Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Zytotoxizität von 6-Fluordopamin gegenüber Noradrenalin-Transporter positiven und negativen Neuroblastomzellen im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Alexander Schmid
aus
Ehingen (Donau)

2006

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Bruchelt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Fierlbeck

Inhaltsverzeichnis:

Seite

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1. 1. Grundlagen 1
1. 1. 1. Das Neuroblastom 1
1. 1. 1. 1.Inzidenz, Ätiologie und Klassifizierung 1
1. 1. 1. 2.Diagnostik 3
1. 1. 1. 3.Prognose und prognostische Marker 4
1. 1. 1. 4.Therapie 5
1. 1. 1. 5.Aktuelle Entwicklungen 6
1. 1. 2. Katecholaminstoffwechsel und Transporter 9
1. 1. 2. 1.Katecholaminstoffwechsel 9
1. 1. 2. 2.Der Noradrenalin-Transporter 10
1. 1. 2. 3.Der Dopamin-Transporter 12
1. 1. 3. Vitamin C 12
1. 1. 3. 1.Historischer Hintergrund 12
1. 1. 3. 2.Chemie der Ascorbinsäure 13
1. 1. 3. 3.Die Rolle des Ascorbat bei oxidativem Stress 14
1. 1. 4. 6-Hydroxydopamin 15
1. 1. 4. 1.Chemie 15
1. 1. 4. 2.Wirkung von 6-Hydroxydopamin auf Zellen in vivo und in vitro 17
1. 1. 4. 3.Probleme bei der Anwendung des 6-Hydroxydopamins zur Reinigung von angereicherten Stammzellen 18
1. 1. 5. 6-Fluordopamin 20
1. 1. 5. 1.Chemie und Umwandlung in 6-Hydroxydopamin 20
1. 1. 5. 2.Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert 21
1. 1. 5. 3.Aufnahme von 6-Fluordopamin in die Zellen 22

1. 2. Zielsetzung und Planung der Arbeit 22

2. Material und Methoden 26

2. 1. Materialien 26
2. 1. 1. Chemikalien, Geräte und Medien 26
2. 1. 1. 1.Chemikalien 26
2. 1. 1. 2.Plastikartikel und Geräte 27
2. 1. 1. 3.Anderes 28
2. 1. 2. Kulturmedien 28
2. 1. 2. 1.Kulturmedien für die Neuroblastomzellen 28

2. 1. 2. 2.Kulturmedium für adulte Knochenmarkstammzellen 28
2. 1. 2. 3.Einfriermedium 29
2. 1. 3. Zelllinien 29
2. 1. 3. 1.Neuroblastomzelllinien 29
2. 1. 3. 2.Adulte hämatopoetische Stammzellen 30
2. 2. Methoden 31
2. 2. 1. Herstellung der Lösungen 31
2. 2. 1. 1.Herstellung der Ascorbatlösung 31
2. 2. 1. 2.Herstellung der 6-Fluordopamin- und 6-Hydroxydopamin-Lösung 32
2. 2. 2. Kultivierung der Neuroblastomzelllinien 32
2. 2. 2. 1.Anzüchten der Neuroblastomzellen 32
2. 2. 2. 2.Passagieren der Neuroblastomzellen 33
2. 2. 2. 3.Einfrieren und Auftauen der Neuroblastomzellen 34
2. 2. 3. Vorbereitung und Durchführung des MTT-Tests mit den Neuroblastomzelllinien 35
2. 2. 3. 1.Gewinnung der Zellsuspension 35
2. 2. 3. 2.Bestimmung der Zellzahl bei den Neuroblastomzellen 35
2. 2. 3. 3.Aussähen der Neuroblastomzellen in 96 Well-Platten 36
2. 2. 3. 4.Inkubation der Neuroblastomzellen mit den Substanzen 36
2. 2. 3. 5.Theoretische Grundlagen des MTT-Tests 37
2. 2. 3. 6.Herstellung der MTT-Stammlösung 38
2. 2. 3. 7.Herstellung der Solubilisierungslösung 38
2. 2. 3. 8.Durchführung des MTT-Tests 38
2. 2. 3. 9.Auswerten der Proben im Milenia Kinetic Analyzer 39
2. 2. 4. Auswertung der Ergebnisse bei den Neuroblastomzelllinien 40
2. 2. 5. Kultivierung und Versuchsdurchführung bei den koloniebildenden Tests 40
2. 2. 5. 1.Koloniewachstum der hämatopoetischen Stammzellen 40
2. 2. 5. 2.Zugeben und Entfernen der Substanzen bei den angereicherten Stammzellen 41
2. 2. 6. Auswertung der Ergebnisse bei den angereicherten Stammzellen 42
2. 2. 7. Probleme und Vorsichtsmaßnahmen bei der Testdurchführung 45
2. 2. 7. 1.Variation der Zellzahl und des Zellwachstums bei den Neuroblastomlinien 45
2. 2. 7. 2.Variation der Zellzahl bei den koloniebildenden Tests 46
2. 2. 7. 3.Stabilität der Lösungen 46
2. 2. 7. 4.Einfluss von Ascorbat auf den MTT-Test 47

3. Ergebnisse 48

3. 1. Einfluss der Wirkstoffe auf Neuroblastomzelllinien 48
3. 1. 1. Vorbemerkung zur Auswahl der Untersuchungen 48
3. 1. 2. Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf das Wachstum von SK-N-SH und SK-N-LO-Zellen 50
3. 1. 2. 1.Optimierung der Zellzahl 50
3. 1. 2. 2.Die Wirkung von 6-Hydroxydopamin in Abhängigkeit von der Konzentration 51

3. 1. 2. 3.Der Einfluss von Vitamin C auf das Testsystem 53
3. 1. 2. 4.Der Einfluss von Vitamin C auf die Wirkung von 6-Hydroxy-dopamin 55
3. 1. 3. Der Einfluss von 6-Fluordopamin auf das Wachstum der Zelllinien 57
3. 1. 3. 1.Die konzentrationsabhängige Wirkung von 6-Fluordopamin bei 2,5stündiger Inkubation 58
3. 1. 3. 2.Die Wirkung von 6-Fluordopamin bei kürzerer Inkubationszeit (0,5 - 1,5 Stunden) 59
3. 1. 3. 3.Der Einfluss der Zelldichte auf das Ergebnis 62
3. 1. 4. Der Einfluss von Vitamin C auf die Wirkung von 6-Fluordopamin 66
3. 1. 4. 1.Wirkung verschiedener Konzentrationen an 6-Fluordopamin in Kombination mit Vitamin C 66
3. 1. 4. 2.Wirkung verschiedener Ascorbat-Konzentrationen auf die Toxizität von 6-Fluordopamin bei unterschiedlichen Inkubationszeiten 68
3. 1. 4. 3.Wirkung von 6-Fluordopamin bei kürzerer Inkubationszeit in Gegenwart geringer Ascorbatkonzentrationen 70
3. 1. 4. 4.Durchführung weiterer Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse 72
3. 1. 5. Zusammenfassung der Ergebnisse für die Neuroblastomzellen 76
3. 2. Einfluss des 6-Fluordopamins auf hämatopoetische Stammzellen 77
3. 2. 1. Einfluss von 6-Fluordopamin auf hämatopoetische Stammzellen bei geringer Ascorbat-Konzentration 77
3. 2. 2. Einfluss von höheren Vitamin C-Konzentrationen auf die Wirkung von 6-Fluordopamin bei hämatopoetischen Stammzellen 79
3. 2. 3. Einfluss auf die Morphologie der Kolonien 85
3. 2. 4. Zusammenfassung der Wirkung von 6-Fluordopamin und Vitamin C auf die hämatopoetischen Stammzellen 86
3. 3. Der Einfluss von Vitamin C auf hämatopoetische Stammzellen 87
3. 3. 1. Wachstumssteigernder Effekt des Vitamin C 87
3. 3. 2. Auswertung nach Kolonietypen 88
3. 3. 3. Unterschiede in der Form und Größe der Kolonien nach Ascorbatbehandlung 92
3. 3. 4. Zusammenfassung der Wirkung von Vitamin C auf hämatopoetische Stammzellen 94

4. Diskussion 96

4. 1. Bedeutung für die Behandlung des Neuroblastoms 96
4. 2. Bewertung der Methoden 98
4. 2. 1. Bewertung der Methode bei den Neuroblastomkulturen 98
4. 2. 1. 1.Bewertung des MTT-Tests 98
4. 2. 1. 2.Vergleichbarkeit der Zellkulturen mit entnommenen Neuroblastom-Tumoren 99
4. 2. 2. Bewertung des koloniebildenden Tests 100
4. 2. 3. Unterschiede zwischen beiden verwendeten Testsystemen 101

4. 3. Interpretation der Ergebnisse 102
4. 3. 1. Gründe für die schwache Wirkung des 6-Fluordopamins 102
4. 3. 1. 1.Unterschiedliche Empfindlichkeit der Neuroblastom-Zelllinien gegenüber reaktiven Sauerstoffverbindungen 102
4. 3. 1. 2.Expression des Noradrenalin-Transporters innerhalb einer Zelllinie 104
4. 3. 2. Gründe für die Empfindlichkeit der hämatopoetischen Stammzellen gegenüber 6-Fluordopamin und mögliche Gegenmaßnahmen 105
4. 3. 2. 1.Der Dopamin-Transporter der hämatopoetischen Stammzellen 105
4. 3. 2. 2.Kombination von 6-Fluordopamin mit einem selektiven Hemmer des Dopamin-Transporters 108
4. 3. 3. Nutzen der Stammzellreinigung 109
4. 4. Zur Wirkung des Vitamin C auf die hämatopoetischen Stammzellen 112
4. 4. 1. Bewertung der Ergebnisse 112
4. 4. 2. Anwendungsmöglichkeiten der Vitamin C-bedingten Wachstumssteigerung 113

5. Zusammenfassung 116

Literaturverzeichniss 121

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
^{123}I	Radiojodisotop 123
^{131}I	Radiojodisotop 131
6-FDA	6-Fluordopamin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AA	Ascorbinsäure (ascorbic acid)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
EPR-Spektren (EPR)	Elektronenspinresonanz
FCS	Fötales Kälberserum
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GABA	Gamma-Amino Buttersäure (gamma-amino-butyric acid)
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HVA	Homovanillinsäure
INSS	internationales Neuroblastomstadiensystem
lU	internationale Einheit (international unit)
MACS	immunomagnetische Zellsortierung (magnet activated cell sorting)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
mIBG	meta-Jodo-Benzylguanidin
N-Myc	N-Myc Onkogen
NA-T	Noradrenalin-Transporter
PCD	programmierter Zelltod (programed cell death)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PBS	Phophate Buffered Salt Solution (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
HCl	Salzsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SK-N-LO	humane Neuroblastomzelllinie
SK-N-SH	humane Neuroblastomzelllinie
VMA	Vanillinmandelsäure

1. Einleitung

1. 1. Grundlagen

1. 1. 1. Das Neuroblastom

1. 1. 1. 1. Inzidenz, Ätiologie und Klassifizierung

Das Neuroblastom ist ein solider Tumor, der sich ätiologisch aus pluripotenten Zellen der Neuralleiste ableitet. Aus ihnen entwickeln sich sonst Neuroblasten, Zellen des sympathischen Nervensystems, und auch Schwannsche Zellen (Voute et al., 1986). Mit den Zellen des sympathischen Nervensystems hat das Neuroblastom die Fähigkeit gemeinsam, Noradrenalin bilden zu können und Noradrenalin-Transporter (NA-T) zu besitzen (Katzenstein et al.,1998). Man nimmt an, dass der Tumor bereits pränatal oder in den ersten Lebensmonaten entsteht, da er beinahe ausschließlich bei Kindern vorkommt und seine höchste Inzidenz im ersten Lebensjahr hat, wo er sogar die häufigste Neoplasie überhaupt ist (Young et al., 1975). Das Neuroblastom ist histologisch durch seine Ähnlichkeit zu den Neuroblasten definiert, kann dabei aber im Differenzierungsgrad sehr unterschiedlich sein (Hughes et al., 1974).

Das Neuroblastom hat bei unter 15jährigen Kindern eine Inzidenz von ungefähr 10 zu 1 000 000 und ist damit der zweithäufigste solide Tumor in dieser Altersklasse. Etwa 70% der Neuroblastome entstehen im Abdomen, die Hälfte davon im Nebennierenmark, und 20% im Thorax (Evans et al., 1976). Das Neuroblastom tritt jedoch überall auf, wo sich auch Zellen des sympathischen Nervensystems finden, unter anderem auch im Rückenmark oder intrakraniell.

Das Neuroblastom wird heute meist nach dem internationalen Neuroblastomstadiensystem (INSS) eingeteilt, wie in Tabelle 1.1. dargestellt.

