

## 2 Die antineoplastische Wirkung von Taurolidin

### 2.1 Einführung

#### 2.1.1 Taurolidin – von der antimikrobiellen zur antineoplastischen Wirkung

Ein hemmender Effekt von Taurolidin auf die Proliferation von LSI 74T Colon - Karzinomzellen, Jurkat - Leukämiezellen und 24 T 2.5 Fibrosarkomzellen konnte bereits im Jahre 1990 festgestellt werden (Monson et al. 1990). Der Mechanismus dieser Proliferationshemmung war jedoch zunächst unklar. Erste Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass Taurolidin in Analogie zu dem Mechanismus der antibakteriellen Wirkung die adhäsiven Eigenschaften von Tumorzellen beeinflusst und auf diese Weise einen antineoplastischen Effekt ausübt (Gorman et al. 1987a, b; Gorman et al. 1987c).

In Analogie wurden in einem Rattenmodell DHD/K12/Trb-Colon-Karzinomzellen mit oder ohne zusätzliche intraperitoneale Instillation von Heparinlösung, Taurolidinlösung oder einer Kombination aus beiden intraperitoneal appliziert. Das intraperitoneale Tumorgewicht nahm nach Instillation mit Heparinlösung (Tumorgewicht  $298 \pm 155$  mg), Taurolidinlösung ( $149 \pm 247$  mg) und bei Kombination beider (Tumorgewicht  $21,5 \pm 36$  mg) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (Tumorgewicht  $596 \pm 278$  mg) deutlich ab. Die Wirkung wurde, analog zu früheren Vermutungen (Gorman et al. 1987a, b; Gorman et al. 1987c; Monson et al. 1990) auf eine durch Heparin unterstützte Behinderung der Anhaftung von Tumorzellen an biologische Oberflächen zurückgeführt - ähnlich wie bei der antibakteriellen Wirkung (Jacobi et al. 1997a; Jacobi et al. 1997b; Jacobi et al. 1999a; Jacobi et al. 1999b). In der Konsequenz wurden klinische Studien initiiert, die eine Verhinderung der Anhaftung von Tumorzellen bei endoskopischen laparoskopischen Eingriffen und damit die Verhinderung der Bildung sogenannter Trokarmetastasen durch intraperitoneale Taurolidinspülung nachweisen sollten. Dieser Nachweis wurde jedoch bisher nicht erbracht.

Dann konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inkubation von Hirntumorzellen mit Taurolidin in sehr geringen Konzentrationen zur Auslösung des programmierten Zelltodes führt, aber bei gesunden Hirnzellen in 10-50-fach höherer Konzentration keine signifikanten Veränderungen hervorruft. Die Konzentration, die zur Auslösung dieses direkten antineoplastischen Effektes führte, lag um mehrere Zehnerpotenzen unter der, die für den antibakteriellen Effekt notwendig war (Stendel et al. 2001; Stendel et al. 2002d). Gleichzeitig wurde festgestellt, dass Taurolidin eine selektive und direkte antineoplastische Wirkung ausübt (Stendel et al. 2001; Stendel et al. 2002d). Als Wirkungsmechanismus wurde die Induktion des programmierten Zelltodes identifiziert (Stendel et al. 2001, 2002a; Stendel et al. 2002d). Dieser Wirkungsmechanismus wurde inzwischen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (McCourt et al. 2000; Calabresi et al. 2001).

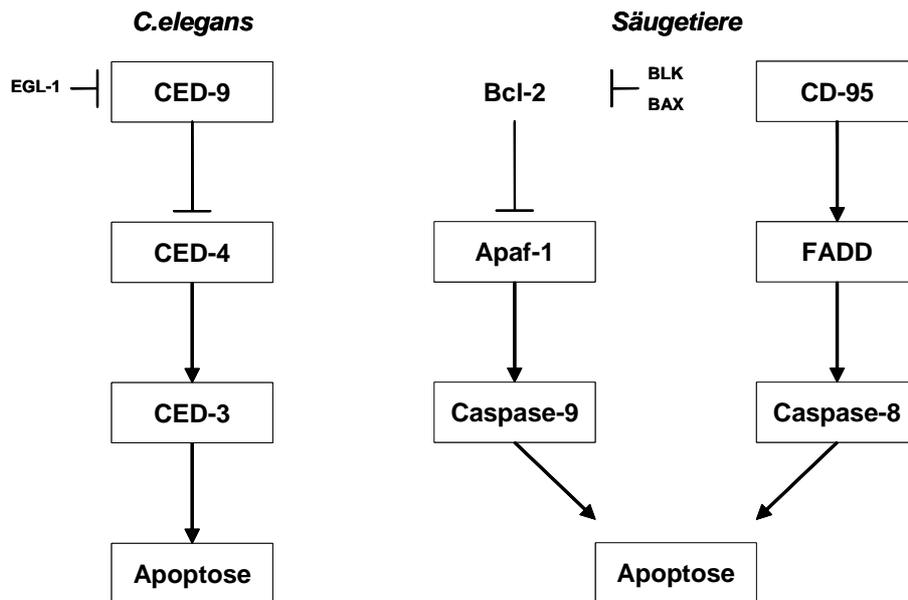
Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Auslösung des programmierten Zelltodes zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen durchgeführt. Sie zeigen, dass die antineoplastische Wirkung von Taurolidin nicht, wie zuvor vermutet, auf einer einfachen Hemmung der Tumorzelladhäsion (Gorman *et al.* 1987a, b; Gorman *et al.* 1987c; Jacobi *et al.* 1997a; Jacobi *et al.* 1997b; Jacobi *et al.* 1999a; Jacobi *et al.* 1999b) beruhen kann, sondern die Auslösung einer spezifischen Form des programmierten Zelltodes zur Grundlage hat.

### 2.1.2 Apoptose und programmierter Zelltod

Mit der zunehmenden Komplexität und Lebensdauer von Organismen ist der treibende evolutionäre Druck für die Entwicklung von Programmen, die zu einem gesteuerten Abbau von Zellen führen, gestiegen (Aravind *et al.* 2001). Die Apoptose oder der „klassische programmierte Zelltod“ hat in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit erregt. Der Begriff Apoptose wurde von C. Vogt in der Mitte des 19. Jahrhunderts als Beschreibung für die Morphologie sterbender Zellen während der Metamorphose von Amphibien eingeführt (Vogt 1842). Die Wiedereinführung des Begriffes Apoptose und seine weitere Prägung auf bestimmte Mechanismen des Zelltodes durch Kerr, Wyllie und Currie 1972 (Kerr *et al.* 1972) weckte die Aufmerksamkeit verschiedener Forschergruppen.

Häufig werden die Begriffe „Apoptose“ und „programmierter Zelltod“ uneinheitlich verwendet (Cataldo *et al.* 1995; Anglade *et al.* 1997; Yamamoto *et al.* 2000). Dies ist jedoch nicht korrekt, da sich herausgestellt hat, dass es auch andere Arten des programmierten Zelltodes gibt, die von großer Bedeutung sind (Schwartz *et al.* 1993; Deiss *et al.* 1996; Kitanaka und Kuchino 1999; Bursch *et al.* 2000a; Bursch *et al.* 2000b; Joza 2001). Diese Unterschiede werden später ausführlicher erläutert.

Es ist nahezu Allgemeinwissen, dass Finger und Zehen nicht einfach aus der embryonalen Hand- oder Fußanlage wachsen, sondern sich aus den Gliedmaßenanlagen durch das gezielte Absterben von Zellen - die Apoptose - entwickeln. Der apoptotische Zelltod in den Zwischenräumen von Fingern und Zehen während der Embryonalentwicklung wurde erstmals an Knock-out Mäusen bewiesen. Dieses und andere Phänomene zeigen, dass es sich bei der Apoptose um ein fundamentales Naturprinzip handelt, das in viele physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert ist (Cecconi 1998; Hakem 1998; Yoshida 1998; Vaux und Korsmeyer 1999; Zakeri und Lockshin 2002). In Übereinstimmung damit wurde festgestellt, dass die fundamentalen Signalwege der Apoptose während der evolutionären Entwicklung genetisch erhalten worden sind.



**Bild 2.1** Analogie des grundlegenden apoptotischen Mechanismus der Säugetierzellen zu dem des Nematodes *C.elegans*. (nach (Zou et al. 1997; Metzstein 1998).

Genetische Untersuchungen an Nematoden (*C.elegans*) haben 3 Gene identifiziert, die bereits einen grundlegenden apoptotischen Mechanismus vermitteln: CED-9, CED-4 und CED-3. Dabei reguliert das anti-apoptotische Molekül CED-9 negativ die Aktivität des pro-apoptotischen Moleküls CED-4, welches wiederum die Cysteinprotease CED-3 aktiviert (Metzstein 1998). Bei Säugetieren wurden Bcl-2, Apaf-1 und die Caspasen als Homologe von CED-9, CED-4 und CED-3 identifiziert (Zou 1997) (Bild 2.1).

### Auslösung der Apoptose

Die Apoptose wird ausgelöst, wenn Liganden an spezielle Todesrezeptoren der Zelloberfläche binden, oder wenn „zellulärer Stress“ ausgelöst wird. Darunter versteht man den Entzug von Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF oder Interleukin 2, das Auftreten erhöhter Spiegel freier Sauerstoffradikale in der Zelle oder die Einwirkung mutagener Agenzien. Hohe Dosen an UV- oder Röntgenstrahlung, verschiedene chemische Substanzen oder auch Virusinfektionen führen zu einer Schädigung des genetischen Materials der Zellen. Ist eine Reparatur nicht möglich, wird ebenfalls die Apoptose ausgelöst (Wyllie et al. 1980; Koopman et al. 1994a; Martin et al. 1995; Zamzami et al. 1996; Kluck et al. 1997; Green und Reed 1998; Schmitt und Lowe 1999; Hengartner 2000; Strasser et al. 2000).

Im Folgenden werden einige wichtige Wege der Apoptoseinduktion näher erläutert, die für das Verständnis der durchgeführten Versuche erforderlich sind. Die Apoptose kann ausgelöst werden durch:

### *Bindung von Liganden an „Todesrezeptoren“*

Sie führt in der Regel zu der Aktivierung spezieller proteolytischer Enzyme (Caspasen). Die Entdeckung dieser Rezeptor-Familie, die spezifisch die Apoptose vermitteln kann, war ein Durchbruch in der Aufklärung dieses Mechanismus. Die Todesrezeptoren haben eine intrazelluläre so genannte „Todesdomäne“, welche die Rezeptoren an die ausführenden Mechanismen ankoppelt. Zu den Todesrezeptoren gehören: CD95 (APO-1/Fas), TNF-R1, (CD120a), DR3 (APO3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, Killer, TRI CK2), und DR6 (Schulze-Osthoff 1998). Unter diesen Rezeptoren ist Fas bzw. CD95 der am besten charakterisierte (Krammer 2000). Sowohl die Rezeptoren als auch die Liganden weisen strukturelle Homologien auf, die ähnliche Mechanismen der Rezeptorerkennung hervorrufen. Die Bindung von CD95-Liganden bewirkt die Zusammenlagerung von drei CD95-Molekülen. Durch diese Trimerisierung werden innerhalb der Zelle die Todesdomänen der CD95-Moleküle zusammengeführt. Diese induzieren die Ausbildung des Adapterkomplexes DISC, der die inaktive Procaspase 8 in die aktive Form überführt. Diese Signalcaspase aktiviert eine Reihe von Verstärker-caspasen, die ihrerseits Effektorcaspasen wie Caspase 3 mobilisieren und den Zelltod ausführen (Suda 1997);(Schneider 1998; Krammer 2000).

### *Destabilisierung von Mitochondrien*

Ein Schlüsselereignis der Apoptose ist die Öffnung der mitochondrialen „permeability transition pore“. Dieses Ereignis wird von den Proteinen der Bcl-2 Familie reguliert und resultiert in der Freisetzung einer Reihe von Proteinen aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien (Zamzami *et al.* 1996; Green und Reed 1998). Verschiedene dieser Proteine, wie Cytochrom-C, die Procaspasen 2, 3 und 9, und der „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF), haben wichtige Funktionen bei dem apoptotischen Zelltod (Susin *et al.* 1996; Kluck *et al.* 1997; Mancini *et al.* 1998; Susin *et al.* 1999a). Nach derzeitigem Kenntnisstand können durch Destabilisierung von Mitochondrien 3 verschiedene Abläufe ausgelöst werden:

I. Die Freisetzung von Cytochrom-C aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt über den Caspase-abhängigen Weg zu der klassischen Apoptose (Strasser *et al.* 2000) (Mattson 2000). Cytochrom-C ist ein Elektronentransportprotein, das für die Energieumwandlung in allen aeroben Organismen benötigt wird (Lehninger *et al.* 1993). Es ist im intermembranösen Raum der Mitochondrien lokalisiert (Gonzales und Neupert 1990). Cytochrom-C wurde als wichtiger Bestandteil der Aktivierung des apoptotischen Prozesses identifiziert (Liu *et al.* 1996). Während der frühen Phasen der Apoptose gelangt das Cytochrom-C von der Mitochondrienmembran in das Zytosol, wo es im Prozess der Aktivierung der Caspase 3 beteiligt ist (Liu *et al.* 1996). Es initiiert die apoptotische Kaskade, wobei Apaf-1 an Apaf-3 (Caspase 9) bindet und dann zur Spaltung von CPP 32 (Caspase 3) führt (Li *et al.* 1997; Zou *et al.* 1997). Zusammen mit anderen Faktoren bewirkt das Cytochrom-C die Zusammenstellung des Apoptosomenkomplexes, der Ausgangspunkt für den Angriff der Caspasen ist. Caspase hemmende Faktoren werden dabei durch spezielle Proteine wie

DIABLO/SMAC entfernt. Die vollständige Entfaltung der Caspase-Aktivität führt schließlich zu den typischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen (Hengartner 2000; Strasser et al. 2000). Die Überexpression von Bcl-2 kann die Translokation von Cytochrom-C verhindern und so den apoptotischen Prozess blockieren (Kluck et al. 1997; Yang et al. 1997).

**II.** Die zweite durch mitochondriale Veränderungen ausgelöste Todesart ist der programmierte Zelltod ohne Caspase-Aktivierung. Ein bekanntes Beispiel ist der TNF-induzierte programmierte Zelltod, der durch aus den Mitochondrien stammendes ROS vermittelt wird (Schulze-Osthoff und al. 1992). Dass die Ligandenbindung an TNF-Rezeptoren auch die klassische Apoptose, wie oben beschrieben, auslösen kann, ist dabei kein Widerspruch. Es ist zwar länger bekannt, dass der durch TNF induzierte Zelltod entweder apoptotischen oder nekrotischen Charakter haben kann (Laster et al. 1988), aber erst kürzlich konnte die Fähigkeit von Fas (eines Mitgliedes der TNF-Familie) beschrieben werden, den nekroseartigen programmierten Zelltod auszulösen (Leist et al. 1997; Vercaemmen 1998; Leist 1999).

**III.** Der dritte Weg ist die Freisetzung des „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF) aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien und dessen Translokation zum Nucleus (Susin et al. 1999b) (Wyllie et al. 1980; Kerr et al. 1994; Zamzami et al. 1996; Green und Reed 1998; Thornberry und Lazebnik 1998; Schmitt und Lowe 1999; Bursch et al. 2000a; Hengartner 2000; Strasser et al. 2000; Leverrier und Ridley 2001). Durch genetische Analysen wurde festgestellt, dass AIF den programmierten Zelltod während der frühen Entwicklung kontrolliert. So werden alle bedeutenden Vorgänge des frühen morphogenetischen Todes, darunter auch die Freisetzung von Cytochrom-C, durch die Deletion von AIF verhindert (Joza 2001). AIF löst die Caspase-unabhängige Erzeugung ca. 50 kb großer Chromatinfragmente aus. Im Gegensatz dazu werden oligonucleosomale DNA Fragmente nur bei Aktivierung der Caspase-abhängigen DNAse erzeugt (Susin et al. 1999b; Strasser et al. 2000). Bcl-2 Überexpression kann die Freisetzung von AIF von den Mitochondrien verhindern, aber nicht die apoptogene Aktivität des AIF blockieren. AIF kann außerdem die Freisetzung von Cytochrom-C und Caspase 9 von den Mitochondrien induzieren (Susin et al. 1999b).

Oft kommt es allerdings zu der simultanen Aktivierung mehrerer der unter I-III beschriebenen Mechanismen, wobei die Geschwindigkeit der einzelnen Prozesse und die Inhibitoren, die von verschiedenen Zellarten exprimiert werden, darüber entscheiden, welcher Prozess seine Merkmale am meisten durchsetzen kann (Jäättelä et al. 1998; Susin et al. 1999b; Mattson 2000). So können Defekte bei einem Schritt des Cytochrom-C oder des AIF vermittelten Mechanismus in einer Umschaltung von dem programmierten Zelltod mit apoptotischem zu dem mit nekrotischem Charakter resultieren (Leist et al. 1997; McCarthy et al. 1997). Wenn das Signal zur Auslösung des programmierten Zelltodes bereits bei den Mitochondrien angekommen ist, führt die Caspase-Hemmung zwar zur Veränderung der Art, nicht aber des Ausmaßes des Zelltodes (Leist et al. 1997;

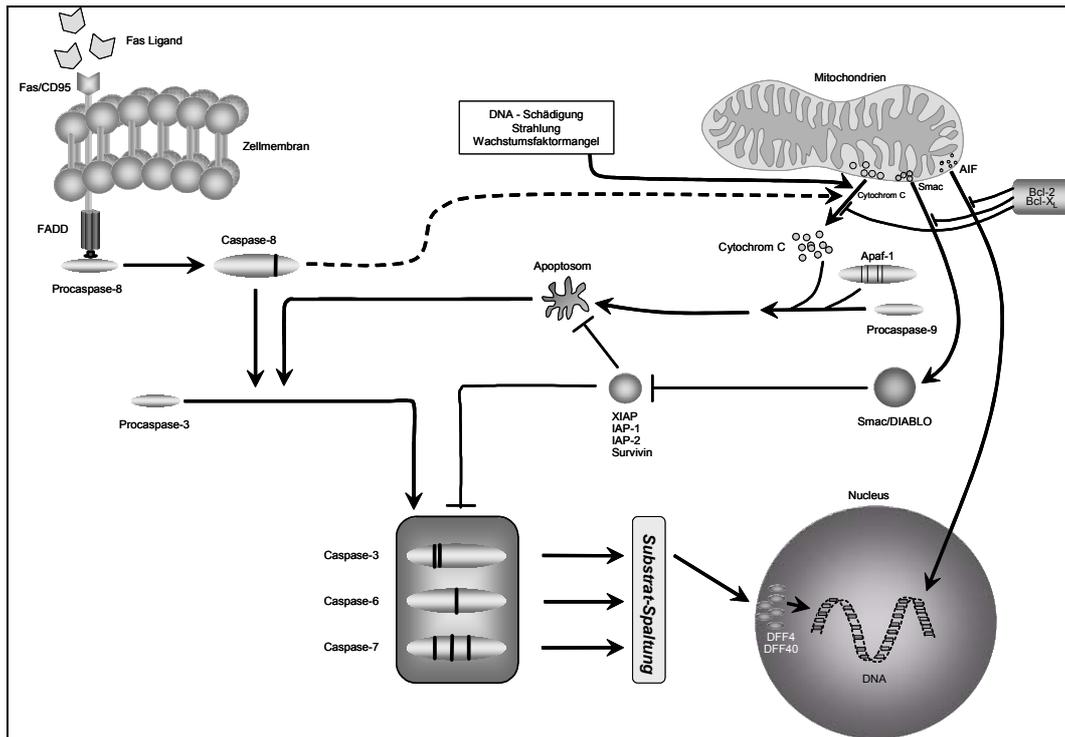
McCarthy *et al.* 1997; Nicotera *et al.* 1999; Daugas und al. 2000). Die entscheidende Kontrolle über den Zelltod scheint also bei den Mitochondrien zu liegen, während die Art des Zelltodes durch den Grad der Caspase-Aktivierung entschieden wird (Nicotera *et al.* 1999). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, nach denen in bestimmten Fällen die Mitochondrien keine regulierende Rolle spielen (Chi und al. 1999; Schierle und al. 1999; Elliott *et al.* 2000; Finn und al. 2000).

### **Ablauf der Apoptose**

Der Ablauf der Apoptose lässt sich in drei Stadien einteilen. In der *Induktionsphase* wird die Apoptose ausgelöst, d.h. das apoptotische Programm wird aktiviert. Während der *Exekutionsphase* wird das apoptotische Programm ausgeführt und führt zu der geplanten Zerlegung der Zelle in phagozytierbare Bestandteile. Durch *Phagozytose* werden die entstandenen Zellabbauprodukte beseitigt (Wyllie *et al.* 1980; Koopman *et al.* 1994a; Martin *et al.* 1995; Zamzami *et al.* 1996; Kluck *et al.* 1997; Green und Reed 1998; Schmitt und Lowe 1999; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000).

Nach der Auslösung der Apoptose unterliegen die sterbenden Zellen einer Reihe charakteristischer biochemischer und morphologischer Veränderungen. Zu den biochemischen Veränderungen gehören insbesondere die Aktivierung spezieller Proteine und das Auftreten von Phagozytosemarkern an der Zelloberfläche, zu den morphologischen die Kondensation des Chromatins und die Bildung sogenannter Apoptosekörperchen (Kerr *et al.* 1972; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000). Das „Selbsttötungsprogramm“ der Zellen führt zu einer partiellen Autodigestion der intrazellulären Komponenten. Die Zellabbauprodukte werden dann in mit Plasmamembran umhüllte Vesikel verpackt, die Apoptosekörperchen genannt werden. Sie exprimieren Phosphatidylserin an dem äußeren Blatt der Plasmamembran. Dieses gilt als Phagozytosesignal und führt konsekutiv zur Phagozytose der Apoptosekörperchen (Fadok *et al.* 1992).

Nach der definitiven Auslösung der Apoptose werden weitere Proteine aktiviert. Apoptotische Proteasen zerstören Schlüsselproteine der Zelle, die für den Strukturerehalt, die Replikation und Reparatur der DNA und die Neusynthese von Proteinen erforderlich sind. Die apoptotischen Proteasen werden Caspasen genannt, da sie in ihrem aktiven Zentrum Cystein enthalten und zu der Aminosäure Asparaginsäure hydrolysieren (Cysteiny-Aspartasen). Die erste identifizierte Caspase war das „Interleukin-1-Converting Enzyme“ (ICE), das Säugerhomolog von Ced-3 (Li *et al.* 1997; Zou *et al.* 1997; Thornberry und Lazebnik 1998; Los *et al.* 1999; Susin *et al.* 1999a; Finn und al. 2000; Holler und al. 2000; Leist und Jäätelä 2001; Leverrier und Ridley 2001; Volbracht *et al.* 2001; Shi 2002; Jäätelä und Tschopp 2003). Einen Überblick über bislang verifizierte Wege des apoptotischen Mechanismus gibt das Bild 2.2.



**Bild 2.2** Bislang verifizierte Wege des apoptotischen Mechanismus. (unter Nutzung von Angaben aus (Kerr *et al.* 1972; Zamzami *et al.* 1996; Kluck *et al.* 1997; Green und Reed 1998; Hasmall und Roberts 1999; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000)

Beim Menschen sind derzeit 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in einer Signalkaskade angeordnet sind und in der Signal-, Verstärker- und Effektorcaspasen unterschieden werden (Thornberry und Lazebnik 1998; Los *et al.* 1999; Susin *et al.* 1999a; Leverrier und Ridley 2001; Shi 2002; Jäättelä und Tschopp 2003). Die Caspasen zerstören viele lebensnotwendige Proteine der Zelle. Bis heute sind etwa 60 verschiedene Substratmoleküle identifiziert worden, von denen 42 durch die Caspase-3 gespalten und inaktiviert werden. Zu den wichtigsten Substraten der Caspase 3 gehören Proteine des Zytoskeletts, die für die Aufrechterhaltung der Form und Motilität von Zellen Bedeutung haben (Thornberry und Lazebnik 1998; Los *et al.* 1999; Leverrier und Ridley 2001; Shi 2002; Jäättelä und Tschopp 2003). Der Abbau dieser Proteine führt zu den umfangreichen Veränderungen der Zellmorphologie während der Apoptose. Die Hydrolyse von Proteinen des Zellkerns wird für den Verlust der Fähigkeit zur Reparatur und Kondensation der DNA verantwortlich gemacht (Thornberry und Lazebnik 1998; Los *et al.* 1999; Leverrier und Ridley 2001; Shi 2002; Jäättelä und Tschopp 2003). Der durch die Caspasen vermittelte Abbau spezifischer Substrate erklärt viele der charakteristischen Kennzeichen der Apoptose. So führt die Caspase-aktivierte DNase zu den spezifischen Chromatinveränderungen, der Abbau des Lamins resultiert in der Verringerung der Kerngröße, der Abbau des Zytoskeletts zur Reorganisation des Zytosols und die cleavage der p21 aktivierten Kinase 2 oder RHO aktivierten Serin/Threoninkinase zum „membrane blebbing“ (Hengartner 2000; Leverrier und Ridley 2001).

Die Wirkung der Caspasen wird durch Endonukleasen ergänzt. Diese bauen das Chromatin des Zellkerns in charakteristischer Weise ab und zerstören damit die genetische Information (Wyllie *et al.* 1980; An *et al.* 1998; Green und Reed 1998; Thornberry und Lazebnik 1998; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000; Leverrier und Ridley 2001). Im Zellkern liegt die DNA in Assoziation mit Strukturproteinen, den sogenannten Histonen, vor. Der größte Anteil der DNA ist um einen Kern aus Histonen gewickelt. Beim Chromatinabbau im Rahmen der Apoptose wird die DNA der Bereiche abgebaut, die nicht durch eine Assoziation mit Histonen geschützt sind. Auf diese Weise entstehen schließlich DNA-Bruchstücke mit einer Größe von etwa 200 bp (bp = Basenpaaren) oder Vielfachen davon. Dies führt dazu, dass nach der Extraktion der DNA in einem elektrischen Feld „DNA-Leitern“ sichtbar werden können. Diese Form der DNA-Hydrolyse wird als internukleosomaler Chromatinabbau bezeichnet. Diesem Vorgang ist eine Aufspaltung in Bruchstücke von 300 und 50 Kilobasen vorgeschaltet (Wyllie *et al.* 1980; An *et al.* 1998; Green und Reed 1998; Spector *et al.* 1998; Thornberry und Lazebnik 1998; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000; Leverrier und Ridley 2001). Die auf diese Weise durchgeführte DNA-Zerstörung ist irreversibel und soll sicherstellen, dass veränderte und potentiell gefährliche DNA-Sequenzen effektiv beseitigt werden. Allerdings konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass die Apoptose auch ohne internukleosomalen Chromatinabbau erfolgen kann (Spector *et al.* 1998). Die Caspase-abhängige Apoptose, die strikt dem klassischen Weg folgt, ist am besten für die Entwicklung des Nervensystems dokumentiert (Ralf *et al.* 1992; Los *et al.* 1999).

### **Regulation der Apoptose**

Wenn ein Todessignal eine Zelle getroffen hat, so wird die Berechtigung dieses Befehls durch die Proteine der Gene der Bcl-2-Familie überprüft. Diese verbinden sich untereinander zu Dimeren, die fördernd oder hemmend auf die Apoptoseinduktion einwirken. Überwiegen die inhibierenden Proteine (Bcl-2 oder Bcl-xL), wird die Apoptose unterdrückt, überwiegen die fördernden (Bax, Bak oder Bcl-xS), wird die Apoptose ausgelöst. Diese Proteine stellen also eine Art Messfühler dar, der letztlich über die Existenz der Zelle entscheidet (Miyashita *et al.* 1995; Susin *et al.* 1996; Schlappbach und Fontana 1997; An *et al.* 1998; Deininger *et al.* 1999; Shinoura *et al.* 1999; Saeki *et al.* 2000). Einige dieser Proteine sind an Membranen des endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns und der Mitochondrien gebunden. Sie können Poren ausbilden und auf diese Weise die Permeabilität der Membranen für Ionen beeinflussen. Bcl-2- oder Bcl-xL-Dimere unterdrücken die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Wasserstoff- und Calciumionen, erhalten damit deren Funktionsfähigkeit, und wirken so einer Apoptoseinduktion entgegen. Überwiegen dagegen Dimere von Apoptose-förderndem Bax oder Bak, so resultiert eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran für Wasserstoff- und Calciumionen und damit der Zusammenbruch des Membranpotentials. Als Folge treten mitochondriale Proteine wie Cytochrom-C und AIF in das Zytoplasma über und fördern die Einleitung der Apoptose (Martin *et al.* 1995; Miyashita *et al.* 1995; Susin *et al.* 1996; Kluck *et al.* 1997;

McCarthy *et al.* 1997; Schlappbach und Fontana 1997; Yang *et al.* 1997; An *et al.* 1998; Deininger *et al.* 1999; Mathiasen *et al.* 1999; Ohgaki *et al.* 1999; Schierle und al. 1999; Shinoura *et al.* 1999; Nylandsted und al. 2000; Saeki *et al.* 2000; Yoshii *et al.* 2001; Zaidi *et al.* 2001). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, nach denen in bestimmten Fällen die anti-apoptotischen Onkogene der Bcl-2 Familie nicht protektiv wirken (Chi und al. 1999; Schierle und al. 1999; Elliott *et al.* 2000; Finn und al. 2000).

### **Caspase-unabhängige Zelltodmechanismen**

Die Fähigkeit einiger Zellen, die Aktivierung pro-apoptotischer Caspasen zu überleben (Wright 1997; Jäättelä *et al.* 1998; Foghsgaard 2001), unterstützte die Hypothese, dass die Aktivierung von Caspasen nicht die einzige Möglichkeit ist, einen programmierten Zelltod auszulösen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass ein programmierter Zelltod auch ohne Aktivierung der Effektor-Caspasen möglich ist (Borner und Monney 1999; Kitanaka und Kuchino 1999; Roberts *et al.* 1999; Joza 2001; Lockshin und Zakeri 2002b). Wie die klassische Apoptose können die alternativen Signalübertragungswege durch Todesrezeptoren oder durch mitochondriale Veränderungen initiiert und durch Proteasen vermittelt werden (Leist und Jäättelä 2001). Auf diese Weise können Signale von typischen Apoptose-Induktoren zu einem programmierten Zelltod ohne die typischen apoptotischen Merkmale führen (Leist *et al.* 1997; Vercammen 1998; Leist 1999). Die Funktionen der Caspasen können, zumindest zum Teil, von anderen Proteasen, z.B. Cathepsinen, übernommen werden (Deiss *et al.* 1996; Vanags *et al.* 1996; Waterhouse und al. 1998; Roberts *et al.* 1999; Foghsgaard 2001). Es existieren also verschiedene Wege für die Selbstzerstörung von Zellen: der programmierte Zelltod Typ I oder Apoptose und der programmierte Zelltod Typ II oder Autophagie (auch „programmierter Zelltod von nekrotischem Typ“ genannt) (Beaulaton und Lockshin 1982; Zakeri *et al.* 1995; Bursch *et al.* 2000a; Lockshin *et al.* 2000).

