

Aus der Strahlenklinik
der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Fietkau

**Strahlensensibilisierung
durch das antiretrovirale Therapieschema
Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Markus Hecht
aus
Tirschenreuth



Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schüttler

Referent: PD Dr. med. L. Distel

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Fietkau

Tag der mündlichen Prüfung:
30.11.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Hintergrund und Ziele	1
1.2	Methoden	1
1.3	Ergebnisse und Beobachtungen	2
1.4	Praktische Schlussfolgerungen	2
2	Summary	3
2.1	Background and aims	3
2.2	Methods	3
2.3	Results and observations	4
2.4	Conclusion	4
3	Einleitung	5
3.1	Dreißig Jahre HIV	5
3.2	HIV, Krebs und Strahlentherapie	7
3.3	Ziele dieser Arbeit	8
4	Material und Methoden	9
4.1	Zellkulturen	9
4.2	Bestrahlung	9
4.3	Medikamente	9
4.4	Koloniebildungstest	10
4.4.1	Prinzip	10
4.4.2	Durchführung	11
4.4.3	Auswertung	11
4.5	Flusszytometrische Messungen	12
4.5.1	Prinzip	12
4.5.2	Durchführung	12
4.5.3	Auswertung	13
4.6	Immunostaining	14
4.6.1	Prinzip	14

4.6.2	Durchführung	15
4.6.3	Auswertung	17
5	Ergebnisse	19
5.1	Koloniebildungstest	19
5.2	Flusszytometrische Messungen	24
5.3	Immunostaining	26
6	Diskussion	33
7	Anhang	43
7.1	Abkürzungen	43
7.2	Verwendete Lösungen	44
7.2.1	Medien für Zellkulturen	44
7.2.2	Lösungen für Immunostaining	44
8	Literaturverzeichnis	45
9	Danksagung	49
10	Lebenslauf	50

1 Zusammenfassung

1.1 Hintergrund und Ziele

Kommt es bei HIV-positiven Patienten zu Tumorerkrankungen, kann eine Strahlentherapie bei Patienten unter HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) erforderlich sein. Von den in der HIV-Therapie eingesetzten Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor Zidovudin (AZT), sowie von einigen Protease-Inhibitoren ist bekannt, dass sie strahlensensibilisierend wirken. Eine Strahlensensibilisierung kann bei Patienten einerseits im Normalgewebe zu starken strahlenbedingten Nebenwirkungen führen, andererseits einen Tumor empfindlicher für eine Radiotherapie machen. In dieser Arbeit soll das HIV-Therapieschema aus dem Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) Efavirenz (EFV) und den beiden Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) Tenofovir (TDF) und Emtricitabin (FTC) hinsichtlich strahlensensibilisierender Effekte in vitro getestet werden.

1.2 Methoden

Die Substanzen wurden einzeln sowie in den Kombinationen Tenofovir plus Emtricitabin und Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin untersucht, da diese Zusammenstellungen als Kombinationsmedikamente Truvada® bzw. Atripla® verwendet werden. Es wurden Koloniebildungstests mit Pankreastumorzellen für die Substanzen in Kombination mit Bestrahlung durchgeführt. Der Einfluss der Medikamente auf den Zellzyklus wurde mittels flusszytometrischen Messungen bei Fibroblasten und Pankreastumorzellen untersucht, da Zellen je nach Zellzyklusphase unterschiedlich strahlensensibel sind. Zudem wurden durch Immunostaining von Fibroblasten die Auswirkungen der antiretroviralen Substanzen auf die aktivierten Faktoren der DNA-Schadenserkennung NBS1, ATM, H2AX und 53BP1 untersucht.

1.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Im Koloniebildungstest mit Pankreastumorzellen erwies sich der NNRTI Efavirenz als strahlensensibilisierend, wogegen die beiden NRTI Tenofovir und Emtricitabin strahlenschützende Effekte zeigten. Die Kombination Tenofovir plus Emtricitabin war ebenfalls strahlenschützend. Kombiniert man Efavirenz, Tenofovir und Emtricitabin miteinander, so zeigt sich im Dosisbereich bis 5 Gy ein strahlensensibilisierender und über 5 Gy ein strahlenschützender Effekt. Die flusszytometrischen Messungen zeigten keinen Einfluss der Medikamente auf den Zellzyklus der Fibroblasten. Bei den Pankreastumorzellen zeigte sich bei der Kombination von Efavirenz, Tenofovir und Emtricitabin eine Zunahme der Zellen in der G1/G0-Phase auf Kosten der S- und G2/M-Phase, wodurch eine Strahlensensibilisierung aber nicht erklärt werden kann. Beim Immunostaining von Fibroblasten fiel beim NNRTI Efavirenz sowie beim NRTI Tenofovir eine geringe Zunahme der Foci pro Zelle von NBS1, H2AX und 53BP1 auf. Beim NRTI Emtricitabin waren ausschließlich 53BP1 Foci vermehrt. Bei der Kombination aller drei Substanzen zeigte sich bei Bestrahlung eine deutliche und signifikante Steigerung der Foci pro Zelle der vier untersuchten Faktoren NBS1, ATM, H2AX und 53BP1 der DNA-Schadenerkennung im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle.

1.4 Praktische Schlussfolgerungen

Die Tripeltherapie Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin, auch als Kombinationsmedikament Atripla® erhältlich, ist in vitro strahlensensibilisierend. Folglich besteht bei Patienten die Gefahr von häufigen und starken strahlenbedingten Nebenwirkungen. Deshalb sollte man bei Patienten mit entsprechender Medikation entweder diese vor Bestrahlung umsetzen oder die Patienten hinsichtlich individueller Strahlenempfindlichkeit untersuchen. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Chromosomenbruchanalyse mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Zudem könnten die Medikamente gezielt als Radiosensitizer eingesetzt werden, um die Wirkung der Bestrahlung auf einen Tumor zu verstärken.

2 Summary

2.1 Background and aims

If a carcinoma occurs in a HIV-positive patient, radiotherapy of a patient who is on HAART medication (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) can be necessary. It is well known that the Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Zidovudin used in HIV-Therapy, as well as some Protease Inhibitors, cause radiosensitivity. On the one hand radiosensitivity can cause harmful side effects of radiation in normal tissue; on the other hand it can improve the susceptibility of a tumor to radiation. In this paper the antiretroviral treatment scheme consisting of the Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI) Efavirenz (EFV) and the two Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI) Tenofovir (TDF) and Emtricitabin (FTC) was tested for radiosensitizing effects in vitro.

2.2 Methods

The drugs were tested separately as well as in the combinations Tenofovir plus Emtricitabin and Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin, because these assemblies are available as combination drugs Truvada® and Atripla® respectively. Clonogenic assays were performed with a pancreatic cancer cell line for the drugs combined with radiation. The effect of the drugs on the cell cycle of fibroblasts and a pancreatic cancer cell line was examined by flow cytometry, because radiosensitivity of cells depends on the actual phase in the cell cycle. Furthermore the effect on the activated factors of DNA damage sensing NBS1, ATM, H2AX and 53BP1 was examined by Immunostaining of fibroblasts.

2.3 Results and observations

In the clonogenic assay the NNRTI Efavirenz was radiosensitizing, whereas for both NRTIs Tenofovir and Emtricitabin a radioprotective effect was found. The combination Tenofovir plus Emtricitabin was also radioprotective. The combination Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin showed a radiosensitizing effect with a radiation dose below 5 Gy and a radioprotective effect above 5 Gy. Flow cytometry showed no effect of the drugs on the cell cycle of fibroblasts. In the pancreatic cancer cell line the combination of Efavirenz, Tenofovir and Emtricitabin caused an increase of the number of cells in G1/G0-phasis and a decrease of the number of cells in S- and G2/M-phasis, which can not be the reason for enhanced radiosensitivity. Immunostaining revealed a little increase of the number of foci per cell of NBS1, H2AX and 53BP1 with the NNRTI Efavirenz as well as the NRTI Tenofovir. With the NRTI Emtricitabin only the 53BP1 foci per cell were elevated. The combination of all three drugs together with radiation showed a larger and significant increase of the number of foci per cell of all four tested factors NBS1, ATM, H2AX and 53BP1 of DNA damage sensing.

2.4 Conclusion

The triple therapy Efavirenz plus Tenofovir plus Emtricitabin, which is also available as combination drug Atripla®, is radiosensitizing in vitro. Consequently the risk of frequent and dangerous radiation induced side effects is elevated in patients on this medication. The practical implications of these results are that in patients on this medication either the therapy regime should be changed or they should be examined for individual radiosensitivity. For this examination the chromosomal break analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) is an established technique. Furthermore these drugs could be used purposefully as radiosensitizers to improve the susceptibility of a tumor to radiation.

3 Einleitung

3.1 Dreißig Jahre HIV

Als Michael Gottlieb 1981 in einem Artikel im New England Journal of Medicine eine neue erworbene Immunschwäche bei homosexuellen Patienten beschrieb (Gottlieb et al. 1981), glaubte wohl niemand, vor welche großen Probleme diese Krankheit die moderne Medizin noch stellen würde. Ihm waren vier Patienten aufgrund Pneumocystis carinii Pneumonien, starker Candidiasis der Schleimhäute und häufiger viraler Infektionen aufgefallen. Außerdem beschrieb er bereits damals das Auftreten des Kaposi-Sarkoms und stellte fest, dass die Patienten zu wenig Lymphozyten im Blut hatten. Da sich in der Folgezeit solche Fälle häuften, wurde die neue Bezeichnung Acquired Immune Deficiency Syndrom, kurz AIDS, für dieses Krankheitsbild eingeführt. Es dauerte zwei Jahre, bis eine französische Arbeitsgruppe ein lymphotropes Retrovirus bei diesen Patienten identifizieren konnte (Barre-Sinoussi et al. 1983). Ein Jahr später konnten Antikörper gegen dieses Retrovirus bei AIDS-Patienten, nicht aber bei Gesunden, nachgewiesen werden (Sarngadharan et al. 1984). Damit war der Zusammenhang zwischen dem Retrovirus und den klinischen Symptomen hergestellt worden. Durch diese Erkenntnis stand nun auch ein Antikörper-Test zum Nachweis dieser Erkrankung zur Verfügung. Im Jahr 1985 wurde die erste Substanz identifiziert, die die Replikation der AIDS-Viren hemmt: 3'-Azido-2'-deoxythymidin, heute unter dem Namen Zidovudin (AZT) bekannt (Mitsuya et al. 1985). So stand vier Jahre nach der Erstbeschreibung von AIDS das erste Medikament zur Verfügung. Aufgrund dieser rapiden Entwicklung glaubte man damals, dass das Problem AIDS bald gelöst sein würde. Aber stattdessen breitete sich das HI-Virus weltweit aus und heute gibt es 33 Millionen HIV-positive Menschen, was 0,8% der Weltbevölkerung entspricht (Kilmarx 2009). Trotz Präventionsprogrammen in der Bevölkerung, einer sensitiveren Diagnostik durch die

HIV-PCR (Polymerasekettenreaktion), der Entwicklung vieler neuer Medikamente und deren Einsatz als Dreifachkombination in der HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) konnte diese Ausbreitung nicht verhindert werden (Wainberg et al. 2008).

Momentan sind mehrere Medikamentengruppen verfügbar, die den Replikationszyklus der HI-Viren hemmen: Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) behindern die Reverse Transkriptase des HI-Virus. Dieses Enzym schreibt das auf RNA gespeicherte Erbgut des HI-Virus in einen DNA-Strang um, der danach in die DNA der humanen Zelle eingebaut wird. Die NRTI werden von der Reversen Transkriptase fälschlicherweise wie normale Nukleotide in diesen Strang eingebaut und machen aufgrund ihrer chemischen Struktur das Anhängen weiterer Nukleotide unmöglich. Der nicht fertig gestellte DNA-Strang bleibt am Enzym hängen und hemmt dadurch die Synthese weiterer DNA-Kopien des HI-Virus. Die NNRTI lagern sich an die Reverse Transkriptase an und bewirken eine Konformationsänderung dieses Enzyms, die auch das katalytische Zentrum betrifft. Dies bewirkt eine Hemmung der reversen Transkription von RNA in DNA.

Die Medikamentengruppe der Protease-Inhibitoren (PI) hat einen ganz anderen Angriffspunkt. Bei der Proteinsynthese für neue HI-Viren durch die humane Zelle entstehen zunächst Vorläuferproteine, die erst an verschiedenen Stellen geschnitten werden müssen, um ihre Funktion ausüben zu können. Dies geschieht durch die HIV-Protease, welche durch die Protease-Inhibitoren gehemmt werden kann. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren einige neue Entwicklungen (Integrase-Inhibitoren, Fusionsinhibitoren, Entry-Inhibitoren) erstmals klinisch getestet. Trotz dieser Entwicklungen kann man HIV bisher nicht heilen. Gründe dafür sind das Auftreten immer neuer HIV-Mutanten, die damit verbundene Medikamentenresistenz, Nebenwirkungen der Medikamente und das mehrmalige Scheitern einer Impfstoffentwicklung (Gallo 2006).

3.2 HIV, Krebs und Strahlentherapie

Die Infektion mit dem HI-Virus bringt ein erhöhtes Tumorrisiko sowohl an AIDS-definierenden als auch an nicht AIDS-definierenden Tumoren mit sich. So sterben mittlerweile ein Drittel der HIV-Patienten an Krebs (Bonnet et al. 2008). Dies liegt zum einen an der Schädigung des Immunsystems, speziell an der niedrigen Anzahl an CD4-Lymphozyten (Clifford et al. 2009). Zum anderen sind HIV-positive Personen häufiger mit karzinogenen Viren, wie dem Human Papilloma Virus, kurz HPV, infiziert (Rapose 2009). Dieses Virus verursacht beim Menschen vor allem genitale und anale Karzinome. Beim Analkarzinom ist die Therapie der Wahl eine Radiochemotherapie (Gervaz et al. 2008). Auch bei anderen Krebserkrankungen wie dem Kaposi-Sarkom oder dem diffusen großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom kann eine therapeutische Bestrahlung mit ionisierender Strahlung bei HIV-Patienten nötig sein (Becker et al. 2006; Rothschild et al. 2009). Von in der HIV-Therapie häufig eingesetzten Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren ist bekannt, dass sie sich bei der Replikation der DNA in diese einlagern und den Prozess behindern können (Olivero 2007). So stellt sich die Frage, ob diese Medikamente in Kombination mit Bestrahlung eine Strahlensensibilisierung verursachen. Dies hätte für die Praxis zwei Konsequenzen: Zum einen könnte man bei therapeutischen Tumorbestrahlungen bei HIV-Patienten die entsprechenden Medikamente vorher absetzen, um unerwartet heftige Nebenwirkungen zu vermeiden. Zum anderen bietet sich die Möglichkeit strahlensensibilisierende Medikamente gezielt vor Bestrahlungen als Radiosensibilisatoren einzusetzen, damit die Wirkung der Bestrahlung auf den Tumor verstärkt wird. Bei den auch in der HIV-Therapie eingesetzten Protease-Inhibitoren wurde ebenfalls eine strahlensensibilisierende Wirkung nachgewiesen und bereits eine Studie an Patienten durchgeführt, bei der diese Medikamente als Radiosensibilisatoren eingesetzt wurden (Brunner et al. 2008; Pajonk et al. 2002).