TABELLE 1.1. Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms (INSS)

Stadium		Tumorausdehnung
1		Lokalisierter Tumor, makroskopisch komplette Resektion möglich, repräsentative ipsi- oder kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
2	a	Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Resektion, repräsentative ipsi- oder kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
	b	Unilateraler Tumor; regionale, ipsilaterale, nicht-adhärente Lymphknoten von Tumorzellen befallen; kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
3		nicht-resektabler unilateraler Tumor mit Infiltration über die Mittellinie, mit oder ohne Lymphknotenbefall, oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder Lymphknotenbefall
4		Disseminierung des Tumors zu entfernt gelegenen Lymphknoten, zu Knochenmark, Leber, Haut und / oder anderen Organen
4 S		Lokalisierter Primärtumor (vgl. Stadium 1, 2a, 2b) mit Disseminierung nur in Leber, Haut und / oder Knochenmark; nur Säuglinge im 1. Lebensjahr

Hierbei ist analog zu anderen Tumorerkrankungen Stadium 1 ein Tumor ohne Metastasen und Stadium 2 mit ersten Metastasen in einigen wenigen Lymphknoten. Stadium 3 ist bereits chirurgisch nicht mehr resizierbar und Stadium 4 bezeichnet einen Tumor, der bereits Fernmetastasen gebildet und sich daher bereits maximal im Körper verbreitet hat (siehe Tabelle 1.1.). Eine Besonderheit des Neuroblastoms ist das Stadium 4 S. Hierbei trägt man dem Umstand Rechnung, dass die Prognose des Neuroblastoms sehr altersabhängig ist. Bei Kindern, die unter einem Jahr alt sind, macht der Tumor oft wenig Beschwerden und wird deshalb nicht selten erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Diese Kinder haben dennoch eine überraschend gute Prognose. Mittlerweile weiß man, dass das zum Teil darauf zurückzuführen ist, dass sich der Tumor in einem

Teil der Fälle spontan und ohne Therapie zurückbildet. Dieses Phänomen ist beim Neuroblastom ungleich häufiger ist als bei anderen Tumoren.

1. 1. 1. 2. Diagnostik

Neben allgemeinen Symptomen einer Tumorerkrankung wie Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust oder Anämie kann es beim Neuroblastom auch zu spezifischen Wirkungen des Primärtumors oder seiner Metastasen kommen, z.B. Lähmungserscheinungen bei intramedullärer Lage oder einem Horner-Syndrom. Daneben kommen Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen oder Leberinsuffizienz bei Lebermetastasen in fortgeschrittenen Stadien vor. Zudem kann sich das Neuroblastom in späteren Stadien durch die Wirkung des von ihm synthetisierten Noradrenalins bemerkbar machen, es kann dann zu Durchfall oder Blässe kommen.

Auch diagnostisch nutzt man die Noradrenalin-Synthese des Neuroblastoms (Miller, 1985). So findet man bei ca. 90% der Patienten im Urin oder im Serum erhöhte Konzentrationen an den Katecholaminen Dopamin und Noradrenalin, ihrer Vorstufe 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oder ihrer Abbauprodukte Normetanephrin, Homovanillinsäure (HVA) und Vanillinmandelsäure (VMA) (Gitlow et al., 1970). Das vielfach vorgeschlagene Massenscreening aller Neugeborener mit Hilfe des sehr einfachen und wenig invasiven Nachweises dieser Substanzen im Urin hat sich jedoch zuletzt nicht als sinnvoll erwiesen (Schilling et al., 2002) (Siehe Kapitel Aktuelle Entwicklungen auf Seite 6).

Zum weiteren Nachweis des Tumors oder der Metastasen dienen Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie. Eine Biopsie mit nachfolgender histologischer Untersuchung ist jedoch zur endgültigen Diagnosestellung unerlässlich. Sie wird ergänzt durch Immunfluoreszenz-Analysen, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und zytologischen Untersuchungen. Große

Bedeutung vor allem für die Stadieneinteilung hat inzwischen die szintigraphische Untersuchung mit [^{123}I] radioaktiv markiertem Meta-Jodo-Benzylguanidin ([^{123}I]mIBG), das von den Neuroblastomzellen aktiv mit Hilfe ihrer NA-T aufgenommen wird und mit hoher Sensitivität Primärtumoren und Metastasen nachweist.

1. 1. 1. 3. Prognose und prognostische Marker

Wie bei allen soliden Tumoren spielt auch beim Neuroblastom das Stadium die wichtigste Rolle (Evans et al., 1987). Während Patienten in den frühen Stadien 1 und 2 eine 10-Jahres-Überlebensrate von 90% (Sitzmann, 1995) haben, hat das fortgeschrittenere Stadien 4 nur noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 22% (Klaassen et al., 2003), die selbst mit hochdosierter Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation nur auf etwa 40% ansteigt. Leider befinden sich bei Diagnose bereits über 50% der Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium, d. h. mindestens Stadium 2 b. Interessant ist, dass beim Neuroblastom das Alter sehr entscheidend für die Prognose ist. So haben Patienten unter einem Jahr selbst im Stadium 4 bzw. 4 S noch eine hohe Überlebensrate (Claviez et al., 1996), im Falle von 4 S sogar ohne Therapie, da sich diese Form des Neuroblastoms oft spontan zurückbildet oder in das gutartige Ganglioneurom ausreift. Außerdem spielt noch die Histologie eine Rolle für die Prognose (Shimada et al., 1984).

Als weiterer entscheidender Faktor hat sich heute die N-Myc-Amplifikation etabliert. Dabei handelt es sich um die Amplifikation eines Gens, die klinisch mit aggressivem Wachstum und ungünstiger Histologie korreliert (Cohn et al., 1990; Shimada et al., 1995). Selbst im nicht-metastasiertem Stadium verschlechtert eine nachgewiesene N-MYC-Amplifikation die Heilungsrate einer chirurgischen Intervention von 90-98% auf 32-36% (Rubi et al., 1997). Weitere prognostische

Faktoren sind: Hohe Spiegel an Ferritin (Silber et al., 1991), Laktat-Dehydrogenase und neuronenspezifische Enolase, Polyploidie, Chromosom 1p-Deletion und eventuell CD44-Antigen-Präsentation und Vaskularisierung, die jedoch abhängig von der N-Myc-Amplifikation sind.

1. 1. 1. 4. Therapie

Patienten in frühen Stadien (1 und 2 nach INSS), aber auch im Stadium 4 S ohne N-Myc-Amplifikation werden heute zu einer Gruppe mit geringem Risiko zusammengefasst und inzwischen zu 90% nur chirurgisch behandelt (Evans et al., 1996). Chemotherapie scheint in dieser Gruppe nicht zur Verbesserung der Prognose beizutragen (Matthay et al., 1989). In einer Gruppe mit mittlerem Risiko werden Patienten in fortgeschrittenen Stadien ohne N-MYC-Amplifikation zusammengefasst und kombiniert chirurgisch und chemotherapeutisch behandelt. Zur Hoch-Risiko Gruppe gehören alle Patienten im fortgeschrittenen Stadium (3, 4 und evtl. 4 S), mit N-MYC-Amplifikation teilweise schon im Stadium 2 (bei älteren Kindern über 1 Jahr). Patienten mit ungünstiger Histologie und N-Myc-Amplifikation werden ebenfalls zur Hoch-Risiko Gruppe gezählt. Die Patienten der Hoch-Risiko Gruppe werden in laufenden Studien zusätzlich zu einer Operation mit Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelt. Dabei wird nach subtotaler Resektion des Tumors das Knochenmark mit Hilfe von G-CSF (granulocyte colony stimulating faktor) zum Wachstum angeregt, so dass unreife hämatopoetische Stammzellen in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Mit Hilfe des Oberflächenantigens CD34 werden die Zellen mittels magnet activated cell sorting (MACS) angereichert. Nach erfolgter hochdosierter Chemotherapie wird das zerstörte Knochenmark durch die gesammelten angereicherten Stammzellen ersetzt (Matthay et al., 1999).

Die Prognose der Hoch-Risiko Gruppe verbesserte sich Dank dieser neuen Methode (Cohn et al., 1997; Di Caro et al., 1994; Mitchell et al., 1994), es blieb

aber trotzdem bei der unbefriedigenden 5-Jahres-Überlebensrate von 35-49%. In der Gruppe mit mittlerem Risiko werden mittlerweile Überlebensraten zwischen 55 und 90% erreicht (Bowman et al., 1997; Look et al., 1991), wobei die großen Unterschiede in der Prognose auf die Inhomogenität dieser Gruppe schließen lassen. In der Gruppe mit geringem Risiko lag die Überlebensrate nach 5 Jahren bei 98% (Evans et al., 1996). Im Bemühen die Prognose der an Neuroblastom erkrankten Kinder zu verbessern, muss somit vor allem die Therapie in der Hoch-Risiko Gruppe verbessert werden und auch in einem Teil der Gruppe mit mittlerem Risiko. Dies ist mit der klassischen Chemotherapie jedoch kaum mehr möglich, da die Chemotherapeutika bei dieser Behandlung schon maximal hoch dosiert werden und eine noch höhere Dosis schwerste Schäden erwarten ließe. Daher wurden andere Wege gewählt um in Zukunft die Behandlung verbessern zu können.

1. 1. 1. 5. Aktuelle Entwicklungen

Eine naheliegende Maßnahme zur Verbesserung der Prognose, die sich schon bei anderen Krebsarten als sehr erfolgreich erwiesen hat, ist die Früherkennung. Hierzu bietet es sich an, die schon oben erwähnte Methode der Erfassung von Katecholaminabbauprodukten wie Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin zu verwenden, da sie einfach durchzuführen und nicht invasiv ist. Dazu wurde den Säuglingen einfach ein Filterpapier in die Windel gelegt, mit Urin getränkt und von einem Zentrallabor ausgewertet. Diese Studie wurde in einigen deutschen Bundesländern (u. a. Baden-Württemberg) durchgeführt und die Entwicklung von Inzidenz und Prognose des Neuroblastoms mit den übrigen Bundesländern verglichen. Das vorläufige Ergebnis dieser Studie war, dass sich zwar die Inzidenz der Erkrankung etwa verdoppelte und damit die Prognose der Erkrankten verbesserte, dass sich aber die Sterblichkeit am Neuroblastom insgesamt nicht verbesserte, sondern sogar geringfügig schlechter wurde. Dies

wurde damit erklärt, dass es verschiedene Varianten des Neuroblastoms gibt, von denen eine sich spontan und ohne Therapie zurückbildet, während die andere sich ausbreitet und letztlich tödlich ist. Durch das Screening wurde nun eine große Zahl von Patienten entdeckt und behandelt, die eigentlich zur ersten Gruppe gehörten und keine Behandlung benötigen hätten. Die Nebenwirkungen der Behandlung für die erste Gruppe scheint weiterhin den Vorteil, den die zweite Gruppe dadurch hat, dass ihre Erkrankung früher diagnostiziert wird, nicht aufzuwiegen. Die Studie kam also zu dem Ergebnis, dass solche Früherkennungsmaßnahmen beim Neuroblastom nicht sinnvoll sind (Schilling et al., 2002).

Eine weitere neue Therapie ist die Behandlung mit [^{131}I] radioaktiv markiertem Meta-Jodo-Benzylguanidin. Wie weiter oben beschrieben wird diese Substanz aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Noradrenalin selektiv über den NA-T in die Zelle aufgenommen (Wieland et al., 1980; Wafelman et al., 1994). Die Strahlung, die diese Substanz aussendet wird dabei jedoch nicht diagnostisch genutzt, sondern zur Bestrahlung der Tumorzellen. Dabei haben die β-Strahlen des radioaktiven [^{131}I]-Meta-Jodo-Benzylguanidins eine Reichweite von 800μm und bestrahlen somit auch die umliegenden Zellen. Ab einer Tumordicke von ungefähr 2mm kann eine kurative Strahlendosis im Tumor erreicht werden, vorrausgesetzt dass die Jod-Aufnahme homogen ist (Wheldon et al., 1991; O´Donoghue et al., 1995). Bei kleineren Tumoren und Tumormetastasen ist die Wirkung jedoch leider nicht ausreichend, zumal die Jodaufnahme nicht homogen in allen Tumorzellen gleich zu sein scheint (Moyers et al., 1989; Mastrangelo et al., 1991). Als Ausweg wurde vorgeschlagen diese Therapie nicht palliativ und in späten Stadien durchzuführen (Troncone et al., 1987; Treuner et al., 1987; Fischer et al., 1987) sondern kurativ und in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika (Corbett et al., 1991; Gaze et al., 1995; De Kraker et al., 1995; Mastrangelo et al., 1997).

Die meisten dieser Therapien werden jedoch mit einer autologen Stammzelltransplantation kombiniert. Dazu werden gesammelte und angereicherte autologe Stammzellen, wie oben beschrieben, nach erfolgter Therapie dem Patienten wieder zurückgegeben. Dabei ist generell nicht auszuschließen, dass die gesammelten Stammzellen bereits mit Tumorzellen durchsetzt sind. Dies umso mehr, da man befürchten muss, dass zumindest einige Neuroblastomzelllinien den CD34-Marker, der beim Anreichern der Zellen verwendet wird, ebenfalls exprimieren (Hafer et al., 1999) oder den Marker MoAbs, der mit CD34 kreuzreagiert (Voigt et al., 1997). Obwohl es bisher keine Studie gibt, in der die Reinigung der Stammzellen zu einer Verbesserung der Prognose geführt hat, gibt es doch Hinweise dafür, dass mit einer erfolgreichen Reinigung der Stammzellen eine Verbesserung zu erzielen wäre. So wurden in einer Studie genmarkierte Tumorzellen, die mit autologem Knochenmark infundiert wurden, bei Rezidiven gefunden, was darauf hindeutet, dass versehentlich transfundierte Tumorzellen für diese Rezidive verantwortlich sein können (Brenner et al., 1993). In anderen Erkrankungen, hier dem Lymphom, wurde nachgewiesen, dass Patienten, deren Stammzellen mit Tumorzellen kontaminiert waren, eine schlechtere Prognose hatten als andere (Freedman et al., 1999). Ob dies allerdings auf die Kontamination der Stammzellen zurückgeht oder auf die Tatsache, dass diese Patienten im Durchschnitt ein früheres Stadium aufwiesen, bleibt unklar.

