

**Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Mario Brock**

Habilitationsschrift

Pro-apoptotische Therapie von Hirntumoren mit Taurolidin - experimentelle und klinische Untersuchungen

**zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Neurochirurgie**

- vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Charité -

**von Dr. med. Rüdiger Stendel
aus Berlin**

eingereicht im Juni 2006

- Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul**
- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Marcos Tatagiba**
 - 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Martina Deckert**

Datum der Habilitation: 22. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
I Einführung	5
I.1 Maligne Gliome	5
I.1.1 Inzidenz	5
I.1.2 Ätiologie und Pathogenese	6
I.1.3 Symptome	8
I.1.4 Komplikationen	9
I.1.5 Bildgebende Diagnostik	10
I.1.6 Differentialdiagnose	11
I.1.7 Therapie	12
I.2 Taurolidin	18
I.2.1 Eigenschaften von Taurolidin und Metaboliten/Derivaten	18
I.2.2 Die antimikrobielle Wirkung von Taurolidin	18
2 Die antineoplastische Wirkung von Taurolidin	21
2.1 Einführung	21
2.1.1 Taurolidin – von der antimikrobiellen zur antineoplastischen Wirkung	21
2.1.2 Apoptose und programmierter Zelltod	22
2.1.3 Programmierter Zelltod und Neoplasie	29
2.2 Fragestellung	30
2.3 Material und Methoden	31
2.3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte	31
2.3.2 Verwendete Zelllinien	32
2.3.3 Verwendete ex vivo Tumorzellen	32
2.3.4 Herstellung von Monolayern aus ex vivo Hirntumoren	32
2.3.5 Herstellung von Zellsuspensionen aus Monolayern	33
2.3.6 Zellzahlbestimmung	33
2.3.7 Kristallviolett-Färbung	33
2.3.8 Bestimmung der EC ₅₀ und der maximalen Zellabtötung	34
2.3.9 Untersuchung der Fas-Ligand Überstände auf die zytotoxische Wirkung	34
2.3.10 Einfluss auf die Tumorzellvitalität und -proliferation	34
2.3.11 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung	34
2.3.12 Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit	35
2.3.13 Einfluss auf die Zellmorphologie	35
2.3.14 Einfluss auf Zellen aus fetalem Rattenhirn	36
2.3.15 Synergismus mit dem durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod	37
2.3.16 Einfluss der Caspaseinhibition auf die antineoplastische Aktivität	37
2.3.17 Untersuchung der Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation	38
2.3.18 Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C - Freisetzung	38
2.3.19 Untersuchung der AIF-Freisetzung	39
2.3.20 Einfluss von SMAC-Peptid	40
2.3.21 Einfluss auf die PARP-Aktivierung	40
2.3.22 Nachweis der DNA-Leiter-Bildung	40
2.3.23 Einfluss von N-Acetylcystein	41
2.3.24 Untersuchung des intrazellulären ATP-Gehaltes	42
2.3.25 Einfluß der Glutathion-Depletion	42
2.3.26 Einfluss von 3-MA	43
2.3.27 Einfluss von 3-MA und Bafilomycin	43
2.3.28 Einfluss auf die VEGF-Expriemierung	43