Die Caspase-unabhängigen Mechanismen haben durchaus einen biologischen Sinn, da es auch zur Inaktivierung des Caspase-Weges durch Mutationen (Chautan *et al.* 1999), Energiedepletion (Leist *et al.* 1997) oder oxidativen Stress (Leist 1999) kommen kann. Physiologische Beispiele für die Caspase-unabhängigen Wege sind die TNF-vermittelte Leberschädigung (Kunzle und al. 1999) und der Zelltod von Chondrozyten, die das Längenwachstum der Knochen kontrollieren (Roach und Clarke 2000). Interessanterweise führt die Modifikation der Art des Zelltodes nicht zu einer Veränderung des Zieles des programmierten Zelltodes, nämlich der effizienten und sicheren und vor allem nicht-entzündlichen Entfernung von Zellen. Dieses Ziel wird auch durch den programmierten Zelltod mit nekrotischem Charakter gewährleistet (Chung *et al.* 2000; Hirt *et al.* 2000).

### **2.1.3 Programmierter Zelltod und Neoplasie**

Neben den Aufgaben bei physiologischen Wachstums- und Entwicklungsprozessen hat die Apoptose einen wichtigen Stellenwert in der Pathogenese und der Abwehr von Krebs. Wie nachstehend noch

genauer ausgeführt wird, beruht die Entstehung von Neoplasien nach heutigem Erkenntnisstand auf der Aktivierung von sogenannten Onkogenen und/oder der Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen. Die daraus folgende Erhöhung der Zellproliferation ist oft mit einer Caspase-Aktivierung und damit einer erhöhten apoptotischen Aktivität verbunden (Schmitt und Lowe 1999). Diese scheinbar paradoxe Kopplung von erhöhter Zellteilung und zunehmender Aktivität der Mechanismen des programmierten Zelltodes wird daher als eine Barriere betrachtet, die überwunden werden muss, um ein echtes Tumorwachstum auszulösen (Jäättelä 1999; Schmitt und Lowe 1999). Wie bereits ausgeführt wurde, sind die Produkte der Bcl-2 Genfamilie regulativ im Prozess der Apoptose beteiligt. In der Tat wurde eine hohe Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und die Aktivierung pro-apoptotischer Tumorsuppressor-Gene wie p53, welche die Caspase-abhängigen Wege kontrollieren, häufig in menschlichen Tumoren gefunden (Jäättelä 1999; Schmitt und Lowe 1999).

Obwohl viele Krebstherapien die klassische Apoptose induzieren, sind Medikamente in Entwicklung, die andere Zelltodarten auslösen können (Kerr et al. 1994). So induziert der Topomerase-Inhibitor Camptothecin den Cathepsin D/B vermittelten Apoptose-ähnlichen Zelltod in hepatozellulären Karzinomzellen (Roberts et al. 1999). Die Aktivierung des Thrombospondin Rezeptors CD47 triggert den programmierten Nekrose-ähnlichen Zelltod in B-Zell-Lymphomzellen (Mateo und al. 1999). Interferon und Arsenit initiieren einen Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus (Quignon und al. 1998). EB1089, ein synthetisches Vitamin D Analogon, tötet Brustkrebszellen durch einen Caspase-unabhängigen Apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod (Mathiasen et al. 1999). Auch gentherapeutische Ansätze nutzen nicht selten alternative Todeswege als vielversprechende Angriffspunkte für die Tumorthherapie (Lavoie et al. 1998; Elliott et al. 2000; Nylandsted und al. 2000).

## 2.2 Fragestellung

Nachdem in initialen Experimenten ein wachstumshemmender Effekt von Taurolidin auf gliale und neuronale Hirntumorzellen nachgewiesen wurde (Stendel et al. 2001; Stendel et al. 2002d), erfolgten weitere Versuche zur Charakterisierung des Wirkungsmechanismus (Stendel et al. 2002b, a; Stendel et al. 2003a; Stendel et al. 2004a). Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Auf welchem Wirkungsmechanismus basiert der antineoplastische Effekt von Taurolidin?
2. Sind Taurultam, der Haupt-Metabolit von Taurolidin, und Taurultam-Glucose, das Konjugat von Taurultam mit Glucose, in gleicher Weise wirksam?
3. Wie ist die Dosis-Wirkungsbeziehung der 3 Substanzen bei verschiedenen Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen?

## 2.3 Material und Methoden

### 2.3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Nachstehend wird die Herstellung häufig verwendeter Chemikalien bzw. Lösungen beschrieben. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sowie Abkürzungen sind im Anhang aufgeführt.

#### Zellkulturmedium

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden zu 500 ml DMEM 50 ml auf 37°C erhitztes fetales Kälberserum, (Fetal Calf Serum, FCS), 5 ml Natriumpyruvat 100 mM, 5 ml N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin und 1 ml einer Gentamicin-Stammlösung (Gentamicin 10 mg/ml; Gibco) hinzugefügt. Nach der Vermischung der Bestandteile erfolgte die Sterilfiltration durch ein Sterilfiltersystem (Nalge Nunc International). Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### Glucosefreies Zellkulturmedium

Zu 500 ml glucosefreiem Medium (Glucose Free Medium, Gibco) wurden 50 ml auf 37 °C erhitztes FCS, 5 ml N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin und 1 ml einer Gentamicin-Stammlösung hinzugefügt. Nach der Vermischung der Bestandteile erfolgte die Sterilfiltration durch ein Sterilfiltersystem (Nalge Nunc International). Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde hergestellt, indem eine Tablette „Phosphate buffered saline“ (Sigma-Aldrich) in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert (Nalge Nunc International) wurde. Die fertige Lösung enthält: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ . Der pH ist mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose

Nahezu alle Versuche wurden sowohl mit Taurolidin als auch mit seinem Metaboliten Taurultam und dem Derivat Taurultam-Glucose (Konjugat aus Taurultam und Glucose) durchgeführt. Für jedes Experiment wurden frisch angesetzte Stammlösungen aller 3 Substanzen mit einer Konzentration von jeweils 10 mg/ml verwendet. Zur Herstellung der Stammlösungen wurde ultrareines Taurolidin-, Taurultam-, bzw. Taurultam-Glucose Pulver (Geistlich Pharma AG) mit PBS auf die jeweilige Konzentration eingestellt und anschließend sterilfiltriert. Aus diesen Stammlösungen wurden dann die für das jeweilige Experiment erforderlichen Konzentrationen hergestellt.

### 2.3.2 Verwendete Zelllinien

Für die Versuche wurden die in der Tabelle 2.1 aufgeführten Zelllinien verwendet.

**Tabelle 2.1** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Literatur
LN18	Glioblastom	human	(Ponten und Westermark 1978)
LN229	Glioblastom	human	(Ponten und Westermark 1978)
U87MG	Glioblastom	human	(Ponten und Westermark 1978)
U138	Glioblastom	human	(Ponten und Westermark 1978)
U251	Glioblastom	human	(Ponten und Westermark 1978)
U373	Glioblastom/Astrozytom	human	(Ponten und Westermark 1978)
Jurkat	Leukämie	human	(Dalglesig et al. 1984)

### 2.3.3 Verwendete ex vivo Tumorzellen

Für die Versuche wurden ex-vivo-Glioblastomzellen von Patienten der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsspitals Zürich mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof.Dr. Frei verwendet (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2** Verwendete ex vivo Glioblastomzellen

Bezeichnung	Diagnose	Passage
ex vivo GBM 1	Glioblastom	5
ex vivo GBM 2	Glioblastom	8
ex vivo GBM 3	Glioblastom	9
ex vivo GBM 4	Glioblastom	3
ex vivo GBM 5	Glioblastom	18

### 2.3.4 Herstellung von Monolayern aus ex vivo Hirntumoren

Es wurden Tumoren von Patienten mit einem histopathologisch gesicherten Glioblastom WHO Grad IV verwendet. Die Diagnose wurde durch das Institut für Neuropathologie der Universität Zürich gesichert. Nach der Entnahme des Tumors wurde das Tumorgewebe in Petrischalen verbracht, mechanisch zerkleinert und enzymatisch mit Kollagenase/Dispase für 1 Stunde bei 37 °C unter ständigem Agitieren inkubiert. Danach wurden die dissoziierten Zellen sequentiell durch Mikrofilter mit 100 bzw. 70 µm Porengröße getrennt, um das überständige Gewebe zu entfernen. Die Erythrozyten wurden durch Resuspension und Inkubation der Zellen in eiskaltem ACK-Puffer (17mM Tris-HCl mit 144 mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,2) für 10 Minuten auf Eis entfernt. Die Zellen wurden an-

schliessend in HBSS gewaschen, in Medium in Plastik-Zellkulturflaschen inkubiert und bei 37 °C kultiviert.

### **2.3.5 Herstellung von Zellsuspensionen aus Monolayern**

Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die in der Plastik-Zellkulturflasche (Falcon) als Monolayer wachsenden Zellen der Zelllinien und ex vivo Glioblastomzellen verwendet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin und EDTA 1:2000 in Puck's saline A) hinzugefügt und die Zellen 5 Minuten bei 37 °C im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium neutralisiert und die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Röhrchen pipettiert.

### **2.3.6 Zellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension in 90 µl Trypanblau (25 % Trypanblau in Hank's Pufferlösung) gegeben und vermischt. Anschließend wurden 10 µl dieser Lösung zwischen Deckglas und Kammer einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) wurden bei 110facher Vergrößerung 4 x 16 Felder der Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor und mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu erhalten. Nach der Zellzahlbestimmung erfolgte die Zentrifugierung (Hermle Z 364; Hermle) mit 1200 rpm über 5 Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, und Medium entsprechend der berechneten Zellzahl hinzugefügt. Das Zellpellett wurde mit Hilfe von Pipetten in dem Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit Hilfe des Vortex homogenisiert.

### **2.3.7 Kristallviolett-Färbung**

Nach der Inkubation der Zellen erfolgte die Beurteilung des zytotoxischen Effektes unter dem Lichtmikroskop unter Verwendung einer semiquantitativen Skala. Anschließend wurden die Überstände entfernt und pro Schacht 100 µl Kristallviolett-Färbungslösung (0,5 % Kristallviolett in 20 % Methanol und 80 % aqua dest.) hinzugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbungslösung entfernt und die Farbstoffreste mit Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Lufttrocknung der Zellkulturplatten. Nach 8-12 Stunden wurden die Platten in dem Multiplattenleser (Labsystem Multiskan) bei 540 nm Absorptionswellenlänge ausgelesen. Bei signifikanten Differenzen zwischen der Zellzahlkinetik im Mikroplattenleser (Labsystem Multiskan) und der Beurteilung mit der semiquantitativen Skala wurde der entsprechende Versuch wiederholt.

### **2.3.8 Bestimmung der EC<sub>50</sub> und der maximalen Zellabtötung**

Die Konzentration an Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose, die zu einer um 50 % verminderten Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte, wurde als effektive Konzentration EC<sub>50</sub> bezeichnet. Die maximale Zellabtötung wurde bestimmt als die bei der höchsten verwendeten Konzentration an Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose auftretende Verringerung der Zellzahl in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

### **2.3.9 Untersuchung der Fas-Ligand Überstände auf die zytotoxische Wirkung**

LN18 Tumorzellen wurden in 75 cm<sup>3</sup> Plastik-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis eine Zellkonfluenz von etwa 80 % erreicht war. Nach der Zellzahlbestimmung wurde eine Zellsuspension mit 5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml hergestellt. Je 200 µl dieser Zellsuspension wurden dann pro Schacht in eine 96-Schacht Zellkulturplatte (Falcon) pipettiert. Nach 12 Stunden erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Anhaftung der Zellen. Das Medium wurde abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Dann erfolgte die Inkubation mit Fas-Ligand 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; und 50 Vol.-% aus 3 verschiedenen überexpressiven Systemen. Weitere Zellen wurden mit Fas-Ligand Neokontrolle in denselben Konzentrationen inkubiert. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend analog zu Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Die zytotoxische Wirkung der verschiedenen Fas-Liganden und der Neokontrolle wurde verglichen, um eine vergleichbare Ausgangsbasis zum Einsatz von Fas-Ligand als Positivkontrolle zu haben.

### **2.3.10 Einfluss auf die Tumorzellvitalität und -proliferation**

LN18, LN229, U87MG, U138, U251 und U373 Zellen sowie ex-vivo-Glioblastomzellen I-5 wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel wurden ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, durchgeführt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose, so dass eine Konzentration von 5, 10, 25, 50, 100 und 200 µg/ml erreicht wurde. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 5 % und 25 % inkubiert. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend analog zu Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Die EC<sub>50</sub> und die maximale Zellabtötung wurden bestimmt.

### **2.3.11 Konzentrations - und Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung**

Tumorzellen der Zelllinien LN18, LN229, U87MG, und der ex vivo Glioblastom-Zellen I wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der

Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose, so dass eine Konzentration von 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  erreicht wurde. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 25 % inkubiert. Die Zellen wurden dann für 2, 4, 8 bzw. 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend analog zu Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Die Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Konzentration und der Inkubationszeit wurde untersucht.

### **2.3.12 Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit**

Die Wirkung einer langdauernden Inkubation der Tumorzellen mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose wurde mit Hilfe des Koloniebildungs-Assay untersucht. Dazu wurden aus Tumorzellen der Zelllinien LN18, LN229, U87MG, U138, U251, U373 und ex vivo Glioblastomzellen I-5 Zellsuspensionen hergestellt und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dann wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 500 Zellen/Schacht (Zelllinien) bzw. 2000 Zellen/Schacht (ex vivo Glioblastomzellen) in 2 ml Medium in die Wells einer 6-Schacht Zellkulturplatte ausgesät. Nach 12 Stunden waren die Zellen adhärent, was mikroskopisch kontrolliert wurde.

Das Medium wurde gewechselt und die Zellen wurden mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in den Konzentrationen 0,1; 1; 5 und 25  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Unbehandelte Zellen, denen das gleiche Volumen an Medium zugesetzt wurde, dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 25 % inkubiert wurden. Wenn die unbehandelten Kontrollzellen Kolonien mit mindestens 50 Zellen gebildet hatten (etwa 6 Zellteilungen erforderlich, ca. 2-4 Wochen Inkubationszeit), wurde das Medium verworfen und die Kolonien wurden mit Kristallviolett-Färbungslösung (Abschnitt 2.3.7) gefärbt. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) mit 6facher Vergrößerung manuell. Dabei wurden Zellanhäufungen mit mehr als 50 Zellen als Kolonien und solche mit weniger als 50 Zellen als Cluster bezeichnet. Die Anzahl der Zellkolonien, die von den behandelten Zellen gebildet wurden, wurde mit denen der unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Die Koloniebildungsrate  $R_c$  (Anzahl der gebildeten Kolonien der unbehandelten Zellen dividiert durch die Anzahl der ausgesäten Zellen) und die  $EC_{50}$  (Konzentration von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose, die zu einer um 50 % verminderten Koloniebildung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte) wurden bestimmt.

### **2.3.13 Einfluss auf die Zellmorphologie**

#### **Lichtmikroskopische Untersuchungen**

LN18, LN229, U87MG, U138, U251 und U373 Zellen und ex vivo Glioblastomzellen I-4 wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der

Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in Konzentrationen von 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 5 und 25 % inkubiert. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend mit Kristallviolett (Abschnitt 2.3.7) gefärbt. Danach erfolgte die Beurteilung der morphologischen Veränderungen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert) bei 50, 100 und 200facher Vergrößerung.

### **Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Humane U373 Tumorzellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert, bis eine Zellkonfluenz von etwa 80 % erreicht war. Nach der Zellzahlbestimmung wurde eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Medium hergestellt. Je 2 ml dieser Zellsuspension wurden dann pro Schacht in eine 6-Schacht-Zellkulturplatte pipettiert. Die mikroskopische Kontrolle der Anhaftung der Zellen erfolgte nach 24 Stunden. Das Medium wurde abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Nach 6 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit wurden die nicht adhärenen Zellen durch Zentrifugation (Hermle) mit  $5000 \text{ U/min}^{-1}$  für 5 Minuten entfernt und für 30 Minuten bei 4 °C in 0,05 M Cacodylat-Puffer mit 2 % Glutaraldehyd und 0,8 % Paraformaldehyd fixiert. Die Postfixierung erfolgte in 0,1 M Cacodylat-Puffer mit 1 %  $\text{OsO}_4$  und 1,5 %  $\text{K}_4(\text{FeCN})_6$ . Anschließend wurden die Zellen in Epon eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskopes (Philips) untersucht. Die ultrastrukturellen Veränderungen wurden in Relation zu dem Wirkstoff und der Inkubationszeit dokumentiert.

#### **2.3.14 Einfluss auf Zellen aus fetalem Rattenhirn**

Fünf Ratten wurden am 16. Tag der Gestation mit  $\text{CO}_2$  narkotisiert und geopfert. Unmittelbar anschließend wurden die Feten aus den Eierstöcken präpariert, in  $\text{CO}_2$  betäubt und geopfert. Ihr Hirn wurde unter sterilen Bedingungen unter Mikroskopsicht herauspräpariert. Die Meningen wurden sorgfältig entfernt. Die Hirne wurden in 5 ml Medium mit 4 % Ultrosor G, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,8 % Glucose dissoziiert. Die Zellen wurden anschließend in  $25 \text{ cm}^3$  Plastikzellkulturflaschen ausgesät. Nach der Anheftung wurden die Zellen mit Taurolidin in Konzentrationen von 100 bis 4000  $\mu\text{g/ml}$  für 10, 30, 60, 120 Minuten sowie für 24 und 48 Stunden inkubiert und zytomorphologische Veränderungen dokumentiert. Es erfolgte eine Färbung mit Methyleneblau zur Vitalitätstestung. Bei Zellen, die mit Taurolidin für 24 und 48 Stunden inkubiert worden waren,

wurde der Überstand entfernt und frisches Medium hinzugefügt. Anschließend wurden sie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um zu überprüfen, ob es erneut zu einer Zellproliferation kommt.

### **2.3.15 Synergismus mit dem durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod**

Die Zelllinien LN18 und LN229 wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (Falcon) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis eine Zellkonfluenz von etwa 80 % erreicht war. Nach der Zellzahlbestimmung wurden in den Versuchen mit Fas-Ligand allein 10<sup>4</sup> Zellen pro Schacht in einer 96-Schacht Platte ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Dies resultierte in einer Zellkonfluenz von etwa 60 %. Für die anderen Versuche wurden 1,5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Schacht ausgesät, was in einer Zellkonfluenz von 90 % resultierte. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen.

#### **Sensitivität der LN18 und LN229 Zellen auf Fas-Ligand**

Den LN18 und LN229 Zellen wurden 50 µl Medium mit Fas-Ligand in Konzentrationen von 3,1; 6,25; 12,5; 25 oder 50 % hinzugefügt. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde eine entsprechende Menge an Medium ohne Zusatz von Fas-Ligand hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 17 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **Einfluss von Taurolidin auf den durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod**

Den LN18 und LN229 Zellen wurden 50 µl Medium ohne oder mit Fas-Ligand in Konzentrationen von 0,4 % oder 2 % und ohne oder mit Zusatz von Taurolidin in den Konzentrationen von 5; 20; und 100 µg/ml hinzugefügt. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde eine entsprechende Menge an Medium ohne Zusatz von Fas-Ligand oder Taurolidin hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 17 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Zugabe von 50 µl Medium mit doppelt konzentriertem WST-I (Iwaki et al. 1995; Liu et al. 1995) Reagenz bestimmt. Die Färbung, die aus der Aktivität der mitochondrialen Succinatreductase resultiert, wurde in einem Multiplattenleser (Labsystem Multiskan) bei 450 nm mit einer Referenz Wellenlänge von 690 nm bestimmt. Die Intensität der Färbung hängt von der Anzahl lebensfähiger Zellen ab und wurde nach Erstellen einer Eichkurve bestimmt (Iwaki et al. 1995; Liu et al. 1995).

### **2.3.16 Einfluss der Caspaseinhibition auf die antineoplastische Aktivität**

LN18, LN229, U87MG, U138, U251 und U373 und ex vivo Glioblastomzellen 1-5 wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk in einer Konzentration von 50 µM. Vierzig Minuten danach wurden die Zellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in Konzentrationen von 5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml inkubiert. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge

hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand 25 % inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend analog Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Die zytotoxische Wirkung von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose wurde mit der nach vorbereitender Inkubation mit z-VAD.fmk verglichen.

### **2.3.17 Untersuchung der Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation**

Die Zellmembran-Phosphatidylserin Externalisation wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie unter Nutzung des Annexin-V-FLUOS staining Kits (Roche) untersucht. Eine Zellzahl von 10<sup>5</sup> Zellen wurden in 25cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und 24 Stunden später mit Taurolidin 25 und 100 µg/ml, Taurultam 200 µg/ml und Taurultam-Glucose 200 µg/ml für 6 und 24 Stunden inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Mit Fas-Ligand 50 % versetzte Zellen dienten als Positivkontrolle. Nach der Inkubation wurden die flottierenden und adhärenen Zellen, die mittels Trypsin gelöst worden waren, zweimal in PBS gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten; 250 x g), in 100 µl Färbungslösung mit HEPES Puffer, Annexin-V-FLUOS und Propidiumjodid resuspendiert und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 0,3ml HEPES Puffer wurden 10<sup>4</sup> Zellen in einem Flow Zytometer bei 488 nm Excitation und einem 515nm Bandpass-Filter für die Fluorescein-Erkennung und einem Hochpassfilter von 600nm für die PI Erkennung analysiert. Der Prozentsatz an lebenden (Annexin negativ, PI negativ), nekrotischen (Annexin positiv, PI positiv) und apoptotischen (Annexin positiv, PI negativ) Zellen wurde direkt mit Hilfe des Programms WinMDI 2.8 berechnet.

### **2.3.18 Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C - Freisetzung**

#### **Untersuchung mittels Western-Blot**

LN18 Zellen wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für die Subfraktionierung in isotonomem Homogenisierungspuffer (Tris 20 mM, pH = 7,5; DTT 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, 10 % Glycerol, 250 mM Sucrose, 10 x vollständiger Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Homogenisator (50 Schläge) homogenisiert. Um ungebrochene Zellen und Zellkerne zu entfernen, wurde anschließend mit 750 x g (Hermle) für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurden die Überstände mit 10.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert (Eppendorf), um die mitochondrialen Fraktionen zu sammeln. Diese wurden anschließend in Homogenisierungspuffer mit 1% Triton X-100 (Dow Chemicals) resuspendiert. Die von der mitochondrialen Fraktion befreiten Überstände wurden erneut bei 20.000 x g (Eppendorf) für 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Überstände für die Bestimmung der zytosolischen Fraktion genutzt. Die mitochondriale und die zytosolische Fraktion wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde mit dem Bradford-

Assay (Bradford 1976) (Bio-Rad) bestimmt. In 15 %-ige Gele wurden 15  $\mu\text{g}$  der Proteine für 2 Stunden geladen und durch Nitrozellulose Membranen transferiert (Schleicher & Schuell). Alle Blots wurden für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit Blotting Puffer (5 % Magermilch in TBS mit 0,05 % Tween-20 (Roche) geblockt. Die Membranen wurden mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem sekundärem Anti-Kaninchen Antikörper (1:4000) in Blotting Puffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur und nachfolgend mit Cytochrom-C (1:200) (Labforce) in Blotting-Puffer für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Banden wurden mit dem ECL Chemilumineszenz Reagenz (Amersham) detektiert.

### **Immuncytochemischer Nachweis**

U373 Zellen wurden mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für 30 Minuten bzw. 6 Stunden inkubiert. Danach wurden die auf den Glaskammerslides befindlichen Zellen mit Methanol für 15 min bei 4 °C fixiert. Die Zellen wurden dann mit PI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 10 min gegengefärbt und anschließend mit Cytochrom-C (1:200) (Labforce) für 2 h bei 4 °C inkubiert. FITC-konjugierter sekundärer anti-Kaninchen (1:100) oder anti-Ziege (1:200) Antikörper wurden für 1 h bei 4 °C hinzugefügt. Die Bilder wurden mittels Laser-konfokaler Mikroskopieeinrichtung, die auf ein invertiertes Leica-Mikroskop montiert war, analysiert. Die Daten wurden mit der 3D Multikanal Bildverarbeitungssoftware Imaris™ (Bitplane) analysiert. Wenn Zellen das punktuelle Cytochrom-C Färbungsmuster verloren, oder ein diffuses Muster zeigten, wurden sie als positiv für die Freisetzung von Cytochrom-C gewertet.

### **2.3.19 Untersuchung der AIF-Freisetzung**

Humane LN18 Gliomzellen wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für die Subfraktionierung in isotonem Homogenisierungspuffer (Tris 20 mM, pH = 7,5; DTT 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, 10 % Glycerol, 250 mM Sucrose, 10 x vollständiger Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst erfolgte die Homogenisierung der Zellen mit einem Homogenisator (50 Schläge). Um ungebrochene Zellen und Zellkerne zu entfernen, wurde mit 750 x g (Hermle) für 10 Minuten zentrifugiert. Dann erfolgte die Zentrifugierung der Überstände mit 10.000 x g (Eppendorf) für 20 Minuten, um die mitochondrialen Fraktionen zu sammeln. Anschließend erfolgte die Resuspendierung in Homogenisierungspuffer mit 1 % Triton X-100 (Dow Chemicals). Die von der mitochondrialen Fraktion befreiten Überstände wurden dann erneut bei 20.000 x g (Eppendorf) für 20 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurden die Überstände für die Bestimmung der zytosolischen Fraktion genutzt. Die Lagerung der mitochondrialen und die zytosolischen Fraktion bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktionen wurde das Bradford-Assay (Bio-Rad) genutzt. In 15 %-ige Gele wurden 15  $\mu\text{g}$  der Proteine für 2 Stunden geladen und durch

Nitrozellulose-Membranen transferiert (Schleicher & Schuell). Alle Blots wurden für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit Blotting Puffer (5 % Magermilch in TBS mit 0,05 % Tween-20 (Roche)) geblockt. Die Membranen wurden mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem sekundärem anti-Kaninchen Antikörper (1:4000) in Blotting-Puffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur und nachfolgend mit AIF (Labforce) in Blotting-Puffer für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem „ECL™-Chemolumineszenz-Kit“ (Amersham).

### **2.3.20 Einfluss von SMAC-Peptid**

LN18, LN229, U87MG und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden, wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben. Die Zellen wurden mit Taurolidin 50 µg/ml und anderen Zellen mit Cisplatin 1 µg/ml inkubiert. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit SMAC-Peptid in den Konzentrationen 20 und 50 µM. Zu Kontrollzellen wurde nach der Inkubation mit Taurolidin bzw. Cisplatin lediglich Medium in derselben Menge hinzugefügt. Es folgte die Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und ihre Färbung und Analyse analog zu Abschnitt 2.3.7. Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Ansätze wurde verglichen.

### **2.3.21 Einfluss auf die PARP-Aktivierung**

LN18, LN229, U87MG, U138, U251, U373 und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls analog zu Abschnitt 2.3.9. Nachfolgend wurden die Zellen mit 3-Aminobenzamid (3-AB) in einer Konzentration von 1 mM inkubiert, und 20 Minuten später mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose 5, 10, 25, 50 und 100 µg/ml. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle dienten mit Fas-Ligand 25 % inkubierte Zellen. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschliessend analog Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Anschliessend erfolgte der Vergleich des zytotoxischen Effektes der verschiedenen Ansätze.

### **2.3.22 Nachweis der DNA-Leiter-Bildung**

Zum Nachweis einer DNA-Fragmentation wurde das Apoptosis-DNA-Ladder-Detection-Kit (Medical & Biological Laboratories) verwendet. LN18 und LN229 Zellen wurden in 6-Schacht Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von 1,5 Millionen Zellen pro Schacht ausgesät. Die Zellen wurden in 2 ml Medium pro Schacht über Nacht inkubiert, bis sie ein konfluentes Monolayer erreicht hatten. Dann wurde das Medium entfernt und frisches Medium hinzugefügt. Anschliessend wurden die Zellen mit Taurolidin 100 µg/ml für 3, 6 und 24 Stunden inkubiert. Gleich vorbereitete Zellen wurden mit Cisplatin 250 µM für 6 Stunden bzw. mit Fas-Ligand 25 % für 24 Stunden inkubiert. In weiteren Ansätzen wurden

gleich vorbereitete Zellen mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  und Anti-Fas-Antikörper 0,5  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$  für 6 Stunden inkubiert. Zu uninkubierten Zellen wurde ein gleiches Volumen an Medium zugefügt. Außerdem wurden Jurkat-Zellen in gleicher Weise vorbereitet und mit Camptothecin 2 $\mu\text{M}$  für 8 und 24 Stunden, mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  für 24 Stunden, und mit Taurolidin 20  $\mu\text{g/ml}$  für 6 Stunden und Ant-Fas-Antikörper 20 ng/ml für 6 Stunden inkubiert.

Nach Erreichen der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, die flottierenden und adhärenen Zellen in dem Medium in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt und bei 500 x g (Hermle) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und je 1 ml PBS hinzugefügt. Die Zellen wurden darin suspendiert und erneut bei 500 x g (Hermle) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  pro Röhrchen des in dem Kit enthaltenen TE Lysis Puffer lysiert. Dann wurden 5  $\mu\text{l}$  Enzym A Lösung pro Tube hinzugefügt und die Lösungen vorsichtig auf dem Vortex vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten. Danach wurden pro Röhrchen 5  $\mu\text{l}$  Enzym B Lösung hinzugegeben und erneut bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die DNA Fällung durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetat pro Röhrchen und 100  $\mu\text{l}$  reines Ethanol. Die Vermischung erfolgte auf dem Vortex. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei -20 °C gehalten. Die Proben wurden dann mit 15000 RPM für 10 Minuten zentrifugiert, um die DNA zu präzipitieren. Der Überstand wurde abpipettiert und das DNA Pellet mit 0,5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 30  $\mu\text{l}$  Suspensionspuffer gelöst. Die Proben wurden auf ein 1 % Agarose Gel mit SYBR Safe Färbungslösung (Molecular Probes) im Gel als auch im running buffer geladen. Nach der Elektrophorese bei 5 V/cm für 1,5 Stunden wurde die gefärbte DNA durch Transillumination mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

### 2.3.23 Einfluss von N-Acetylcystein

Tumorzellen der Zelllinien LN18, LN229, U87MG, U138, U251 und U373 sowie der ex-vivo-Glioblastomzellen 1-5 wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit N-Acetylcystein 5 mM und 20 Minuten danach mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose, so dass eine Konzentration von 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  erreicht wurde. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 25 % verwendet. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend analog zu Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Ansätze wurde verglichen.