Andere therapeutische Ansätze nutzen monoclonale Antikörper gegen GD2-Ganglioside, Interleukin-2 oder Retinoide (retinoic acid). Alle diese Ansätze haben objektivierbare erste Erfolge bei Patienten im Spätstadium der Erkrankung erbracht.

1. 1. 2. Katecholaminstoffwechsel und Transporter

1. 1. 2. 1. Katecholaminstoffwechsel

Katecholamine werden aus der aromatischen Aminosäure Tyrosin hergestellt. Mit Hilfe des Cofaktors Tetrahydrobiopterin hydroxyliert die Tyrosin-Hydroxylase Tyrosin zu DOPA. Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Dopamin-Synthese und wird deshalb auf vielfältige Weise reguliert, beispielsweise durch Phosphorylierung. Durch Decarboxylierung entsteht mit Hilfe der im Zytosol befindlichen DOPA-Decarboxylase aus DOPA Dopamin. Im letzten Schritt kann aus Dopamin Noradrenalin hergestellt werden, was in den sympathischen Nervenzellen über das Enzyms Dopamin-β–Hydroxylase geschieht. In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, nicht jedoch in den Neuroblastomzellen, kann daraus mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase Adrenalin entstehen (siehe Abbildung 1.1.).

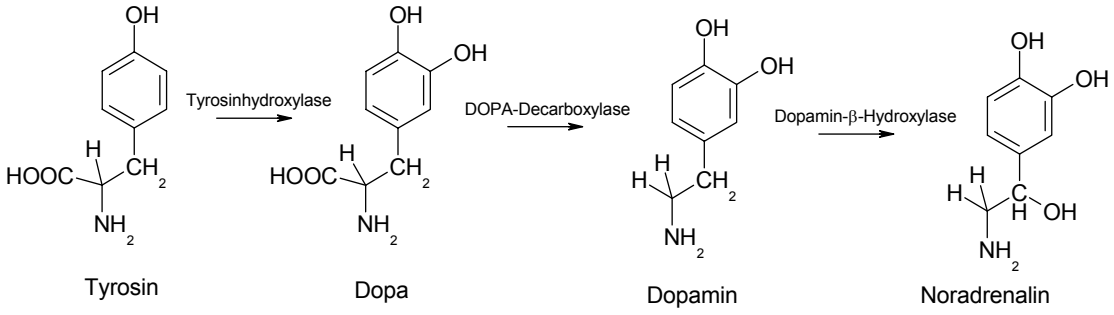


ABBILDUNG 1.1. Synthese von Noradrenalin in Neuroblastomzellen und Zellen des sympathischen Nervensystems

In gesunden sympathischen Nervenzellen werden Dopamin und Noradrenalin zum größten Teil in Vesikeln gespeichert, da sie im Zytosol bei physiologischem pH schnell zu Chinonen autooxidieren und dabei Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) freisetzen. Das Milieu in den Vesikeln bei einem pH von

5,5 und einer hohen Konzentration von Ascorbat schützt die Substanzen vor abbauenden Enzymen und Autooxidation. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach Behandlung von Striatum-Zellen von Ratten mit Reserpin, einer Substanz, welche die Aufnahme von Noradrenalin in die Speichervesikel hemmt, der intrazelluläre Gehalt an H_2O_2 ansteigt (Spina & Cohen, 1988). Neuroblastomzellen besitzen dagegen nur wenige Speichervesikel, was ihre Empfindlichkeit gegenüber Dopamin erklärt.

1. 1. 2. 2. Der Noradrenalin-Transporter

Die Transporter für Monoamine kommen nicht nur in Nervenzellen vor, sondern auch in anderen Geweben (Sieber-Blum et al., 2000). Sie scheinen dort eine Rolle in der Embryogenese und in der Differenzierung von Zellen zu spielen. Über ihre genaue Bedeutung ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Viel wichtiger und auch schon seit längerer Zeit bekannt ist ihre Funktion in den Nervenzellen, sowohl des Zentralnervensystems, als auch des peripheren Nervensystems.

Hat die Depolarisation und damit das übertragene Signal einer Nervenzelle den synaptischen Spalt erreicht, so stößt sie dort ihren Neurotransmitter aus um die nachgeschaltete Nervenzellen zu erregen. Als ein solcher Neurotransmitter dienen auch die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin. Da die übertragenen Signale nur wenige Millisekunden andauern, muss der Neurotransmitter sofort wieder aus dem Spalt entfernt werden. Dazu dienen neben Enzymen, die Monoamine abbauen, auch die Noradrenalin-Transporter, die Dopamin-Transporter und die Serotonin-Transporter. Daneben gibt es Transporter, die in der Lage sind, das in den Nervenzellen befindliche Katecholamin in intrazelluläre Vesikel zu übertragen. Dies geschieht nicht nur zum Schutz der Katecholamine vor abbauenden Enzymen, sondern auch zum Schutz der Zelle, da die Katecholamine autooxidieren können und dabei reaktive Sauerstoffmetabolite abgeben.

3 verschiedene Transporter für Monoamine sind mittlerweile bekannt: der Dopamin-Transporter (Shimada et al., 1991; Usdin et al., 1991), der Noradrenalin-Transporter (Pacholczyk et al., 1991) und der Serotonin-Transporter (Blakely et al., 1991). Sie alle weisen funktionell und genetisch eine hohe Ähnlichkeit auf, sind aber auch eng mit anderen Transportern des Gehirns verwandt, wie z. B. dem GABA-Transporter (Hoffmann et al., 1991). Gemeinsam ist diesen Transportern ihre Abhängigkeit gegenüber dem Na^+/Cl^--Gradienten und die Aktivierung über die intrazelluläre K^+-Konzentration. Alle Monoamin-Transporter erkennen die Kationische Form des entsprechenden Monoamins, sie unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und teilweise hinsichtlich einiger Antagonisten (Ramamoorthy et al., 1993, Lester et al., 1994).

Der NA-T wurde 1991 erstmals geklont (Pacholczyket al., 1991). Er besitzt 12-13 hydrophobe Bereiche, die als Transmembran Domänen angesehen werden. Das Carboxy- wie auch das Amino-Terminale Ende ragen ins Zytoplasma. Er transportiert Noradrenalin aktiv über einen Na^+/Cl^--abhängigen Cotransport in die Zelle (Trendelenburg, 1991). Der Na-Gradient wird dabei von der Na/K-ATPase aufrechterhalten. Der NA-T ist der unspezifischste unter den Monoamin-Transportern. Er transportiert neben Noradrenalin u.a. auch Dopamin. Die Affinität für Dopamin ist sogar höher als die für Noradrenalin. Außerdem werden durch ihn viele Katecholamin-ähnliche Substanzen in die Zelle aufgenommen, von denen radioaktives [^{123}I]mIBG therapeutische und diagnostische Bedeutung hat. Charakteristisch ist ferner, dass dieser Transporter in seiner Aktivität sehr effektiv durch Mazinidol und Desipramin gehemmt werden kann (Pacholczyk et al., 1991). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den Neuroblastomzellen der NA-T exprimiert wird, nicht aber der Dopamin-Transporter oder der Serotonin-Transporter (Lode et al., 1995).

Der NA-T kommt in vielen Geweben, z. B. dem Herzmuskel, den großen Arterien oder der Nebennierenrinde in den dortigen Zellen des sympathischen Nervensystems vor.

1. 1. 2. 3. Der Dopamin-Transporter

Der Dopamin-Transporter besitzt große Ähnlichkeit mit dem NA-T, sowohl genetisch als auch funktionell. 66% der für den Dopamin-Transporter kodierenden Basenpaare stimmen mit denen des NA-T überein. Beide besitzen 12 Transmemban-Domänen, und eine Reihe von Serin-Aminosäuren in der siebten Transmemban Domäne scheint in beiden Fällen für den Monoamintransport verantwortlich zu sein (Strader et al., 1989; Kitayama et al., 1992, Giros et al., 1993). Auch beim Dopamin-Transporter ist die Funktionsfähigkeit an die Na/K-ATPase geknüpft (Landschulz et al., 1988) und vom Natrium-Chlorid-Gradienten abhängig. Im Gegensatz zum NA-T scheint der Dopamin-Transporter spezifisch für Dopamin zu sein und Analoga wie mIBG nicht aufzunehmen.

1. 1. 3. Vitamin C

1. 1. 3. 1. Historischer Hintergrund

Skorbut als eine Folge des Mangels an Vitamin C in der Nahrung spielte in der Schifffahrt spätestens seit Ende des Mittelalters, als die Seefahrer begannen, immer weitere Reisen zu unternehmen, eine wichtige Rolle. Obwohl der schottische Arzt James Lind bereits 1753 in seiner Arbeit „A Treatise of the Scurvy“ die Krankheit systematisch untersuchte und feststellte, dass sie mit Zitronensaft geheilt werden konnte, dauerte es noch gut anderthalb Jahrhunderte bis der Skorbut seine Bedeutung verlor. Dies hing mit zwei Eigenschaften des Vitamin C zusammen:

Zum einen ist Vitamin C sehr instabil, wenn es über längere Zeit aufbewahrt und nicht richtig gelagert wird. So sank die Skorbutrate auf den Schiffen zwar schlagartig nach Einführung antiskorbutischer Rationen, doch durch geringfügige Veränderungen des Herstellungs- und Lagerungsprozesses, wie der Verwendung von Kupfergefäßen, verloren diese Rationen in den Jahren nach 1875 zunehmend ihre Wirksamkeit, so dass die Ursache des Skorbut 1905 wieder völlig unklar schien.

Zum anderen gelang es niemandem, ein Tiermodell für Skorbut zu etablieren, da alle Säugetiere außer Meerschweinchen, Affen und Menschen das Enzym L-Gulonolactonoxidase besitzen und somit Ascorbat selbst herstellen können. Erst Axel Holst gelang es 1907 ein Tiermodell des Skorbut an Meerschweinchen zu etablieren.

In den Folgejahren wurde immer mehr über Ascorbinsäure bekannt, so entdeckte Szent-Györgyi 1928 eine Substanz, die sich als starkes Reduktionsmittel verhielt und sich 1932 als Vitamin C erwies. Seitdem ist das Wissen um Vitamin C und seine Anwendungsgebiete förmlich explodiert. Bereits 1934 entschuldigte sich L. J. Harris in einem Artikel über Vitamin C, dass er nur in der Lage war, sich auf etwa ein Viertel aller erschienen Artikel zu beziehen (was immer noch 77 waren). Bis Ende der 70er Jahre bereits erschienen etwa 1000 Artikel zum Vitamin C jedes Jahr.

(Kenneth J. Carpenter: „The History of Scuvey and Vitamin C“, 1986)

1. 1. 3. 2. Chemie der Ascorbinsäure

Ascorbinsäure ist das En-Diol-Lacton der L-Gulonsäure. Ihr Säurecharakter ist nicht auf die Carboxylgruppe am C-Atom 1 zurückzuführen, die in Lactonform vorliegt, sondern resultiert aus der Dissoziation des enolischen Wasserstoffes am C-Atom 3 (E. Buddecke, 1994). Dies bedeutet, dass die Hydroxylgruppe am

C-Atom 3 leicht ein H^+-Ion abgeben kann, was zum sauren Charakter der Ascorbinsäure führt. Die Umwandlung von Ascorbat zu Dehydroascorbat unter Abgabe von zwei Elektronen und zwei H^+-Ionen ist die physiologische Aufgabe des Ascorbats und der Grund für seine starke antioxidative Wirkung (siehe Abbildung 1.2.). Ascorbinsäure ist das wichtigste wasserlösliche Antioxidans, sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich.

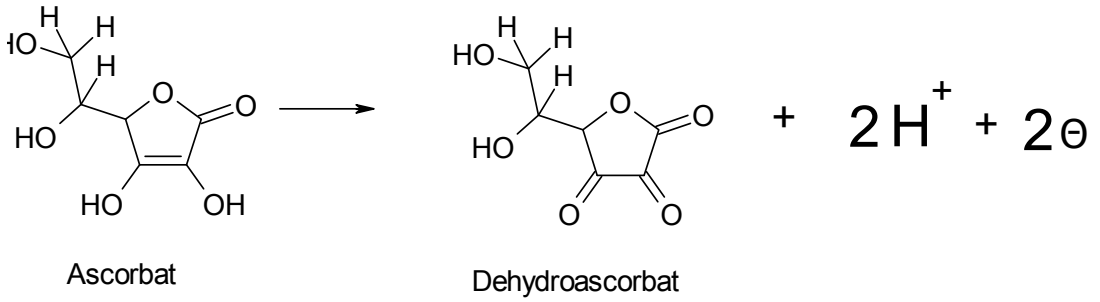


ABBILDUNG 1.2. Umwandlung von Ascorbat in Dehydroascorbat unter Abgabe zweier Wasserstoffatome

Bei der Dopamin-β-Hydroxylase, der 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat-Hydroxylase und der für die α-Amidierung von Peptidylglykanen verantwortlichen Hydroxylase spielt Ascorbat als Elektronendonator eine Rolle, ebenso bei der Kollagen- sowie der Karnitinbiosynthese.