3.3 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es Interaktionen von HIV-Medikamenten mit Bestrahlung an verschiedenen Zelllinien zu erfassen, um so Rückschlüsse auf mögliche Nebenwirkungen bei einer Radiotherapie von HIV-Patienten ziehen zu können oder die entsprechenden Medikamente gezielt als Radiosensitizer einsetzen zu können. Alle in dieser Arbeit untersuchten Medikamente gehören zur Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTI). Es wurden der nicht-nukleosidische RTI Efavirenz (EFV) und die beiden nukleosidischen RTI Tenofovir (TDF) und Emtricitabin (FTC) untersucht. Diese drei Wirkstoffe sind eine häufig eingesetzte Dreierkombination in der HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), da sie als Kombinationsmedikament (Atripla®) erhältlich sind, das der Patient nur einmal am Tag einnehmen muss. Dabei steht die Wirksamkeit anderen komplizierteren Kombinationstherapien in nichts nach (Dejesus et al. 2009; Goicoechea et al. 2007). Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erfolgte die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Als erste Methode wurde der Koloniebildungstest gewählt. Dies ist der klassische Test zum Erfassen einer Strahlensensibilisierung. Mittels flusszytometrischer Messungen wurde der Einfluss der Medikamente auf den Zellzyklus untersucht, da Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen verschieden strahlensensibel sind (Pawlik et al. 2004; Sinclair 1968). Als weitere Methode wurde Immunostaining von DNA-Reparatursystemen durchgeführt. So kann eine mögliche Beeinflussung der DNA-Reparatur durch die Medikamente nach strahleninduzierter DNA-Schädigung erkannt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkulturen

Es wurden zwei Zelllinien verwendet: Die erste Zelllinie bestand aus den primären Hautfibroblasten TE. Für sie wurde das Medium F-12 (Firma: Gibco) mit Zusatz von 12% FBS (fetal bovine serum), 2% NEA (non-essential AminoAcids), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die zweite Zelllinie bestand aus den Pankreastumorzellen BxPC-3. Für sie wurde das Medium DMEN (Firma: PAN Biotech GmbH) mit Zusatz von 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

4.2 Bestrahlung

Alle Bestrahlungen erfolgten mit einer Röntgenanlage der Firma Comet AG: Röntgenstrahler Isovolt 160 / M2, Röhrentyp MXR-160 / 0.4 - 3.0

4.3 Medikamente

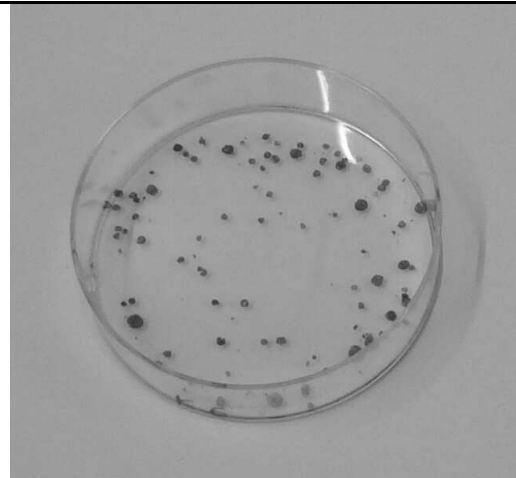
Alle verwendeten Medikamente gehören zur Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren. Für die Versuche wurden der nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor Efavirenz (EFV), und die beiden nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Tenofovir (TDF) und Emtricitabin (FTC) verwendet. Die Substanzen wurden von Firma Sequoia Research Products bezogen und vom Virologischen Institut als 10 mmol/l Stammlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Verfügung gestellt. Die Ermittlung der Medikamentenkonzentration für die Versuche erfolgte anhand der Ergebnisse des Therapeutischen Drug Monitorings bei HIV-Patienten. Für NNRTI wie Efavirenz wird so die Medikamentenkonzentration im Blut des Patienten überwacht. Der Therapeutische Bereich für EFV im Blut des Patienten beträgt 1000 bis 4000 ng/ml, wobei in Studien Maximalwerte bis über 6000ng/ml festge-

stellt wurden (Donnerer et al. 2008; Takahashi et al. 2007). Das Molekulargewicht von EFV beträgt 315,67 g/mol. Das ergibt für den Maximalwert 6000ng/ml umgerechnet 19,0 µmol/l. Für alle Versuche wurde deshalb die Konzentration 20 µmol/l verwendet. Um eine Vergleichbarkeit der drei Substanzen zu gewährleisten, wurden die beiden NRTI TDF und FTC ebenfalls in dieser Konzentration verwendet. Je nach erforderlicher Menge wurde die Stammlösung dem jeweiligen Zellmedium zugegeben. Die Substanzen wurden sowohl einzeln, als auch in verschiedenen Kombinationen getestet. Es wurde TDF mit FTC kombiniert, die beiden im Medikament Truvada® der Firma Gilead Sciences enthaltenen Substanzen. Außerdem wurden die drei im Medikament Atripla® (ebenfalls Firma Gilead Sciences) enthaltenen Substanzen, also EFV+TDF+FTC, miteinander kombiniert. Um eine Vergleichbarkeit mit den Einzelsubstanzen zu gewährleisten, erfolgten die Kombinationen im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:1.

4.4 Koloniebildungstest

4.4.1 Prinzip

Der Koloniebildungstest ist die klassische Methode zum Testen der Strahlenempfindlichkeit von Zelllinien. Es wird die Teilungsfähigkeit einer Zelle nach einer bestimmten Behandlung/Bestrahlung überprüft. Das Prinzip ist folgendermaßen: Einzeln liegende Zellen werden medikamentös behandelt und/oder bestrahlt. Folglich sterben einige Zellen ab, einige verlieren ihre Teilungsfähigkeit und einige können sich weiter vermehren. Die vermehrungsfähigen Zellen teilen sich immer weiter und bilden nach einiger Zeit sog. Kolonien, d.h. kleine Zellnester mit mehr als 50 Zellen. Diese Kolonien sind mit dem Auge sichtbar und Anzahl und Größe können ausgewertet werden (siehe Abb. 1).

Abb. 1: Petrischale beim Koloniebildungstest

Bei den Versuchen werden mehrere Ansätze mit aufsteigenden Dosen bestrahlt, so dass man sog. Bestrahlungskurven ermitteln kann. In dieser Arbeit wurde jeweils eine Kontroll-Bestrahlungskurve mit einer Bestrahlungskurve mit Medikament verglichen.

4.4.2 Durchführung

Der Koloniebildungstest wurde mit der Pankreastumorzelllinie BxPC-3 und dem oben genannten Medium durchgeführt. Die Zellen wurden in Petrischalen eingesät und, nachdem die Zellen 3 Stunden Zeit zum Anwachsen hatten, mit dem Wirkstoff behandelt. Die Bestrahlung erfolgte nach 24 Stunden, so dass der Wirkstoff vorher in die Zellen eindringen und seine Wirkung entfalten konnte. Als Bestrahlungsdosen wurden 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy gewählt. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die medikamentöse Behandlung beendet, indem die Substanz mit Zellmedium ausgewaschen wurde. Am 12. Tag wurde das Medium nochmals durch frisches ersetzt, um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Die Färbung erfolgte am 18. Tag mit Methyleneblau.

4.4.3 Auswertung

Die Petrischalen wurden mit einem speziellen Scanner eingelesen. Dieser Scanner verwendet gelb-grünes Licht der Wellenlänge 565 nm, da hier das Absorptionsmaximum von Methyleneblau liegt. Danach erfolgte

die Auswertung mit einem speziell dafür entworfenen und mehrfach erprobten Computerprogramm am PC (Piasecka et al. 1998). Dieses Programm bestimmt automatisch die Anzahl der Kolonien.

4.5 Flusszytometrische Messungen

4.5.1 Prinzip

Mit flusszytometrischen Messungen kann schnell eine große Zellzahl auf verschiedene fluoreszenzmarkierte Strukturen untersucht werden. Der erste Schritt bei flusszytometrischen Messungen ist die Markierung der zu untersuchenden Strukturen der Zelle mit einer fluoreszierenden Substanz. Dies kann mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern, anderen Proteinen oder chemischen Substanzen erfolgen. Danach fließen die Zellen durch ein Messgerät, das mittels Laser die Substanz zum Fluoreszieren bringt. Das Leuchten jeder einzelnen Zelle wird durch einen Lichtsensor hinter einem Farbfilter registriert. In der vorliegenden Arbeit soll der Zellzyklus untersucht werden, da Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich stark von Röntgenstrahlung geschädigt werden (Pawlik and Keyomarsi 2004; Sinclair 1968). Hierfür wurde eine fluoreszierende Substanz verwendet, die sich in die DNA einlagert. Über den DNA-Gehalt der Zelle kann dann die momentane Zellzyklusphase bestimmt werden, da Zellen in der G1/G0-Phase den normalen und in der G2/M-Phase den doppelten DNA-Gehalt besitzen. Zellen mit einer DNA-Menge zwischen einfach und doppelt replizieren momentan ihre DNA und befinden sich somit in der S-Phase.

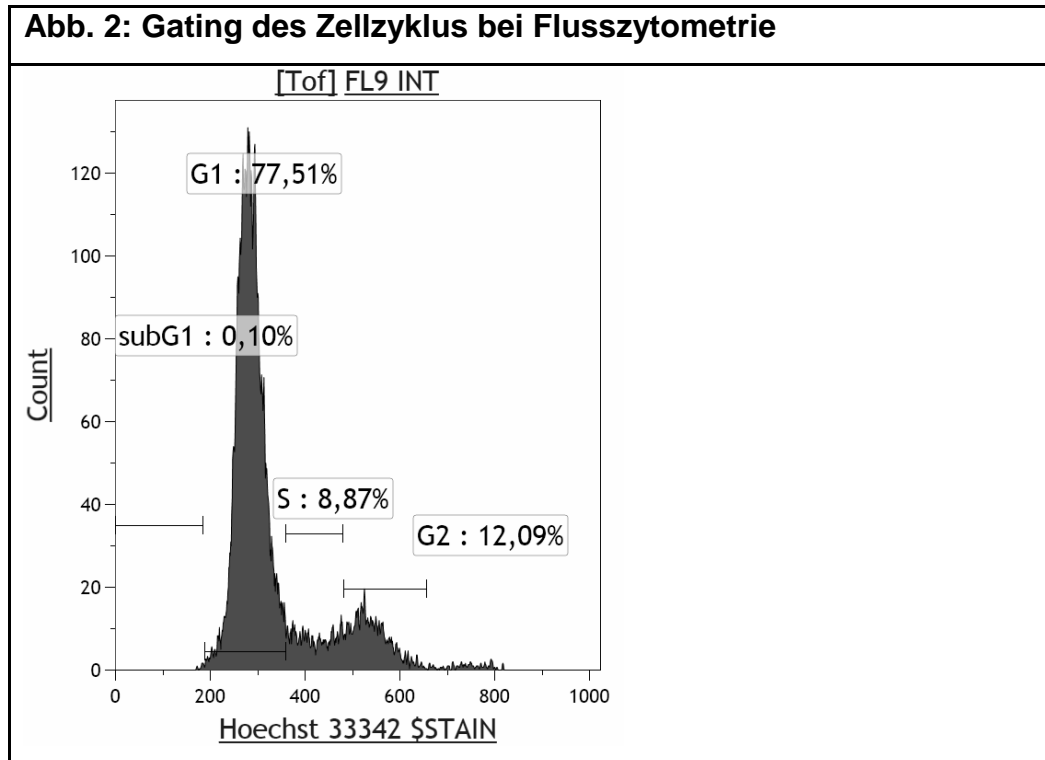
4.5.2 Durchführung

Es wurden flusszytometrische Messungen sowohl mit den Hautfibroblasten TE, als auch mit der Pankreastumorzelllinie BxPC-3 durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in Zellkulturflaschen eingesät. Die Behandlung mit den Medikamenten erfolgte nach 48 Stunden, damit die Zellen Zeit zum Anwachsen hatten und sich im normalen Zellzyklus befanden. Nachdem die Medikamente 24 Stunden einwirken konnten, erfolgte die Färbung. Dieser Zeitpunkt wurde so gewählt, um die Zellzyk-

lusphase im Moment der Bestrahlung beim Koloniebildungstest und beim Immunostaining zu erfassen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Hoechst 33342. Dabei wurden 2 µl des Färbemittels Hoechst 33342 auf 400 µl Zellsuspension, entsprechend etwa 200000 Zellen, gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Danach erfolgte die Messung mit dem Gallios Flow Cytometer und der Software Gallios Cytometer 1.1 der Firma Beckmann Coulter. Pro Messung wurden 10000 Zellen erfasst.

4.5.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Kaluza Flow Cytometry Analysis 1.0 der Firma Beckmann Coulter. Die Zellen wurden je nach Stärke der Fluoreszenz in vier Bereiche eingeteilt. Zuerst wurden die zwei Bereiche für Zellen mit einfachen und doppelten DNA-Gehalt festgelegt, d.h. Zellen in der G1/G0- bzw. in der G2/M-Phase. Zellen, die sich zwischen diesen Bereichen befinden, replizieren momentan ihre DNA und befinden sich somit in der S-Phase. Zellen mit einem DNA-Gehalt kleiner als in der G1/G0-Phase gelten als apoptotisch und werden als subG1 bezeichnet (Darzynkiewicz et al. 2004) (siehe Abb. 2).

