Kumai K, and Kitajima M, Tyrosine kinase inhibitor SU6668 inhibits peritoneal dissemination of gastric cancer via suppression of tumor angiogenesis. *Anticancer Res.* 25: 17-22, 2005.
86. Trauth BC and Keesy H. J. *Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods.* [697 1629727 Mz]. 1998.
87. Wagner T, Ifosfamide clinical pharmacokinetics. *Clin.Pharmacokinet.* 26: 439-456, 1994.
88. Wheeler BM, Loehrer PJ, Williams SD, and Einhorn LH, Ifosfamide in refractory male germ cell tumors. *J.Clin.Oncol.* 4: 28-34, 1986.
89. Widestrand J, Lundh T, Pettersson H, and Lindberg JE, Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays. *Mycopathologia* 147: 149-155, 1999.

90. Wiedemann GJ, Siemens HJ, Mentzel M, Biersack A, Wossmann W, Knocks D, Weiss C, and Wagner T, Effects of temperature on the Therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide. *Cancer Res.* 53: 4268-4272, 1993.
91. Worthington-White DA, Graham P, Jr., Stout SA, and Riley CM, In vitro studies with melphalan and pediatric neoplastic and normal bone marrow cells. *Int.J.Cancer* 37: 819-823, 1986.
92. Wossmann W, Siemens HJ, Beck B, Jansen B, Wiedemann GJ, and Wagner T, Influence of induction of HSP70 on the cytotoxicity of oxazaphosphorine compounds and cisplatin. *International Journal of Oncology* 9: 305-312, 1996.
93. Yu LJ, Drewes P, Gustafsson K, Brain EG, Hecht JE, and Waxman DJ, In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 288: 928-937, 1999.
94. Zmlauski-Tucker MJ, Morris ME, and Springate JE, Ifosfamide metabolite chloroacetaldehyde causes Fanconi syndrome in the perfused rat kidney. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 129: 170-175, 1994.
95. Zhang J, Tian Q, Yung CS, Chuen LS, Zhou S, Duan W, and Zhu YZ, Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev.* 37: 611-703, 2005.
96. Zhang J, Tian Q, Zhu YZ, Xu AL, and Zhou SF, Reversal of resistance to oxazaphosphorines. *Curr.Cancer Drug Targets.* 6: 385-407, 2006.

## VII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner, Leiter der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik I des UKL-SH Campus Lübeck für die interessante Themenstellung und die freundliche sowie geduldige Unterstützung im Verlauf der gesamten Arbeit.

Frau Dr. med. W. Hagenah, Frau Dr. med. S. Klich und Frau Dr. med. Brüggemann danke ich ebenfalls für ihren Beitrag bei der Diskussion methodischer und inhaltlicher Fragen.

Ein besonderer Dank gilt Frau M. Vollmert für ihre Mühe bei der Einarbeitung ins Zellkulturlabor sowie ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

## VIII. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Kirsten Braasch

Geburtsdatum: 26.02.1975

Geburtsort: Lübeck

Eltern: Volker Braasch, Pastor  
Annemarie Braasch, geb. Kolz

**Schulbildung:** 1981-1985 Gotthard-Kühl-Schule Lübeck  
1985-1994 Carl-Jacob-Burckhardt Gymnasium Lübeck  
Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife

**Studium:** Oktober 1994 Beginn des Medizinstudiums an der  
Medizinischen Universität zu Lübeck  
August 1996 Ärztliche Vorprüfung  
August 1997 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
August 2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: Innere Medizin: Klinikum Stormarn  
Chirurgie: Klinikum Stormarn  
Neurologie: Med. Universität zu Lübeck

Oktober 2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**AiP:** 01.Juni 2002 - 30.November 2003  
im Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital, Innere Abteilung

seit 01.12.2003 Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin im  
Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital, Innere Abteilung