1. 1. 3. 3. Die Rolle des Ascorbat bei oxidativem Stress

In jedem Organismus, der Kontakt mit Sauerstoff hat, entstehen im Zuge des normalen Zellmetabolismus aus Luftsauerstoff reaktive Sauerstoffverbindungen wie Singulettsauerstoff ($^1O_2$), Superoxidradikale ($O_2^{\bullet -}$) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($^{\bullet}OH$). Diese sind in der Lage den zellulären Strukturen wie Zellmembran, DNA und Proteinen erheblichen Schaden zuzufügen. Unter bestimmten Umständen wie z. B. bei Rauchern, beim Genuss von

Alkohol, bei Sepsis oder bei Dialysepatienten kann diese Belastung erheblich zunehmen. Dies hat zu dem Ausdruck oxidativer Stress geführt. Alle Organismen müssen daher über Systeme verfügen, die in der Lage sind, diese reaktiven Sauerstoffverbindungen abzufangen. Hierbei spielt Ascorbat eine sehr wichtige Rolle. Es gilt als das wichtigste Antioxidans nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Pflanzen. Als solches ist es in der Lage, die Entstehung von Sauerstoffradikalen zu verhindern (Gosh et al., 1996) und außerdem wichtige andere Antioxidantien wie Folsäure oder Vitamin E (Tocopherol), die ebenfalls als Radikalfänger gelten, zu schützen.

1. 1. 4. 6-Hydroxydopamin

1. 1. 4. 1. Chemie

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein Analogon des Dopamins, das an Position 6 seines Sechs-Rings statt des Wasserstoffs eine Hydroxylgruppe hat (siehe Abbildung 1.3.). Aufgrund seiner Analogie zum Dopamin nimmt man an, dass 6-Hydroxydopamin selektiv mit Hilfe des NA-T in die Zellen aufgenommen wird. Dies ist außer bei Neuroblastomzellen bei Nervenzellen des sympathischen Nervensystems der Fall.

Während 6-Hydroxydopamin in wässriger Lösung zusammen mit Ascorbat bei einem pH-Wert von 2-3 sehr stabil ist, ist es bei einem physiologischen pH-Wert von ca. 7,3 sehr instabil. Wie in Abbildung 1.3. dargestellt, zerfällt es rasch in sein entsprechendes para-Chinon und gibt dabei ein Superoxidradikal ($O^{2\bullet -}$) ab, das zu H_2O_2 weiterreagiert. Chinone sind vom Benzol abgeleitete Verbindungen, die zwei Carbonylgruppen aufweisen. Liegen sich die Carbonylgruppen wie hier gegenüber spricht man von einem para-Chinon. Hierbei sind die entstehenden Substanzen, das Superoxidradikal, das daraus entstehende H_2O_2 sowie

das Chinon giftig und führen in entsprechender Konzentration zum Absterben der Zelle.

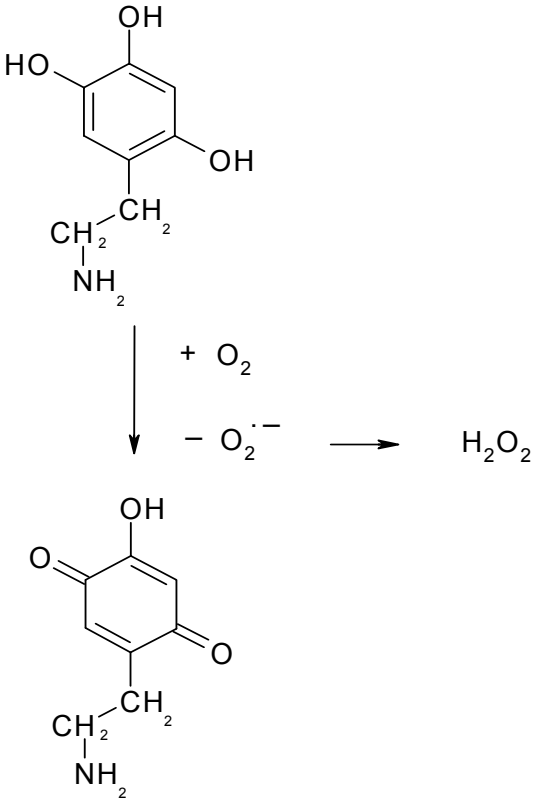


ABBILDUNG 1.3. Reaktion von 6-Hydroxydopamin in sein Chinon unter Abgabe reaktiver Sauerstoffverbindungen

Sowohl das entstehende Superoxidradikal als auch H_2O_2 sind als reaktive Sauerstoffverbindungen in hohem Maße schädlich für jede Zelle, indem sie die Zelle direkt abtöten oder ihre Apoptose einleiten.

Es ist in der Literatur beschrieben, dass bei dieser Reaktion die Zugabe von Ascorbat bewirkt, dass mehr toxische Metabolite gebildet werden (Heikkila & Cohen, 1975, Bruchelt et al., 1991). Dies wurde so interpretiert, dass Ascorbat in der Lage ist, das 6-OHDA-para-Chinon wieder zu 6-OHDA zu reduzieren und es

somit erneut zur Bildung von Superoxidradikalen zur Verfügung zu stellen. Das Ascorbat selbst wird dabei zum Dehydroascorbat oxidiert. Dieser Effekt wurde als Redox-Cycling bezeichnet.

1. 1. 4. 2. Wirkung von 6-Hydroxydopamin auf Zellen in vivo und in vitro

Die Bedeutung der Apoptose

Apoptose wird in der Literatur häufig synonym zu dem Begriff „programmierter Zelltod“ (programmed cell-death, PCD) verwendet (Minn et al., 1998) und bezeichnet den Vorgang, bei dem die Zelle mit Hilfe zahlreicher unterschiedlicher Signaltransduktionswege ihren eigenen Zelltod einleiten kann. Dieser Vorgang spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese (z. B. bei der Entwicklung der Finger, wobei das Gewebe zwischen den Fingern Apoptose begeht), in der Immunologie (zur Entwicklung von Toleranz und zur Begrenzung immunologischer Prozesse) oder zur Erhaltung der Homöostase von Geweben (z. B. Leber, Niere und Haut). Auch in der Onkologie gewinnt die Apoptose zunehmend an Bedeutung, da der Verlust der Apoptosefähigkeit in der Ätiologie mancher Tumoren (Mamma-, Prostata-, Ovarialkarzinom) eine große Rolle spielt (Tomson et al., 1995). Die Zellen werden dabei in ihrem Wachstum nicht mehr ausreichend gehemmt und das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Absterben der Zellen ist gestört und führt zu überschießendem Wachstum. Man weiß inzwischen außerdem, dass die Wirksamkeit vieler Pharmaka zur Krebsbekämpfung zu einem großen Teil vielmehr auf die Einleitung von Apoptose als auf herkömmlichen Zelltod, den man auch als Nekrose oder pathologischen Zelltod bezeichnet, zurückzuführen ist (Hickman, -J, -A, 1992).

Für die Auswirkung des 6-OHDA ist die Beziehung zwischen reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Apoptose entscheidend. Einerseits können Sauerstoffmetabolite und oxidativer Stress Apoptose auslösen (Buttke & Sandstrom, 1994), andererseits wirken sie in gesunden Zellen auch als Signalmoleküle (Kane et al., 1993; Greenlund et al., 1995) und bewirken eine Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentration (Kane et al., 1993; Ferrari et al., 1995) sowie eine erhöhte Expression der Enzyme Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) (Hockenberry et al., 1993), Superoxid-Dismutase (Kane et al., 1993; Greenlund et al., 1995)

und Catalase (Sandstom & Buttke, 1993). Diese Enzyme senken nicht nur die Konzentration der Sauerstoffradikale, sondern hemmen auch die Apoptose.

Anwendungsbereiche des 6-Hydroxydopamins

6-OHDA wurde zuerst eingesetzt zur chemischen Symphathektomie bei Versuchstieren. Bei Nagetieren kurz nach der Geburt führt es zu einer dauerhaften (Angeletti et al., 1970[1]), bei älteren Nagetieren zu einer kurz anhaltenden Denervierung der sympathischen Ganglien (Angeletti et al., 1970[2]). Der Unterschied liegt hierbei darin, dass 6-Hydroxydopamin bei erwachsenen Tieren lediglich die Nervenenden der sympathischen Neuroblasten schädigt (Thoenen et al., 1968; Tranzer et al., 1968), während es bei neugeborenen Tieren die gesamte Zelle zerstört (Levi-Montalcini et al., 1970). Diese Wirkung kann durch Gabe von Desipramin, einem Antagonisten des Noradrenalin-Transporters, aufgehoben werden, was vermuten lässt, dass die selektive Aufnahme des 6-Hydroxydopamins und nicht unspezifischen toxischen Effekte für diese Wirkung verantwortlich sind. Nichtsdestotrotz hat die Anwendung von 6-Hydroxydopamin in der Behandlung des Neuroblastoms die Erwartungen nicht erfüllt.

1. 1. 4. 3. Probleme bei der Anwendung des 6-Hydroxydopamins zur Reinigung von angereicherten Stammzellen

Nur kurz nach der Erkenntnis, dass 6-Hydoxydopamin im Tierversuch sympathische Neuroblasten abtötet, begannen die ersten Versuche, diese Substanz auch bei der Behandlung des Neuroblastoms einzusetzen und zwar ex vivo, zur Zerstörung von -das Knochenmark kontaminierenden- Neuroblastomzellen. Zunächst erwies sich die Verbindung in der Behandlung des Neuroblastoms bei Mäusen als erfolgreich, da das Wachstum des Tumors damit signifikant (Angeletti et al., 1970[3]) und dosisabhängig gesenkt werden konnte und sich histologisch bei den behandelten Mäusen im Vergleich mit der Kontrollgruppe ausgedehntere nekrotische Areale im Tumorgewebe fanden (Angeletti et al.,

1970). Beim Versuch 6-Hydroxydopamin zur Reinigung angereicherter Stammzellen zu verwenden erwies sich, dass Neuroblastomzellkulturen, die den Noradrenalin-Transporter exprimierten, zwar durchaus in ihrem Wachstum gehemmt wurden, diese Wirkung aber nicht nur Neuroblastomzellen betraf, sondern auch Zelllinien, von denen man nicht erwartete, dass sie einen Transporter für Dopamin oder Noradrenalin besaßen, wie Melanomzellen, Osteosarkomzellen und Fibroblasten (Bruchelt et al., 1985). Ebenso war eine Zelllinie von Neuroblastomzellen (SK-N-LO) betroffen, von der bekannt ist, dass sie keinen Noradrenalin-Transporter besitzt. Es stellte sich also die Frage, ob 6-OHDA überhaupt lange genug stabil bleibt, um selektiv vom Noradrenalin-Transporter in die Zielzelle aufgenommen zu werden oder ob die Autooxidation so schnell abläuft, dass die überwiegende Mehrheit der reaktiven Sauerstoffverbindungen bereits im interzellulären Medium frei wird. In diesem Fall wäre die Wirkung lediglich eine unspezifische Reaktion auf den ausgelösten oxidativen Stress, wie er bei herkömmlichen Chemotherapeutika zur Anwendung kommt.

Trotz dieser unklaren Ergebnisse wurde Ende der 80er Jahre mit einer Studie begonnen, bei der ausschließlich Patienten mit Rezidiv oder Patienten mit sehr schlechter Prognose ausgewählt wurden. Sie wurden mit einer hochdosierten Melphalan-Therapie behandelt, die mit 240mg/m^2 über der maximal tolerierten Dosis von 210mg/m^2 (Lazarus et al., 1983) lag, so dass die Patienten anschließend autologes Knochenmark zurücktransplantiert bekommen mussten. Dieses Knochenmark wurde vorher mit 20μg/ml 6-OHDA behandelt, dem noch 200μg/ml Ascorbat hinzugegeben wurde. Es wurde eine Stunde inkubiert und das Knochenmark dann „gewaschen“ um die Wirkstoffe danach wieder zu entfernen. Das „Waschen“ der Zellen erfolgte dabei auf die gleiche Weise, wie in dieser Arbeit: Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Medium wieder aufgefüllt. Die Ergebnisse der Studie waren jedoch ernüchternd. So starben von 28 Patienten 27 innerhalb der nächsten 6,5 Jahre und nur bei

einem wurde eine dauerhafte Remission erzielt. Bei sechs der 16 Patienten, die eine komplette Remission erreichten, fanden sich bei der Autopsie die Rezidive nicht am Ursprungsort des Tumors, sondern im Blut, Knochenmark, Lunge oder Leber. Dies lies darauf schließen, dass die Reinigung des Knochenmarks nicht effektiv genug war und somit dazu beigetragen hat, dass das Ergebnis im Vergleich zu ähnlichen Studien schlechter war (Kushner et al., 1991). Dies war der Anlass, die toxische Wirkung des 6-OHDA auf Neuroblastomzellen näher zu untersuchen. Dabei stellte man fest, dass 6-OHDA, obwohl es auf reine Neuroblastomzellkulturen stark wachstumshemmend wirkte, in einem Gemisch von Stammzellen und Knochenmark nicht selektiv die Tumorzellen abtötete. Dies ist vielleicht auf die im Außenmedium gebildeten reaktiven Sauerstoffverbindungen, insbesondere H_2O_2, zurückzuführen, die die Zellen unspezifisch abtöten.