### 2.3.24 Untersuchung des intrazellulären ATP-Gehaltes

LN18 und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden in 150 cm<sup>3</sup> Plastik-Zellkulturflaschen (Falcon) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis eine Zellkonfluenz von etwa 80 % erreicht war. Es wurde eine Zellsuspension hergestellt und anschließend eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Danach wurden in die Schächte von 24-Schacht Multischachtplatten 1 ml Medium mit 10<sup>5</sup> Zellen pro Schacht pipettiert. Die mikroskopische Kontrolle der Anhaftung der Zellen erfolgte nach 24 Stunden. Das Medium wurde abpipettiert und durch frisches Medium pro well ersetzt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin 100, Taurultam 200 bzw. Taurultam-Glucose 200 µg/ml für 1, 3, 6 und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 25 µg/ml für 1, 3, 6 und 24 Stunden inkubiert. Gleich vorbehandelte Zellen wurden in glucosefreiem Medium, in normalem Medium unter Zusatz von Oligomycin 10 µM bzw. in glucosefreiem Medium unter Zusatz von Oligomycin 10 µM für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Zellsuspensionen hergestellt. Diese wurden mit 9 Anteilen kochendem Tris 100 mM und EDTA 4 mM bei einem pH von 7,75 versetzt und 2 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Proben wurden dann bei 1000 x g (Eppendorf) für 60 s zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Diese Röhrchen wurden dann bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration erfolgte mit Hilfe des ATP-Bioluminescence-Kit (Roche) nach den Vorgaben des Herstellers. Ein entsprechendes Volumen an ATP-Standard wurde in ein gleiches Röhrchen transferiert. Dann wurde das Luciferase Reagenz hinzugefügt und die Emission bei 562 nm über 10 Sekunden integriert mit einem Asorptionsspektrophotometer gemessen. Die Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte durch Berechnungen anhand der Standardkurve.

### 2.3.25 Einfluß der Glutathion-Depletion

LN18, LN229, U87MG, und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden in 150 cm<sup>3</sup> Plastik-Zellkulturflaschen (Falcon), wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Die Zellen wurden mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose inkubiert in einer Konzentration von 1, 5, 25, 50, 100 bzw. 200 µg/ml inkubiert. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Gleich vorbehandelte Zellen wurden mit Cisplatin 0,5 mM behandelt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Gleichbehandelte Zellen wurden vor der Inkubation mit Taurolidin, Taurultam, Taurultam-Glucose mit DL-Buthioninsulfoxid (BSO) in einer Konzentration von 1 mM für 20 Stunden inkubiert. Nach der 20stündigen Inkubation mit BSO wurden die Überstände abpipettiert und frisches Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden dann mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in den o.g.

Konzentrationen sowie erneut BSO 1 mM behandelt und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Gleich vorbehandelte Zellen wurden mit Cisplatin 0,5 mM und erneut BSO 1 mM für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte analog zu Abschnitt 2.3.7 die Färbung und Analyse der Zellen. Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Ansätze wurde verglichen.

### **2.3.26 Einfluss von 3-MA**

LN18, LN229, U87MG, und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit 3-Methyladenin (3-MA) in Konzentrationen von 1, 2,5, 5 und 10 mM, Taurolidin 50, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose 100 µg/ml bzw. in entsprechenden Kombinationen von 3-MA, Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschliessend analog Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Ansätze wurde verglichen.

### **2.3.27 Einfluss von 3-MA und Bafilomycin**

LN18, LN229, U87MG, und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden, wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Bafilomycin-A1 100 nM; 3-MA 2,5 oder 5 mM; Taurolidin 50 µg/ml; Taurultam bzw. Taurultam-Glucose 100 µg/ml bzw. in entsprechenden Kombinationen. Die Zellen wurden dann für 20 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschliessend analog Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen. Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Ansätze wurde verglichen.

### **2.3.28 Einfluss auf die VEGF-Expriemierung**

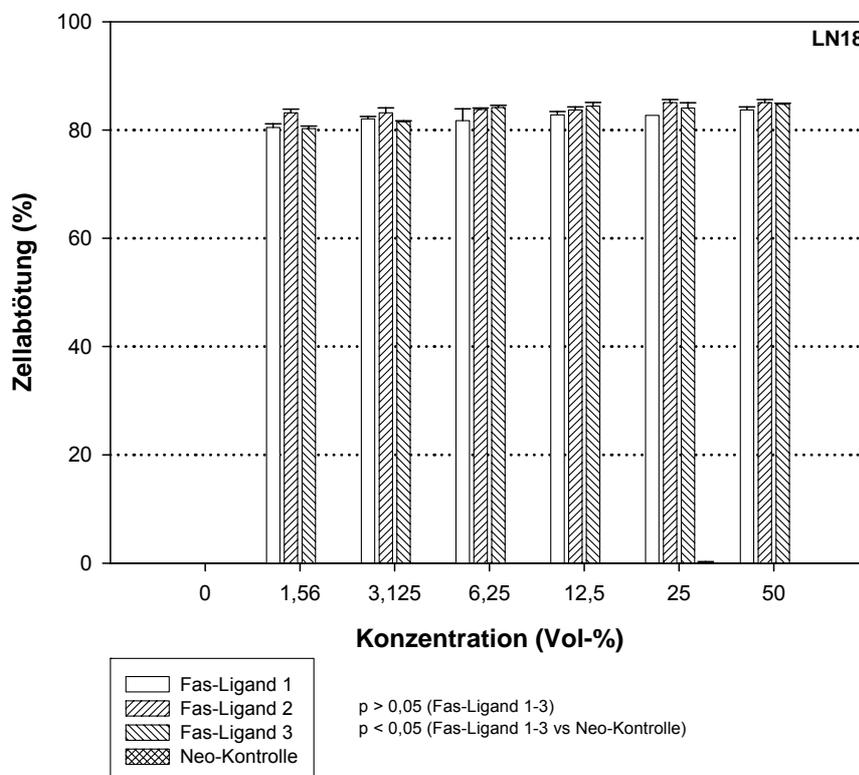
LN18, LN229, U87MG, U138, U251 und ex vivo Glioblastomzellen-I wurden in 150 cm<sup>3</sup> großen Plastik-Zellkulturflaschen (Falcon), wie in Absatz 2.3.9 beschrieben, ausgesät. Die Kontrolle der Anhaftung der Zellen und der Mediumwechsel erfolgten ebenfalls wie in Absatz 2.3.9 beschrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Taurolidin 25 und 100, Taurultam 100 und 200 und Taurultam-Glucose 100 und 200 µg/ml für 24 Stunden und mit Taurolidin 25 bzw. 100 µg/ml für 6 und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zu unbehandelten Kontrollzellen wurde Medium in derselben Menge hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 25 % bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung des zytotoxischen Effektes unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert). Danach wurden die Überstände abpipettiert, in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 5

Minuten bei 250 x g (Eppendorf) zentrifugiert. Dann wurden die Überstände in 1,5 ml Nunc-Röhrchen (Nalge-Nunc) pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse von VEGF wurde mittels VEGF-ELISA (R&D Systems) entsprechend der Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden analog zu Abschnitt 2.3.7 gefärbt und ausgelesen.

## 2.4 Ergebnisse

### 2.4.1 Untersuchung der Fas-Ligand Überstände auf die zytotoxische Wirkung

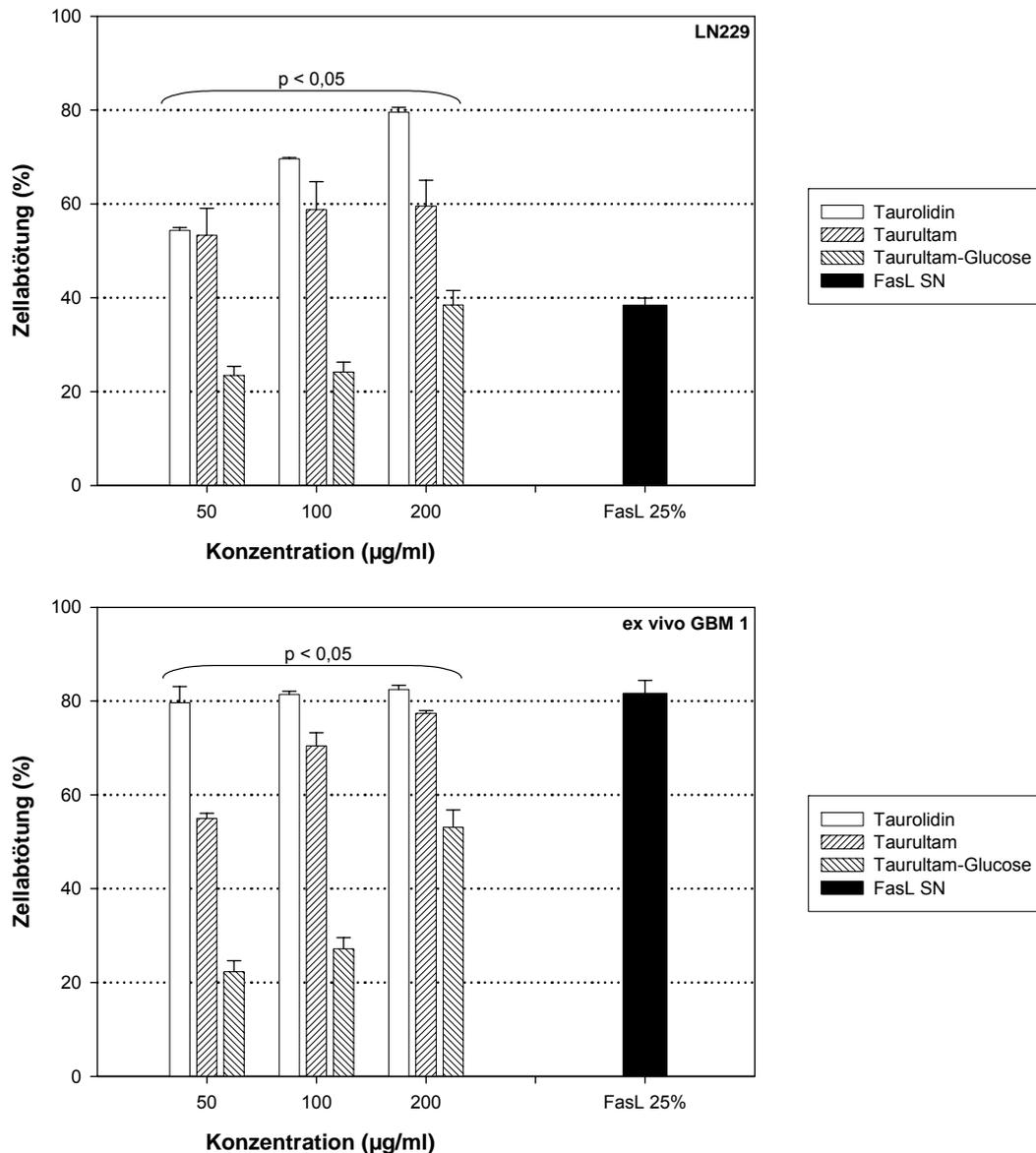
Die Fas-Ligand Überstände 3 verschiedener überexprimierender Systeme zeigten hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung auf LN18 Zellen keinen signifikanten Unterschied (Varianzanalyse;  $p > 0,05$ ) (Bild 2.3). Erwartungsgemäß trat bei der Inkubation der LN18 Zellen mit der Neokontrolle keine zytotoxische Wirkung auf. Dieser Unterschied zu der Wirkung der Fas-Ligand Überstände war signifikant (t-Test;  $p < 0,05$ ). Da sich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Wirksamkeit gezeigt hatten, wurden für die folgenden Experimente Überstände aller Fas-Ligand produzierenden System verwendet.



**Bild 2.3** Vergleich der Fas-Ligand Überstände drei verschiedener überexprimierender Systeme hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung an LN18 Zellen. Es bestand keine signifikante Differenz. Die Neo-Kontrolle hatte keine zytotoxische Wirkung.

## 2.4.2 Einfluss auf Tumorzellproliferation und Tumorzellvitalität

Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose führten konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Tumorzell-Proliferation und zu einer Abtötung der Tumorzellen aller untersuchter Tumorzelllinien und ex vivo Tumorzellen (Bild 2.4).



**Bild 2.4** Zellabtötung nach einer 24stündigen Inkubation mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose am Beispiel von LN229 und ex vivo Glioblastom-I Zellen. Es zeigt sich die signifikante Differenz der Die zytotoxische Aktivität der 3 Substanzen unterscheidet sich signifikant (Varianzanalyse und Holm-Sidak-Test). Als Kontrolle wurden Zellen mit Fas-Ligand 25% inkubiert.

Die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  gibt die Wirkstoffkonzentration an, bei der 50 % der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen abgetötet sind. Es zeigte sich, dass bei allen untersuchten Zellarten die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  von Taurolidin größer war (mittlere  $EC_{50}=71,2 \pm 19,6 \mu\text{g/ml}$ ) als die von Taurultam (mittlere  $EC_{50}=132,4 \pm 40,8 \mu\text{g/ml}$ ), und die von Taurultam-

Glucose (mittlere  $EC_{50} > 200$ ). Diese Unterschiede waren signifikant (Varianzanalyse, paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test,  $p < 0,05$ ) (Tabelle 2.3; Tabelle 2.4; Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.3** Einfluss von Taurolidin auf die Proliferation und Vitalität von Tumorzelllinien und ex vivo Glioblastomzellen. ( $EC_{50}$  = mittlere effektive Konzentration; SD = Standardabweichung)

Zelllinie	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD	Maximale Zellabtötung (%) $\pm$ SD
<b>LN18</b>	48,6 $\pm$ 3,2	66,3 $\pm$ 1,2
<b>LN229</b>	38,9 $\pm$ 6,9	79,5 $\pm$ 1,1
<b>U87MG</b>	79,2 $\pm$ 8,2	69,3 $\pm$ 0,7
<b>U138</b>	92,4 $\pm$ 10,2	52,3 $\pm$ 5,3
<b>U251</b>	49,8 $\pm$ 4,5	73,8 $\pm$ 10,5
<b>U373</b>	72,3 $\pm$ 5,2	69,4 $\pm$ 4,9
<b>ex vivo GBM-1</b>	79,2 $\pm$ 2,8	82,5 $\pm$ 0,8
<b>ex vivo GBM-2</b>	102,3 $\pm$ 6,3	60,5 $\pm$ 5,1
<b>ex vivo GBM-3</b>	62,5 $\pm$ 2,9	73,5 $\pm$ 3,5
<b>ex vivo GBM-4</b>	72,3 $\pm$ 6,8	89,3 $\pm$ 4,4
<b>ex vivo GBM-5</b>	85,4 $\pm$ 12,1	68,4 $\pm$ 4,3
<b>Gesamt</b>	<b>71,2 <math>\pm</math> 19,6</b>	<b>71,3 <math>\pm</math> 10,2</b>

**Tabelle 2.4** Einfluss einer Inkubation mit Taurultam auf die Proliferation von Tumorzelllinien und ex vivo Glioblastomzellen. ( $EC_{50}$  = mittlere effektive Konzentration; SD = Standardabweichung)

Zelllinie	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD	Maximale Zellabtötung (%) $\pm$ SD
<b>LN18</b>	105,2 $\pm$ 12,1	62,3 $\pm$ 2,8
<b>LN229</b>	65,4 $\pm$ 2,9	59,5 $\pm$ 5,5
<b>U87MG</b>	129,3 $\pm$ 5,4	55,8 $\pm$ 2,2
<b>U138</b>	172,4 $\pm$ 14,6	46,7 $\pm$ 3,7
<b>U251</b>	106,5 $\pm$ 11,9	63,4 $\pm$ 9,4
<b>U373</b>	167,4 $\pm$ 22,8	62,9 $\pm$ 12,3
<b>ex vivo GBM-1</b>	84,4 $\pm$ 6,9	72,4 $\pm$ 0,6
<b>ex vivo GBM-2</b>	198,7 $\pm$ 14,5	51,4 $\pm$ 4,9
<b>ex vivo GBM-3</b>	123,4 $\pm$ 8,3	64,5 $\pm$ 5,3
<b>ex vivo GBM-4</b>	129,9 $\pm$ 29,3	78,3 $\pm$ 4,9
<b>ex vivo GBM-5</b>	146,9 $\pm$ 12,8	52,3 $\pm$ 3,9
<b>Gesamt</b>	<b>132,4 <math>\pm</math> 40,8</b>	<b>60,9 <math>\pm</math> 9,2</b>

Die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  von Taurolidin bei Tumorzelllinien unterschied sich nicht signifikant von der bei den ex vivo Glioblastomzellen ( $63,5 \pm 20,9 \mu\text{g/ml}$  vs.  $80,3 \pm 14,9 \mu\text{g/ml}$ ; t-Test,  $p=0,167$ ). Genauso verhielt es sich beim Taurultam ( $128,2 \pm 44,5 \mu\text{g/ml}$  vs.  $136,7 \pm 41,6 \mu\text{g/ml}$ ; t-Test,  $p=0,764$ ). Beim Taurultam-Glucose war die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  bei allen bis auf eine Zellart größer als  $200 \mu\text{g/ml}$ . Die maximale Zellabtötung im Vergleich zu unbehandelten Zellen betrug beim Taurolidin  $71,3 \pm 10,2 \%$ ; bei Taurultam  $60,9 \pm 9,2 \%$  und bei Taurultam-Glucose  $28,1 \pm 12,1 \%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test;  $p < 0,05$ ).

Die maximale Zellabtötung bei den Zelllinien unterschied sich nicht signifikant von der bei den ex vivo Zellen (Taurolidin:  $68,4 \pm 20,9 \%$  vs.  $74,8 \pm 11,4 \%$ ; t-Test;  $p=0,326$ ; Taurultam:  $58,4 \pm 6,4 \%$  vs.  $63,8 \pm 11,9 \%$ ; t-Test;  $p=0,429$ ; Taurultam-Glucose:  $28,9 \pm 11,4 \%$  vs.  $27,2 \pm 14,2 \%$ ; t-Test;  $p=0,822$ ). Die verschiedenen Tumorzellarten zeigten eine unterschiedliche Sensitivität auf die 3 Wirkstoffe (Tabelle 2.3; Tabelle 2.4; Tabelle 2.5). Am empfindlichsten zeigten sich die LN229 ( $EC_{50}$  von Taurolidin  $38,9 \pm 6,9 \mu\text{g/ml}$ ;  $EC_{50}$  von Taurultam  $65,4 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$ ), am resistentesten die U138 Zellen ( $EC_{50}$  von Taurolidin  $92,4 \pm 10,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $EC_{50}$  von Taurultam  $172,4 \pm 14,6 \mu\text{g/ml}$ ). Bei Taurultam-Glucose lag die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  bis auf eine Ausnahme bei Werten von mehr als  $200 \mu\text{g/ml}$ . Bei den ex vivo Glioblastomzellen zeigten sich die GBM-3 Zellen ( $EC_{50}$  von Taurolidin  $62,5 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$ ) und GBM-1 Zellen ( $EC_{50}$  von Taurultam  $84,4 \pm 6,9 \mu\text{g/ml}$ ) am empfindlichsten, und die GBM-2 Zellen am resistentesten ( $EC_{50}$  von Taurolidin  $102,3 \pm 6,3 \mu\text{g/ml}$ ;  $EC_{50}$  von Taurultam  $198,7 \pm 14,5 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabelle 2.5** Einfluss einer Inkubation mit Taurultam-Glucose auf die Proliferation von Tumorzelllinien und ex vivo Glioblastomzellen. ( $EC_{50}$  = mittlere effektive Konzentration; SD = Standardabweichung)

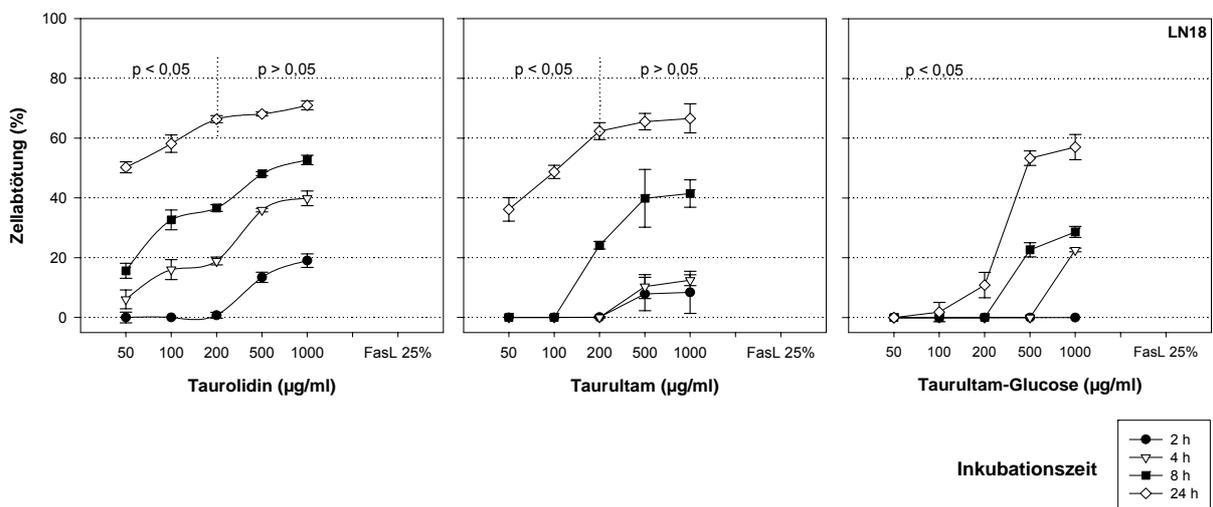
Zelllinie	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD	Maximale Zellabtötung (%) $\pm$ SD
LN18	> 200	10,8 $\pm$ 4,2
LN229	> 200	38,4 $\pm$ 3,1
U87MG	> 200	37,5 $\pm$ 6,3
U138	> 200	25,4 $\pm$ 4,9
U251	> 200	39,2 $\pm$ 6,9
U373	> 200	22,4 $\pm$ 7,2
ex vivo GBM-1	186,2 $\pm$ 21,30	23,1 $\pm$ 3,7
ex vivo GBM-2	> 200	5,3 $\pm$ 1,7
ex vivo GBM-3	> 200	34,1 $\pm$ 8,3
ex vivo GBM-4	> 200	43,2 $\pm$ 9,2
ex vivo GBM-5	> 200	30,1 $\pm$ 6,2
<b>Gesamt</b>	<b>&gt; 200</b>	<b>28,1 <math>\pm</math> 12,1</b>

### 2.4.3 Konzentrations - und Zeitabhängigkeit der Zellabtötung

Bei einer Steigerung der Taurolidin-Konzentration von 100 auf 200  $\mu\text{g/ml}$  und einer Inkubationszeit von 24 Stunden ergab sich eine signifikante durchschnittliche Steigerung der Zellabtötung um  $8,6 \pm 5,9 \%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test,  $p < 0,05$ ). Die Konzentrationserhöhung von 200 auf 500  $\mu\text{g/ml}$  hatte hingegen nur eine nicht signifikante Steigerung um  $2,8 \pm 0,7\%$ ; und die Konzentrationsteigerung von 200 auf 1000  $\mu\text{g/ml}$  um  $4,2 \pm 0,9 \%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test;  $p > 0,05$ ) zur Folge.

Bei einer Steigerung der Taurultam-Konzentration von 100 auf 200  $\mu\text{g/ml}$  und einer Inkubationszeit von 24 Stunden ergab sich eine durchschnittliche Steigerung der Zellabtötung um  $6,4 \pm 5,4 \%$ , die statistisch signifikant war (t-Test;  $p < 0,05$ ). Die Konzentrationserhöhung von 200 auf 500 und von 200 auf 1000  $\mu\text{g/ml}$  resultierte nur in einer nicht signifikanten Steigerung um  $3,1 \pm 2,3 \%$  bzw. um  $5,9 \pm 4,6 \%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test,  $p > 0,05$ ).

Die Erhöhung der Taurultam-Glucose-Konzentration von 100 auf 200  $\mu\text{g/ml}$  bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden führte zu einer signifikanten durchschnittlichen Zunahme der Zellabtötung um  $16,1 \pm 7,1\%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test,  $p < 0,05$ ). Bei Konzentrationserhöhung von 200 auf 500 bzw. von 200 auf 1000  $\mu\text{g/ml}$  zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung der zellabtötenden Wirkung um  $22,4 \pm 14,2 \%$  bzw. um  $28,5 \pm 12,7 \%$  (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test,  $p > 0,05$ ) (Bild 2.5).

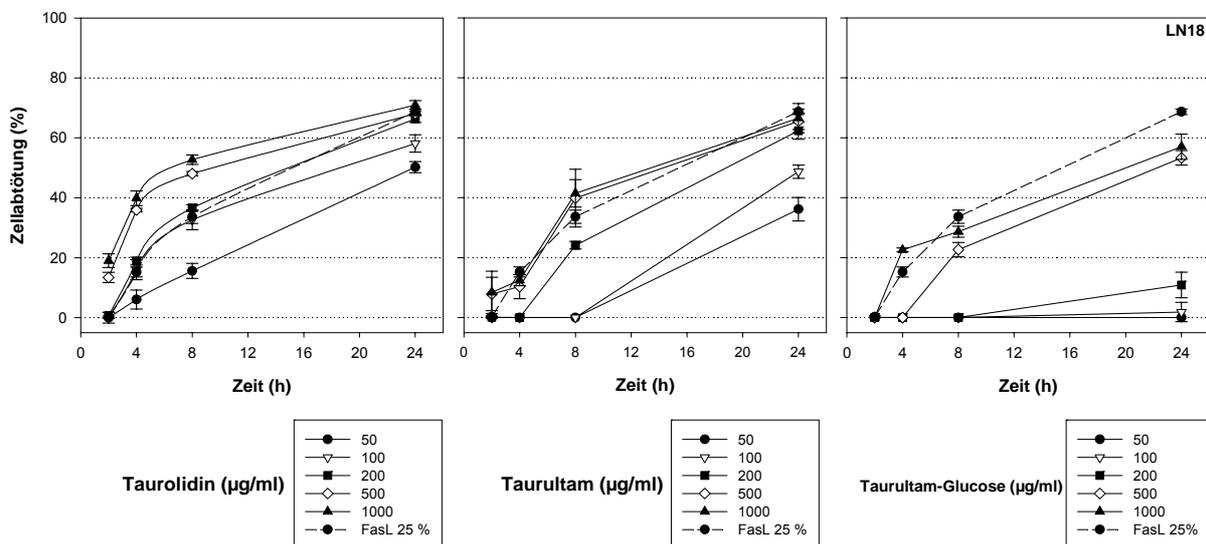


**Bild 2.5** Einfluss der Konzentration von Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose auf die Proliferationshemmung und Abtötung von LN18 Tumorzellen. Bei der längsten Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass eine Erhöhung der Taurolidin- bzw. Taurultam-Konzentration über 200  $\mu\text{g/ml}$  nicht zu einer signifikanten Steigerung der zytotoxischen Wirkung führt.

Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass eine Erhöhung der Taurolidin- bzw. Taurultamkonzentration über 200  $\mu\text{g/ml}$  nicht zu einer signifikanten Zunahme der Zellabtötung

fürhte. Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte beim Übergang von 100  $\mu\text{g/ml}$  Taurultam-Glucose auf 200  $\mu\text{g/ml}$  kein signifikanter Zuwachs der zellabtötenden Wirkung festgestellt werden, wohl aber bei einer Steigerung auf 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Dies könnte auf einen anderen, zusätzlichen Mechanismus mit einer anderen Zeitkinetik hindeuten.

Bei höheren Konzentrationen führte eine längere Inkubationszeit nur zu einer geringeren Zunahme der zytotoxischen Wirkung. Bei einer Taurolidin-Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  ergab sich bei einer Erhöhung der Inkubationszeit von 8 auf 24 Stunden ein durchschnittlicher Zuwachs der zytotoxischen Wirkung um  $31,3 \pm 8,4 \%$ . Bei einer Taurolidin-Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  betrug der Zuwachs im Durchschnitt  $17,7 \pm 3,96 \%$ ; bei 1000  $\mu\text{g/ml}$   $16,2 \pm 3,2 \%$ . Die Differenzen bei einer Konzentrationsteigerung von 200 auf 500 und auf 1000  $\mu\text{g/ml}$  waren signifikant (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p < 0,05$ ), bei Konzentrationsteigerung von 500 auf 1000  $\mu\text{g/ml}$  dagegen nicht. Bei einer Taurultam-Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  erhöhte sich die zellabtötende Wirkung bei einer Verlängerung der Inkubationszeit von 8 auf 24 Stunden um durchschnittlich  $28,4 \pm 10,1 \%$ , bei Steigerung auf 500  $\mu\text{g/ml}$  um durchschnittlich  $15,9 \pm 7,5 \%$ ; und bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  um durchschnittlich  $16,9 \pm 6,5 \%$ . Die Steigerung der Inkubationszeit von 8 auf 24 Stunden mit einer Taurultam-Glucose Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  bewirkte einen durchschnittlichen Zuwachs der Zellabtötung um  $21,1 \pm 11,5 \%$ , bei 500 um  $28,9 \pm 7,4 \%$ ; bei 1000 um  $31,2 \pm 8,9 \%$ . Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant (Varianzanalyse;  $p > 0,05$  Bild 2.6).



**Bild 2.6** Steigerung der zytotoxischen Wirkung von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose durch Verlängerung der Inkubationszeit am Beispiel der LN18 Zellen. Als Kontrolle dienten mit FasLigand 25 % inkubierte Zellen.