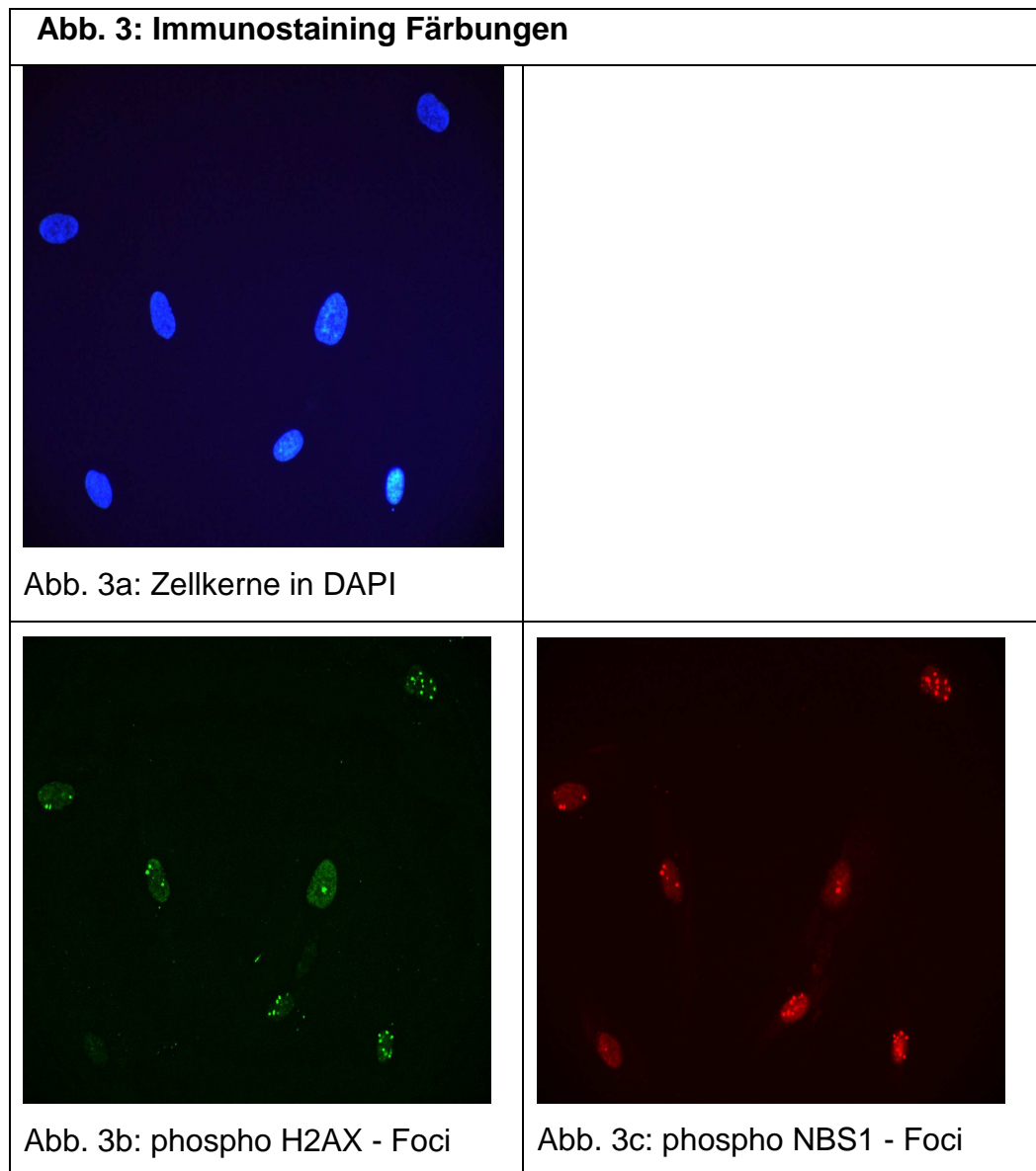


4.6 Immunostaining

4.6.1 Prinzip

Beim Immunostaining kann man Proteine im Zellkern mithilfe fluoreszierender Antikörper als kleine Punkte, sog. Foci, darstellen. In dieser Arbeit wird die Methode der „Indirekten Immunfluoreszenz“ angewendet: Der erste Antikörper (Primärantikörper), der aus einer bestimmten Tierart gewonnen wurde, ist gegen das interessierende Protein gerichtet. Der zweite Antikörper (Sekundärantikörper) ist gegen die Tierart des Primärantikörpers gerichtet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Er dient dazu den an das Protein gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen. Betrachtet man eine Zelle im Fluoreszenzmikroskop, kann man die Anzahl der Foci auswerten. Wenn man mehrere Primär- und Sekundärantikörper verwendet, kann man auch die Kolokalisation bestimmter Proteine erfassen. Außerdem werden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, eine Substanz, die sich in die DNA einla-

gert. Damit ist sichergestellt, dass nur Foci in Zellkernen ausgewertet werden (siehe Abb. 3).



4.6.2 Durchführung

Das Immunostaining erfolgte mit der Fibroblasten-Zelllinie TE. Die Fibroblasten wurden auf Deckgläser in einer Quadripermschale ausgesät. Um zu gewährleisten, dass durch das Einsäen verursachte Zellschäden repariert waren und sich die Zellen im normalen Zellzyklus befanden, wurde erst nach 48 Stunden das Medikament zugegeben. Damit das Medikament in die Zelle gelangen und wirken konnte, erfolgte die Bestrahlung 24 Stunden später. Nach weiteren 24 Stunden wur-

den die Deckgläser in eine Küvette gegeben und kurz in PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Danach wurden die Zellen 15 Minuten lang mit der Fixierlösung aus 4% Formaldehyd und 0,1% Triton X-100 in PBS fixiert und permeabilisiert (siehe Anhang Tabelle 5). Die Permeabilisation der Zell- und Kernmembran mit Triton X-100 ist nötig, damit die Antikörper in den Zellkern gelangen können. Dieser Vorgang wurde mit einer dreimaligen Waschung mit TBS (tris buffered saline) beendet. Als nächster Schritt wurde die Blocking-Lösung aus BSA (bovine serum albumin), Natriumazid und FBS in PBS zugegeben (siehe Anhang Tabelle 6) und 3 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Vor der Färbung wurde die Blocking-Lösung durch dreimaliges Waschen in TBS wieder entfernt. Daraufhin wurden die Deckgläser getrocknet und mit dem Fettstift in zwei Hälften geteilt. So konnte man zwei unterschiedliche Primärantikörper-Mischungen verwenden. Eine Primärantikörper-Mischung bestand aus jeweils zwei unterschiedlichen Primärantikörpern von verschiedenen Tierarten verdünnt in 1%BSA in TBS. So ergab sich die Möglichkeit, auf einem Deckglas insgesamt vier verschiedene Proteine anzufärben.

Tabelle 1: Primärantikörper für Immunostaining

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
H2A.X Anti Phospho Ser 139 clone, Mouse	Upstate	1:2000
NBS1/Nibrin/p95 (Ser 343), Rabbit	Novus	1:500
ATM (Ser 1981), Mouse	Cell Signaling	1:300
Phospho 53BP-1, Rabbit	Cell Signaling	1:100

Es wurde in jedes Feld die jeweilige Primärantikörpermischung aufgetragen und mit einem Coverslip bedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank. Danach wurde durch dreimaliges Waschen in TBS die Primärantikörperlösung wieder entfernt und die Deckgläser getrocknet. Nun wurde die fluoreszierende

Sekundärantikörper-Mischung, ebenfalls verdünnt mit 1%BSA in TBS, zugegeben. Die Sekundärantikörpermischung enthielt rot und grün fluoreszierende Antikörper, wobei einer gegen die Tierart des ersten Primärantikörpers und der andere gegen die Tierart des zweiten Primärantikörpers gerichtet war.

Tabelle 2: Sekundärantikörper für Immunostaining

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Flour 594 (rot), Chicken anti Rabbit	Molecular Probes	1:200
Alexa Flour 488 (grün), Goat anti Mouse	Molecular Probes	1:400

Die jeweilige Sekundärantikörper-Mischung wurde ebenfalls in die entsprechenden Felder aufgetragen und mit einem Coverslip bedeckt. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Die Sekundärantikörper-Mischung wurde danach durch dreimaliges Waschen in TBS wieder entfernt. Nachdem die Deckgläser getrocknet waren, erfolgte die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol). Dafür wurde eine Lösung aus 0,1 µl DAPI in 1 ml 4xSSC/Tween verwendet. Es wurde in jedes Feld aufgetragen und mit einem Coverslip für 1 Minute bedeckt. Zum Beenden wurden die Coverslips abgezogen und die Deckgläser kurz in destilliertem Wasser gewaschen. DAPI färbt den gesamten Zellkern blau, so dass unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellkerne leicht identifiziert werden können. Nachdem die Deckgläser getrocknet waren, wurde auf jedes Deckglas das Eindeckmedium „Vectashield Mounting Medium for Fluorescence“ (Firma: Vector Laboratories) gegeben und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite auf einen Objektträger aufgebracht.

4.6.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Farbfiltern fotografiert. Mit dem blauen

Farbfilter kann man die DAPI-Färbung darstellen, also homogen blau gefärbte Zellkerne. Mit dem roten und grünen Farbfilter kann man die Foci, also die gefärbten Proteine im Zellkern, sehen. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm Optimas 6.5. Es wurde die spezielle Auswertungssoftware „Biomass Software, Version 3.3 10/2004 MSAB (Modulare Systeme in der angewandten Biologie) PD Dr. med. Distel, Erlangen, Germany“ verwendet. Im ersten Schritt kann dieses Programm die DAPI gefärbten Zellkerne selbstständig erkennen und die Kerngrenzen markieren. Die Parameter für die Empfindlichkeit der Erkennung müssen manuell eingestellt werden. Die Markierungen werden dann auf die Photos mit den Proteinfärbungen übertragen. Danach werden die Zellen im Computerprogramm nebeneinander sortiert. Im nächsten Schritt muss die Sensibilität für die Detektion der Foci innerhalb der Zellen eingestellt werden. Die Markierung der Foci erfolgt dann wieder automatisch durch das Programm. Durch die Software wird die Anzahl der Foci pro Zelle automatisch in eine Excel-Datei übertragen.

5 Ergebnisse

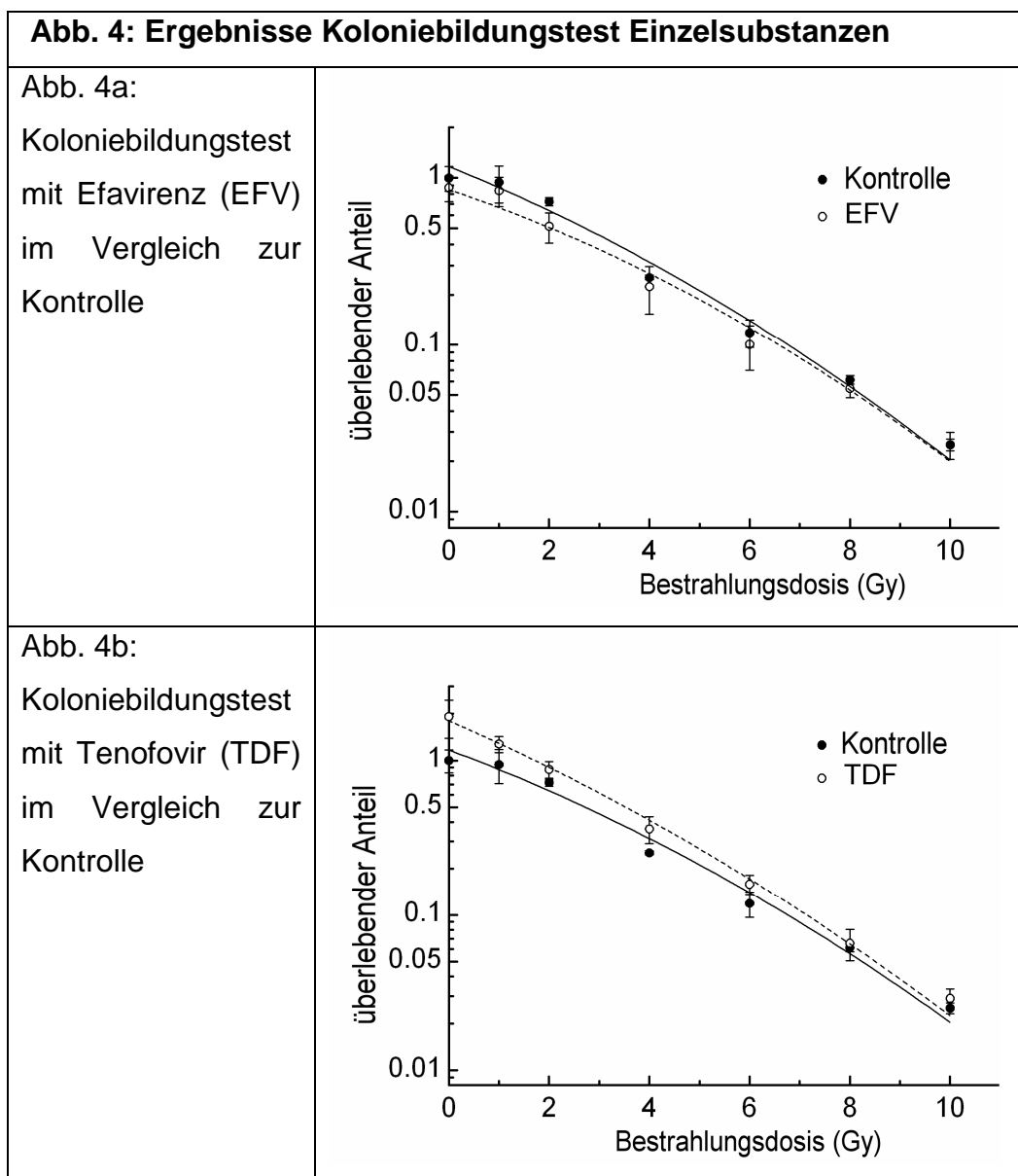
5.1 Koloniebildungstest

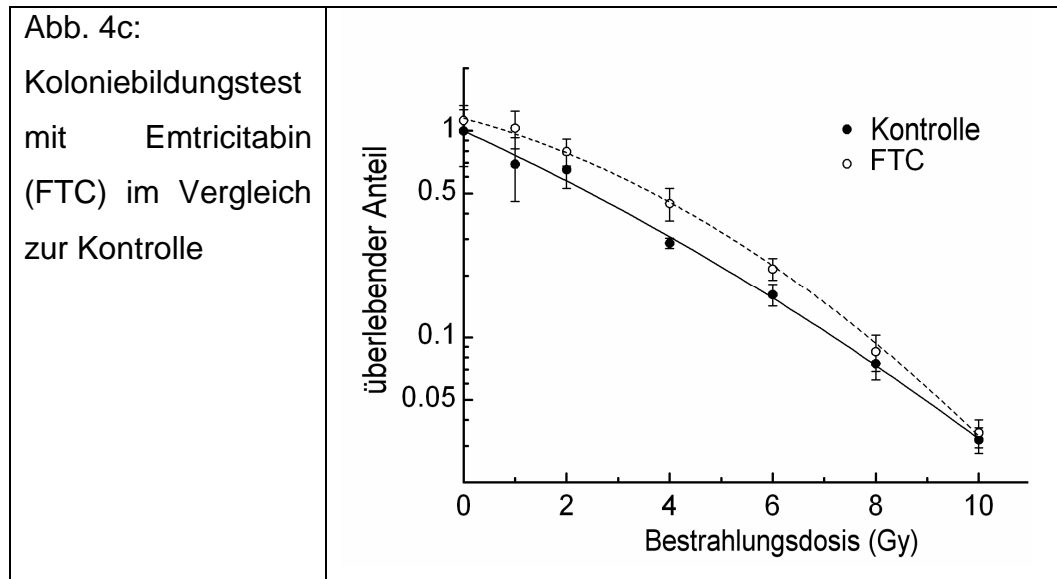
Der Koloniebildungstest ist die klassische Methode zur Untersuchung einer Strahlensensibilisierung. Bei jedem Versuch wurde ein Präparat oder eine Kombination mit einer Kontrolle verglichen. Für alle Versuche wurden die Pankreastumorzellen BxPC-3 verwendet. Die medikamentöse Behandlung erfolgte 24h vor bis 24h nach der Bestrahlung. Die Bestrahlung erfolgte mit den Dosen 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy. Bei der unbehandelten und nicht bestrahlten Kontrolle lag der überlebende Anteil der Pankreastumorzellen bei allen Versuchen zwischen 22% und 41% (Mittelwert 30%). Für jeden Versuch wurde der überlebende Anteil der unbehandelten und nicht bestrahlten Kontrolle definitionsgemäß auf 1 festgelegt und alle anderen Werte als Anteil davon berechnet. Jeder Punkt in den Diagrammen ist ein Mittelwert aus 6 Einzelwerten. Die Standardabweichung wurde aus den 6 Einzelwerten berechnet. Bei der Darstellung als Diagramm wird definitionsgemäß auf einer logarithmischen y-Achse der überlebende Anteil und auf einer linearen x-Achse die Bestrahlungsdosis aufgetragen. Zuerst wurden die Einzelsubstanzen getestet.