2.4	Ergebnisse	45
2.4.1	Untersuchung der Fas-Ligand Überstände auf die zytotoxische Wirkung	45
2.4.2	Einfluss auf Tumorzellproliferation und Tumorzellvitalität	46
2.4.3	Konzentrations - und Zeitabhängigkeit der Zellabtötung	49
2.4.4	Einfluss auf die Koloniebildung	51
2.4.5	Einfluss auf die Zellmorphologie	53
2.4.6	Einfluss auf Zellen aus fetalen Rattenhirnen	59
2.4.7	Synergismus mit dem durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod	60
2.4.8	Einfluss einer Caspaseinhibition auf die antineoplastische Aktivität	63
2.4.9	Einfluss auf die Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation	64
2.4.10	Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C Freisetzung	65
2.4.11	Untersuchung der mitochondrialen AIF-Freisetzung	67
2.4.12	Einfluss von SMAC-Peptid	68
2.4.13	Untersuchung zur PARP-Aktivierung	70
2.4.14	Untersuchung auf DNA-Leiterbildung	70
2.4.15	Protektion durch N-Acetylcystein	72
2.4.16	Untersuchung des intrazellulären ATP-Gehaltes	73
2.4.17	Einfluss von DL-Buthioninsulfoxid	74
2.4.18	Einfluss von 3-Methyladenin	76
2.4.19	Einfluss von 3-Methyladenin und Bafilomycin-A1	77
2.4.20	Einfluss auf die VEGF-Exprimierung	78
2.5	Diskussion	80
2.6	Schlussfolgerungen	90
3	Pharmakokinetik von Taurolidin nach intravenöser Gabe	92
3.1	Einführung	92
3.2	Fragestellung	93
3.3	Patienten und Methoden	94
3.3.1	Taurolidin	94
3.3.2	Patienten	94
3.3.3	Entnahme und Aufarbeitung der Proben	94
3.3.4	Nachweis von Taurolidin mit HPLC-MS	94
3.3.5	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit HPLC-MS	98
3.3.6	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit HPLC-MS	98
3.3.7	Nachweis von Taurolidin mit der colorimetrischen Reaktion	98
3.3.8	Bestimmung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit der colorimetrischen Methode	99
3.3.9	Bestimmung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit der colorimetrischen Methode	99
3.3.10	Einfluss des Povidons auf die colorimetrische Reaktion	100
3.3.11	Berechnung pharmakokinetischer Parameter zur Beschreibung der repetitiven Infusion	100
3.4	Ergebnisse	101
3.4.1	Nachweis von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid mit HPLC-MS	101
3.4.2	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit HPLC-MS	102
3.4.3	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit HPLC-MS	104
3.4.4	Nachweis von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid während repetitiver Taurolidin-Infusionen	105
3.4.5	Pharmakokinetische Parameter von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid	106
3.4.6	Nachweis von Taurolidin mit Hilfe der colorimetrischen Reaktion	108
3.4.7	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit der colorimetrischen Methode	111
3.4.8	Untersuchung der Stabilität von Taurolidin in Vollblut mit der colorimetrischen	

Methode	112
3.4.9 Bestimmung von Taurolidin im Serum von Patienten nach repetitiver Infusion mit der colorimetrischen Methode	114
3.4.10 Vergleich der Bestimmungsmethoden	114
3.5 Diskussion	116
3.6 Schlußfolgerungen	118
4 Behandlung des Glioblastoms mit Taurolidin intravenös	120
4.1 Einführung	120
4.2 Fragestellung	123
4.3 Patienten und Methoden	123
4.3.1 Prüfziele	123
4.3.2 Ethik	123
4.3.3 Patienteninformation und Einverständniserklärung	124
4.3.4 Patientenselektion	124
4.3.5 Ablauf der Studie	125
4.3.6 Ermittlung der Wirksamkeit	127
4.3.7 Ermittlung der Sicherheit	130
4.3.8 Statistische Methoden	130
4.4 Ergebnisse	132
4.4.1 Patienten	132
4.4.2 Wirksamkeit und Ansprechverhalten	132
4.4.3 Sicherheit	146
4.5 Diskussion	165
4.6 Schlussfolgerungen	169
5 Zusammenfassung	170
6 Literaturverzeichnis	173
7 Anhang	199
7.1 Abkürzungen	199
7.2 Verwendete Chemikalien und Geräte	202
7.3 Neurologischer Status	205
8 Danksagung	206

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

3-AB	3-Amino-Benzamid
3-MA	3-Methyladenin
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
ADP	Adenosin-Diphosphat
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALAT	Alanin-Amino-Transferase (= GPT Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase (= GOT Glutamat-Oxalacetat-Transaminase)
ATP	Adenosintriphosphat
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitrosourea (Carmustin)
Bf-AI	Bafilomycin AI
bp	Basenpaar
BSO	DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximine
BSO	DL-Buthioninsulfoxid
C	Chromatin
C.elegans	Caenorhabditis elegans
CCNU	Chlorethyl-cyclohexyl-nitrosourea (Lomustin)
CP	Zytoplasma
CT	Computertomographie
Cyt C	Cytochrom-C
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with low PI
DIC	Disseminated Intravasal Coagulation
DMEM	Dulbecco´s Minimal Essential Medium
DNA	Deoxyribo-Nucleid-Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGFR	Epidermal Growth Receptor Factor
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetra-Acetat
EKG	Elektrokardiogramm
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
Fas-Ligand-SN	Fas-Ligand-Supernatant
FCS	Fetal Calf Serum
FDG-PET	Fluordeoxyglucose-Positronenemissionstomographie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie

GSH	Reduziertes Glutathion
HEPES	N-(2hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	Interleukin 1 Converting Enzyme
IMT-SPECT	I 23-Iod-Methylthirosin-Single-Photon-Emission-Computed Tomography
KM	Kontrastmittel
LOH	Loss Of Heterogenity
MBq	Mega-Bequerel
MDM2	Murine Double Minute 2
MRS	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massen Spektroskopie
MV	Mikrovilli
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogen
NGF	Nerve Growth Factor
OM	Oligomycin
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCV	Procarbazin, CCNU, Vincristin
PD	Progressive Disease
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidium-Iodid
PTT	Partial Thromboplastin Time
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SMAC	Second Mitochondria derived Activator of Caspase
SPECT	Single Photon Computed Tomography
T	Taurolidin
TBS	Tris-Buffered-Saline
TFM	Taurolidin-Fibrin-Matrix
TNF	Tumor Necrosis Factor
TT	Taurultam
TTG	Taurultam-Glucose
UV	Ultraviolett
V	Vacuolen

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
γ -GT	γ -GlytamyI-Transferase

7.2 Verwendete Chemikalien und Geräte

Name	Bestandteil	Hersteller
3-AB	3-Aminobenzamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Acrodisk Syringe Filter	Sterilfilter 0,2 μm	Pall Corporation Laboratory Group, Ann Arbor, Mich., USA
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Labforce AG, Nunningen, Schweiz
Annexin-V-FITC Kit	Annexin-V-FITC Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Apoptosis DNA Ladder Detection Kit	Apoptosis DNA Ladder Detection Kit	Medical & Biological Laboratories Co Ltd., Nagoya, Japan
ATP Bioluminescence Assay Kit	ATP Bioluminescence Kit CLS II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bafilomycin A1	Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bradford-Assay	Bradford-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BSO	DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Cytochrome-C	Cytochrome-C	Labforce AG, Nunningen, Schweiz
DMEM	Dulbecco 's Minimal Essential Medium	Gibco Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland
ECL [™] -Chemolumineszenz-Kit	ECL [™] -Chemolumineszenz-Kit	Amersham, Duebendorf, Schweiz
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel
FCS	Fetal Calf Serum	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Gentamicin	Gentamicin	Gibco Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland
Glucose Free Medium	Glucosefreies Medium	Gibco Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland
Hank 's Pufferlösung	Pufferlösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hermle Z 364	Zentrifuge	Hermle Labortechnik, Wehningen, Deutschland

Imaris™ Bildverarbeitung	Bildverarbeitungsprogramm	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
Kollagenase/Dispase	Kollagenase/Dispase	Roche Applied Science, Rotkreuz, Schweiz
Labsystem Multiskan MS	Multiplattenleser	Bioconcept, Allschwil, Schweiz
L-Glu	N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Mikrofilter	Mikrofilter BD Falcon	BS Biosciences, Basel, Schweiz
NAC	N-Acetyl-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Nalgene Filter Unit	Filtereinheit	Nalge Nunc International, Rochester, N.Y., USA
Oligomycin	Oligomycin	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Philips TEM 420	Elektronen-Transmissionsmikroskop	Philips, Basel, Schweiz
Pipetboy comfort	Elektrische Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz
Pipetten	Glaspipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml mit autoklavierten Plastikspitzen	BD Falcon, BS Biosciences, Basel, Schweiz
Plastik-Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen	BD Falcon, BS Biosciences, Basel, Schweiz
Protran™	Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Puck´s saline A	Puck´s saline A	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel
SMAC-N7 Peptid	zellpermeables SMAC Peptid	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
SP	Sodumpyruvat	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
SYBR Safe	DNA Gelfärbungslösung	Molecular Probes, Eugene, Or., USA
Taurolidin	Ultrareines Taurolidin Pulver	Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz
Taurultam	Ultrareines Taurultam Pulver	Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz

Taurultam-Glucose	Ultrareines Taurultam-Glucose Pulver	Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz
Triton-X-100	Triton-X-100	Dow Chemicals, Midland, Mich., USA
Trypanblau	Trypanblau - Färbelösung	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel;
Trypsin	Trypsin	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel
Vakuumsauger	Vakuumsauger	Inotech Inc., Kalamazoo Lansing, Mich., USA
VEGF Quantikine Kit	VEGF ELISA Test	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
Vortex Genie	Vortex	Inotech, Dottika, Schweiz
Zeiss Axiovert	Lichtmikroskop, Phasenkontrastmikroskop	Zeiss AG, Feldkirch, Deutschland
Zellkulturschrank Heraeus	Zellkulturschrank	Heraeus Laborgeräte AG Zürich, Schweiz
z-VAD.fmk	Pancaspase-Inhibitor	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz

7.3 Neurologischer Status

Für die Erhebung und Beurteilung des neurologischen Status wurde ein spezieller Erhebungsbogen (Bild 7.1) und Score genutzt.

Bild 7.1 Evaluations- und Beurteilungsbogen für den neurologischen Status

Taurolidine intravenously in patients with recurrent or progressive glioblastoma	Initial Evaluation	Neurological Status	13
Patient-No.: <input style="width: 40px;" type="text"/>	male <input type="checkbox"/>	female <input type="checkbox"/>	
Patient-Initials: <input style="width: 40px;" type="text"/>	Date of Birth	<input style="width: 20px;" type="text"/> day	<input style="width: 20px;" type="text"/> month
	Date of Evaluation	<input style="width: 20px;" type="text"/> day	<input style="width: 20px;" type="text"/> month
		<input style="width: 20px;" type="text"/> year	<input style="width: 20px;" type="text"/> year

Level of consciousness	Facial paresis
alert 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	none 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
drowsy 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	mild 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
stuporous 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	partial 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
comatose 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>	complete 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Ask the patient for month and his age, rate the 1st answer	Motor function arm
both answers correct 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	normal 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
one answer correct 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	mild to moderate paresis 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
both answers wrong 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	severe paresis 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Ask the patient to open/close his hands/eyes. Rate only clear actions	plegia 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>
both actions correct 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Motor function leg
one action correct 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	normal 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
no correct action 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	mild to moderate paresis 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Light reaction	severe paresis 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
both sides 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	plegia 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>
one side 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Babinski's sign
no reaction 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	unverifiable 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Range of vision	questionable 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
unrestricted 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	one side 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
partial hemianopsia 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	both sides 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>
complete hemianopsia 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Ataxia extremities
Eye movement	none 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
unrestricted 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	arm or leg 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
partial paresis 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	arm and leg 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
deviation conjugate 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Sensibility
Speech	normal 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
no aphasia 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	reduced 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
limited function 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	none 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>
no sentences, more yes/no 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Neglect
yes/no or less 3 <input style="width: 20px;" type="text"/>	absent 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Dysarthria	partial / complete 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>
normal articulation 0 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Sum
mild to moderate dysarthria 1 <input style="width: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px;" type="text"/>
(almost) incomprehensible 2 <input style="width: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px;" type="text"/>

Signature _____ Investigator

Date day month year

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Mario Brock danke ich für den gewährten Freiraum für die Durchführung der experimentellen und klinischen Arbeiten und seine fachliche und persönliche Unterstützung.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hanns Möhler für seine fachliche und persönliche Unterstützung und seine kontinuierliche Motivation während des gesamten Zeitraumes.

Herrn Prof. Dr. Karl Frei danke ich für seine mir gewährte Möglichkeit zur Entfaltung von Forschungsaktivitäten und seine wertvolle fachliche und persönliche Unterstützung und Motivation.

Herrn Prof. Dr. Werner Jänisch danke ich für seine Förderung der experimentellen und klinischen Arbeiten sowie seine persönliche Unterstützung.

Herrn Louis Scheurer gilt mein Dank für seine kompetente und freundliche Unterstützung und für die persönlichen und fachlichen Ratschläge.

Herrn Dr. Hisashi Kubota danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die wertvollen fachlichen Ratschläge sowie den guten persönlichen Kontakt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Werner Hopfenmüller gilt mein Dank für seine wertvolle Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Neurochirurgischen Klinik der Charité - Campus Benjamin Franklin danke ich für ihre Unterstützung.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 29.6.2006

.....
Datum

Dr. Rüdiger Stendel

.....
Unterschrift