Der zeitliche Verlauf der zytotoxischen Wirkung der Taurolidin-Konzentrationen 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  unterschied sich nicht signifikant (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p > 0,05$ ). Bei dem Vergleich des zeitlichen Verlaufes der zellzahlmindernden Wirkung zwischen den Taurolidin - Konzentrationen 500 vs. 200, 100 und 50  $\mu\text{g/ml}$  war dagegen eine signifikante Differenz nachweisbar (Varianzanalyse,

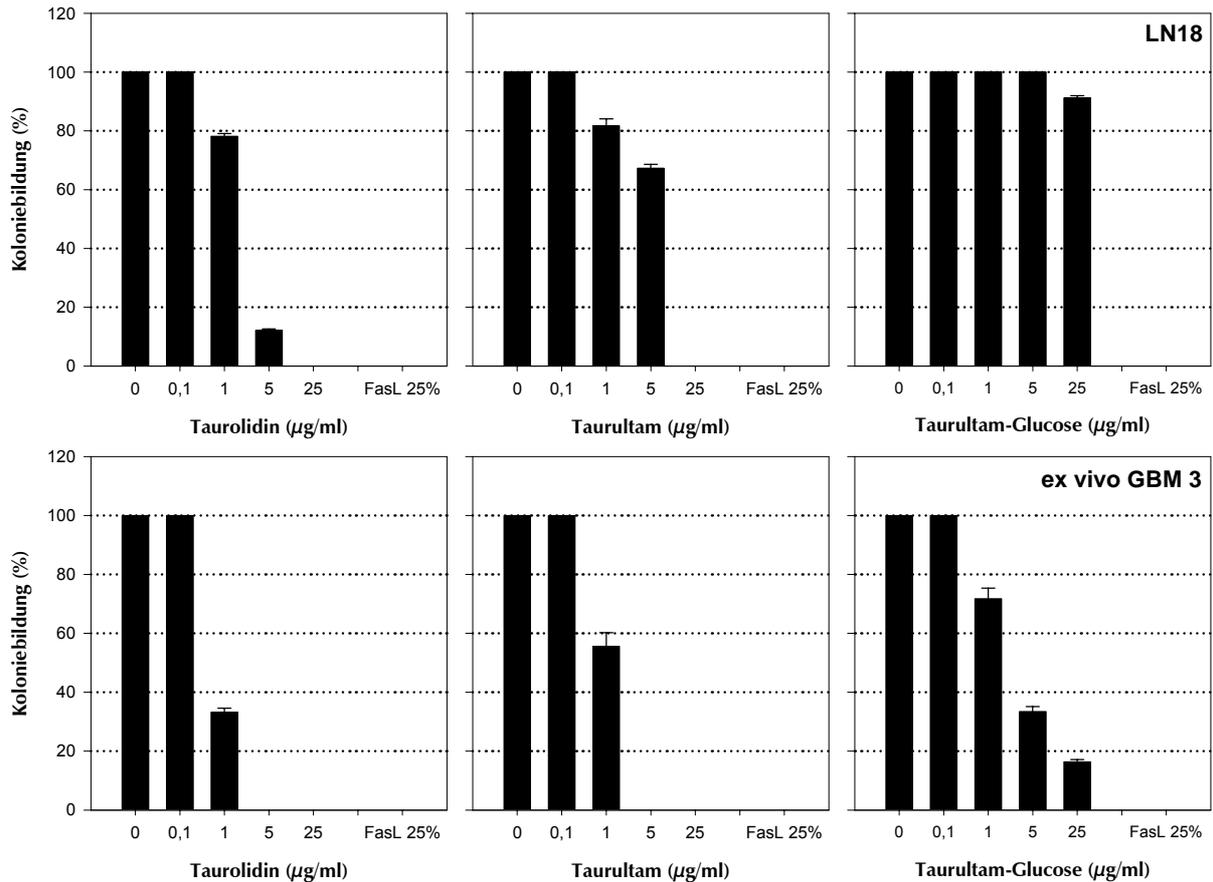
Student-Newman-Test;  $p < 0,05$ ). Beim Taurultam fand sich im zeitlichen Verlauf der Zellabtötung zwischen den Konzentrationen 1000 und 500  $\mu\text{g/ml}$ , außer bei den U87MG Zellen, keine signifikante Differenz (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p > 0,05$ ; U87MG-Zellen:  $p = 0,005$ ). Der zeitliche Verlauf der Zellabtötung bei den Taurultam-Konzentrationen 500 vs. 100 und 50  $\mu\text{g/ml}$  unterschied sich signifikant (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p < 0,05$ ). Der zeitliche Verlauf der zytotoxischen Wirkung nach Inkubation mit Taurultam-Glucose in verschiedenen Konzentrationen unterschied sich nicht signifikant (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p > 0,05$ ). Zusammenfassend erscheint eine Erhöhung der Konzentration von Taurolidin und Taurultam über 200  $\mu\text{g/ml}$  nicht sinnvoll, da nur ein nicht signifikanter Anstieg der zytotoxischen Wirkung zu verzeichnen war. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 24 Stunden führte jedoch bei Taurolidin und Taurultam zu einem signifikanten Anstieg der zytotoxischen Wirkung.

#### 2.4.4 Einfluss auf die Koloniebildung

Als Koloniebildungsrate wird das Verhältnis der Anzahl gebildeter Kolonien zu den ausgesäten Zellen bezeichnet. Die durchschnittliche Koloniebildungsrate betrug  $11,6 \pm 7,2 \%$  (2,0-22,7 %). Die durchschnittliche Koloniebildungsrate der Tumorzelllinien war signifikant höher als die der ex-vivo-Glioblastomzellen ( $16,4 \pm 4,6 \%$  vs.  $4,5 \pm 2,6 \%$ ; t-Test,  $p = 0,002$ ).

Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose führten konzentrationsabhängig zu einer Verminderung oder Verhinderung der Koloniebildung bei allen untersuchten Tumorzelllinien und ex vivo Glioblastomzellen.

Bei allen untersuchten Zellarten war die hemmende Wirkung von Taurolidin größer (durchschnittliche  $EC_{50} = 1,2 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) als die von Taurultam (durchschnittliche  $EC_{50} = 3,1 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$ ), und von Taurultam-Glucose (durchschnittliche  $EC_{50} = 10,2 \pm 10,1 \mu\text{g/ml}$ ) (Varianzanalyse, Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,006$ ; paarweiser Vergleich mit Dunn's Test: TTG vs. T:  $p < 0,05$ ; TTG vs. TT:  $p > 0,05$ ; TT vs. T:  $p > 0,05$ ). Die  $EC_{50}$  von Taurolidin bei den Tumorzelllinien unterschied sich nicht signifikant von der  $EC_{50}$  der ex vivo Glioblastomzellen ( $1,3 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$  vs.  $0,9 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ; t-Test,  $p = 0,283$ ). Genauso verhielt es sich bei Taurultam ( $3,4 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$  vs.  $0,9 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ; t-Test,  $p = 0,054$ ) und Taurultam-Glucose ( $9,9 \pm 12,1 \mu\text{g/ml}$  vs.  $10,5 \pm 10,5 \mu\text{g/ml}$ ; t-Test,  $p = 0,948$ ) (Bild 2.7). Bei den verschiedenen Tumorzellarten konnten deutliche Unterschiede in der Sensitivität auf Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose festgestellt werden (Tabelle 2.6).



**Bild 2.7** Einfluss der Inkubation von LN18 Zellen (oben) und ex-vivo-Glioblastomzellen-3 (unten) mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose auf die Koloniebildung .

**Tabelle 2.6** Einfluss einer Inkubation von Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen mit Taurolidin, Taurultam oder Taurultam-Glucose auf die Koloniebildung. Die Inkubation erfolgte bis Kolonien von mehr als 50 Zellen gebildet wurden. (SD=Standardabweichung;  $R_c$  = Koloniebildungsrate;  $EC_{50}$  = mittlere effektive Konzentration)

Zellart	$R_c$ (%) ± SD	$EC_{50}$ (μg/ml) ± SD		
		Taurolidin	Taurultam	Taurultam-Glucose
LN-18	17,0 ± 2,2	1,9 ± 0,0	6,8 ± 1,1	> 25,0 <sup>a</sup>
LN-229	19,3 ± 1,2	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1	23,6 ± 7,0
U-87MG	9,5 ± 2,5	1,2 ± 0,8	4,5 ± 1,0	> 25,0 <sup>a</sup>
U-138	22,7 ± 1,6	2,4 ± 1,9	3,6 ± 1,4	> 25,0 <sup>a</sup>
U-251	16,2 ± 1,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2
U-373	13,6 ± 0,8	1,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1	4,9 ± 0,1
ex vivo GBM 1	7,9 ± 0,6	1,4 ± 0,2	6,9 ± 2,3	> 25,0 <sup>a</sup>
ex vivo GBM 2	5,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,0	5,0 ± 2,7
ex vivo GBM 3	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,3
ex vivo GBM 4	3,0 ± 1,4	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	9,7 ± 2,5
ex vivo GBM 4	Keine Koloniebildung			
<b>Gesamt ± SD</b>	<b>11,6 ± 7,2</b>	<b>1,2 ± 0,6</b>	<b>3,1 ± 0,8</b>	<b>7,7** ± 8,4<sup>b</sup></b>

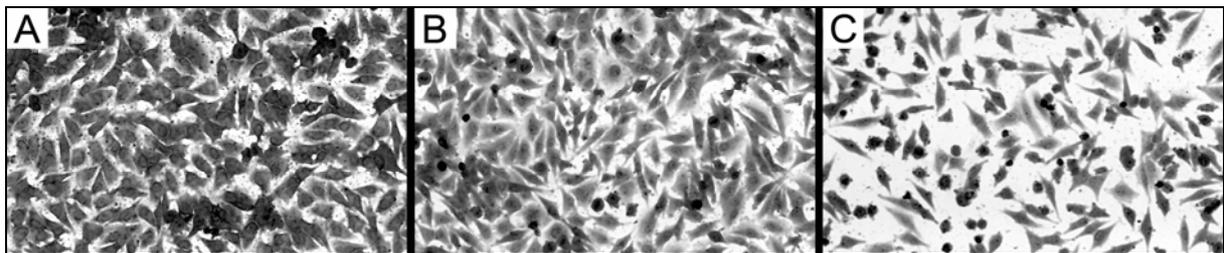
<sup>a</sup> Berechnungen mit der Regressionsanalyse wurden nicht durchgeführt, da mit der höchsten gewählten Konzentration die  $EC_{50}$  nicht erreicht wurde und damit der Fehler zu hoch ist.

<sup>b</sup> Berechnung nur anhand der Werte unter 25 μg/ml durchgeführt

### 2.4.5 Einfluss auf die Zellmorphologie

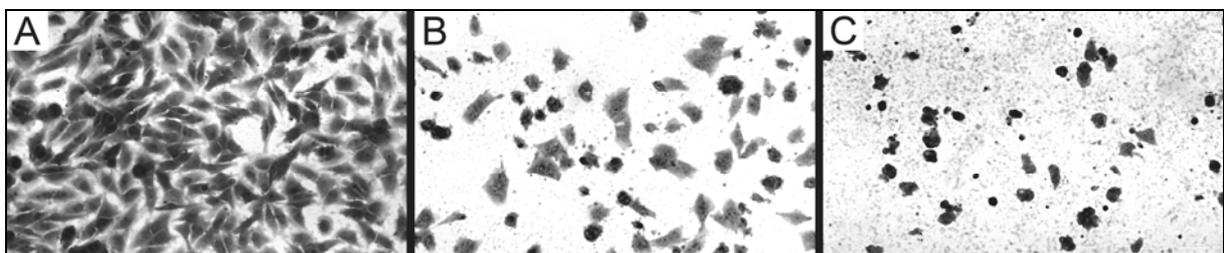
#### Lichtmikroskopische Veränderungen

Die lichtmikroskopischen Veränderungen der Tumorzellen wurden nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose erfasst. In den Bildern werden beispielhaft die Veränderungen der LN229 Zellen dargestellt. Die Veränderungen der anderen Zellarten korrelierten jedoch mit denen der LN229 Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 5 bzw. 25 % zur Positivkontrolle kam es zellartabhängig zu einer Zellzahlverminderung und teilweise zu einer Auflösung der Zellstruktur (Bild 2.8).



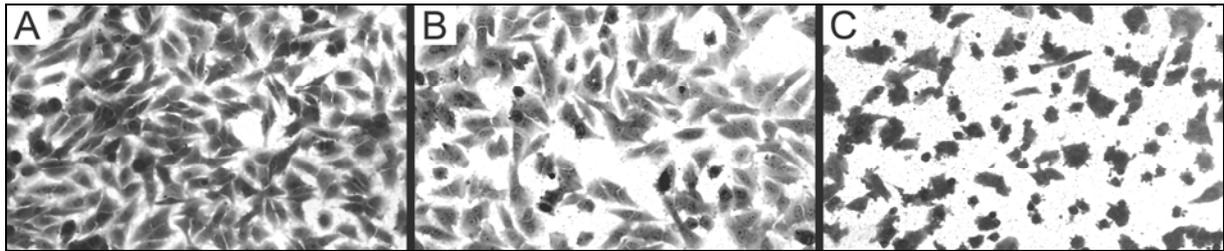
**Bild 2.8** LN229 Zellen vor (A) und nach Inkubation mit Fas-Ligand 5 (B) und 25 % (C) für 24 Stunden. Die Zellen zeigen sich auch bei der hohen Konzentration an Fas-Ligand relativ resistent (Vergrößerung 200 x).

Bei allen untersuchten Zelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Veränderung der Zellmorphologie nach Inkubation mit Taurolidin und Taurultam. Taurultam-Glucose führte in dem untersuchten Konzentrationsbereich nur zu sehr geringen morphologischen Veränderungen. Nach Inkubation mit Taurolidin kam es konzentrationsabhängig zu einer zunehmenden Zellpyknose. Das Zellplasma schrumpfte, während die Zellkerne in ihrer äußeren Struktur noch erhalten blieben. Die Zellen verloren ihre Fortsätze und es kam zu einer zuletzt vollständigen Auflösung der Zellstruktur (Bild 2.9).



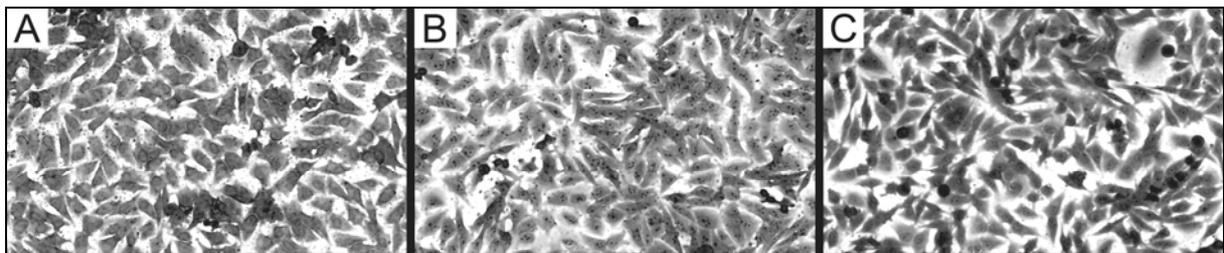
**Bild 2.9** LN229 Zellen vor (A) und nach Inkubation mit Taurolidin in einer Konzentration von 50 (B) und 100 µg/ml (C) für 24 Stunden (Vergrößerung 200 x).

Bei Inkubation mit Taurultam waren die morphologischen Veränderungen bei einer Konzentration von 50 µg/ml nur schwach ausgeprägt, obwohl auch hier schon eine Verminderung der Zellzahl auffiel. Bei einer Taurultam-Konzentration von 100 µg/ml kam es dann wie beim Taurolidin zu einer zunehmenden Auflösung der Zellstruktur (Bild 2.10).



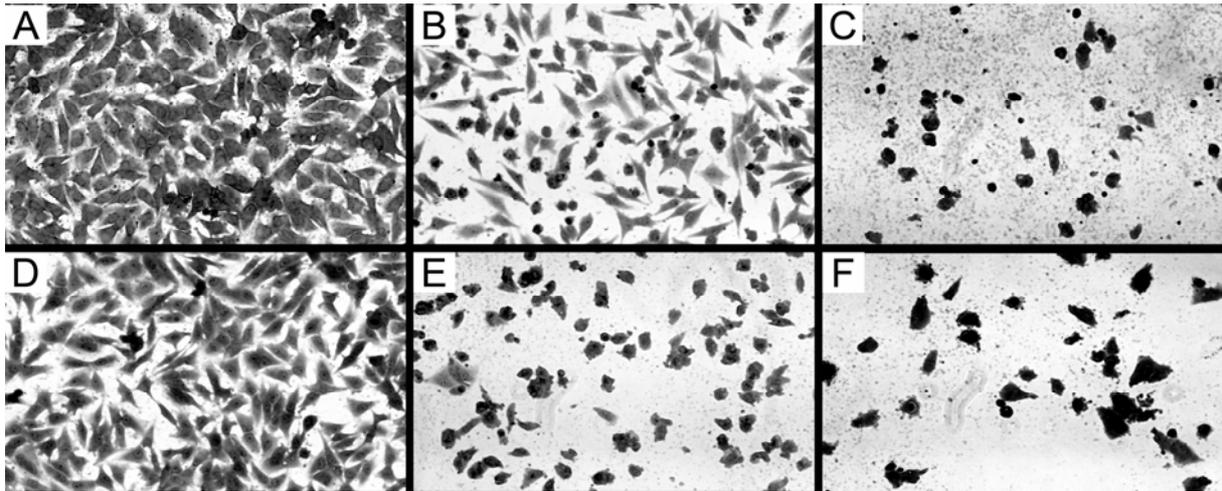
**Bild 2.10** LN229 Zellen vor (A) nach 24stündiger Inkubation mit Taurultam in einer Konzentration von 50 (B) und 100  $\mu\text{g/ml}$  (C) (Vergrößerung 200 x).

Nach Inkubation der Zellen mit Taurultam-Glucose zeigten sich in einer Konzentration bis 100  $\mu\text{g/ml}$  keine signifikanten Veränderungen der Zellmorphologie (Bild 2.11). Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen korrelierten mit den Ergebnissen der Zellzahlminderungs-Assays. Alle untersuchten Zelllinien und ex vivo Glioblastomzellen waren diesen Veränderungen unterworfen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Zellarten auf die Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose war unterschiedlich und korrelierte mit den Ergebnissen der Zellzahlminderungs-Assays.



**Bild 2.11** LN229 Zellen vor (links) und nach Inkubation mit Taurultam-Glucose in einer Konzentration von 50 (Mitte) und 100  $\mu\text{g/ml}$  (rechts) (Vergrößerung 200 x).

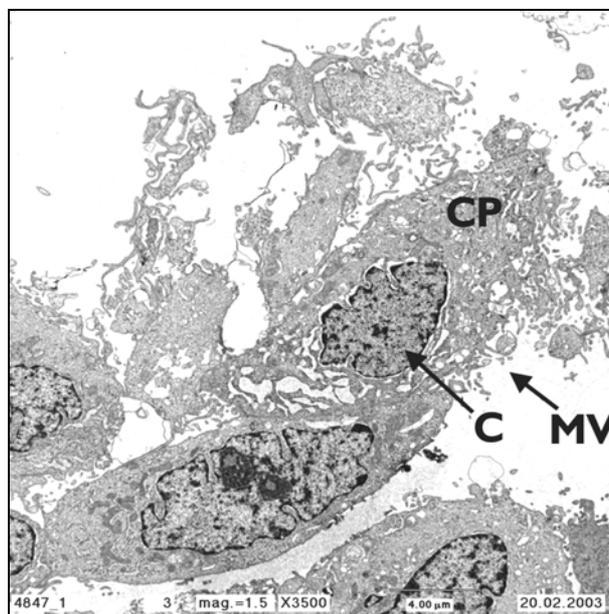
Zur weiteren Eingrenzung des Wirkungsmechanismus wurden die Zellen 40 Minuten vor der Inkubation mit Taurolidin mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk inkubiert. Die Inkubation mit z-VAD.fmk schützte die Zellen nicht vor dem durch Taurolidin vermittelten Zelltod. Auch dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen der Zellzahlminderungs-Assays. Außerdem wurden Zellen 20 Minuten vor der Zugabe von Taurolidin mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) inkubiert. Dies führte ebenfalls nicht zu einem Schutz der Zellen vor dem durch Taurolidin vermittelten Zelltod. Die Inkubation der Zellen mit N-Acetylcystein (NAC) 20 Minuten vor der Zugabe von Taurolidin konnte die Zellen dagegen weitgehend vor dem durch Taurolidin vermittelten Zelltod schützen (Bild 2.12).



**Bild 2.12** LN229 Zellen vor (A) und nach Inkubation mit Fas-Ligand 25 % (B), Taurolidin 100 µg/ml (C) (zum Zwecke der Anschaulichkeit übernommen aus Bild 2.9), Taurolidin 100 µg/ml + N-Acetylcystein (D), Taurolidin 100 µg/ml + z-VAD.fmk (E) und Taurolidin 100 µg/ml + 3-Aminobenzamid (F). Durch N-Acetylcystein wird der durch Taurolidin 100 µg/ml vermittelte Zelltod weitgehend verhindert. Durch z-VAD.fmk oder 3-Aminobenzamid kann der durch Taurolidin ausgelöste Zelltod nicht verhindert werden (Vergrößerung 200x).

### Elektronenmikroskopische Veränderungen

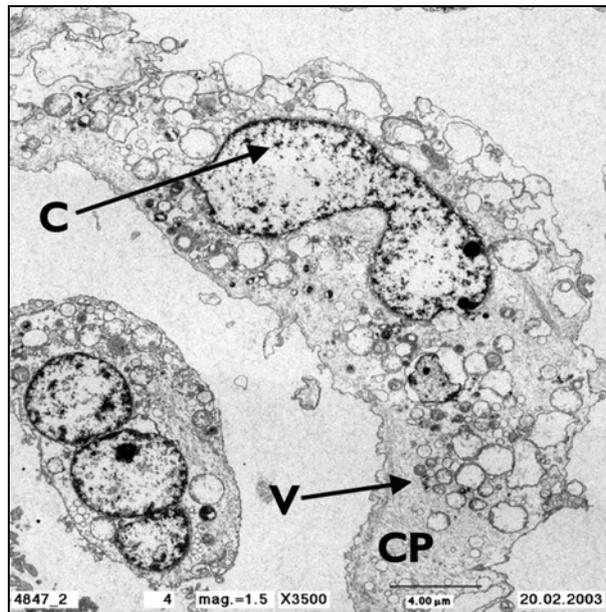
Bei unbehandelten U373 Zellen zeigten sich elektronenmikroskopisch eine Integrität des Zytoplasmas mit zytoplasmatischen Fortsätzen (im folgenden Mikrovilli genannt) und ein mehrheitlich unkondensiertes Chromatin bei vorhandenem Nucleolus (Bild 2.13).



**Bild 2.13** Unbehandelte U373 Tumorzellen im elektronenmikroskopischen Bild. Die Zellen haben ein intaktes Zytoplasma (CP) mit Mikrovilli (MV). Vakuolen lassen sich nicht nachweisen. Das Chromatin (C) ist bei vorhandenem Nucleolus relativ homogen verteilt.

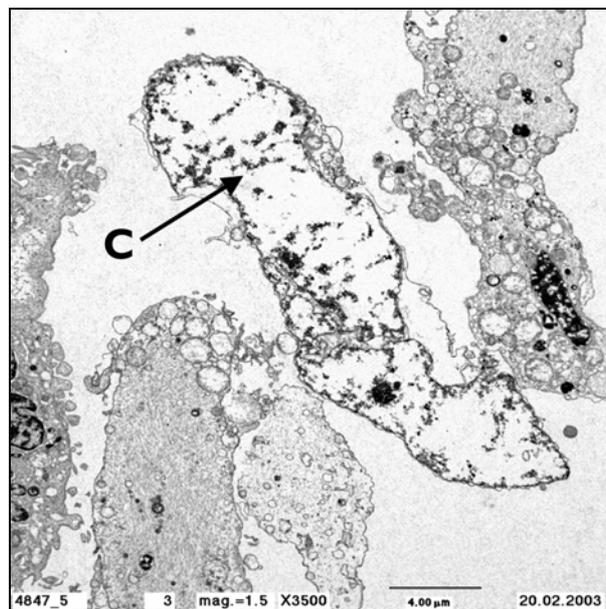
Nach der Behandlung mit Taurolidin kam es bereits nach 3 Stunden zu der Bildung zahlreicher intra-zytoplasmatischer Vakuolen. Mikrovilli waren nur noch selten nachweisbar, das Zytoplasma aber bei

den meisten Zellen noch vorhanden. Auffällig war eine fleckförmige Kondensation und teilweise auch Marginalisation des Chromatins (Bild 2.14).



**Bild 2.14** U373 Tumorzellen nach der Inkubation mit Taurolidin 100 µg/ml für 3 Stunden. Man erkennt die fleckförmige Kondensation des Chromatins (C) und zahlreiche intrazytoplasmatische Vakuolen. Mikrovilli sind nicht mehr nachweisbar. (V = Vakuolen, CP = Zytoplasma)

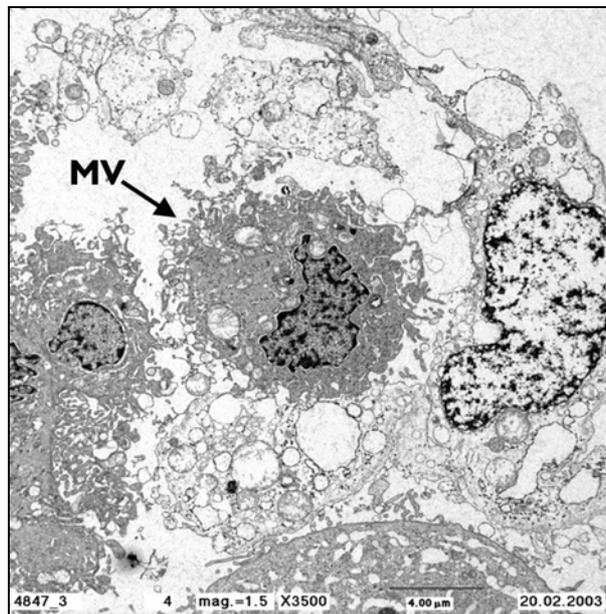
Nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin in einer Konzentration von 100 µg/ml ist das Zytoplasma bereits weitgehend abgebaut worden. In den restlichen Zytoplasmabereichen sind zahlreiche Vakuolen zu erkennen. Mikrovilli sind nur noch bei sehr wenigen Zellen vereinzelt vorhanden.



**Bild 2.15** U373 Zellen nach der Inkubation mit Taurolidin 100 µg/ml für 24 Stunden. Weitgehende fleck- und streifenförmige Kondensation des Chromatins (C). Bereits weit fortgeschrittene Auflösung des Zytoplasmas.

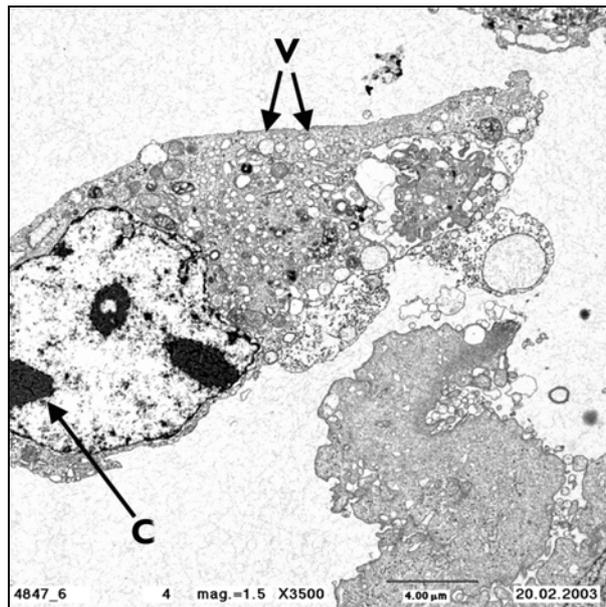
Zu der fleckförmigen ist auch eine streifenförmige Chromatinkondensation hinzugekommen. Die fleck- bzw. streifenförmige Kondensation und teilweise auch Marginalisation des Chromatins hat sich weitgehend vervollständigt (Bild 2.15).

Bei Inkubation der U373 Tumorzellen mit Taurultam in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  sind ebenfalls bereits nach 3 Stunden Zeichen des programmierten Zelltodes zu erkennen (Bild 2.16). Es zeigen sich neben Zellen mit ausgeprägter fleckförmiger Kondensation und Marginalisation des Chromatins aber auch relativ unbetreffene Zellen mit vorhandenen Mikrovilli, intaktem Zytoplasma und nur leicht kondensiertem Chromatin. Das Zytoplasma dieser Zellen ist jedoch wiederum von zahlreichen Vakuolen durchsetzt.



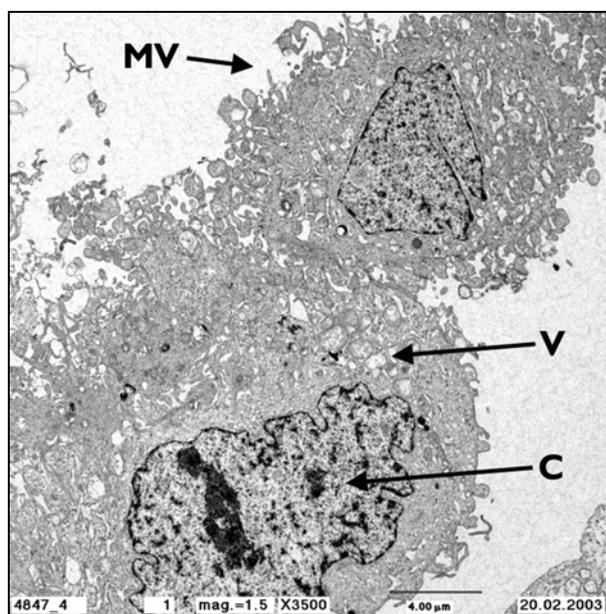
**Bild 2.16** Inkubation von U373 Tumorzellen mit Taurultam in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  für 3 Stunden. Bei einigen Zellen ist eine Chromatinkondensation zu erkennen (rechts im Bild). (MV = Mikrovilli)

Nach 24stündiger Inkubation mit Taurultam in der Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  kann man eine ausgeprägte intrazytoplasmatische Vakuolenbildung erkennen (Bild 2.17). Auffällig sind weiterhin die fleckförmige Kondensation und Marginalisation des Chromatins bei weitgehend erhaltenem Zytoplasma.



**Bild 2.17** U373 Tumorzellen nach 24stündiger Inkubation mit Taurultam 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Man erkennt die intracytoplasmatische Vakuolenbildung (V) und teilweise fleckförmige Kondensation des Chromatins (C).

Nach einer Inkubation von U373 Zellen mit Taurultam-Glucose in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für 24 Stunden hat die Mehrzahl der Zellen noch ein intaktes Zytoplasma mit Mikrovilli (Bild 2.18). Es liegt nur eine geringgradige fleckförmige Kondensation des Chromatin vor. Im Zytoplasma sind wenige Vakuolen sichtbar.

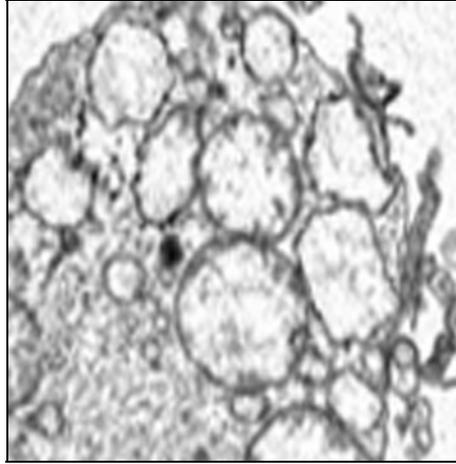


**Bild 2.18** Inkubation von U373 Tumorzellen nach der Inkubation mit Taurultam-Glucose 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für 24 Stunden. Die Mehrzahl der Zellen weist keine oder nur geringe Veränderungen auf. (MV = Mikrovilli; C = Chromatin; V = Vakuolen)

Insgesamt zeigten sich sowohl nach der Inkubation mit Taurolidin als auch nach der Inkubation mit Taurultam bereits nach 3 Stunden deutliche morphologische Veränderungen. Diese Veränderungen

sind zeitabhängig. Aus den Untersuchungen lässt sich ein chronologischer Ablauf der morphologischen Veränderungen postulieren:

1. Auftreten intrazytoplasmatischer Vakuolen (Bild 2.19). Die Anzahl und Größe dieser Vakuolen scheint mit zunehmender Inkubationszeit zuzunehmen.