Beim nicht-nukleosidischen RTI Efavirenz (EFV) zeigte sich bereits ohne Bestrahlung ein geringerer überlebender Anteil der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt setzt sich auch in Kombination mit Bestrahlung fort (siehe Abb. 4a). Insgesamt liegen alle Werte für EFV unter den Werten der Kontrolle, wobei sich die Standardabweichungen oft überschneiden. Tendenziell ist der Unterschied zwischen EFV und Kontrolle bei niedrigeren Dosen größer als bei hohen Dosen.

Im Gegensatz dazu liegen beim nukleosidischen RTI Tenofovir (TDF) alle Messwerte über der Kontrolle, wobei sich auch hier die Standardabweichungen oft überschneiden. Hier zeigt sich ebenfalls die Tendenz, dass die Unterschiede bei niedrigeren Dosen deutlicher ausgeprägt sind als bei hohen Dosen (siehe Abb. 4b).

Auch für Emtricitabin (FTC) liegen alle Messwerte über der Kontrolle. (siehe Abb. 4c). Allerdings ist der Unterschied im mittleren Dosisbereich am größten. Bei den Standardabweichungen kommt es hier ebenfalls oft zu Überschneidungen.





Danach wurden die drei Substanzen in verschiedenen Kombinationen getestet. Zuerst wurden die beiden im Medikament Truvada® der Firma Gilead Sciences enthaltenen Substanzen miteinander kombiniert: Tenofovir (TDF) + Emtricitabin (FTC). Das Mischverhältnis betrug 1:1. Es zeigt sich, dass bei allen Bestrahlungsdosen die Werte der Kombination TDF+FTC über der Kontrolle liegen (siehe Abb. 5a). Dieser Effekt nimmt mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis zu. Bei den Dosen 4 Gy und mehr sind die Standardabweichungen relativ klar voneinander abzugrenzen.

Um das Medikament Atripla® der Firma Gilead Sciences nachzubilden, sind die drei Substanzen EFV+TDF+FTC miteinander kombiniert worden. Bei dieser Kombination wurden die Substanzen im Verhältnis 1:1:1 vermischt. Die Kurve für diese Kombination liegt im Niedrigdosisbereich unter und im Hochdosisbereich über der Kontrollkurve (siehe Abb. 5b). Die beiden Kurven schneiden sich etwa bei 5 Gy. Bereits ohne Bestrahlung ist der überlebende Anteil bei der Kombination EFV+TDF+FTC deutlich geringer als bei der Kontrolle.

Abb. 5: Ergebnisse Koloniebildungstest Kombinationen

Abb. 5a:
Koloniebildungstest mit der Kombination Tenofovir + Emtricitabin (TDF+FTC) im Vergleich zur Kontrolle

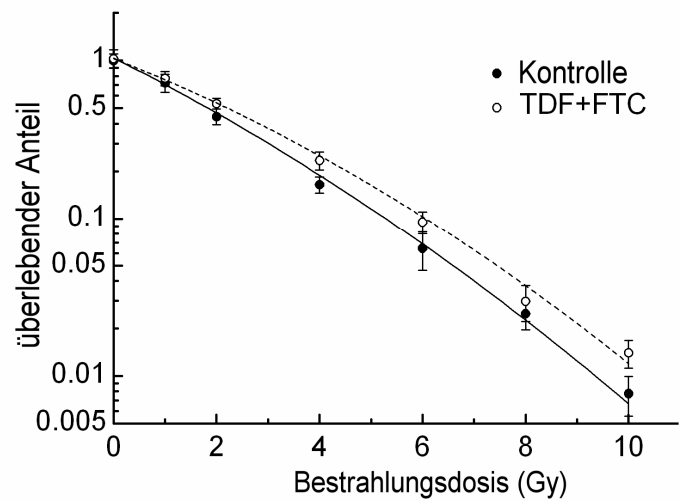
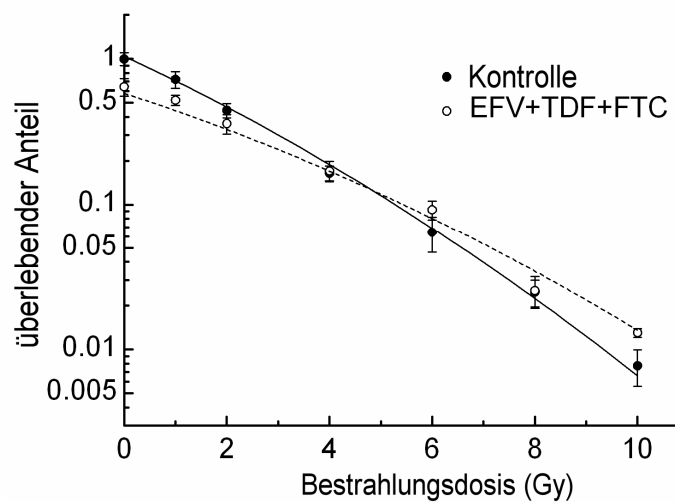


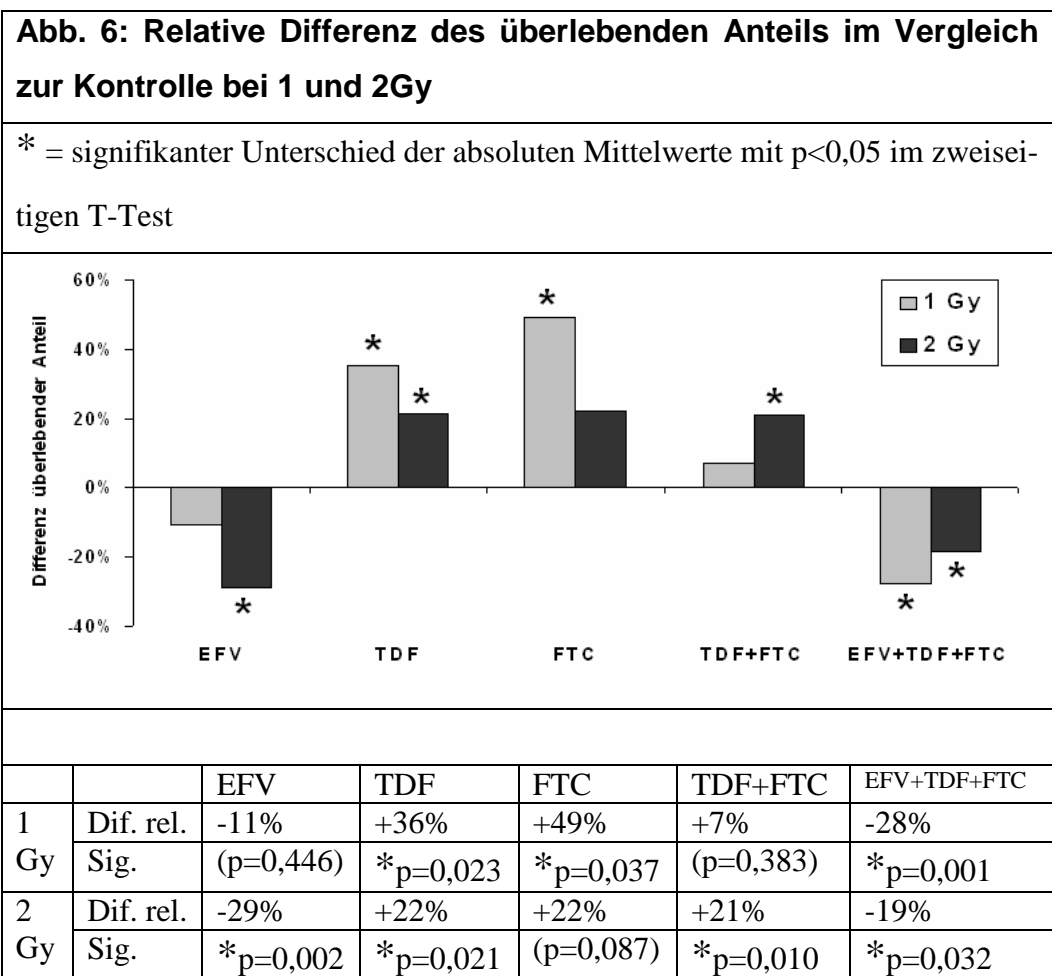
Abb. 5b:
Koloniebildungstest mit der Kombination Efavirenz + Tenofovir + Emtricitabin (EFV+TDF+FTC) im Vergleich zur Kontrolle



In der klinischen Strahlentherapie werden Patienten zur Tumorthherapie in der Regel mit 1,5 bis 2 Gy pro Sitzung bestrahlt (Becker and Bottke 2006; Brunner 2008; Fraunholz et al. 2010). Folglich sind diese Dosen auch bei der hier durchgeführten in vitro Untersuchung von besonderem Interesse. Im folgenden Diagramm sind die überlebenden Anteile für alle Wirkstoffe noch einmal dargestellt. Dabei wurde die Differenz aus medikamentös behandeltem Ansatz und Kontrolle gebildet und als Anteil der Kontrolle berechnet:

$$\frac{X_{\text{Medikament}} - X_{\text{Kontrolle}}}{X_{\text{Kontrolle}}}$$

Folglich ist bei negativem Ergebnis der überlebende Anteil geringer und bei positivem Ergebnis größer als bei der Kontrolle. Diese Berechnung wurde bei jedem Versuch separat bei 1 Gy und 2 Gy durchgeführt. Zudem wurden für 1 Gy und 2 Gy die absoluten Mittelwerte, berechnet aus 6 Einzelwerten, mit einem zweiseitigen T-Test auf Ungleichheit getestet. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gelten als statistisch signifikant unterschiedlich und werden mit einem Sternchen gekennzeichnet.



Es zeigt sich, dass im Bereich von 1 bis 2 Gy bei EFV der überlebende Anteil um 11% bis 29% geringer ist als bei der Kontrolle. Im T-Test zeigt sich beim Wert für 2 Gy eine Signifikanz. Auch bei der Kombination EFV+TDF+FTC überleben 19% bis 28% weniger Zellen als ohne Medikamente. Bei beiden Werten besteht ein signifikanter Unterschied. Hin-

gegen beobachtet man in diesem Dosisbereich bei TDF (+22% bis +36%) und bei FTC (+22% bis + 49%) eine klare Zunahme der überlebenden Zellen. Für TDF sind beide, für FTC der 1Gy-Wert signifikant unterschiedlich. In der Kombination TDF+FTC zeigt sich der gleiche Effekt, wenn auch mit 7% bis 21% geringer ausgeprägt. Dabei besteht bei 2 Gy ein signifikanter Unterschied.

5.2 Flusszytometrische Messungen

Die Flusszytometrischen Messungen wurden durchgeführt um den Einfluss der Medikamente auf den Zellzyklus zu erfassen. Grund für diese Analyse ist, dass Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich strahlenempfindlich sind: Zellen in der S-Phase sind am strahlenresistentesten und Zellen in der G2/M-Phase am strahlenempfindlichsten. In der G1/G0-Phase besteht intermediäre Strahlenempfindlichkeit (Pawlik and Keyomarsi 2004; Sinclair 1968). In den Versuchen wurden die Substanzen EFV, TDF und FTC einzeln und in den Kombinationen TDF+FTC und EFV+TDF+FTC verwendet. Die Kombinationen erfolgten im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:1. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Folglich wurden die Zellen zu dem Zeitpunkt fixiert, als in den anderen Versuchen (Koloniebildungstest und Immunostaining) die Bestrahlung erfolgte. Die Versuche wurden sowohl mit den Pankreastumorzellen BxPC-3 als auch mit den Fibroblasten TE jeweils zweimal durchgeführt. Dabei erfolgten für jede Bedingung jeweils 3 Einzelmessungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den 6 Einzelmesswerten berechnet.