1. 1. 5. 6-Fluordopamin

1. 1. 5. 1. Chemie und Umwandlung in 6-Hydoxydopamin

6-Fluordopamin (6-FDA) wurde erstmals von Kirk et al. 1979 beschrieben. Es besitzt die gleiche Struktur wie 6-Hydroxydopamin, lediglich die Hydroxy-Gruppe am sechsten C-Atom ist durch ein Fluor ersetzt. In wässrige Lösung gebracht oxidiert 6-Fluordopamin in sein entsprechendes Semichinon und in einem weiteren Oxidationsschritt in sein Ortho-Chinon. Dort kann nun das Fluor als F^- durch ein OH^- substituiert werden. Wird das Chinon nun wieder reduziert entsteht 6-Hydroxydopamin (siehe Abbildung 1.4.) (Seitz et al., 2000).

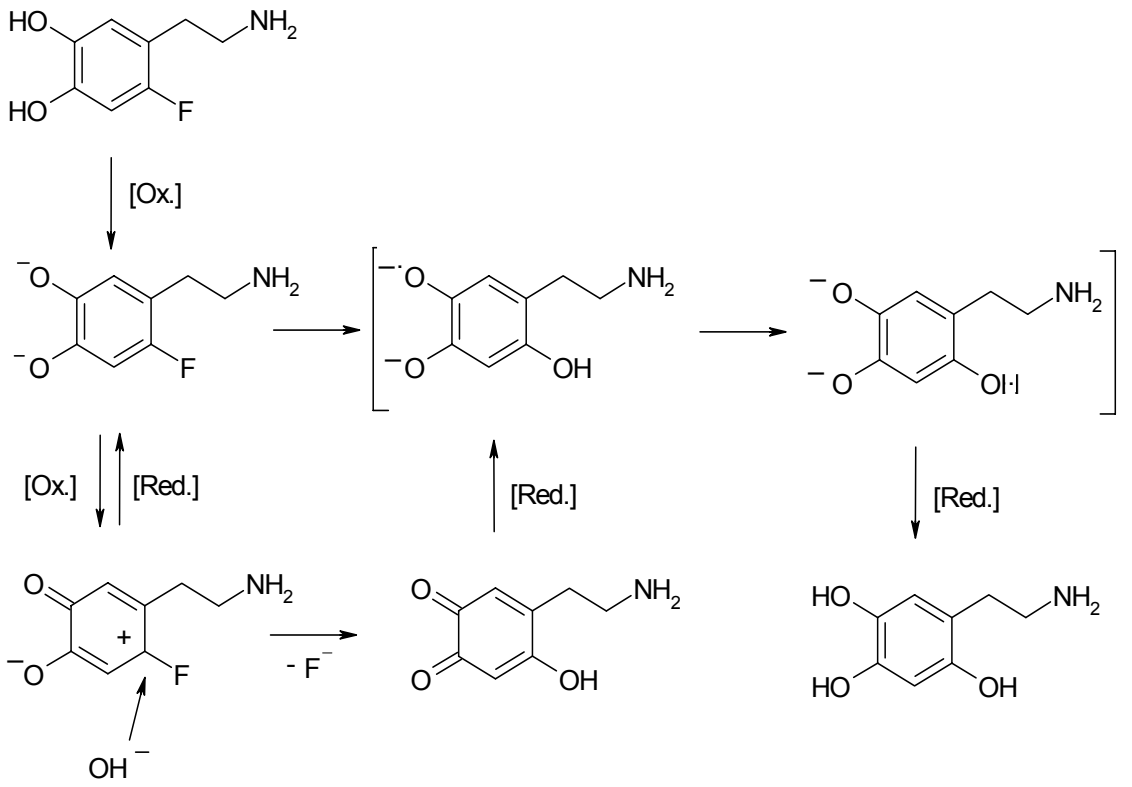


ABBILDUNG 1.4. Umwandlung von 6-Fluordopamin in 6-Hydroxydopamin (Seitz et al., 2000)

1. 1. 5. 2. Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert

Diese Reaktion läuft unter alkalischen Bedingungen rasch ab, während 6-Fluordopamin in saurem Milieu sehr stabil ist. Mit Hilfe von EPR-Spektren konnte jedoch nachgewiesen werden, dass 6-FDA, wenn es in eine Lösung mit einem pH-Wert im physíologischen Bereich gegeben wird, erst nach ungefähr 45 Minuten ein sekundäres Radikal abgibt und nach 150 Minuten das gleich EPR-Spektrum wie 6-Hydroxydopamin hat (Seitz et al., 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Verbrauch an O_2, der bei der Reaktion messbar ist, beim 6-OHDA innerhalb der ersten Minuten fast quantitativ abläuft, während er beim 6-FDA nach 30 Minuten immer noch ansteigt, als Zeichen dafür, dass noch

nicht alle 6-FDA-Moleküle die Reaktion durchlaufen haben. Auch der Anstieg der H_2O_2-Konzentration in den ersten 60 Minuten nach Beginn der Reaktion ist beim 6-FDA flacher als beim 6-OHDA, was belegt, dass die Reaktion langsamer abläuft (Seitz et al., 2000).

1. 1. 5. 3. Aufnahme von 6-Fluordopamin in die Zellen

Vorraussetzung für die selektive Wirkung ist jedoch neben der längeren Stabilität auch die Aufnahme in die Zelle durch den Noradrenalin-Transporter. Diese wurde in der gleichen Arbeit gemessen, indem die Aufnahme von radioaktivem [^{123}I]-mIBG von Neuroblastomzellen nach einstündiger Inkubation gemessen wurde. Wenn Substanzen wie Dopamin, 6-FDA und 6-OHDA mit mIBG um den gleichen Transporter konkurrieren, sollten sie in der Lage sein, die mIBG-Aufnahme kompetitiv zu hemmen. Dies war für Dopamin und 6-FDA auch der Fall, die die mIBG-Aufnahme deutlich reduzierten. 6-OHDA verringerte die mIBG-Aufnahme in die Zellen jedoch deutlich geringer, was wiederum darauf hindeutet, dass 6-OHDA zu schnell autooxidiert, um am NA-T die mIBG-Aufnahme kompetitiv hemmen zu können (Seitz, 2000).

1. 2. Zielsetzung und Planung der Arbeit

Der Katecholaminstoffwechsel ist nicht nur ein wichtiges Kriterium bei der Klassifikation und Diagnose des Neuroblastoms, er bietet theoretisch auch die Möglichkeit -im Gegensatz zur herkömmlichen Chemotherapie- Neuroblastomzellen mit geeigneten zytotoxischen Analoga selektiv abzutöten. Dies gilt ganz besonders im Hinblick auf die selektive Aufnahme dieser Substanzen über den Noradrenalin-Transporter (NA-T), den die meisten Neuroblastomzelllinien ausbilden, der in den meisten anderen Geweben jedoch nicht exprimiert wird. Es existieren

zum Teil bereits etablierte Methoden, die sich diese Eigenschaften zu nutze machen, wie die Therapie mit [^{131}I]-mIBG. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) war allerdings nicht in der Lage, angereicherte Stammzellen ex vivo von Tumorzellen zu reinigen, d. h. die Tumorzellen abzutöten, die Stammzellen jedoch zu verschonen.

Mit dem 6-Fluordopamin (6-FDA) existiert nun jedoch eine Substanz, die lange genug stabil bleibt, um selektiv vom NA-T aufgenommen zu werden. Als weiterer Vorteil könnte sich erweisen, dass sich die Stabilität des gelösten 6-Fluordopamins durch die Zugabe von Ascorbat erhöhen lässt. Auf diese Weise lässt sich theoretisch die Dauer der Inkubationszeit optimieren, ohne dass die unspezifische Toxizität aufgrund des vorzeitigen Zerfalls in 6-OHDA und die Abgabe von reaktiven Sauerstoffverbindungen überwiegt.

Ziele dieser Arbeit waren also:

1. Zu bestätigen, dass 6-FDA im Gegensatz zu 6-OHDA selektiv toxisch ist, d.h., dass es Neuroblastomzelllinien, die den Noradrenalin-Transporter exprimieren, stärker in ihrem Wachstum hemmt oder abtötet als Zelllinien, die den Noradrenalin-Transporter nicht exprimieren.
2. Die Einwirkdauer des 6-FDA so zu optimieren, dass die Selektivität am größten ist.
3. Die Hypothese zu belegen, dass Ascorbat den Umwandlungsprozess des 6-FDA in 6-OHDA verlangsamt und dadurch die Zellen, die keinen NA-T exprimieren, vor im Außenmedium gebildeten reaktiven Sauerstoffverbindungen (durch Verzögerung der Umwandlung 6-FDA in 6-OHDA) besser schützen kann.
4. Die Ascorbatkonzentration so zu wählen, dass die toxische Wirkung für die Zellen mit NA-T hoch bleibt, die Zelllinien ohne NA-T jedoch optimal geschützt sind.

5. Zu überprüfen, ob sich dieses Ergebnis prinzipiell auch auf die Stammzellen anwenden lässt, d. h. zu überprüfen ob bei den ermittelten optimalen Bedingungen die Stammzellen in ihrem Wachstum nicht zu stark beeinträchtigt werden.

2. Material und Methoden

2. 1. Materialien

2. 1. 1. Chemikalien, Geräte und Medien

2. 1. 1. 1. Chemikalien

Substanz	Firma
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-Bromid (MTT)	Sigma
6-Fluordopamin	Eigensynthese, erhalten von Prof. Stegmann, Institut für organische Chemie der Universität Tübingen
6-Hydroxydopamin	Sigma
Ascorbat	Sigma
Ampuwa	Fresenius Kabi
Fetales Kalbserum (FCS)	Seromed
Isopropanol	Merck
L-Glutamin	Seromed
Penicillin	Seromed
Phophate Buffered Salt Solution (PBS)	GibcoBRL
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium	Seromed
Salzsäure (1M)	Merck
Streptomycin	Seromed
Triton-X	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin-Versen	Seromed

2. 1. 1. 2. Plastikartikel und Geräte

Plastikartikel

Artikel	**Firma**
Zellkulturflaschen	Coster
162 cm^2	
75 cm^2	
96 Loch-Platten mit flachem Boden	Corning
Zenrifugationsröhrchen	Greiner
Sicherheitsverschluß Eppendorf-Hütchen (1,5ml)	Eppendorf
Einfriergefäße	Falcon
Plastikpipetten	Coster
Steripette 2,5ml	
Steripette 5ml	
Steripette 10ml	
Steripette 25ml	
Pipettenspitzen	Eppendorf
10-100µl	
100-1000µl	
Combitips, sterile	Eppendorf
0,5ml(10µl Portion)	
5ml(100µl Portion)	
Cuvette (10*4*45)	Sarstedt
Minisart NML Filter	Sartorius
0,2µm Porengröße	
0,5µm Porengröße	
Spritzen	B. Braun
5ml	
20ml	
Spritzennadeln	Microlance

Geräte

Geräte	**Firma**
Elsa Microplate Reader (MR700)	Dynatech
Microwaage	Sartorius

Zentrifuge	Hettich
Sterilwerkbank	Waldner
Ultrospec Plus Photometer	Biochrom ULK
Inkubator für Zellkulturen	Hereaus
Optima TMTLUltracentrifuge	Beckmann
Phasenkontrast-Mikroskop	Olympus
Wasserbad	Köttermann
Schüttler	Heidolph
Sonifier Cell Disruptor	Branson
Advia 120	Bayer

2. 1. 1. 3. Anderes

Material	**Firma**
Neubauer-Zählkammer	Blau Brand
Latex-Handschuhe	Safe-Skin
Pasteur-Pipetten	Hirschmann
Comforpette, 50ml	Eppendorf
Dispenser-Multipette	Eppendorf
Varipette, 100-1000ml, 10-100ml	Eppendorf

2. 1. 2. Kulturmedien

2. 1. 2. 1. Kulturmedien für die Neuroblastomzellen

Substanz	**Konzentration**
RPMI 1640	
Fötales Kälberserum (FCS)	10%
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 lU/ml
Streptomycin	100 lU/ml

2. 1. 2. 2. Kulturmedium für adulte Knochenmarkstammzellen

Substanz	**Hersteller**
Methokult	Cellsystems

2. 1. 2. 3. Einfriermedium

Substanz	Konzentration
Fötales Kälberserum	90%
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10%

2. 1. 3. Zelllinien

2. 1. 3. 1. Neuroblastomzelllinien

SK-N-SH

Diese Zelllinie synthetisiert Katecholamine bis zum Noradrenalin. Sie exprimiert den Noradrenalin-Transporter (NA-T), hat aber sonst keinen Transporter für Monoamine (weder den Dopamin- noch den Serotonin-Transporter). Die Zellen wachsen adhärent. Etabliert wurde diese Zelllinie von Biedler et al, 1972. Sie ist über die American Type Culture Collection erhältlich.