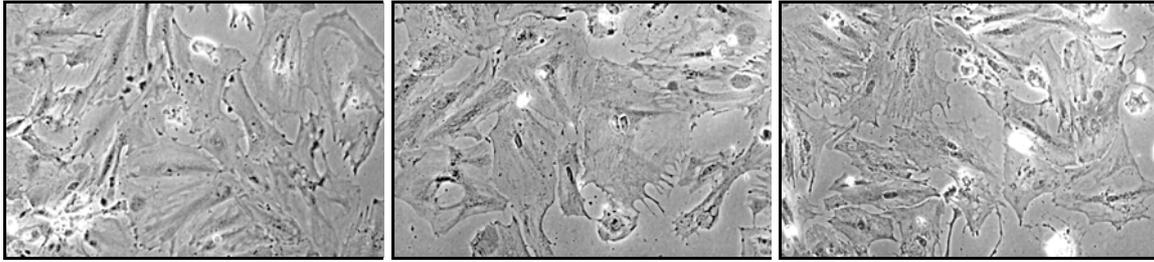
**Bild 2.19** Auftreten intrazytoplasmatischer Vacuolen bei U373 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin 100 µg/ml.

2. Verlust der zytoplasmatischen Mikrovilli
3. Beginn der fleckförmigen Kondensation und teilweise Marginalisation des Chromatins
4. Abbau des Zytoplasmas
5. Fortsetzung der fleckförmigen und Beginn der streifenförmigen Kondensation und Marginalisation des Chromatins
6. Vervollständigung der Kondensation des Chromatins.

Bei Inkubation mit Taurultam, das sich in den bisherigen Untersuchungen als schwächer wirksam als Taurolidin gezeigt hat, ist das Zytoplasma oft noch erhalten, während die Kondensation des Chromatins weit fortgeschritten ist. Hier wurde auch mehrheitlich eine ausschließlich fleckförmige Kondensation des Chromatins beobachtet.

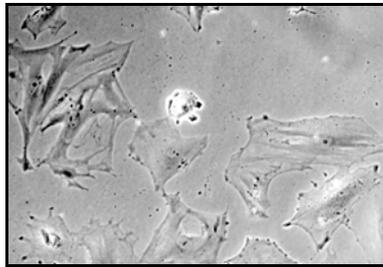
#### 2.4.6 Einfluss auf Zellen aus fetalen Rattenhirnen

Die Inkubation von Zellen aus fetalen Rattenhirnen mit Taurolidin in einer Konzentration von 1000 µg/ml führte nach 24 Stunden und auch nach 48 Stunden nicht zu morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Bild 2.20).



**Bild 2.20** Inkubation von Zellen aus fetalen Rattenhirnen mit Taurolidin 1000 µg/ml. Die Zellen nach 24stündiger (Mitte) und nach 48stündiger (rechts) Inkubation zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (links).

Bei Reinkubation der Zellen nach 48stündiger Inkubation mit Taurolidin in einer Konzentration von 1000 µg/ml und Reinkubation der Zellen in frischem Medium kam es zu einer Proliferation der fetalen Hirnzellen (Bild 2.21).

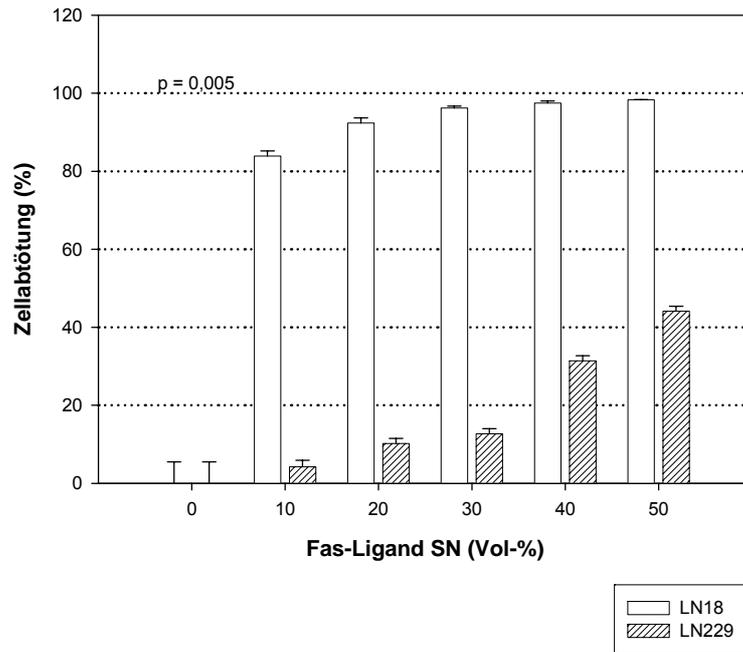


**Bild 2.21** Zellen aus fetalen Rattenhirnen wurden mit Taurolidin 1000 µg/ml für 48 Stunden inkubiert und anschließend mit normalem Medium reinkubiert. Es kam zu einer Proliferation der Zellen.

## 2.4.7 Synergismus mit dem durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod

### Sensitivität der LN18 und LN229 Zellen auf Fas-Ligand

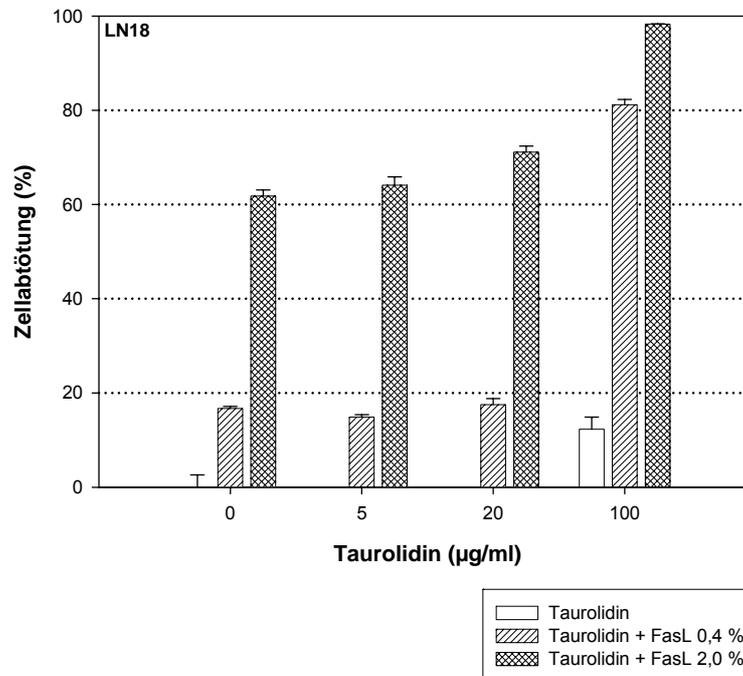
Die LN18 Zellen zeigten sich sehr sensitiv auf den durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod. Mehr als 90 % der Zellen verloren ihre Zellintegrität nach Inkubation mit Fas-Ligand in einer Konzentration von nur 6,25 %. Im Gegensatz dazu wurde die Lebensfähigkeit der LN-229 Zellen durch Fas-Ligand in dieser Konzentration nicht signifikant beeinflusst (Bild.2.22). Bei den höchsten verwendeten Konzentrationen an Fas-Ligand wurden nur 40 % der LN-229 Zellen abgetötet. Die beiden Zellarten weisen also eine sehr verschiedene Sensitivität auf den durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod auf. Diese Unterschiede waren signifikant (t-Test;  $p=0,005$ ).



**Bild.2.22** Abtötung von LN18 und LN229 Zellen nach 17-stündiger Inkubation mit Fas-Ligand.

### Einfluss von Taurolidin auf den durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod

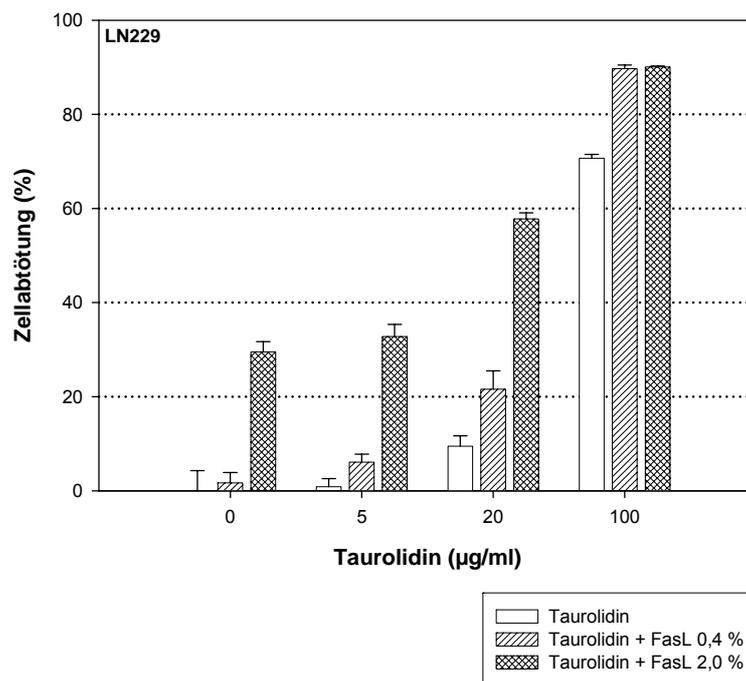
Taurolidin führte in Konzentrationen bis zu 100  $\mu\text{g/ml}$  nach einer Inkubationszeit von 17 Stunden nur zu einer relativ geringen Abtötung der LN18 Zellen um etwa 10 %. Die Gabe von Fas-Ligand allein führte zu einer konzentrationsabhängigen Zytotoxizität. Die Zellabtötung wurde durch Kombination des Fas-Liganden mit Taurolidin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  weiter reduziert (Bild 2.23).



**Bild 2.23** Abtötung von LN18 Zellen nach Inkubation mit Taurolidin allein oder in Kombination mit Fas-Ligand. Es kommt zu einer Verstärkung des antineoplastischen Effektes von Taurolidin.

Taurolidin ist in der Lage, den durch Fas-Ligand vermittelten programmierten Zelltod zu verstärken in einer Konzentration, in welcher eine Beeinflussung der Lebensfähigkeit der Zellen durch Taurolidin allein nicht vorlag. Die Kombination von Taurolidin in steigenden Konzentrationen mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 0,4 % führte zu einer geringen und nicht signifikanten Verstärkung des zytotoxischen Effektes. Lediglich die Kombination von Taurolidin mit Fas-Ligand in einer Konzentration von 2 % führte zu einer ausgeprägten und signifikanten Steigerung der zytotoxischen Wirkung (Kruskal-Wallis-Test, paarweiser Vergleich mit Dunn´s Test;  $p < 0,05$ ).

Die Inkubation von LN229 Zellen mit Taurolidin allein in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  führte zu einer signifikanten Abnahme der Zahl der lebenden Zellen um etwa 70 %. Ähnlich wie die LN18 Zellen waren auch die LN229 Zellen sensitiv auf den durch Fas-Ligand induzierten programmierten Zelltod, allerdings zu einem deutlich geringeren Ausmaß. So wurde die Anzahl lebender Zellen bei der Anwendung der höchsten Konzentration an Fas-Ligand nur um etwa 30 % reduziert. Die Inkubation mit Taurolidin hatte dabei einen synergistischen Effekt, der bereits bei einer Taurolidin-Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  zu erkennen war (Bild 2.24). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test;  $p = 0,212$ ) (Stendel et al. 2003a).

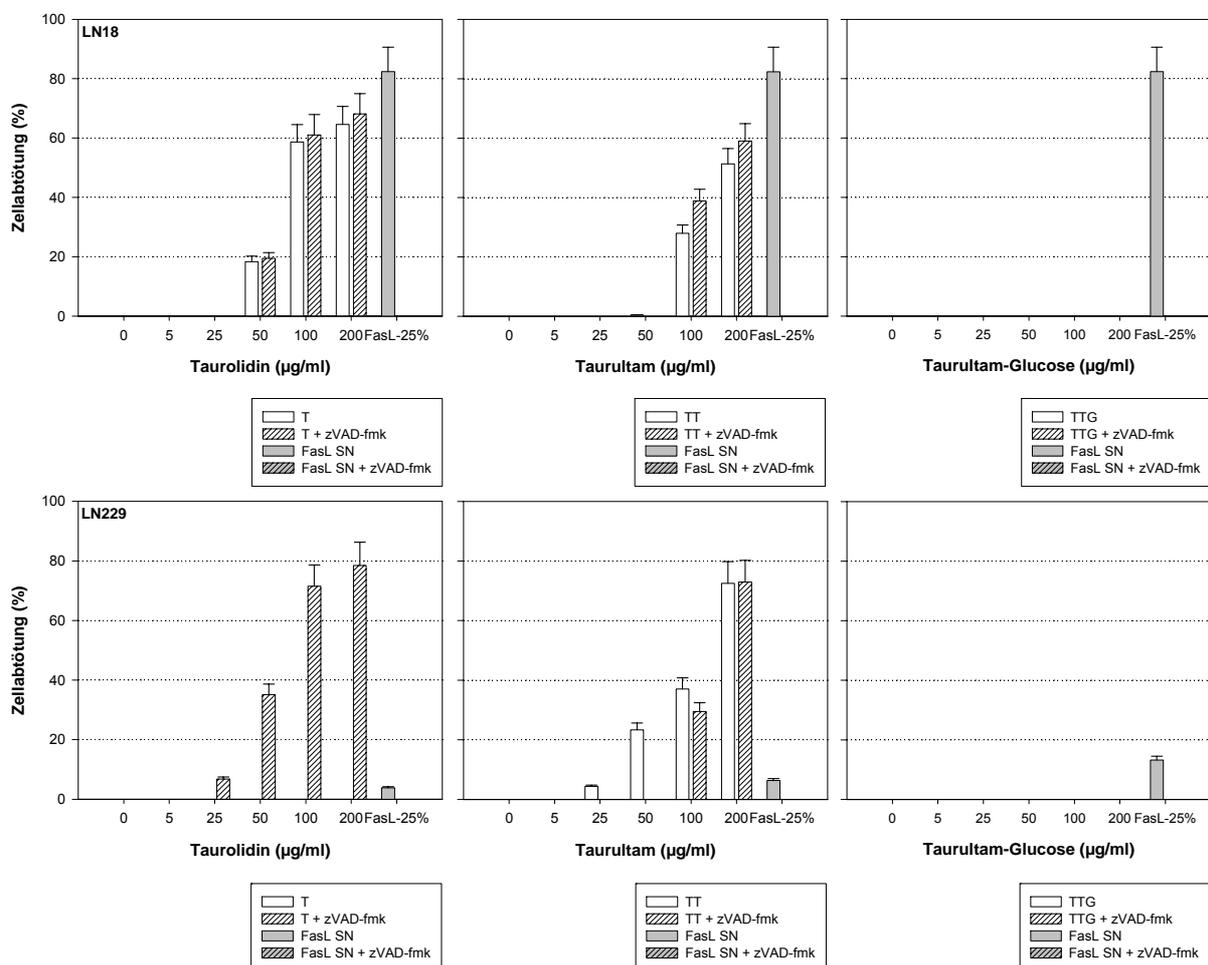


**Bild 2.24** Abtötung von LN229 Zellen nach Inkubation mit Taurolidin allein oder in Kombination mit Fas-Ligand. Es kommt zu einer Verstärkung des zytotoxischen Effektes von Taurolidin.

### 2.4.8 Einfluss einer Caspaseinhibition auf die antineoplastische Aktivität

Der zellpermeable Pan-Caspaseinhibitor z-VAD.fmk bindet irreversibel an alle Caspasen und hemmt deren Aktivität (Slee et al. 1996) (Qi et al. 1997). Somit wird die Auslösung des caspaseabhängigen programmierten Zelltodes verhindert.

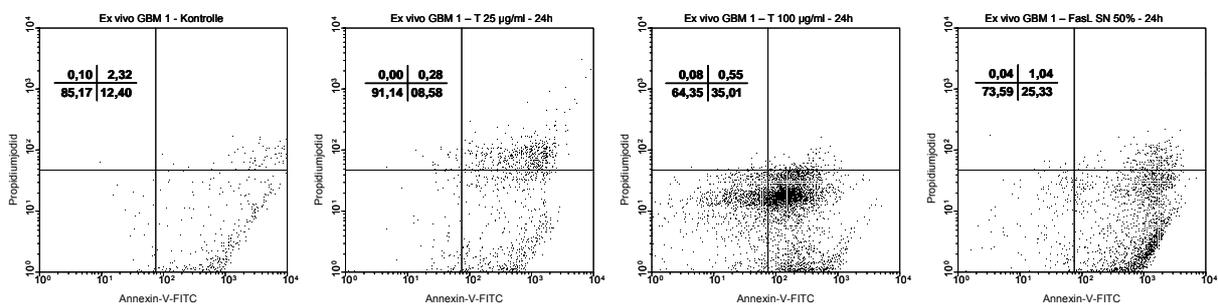
Die durch Inkubation mit Fas-Ligand induzierte Apoptose konnte durch die vorherige Inkubation mit z-VAD.fmk 50  $\mu\text{M}$  komplett verhindert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine geringe und nicht signifikante Inhibition der durch Taurolidin und Taurultam ausgelösten Zytotoxizität (Bild 2.25). Dieses Ergebnis lässt auf einen vollständig bzw. vorwiegend Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus schließen.



**Bild 2.25** Einfluss des Pancaspase-Inhibitors z-VAD.fmk auf die durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose vermittelte Zytotoxizität von LN18 und LN229 Zellen. Es zeigt sich lediglich eine geringe, nicht signifikante Wirkungsminderung, die auf einen (vorwiegend) Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus schließen lässt.

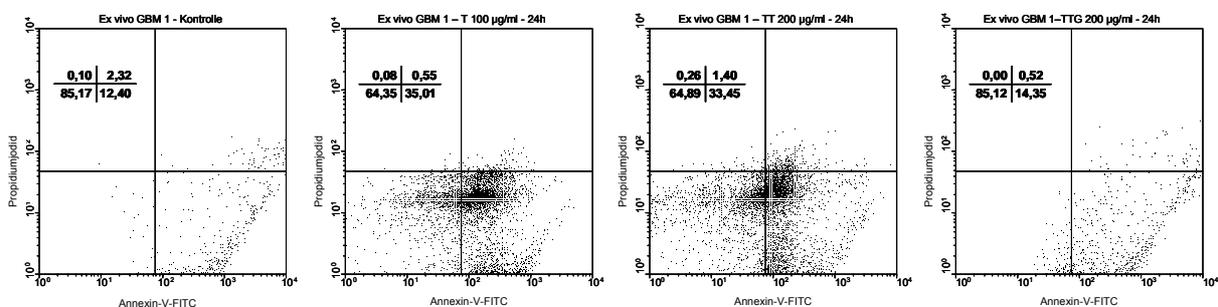
### 2.4.9 Einfluss auf die Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation zeigt eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme Annexin-V-positiver (apoptotischer) Zellen nach Inkubation mit Taurolidin (rechter unterer Quadrant). Bei unbehandelten ex vivo Glioblastomzellen-I waren 12,4 % der Zellen Annexin-V-positiv. Nach Inkubation mit Taurolidin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  für 24 Stunden stieg der Anteil Annexin-V-positiver Zellen auf 35 %. Eine Taurolidin Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  führte hingegen nicht zu einer Zunahme der Annexin-V-positiven Zellen. Als Kontrolle wurden ex vivo Glioblastomzellen-I mit Fas-Ligand 50 % für 24 Stunden inkubiert, wonach 25,3 % der Zellen Annexin-V-positiv waren (Bild 2.26).



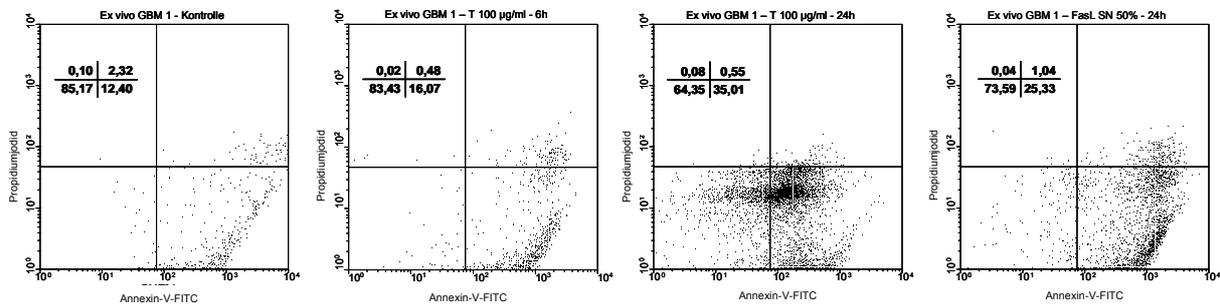
**Bild 2.26** Ex vivo Glioblastomzellen-I wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit Taurolidin 25 oder 100  $\mu\text{g/ml}$  mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  nahm der Anteil der apoptotischen, Annexin-V-positiven Zellen deutlich zu (rechter unterer Quadrant). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Fas-Ligand 50% inkubiert wurden. (GBM=Glioblastom; T=Taurolidin)

Die drei Wirksubstanzen Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose hatten einen unterschiedlichen Einfluss auf den Anteil Annexin-V-positiver Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation mit Taurultam in einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  stieg der Anteil Annexin-V-positiver Zellen von 12,4 auf 33,5 %. Nach einer 24-stündigen Inkubation der ex vivo Glioblastomzellen-I mit Taurultam-Glucose in einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  war nur eine sehr geringe Zunahme des Anteils Annexin-V-positiver Zellen auf 14,4 % zu verzeichnen (Bild 2.27).



**Bild 2.27** Nachweis der Phosphatidylserin-Externalisation nach 24-stündiger Inkubation von ex vivo Glioblastomzellen-I mit Taurolidin 100, Taurultam 200 und Taurultam-Glucose 200  $\mu\text{g/ml}$ . Nach Inkubation mit Taurolidin oder Taurultam zeigt sich eine deutliche Zunahme des Anteils Annexin-V-positiver Zellen. (GBM=Glioblastom; T=Taurolidin; TT=Taurultam; TTG=Taurultam-Glucose).

Nach der 6stündigen Inkubation von ex-vivo-Glioblastomzellen-I mit Taurolidin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konnte nur eine leichte Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen von 12,4 auf 16,1 % festgestellt werden. Nach 24 Stunden stieg dieser Anteil auf 35 % (Bild 2.28).



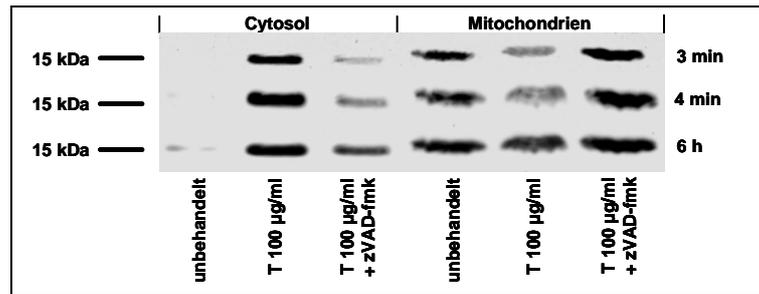
**Bild 2.28** Nach der 24-stündigen Inkubation von ex-vivo-Glioblastomzellen-I mit Taurolidin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zeigt sich eine deutliche Zunahme Annexin-V-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Mit Fas-Ligand 50 % inkubierte Zellen dienen als Positivkontrolle. (GBM=Glioblastom; T=Taurolidin)

## 2.4.10 Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C Freisetzung

### Untersuchung mittels Western-Blot

Wie aus den im Abschnitt 2.4.5 dargelegten Ergebnissen hervorgeht, kann N-Acetylcystein den durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose ausgelösten Zelltod zu einem hohen Prozentsatz hemmen. Dies legt die Hypothese nahe, dass die Wirkung der Substanzen auf der Generation von Sauerstoffradikalen (Radical Oxygen Intermediates - ROI) beruht. Diese können Ursache oder Folge einer Schädigung der Mitochondrien durch Störung des mitochondrialen transmembranösen Potentials sein. Diese Störung wiederum kann in einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom-C oder AIF (Apoptosis Inducing Factor) resultieren.

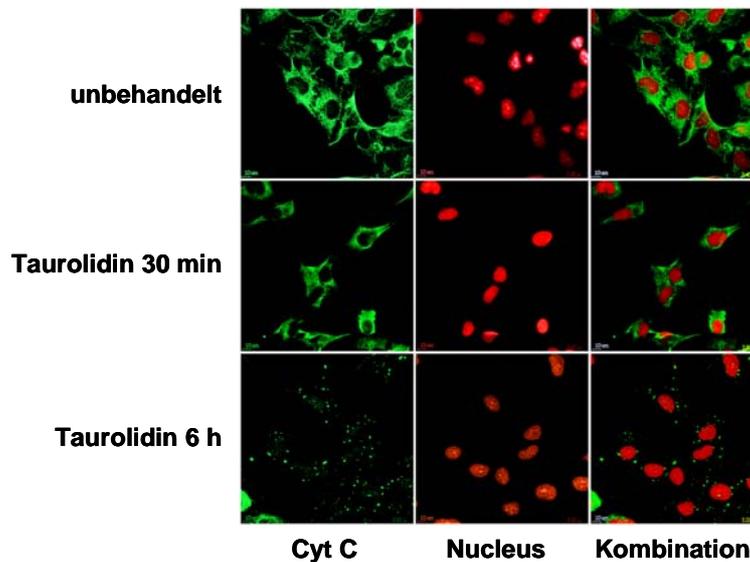
Nach Inkubation von LN18 Zellen mit Taurolidin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kam es eindeutig zu einer Freisetzung von Cytochrom-C von den Mitochondrien in das Zytosol. Diese begann bereits nach 3 Minuten und hielt für mindestens 6 Stunden an (Bild 2.29). Die vorbereitende Behandlung der LN18 Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk 50  $\mu\text{M}$  vor der Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konnte die Freisetzung von Cytochrom-C in das Zytosol nur partiell verhindern.



**Bild 2.29** Nachweis von Cytochrom-C in der cytosolischen und der mitochondrialen Fraktion von LN18 Zellen vor und nach Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  mit und ohne Zusatz des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD.fmk. Es zeigt sich eine eindeutige Freisetzung von Cytochrom-C in das Zytosol, die durch z-VAD.fmk nur partiell hemmbar ist.

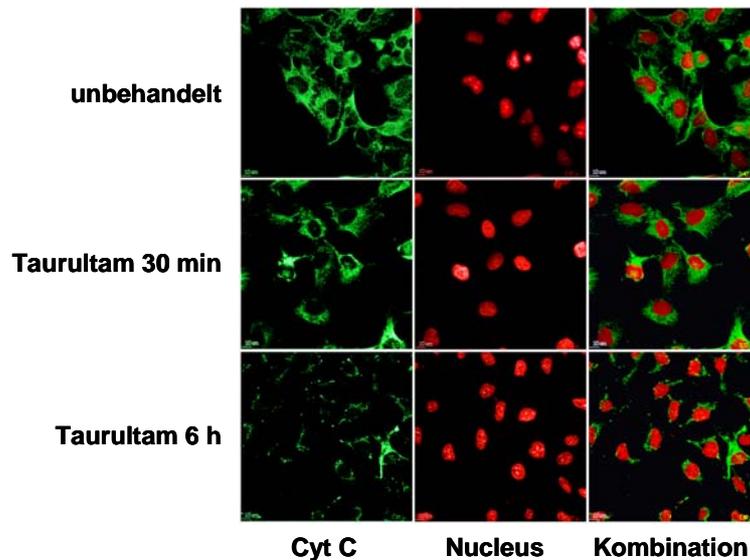
### Immunzytochemischer Nachweis

Um festzustellen, ob durch die Inkubation der Tumorzellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose eine Translokation von den Mitochondrien in das Zytosol stattfindet, wurde die konfokale Mikroskopie durchgeführt. In unbehandelten U373 Zellen stellt sich Cytochrom-C als grün dargestellte cytoplasmatische Färbung dar. Bereits nach 30-minütiger Inkubation mit Taurolidin 250  $\mu\text{g/ml}$  zeigte sich eine Freisetzung von Cytochrom-C in das Zytoplasma. Nach 6 Stunden war ein Grossteil des Cytochrom-C freigesetzt (Bild 2.30).



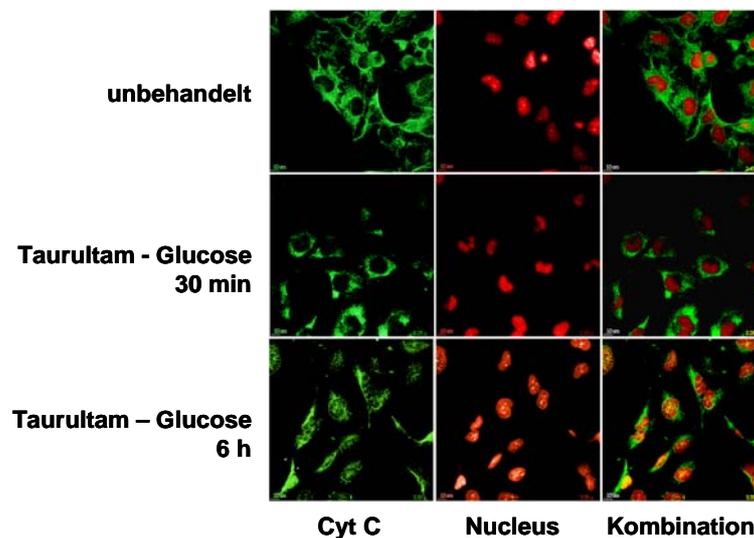
**Bild 2.30** Cytochrom-C (Cyt C) Freisetzung nach 30 minütiger und 6 stündiger Inkubation von U373 Zellen mit Taurolidin in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$ .

Cytochrom-C wurde auch nach der 6-stündigen Inkubation von U373 Zellen mit Taurultam 250  $\mu\text{g/ml}$  freigesetzt. Allerdings erfolgte nach 30 Minuten Inkubationszeit keine Cytochrom-C Freisetzung (Bild 2.31).



**Bild 2.31** Die 30minütige Inkubation von U373 humanen Glioblastomzellen mit Taurultam in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Cytochrom-C (Cyt C) Freisetzung. Nach 6-stündiger Inkubation hingegen wird Cytochrom-C freigesetzt.

Nach der Behandlung der U373 Zellen mit Taurultam-Glucose 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für 6 Stunden zeigte sich eine leichte Freisetzung von Cytochrom-C. Diese war jedoch deutlich schwächer als die Freisetzung nach Inkubation mit Taurolidin und Taurultam in gleicher Konzentration. Nach 30 Minuten war keine signifikante Cytochrom-C Freisetzung nachweisbar (Bild 2.32).

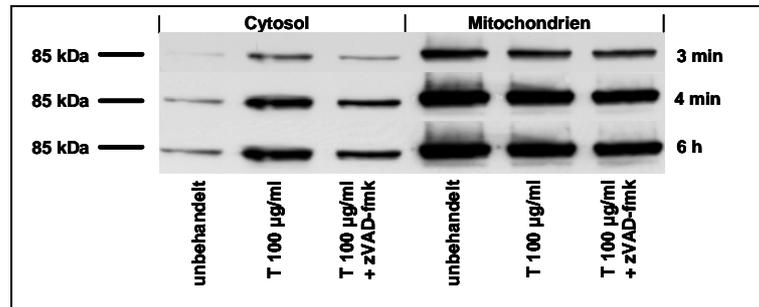


**Bild 2.32** Erst nach 6-stündiger Inkubation von U373 Zellen mit Taurultam-Glucose 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zeigt sich eine eindeutige Cytochrom-C (Cyt C) Freisetzung, die deutlich geringer ist als nach Inkubation mit Taurolidin.