Abb. 7: Auswirkungen der Medikamente auf den Zellzyklus
(* Signifikanz mit $p < 0,001$)

Abb. 7a: Zellzyklus der Fibroblasten TE

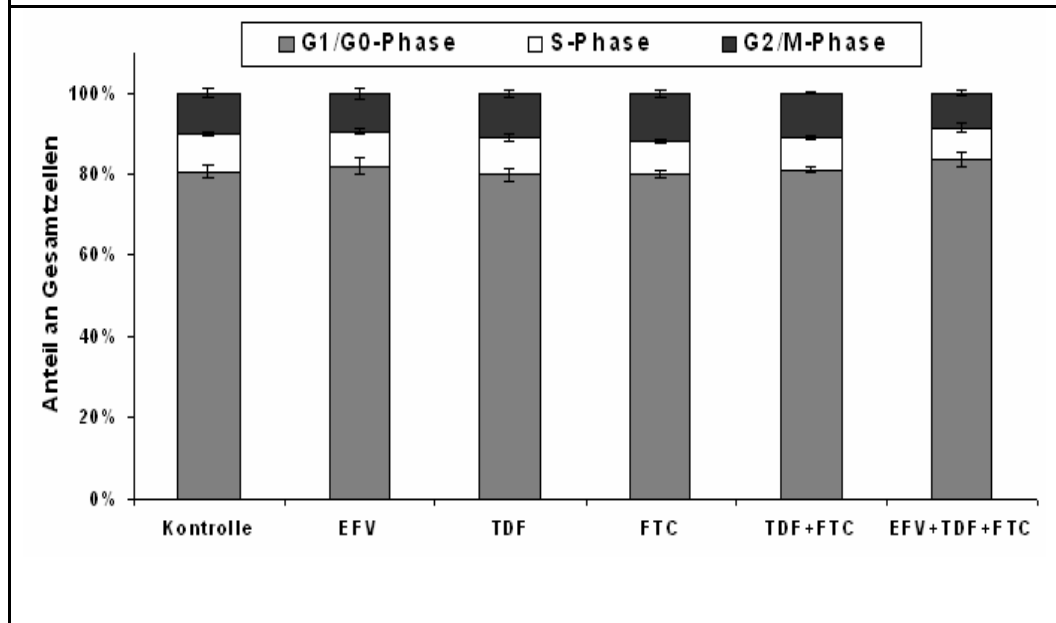
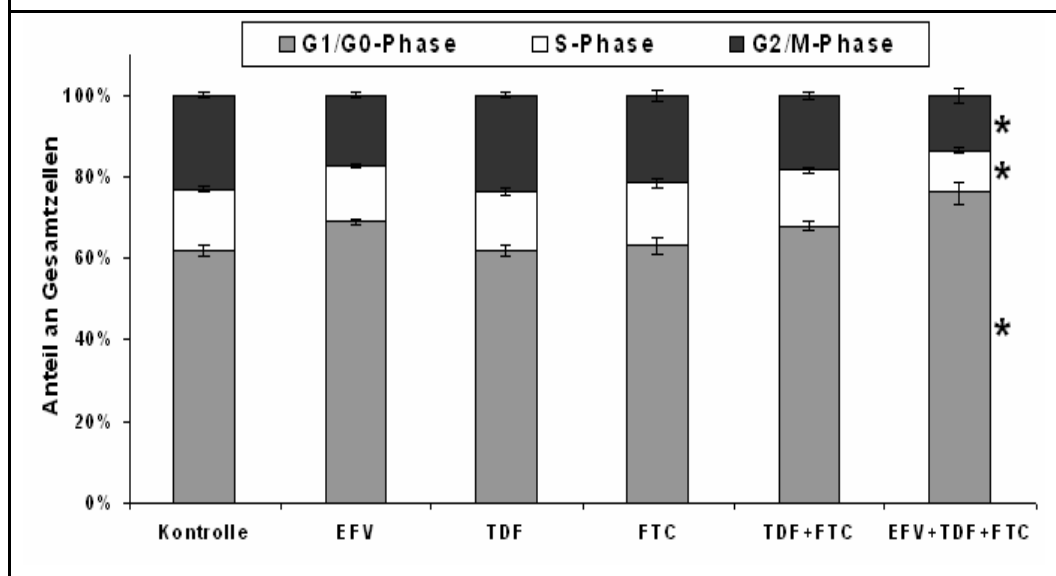


Abb. 7b: Zellzyklus der Pankreastumorzellen BxPC-3



Die Messungen ergeben bei den Fibroblasten TE keine relevanten Veränderungen der Zellzyklusphasen durch die medikamentöse Behandlung (siehe Abb. 7a).

Bei den Pankreastumorzellen BxPC-3 zeigt sich bei der Kombination EFV+TDF+FTC eine Zunahme der Zellzahl in der G0/G1-Phase um 14,3% auf Kosten einer Abnahme der Zellzahl in der S-Phase um 4,6%

und in der G2/M-Phase um 9,7% (siehe Abb. 7b). Diese Daten ergeben in allen drei Zellzyklusphasen beim zweiseitigen T-Test einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt zeigt sich im geringeren Maße auch bei EFV allein und bei der Kombination TDF+FTC. Bei EFV nimmt die G0/G1-Phase um 7,1% zu, wogegen die S-Phase um 1,5% und die G2/M-Phase um 5,6% abnimmt. Bei TDF+FTC nimmt die G0/G1-Phase um 6,1% zu, dagegen die S-Phase um 1,4% und die G2/M-Phase um 4,7% ab.

5.3 Immunostaining

In menschlichen Zellen können durch unterschiedliche Mechanismen DNA-Schäden verursacht werden. Um ihre DNA zu schützen, besitzen die Zellen Schadenerkennungs- und Reparatursysteme. Röntgenstrahlung kann DNA-Doppelstrangbrüche verursachen, die durch das System der ATM-Kinase erkannt und entweder durch das Nicht-homologe End Joining (NHEJ) oder die Homologe Rekombination (HR) repariert werden können. In dieser Arbeit wurden verschiedene Moleküle des Schadenerkennungssystems der ATM-Kinase bei den primären Fibroblasten TE untersucht. Es wurden folgende durch Phosphorylierung aktivierten Faktoren angefärbt: der Schadenssensor NBS1, die Kinase ATM, das Histon H2A.X und der Downstream-Faktor 53BP1 (Czornak et al. 2008; Misteli et al. 2009). Es wurden analog zu den Koloniebildungstesten zuerst der nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor Efavirenz (EFV) und die beiden nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Tenofovir (TDF) und Emtricitabin (FTC) einzeln getestet. Danach wurden die beiden Kombinationen TDF+FTC im Verhältnis 1:1 und EFV+TDF+FTC im Verhältnis 1:1:1 untersucht. Die Substanzen wurden 24h vor der Bestrahlung bis zur Fixierung auf den Zellen belassen. Bei den Versuchen wurde mit 2 Gy bestrahlt. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 24 Stunden Reparaturzeit. Die in den Versuchen verwendeten Fibroblasten besitzen intakte Reparatursysteme. Können diese ungestört arbeiten, so liegen nach 24 Stunden nur noch wenige nicht behobene DNA-Schäden vor. Es soll

untersucht werden, ob durch die Medikamente die Reparatur der DNA behindert wird. Dies würde sich durch einen erhöhten Anteil aktivierter DNA-Reparatursysteme und somit noch nicht behobener DNA-Schäden zeigen.

Bei den Versuchen waren die vier oben genannten phosphorylierten Faktoren der DNA-Reparatur im Zellkern, sichtbar als Foci, von Interesse. Für die Auswertung wurden für jede Versuchsbedingung drei verschiedene Bereiche des Objektträgers photographiert. Danach wurde für alle photographierten Zellen die Anzahl der Foci im Zellkern am PC mit der Biomas Software automatisch ausgewertet. Die Standardabweichung wurde über die Einzelergebnisse der drei Bereiche berechnet. Insgesamt wurden für jede Bedingung mindestens 500 Zellen ausgewertet. Die Summe der jeweiligen Foci wurde durch die Anzahl an ausgewerteten Zellen geteilt. Die daraus resultierende durchschnittliche Anzahl der Foci pro Zelle ist in Abb. 8 für die verschiedenen Faktoren dargestellt.

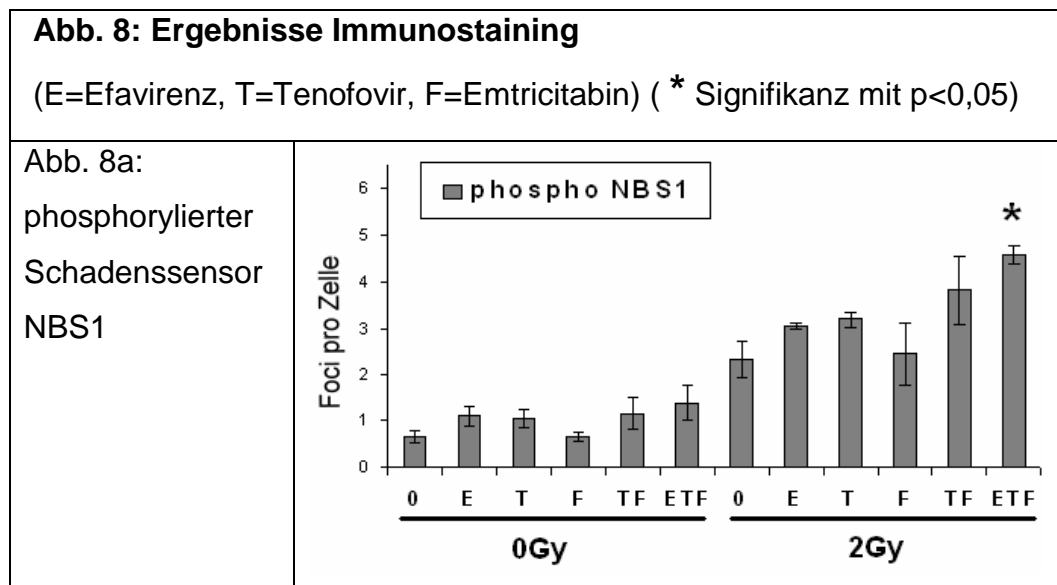
Abb. 8a zeigt die Werte für den phosphorylierten Schadenssensor NBS1. Man erkennt, dass auch ohne Medikamente und ohne Bestrahlung durchschnittlich 0,7 Foci pro Zelle vorliegen. Bei alleiniger Bestrahlung und 24 Stunden Reparaturzeit ist dieser Wert mit 2,3 Foci pro Zelle noch deutlich erhöht. Vergleicht man diesen Wert mit den bestrahlten und mit EFV+TDF+FTC behandelten Zellen, erkennt man einen deutlichen Anstieg auf durchschnittlich 4,6 Foci pro Zelle. Führt man mit den letzten beiden Werten einen zweiseitigen T-Test durch, so ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$. Die beiden Werte sind nach dem statistischen Signifikanz-Kriterium $p < 0,05$ also signifikant unterschiedlich.

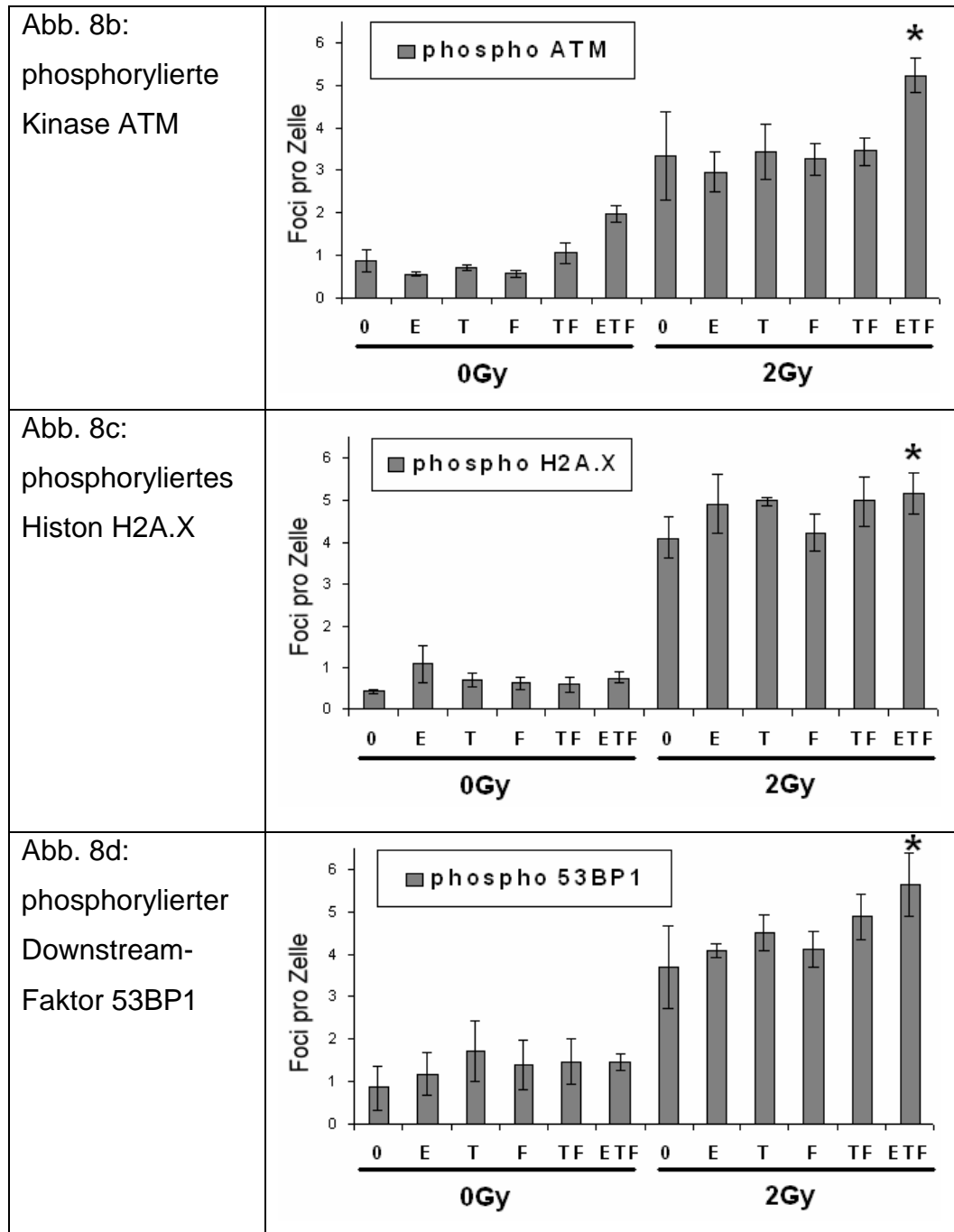
In Abb. 8b sind die Ergebnisse für die phosphorylierte Kinase ATM dargestellt. Auch hier liegen bereits bei der unbehandelten nicht bestrahlten Kontrolle 0,9 Foci pro Zelle vor. Bei der bestrahlten Kontrolle sind durchschnittlich 3,3 Foci pro Zelle vorhanden. Man kann auch hier einen erneuten Anstieg bei Kombination von Bestrahlung und Behandlung mit EFV+TDF+FTC, und zwar auf 5,2 Foci pro Zelle, erkennen.

Vergleicht man die beiden letzteren Werte im zweiseitigen T-Test, liegt mit $p=0,032$ ein signifikanter Unterschied vor.