Arbeiten an dieser Zelllinie haben gezeigt, dass die Synthese von Noradrenalin durch die Gabe von Vitamin C gesteigert wird, da die Expression der Tyrosinhydroxylase steigt, was zu einer gesteigerten Synthese von Dopa führt (Goodman et al., 1982; Lewis & Chikarashi, 1987). Diese Zelllinie dient daher auch als Modell in der Erforschung des Morbus Parkinson und die Gabe von Vitamin C wurde bereits als ergänzende Therapie dieser Krankheit vorgeschlagen (Fahn, 1992). Eine erhöhte Katecholaminproduktion führt bei den SK-N-SH-Zellen aufgrund eines Mangels an Katecholamin-Speichervesikeln (Smets et al., 1989) sehr wahrscheinlich durch den Abbau von Katecholaminen zu einer gesteigerten H_2O_2-Produktion. Dies kann die Ursache dafür sein, dass gerade die SK-N-SH-Zelllinie besonders empfindlich auf die Gabe von hohen Konzentrationen an Ascorbat reagiert.

SK-N-LO

Diese humane Zelllinie ist neuroektodermalen Ursprungs. Sie ist nicht in der Lage Katecholamine zu synthetisieren, der Syntheseweg verläuft nur bis zum L-Dopa (Biedler et al., 1978).

In diesen Zellen konnte das Enzym Catalase, das eine wichtige Aufgabe beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress hat, nicht nachgewiesen werden (Seitz, 2000). Ebenso wurden nur geringe Mengen an Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) nachgewiesen. Da auch dieses Enzym für den Schutz vor H_2O_2 zuständig ist (Andreoli et al., 1986; Michiels et al., 1994), erklärt sich daraus die hohe Empfindlichkeit der SK-N-LO-Zellen gegenüber reaktiven Sauerstoffmetaboliten.

Diese Zelllinie exprimiert den NA-T nicht und hat auch sonst keinen Transporter für Katecholamine. Ihr Wachstum ist ebenfalls adhärent. Sie wurde etabliert von Helson et al., 1982.

2. 1. 3. 2. Adulte hämatopoetische Stammzellen

Diese Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Peter Lang und Herrn Dr. Michael Schumm zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsschritte zur Zellisolierung wurden im Stammzelllabor der Kinderklinik Tübingen unter der Leitung von Dr. Lang und Dr. Schumm im Rahmen von allogenen Stammzelltransplantationen durchgeführt. Die überschüssigen Zellen, die nicht für die Transplantation benötigt wurden, wurden dankenswerterweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um eingefrorene Zellpellets, die nicht mehr für therapeutische Zwecke verwendet werden konnten. Die Zellpellets wurden ohne Angabe von Patientennamen oder anderer patientenbezogener Daten erhalten. Nach Ablauf des Versuchs (nach Ausreifung und Koloniebildung) wurden die Ansätze vollständig vernichtet.

Hier soll eine kurze grundsätzliche Beschreibung des Vorgangs der Isolation hämatopoetischer Stammzellen gegeben werden: Peripheres, venöses Blut wird entnommen und daraus werden mononukleäre Zellen angereichert. Um die Anzahl der mononukleären Zellen im Blut zu erhöhen, kann dem Spender ein klassisches Chemotherapeuticum wie Cyclophosphamid oder auch ein die Hämatopoese stimulierender Faktor wie Filgrastim (G-CSF, Handelsname Neupogen®) gegeben werden (Sheridan et al., 1992). Dieser Faktor, der die Produk-

tion von weißen Blutzellen stimuliert, sorgt auch für eine erhöhte Ausschwemmung unreifer mononukleärer Zellen aus dem blutbildenden Knochenmark (Bensinger et al., 1993). Mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD34 oder AC133, der überwiegend an ausgeschwemmten, unreifen hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist, werden diese weiter mit Hilfe der immunomagnetischen Zellsortierung oder Magneted Cell Sorting (MACS) angereichert. Dabei wird mit einem Antikörper gearbeitet, der zuvor mit einem submikroskopischen magnetischen Partikel (Durchmesser 60nm) konjugiert wurde. Dieser Antikörper ist in der Lage spezifisch an das Oberflächenantigen CD34 oder entsprechend AC133 zu binden. Wird dieser Antikörper einige Zeit zusammen mit den mononukleären Zellen inkubiert, so bindet er an die Zellen, die das entsprechende Oberflächenantigen besitzen. Werden die Zellen nun durch eine mit Stahlwolle gepackte Säule geschickt, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, werden die markierten Zellen in der Säule festgehalten und können auf diese Weise von den übrigen mononukleären Zellen getrennt werden. Nach der Entfernung des Magnetfeldes können nun die markierten Zellen leicht ausgespült werden.

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Herstellung der Lösungen

2. 2. 1. 1. Herstellung der Ascorbatlösung

Ascorbinsäure ist in gelöster Form instabil und lichtempfindlich (Goth et al., 1948). Deshalb wurde die Lösung immer unmittelbar vor ihrer Verwendung angesetzt und lichtgeschützt in Alufolie gewickelt aufbewahrt. Dazu wurde das Natriumsalz der Ascorbinsäure in sterilem Wasser (Ampuwa) so gelöst, dass bei den Versuchen mit Neuroblastomzellen das ca. 20fache der erwünschten Endkonzentration entstand (Zugabe von 10 µl zu 200 µl Zellsuspension). Bei

den Knochenmarkstammzellen wurde das 50fache der Endkonzentration verwendet (Zugabe von 10 µl in 500 µl Zellsuspension). Die Lösung wurde anschließend mit einer 0,2µm Minisart NML Filter Membran sterilfiltriert. Bei Bedarf wurde, falls mehrere Konzentrationen in einem Versuch gebraucht wurden, aus der Stammlösung entsprechend mit Ampuwa eine Verdünnungsreihe hergestellt.

2. 2. 1. 2. Herstellung der 6-Fluordopamin- und 6-Hydroxydopamin-Lösung

Die abgewogene Menge des 6-Fluordopamins wurde in 0,01M Salzsäure gelöst. Dabei waren die verwendeten Lösungen wiederum um das 20- (in den Versuchen mit den Neuroblastomkulturen) bzw. das 50fache (in den Versuchen mit den Knochenmarkstammzellen) höher konzentriert als in der Endkonzentration, da anschließend 10 µl in 200 bzw. 500 µl gegeben wurden. Das Eppendorf-Hütchen mit dem 6-Fluordopamin wurde stets mit Alufolie umwickelt, um Lichteinfluss zu verhindern. Auch diese Lösung wurde mit einer 0,2µm Minisart NML Filter Membran sterilfiltriert und möglichst sofort verwendet.

Mit der 6-Hydroxydopamin-Lösung wurde ebenso verfahren.

2. 2. 2. Kultivierung der Neuroblastomzelllinien

2. 2. 2. 1. Anzüchten der Neuroblastomzellen

Beide verwendete Zelllinien (SK-N-SH und SK-N-LO) wachsen adhärent, sie wurden in 162 und 75cm^2 Kulturflaschen mit 35ml (bei 162cm^2 Kulturflaschen) bzw. 25ml Kulturmedium (bei 75cm^2 Kulturflaschen) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer Atmosphäre von 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2. Der Deckel der Kulturflaschen wurde dabei nicht ganz verschlossen, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die Zellkulturen mussten dabei täglich auf ihr

Wachstum und auf Verunreinigungen durch Mikroorganismen kontrolliert werden. Bei Bedarf wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, wenn der im RPMI-Medium enthaltene pH-Indikator Phenolrot von rot nach orange umschlug (Mosmann et al., 1983). Dabei gilt für Phenolrot zwischen Farbe und pH-Wert ungefähr folgende Beziehung:

TABELLE 2.1. pH Farbumschlag des Phenolrot

Violett	pH 7,8
Blaurot	pH 7,6
Rot	pH 7, 4
Orange	pH 7,0
Gelb	pH 6,5

2. 2. 2. 2. Passagieren der Neuroblastomzellen

Die Passage der adhärent wachsenden Neuroblastomzellen erfolgte unter streng sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank nach folgender Vorgehensweise:

1. Absaugen des verbrauchten Zellkulturmediums mit sterilen Pasteurpipetten. Dabei wurde die Flasche so gehalten, dass keine Neuroblastomzellen mit abgelöst wurden.
2. Zugabe von 2,5ml Trypsin-Lösung, die sich am mit Zellen bewachsenen Flaschenboden verteilte und einige Sekunden einwirken sollte.
3. Nach ausreichender Einwirkzeit von ca. 1 min konnten die Zellen mechanisch (durch Schwenken oder leichtes Schütteln) vom Flaschenboden abgelöst werden. Das vollständige Ablösen konnte mikroskopisch oder bei sehr dichtem Zellrasen auch makroskopisch kontrolliert werden.
4. Durch Zugabe von 10 ml Nährmedium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt, da im Nährmedium auch Antitrypsin enthalten ist.

5. Die Zellsuspension wurde nun in einem 15ml Zentrifugationsröhrchen für 6 Minuten bei 400g zentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, um das Trypsin zu entfernen.
6. Die Zellen wurden nun mit etwas Nährmedium verdünnt und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt, wobei vor allem bei Zellen der SK-N-SH-Linie darauf geachtet werden musste, dass die Zellen einer voll bewachsenen Zellkulturflasche auf nicht mehr als 3 Zellkulturflaschen verteilt wurden. Wurde dies nicht beachtet, dann wuchsen die Zellen der nächsten Generation langsamer.

2. 2. 2. 3. Einfrieren und Auftauen der Neuroblastomzellen

Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2. 2. 2. 2. beschrieben, geerntet. Im letzten Schritt wurden die Zellen nicht mit 10ml Nährmedium, sondern mit 2ml Einfriermedium suspendiert und in ein steriles Einfriergefäß gegeben. Dieses wurde gut mit Papiertüchern umwickelt, einige Tage bei -60°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff für längere Zeit gelagert.

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und dann sofort mit 10ml Zellkulturmedium (RPMI+FCS+Penicillin+Streptomycin+Glutamin) verdünnt, da das Einfriermedium für die Zellen toxisches DMSO enthält. Danach wurden die Zellen 6 Minuten bei 400g zentrifugiert, der Überstand wieder abgesaugt und die Zellen in etwas Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst in kleinen 75cm^2 Kulturflaschen einige Tage angezüchtet und frühestens nach zwei weiteren Passagen für Versuche verwendet, da erst dann das Wachstumsverhalten wieder normal war.

2. 2. 3. Vorbereitung und Durchführung des MTT-Tests mit den Neuroblastomzelllinien

2. 2. 3. 1. Gewinnung der Zellsuspension

Zunächst wurden die Zellen wie für die Passage in Kapitel 2. 2. 2. 2. beschrieben mit Trypsin abgelöst, mit Nährmedium verdünnt, zentrifugiert, das Trypsin entfernt und mit etwa 25 ml Nährmedium wieder resuspendiert, da für die Aussaat in 96-Well-Platten ca. 20 ml (96 * 200 µl) benötigt wurden.

2. 2. 3. 2. Bestimmung der Zellzahl bei den Neuroblastomzellen

Hierzu wurde die Zellsuspension gut resuspendiert und dann 0,1ml entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,45%) gut gemischt. Die Mischung wurde auf die mit Deckblatt versehene Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Nun wurden die 4 Großquadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt, wobei die kräftig blau gefärbten Zellen nicht berücksichtigt wurden, da Trypanblau tote Zellen stark blau anfärbt. In jedem der ausgezählten Quadrate befand sich ein Volumen von 0,1µl. Die Anzahl der Zellen in den 4 Quadraten wurde somit addiert, durch 4 geteilt und mit 10 000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Um die Verdünnung mit Trypanblau zu berücksichtigen, wurde schließlich noch mit 2 multipliziert. Um nun eine Zellkonzentration von 20 000 Zellen pro Well (für die SK-N-SH-Linie) bzw. 10 000 Zellen pro Well (SK-N-LO-Linie) in 200 µl zu erhalten, musste die Suspension so verdünnt werden, dass 100 000 (SK-N-SH) bzw. 50 000 (SK-N-LO) Zellen pro ml enthalten waren. In einigen Versuchen mit geringerer Zellzahl war die Verdünnung entsprechend höher.

2. 2. 3. 3. Aussäen der Neuroblastomzellen in 96 Well-Platten

Die verdünnte Zellsuspension wurde nun gut durchmischt und mit der Dispenser Multipette und den sterilen Combitips (5ml, 100µl Portion) auf die ebenfalls sterilen 96-Loch-Platten aufgetragen, wobei die Multipette so eingestellt war, dass in jedes Well 200µl kamen. Die Zellsuspension wurde dabei bei jedem Nachfüllen der Pipette erneut durchmischt um ein Absinken der Zellen zu verhindern. Die ersten beiden Wells der Platte blieben frei und wurden zum Schluss mit 200µl Nährmedium ohne Zellen aufgefüllt. Vor Zugabe der Substanzen mussten die Zellen nun zunächst 24 Stunden im Inkubator stehen, um anwachsen zu können.