#### 2.4.11 Untersuchung der mitochondrialen AIF-Freisetzung

Nach Inkubation von LN18 Zellen mit Taurolidin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konnte man eindeutig eine Freisetzung von AIF in das cytosolische Kompartiment nachweisen. Bei unbehandelten Zellen zeigte sich dagegen keine Freisetzung von AIF in das cytosolische Kompartiment. Die

Inkubation der Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  konnte die Freisetzung von AIF nur zu einem geringen Teil verhindern (Bild 2.33).

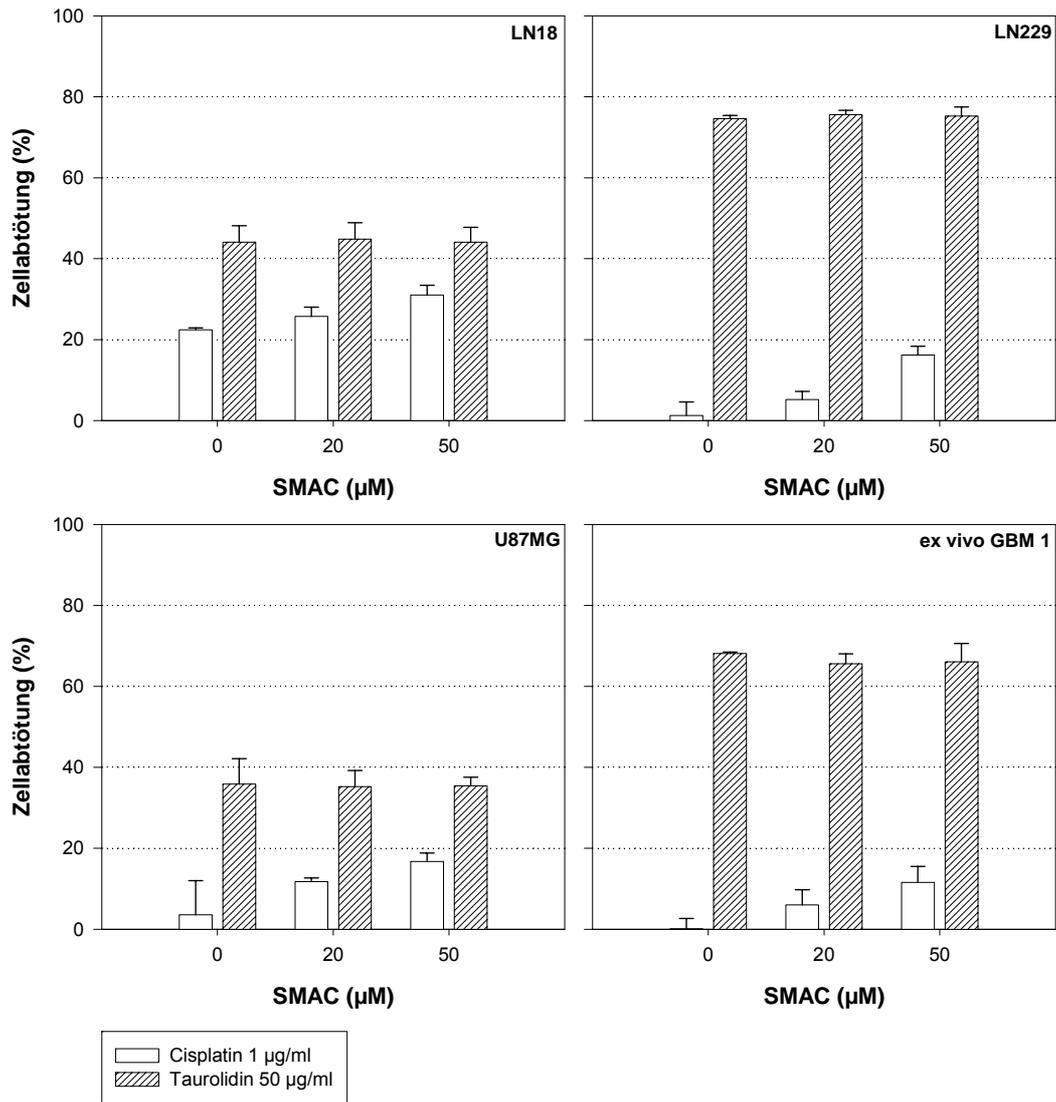


**Bild 2.33** AIF Nachweis in dem cytosolischen und mitochondrialen Kompartiment von LNI8 Zellen vor und nach Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  mit und ohne Zusatz des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD.fmk. AIF wird nach Inkubation mit Taurolidin eindeutig in das Zytosol freigesetzt. Diese Freisetzung ist partiell durch z-VAD.fmk hemmbar.

#### 2.4.12 Einfluss von SMAC-Peptid

Die Untersuchung des Einflusses von SMAC-Peptid auf den durch Taurolidin vermittelten Zelltod zeigte, dass es nicht zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität kam. Bei Inkubation der LNI8, LN229, U87MG, und ex vivo Glioblastomzellen-I mit SMAC-Peptid 20  $\mu\text{M}$  und Taurolidin 50  $\mu\text{g/ml}$  kam es nur zu einer durchschnittlichen Zunahme der Zellabtötung um  $0,3 \pm 0,7 \%$  im Vergleich zu der Inkubation mit Taurolidin allein. Bei Verwendung von SMAC-Peptid in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  stieg die zellabtötende Wirkung um durchschnittlich  $5,5 \pm 10,3 \%$ . Diese Unterschiede waren nicht signifikant (Varianzanalyse;  $p > 0,05$ ) (Bild 2.34).

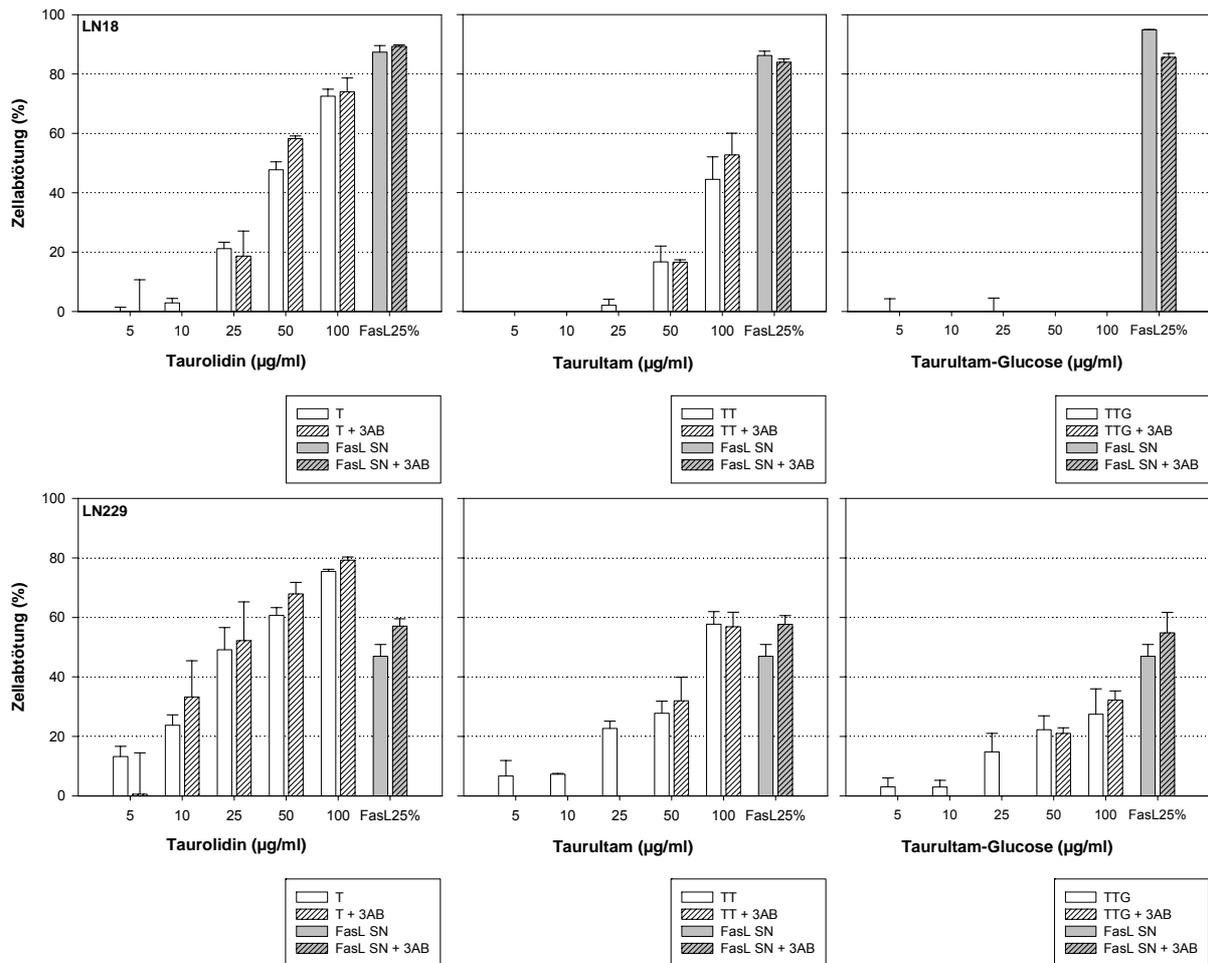
Bei Inkubation der Zellen mit Cisplatin 1  $\mu\text{g/ml}$  und SMAC-Peptid 20  $\mu\text{M}$  stieg der zytotoxische Effekt um durchschnittlich  $7,3 \pm 2,8 \%$  im Vergleich zu der Inkubation mit Cisplatin 1  $\mu\text{g/ml}$  allein. Bei Inkubation mit Cisplatin und SMAC-Peptid 50  $\mu\text{M}$  war dagegen eine signifikante Zunahme um  $13,0 \pm 3,8 \%$  zu verzeichnen (Varianzanalyse;  $p < 0,05$ ).



**Bild 2.34** Einfluss von SMAC-Peptid auf den durch Taurolidin 50 μg/ml und Cisplatin 1 μg/ml ausgelösten Zelltod bei LN18, LN229, U87MG und ex-vivo-Glioblastomzellen-1.

### 2.4.13 Untersuchung zur PARP-Aktivierung

Die Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose und zusätzlich 3-Aminobenzamid (3-AB) ergab bei allen untersuchten Zellarten keine signifikante Beeinflussung der zytotoxischen Wirkung (Mann-Whitney-Test,  $p > 0,05$ ). Es war jedoch eine (nicht signifikante) Tendenz zu einer geringfügigen Steigerung der Zellabtötung zu verzeichnen. 3-AB allein hatte in der hier verwendeten Konzentration keine eigene zytotoxische Aktivität (Bild 2.35).



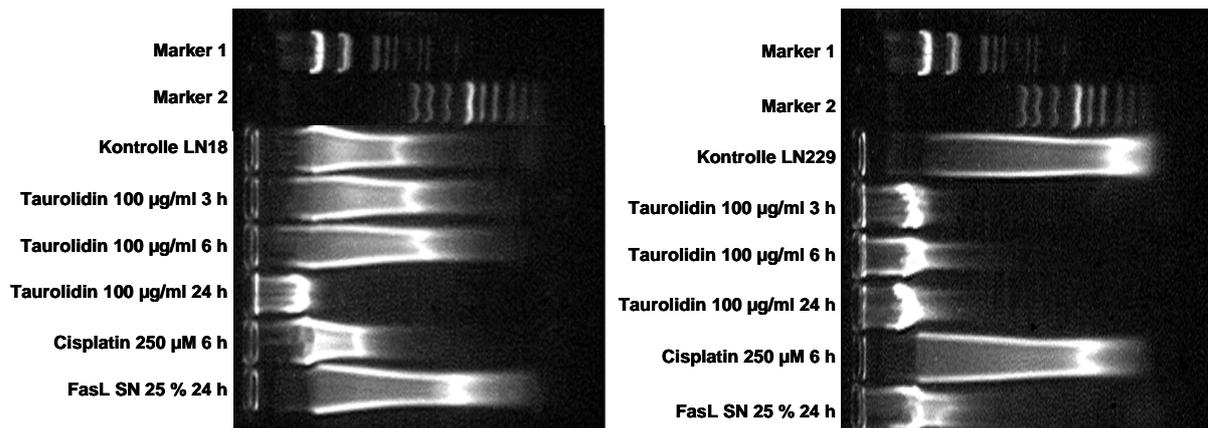
**Bild 2.35** Einfluss des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid auf den durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose ausgelösten programmierten Zelltod. Es besteht keine signifikante Veränderung der zytotoxischen Wirkung.

### 2.4.14 Untersuchung auf DNA-Leiterbildung

Ein klassisches Phänomen der Apoptose ist die Spaltung der genomischen DNA in oligonukleosomale Fragmente, die durch Vielfache von 180-200 Basenpaaren repräsentiert werden. In der Gel-Elektrophorese stellt sich die auf diese Weise fragmentierte DNA leiterartig dar. Dieses Phänomen wird deshalb DNA-Leiterbildung genannt. Es gibt auch Formen der DNA-Fragmentierung mit hohem Molekulargewicht im Rahmen bestimmter Formen des programmierten Zelltodes, die keine

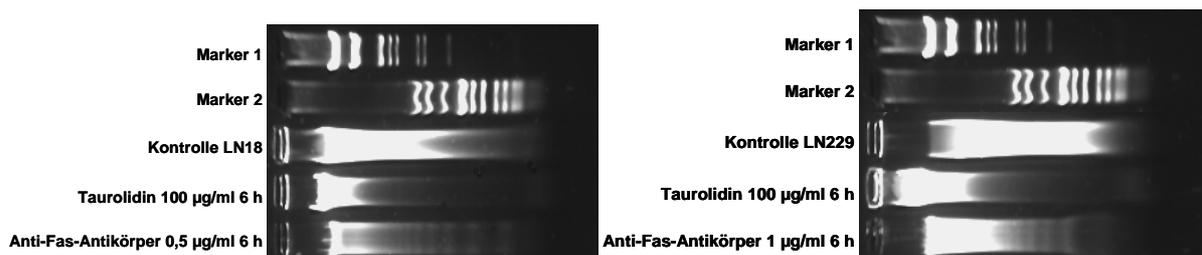
Leiterbildung zeigen. Auch nach Auslösung des programmierten Zelltodes mit nekrotischem Charakter ist eine Leiterbildung möglich. Das Phänomen der DNA-Leiterbildung ist also nicht spezifisch für die Auslösung der Apoptose (Spector et al. 1998).

Bei LN18 und LN229 Zellen konnte nach Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  für 3, 6, und 24 Stunden keine DNA-Leiterbildung nachgewiesen werden. Die 6-stündige Inkubation mit Cisplatin 250  $\mu\text{M}$  führte ebenfalls nicht zur DNA-Leiterbildung (Bild 2.36).



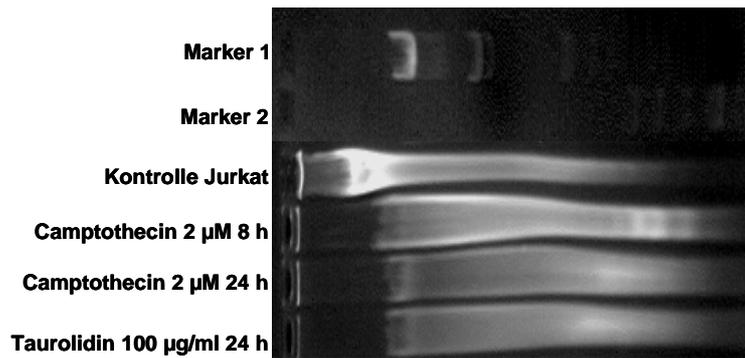
**Bild 2.36** LN18 (links) und LN229 (rechts) Zellen zeigen nach der Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  und Cisplatin 250  $\mu\text{M}$  keine DNA-Leiterbildung.

Nach der Inkubation von LN18 Zellen mit Anti-Fas-Antikörper 0,5  $\mu\text{g/ml}$  und von LN229 Zellen mit Anti-Fas-Antikörper 1  $\mu\text{g/ml}$  für 6 Stunden zeigt sich jedoch eindeutig eine DNA-Leiterbildung, während nach der 6-stündigen Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  keine DNA-Leiter ausgebildet wird (Bild 2.37). Wie aus den Zytotoxizitätsversuchen ersichtlich ist, hat Taurolidin in dieser Konzentration auf die LN229 Zellen bereits einen erheblichen zytotoxischen Effekt (Tabelle 2.3).



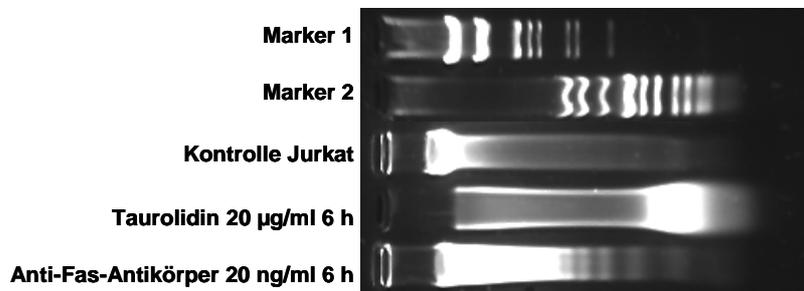
**Bild 2.37** Nach 6-stündiger Inkubation der LN18 (links) und LN229 (rechts) Zellen mit Anti-Fas-Antikörper zeigt sich eine Leiterbildung, nach der Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  nicht.

Die Inkubation von Jurkat-Leukämiezellen mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  für 24 Stunden oder mit Taurolidin 20  $\mu\text{g/ml}$  für 6 Stunden führt nicht zu einer DNA-Leiterbildung, wohingegen diese nach der 8-stündigen Inkubation mit Camptothecin 2  $\mu\text{M}$  nachzuweisen war (Bild 2.38).



**Bild 2.38** Nach 8stündiger Inkubation von Jurkat Leukämiezellen mit Camptothecin 2  $\mu\text{M}$  lässt sich eine DNA-Leiterbildung nachweisen.

Auch nach der 6-stündigen Inkubation von Jurkat-Leukämiezellen mit Anti-Fas-Antikörper 20 ng/ml ist eine DNA-Leiterbildung eindeutig zu erkennen (Bild 2.39).



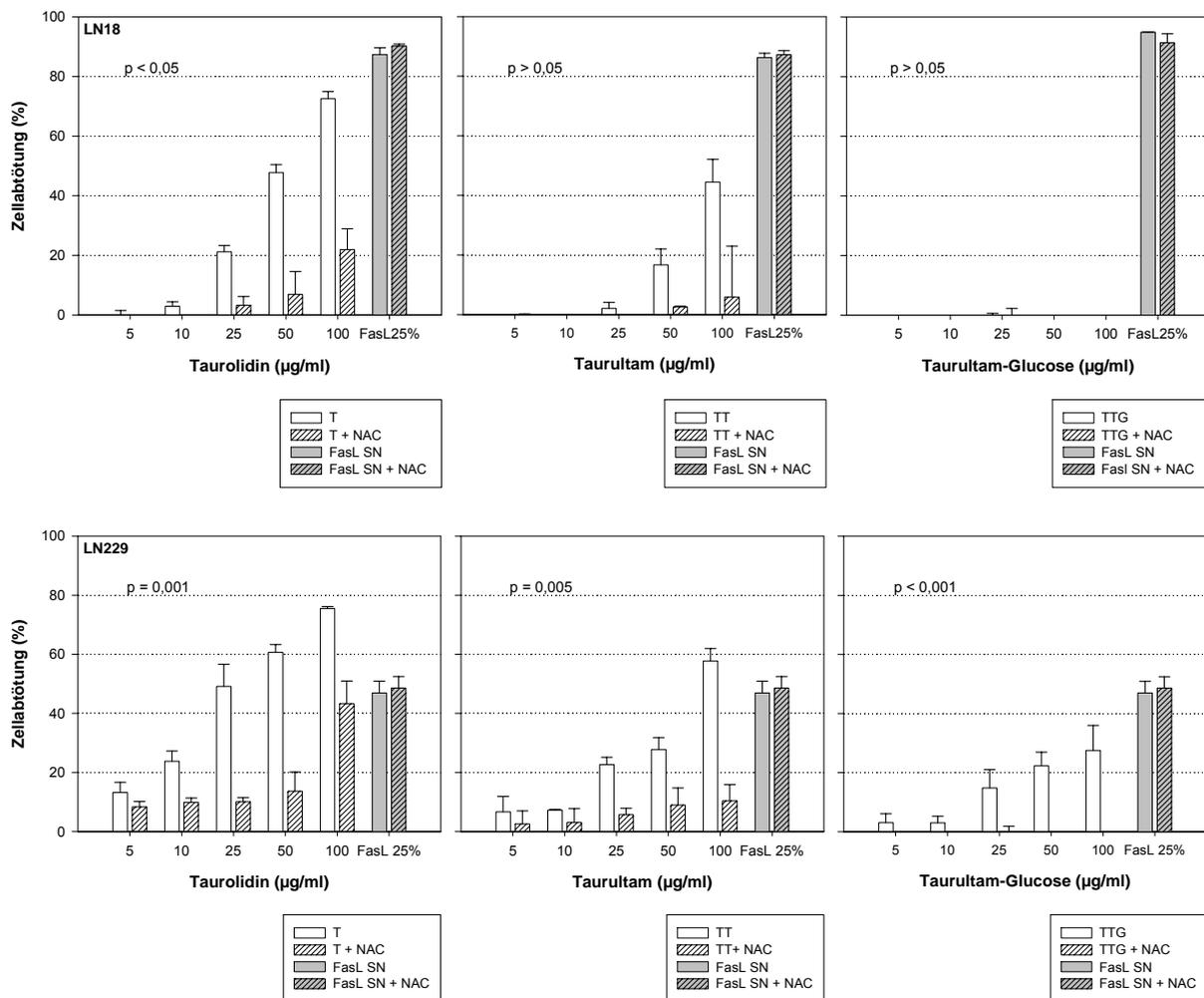
**Bild 2.39** Bei Jurkat Leukämiezellen führt Taurolidin ebenfalls nicht zu einer Leiterbildung, wohingegen Anti-Fas-Antikörper eine DNA-Leiterbildung hervorruft.

#### 2.4.15 Protektion durch N-Acetylcystein

N-Acetylcystein (NAC) ist eine antioxidative Substanz, die die zellulären Vorräte an freien Radikalfängern erhöht, und somit den durch reaktive Sauerstoffintermediate (reactive oxygen intermediates = ROI) induzierten programmierten Zelltod verhindern kann (Ferrari et al. 1995).

Bereits in den im Abschnitt 2.4.5 dargestellten Untersuchungen kam es nach vorbereitender Inkubation mit NAC zu einer deutlichen Verminderung der durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose ausgelösten Zytotoxizität. Die Inkubation mit NAC 5mM führte zu einer signifikanten Inhibition des Zelltodes bei allen untersuchten Zellarten um durchschnittlich  $41,4 \pm 13,0 \%$  (Taurolidin),  $42,9 \pm 6,2 \%$  (Taurultam), bzw.  $24,4 \pm 36,70 \%$  (Taurultam-Glucose)(Bild 2.40).

Die durchschnittliche maximale Zellzahlminderung betrug nach vorbereitender Inkubation mit NAC  $37,4 \pm 14,3 \%$  (Taurolidin),  $36,5 \pm 13,2 \%$  (Taurultam) bzw.  $17,9 \pm 25,4 \%$  (Taurultam-Glucose). Bei der Inkubation von LN229 Zellen mit Taurultam-Glucose konnte durch die vorbereitende Inkubation mit NAC eine komplette Protektion vor dem Zelltod erreicht werden.

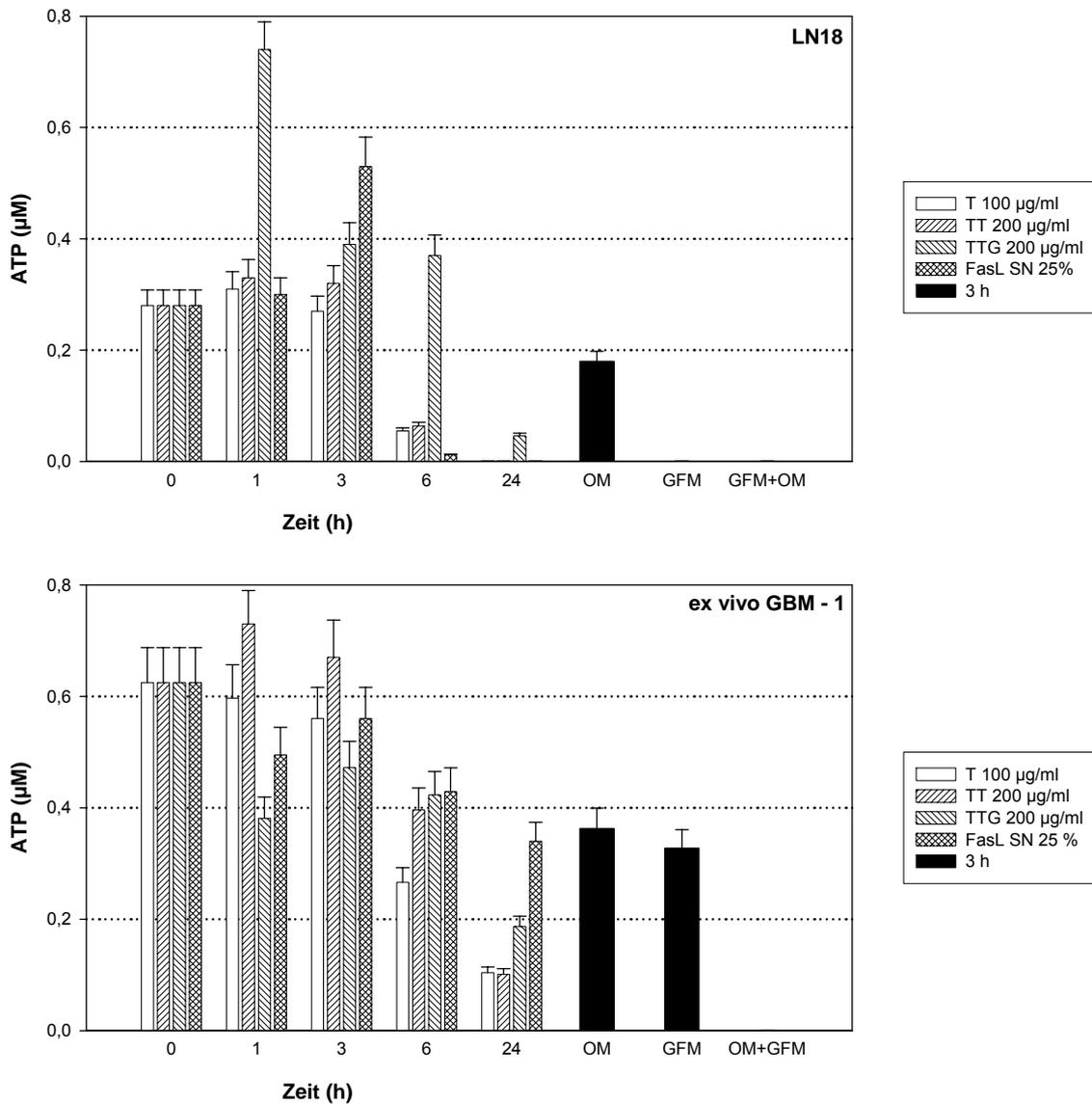


**Bild 2.40** Einfluss einer vorbereitenden Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC) 5mM auf den durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose ausgelösten Zelltod von LN18 und LN229 Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der zytotoxischen Wirkung.

### 2.4.16 Untersuchung des intrazellulären ATP-Gehaltes

Nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin 100 bzw. Taurultam 200 µg/ml war der intrazelluläre ATP-Gehalt bei LN18 Zellen auf  $0,4 \pm 0,04$  % des Ausgangswertes abgesunken. Die 24-stündige Inkubation mit Taurultam-Glucose 200 µg/ml führte zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes LN18 Zellen auf  $16,4 \pm 1,7$  %. Bei den ex-vivo-Glioblastomzellen führte die Inkubation mit Taurolidin 100 bzw. mit Taurultam 200 µg/ml zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes auf  $16,4 \pm 0,3$  %. Mit Taurultam-Glucose sank der ATP-Gehalt auf  $29,9 \pm 2,6$  % ab. Die LN18 Zellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit Fas-Ligand 25 % eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes auf  $0,4 \pm 0,0$  %, ex-vivo-Glioblastomzellen auf  $54,4 \pm 3,2$  %. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Oligomycin (OM), mit glucosefreiem Medium (GFM) bzw. mit beiden Substanzen für 3 h inkubiert, um jede Quelle der ATP-Produktion auszuschliessen. Dabei zeigten sich die LN18 Zellen besonders empfindlich auf die Inkubation mit glucosefreiem Medium. Der ATP-Gehalt sank dabei auf unter  $0,4 \pm 0,1$  % ab, während es bei den ex-vivo-Glioblastomzellen zu einer Reduktion auf  $52,5 \pm 1,3$  % kam.

Bei der Eliminierung jeglicher intrazellulärer ATP-Produktion, d.h. bei Inkubation in glucosefreiem Medium und Zugabe von Oligomycin, war der intrazelluläre ATP-Gehalt praktisch auf Null gesunken (Bild 2.41). Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose waren hinsichtlich der Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes wirksamer als Fas-Ligand und ähnlich wirksam wie die Inkubation mit glucosefreiem Medium *und* Oligomycin. Diese Differenzen waren jedoch nicht signifikant (Varianzanalyse, Student-Newman-Test;  $p > 0,05$ ) (Bild 2.41).