Abb. 8c zeigt die Anzahl der phosphorylierten Histone H2A.X pro Zelle. Bei den unbehandelten unbestrahlten Zellen findet man durchschnittlich 0,4 Foci pro Zelle. Mit Bestrahlung steigt dieser Wert deutlich auf 4,1 Foci pro Zelle an. Bei den mit EFV+TDF+FTC behandelten und bestrahlten Zellen steigt dieser Wert nochmals leicht auf 5,2 Foci pro Zelle an. Doch trotz dieses geringeren Unterschiedes der beiden letzten Werte ergibt sich im zweiseitigen T-Test eine Signifikanz mit $p=0,034$.

Das letzte untersuchte Protein war der phosphorylierte Downstream-Faktor 53BP1 (siehe Abb. 8d). Ohne Medikamente und Bestrahlung wurden durchschnittlich 0,9 Foci pro Zelle registriert. Bei der bestrahlten Kontrolle stieg dieser Wert auf 3,7 Foci pro Zelle. Werden Bestrahlung und Behandlung mit EFV+TDF+FTC kombiniert, so steigt dieser Wert auf 5,7 Foci pro Zelle. Auch hier unterscheiden sich die beiden letzteren Werte im zweiseitigen T-Test signifikant mit $p=0,030$.





In Abbildung 9 sind diese Ergebnisse noch einmal anders dargestellt. Es wurden separat für jeden untersuchten Faktor die absoluten Unterschiede von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle berechnet. Dabei wurde von den Werten der unbestrahlten medikamentös behandelten Ansätze die unbestrahlte Kontrolle subtrahiert und von den bestrahlten medikamentös behandelten Ansätzen die bestrahlte Kontrolle. Bei den so errechneten Differenzen kommt der Einfluss der Medikamente deut-

licher zum Ausdruck. Zudem lassen sich die medikamentösen Effekte mit und ohne Bestrahlung leichter vergleichen.

Abb. 9: Absolute Differenzen der Foci pro Zelle von unbestrahlter bzw. bestrahlter Kontrolle

Abb. 9a

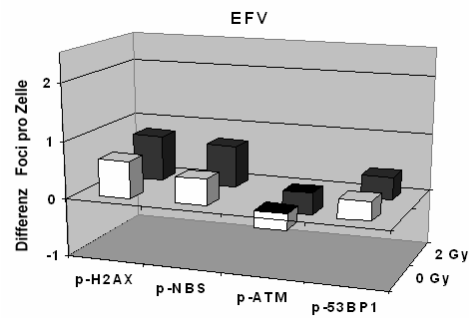


Abb. 9b

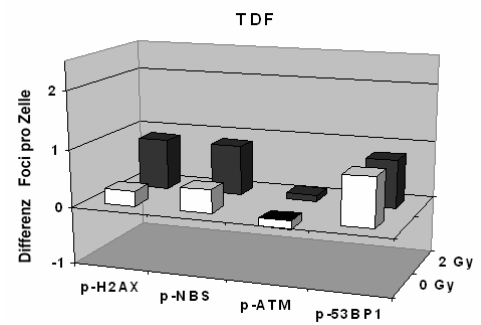


Abb. 9c

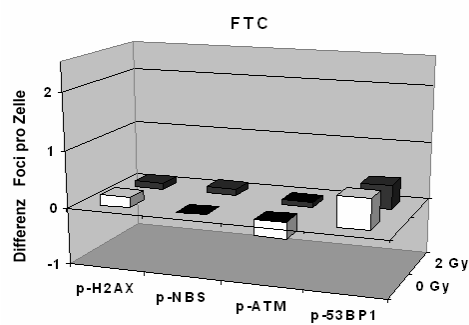


Abb. 9d

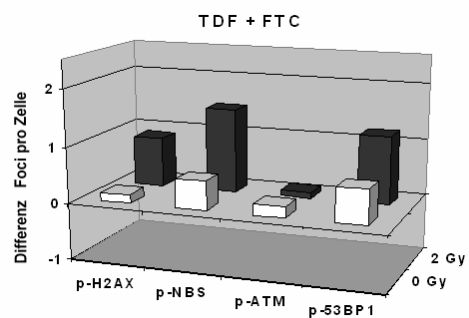
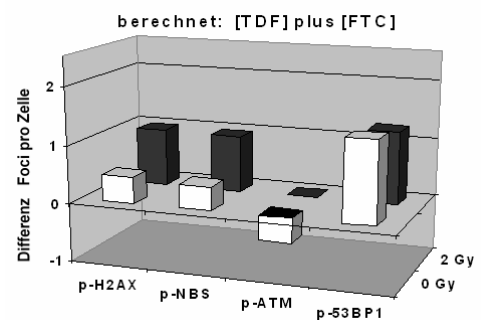
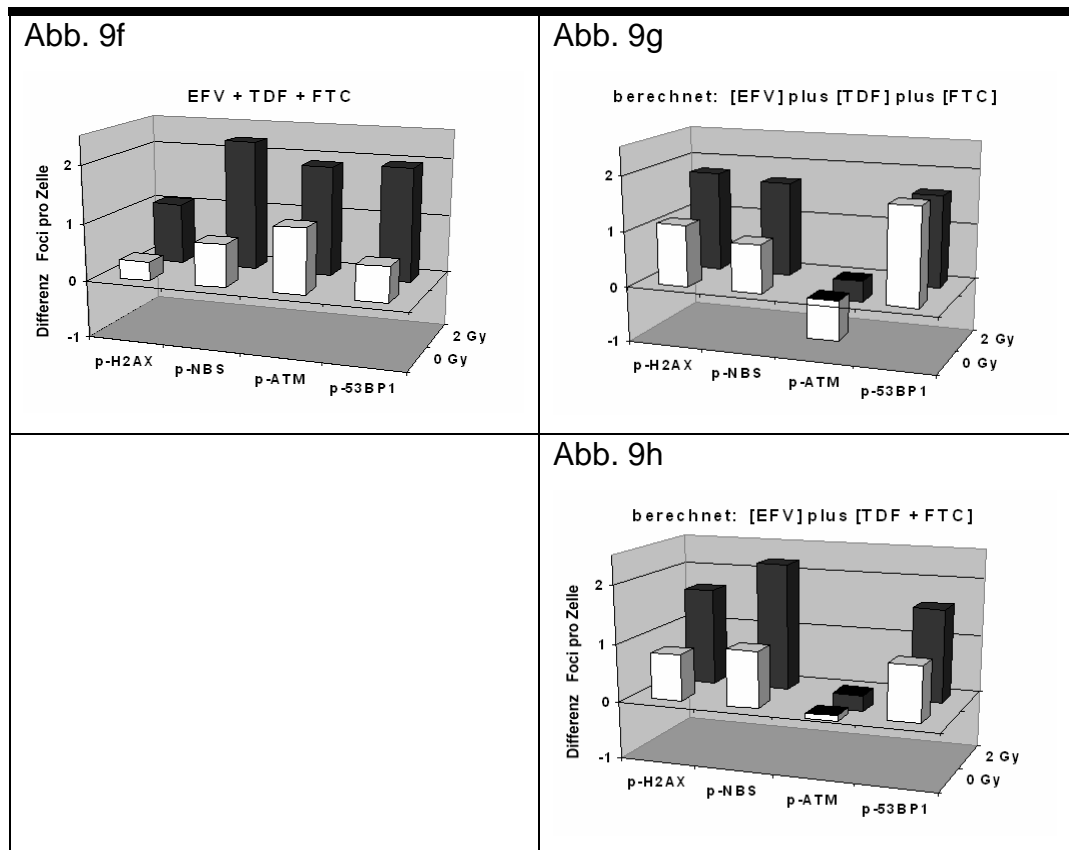


Abb. 9e





In Abb. 9a-c sind die Medikamente einzeln dargestellt. Bei EFV und TDF kommt es bei p-H2AX, p-NBS und p-53BP1 zu einer Zunahme um 0,3 bis 0,9 Foci pro Zelle im Vergleich zu den Kontrollen. p-ATM entspricht bei TDF dem Wert der Kontrolle und nimmt bei EFV sogar um etwa 0,4 Foci pro Zelle ab. In Kombination mit Bestrahlung sind die Effekte etwas stärker ausgeprägt als ohne Bestrahlung. Bei FTC zeigen sich bei p-H2AX, p-NBS und p-ATM keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Lediglich bei p-53BP1 kommt es mit und ohne Bestrahlung zu einer Zunahme um 0,5 Foci pro Zelle.

Abb. 9d zeigt die gemessenen Veränderungen bei der Kombination TDF+FTC im Vergleich zu den Kontrollen. In Abb. 9e wurden die einzeln gemessenen Werte für TDF (Abb. 9b) und für FTC (Abb. 9c) mathematisch addiert. Insgesamt entsprechen die tatsächlich gemessenen Werte den berechneten Erwartungswerten relativ gut. Wie erwartet sind die Faktoren p-H2AX, p-NBS und p-53BP1 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Quantitativ findet sich in Kombination mit Bestrahlung bei p-H2AX eine Zunahme um 0,9 Foci pro Zelle, bei p-NBS um 1,5 Foci pro

Zelle und bei p-53BP-1 um 1,2 Foci pro Zelle. Vergleicht man die bestrahlten mit den unbestrahlten Ansätzen, fällt auf, dass in Kombination mit Bestrahlung die Effekte der Wirksubstanzen stärker ausgeprägt sind als ohne Bestrahlung. Bei p-ATM bestehen verglichen mit den Kontrollen keine großen Unterschiede.

In Abb. 9f sind die Veränderungen bei EFV+TDF+FTC im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Man kann auch hier erkennen, dass die Effekte dieser Wirkstoffe mit Bestrahlung deutlicher ausgeprägt sind als ohne. Quantitativ erfasst man bei der Kombination von EFV+TDF+FTC mit Bestrahlung die stärkste Zunahme der Foci pro Zelle im Vergleich zur Kontrolle: bei p-H2AX um 1,0 Foci pro Zelle, bei p-NBS um 2,2 Foci pro Zelle, bei p-ATM um 1,9 Foci pro Zelle und bei p-53BP1 um 2,0 Foci pro Zelle. In Abb. 9g und 9h sind die Erwartungswerte für EFV+TDF+FTC aus den Einzelmessungen für die drei Substanzen, bzw. aus der Messung für EFV und der Kombination TDF+FTC berechnet. Für p-H2AX, p-NBS und p-53BP1 sind die berechneten Werte den tatsächlich gemessenen relativ ähnlich. Allerdings müsste nach den Berechnungen für p-ATM die Anzahl der Foci pro Zelle im Vergleich zu den Kontrollen konstant bleiben oder sogar abnehmen. Hingegen wurde im durchgeführten Versuch eine Zunahme um 1,1 Foci ohne und um 1,9 Foci mit Bestrahlung gemessen.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamenten auf therapeutische Bestrahlung untersucht. Eine strahlensensibilisierende Wirkung durch Medikamente hätte zwei wichtige Konsequenzen für die Klinik: Zum einen müsste bei Patienten unter entsprechender Medikation die antiretrovirale Therapie vorher umgesetzt werden, um schwere Nebenwirkungen zu vermeiden. Zum anderen könnten solche Medikamente gezielt vor Bestrahlungen als Radiosensitizer eingesetzt werden, um die Wirkung der Bestrahlung auf einen Tumor zu verstärken. Liegt ein strahlenschützender Effekt der Medikamente vor, so würde bei Bestrahlungen das Normalgewebe, aber auch der Tumor weniger geschädigt. Folglich könnten trotz komplett verabreichter Strahlendosis Tumorzellen überleben und zu einem Tumorrezidiv führen.

Einige in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamente wurden bereits in Kombination mit Bestrahlung untersucht (Copaceanu et al. 1995; Cuneo et al. 2007; Zhou et al. 2007). Die meisten Daten liegen zum ersten gegen HI-Viren wirksamen Medikament Zidovudin (=Azidothymidin =AZT) vor. Dieses Medikament gehört zur Gruppe der Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI). Bereits drei Jahre nachdem die Wirkung von AZT gegen das HI-Virus festgestellt wurde (Mitsuya 1985), stellte man den strahlensensibilisierenden Effekt dieses Medikaments im Koloniebildungstest fest (Hiraoka et al. 1988). Dieses Ergebnis konnte durch darauf folgende Untersuchungen bestätigt werden (Jagetia et al. 2003; Jagetia et al. 2000). Allerdings ist der Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt: Es wurde festgestellt, dass AZT von DNA-Polymerasen in die menschliche DNA eingebaut werden kann (Copeland et al. 1992). Bei Kombination von Bestrahlung und AZT konnte gezeigt werden, dass sofort nach Bestrahlung der DNA-Schaden bei den mit AZT behandelten Zellen gleich dem der unbehandelten Zellen ist. Allerdings wurden die DNA-Schäden bei den mit AZT

behandelten Zellen verzögert und nicht komplett repariert, was für eine Behinderung des DNA-Reparatursystems spricht (Zhou 2007). In einigen Studien wurde gezeigt, dass sich AZT in Mitochondrien einlagern kann (Nusbaum et al. 1996), die dortige Polymerase-gamma hemmt (Lewis et al. 1994) und von dieser auch in die mitochondriale DNA eingebaut werden kann (Lim et al. 2001). Ebenfalls wurde als Wirkmechanismus von AZT die Inhibition von Telomerasen genannt (Zhou 2007). Gegen alle diese Untersuchungen, wird allerdings auch in einer Arbeit ein strahlenschützender Effekt von AZT beschrieben (Copaceanu 1995). In einer aktuellen Übersichtsarbeit werden die oben beschriebenen Effekte des Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitors (NRTI) AZT als parallel ablaufende Interaktionen angenommen (Olivero 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit einige neuere Reverse-Transkriptase-Inhibitoren hinsichtlich strahlensensibilisierender Effekte untersucht. Es wurden die beiden Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) Tenofovir (TDF) und Emtricitabin (FTC) und der nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) Efavirenz (EFV) ausgewählt. Diese drei Substanzen werden auch als Kombinationsmedikament TDF+FTC unter dem Handelsnamen Truvada® und EFV+TDF+FTC unter dem Handelsnamen Atripla® hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkstoffe einzeln und in den genannten Kombinationen mit verschiedenen Methoden auf strahlensensibilisierende Effekte getestet.