2. 2. 3. 4. Inkubation der Neuroblastomzellen mit den Substanzen

Zugeben der Substanzen

Nach der 24stündigen Inkubationszeit nach Aussaat der Zellen wurde nochmals mikroskopisch kontrolliert, ob alle Zellen bereits am Boden der 96-Loch-Platte angewachsen waren. War dies der Fall, so wurde die jeweilige gelöste Substanz mit der Dispenser Multipette und den sterilen Combitips (0,5ml, 10µl Portion) in die dafür vorgesehenen Wells der 96-Loch-Platte gegeben. Es wurde dabei in jedes Well 10µl der erstellten Lösung gegeben, wobei in jedem Well bereits 200µl enthalten waren. Da die Lösung 20fach konzentrierter war, entstand somit näherungsweise die erwünschte Konzentration. Ascorbat wurde stets als erstes zugesetzt, da sein Einfluss auf die Zellen geringer ist. Danach erst wurde die 6-Fluor- bzw. 6-Hydroxydopamin-Lösung hergestellt und hinzugefügt, denn sie ist, wie oben erläutert, in gelöster Form bei neutralem pH-Wert sehr instabil. Die Platten wurden für die Dauer der Inkubationszeit zurück in den Brutschrank gestellt.

Bei den Versuchen wurden die äußersten Reihen der 96-Loch-Platten (Reihe A und H, Reihe 1 und 12) nicht genutzt, da sich bereits in den ersten Versuchen gezeigt hatte, dass die Werte in diesen Reihen stärker als die anderen Werte von den Mittelwerten der Versuchsreihe abwichen. Den Reihen B und C wurden dabei keine Substanzen zugegeben, so dass sich eine große Zahl von Kontrollwerten (in der Regel 20) ergab, mit denen die Versuchsgruppen verglichen werden konnten. In der späteren Auswertung wurden sie stets als 100% festgelegt.

Entfernen der Substanzen

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit (in den meisten Versuchen 1 Stunde) wurden die zugegebenen Substanzen einfach mit einer dünnen Spritzennadel, die an einen Absaugschlauch angeschlossen war, entfernt und die Wells mit einer Multipette und sterilen Combitips (5ml, 100µl Portion) wieder mit 200µl Nährmedium gefüllt. Dies war möglich, da die Neuroblastomzellen ja bereits fest auf dem Boden der Platte angewachsen waren. Fehler konnten dabei dadurch entstehen, dass man beim Absaugen mit der Nadel einige Zellen ablöste, zumal man gleichzeitig die zugegebenen Substanzen möglichst vollständig entfernen musste, aufgrund des starken Einflusses des 6-Fluordopamins auf das Wachstum. Bei einer mikroskopischen Kontrolle ergab sich jedoch, dass dies nur in 1-2 Prozent der Fälle geschah und der Einfluss auf die Ergebnisse gering war.

2. 2. 3. 5. Theoretische Grundlagen des MTT-Tests

Das gelbe 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) ist ein Tetrazoliumsalz, das durch Dehydrogenasen, die in funktionsfähigen Mitochondrien vorkommen, in Formazane umgewandelt wird. Diese haben eine intensiv blaue Farbe, deren Intensität photometrisch bestimmt werden kann (Lopez-Ibor et al., 1985; Seeger et al., 1982), indem man den Anteil des Lichts misst, der bei der Durchleuchtung der Probe absorbiert wird. Die Absorption ist nun proportional zur Schichtdicke der durchleuchteten Probe und zur Konzentration des Formazans. Da die Dicke der Proben immer konstant ist (in jedem der

Wells war dieselbe Menge Flüssigkeit), war die Absorption proportional zur Formazankonzentration. Alle übrigen hinzugegebenen Substanzen sowie die durchleuchtete 96-Loch-Platten waren gelblich, absorbierten das verwendete Licht im blauen Bereich also kaum. Es wurde jedoch stets ein Leerwert (der alle verwendeten Substanzen enthielt, jedoch keine Zellen und damit auch kein Formazan) mitgemessen, der bei der Auswertung automatisch gleich 0 gesetzt wurde.

Die Konzentration des entstandenen Formazans war, da stets genug MTT vorhanden war und die Inkubationszeit nach Zugabe des MTT stets 3 Stunden betrug, proportional zur Zahl der intakten Mitochondrien in der Probe und damit auch proportional zur Zahl der im Well enthaltenen vitalen Zellen.

2. 2. 3. 6. Herstellung der MTT-Stammlösung

Pro ml PBS wurden 5mg MTT gelöst und die Lösung nach intensivem Schütteln im Vortexer durch ein 0,44µm Minisart NML-Filter filtriert. Die MTT-Lösung musste stets lichtgeschützt bei 4°C gelagert werden.

2. 2. 3. 7. Herstellung der Solubilisierungslösung

Die Lösung bestand aus 190ml Isopropanol, 10ml 2M Salzsäure (HCl) und 20ml Triton X-100. Sie konnte bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2. 2. 3. 8. Durchführung des MTT-Tests

72 Stunden nach Zugabe der Substanzen wurde, wenn der Boden der Platte in der Kontrollgruppe gut bewachsen war, der MTT-Test durchgeführt. Dazu wurde die MTT-Stammlösung im Verhältnis 9:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Danach wurde in allen Ansätzen das Nährmedium mit einer dünnen Nadel vollständig entfernt. Mit einer Multipette und Combitips (5ml, 100µl Portion) wurde in jedes Well der 96-Loch-Platte 100µl der RPMI-MTT-Lösung gegeben und genau 3

Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnte man mit Hilfe des Mikroskops im Bereich der Zellen deutlich die blauen Formazan-Kristalle erkennen, die sich gebildet hatten.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100µl der Solubilisierungslösung gestoppt und gleichzeitig dafür gesorgt, dass sich die Formazan-Kristalle lösen konnten. Dazu mussten die Platten jedoch unter leichtem horizontalen Schütteln für weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert werden. Hierzu wurden die Platten luftdicht mit Parafilm umwickelt, um ein Entweichen des Lösungsmittels zu verhindern. Darüber wurde als Lichtschutz Alufolie gewikkelt und die Platten wurden auf dem Schüttler befestigt.

2. 2. 3. 9. Auswerten der Proben im Milenia Kinetic Analyzer

Die Lichtabsorption der einzelnen Wells der 96-Loch-Platte wurde im Milenia Kinetic Analyzer im Zwei-Wellenlängenmodus gemessen. Hierbei wurde eine Referenzwellenlänge außerhalb des Absorptionsspektrums des Formazans gewählt. Sie diente dazu, störende Trübungen der Probe z.B. durch Fingerabdrücke oder Kratzer am Plattenboden oder auch durch Dunstbildung, aufzuspüren und aus den Werten herauszurechnen. Dies wurde von dem Gerät automatisch ausgeführt. Des weiteren wurde eine Testwellenlänge festgelegt, die möglichst nahe am Absorptionsmaximum des Formazans liegen sollte und die zum Messen der spezifischen Absorption der gemessenen Substanz diente. Die Referenzwellenlänge wurde bei allen Versuchen mit 570 nm festgelegt, die Testwellenlänge lag bei 630 nm.

2. 2. 4. Auswertung der Ergebnisse bei den Neuroblastomzelllinien

Es wurde mit mindestens 10 Kontrollwerten gearbeitet, in einigen Versuchen auch mit mehr. In den Wirkstoffgruppen wurden für jede Substanz und Konzen-

tration mindestens 5 Ansätze verwendet. Aus den Werten wurden die Mittelwerte gebildet, wobei in begründeten Fällen grobe Abweichungen bei einzelnen Werten als „Ausreißer“ weggelassen wurden.

Da die Wachstumsgeschwindigkeit der Neuroblastomzellen sehr unterschiedlich sein kann, ist eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse nur möglich, wenn man sie mit der unbehandelten Kontrollgruppe vergleicht. Die Werte sind daher alle auf die jeweilige Kontrollgruppe (=100%) bezogen, das heißt sie sind stets als Quotient Vergleichsgruppe zur Kontrollgruppe mal 100% angegeben.

Zu den endgültigen Ergebnissen wurden mindestens n=3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2. 2. 5. Kultivierung und Versuchsdurchführung bei den koloniebildenden Tests

2. 2. 5. 1. Koloniewachstum der hämatopoetischen Stammzellen

Die gewonnenen angereicherten hämatopoetischen Stammzellen (in den meisten Fällen $CD34^+$ Stammzellen, nur in einem Versuch CD 133^+ Stammzellen, dieser Versuch wurde jedoch nicht ausgewertet, da überhaupt kein Zellwachstum stattfand) wurden zunächst in ca. 1ml RPMI 1640-Medium gelöst. Um eine für die Auszählung günstige Anzahl an Kolonien zu erhalten wurde zunächst die Zellzahl mit Hilfe des Advia 120 bestimmt und anschließend so verdünnt, dass sich etwa 500 000 Zellen/ml ergaben. Danach wurde die Stammzellsuspension gründlich durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten und je 100µl davon mit je 400µl RPMI 1640 in verschiedene sterile Eppendorfcups verteilt, so dass für jede Wirkstoffkonzentration ein Eppendorfcup zur Verfügung stand. Die Zellkonzentration betrug somit etwa 100 000/µl. In jedes Eppendorfcup wurden 10µl der zu untersuchenden Substanzen 6-FDA

und Ascorbat gegeben. Dabei wurde jeweils auf das 50fache der Zielkonzentration verdünnt. Für die erwünschte Endkonzentration von 250 bzw. 500µmol/l 6-FDA wurde eine Lösung mit einer Wirkstoffkonzentration von 12,5 bzw. 25mM hergestellt. Ascorbat wurde in einer Konzentration von 500µmol/l bzw. 5mmol/l zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 bzw. 100µmol/l erreicht wurde. Die Ansätze wurden wiederum gut durchmischt, und nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurden die Wirkstoffe wieder entfernt. Dies geschah, indem die Ansätze zunächst mit 600µl RPMI 1640-Medium aufgefüllt und dann für 6 min bei 400g zentrifugiert wurden. Danach konnte der Überstand mit einer feinen Nadel vorsichtig abgesaugt und die Reaktionsansätze wieder mit 500µl RPMI 1640 aufgefüllt werden. Die Zellkonzentration betrug somit weiterhin 100 000/µl in allen Ansätzen. Nach gründlicher Durchmischung wurden 35µl aus jeder der Stammzellensuspensionen direkt in 3,5ml Methylzellulose-Medium suspendiert, so dass sich eine Zelldichte von etwa 1000/µl ergab. Je 1ml des Zellulose-Mediums wurde in eine Gewebekulturschale gegeben, wodurch aus jedem Ansatz 3 Kulturschalen befüllt werden konnten. Alle drei Kulturschalen eines Ansatzes wurden zusammen mit einer Schale, die mit Ampuwa gefüllt war, auf ein Tablett gestellt und abgedeckt, um sterile Bedingungen zu gewährleisten und gleichzeitig eine ausreichend mit Wasser gesättigte Atmosphäre zu ermöglichen. Auf diese Weise wurden die Kulturschalen für 14 Tage bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

2. 2. 5. 2. Zugeben und Entfernen der Substanzen bei den angereicherten Stammzellen

Zugeben der Substanzen

100µl der angereicherten Stammzellen wurden nach der Auszählung auf verschiedene sterile Eppendorfcups verteilt und mit 400µl RPMI 1640-Lösung verdünnt. In jedes Eppendorfcup wurde nun 10µl der 50-fach konzentrierten

Wirkstoffe gegeben, so dass sich näherungsweise die gewünschte Konzentration ergab. Mit den Substanzen wurde in bezug auf die Reihenfolge und die Aufbewahrung genauso verfahren wie bei den Neuroblastomzellen und ebenfalls im Brutschrank inkubiert.

Entfernen der Substanzen

Da die angereicherten Stammzellen nicht die Eigenschaft besaßen, am Boden des Gefäßes anzuwachsen, musste der Austausch des Nährmediums nach vorheriger Zentrifugation erfolgen. Um zu verhindern, dass dadurch die Inkubationszeit zu lang wurde, wurden die 500µl nach Ablauf der Inkubationszeit mit 700µl RPMI 1640-Medium verdünnt. Die Zellsuspension wurde dann für 6 Minuten bei 400g zentrifugiert und danach der Überstand mit einer feinen Nadel vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden in 500µl RPMI 1640 resuspendiert und je 35µl in 3,5ml Methylzellulosemedium gegeben. In diesem Medium konnten die Stammzellen nun, wie in Kapitel 2. 2. 5. 1. beschrieben, angezüchtet werden. Jede Schale sollte somit 500-1000 hämatopoetische Zellen enthalten.