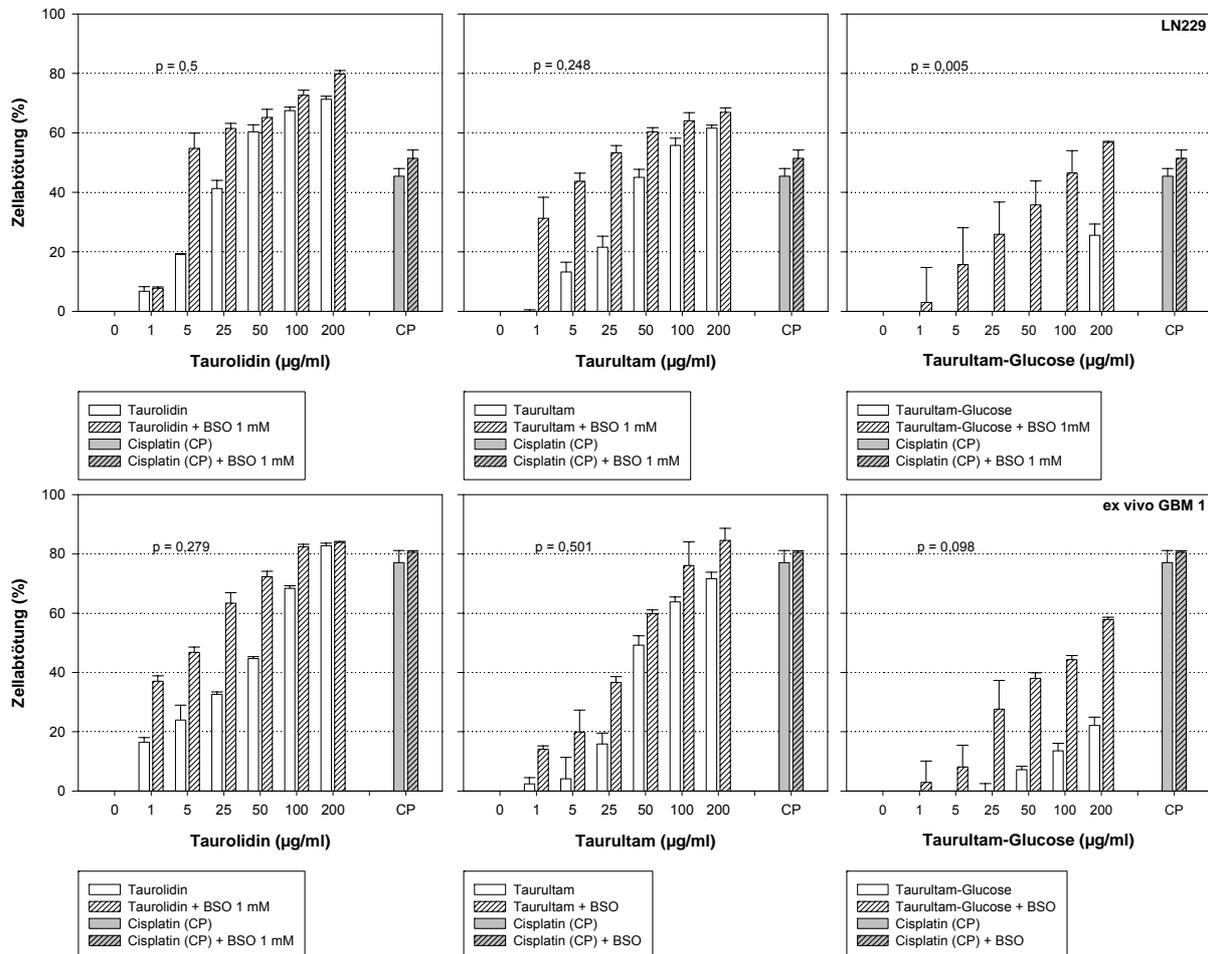
**Bild 2.41** Intrazellulärer ATP-Gehalt von LN18 und ex-vivo-Glioblastomzellen-I vor und nach Inkubation mit Taurolidin (T) 100 µg/m, Taurultam (TT) 200 µg/ml und Taurultam-Glucose (TTG) 200 µg/ml für 1, 3, 6 und 24 Stunden. Nach 24 Stunden ist der ATP-Gehalt bei den LN18 Zellen auf unter 0,4 % des Ausgangswertes abgesunken. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Oligomycin (OM), mit glucosefreiem Medium (GFM) bzw. mit beiden Substanzen für 3 h inkubiert.

#### 2.4.17 Einfluss von DL-Buthioninsulfoxid

[S, R]

Die Substanz DL-Buthionin--sulfoxid (BSO) ist ein selektiver Inhibitor der Gamma-Glutamyl-Cystein-Synthase, eines Enzyms im Glutathion Biosynthese Weg (Hofmann 1985).

Die Depletion des intrazellulären Glutathions durch BSO ist mit einer erhöhten Sensitivität der Zellen auf chemotherapeutische Substanzen verbunden. (Griffith und Meister 1979; Griffith 1982; Green 1984; Kramer 1987). Nach vorbereitender Inkubation der Zellen mit BSO zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf den durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose vermittelten Zelltod (Bild 2.42).

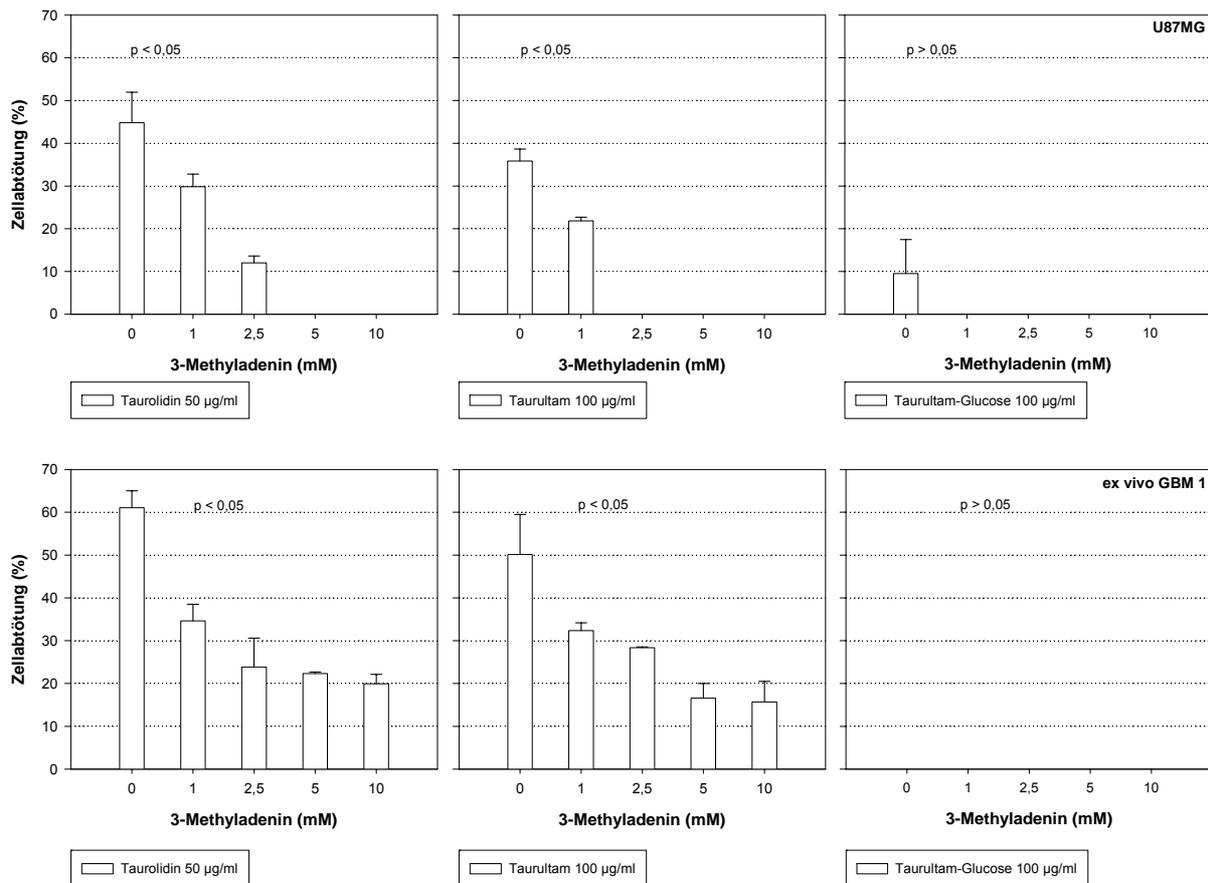


**Bild 2.42** Effekt der Inkubation von LN229 Zellen und ex-vivo-Glioblastom-I Zellen mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne vorbereitende Inkubation mit DL-Buthioninsulfoxid (BSO) in einer Konzentration von 1 mM. Es ist eine deutliche Zunahme der zytotoxischen Wirkung nach der Vorbereitung mit BSO zu erkennen.

Dabei wurde bei dem relativ schwach wirkenden Taurultam-Glucose die größte Wirkung erzielt. Selbst in Konzentrationen, bei denen mit alleiniger Inkubation mit Taurultam-Glucose noch keine Zellzahlminderung erreicht wurde, konnte nach vorbereitender Inkubation mit BSO ein erheblicher zellzahlmindernder Effekt erzielt werden. Die vorbereitende Inkubation von LN18, LN229, U87MG Zellen und ex-vivo-Glioblastom-I Zellen mit BSO in einer Konzentration von 1 mM führte nach Inkubation mit Taurolidin zu einer durchschnittlichen Zunahme der Zellabtötung um  $9,6 \pm 3,6$  %; bei Taurultam um  $9,8 \pm 3,9$  %; bei Taurultam-Glucose um  $14,6 \pm 9,2$  %. Bei Taurultam-Glucose waren die Unterschiede signifikant (t-Test;  $p < 0,05$ ).

### 2.4.18 Einfluss von 3-Methyladenin

Einige Autoren berichten, dass 3-Methyladenin (3-MA) die Bildung der Autophagie-Vacuolen und auch den programmierten Zelltod Typ II verhindern kann (Seglen und Jordan 1982; Sandvig und van Deurs 1992; Bursch und al. 1996; Petiot et al. 2000). Nach Zugabe von 3-MA kam es bei den LN18, LN229 und U87MG Zellen sowie den ex-vivo-Glioblastomzellen-I zu einer konzentrationsabhängigen Minderung des durch die Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose ausgelösten Zelltodes (Bild 2.43).

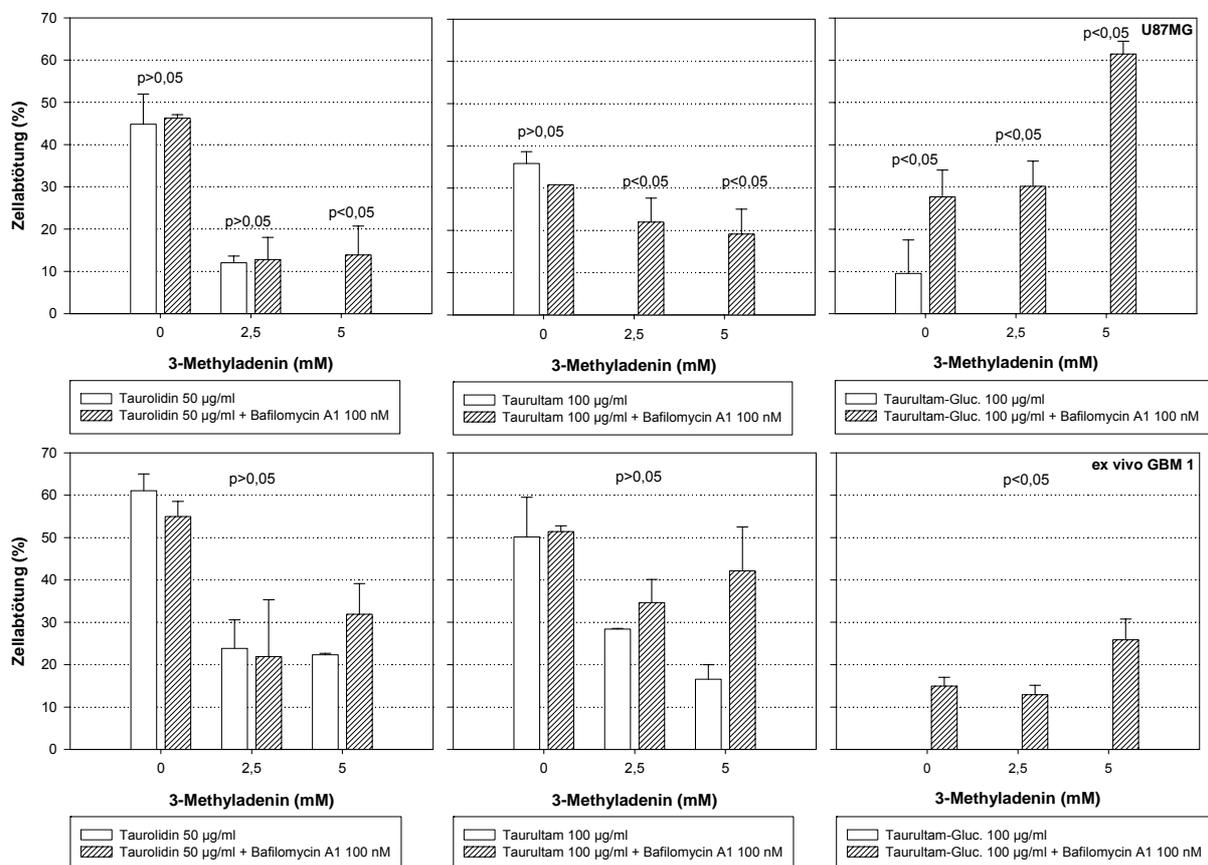


**Bild 2.43** Einfluss von 3-Methyladenin auf den durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam - Glucose vermittelten Zelltod bei U87MG Zellen und ex vivo Glioblastomzellen I.

Bei Anwendung von 3-MA in einer Konzentration von 1 mM verringerte sich die zytotoxische Wirkung um durchschnittlich  $16,1 \pm 29,3$  %, bei 2,5 mM um  $20,1 \pm 26,5$  %, bei 5 mM um  $32,0 \pm 34,2$  % und bei 10 mM um  $31,8 \pm 25,43$  % (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test;  $p < 0,05$ ). Nach Inkubation mit Taurultam und 3-MA reduzierte sich die zytotoxische Wirkung um  $10,4 \pm 16,3$  % (1 mM);  $21,7 \pm 22,3$  % (2,5 mM),  $25,3 \pm 28,6$  % (5 mM) bzw.  $19,7 \pm 18,8$  % (10 mM) (Varianzanalyse und paarweiser Vergleich mit Holm-Sidak-Test;  $p < 0,05$ ).

### 2.4.19 Einfluss von 3-Methyladenin und Bafilomycin-AI

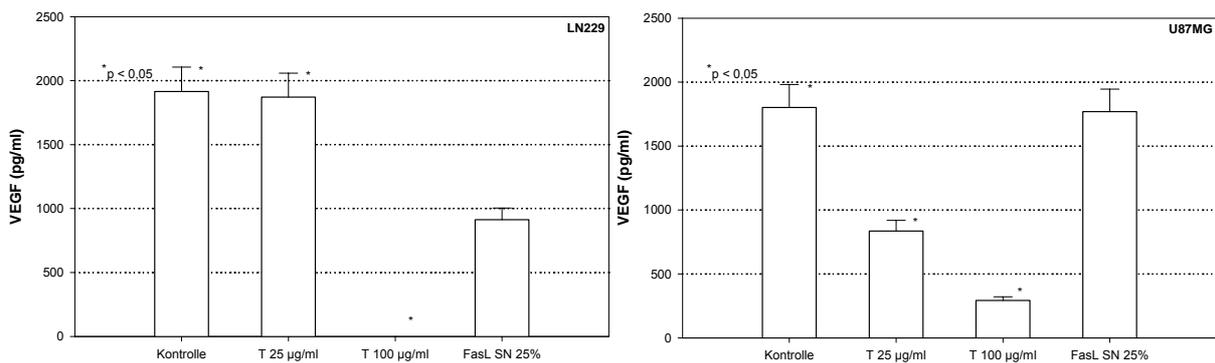
Bafilomycin-AI ist ein Protonenpumpeninhibitor der ATPase und kann bei bestrahlten Tumorzellen die Autophagie unterdrücken und alternativ zu einem apoptotischen Zelltod führen (Werner et al. 1984; Bowman et al. 1988; Paglin et al. 2001). Der durch Taurolidin 50  $\mu\text{g/ml}$  und Taurultam sowie Taurultam-Glucose 100  $\mu\text{g/ml}$  ausgelöste Zelltod von LN18, LN229, U87MG und ex-vivo-Glioblastom-Zellen-I konnte durch Bafilomycin AI in einer Konzentration von 100 nM nicht unterdrückt werden. Nach Inkubation der Zellen mit 3-Methyladenin konnte der durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose induzierte Zelltod konzentrationsabhängig partiell verhindert werden. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 3-Methyladenin und Bafilomycin AI kam es zu einer Zunahme der Zelltodrate, die durch Taurolidin 50  $\mu\text{g/m}$  und Taurultam bzw. durch Taurultam-Glucose 100  $\mu\text{g/ml}$  ausgelöst wurde.



**Bild 2.44** Einfluss von Bafilomycin-AI und 3-Methyladenin auf die durch Taurolidin erzeugte Zytotoxizität am Beispiel der U87MG Tumorzellen und ex-vivo-Glioblastomzellen-I (t-Test).

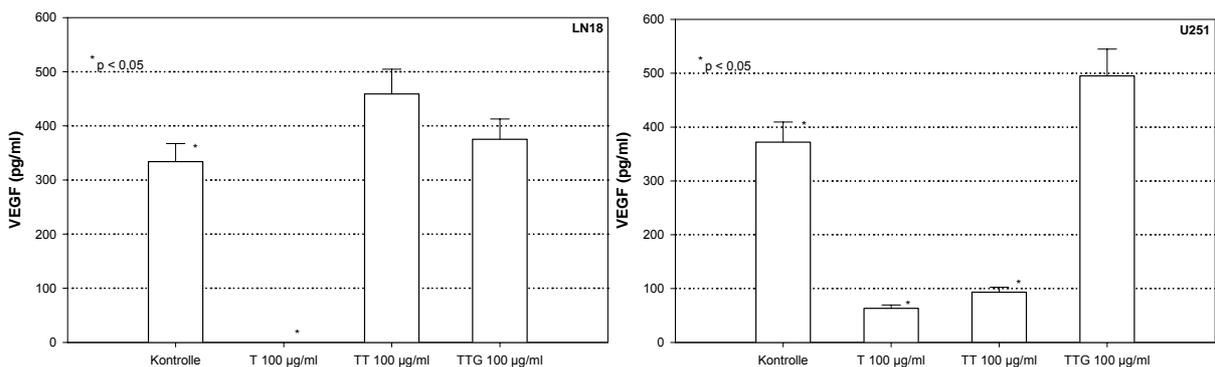
### 2.4.20 Einfluss auf die VEGF-Exprimierung

Bei LN 18, LN229 und U138 Zellen kam es nach Inkubation mit Taurolidin konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-Exprimierung (t-Test;  $p < 0,05$ ). Bei den LN18 und LN229 Zellen wurde nach Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  kein VEGF mehr exprimiert. Bei den U138 Zellen waren nur noch  $4,4 \pm 0,4$  % des Ausgangswertes nachweisbar, bei den U87MG Zellen  $16,2 \pm 1,6$  %. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Reduktion der VEGF-Exprimierung und der  $EC_{50}$  der Akut-Toxizität oder der maximalen Zellabtötung (Kapitel 2) (Pearson-Korrelations-Test;  $p > 0,05$ ).



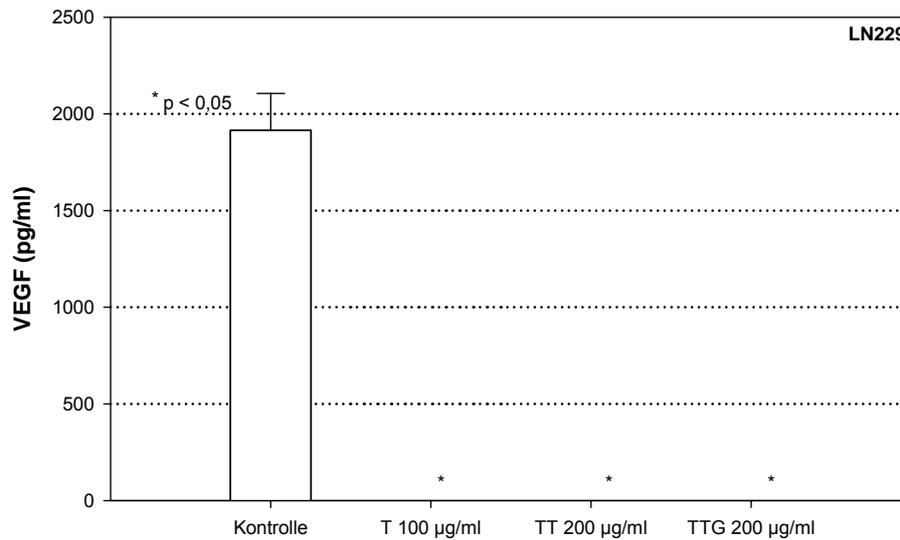
**Bild 2.45** Einfluss der 24-stündigen Inkubation von LN229 und U87MG Zellen mit Taurolidin 25 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  auf die VEGF-Exprimierung. Zur Kontrolle dienten unbehandelte und mit Fas- Ligand 25 % inkubierte Zellen.

Taurolidin zeigte je nach Zelllinie einen unterschiedlichen Effekt auf die VEGF-Expression. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  kam es zu einer Minderung der VEGF-Expression um 0-75 % (Bild 2.46).



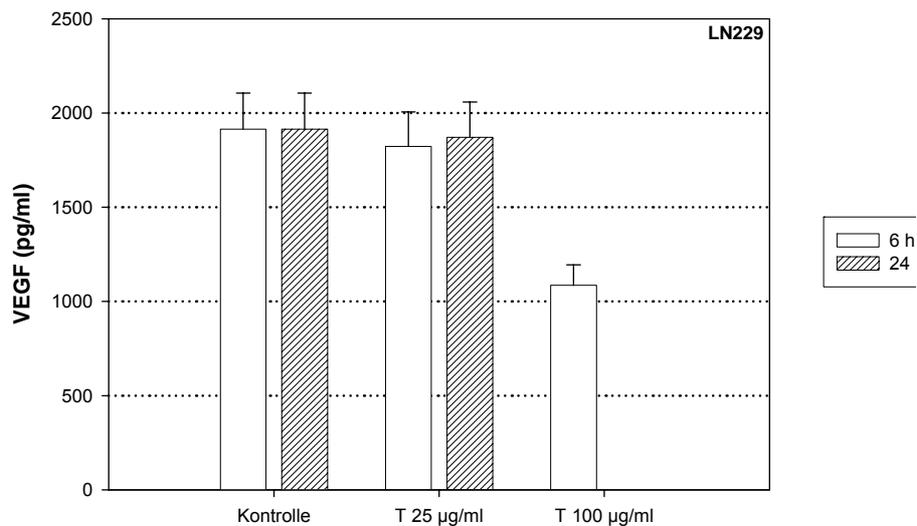
**Bild 2.46** Einfluss einer 24stündigen Inkubation von LN18 und U251 Zellen mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Bei Inkubation von LN229 Zellen mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  und Taurultam bzw. Taurultam-Glucose 200  $\mu\text{g/ml}$  konnte die VEGF-Expression vollständig gehemmt werden (Bild 2.47).



**Bild 2.47** Nach Inkubation von LN229 Zellen mit Taurolidin 100 und Taurultam bzw. Taurultam-Glucose 200 µg/ml wurde kein VEGF mehr exprimiert.

Die Inkubation von LN229 Zellen mit Taurolidin 25 µg/ml für 6 Stunden bzw. 24 Stunden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die VEGF-Expression. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied



**Bild 2.48** VEGF-Expression von LN229 Zellen nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin.

zwischen der VEGF-Expression nach 6-stündiger und 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin 100 µg/ml. Nach 6-stündiger Inkubation wurde die VEGF-Expression der LN229 Zellen um ca. 40 % vermindert, nach 24 Stunden vollkommen unterdrückt (Bild 2.48).

## 2.5 Diskussion

Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose führten konzentrationsabhängig zu einer Proliferationshemmung und Abtötung aller untersuchten Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen (Abschnitt 2.4.2). Außerdem kam es zu einer Verminderung bzw. Verhinderung der Koloniebildung (Abschnitt 2.4.4). Taurolidin war hinsichtlich der Zytotoxizität etwa 2-mal effektiver als Taurultam und ca. 2,8-mal effektiver als Taurultam-Glucose. Allerdings erreichte Taurultam-Glucose nur eine maximale Zellzahlreduktion um durchschnittlich 30 % (Stendel et al. 2005). Dabei zeigte sich, dass die Wirkung von Taurolidin signifikant größer war als die von Taurultam. Taurultam-Glucose stellte sich als relativ schwach wirksam heraus. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden führte eine Erhöhung der Taurolidin- bzw. Taurultamkonzentration über 200  $\mu\text{g/ml}$  nicht mehr zu einer signifikanten Steigerung der Zellzahlminderung (Abschnitt 2.4.3). Interessant ist, dass die antineoplastisch wirksame Konzentration von Taurolidin um etwa 2 Zehnerpotenzen geringer als die antimikrobiell wirksame Konzentration ist. Dies lässt vermuten, dass beiden Wirkungen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Die proliferationshemmende und zytotoxische Wirkung konnte selektiv nur für Tumorzellen nachgewiesen werden. So führte die Inkubation von Zellen aus fetalen Rattenhirnen mit Taurolidin 4000  $\mu\text{g/ml}$  nach 24 und 48 Stunden nicht zu morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Bild 2.20). Bei Reinkubation dieser Zellen nach 48 Stunden mit frischem Medium kam es erneut zur Zellproliferation (Bild 2.21) (Abschnitt 2.4.6).

Bei allen untersuchten Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen zeigten sich gleichartige konzentrationsabhängige Veränderungen der Zellmorphologie nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose. Es kam zu einer zunehmenden Schrumpfung des Zytoplasmas, während die Zellkerne in ihrer äußeren Struktur zunächst erhalten blieben. Schließlich wurde die Zellstruktur vollständig aufgelöst (Bild 2.9, Bild 2.10). Lediglich nach der Inkubation mit Taurultam-Glucose in einer Konzentration bis 100  $\mu\text{g/ml}$  konnten keine signifikanten Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet werden (Bild 2.11)(Abschnitt 2.4.5). Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen korrelierten mit den Ergebnissen der Zytotoxizitäts-Assays (Abschnitt 2.4.2).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose chronologische morphologische Veränderungen erkennen: das Auftreten intrazytoplasmatischer Vakuolen (Bild 2.19), deren Anzahl und Größe mit zunehmender Inkubationszeit zunahm; den Verlust der zytoplasmatischen Mikrovilli; den Abbau des Zytoplasmas; die fleck- und streifenförmige Kondensation und teilweise Marginalisation des Chromatins. Die Bildung großer intrazytoplasmatischer Vakuolen ist mit einer spezifischen Form des programmierten Zelltodes vereinbar – dem programmierten Zelltod Typ II bzw. der Autophagie (Bursch et al. 2000b; Komata et al. 2000) (Bursch und al. 1996; Chi und al. 1999; Elliott et al. 2000). Auch die Form der

Chromatinkondensation mit Bevorzugung weniger geometrischer Formen spricht eher für diese Form des Zelltodes (Woodle 1997; Borner und Monney 1999; Kitanaka und Kuchino 1999; Roberts *et al.* 1999; Foghsgaard 2001). Während bei der Apoptose (programmierter Zelltod Typ I) das Chromatin rund oder konvex-konkav kondensiert (Vercammen 1998; Mateo und al. 1999), zeigte sich hier eine fleck- bis streifenförmige Kondensationsform. Einige Autoren berichten, dass der programmierte Zelltod Typ II auch ohne jegliche Chromatinkondensation auftreten kann (Vercammen 1998; Mateo und al. 1999). Diese morphologischen Hinweise auf die Auslösung des programmierten Zelltodes Typ II (Autophagie) durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose mussten durch die nachfolgenden Untersuchungen verifiziert werden.

Eine Möglichkeit zur Auslösung des programmierten Zelltodes besteht in der Aktivierung von Todesrezeptoren durch geeignete Liganden, die von benachbarten Zellen sezerniert werden (Ashkenazi und Dixit 1998; Thornberry und Lazebnik 1998). Ein wichtiges und gut untersuchtes System ist die durch Fas-Ligand vermittelte Apoptose. Fas – auch bekannt als CD95/APO-1 - ist ein Rezeptor der Zelloberfläche und ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor Subfamilie. Diese löst die Apoptose in sensitiven Zellen durch Oligomerisation aus. Mindestens ein Teil der Gliom-Zelllinien und der *ex vivo* Glioblastomzellen zeigt die Fähigkeit zur Fas-vermittelten Apoptose (Schlappbach und Fontana 1997; Frei *et al.* 1998). Die beiden Tumorzelllinien LN18 und LN229 repräsentieren aufgrund ihrer deutlich verschiedenen Sensitivität ein interessantes Modell für die Auslösung der Apoptose durch Fas-Ligand (Schlappbach und Fontana 1997). Diese Zelllinien sind deshalb geeignet, die Fähigkeit von Taurolidin zum Synergismus mit Fas-Ligand zu untersuchen.

Die Inkubation der LN18 Zellen mit Taurolidin konnte den durch Fas-Ligand ausgelösten programmierten Zelltod synergistisch verstärken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei LN18 Zellen war Taurolidin in der Lage, bereits in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  die Anzahl der lebenden LN229 Zellen zu reduzieren. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  wies Taurolidin annähernd die gleiche Effektivität wie Fas-Ligand auf. Bei Kombination von Taurolidin mit Fas-Ligand repräsentierte die gesamte Zellzahlverminderung mehr als die Summe aus der durch Fas-Ligand induzierten und der durch Taurolidin induzierten. Der Effekt der Tumorzellzerstörung durch Taurolidin scheint so zumindest teilweise auf einer Verstärkung der Fas-Ligand induzierten Apoptose zu beruhen, teilweise aber auch davon unabhängig zu sein. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Taurolidin in der Lage ist, antineoplastische Aktivität über mehrere Mechanismen zu erzeugen (Abschnitt 2.4.7) (Stendel *et al.* 2003a). Der durch Fas-Ligand ausgelöste Zelltod wird primär durch die „klassische“ Apoptose (programmierter Zelltod Typ I) vermittelt. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass auch andere Zelltodmechanismen über diesen Weg ausgelöst werden können (Vercammen 1998; Holler und al. 2000; Matsumara und al. 2000).

Während die Caspasen bei der klassischen Apoptose (programmierter Zelltod Typ I) eine entscheidende Rolle spielen, ist ihre Funktion bei der Autophagie (programmierter Zelltyp Typ II) umstritten (Saeki *et al.* 2000; Zaidi *et al.* 2001; Lockshin und Zakeri 2002a; Shi 2002). Der nächste Schritt bei der Untersuchung des antineoplastischen Wirkungsmechanismus bestand somit in der Anwendung von Caspase-Inhibitoren. Der zellpermeable Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk bindet sich irreversibel an alle Caspasen und hemmt deren Aktivität (Qi *et al.* 1997). Somit wird die Auslösung des Caspase-abhängigen programmierten Zelltodes verhindert. Die durch Inkubation mit Fas-Ligand induzierte Apoptose konnte durch z-VAD.fmk vollständig verhindert werden, wenn es in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  40 Minuten vor der Inkubation angewendet wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine relativ geringe und nicht signifikante Inhibition des durch Taurolidin und Taurultam ausgelösten Zelltodes (Bild 2.25; Abschnitt 2.4.8). Die bisherigen Resultate liessen auf einen vorwiegend Caspase-unabhängigen Mechanismus des durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose vermittelten Zelltodes, wie den programmierten Zelltod Typ II (Autophagie) schließen (Leist *et al.* 1997; Vercammen 1998; Roberts *et al.* 1999; Xue *et al.* 1999; Matsumara und al. 2000; Foghsgaard 2001; Volbracht *et al.* 2001) (Woodle 1997; Borner und Monney 1999; Kitanaka und Kuchino 1999).