Der Koloniebildungstest ist die klassische Methode zum Nachweis einer Strahlensensibilisierung. Liegt die Versuchskurve unter der Kontrollkurve, spricht dies für eine Strahlensensibilisierung, liegt sie über der Kontrollkurve, so handelt es sich um einen strahlenschützenden Effekt (Copaceanu 1995; Kim et al. 2010). In den hier durchgeführten Koloniebildungstesten mit Pankreastumorzellen zeigten sich bei den Wirkstoffen unterschiedliche Effekte. Die Bestrahlungskurve von EFV lag unter der Kontrollkurve, was für eine Strahlensensibilisierung spricht. Die Kurven von TDF und FTC lagen über der Kontrolle, diese Substan-

zen haben also im Koloniebildungstest strahlenschützenden Effekt. Bei der Kombination der beiden in Truvada® enthaltenen Substanzen TDF+FTC lag die Kurve ebenfalls über der Kontrolle, also ist auch diese Kombination strahlenschützend. Kombiniert man die drei in Atripla® enthaltenen Wirkstoffe EFV+TDF+FTC miteinander, so liegt die Kurve im Dosisbereich bis 5 Gy unter und im Dosisbereich über 5 Gy über der Kontrollkurve. Somit überwiegt im Niedrigdosisbereich der strahlensensibilisierende Effekt von EFV und im Hochdosisbereich der strahlenschützende Effekt von TDF+FTC. Besonders interessant sind die in der Klinik zur Tumorbestrahlung verwendeten Dosen im Bereich von 1 Gy bis 2 Gy (siehe Abb. 6). TDF und FTC sind als Einzelsubstanzen sowie in Kombination strahlenschützend. Beurteilt man die absoluten Effekte, verstärkt sich die strahlenschützende Wirkung von TDF und FTC in Kombination nicht. Das bedeutet für die Klinik, dass bei Patienten unter dieser Medikation bei Tumorbestrahlungen mit der Standarddosis möglicherweise nicht alle Tumorzellen abgetötet werden und Tumorrezidive auftreten können. Hingegen ist EFV in diesem Dosisbereich sowohl als Einzelsubstanz, als auch in Kombination mit TDF+FTC strahlensensibilisierend. Das bedeutet, dass bei Einnahme von EFV bei Bestrahlungen immer mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate beim Patienten gerechnet werden muss. Möglicherweise kann EFV auch gezielt vor Tumorbestrahlungen als Radiosensitizer eingesetzt werden.

Die im Koloniebildungstest festgestellten Effekte können auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Es ist schon lange bekannt, dass Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen verschieden strahlensensibel sind: Zellen in der S-Phase sind am strahlenresistentesten, Zellen in der G1/G0-Phase sind intermediär strahlensensibel und Zellen in der G2/M-Phase sind am empfindlichsten gegenüber radioaktiver Bestrahlung (Pawlik and Keyomarsi 2004; Sinclair 1968). So wäre eine nahe liegende Erklärung der im Koloniebildungstest festgestellten strahlensensibilisierenden Effekte bei EFV eine Kumulation der Zellen in der G2/M-Phase oder eine Abnahme der Zellen in der S-Phase. Die strahlenschützenden Effekte von TDF und FTC könnten über eine Kumulati-

on der Zellen in der S-Phase oder eine Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase erklärt werden. Um dies zu untersuchen wurden Zellzyklusanalysen mittels Flusszytometrie durchgeführt. Dazu wurde die DNA der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt und über den quantitativen DNA-Gehalt die momentane Zellzyklusphase bestimmt. Die Färbung der Zellen erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit, also zu dem Zeitpunkt, zu dem bei den anderen Versuchen (Koloniebildungstest und Immunostaining) die Bestrahlung durchgeführt wurde. Bei den Fibroblasten TE wurde weder bei den Einzelsubstanzen EFV, TDF und FTC noch in den Kombinationen TDF+FTC und EFV+TDF+FTC eine Beeinflussung der Zellzyklusphasen festgestellt. Bei den Pankreastumorzellen BxPC-3 zeigte sich bei der Kombination EFV+TDF+FTC eine Zunahme der Zellzahl in der G0/G1-Phase um 14,3% auf Kosten einer Abnahme der Zellzahl in der S-Phase um 4,6% und der G2/M-Phase um 9,7%. Diese Verschiebung in den Zellzyklusphasen zeigte sich im geringeren Maße auch bei EFV allein und bei der Kombination TDF+FTC. Bezüglich der Strahlensensibilität kann man feststellen, dass eine Kumulation der Zellen in der intermediär strahlensensiblen G1/G0-Phase auf Kosten der hoch strahlensensiblen G2/M-Phase und der relativ strahlenresistenten S-Phase erfolgt. Aus diesen Verschiebungen im Zellzyklus resultiert insgesamt also eine gleich bleibende Strahlensensibilität der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrolle. So kann weder bei den Fibroblasten TE noch bei den Pankreastumorzellen BxPC-3 eine Strahlensensibilisierung durch Verschiebungen in den Zellzyklusphasen erklärt werden.

Um den Mechanismus dieser Beobachtungen genauer erfassen zu können, wurde Immunostaining von verschiedenen Faktoren der DNA-Schadenserkenung durchgeführt. Hierfür wurde eine Fibroblasten-Zelllinie verwendet. Grundsätzlich gibt es zwei Schadenserkenungssysteme für die unterschiedlichen DNA-Schäden, das System der ATM-Kinase und das System der ATR-Kinase. DNA-Doppelstrangbrüche zählen zu den gefährlichsten Schäden für die Zelle und können durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlung verursacht werden. Sie werden vom

Schadenerkennungssystem der ATM-Kinase erkannt, die daraufhin die DNA-Reparatur starten, den Zellzyklus anhalten oder die Apoptose einleiten kann.

Im folgenden Abschnitt wird der detaillierte Ablauf dieses Systems geschildert: Ausgangspunkt ist ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB). Die eigentliche Erkennung des DSB erfolgt durch den sog. MRN-Komplex. Dieser Komplex besteht aus den drei Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 (=NBN), die sich an den DSB anlagern. Die Kinase ATM liegt im Zellkern als inaktives Dimer vor. Lagert sich ATM an den MRN-Komplex an, teilt es sich in Monomere und aktiviert sich selbst durch Autophosphorylierung. Danach phosphoryliert die aktive Kinase ATM das Histon H2AX. An dieses phosphorylierte Histon kann der Mediator MDC1 binden. Er bewirkt die Rekrutierung weiterer aktivierter ATM Kinasen. Dies führt zur Phosphorylierung weiterer H2AX bis einige Megabasenpaare entfernt vom eigentlichen DNA-Schaden und somit zu einer deutlichen Signalverstärkung. Zudem fördert der Mediator MDC1 zusammen mit dem phosphorylierten Histon H2AX die Anlagerung des Signaltransduktors 53BP1, der unter anderem den Zellzyklus beeinflussen kann. Die Schlüsselrolle in diesem Geschehen spielt dennoch die Kinase ATM: Sie kann die oben beschriebenen Faktoren NBS1, MRE11, MDC1, H2AX und 53BP1 durch Phosphorylierungen in ihrer Aktivität beeinflussen. Darüber hinaus kann ATM die entscheidenden Proteine für das Verhalten der Zelle nach DNA-Schädigung durch Phosphorylierung aktivieren: über CHK2 kann ein Zellzyklusblock in der S- oder G2-Phase ausgelöst werden, über SMC1 kann die DNA-Reparatur gestartet werden, über p53 ein G1-Block oder bei schweren Schäden Apoptose oder Seneszenz eingeleitet werden. Seneszenz ist ein Zustand der Zelle, in dem sie zwar noch ihre Funktion ausüben kann, aber nie wieder ihre DNA replizieren und sich teilen kann (Czornak 2008; FitzGerald et al. 2009; Kim et al. 2006; Misteli and Soutoglou 2009; Zgheib et al. 2005). Zgheib et al. 2005 beschreibt noch weitere Funktionen des Proteins 53BP1: Dieses Protein könne auch ohne vorliegende DNA-Doppelstrangbrüche Chromatinveränderungen

im Zellkern erkennen und unabhängig von MRN-Komplex die Kinase ATM aktivieren. Das würde bedeuten, dass das oben beschriebene System nach diesen Erkenntnissen über zwei Wege aktiviert werden könnte.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich durch Phosphorylierung aktivierte Faktoren untersucht: Der primäre Schadenssensor NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrom 1 / Nibrin), die Kinase ATM (Ataxia teleangiectasia mutated), das Histon H2AX und der Downstream-Faktor 53BP1 (p53 Binding Protein 1). Im Versuch wurden bei den Fibroblasten durch Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung unter anderem DNA-Doppelstrangbrüche verursacht. Die Zellen hatten 24 Stunden Zeit um diese zu reparieren, bevor die Fixierung und Färbung erfolgte. Man kann davon ausgehen, dass es sich bei nach 24 Stunden nicht reparierten Schäden um schwere Schäden handelt. Vergleicht man in Abb. 8 die unbestrahlte Kontrolle mit der bestrahlten Kontrolle, so stellt man fest, dass bei der bestrahlten Kontrolle immer noch alle vier Faktoren der DNA-Schadenserkenkung erhöht sind. In dieser Arbeit soll allerdings der Einfluss der antiretroviralen Wirkstoffe EFV, TDF und FTC auf die DNA-Reparatur untersucht werden. Vergleicht man die mit EFV+TDF+FTC behandelten und bestrahlten Zellen mit der bestrahlten Kontrolle, so zeigt sich bei allen vier Faktoren ein signifikanter erhöhter Wert. Es liegen also bei den mit EFV+TDF+FTC behandelten und bestrahlten Zellen nach 24 Stunden noch mehr DNA-Schäden vor als bei der Kontrolle, was für eine Strahlensensibilisierung spricht. Für die genauere Auswertung der Unterschiede wurde getrennt für jeden Faktor von allen medikamentös behandelten unbestrahlten Zellen die unbestrahlte Kontrolle und von allen medikamentös behandelten bestrahlten Zellen die bestrahlte Kontrolle subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Beim NNRTI EFV und beim NRTI TDF treten ähnliche Effekte auf. Mit und ohne Bestrahlung kommt es zu einem Anstieg von p-NBS, p-H2AX und p-53BP1, wogegen p-ATM leicht abnimmt bzw. konstant bleibt. Der Anstieg bei den bestrahlten Zellen beträgt etwa 0,7 Foci pro Zelle. Beim NRTI FTC steigt isoliert p-53BP1 leicht an

und die anderen Faktoren entsprechen der Kontrolle. Beim Versuch zur Kombination von TDF+FTC, den in Truvada® enthaltenen Substanzen, zeigt sich mit und ohne Bestrahlung ein Anstieg von NBS, p-H2AX und p-53BP1, während ATM konstant bleibt. Hier beträgt der Anstieg bei den bestrahlten Zellen etwa 1 Foci pro Zelle. Zum Vergleich wurde diese Wirkstoffkombination durch mathematische Addition der Einzelversuche berechnet. Die beiden Ergebnisse sind sich relativ ähnlich. Bei der Kombination der drei in Atripla® enthaltenen Wirksubstanzen EFV+TDF+FTC kommt es dagegen ohne und mit Bestrahlung zum Anstieg aller vier Faktoren der DNA-Schadenserkennung. Betrachtet man die Quantität, so liegt hier bei den bestrahlten Zellen mit Anstiegen um 1 Foci bei p-H2AX und um etwa 2 Foci bei p-NBS, p-ATM und p-53BP1 die größte Steigerung vor. Vergleicht man das Ergebnis mit den berechneten Vorhersagen, fällt eine unerwartete Erhöhung von p-ATM im durchgeführten Versuch ohne und mit Bestrahlung auf. Man kann daraus folgern, dass durch die Wirkstoffkombination EFV+TDF+FTC entweder ATM direkt oder ein Signalweg, an dem ATM beteiligt ist, beeinflusst wird. Möglicherweise erfolgt die ATM-Aktivierung über den von Zgheib et al. 2005 vermuteten und oben beschriebenen Signalweg. Zusammengefasst zeigen die Immunostaining-Versuche, dass bei der Kombination von EFV+TDF+FTC mit Bestrahlung nach 24 h signifikant mehr DNA-Schäden vorliegen als bei alleiniger Bestrahlung. Dieses Ergebnis weist wie das Ergebnis des Koloniebildungstests auf eine strahlensensibilisierende Wirkung der drei in Atripla® enthaltenen Substanzen EFV+TDF+FTC in Kombination hin. Man muss also davon ausgehen, dass es bei Patienten, die diese Medikamentenkombination einnehmen, bei Bestrahlung häufiger zu schweren Nebenwirkungen kommen kann. Dieses Ergebnis ist für die Strahlentherapeuten in der Klinik insofern bedeutend, da das Kombinationspräparat Atripla® (EFV+TDF+FTC) in Zukunft wahrscheinlich häufiger bei Patienten eingesetzt wird. Der Grund dafür ist, dass bei diesem HAART-Schema (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) der Patient nur eine Tablette am Tag einnehmen muss. Die Wirksamkeit dieser täglichen Einmaldosis ist

neuen Studien zufolge genauso gut wie bei anderen komplizierteren antiretroviralen Therapieschemata, bei denen die Patienten verschiedene Tabletten mehrmals täglich einnehmen müssen (Dejesus 2009; Goicoechea and Best 2007).

Neben den Reverse-Transkriptase-Inhibitoren wurde auch bei einigen in der HIV-Therapie verwendeten Protease-Inhibitoren eine strahlensensibilisierende Wirkung nachgewiesen. Allerdings kommt diese über komplett andere Signalwege zustande als bei den oben beschriebenen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Cuneo 2007; Pajonk 2002). Die Protease-Inhibitoren wurden sogar schon in einer klinischen Studie als Radiosensibilisatoren bei Tumorpatienten getestet (Bernhard et al. 2008; Brunner 2008).

Betrachtet man alle diese Ergebnisse, kann man sagen, dass viele HIV-Patienten unter HAART strahlensensibilisierende Medikamente in ihrem Therapieregime haben. Aufgrund dieser Erkenntnisse müsste man annehmen, dass bei Bestrahlung von HIV-Patienten unter HAART häufig mit sehr starken Nebenwirkungen aufgrund von Strahlensensibilisierung gerechnet werden muss. Tatsächlich wurden aber nur wenige Einzelfallberichte über verheerende strahlenbedingte Nebenwirkungen bei HIV-Patienten publiziert (Chapman et al. 2009). Die meisten Patientenstudien zur Bestrahlung von HIV-Patienten liegen zum Analkarzinom vor. Das liegt zum einen daran, dass beim Analkarzinom die Radiochemotherapie die Standardtherapie darstellt (Gervaz 2008). Zum anderen sind HIV-positive Personen häufiger mit dem karzinogenen Human Papilloma Virus, kurz HPV, infiziert, das eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese des Analkarzinoms spielt (Rapose 2009). Es liegen vier aktuelle Studien zur Radiochemotherapie des Analkarzinoms bei HIV-Patienten vor. In allen vier Studien wurde als Chemotherapie die Kombination 5-Fluorouracil plus Mitomycin C eingesetzt. Endergebnis aller vier Studien ist, dass HIV-positive Patienten die gleiche Standardtherapie wie HIV-negative Patienten erhalten sollten (Fraunholz 2010; Oehler-Janne et al. 2006; Seo et al. 2009; Wexler et al. 2008). Bei allen vier Studien sind allerdings jeweils nur 10 bis 32 HIV-positive

Patienten eingeschlossen. Betrachtet man die genauen Daten, so wurden in einer Studie bei HIV-Patienten doppelt so häufig Grad 3-4 Toxizitäten festgestellt wie bei der Vergleichsgruppe, was wegen der niedrigen Patientenzahl allerdings nicht signifikant war (Oehler-Janne 2006). In drei Studien wurde eine erhöhte Hämatotoxizität der Radiochemotherapie bei HIV-Patienten festgestellt (Oehler-Janne 2006; Seo 2009; Wexler 2008), was allerdings wegen der geringen Patientenzahlen meist nicht signifikant war. In der größten dieser Studien mit 32 Patienten traten bei 48% der HIV-Patienten bei Radiochemotherapie Hämatotoxizität 4. Grades auf und bei mehr als zwei Drittel der Patienten musste die Strahlentherapie wegen Nebenwirkungen unterbrochen werden (Wexler 2008). Problematisch bei allen 4 Studien ist, dass die aufgetretenen Nebenwirkungen nie mit der antiretroviralen Medikation in Beziehung gesetzt wurden. In einer aktuellen Übersichtsarbeit wird deshalb empfohlen, dass bei HIV-Patienten alle Bestrahlungen nach dem Standardschema erfolgen sollten und die Patienten lediglich hinsichtlich Schleimhautreaktionen und Blutbildungsstörungen engmaschig überwacht werden sollten (Housri et al. 2010).

Berücksichtigt man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sollten darüber hinaus beim Therapieschema EFV+TDF+FTC oder anderen strahlensensibilisierenden Medikamenten weitere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Eine Möglichkeit wäre das antiretrovirale Therapieschema vor Bestrahlung auf nicht-strahlensensibilisierende Medikamente umzustellen, was allerdings hinsichtlich der viralen Kontrolle und somit des Immunstatus des Patienten zu Einbußen führen könnte. Eine elegantere Methode ist deshalb die individuelle Strahlenempfindlichkeit des entsprechenden Patienten vor der Bestrahlung zu testen. Dazu muss dem Patienten lediglich Blut abgenommen werden, das bestrahlt wird und danach mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) hinsichtlich Chromosomenschäden analysiert wird. Mit dieser Methode wird beim Patienten neben der aktuellen Medikation auch die anlagebedingte Anfälligkeit gegenüber Bestrahlung erfasst (Distel et al. 2006; Keller et al. 2004). Wenn sich hier erhöhte Strahlenempfindlichkeit

zeigt, sollte die antiretrovirale Therapie des Patienten vor Bestrahlung unbedingt auf nicht-strahlensensibilisierende Medikamente umgestellt werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
AZT	3'-Azido-3'-deoxythymidin =Azidothymidin = Zidovudin
BSA	bovine serum albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EFV	Efavirenz
FBS	fetal bovine serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisation
FTC	Emtricitabin
Gy	Gray
H2AX	phosphoryliertes Histon 2ax
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MRE11	meiotic recombination 11
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NEA	non-essential AminoAcids
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase- Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PI	Protease-Inhibitor
RAD50	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase
RTI	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
TBS	tris buffered saline
TDF	Tenofovir
Tween	polyoxyethylene sorbitan monolaurat
53BP1	p53 Binding Protein 1

7.2 Verwendete Lösungen

7.2.1 Medien für Zellkulturen

Tabelle 3: Medium Fibroblasten TE

Substanz	Volumen
Medium F-12 (Firma: Gibco)	500ml
FBS (fetal bovine serum)	60ml (=12%)
NEA (non-essential AminoAcids),	10ml (=2%)
L-Glutamin	5ml (=1%)
Penicillin/Streptomycin	5ml (=1%)

Tabelle 4: Medium Pankreastumorzellen BxPC-3

Substanz	Volumen
Medium DMEN (Firma: PAN Biotech GmbH)	500ml
FBS (fetal bovine serum)	50ml (=10%)
Penicillin/Streptomycin	5ml (=1%)

7.2.2 Lösungen für Immunostaining

Tabelle 5: Fixierlösung

Substanz	Volumen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	89,2ml
Triton X-100	100µl
Formaldehyd (37%)	10,8ml

Tabelle 6: Blocking-Lösung

Substanz	Volumen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	90ml
BSA (bovine serum albumin)	1g
Natriumazid (1mol/l)	0,3ml
FBS (fetal bovine serum)	10ml

8 Literaturverzeichnis

1. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-71.
2. **Becker G, Bottke D.** Radiotherapy in the management of Kaposi's sarcoma. *Onkologie* 2006;29:329-33.
3. **Bernhard EJ, Brunner TB.** Progress towards the use of HIV protease inhibitors in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2008;7:636-7.
4. **Bonnet F, Chene G.** Evolving epidemiology of malignancies in HIV. *Curr Opin Oncol* 2008;20:534-40.
5. **Brunner TB, Geiger M, Grabenbauer GG, Lang-Welzenbach M, Mantoni TS, Cavallaro A, Sauer R, Hohenberger W, McKenna WG.** Phase I trial of the human immunodeficiency virus protease inhibitor nelfinavir and chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:2699-706.
6. **Chapman CH, Shen J, Fillion EJ, Tran PT, Hara W, Asuncion A, Marko D, Wakelee H, Berry GJ, Dimmick KW, Loo BW, Jr., Green J.** Marked tumor response and fatal hemoptysis during radiation for lung cancer in a human immunodeficiency virus-positive patient taking nelfinavir. *J Thorac Oncol* 2009;4:1587-9.
7. **Clifford GM, Franceschi S.** Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4(+) count. *Future Oncol* 2009;5:669-78.
8. **Copaceanu ML, Coucke PA, Cottin E, Paschoud N, Mirimanoff RO.** Azidothymidine (AZT) as a potential modifier of radiation response in vitro. *Acta Oncol* 1995;34:213-8.
9. **Copeland WC, Chen MS, Wang TS.** Human DNA polymerases alpha and beta are able to incorporate anti-HIV deoxynucleotides into DNA. *J Biol Chem* 1992;267:21459-64.
10. **Cuneo KC, Tu T, Geng L, Fu A, Hallahan DE, Willey CD.** HIV protease inhibitors enhance the efficacy of irradiation. *Cancer Res* 2007;67:4886-93.
11. **Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH.** Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* 2008;49:383-96.
12. **Darzynkiewicz Z, Huang X.** Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2004;Chapter 5:Unit 5 7.
13. **Dejesus E, Young B, Morales-Ramirez JO, Sloan L, Ward DJ, Flaherty JF, Ebrahimi R, Maa JF, Reilly K, Ecker J, McColl D, Seeks D, Farajallah A.** Simplification of antiretroviral therapy to a single-tablet regimen consisting of efavirenz, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate versus unmodified antiretroviral therapy in virologically suppressed HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;51:163-74.

14. **Distel LV, Neubauer S, Keller U, Sprung CN, Sauer R, Grabenbauer GG.** Individual differences in chromosomal aberrations after in vitro irradiation of cells from healthy individuals, cancer and cancer susceptibility syndrome patients. *Radiother Oncol* 2006;81:257-63.
15. **Donnerer J, Haas BJ, Kessler HH.** Single-measurement therapeutic drug monitoring of the HIV/AIDS drugs abacavir, zidovudine, lamivudine, efavirenz, nevirapine, lopinavir and nelfinavir. *Pharmacology* 2008;82:287-92.
16. **FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF.** 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans* 2009;37:897-904.
17. **Fraunholz I, Weiss C, Eberlein K, Haberl A, Rodel C.** Concurrent chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and mitomycin C for invasive anal carcinoma in human immunodeficiency virus-positive patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:1425-32.
18. **Gallo RC.** A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. *Retrovirology* 2006;3:72.
19. **Gervaz P, Buchs N, Morel P.** Diagnosis and management of anal cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2008;10:502-6.
20. **Goicoechea M, Best B.** Efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate fixed-dose combination: first-line therapy for all? *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:371-82.
21. **Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A.** Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425-31.
22. **Hiraoka W, Tanabe K, Kuwabara M, Sato F, Matsuda A, Ueda T.** Sensitization of X-irradiated Chinese hamster V79 cells by derivatives of pyrimidine nucleosides. *J Radiat Res (Tokyo)* 1988;29:246-54.
23. **Housri N, Yarchoan R, Kaushal A.** Radiotherapy for patients with the human immunodeficiency virus: are special precautions necessary? *Cancer* 2010;116:273-83.
24. **Jagetia GC, Aruna R.** Correlation of micronuclei-induction with the cell survival in HeLa cells treated with a base analogue, azidothymidine (AZT) before exposure to different doses of gamma-radiation. *Toxicol Lett* 2003;139:33-43.
25. **Jagetia GC, Aruna R, Nayak BS.** Effect of azidothymidine on the radiation-induced LDH release in HeLa cells. *Pharmazie* 2000;55:837-40.
26. **Keller U, Kuechler A, Liehr T, Muller E, Grabenbauer G, Sauer R, Distel L.** Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity. *Strahlenther Onkol* 2004;180:289-96.
27. **Kilmarx PH.** Global epidemiology of HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4:240-6.
28. **Kim IA, Kim IH, Kim HJ, Chie EK, Kim JS.** HDAC inhibitor-mediated radiosensitization in human carcinoma cells: a general phenomenon? *J Radiat Res (Tokyo)* 2010;51:257-63.

29. **Kim JE, Minter-Dykhouse K, Chen J.** Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol Carcinog* 2006;45:403-8.
30. **Lewis W, Simpson JF, Meyer RR.** Cardiac mitochondrial DNA polymerase-gamma is inhibited competitively and noncompetitively by phosphorylated zidovudine. *Circ Res* 1994;74:344-8.
31. **Lim SE, Copeland WC.** Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem* 2001;276:23616-23.
32. **Misteli T, Soutoglou E.** The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:243-54.
33. **Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S.** 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type I-II/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7096-100.
34. **Nusbaum NJ, Joseph PE.** AZT incorporation into mitochondria: study in a human myeloid cell line. *DNA Cell Biol* 1996;15:363-6.
35. **Oehler-Janne C, Seifert B, Lutolf UM, Ciernik IF.** Local tumor control and toxicity in HIV-associated anal carcinoma treated with radiotherapy in the era of antiretroviral therapy. *Radiat Oncol* 2006;1:29.
36. **Olivero OA.** Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:215-23.
37. **Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH.** The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:5230-5.
38. **Pawlik TM, Keyomarsi K.** Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:928-42.
39. **Piasecka A, Distel LV, Schuessler H.** Analysis of radiation- and 5-FU-induced inhibition of cell proliferation by an automatic colony analyser. *Int J Radiat Biol* 1998;74:139-44.
40. **Rapose A.** Human papillomavirus and genital cancer. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009;75:236-43; quiz 243-4.
41. **Rothschild S, Dolder M, Seifert B, Lutolf UM, Ciernik IF.** Radiation therapy for HIV-associated diffuse large cell non-Hodgkin lymphoma. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)* 2009;8:239-48.
42. **Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC.** Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984;224:506-8.
43. **Seo Y, Kinsella MT, Reynolds HL, Chipman G, Remick SC, Kinsella TJ.** Outcomes of chemoradiotherapy with 5-Fluorouracil and mitomycin C for anal cancer in immunocompetent versus immunodeficient patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;75:143-9.
44. **Sinclair WK.** Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res* 1968;33:620-43.

45. **Takahashi M, Ibe S, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Suzuki T, Mamiya N, Hamaguchi M, Kaneda T.** No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients treated with EFV containing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:983-7.
46. **Wainberg MA, Jeang KT.** 25 years of HIV-1 research - progress and perspectives. *BMC Med* 2008;6:31.
47. **Wexler A, Berson AM, Goldstone SE, Waltzman R, Penzer J, Maisonet OG, McDermott B, Rescigno J.** Invasive anal squamous-cell carcinoma in the HIV-positive patient: outcome in the era of highly active antiretroviral therapy. *Dis Colon Rectum* 2008;51:73-81.
48. **Zgheib O, Huyen Y, DiTullio RA, Jr., Snyder A, Venere M, Stavridi ES, Halazonetis TD.** ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol* 2005;76:119-22.
49. **Zhou FX, Liao ZK, Dai J, Xiong J, Xie CH, Luo ZG, Liu SQ, Zhou YF.** Radiosensitization effect of zidovudine on human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:351-6.

9 Danksagung

Diese Dissertation ist im strahlenbiologischen Labor der Strahlenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg entstanden. Hiermit möchte ich allen danken, die an der Durchführung dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Fietkau bedanken, der als Direktor der Strahlenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg diese Dissertation an seinem Institut ermöglicht hat.

Ein großer Dank gilt meinen Betreuern Frau Dr. hum. biol. U. Keller und Herrn PD Dr. med. L. Distel, die mein Interesse für die Strahlentherapie geweckt haben und ohne deren hervorragende Anleitung und Unterstützung diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Auch bei Prof. Dr. med. T. Harrer, der den Anstoß zu diesem Projekt gab und im Verlauf mit vielen Ideen zur Seite stand, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des strahlenbiologischen Labors, die mich immer mit Rat und Tat unterstützt haben. Hervorzuheben sind Frau Elisabeth Müller, Frau Doris Mehler und Frau Renate Sieber, die mir mit viel Geduld die praktische Durchführung sämtlicher Versuchsmethoden beigebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir die Universitätsausbildung und die Dissertation ermöglicht haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Markus Hecht
Geburtsdatum:	18. 02. 1985
Geburtsort:	Tirschenreuth
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Eltern:	Ludwig Hecht Irmgard Hecht, geb. Gmeiner
Geschwister:	Tobias Hecht

Schulausbildung:

Sept. 1991 – Juli 1995	Grundschule Neualbenreuth
Sept. 1995 – Juni 2004	Stiftland-Gymnasium Tirschenreuth, Schulabschluss: Abitur

Zivildienst:

Juli 2004 – März 2005	Zivildienst, Kreiskrankenhaus Waldsassen
-----------------------	--

Studium:

April 2005	Beginn Studium Humanmedizin, Universität Erlangen
März 2007	Erste Ärztliche Prüfung, Universität Erlangen
Mai 2011	Zweite Ärztliche Prüfung, Universität Erlangen

Beruf:

seit Juli 2011	Assistenzarzt für Strahlentherapie, Strahlenklinik Universitätsklinikum Erlangen
----------------	---