In den frühen Stadien der Apoptose wird Phosphatidylserin von dem inneren an den äußeren Anteil der Zellmembran transloziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen in der Lage sind, an der Zelloberfläche von Lymphozyten befindliches Phosphatidylserin und somit Zellen im frühen Stadium der Apoptose zu erkennen. Die Erkennung und Phagozytose dieser apoptotischen Zellen schützt den Organismus vor der Freisetzung zellulärer Bestandteile und Inhalte, die entzündliche Prozesse auslösen könnten (Savill und Fadok 2000; Strasser *et al.* 2000) (Fadok *et al.* 1992). Das Phosphatidylserin an der äußeren Oberfläche der Zelle kann nach Färbung mit der Durchflußzytometrie nachgewiesen werden (Vermes *et al.* 1995). Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid bindendes Protein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin besitzt (Vermes *et al.* 1995). Annexin-V kann somit als empfindliche Sonde genutzt werden, um Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran und somit apoptotische Zellen in einem frühen Stadium nachzuweisen (Vermes *et al.* 1995) (Verhoven *et al.* 1995). Da auch bei nekrotischen Zellen durch den Verlust der Integrität der Plasmamembran Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran nachweisbar ist, wird die Methode mit der simultanen Färbung mit Propidiumjodid kombiniert. Dieser Farbstoff kann nur von nekrotischen Zellen aufgenommen werden, die somit von den apoptotischen unterschieden werden können (Koopman *et al.* 1994b).

Die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellmembran-Phosphatidylserin-Externalisation bei LN18, U373 und ex-vivo-Glioblastomzellen-I zeigte eine signifikante zeit- und konzentrations-abhängige Zunahme Annexin-V-positiver und damit apoptotischer Zellen nach Inkubation mit Taurolidin und Taurultam im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Nach Inkubation der Zellen mit Taurultam-Glucose 200  $\mu\text{g/ml}$  konnte dagegen keine signifikante Zunahme der Annexin-V-

positiven Zellen gefunden werden. Auch die Inkubation der Zellen mit Fas-Ligand führte zu einer signifikanten Zunahme Annexin-V-positiver Zellen (Bild 2.4). Diese war jedoch schwächer ausgeprägt als nach der Inkubation mit Taurolidin 100 und Taurultam 200  $\mu\text{g/ml}$  (Abschnitt 2.4.9). Wie beschrieben, ist die Phosphatidylserin-Externalisation ein wichtiges Phagozytosesignal. Das Phänomen tritt allerdings nicht nur im Rahmen der Caspase-Aktivierung auf, sondern ist vielfach von ihr abgekoppelt (Frohlich und Madeo 2000; Foghsgaard 2001). So können auch Zellen, die nicht der klassischen Apoptose unterliegen, effizient phagozytiert werden (Hirt et al. 2000). Auf diese Weise führt auch der Caspase-unabhängige programmierte Zelltod Typ II (Autophagie), im Gegensatz zu der Nekrose, zu einer nicht-entzündlichen Zellzerstörung (Woodle 1997; Borner und Monney 1999; Kitanaka und Kuchino 1999; Roberts et al. 1999; Foghsgaard 2001). Mechanismen, die zu einer Translokation von Phosphatidylserin und der nachfolgenden Phagozytose bei Zellen mit Caspase-unabhängigem Zelltod führen können, sind Störungen der zellulären Calciumhomöostase und die Aktivierung der Proteinkinase-C (Hirt et al. 2000; Volbracht et al. 2001). Möglicherweise werden solche intrazellulären Veränderungen durch die Inkubation von Tumorzellen mit Taurolidin und Taurultam ausgelöst.

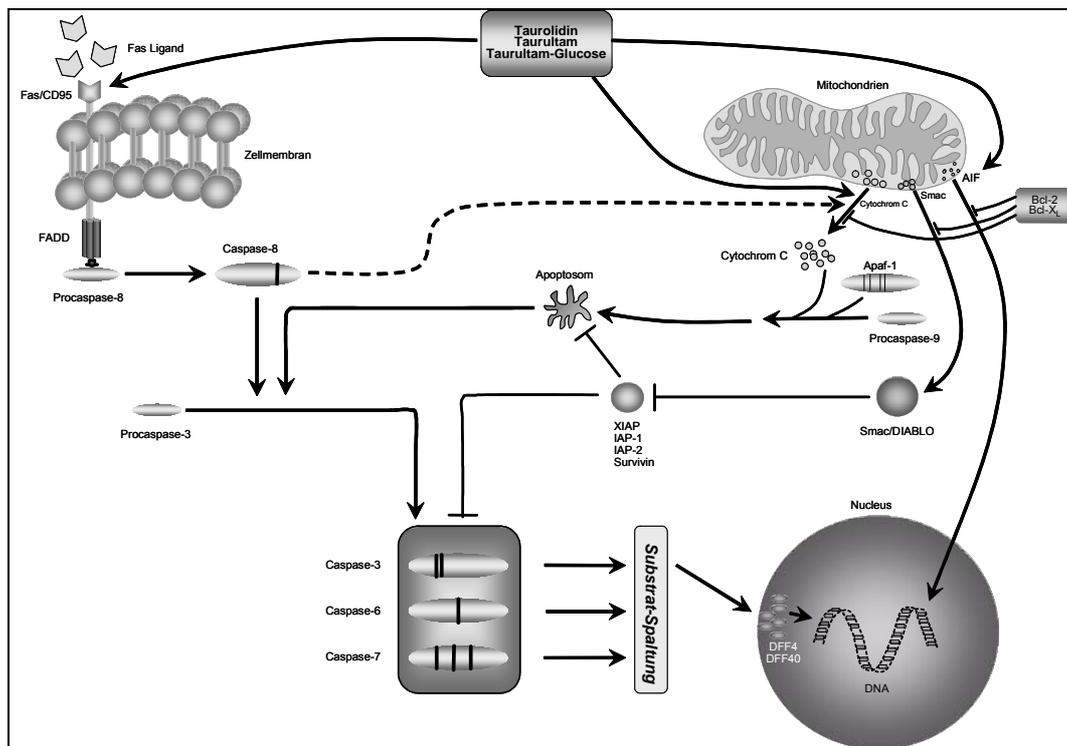
Wie in der Einführung dieses Kapitels erläutert wurde, spielen die aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien freigesetzten Proteine Cytochrom-C und AIF eine wichtige Rolle bei dem über den mitochondrialen Mechanismus ausgelösten programmierten Zelltod. Deshalb wurde die Freisetzung dieser Proteine aus den Mitochondrien nach Subfraktionierung der Zellen in das zytosolische und das mitochondriale Kompartiment untersucht. Nach Inkubation von LN18 Zellen mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  kam es eindeutig zu einer Freisetzung von Cytochrom-C von den Mitochondrien in das Zytosol (Bild 2.29). Die Inkubation der LN18 Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk 50  $\mu\text{M}$  40 Minuten vor der Inkubation mit Taurolidin 100  $\mu\text{g/ml}$  konnte die Freisetzung von Cytochrom-C in das Zytosol nur partiell verhindern. Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse die Freisetzung von Cytochrom-C als klassischem Bestandteil des klassischen Apoptoseweges nicht erwartet wurde, wurde immunzytochemisch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie das Verhalten U373 Zellen nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose untersucht. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Cytochrom-C sowohl nach der Inkubation der U373 Zellen mit Taurolidin, als auch mit Taurultam und Taurultam-Glucose freigesetzt wird (Abschnitt 2.4.10). Das Vorhandensein von Cytochrom-C im Zytoplasma führt zu der Bildung von Apoptosomen – bestehend aus aktiviertem APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) und Caspase 9 – und dadurch zur Umwandlung der inaktiven Procaspase 3 in die aktive Caspase 3. Diese aktiviert wiederum eine Reihe anderer Effektor-Caspasen und weitere, an der Apoptose beteiligter Proteine. Die Freisetzung von Cytochrom-C in das Zytoplasma nach Inkubation von Zellen mit Taurolidin konnte von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Ribizzi et al. 2001a; Ribizzi et al. 2001b). Interessanterweise kann die durch Taurolidin ausgelöste Apoptose durch den Pan-Caspase Inhibitor z-VAD.fmk nur in

geringem Maße verhindert werden. Es ist möglich, dass Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose in der Lage sind, sowohl den programmierten Zelltod Typ I als auch den programmierten Zelltod Typ II auszulösen. Bei Verhinderung des Weges der klassischen Apoptose kann dann der alternative Weg bevorzugt werden.

Bei Auslösung der Apoptose kann es auch zu einer Freisetzung von AIF aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien in das Zytosol kommen (Zamzami *et al.* 1996; Green und Reed 1998). Der Nachweis von AIF in der zytosolischen Fraktion ist also ein Zeichen für den eingeleiteten apoptotischen Zelltod. Da möglicherweise die Translokation von AIF aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des antineoplastischen Wirkungsmechanismus von Taurolidin spielt, führten wir nach der Fraktionierung in das zytosolische und das mitochondriale Kompartiment Western-Blot Analysen durch. Nach der Inkubation von LNI8 Zellen mit Taurolidin 100 µg/ml konnte im Gegensatz zu unbehandelten Zellen eindeutig eine Freisetzung von AIF in das zytosolische Kompartiment nachgewiesen werden. Die vorbereitende Inkubation der Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD.fmk 50 µM konnte die Freisetzung von AIF nur zu einem sehr geringen Teil verhindern (Bild 2.33) (Abschnitt 2.4.11).

Der mitochondriale Apoptose-Mechanismus wird durch die Freisetzung apoptogener Faktoren wie Cytochrom-C, AIF, oder SMAC/ DIABLO (Second Mitochondria derived Activator of Caspase /Direct IAP Binding Protein with Low PI ) initiiert. Durch die Formierung des Apoptosomen-Komplexes bestehend aus Cytochrom-C, Apaf-1 und Caspase-9, wird die Caspase-3 aktiviert (Antonsson und Martinou 2000; Kroemer und Reed 2000; Roy und Nicholson 2000). Defekte in Apoptoseprogrammen können zu einer Progression oder Resistenz maligner Tumoren beitragen. Sie können durch Dysregulationen anti-apoptotischer oder pro-apoptotischer Stoffe verursacht sein (Deveraux und Reed 1999; Wagenknecht 1999; Goyal 2001). In der Tat hat man eine hohe Expression von IAP (inhibitor of apoptosis proteins) wie z.B. XIAP in malignen Gliomen, meist verbunden mit Therapieresistenz und schlechter Prognose gefunden (Deveraux und Reed 1999; Wagenknecht 1999). Kürzlich wurde festgestellt, dass SMAC-Peptid als Reaktion auf apoptotische Stimuli von Mitochondrien freigesetzt wird und die Apoptose durch Antagonisierung von IAP's fördert (Chai 2000; Du *et al.* 2000; Verhagen 2000; Srinivasula 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung des Einflusses von SMAC-Peptid auf den durch Taurolidin vermittelten Zelltod zeigten, dass es nicht zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität kam. Bei Inkubation der Zellen mit Cisplatin 1 µg/ml und SMAC-Peptid 20 bzw. 50 µM erhöhte sich dagegen der zytotoxische Effekt signifikant (Bild 2.34) (Abschnitt 2.4.12). Die nur sehr geringe Beeinflussung der durch Taurolidin ausgelösten Zytotoxizität durch SMAC-Peptid ist ein weiteres Argument dafür, dass Taurolidin seine zytotoxische Aktivität primär nicht oder nur in sehr geringem Maße über den klassischen Apoptoseweg ausübt.

Die bisherigen Resultate sprachen für eine bevorzugte Induktion des programmierten Zelltodes Typ II durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose. Der Caspase-abhängige Weg der klassischen Apoptose schien dabei nur zu einem geringen Teil für die Wirkung verantwortlich zu sein. Nach der Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose wurden eindeutig Cytochrom-C und auch AIF freigesetzt. Die antineoplastische Wirkung von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose scheint so eher auf mitochondrialen Veränderungen zu beruhen, die zu der Auslösung des programmierten Zelltodes Typ II, wahrscheinlich vorwiegend vermittelt durch AIF, führen. Mögliche Angriffspunkte des antineoplastischen Wirkungsmechanismus von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose zeigt das Bild 2.49.



**Bild 2.49** Mögliche Angriffspunkte der antineoplastischen Wirkung von Taurolidin auf Signalwegen des programmierten Zelltodes.

Während des apoptotischen Zelltodes spielt PARP-1 zwei gegensätzliche Rollen. Seine Stimulation durch DNA Schäden führt zu der Synthese von Poly-(ADP-Ribose) und zu der Ribolysierung nukleärer Proteine und von PARP-1 selbst, was wiederum die Reparatur der DNA-Schäden ermöglicht. Da die Poly-(ADP-Ribose) aus NADH synthetisiert wird, ist dieser Vorgang für die Zelle sehr energieaufwendig. Auf der anderen Seite führt die Aktivierung von Caspasen zur Spaltung und damit Inaktivierung von PARP-1 (Soldani und Scovassi 2002). Die Inaktivierung von PARP-1 fördert die Apoptose, indem sie das Überleben durch DNA-Reparatur und den nekrotischen Zelltod durch Erschöpfen der verfügbaren Energie verhindert (Nosseri 1994). Die Resultate zeigen, dass der PARP-Inhibitor 3-AB (Nosseri 1994) nicht vor dem durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose

induzierten programmierten Zelltod schützt. Das 3-Aminobenzamid allein hatte in der verwendeten Konzentration auf keine der verwendeten Zellarten eine zytotoxische Wirkung (Abschnitt 2.4.13).

Beim internukleosomalen Chromatinabbau im Rahmen der klassischen Apoptose wird die DNA in den Bereichen abgebaut, die nicht durch eine Assoziation mit Histonen geschützt sind. So entstehen DNA-Bruchstücke mit einer Größe von etwa 200 Basenpaaren oder Vielfachen davon. Dies führt dazu, dass nach der Extraktion der DNA in einem elektrischen Feld „DNA-Leitern“ sichtbar werden können. (Wyllie *et al.* 1980; An *et al.* 1998; Green und Reed 1998; Spector *et al.* 1998; Thornberry und Lazebnik 1998; Hengartner 2000; Strasser *et al.* 2000; Leverrier und Ridley 2001). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose keine DNA-Leiterbildung nachgewiesen werden. Dies spricht wiederum für die Induktion des programmierten Zelltodes Typ II (Spector *et al.* 1998).

N-Acetylcystein (NAC) ist eine antioxidative Substanz, die die zellulären Vorräte an freien Radikalfängern erhöht und somit den durch reaktive Sauerstoffintermediate (Reactive Oxygen Intermediates = ROI) induzierten programmierten Zelltod verringern oder verhindern kann (Ferrari *et al.* 1995; De Flora *et al.* 2001). Die Inkubation der Tumorzellen mit NAC 20 Minuten vor der Inkubation mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose führte zu einer signifikanten Inhibition der durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose ausgelösten Zytotoxizität (Abschnitt 2.3.23). Dieses Ergebnis lässt wiederum auf einen Caspase-unabhängigen, durch reaktive Sauerstoffintermediate vermittelten Apoptose-Mechanismus schließen.

Der Autophagie-Mechanismus beginnt mit der Sequestration des zytoplasmatischen Materials, wobei es zu der Bildung intrazytoplasmatischer Vakuolen, sog. Autophagosomen kommt. Es wird angenommen, dass die Doppelmembran der frühen Autophagosomen von den Ribosomen-freien Regionen des endoplasmatischen Retikulums stammt (Blommaart *et al.* 1997; Kim und Klionsky 2000; Klionsky und Emr 2000). Alternativ gibt es Meinungen, dass sie von einer speziellen Organelle, der sogenannten Phagophore oder aus veränderten Golgi-Membranen gebildet wird (Blommaart *et al.* 1997; Kim und Klionsky 2000; Klionsky und Emr 2000). Die Autolysosomen entstehen aus der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen. Dadurch wird der endgültige Abbau des sequestrierten Materials eingeleitet. Die Proteine des Zytoskelettes sind dabei integrale Bestandteile dieses Mechanismus: die Sequestration erfordert intermediäre Filamente (Cytokeratin und Vimentin), die Bewegung und Fusion der Lysosomen mit den späten Autophagosomen benötigt das mikrotubuläre System. Alle Schritte des finalen Abbaus des sequestrierten zytoplasmatischen Materials sind ATP-abhängig. (Blommaart *et al.* 1997; Kim und Klionsky 2000; Klionsky und Emr 2000). Das würde bedeuten, dass bei der Induktion der Autophagie der intrazelluläre ATP-Gehalt für einige Zeit aufrechterhalten bleiben müsste.

Die Untersuchung des intrazellulären ATP-Gehaltes von LN18, LN229, U87MG und ex vivo Glioblastom-Zellen-I nach Inkubation mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose zeigte entsprechend nach 3 und 6 Stunden keine signifikante Differenz im Vergleich zum Ausgangswert. Erst nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin 100 bzw. Taurultam 200  $\mu\text{g/ml}$  war der intrazelluläre ATP-Gehalt auf 0,4 % des Ausgangswertes abgesunken. Zum Vergleich wurden die Zellen mit Oligomycin, glucosefreiem Medium bzw. mit beiden Substanzen für 3 h inkubiert, um jede Quelle der ATP-Produktion zu eliminieren. Oligomycin ist ein Inhibitor der  $\text{H}^+$  transportierenden ATP-Synthase (Slater 1967) und der Na/K ATPase (Robinson und Flashner 1979). Der ATP-Gehalt sank bei den LN18 Zellen bereits nach 3 Stunden auf unter 0,4 % ab, während es bei den ex vivo Glioblastomzellen nur zu einer Reduktion auf 52,5 % kam. Bei der Eliminierung jeglicher intrazellulärer ATP-Produktion, d.h. bei Inkubation in glucosefreiem Medium und Zugabe von Oligomycin, war der intrazelluläre ATP-Gehalt schon nach 3 Stunden praktisch auf Null abgesunken (Abschnitt 2.4.16). Insgesamt zeigten sich Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose hinsichtlich der Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes wirksamer als Fas-Ligand und ähnlich wirksam wie die Inkubation mit glucosefreiem Medium und Oligomycin. Der Effekt der intrazellulären ATP-Abnahme trat jedoch *deutlich* später ein. Der relativ lange aufrechterhaltene hohe ATP-Gehalt nach Initiierung des Zelltodes durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose spricht wiederum für die Autophagie. Es scheint, dass die ATP-Synthase auf einem Level aufrechterhalten wird, der für die Komplettierung dieser Form des programmierten Zelltodes erforderlich ist. Studien zeigten, dass die Autophagie zumindest in den frühen Stadien nicht mit einem Verlust der Zellmembranintegrität einhergeht (Blommaert *et al.* 1997; Klionsky und Emr 2000). Diese ATP-Abhängigkeit des Zellabbauprogrammes würde die dargelegten Resultate unterstützen.

DL Buthionine [S, R]-sulfoximine (BSO) ist ein selektiver Inhibitor der Gamma-Glutamyl-Cystein-Synthase (Fruehauf *et al.* 1997). Dieses ist ein Enzym, das im Glutathion-Biosynthese Weg eine entscheidende Bedeutung hat. Glutathion ist ein Tripeptid, das in reduzierter Form eine Schutzwirkung auf verschiedene Enzyme der Glykolyse vor deren Inaktivierung durch Oxidation hat. Außerdem hat es eine Schutzwirkung gegen Wasserstoffperoxid und freie Sauerstoffradikale (Hofmann 1985). Die Depletion des intrazellulären Glutathions durch BSO ist mit einer erhöhten Sensitivität von Zellen auf chemotherapeutische Substanzen verbunden. (Griffith und Meister 1979; Griffith 1982; Green 1984; Kramer 1987). Wenn nun die Wirkung von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose, zumindest zum Teil, auf der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale beruht, müsste die intrazelluläre Glutathiondepletion durch BSO zu einer Zunahme der durch die Wirkstoffe ausgelösten Zellzerstörung führen. Nach vorbereitender Inkubation der Zellen mit BSO für 24 Stunden zeigte sich tatsächlich eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf den durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose vermittelten Zelltod (Bild 2.42). Dabei wurde bei dem relativ schwach wirkenden Taurultam-Glucose die größte Wirkung erzielt. Selbst in Konzentrationen, bei

denen mit alleiniger Inkubation mit Taurultam-Glucose noch keine Zellabtötung erreicht wurde, konnte nach vorbereitender Inkubation mit BSO ein deutlicher zytotoxischer Effekt erzielt werden (Abschnitt 2.4.17).

Der programmierte Zelltod Typ II ist das Resultat aktiver zellulärer Prozesse, die durch Radikalfänger freier Sauerstoffradikale (Schulze-Osthoff und al. 1992; Vercammen 1998) oder Mutationen intrazellulärer Signalmoleküle aufgehalten werden können (Holler und al. 2000). Im Hinblick auf die ursprünglichen morphologischen und biochemischen Beschreibungen der Apoptose, wurde das autophagosomale/lysosomale System als unbedeutend für die initialen Stadien der Apoptose angesehen. Die Funktion der Lysosomen war nur auf den Abbau der Apoptosomen beschränkt (Kerr et al. 1972; Wyllie et al. 1980). Autophagie scheint aber ein phylogenetisch altes Phänomen zu sein, dass sich möglicherweise noch vor der Apoptose entwickelt hat (Schwartz et al. 1993; Cornillon et al. 1994; Klionsky und Emr 2000). Autophagie wurde sowohl mit experimentellen und humanen neurologischen Erkrankungen als auch mit zytotoxischer Therapie in Verbindung gebracht (Rez et al. 1991; Cataldo et al. 1995; Anglade et al. 1997). Das Zytoskelett reagiert bei der Autophagie und der Apoptose auf verschiedene Weise. Die Apoptose beinhaltet die Depolymerisation bzw. den Abbau des Aktin, Cytokeratin, Lamin und anderer Proteine des Zytoskelettes. Dies resultiert wahrscheinlich in der typischen finalen Form der apoptotischen Zellen. Im Gegensatz dazu wird das Zytoskelett bei der Autophagie umverteilt, ist aber weitgehend erhalten (Bursch et al. 2000c; Hengartner 2000). Einer der wichtigsten Schritte der Autophagie ist der Abbau zytoplasmatischer Komponenten, was zu einem fortschreitenden Verlust der Elektrodensität führt. Die Degradation der zytoplasmatischen Komponenten findet vor dem Abbau des Nucleus statt. Dieser zeitliche Ablauf der Veränderungen fand sich auch bei dem durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose induzierten Zelltod. Wie die Apoptose, wird auch die Autophagie durch Phagozytose komplettiert (Beaulaton und Lockshin 1982; Verma 1983).

Apoptose und Autophagie müssen sich nicht ausschließen. Sie können simultan auftreten aber auch aufeinander folgen (Beaulaton und Lockshin 1982; Verma 1983; Rez et al. 1991; Schwartz et al. 1993; Zakeri et al. 1995; Anglade et al. 1997). Außerdem können sterbende Zellen Merkmale beider Zelltodmechanismen aufweisen, das heißt, dass Mischformen möglich sind (Beaulaton und Lockshin 1982; Verma 1983; Rez et al. 1991; Schwartz et al. 1993; Zakeri et al. 1995; Bursch und al. 1996; Anglade et al. 1997; Xue et al. 1999). Eine funktionelle Beziehung zwischen der Autophagozytose und dem Selbsttötungsprogramm von Zellen konnte durch Inhibitionsexperimente mit 3-Methyladenin (3-MA) hergestellt werden (Seglen und Jordan 1982; Sandvig und van Deurs 1992; Bursch und al. 1996; Jia et al. 1997; Chi und al. 1999; Kitanaka und Kuchino 1999; Xue et al. 1999; Petiot et al. 2000). So kann 3-MA die Aktivität der Klasse III Phosphatidylinositol-Kinase hemmen (Seglen und Jordan 1982; Petiot et al. 2000). Die Inhibition der Bildung der Autophagie-Vacuolen durch 3-MA wurden an Experimenten mit Tamoxifen behandelten humanen Mamma-Karzinomzellen, gastrischen Karzinom-

zellen und Gliomzellen mit Überexpression von Ras, TNF- $\alpha$  behandelten humanen T-lymphoblastischen Leukämiezellen und neuronalen Zellen nachgewiesen (Seglen und Jordan 1982; Sandvig und van Deurs 1992; Bursch und al. 1996; Jia et al. 1997; Chi und al. 1999; Kitanaka und Kuchino 1999; Xue et al. 1999). Dabei wurde TNF- $\alpha$  als Auslöser der Autophagie bei T-lymphoblastischen Leukämiezellen festgestellt. Durch 3-MA konnten sowohl die Formation der Autophagosomen als auch der Zelltod verhindert werden (Jia et al. 1997). In Gegensatz dazu konnte Asparagin, welches die Fusion von Lysosomen mit Autophagosomen hemmt, den durch TNF- $\alpha$  induzierten Zelltod nicht verhindern (Jia et al. 1997). Eine Inhibition dieses Zelltodmechanismus nach der Sequestration behindert also nicht die Komplettierung der Autophagie. Einige Autoren hatten den inhibitorischen Effekt von 3-MA auf pH-Verschiebungen zurückgeführt, da 3-MA den lysosomalen pH-Wert von Hepatocyten leicht erhöht. Die Anhebung des lysosomalen pH-Wertes durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konnte aber im Gegensatz dazu Nierenzellen nicht vor der durch Ricin induzierten Lyse schützen. Dies spricht gegen einen möglichen Anstieg des lysosomalen pH-Wertes als Ursache für die protektive Wirkung von 3-MA (Sandvig und van Deurs 1992).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass nach Inkubation mit 3-MA der durch Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose ausgelöste Zelltod konzentrationsabhängig um bis zu ca. 30 % vermindert werden konnte (Bild 2.43; Abschnitt 2.4.18). Auch diese Ergebnisse lassen auf den vorwiegenden Mechanismus der Auslösung des programmierten Zelltodes Typ II (Autophagie) durch Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose schließen.

Bafilomycin A1 ist ein Protonenpumpen Inhibitor der ATPase (Werner et al. 1984; Bowman et al. 1988). Es wurde beschrieben, dass Bafilomycin-A1 die Autophagie bei bestrahlten Krebszellen unterdrückt und dafür zu einem apoptotischen Zelltod führt (Paglin et al. 2001). Es wurde deshalb untersucht, ob Bafilomycin A1 die Autophagie bei den LN18, LN229, U87MG und ex-vivo-Glioblastomzellen-I beeinflusst. Es zeigte sich, dass der durch Taurolidin, Taurultam sowie Taurultam-Glucose ausgelöste Zelltod nicht durch Bafilomycin A1 100 mM unterdrückt werden konnte. Nach Inkubation der Zellen mit 3-Methyladenin konnte er aber konzentrationsabhängig partiell verhindert werden. Bei Zugabe von Bafilomycin-A1 und gleichzeitiger Hemmung der Autophagie durch 3-Methyladenin kam es zu einer Zunahme der zytotoxischen Wirkung, die durch Taurolidin ausgelöst wurde (Abschnitt 2.4.19). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Bafilomycin-A1 in diesem Fall die Autophagie hemmt, gleichzeitig jedoch den apoptotischen Zelltodmechanismus fördert. Das wäre neben der geringen, wenn auch nicht signifikanten Inhibierung der Wirkung durch z-VAD.fmk und dem Nachweis der Cytochrom-C Freisetzung ein weiterer Hinweis darauf, dass zu einem geringen Anteil auch der programmierte Zelltod Typ I an der Wirkung von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose beteiligt sein könnte. Es handelt sich also möglicherweise um eine Mischform des programmierten Zelltodes, an dem vorwiegend die Autophagie und zu einem geringeren Anteil die klassische Apoptose beteiligt sind. Dabei scheinen bedarfsgerechte Verschiebungen dieses

Verhältnisses möglich zu sein (Stendel *et al.* 2001, 2002a; Stendel *et al.* 2002d; Lockshin und Zakeri 2004b, a; Stendel *et al.* 2004a).

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) kann in normalem Hirngewebe in der Regel nicht nachgewiesen werden. VEGF wird jedoch in glialen Tumorzellen nach der Progression zu einem Glioblastom regelmäßig exprimiert (Yao *et al.* 2001). Dieses von den Tumorzellen produzierte VEGF hat eine große Bedeutung für die Regulation der Tumorausdehnung, der Angiogenese und das perifokale Hirnödem (Cheng *et al.* 1996; Grunstein *et al.* 1999). VEGF fördert Migration und tubuläre Differenzierung von Endothelzellen (Zeng 2001), die Dilatation von Gefäßen und führt die Gefäßpermeabilität sowie Degradation von Basalmembranen (Laird 2000).

Nach Inkubation der Tumorzellen mit Taurolidin, Taurultam bzw. Taurultam-Glucose kam es zu einer Verminderung der VEGF-Expression um bis zu 75 %. Die Resultate sprechen für einen anti-angiogenetischen Effekt von Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose. Interessant ist die Tatsache, dass sich der zytotoxische Effekt von Taurultam-Glucose als relativ schwach erwiesen hatte, jedoch die anti-angiogenetische Wirkung von Taurultam und Taurultam-Glucose nahezu gleich war (Abschnitt 2.4.20). Möglicherweise sind verschiedene Mechanismen für die beiden Wirkungen verantwortlich. Der schwächere Effekt von Taurultam-Glucose hinsichtlich der Auslösung des programmierten Zelltodes Typ II ist möglicherweise auf den hohen Glucoseanteil dieser Substanz von mehr als 57 % zurückzuführen. Dieser könnte einen gewissen protektiven Effekt auf den durch die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate ausgelösten Zelltod ausüben. Dieser beruht möglicherweise auf der besseren Energieversorgung und damit der besseren Wirksamkeit der Entgiftungs- und Radikalfängermechanismen der Zelle.

## 2.6 Schlussfolgerungen

Taurolidin, Taurultam und Taurultam-Glucose führen dosis- und zeitabhängig zu einer selektiven zytotoxischen Wirkung auf humane gliale Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen. Die Wirkstoffe führen dosisabhängig zu einer Verminderung bzw. Verhinderung der Koloniebildung humaner glialer Tumorzelllinien und ex-vivo-Glioblastomzellen. Taurolidin ist wirksamer als Taurultam und Taurultam ist wirksamer als Taurultam-Glucose. Dies beruht möglicherweise auf dem hohen Glucoseanteil von Taurultam-Glucose, der hinsichtlich des festgestellten Wirkungsmechanismus protektiv wirkt.

Die antineoplastische Wirkung scheint zum wesentlichen Teil auf der Induktion des programmierten Zelltodes Typ II (Autophagie) über die Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor) und konsekutiver Bildung von ROI (reactive oxygen intermediates) zu beruhen. Zu einem deutlich geringeren Anteil scheint auch der klassische Caspase-abhängige programmierte Zelltod Typ I beteiligt

zu sein. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es möglicherweise im Bedarfsfall zur Verschiebung der Relation dieser beiden am Zelltod beteiligten Prozesse kommen kann.

Die VEGF-Exprimierung wird durch alle 3 Wirkstoffe zeit- und dosisabhängig vermindert. Dies spricht für einen zusätzlichen anti-angiogenetischen Effekt dieser Substanzen.