2. 2. 6. Auswertung der Ergebnisse bei den angereicherten Stammzellen

Nach Ablauf der 14-tägigen Inkubationszeit wurden die Kolonien, die in den Kulturschalen gewachsen waren, mit Hilfe des Mikroskops bei 25facher Vergrößerung ausgezählt. Als Kolonie wurde eine Ansammlung von mehr als 20 Zellen gewertet. Zur Auszählung wurde ein dafür vorgesehenes Raster unterlegt, das die Kulturschale in mehrere Quadrate unterteilte. Auf diese Weise konnte die gesamte Fläche der Schale mäanderförmig Quadrat für Quadrat ausgezählt werden. Die Kolonien unterschieden sich dabei deutlich, nicht nur nach ihrer Größe, sondern auch nach der Art der Zellen. Einige Kolonien bestanden ausschließlich aus meist dicht gelagerten roten Zellen, andere enthielten rote und

weiße Zellen und die meisten Kolonien bestanden nur aus weißen Zellen, die oft über ein relativ großes Gebiet zerstreut waren. Daher wurden die Kolonien bei der Auszählung in drei Gruppen unterteilt: eine mit roten, fokussierten Kolonien, eine mit weißen, zerstreuten Kolonien und eine mit gemischten Kolonien.

Zur Illustration der unterschiedlichen Kolonien wurden folgende Fotografien bei 100facher Vergrößerung in Abbildung 2.1. dargestellt:

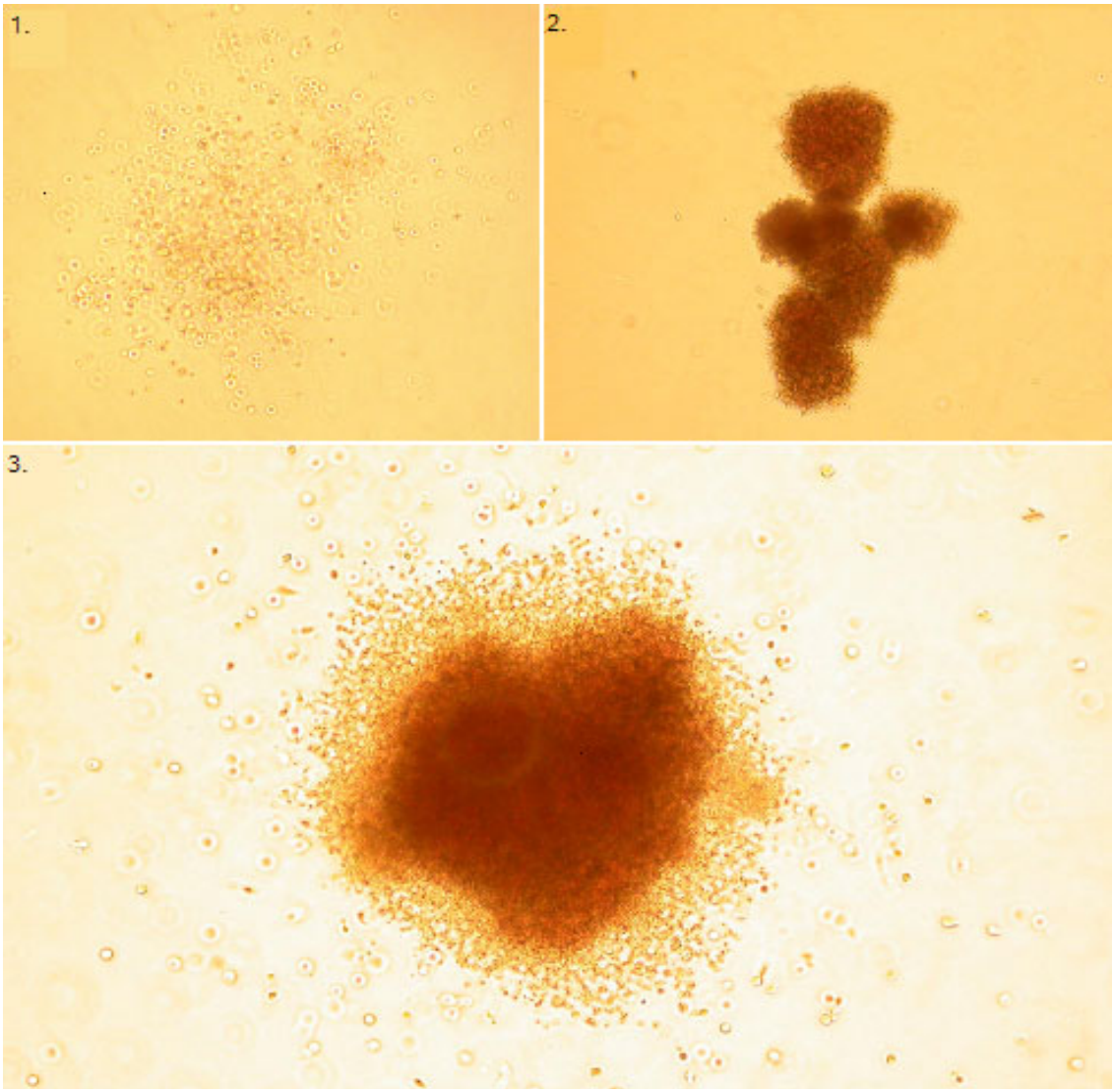


ABBILDUNG 2.1. Unterscheidung der Kolonien zu Auswertung (Bilder jeweils bei 100facher Vergrößerung angefertigt): 1. Weiße zerstreute Kolonie 2. Rote fokussierte Kolonie 3. Gemischte Kolonie

Auf diese Weise wurden alle drei Kulturschalen einer Wirkstoffgruppe ausgezählt und Mittelwerte gebildet.

Zwar müssen auch diese Werte im Verhältnis zur Kontrollgruppe gesehen werden, auf eine Darstellung als Quotient zur Anzahl der Kolonien der Kontrolle

wurde hierbei jedoch verzichtet, um statt dessen die verschiedenen Koloniety-pen darstellen zu können. Die Werte sind daher als absolute Anzahl den Kolonien angegeben.

Bei der graphischen Auswertung wurden die mittlere Anzahl der verschiedenen Kolonietypen als Balken übereinander aufgetragen, so dass die Gesamtlänge des Balkens der mittleren Gesamtanzahl der Kolonien einer Kulturschale entsprach. Die aufgetragene Standardabweichung bezieht sich auf die Gesamtzahl aller Kolonien (unabhängig vom Kolonietyp) einer Schale (siehe z.B. Abb. 3.14 auf Seite 77).

Auch hier wurden von der endgültigen Versuchsreihe n=3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2. 2. 7. Probleme und Vorsichtsmaßnahmen bei der Testdurchführung

2. 2. 7. 1. Variation der Zellzahl und des Zellwachstums bei den Neuroblastomlinien

Die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien können sich im Laufe einiger Passagen verändern. Dies gilt vor allem für ihre Wachstumsgeschwindigkeit. Daher wurde in einem Vorversuch zunächst geklärt, wie viele Zellen ausgesät werden müssen, um in der Auswertung ein gutes Ergebnis zu erhalten. In den weiteren Versuchen wurden außerdem die ausgesäten Zellzahlen immer wieder an die sich verändernde Wachstumsgeschwindigkeit angepasst, so dass oft unterschiedliche Zellzahlen ausgesät werden mussten. Um dennoch vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können, wurde das Wachstum der behandelten Zellen stets mit dem Wachstum einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen und das Ergebnis entsprechend prozentual zur Kontrollgruppe angegeben.

Auch andere Eigenschaften der Zelllinien können sich im Laufe der Zeit verändern. So zeigte sich bei der quantitativen Bestimmung der spezifischen mIBG-Aufnahme von SK-N-SH-Zellen über den NA-T, dass diese im Laufe verschiedener Passagen innerhalb weniger Wochen deutliche Unterschiede aufwies. Dies galt auch für die Genexpression des NA-T (Seitz, 2000). Deshalb wurde darauf geachtet, vergleichbare Versuche kurz nacheinander durchzuführen, um zu verhindern, dass sich relevante Eigenschaften der Zellen veränderten.

2. 2. 7. 2. Variation der Zellzahl bei den koloniebildenden Tests

Ähnlich wie bei den Neuroblastomzellen unterliegt auch das Koloniewachstum der hämatopoetischen Stammzellen einer großen Streubreite. Da jedoch für jeden Versuch eine neue Charge von Zellen benutzt wurde, konnten vor einem Versuch keine Rückschlüsse auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen gezogen werden. Es wurden daher immer 1000 Zellen/µl ausgesät, da sich diese Zahl in der Praxis als sinnvoll erwiesen hatte. Auch hierbei wurden, wie oben beschrieben, die Ergebnisse mit dem Wachstum einer Kontrollgruppe verglichen, so dass das Ergebnis letztlich qualitativ unabhängig vom absoluten Koloniewachstum der hämatopoetischen Zellen war.

2. 2. 7. 3. Stabilität der Lösungen

6-Fluordopamin ist im ungelösten Zustand lichtempfindlich und sollte unter Luftabschluss gelagert werden. Deshalb wurde der benötigte Teil der Substanz in einem Eppendorf-Hütchen gelagert und stets darauf geachtet, dass das Hütchen sofort nach Entnahme der benötigten Menge mit Parafilm gut luftdicht verschlossen und in Alufolie verpackt wurde.

2. 2. 7. 4. Einfluss von Ascorbat auf den MTT-Test

Grundsätzlich ist auch Ascorbat in der Lage MTT, nichtenzymatisch in Formazan umzuwandeln, so dass Ascorbat in der Lage wäre den MTT-Test zu beeinflussen. Allerdings wurde das Ascorbat vor Zugabe des MTT durch Absaugen vollständig aus den Wells entfernt. Außerdem zeigte sich, dass das Ascorbat nach einer 72stündigen Inkubationszeit vollständig abgebaut wird (Balis, 1988). In den Versuchen wurden zudem meist nur geringe Konzentrationen an Ascorbat verwandt und nach Ablauf der Einwirkzeit wieder entfernt.

3. Ergebnisse

3. 1. Einfluss der Wirkstoffe auf Neuroblastomzelllinien

3. 1. 1. Vorbemerkung zur Auswahl der Untersuchungen

Vor 20 Jahren wurde am Sloan Kettering Institut erstmals die klinische Anwendung von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) zur Reinigung autologer Stammzellen von kontaminierenden Neuroblastomzellen getestet (Kushner et al., 1991). Dabei wurden Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung mit einer hochdosierten Chemotherapie, wie sie heute bei der Hochdosistherapie auch noch gebräuchlich ist, behandelt („Konditionierung“). Vor der Rücktransfusion des entnommenen Knochenmarks wurde dieses für 1 Stunde mit 6-OHDA in einer Konzentration von 100 µmol/l ex vivo behandelt. Wie schon in Kapitel 1 ausgeführt, sollte dabei das Katecholamin-Analogon 6-OHDA selektiv von den Neuroblastomzellen aufgenommen werden und die Zellen durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (H_2O_2 u.a.) irreversibel schädigen, gleichzeitig aber das Knochenmark verschonen. Man ging davon aus, dass Neuroblastomzellen über spezielle Aufnahmesysteme für Katecholamine verfügen, Knochenmarkstammzellen aber nicht. In dieser Studie wurde 6-OHDA mit 1000µmol/l Ascorbat kombiniert, da bekannt war, dass Ascorbat in der Lage ist, die Wirkung von 6-OHDA zu verstärken. Dies wurde mit dem Effekt des Redox-Cyclings erklärt (siehe 1. 1. 3. 1.). Dennoch waren die Ergebnisse dieser Studie ernüchternd. Nicht nur, weil die behandlungsbedingte Sterblichkeit mit 5 der 28 behandelten Kindern hoch war, sondern auch, weil 22 Kinder an einem Rezidiv verstarben.

Davon hatten 6 Patienten ein Rezidiv in Knochen, Knochenmark, Leber oder Lunge, also fernab ihres Primärtumors, so dass man vermuten musste, dass diese Rezidive durch mit den autologen Stammzellen zurückinfundierte Tumorzellen entstanden waren. In nachfolgenden Analysen wurden später Gründe für dieses schlechte Studienergebnis gefunden: Zum einen besitzen nicht alle Neuroblastome spezielle Aufnahmesysteme, zum anderen autooxidiert 6-OHDA bei physiologischen pH-Werten um 7,4 rasch innerhalb von wenigen Minuten, so dass toxische Metabolite gebildet werden, lange bevor der Großteil des 6-OHDA von den Zellen aufgenommen wird. Es entsteht eine unspezifische Toxizität, vor allem des gebildeten H_2O_2, die die hämatopoetischen Stammzellen genauso betrifft wie die Neuroblastomzellen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie der Universität Tübingen (Prof. Stegmann), nach anderen zytotoxischen Katecholamin-analogen Verbindungen gesucht und schließlich das chemisch sehr ähnliche 6-Fluordopamin (6-FDA) in Betracht gezogen. Dies wird bei neutralem pH nur sehr langsam in 6-OHDA umgewandelt, so dass genug Zeit für die Aufnahme durch den NA-T in die Zellen bleibt. Auf diese Weise sollte zumindest die Subfraktion der Neuroblastomzellen, die einen NA-T exprimiert, von dieser Substanz spezifisch abgetötet werden.

Zuerst sollte daher in dieser Arbeit geklärt werden, ob Neuroblastomzellen, die den NA-T exprimieren (z.B. Zellen der SK-N-SH-Linie) beim Einsatz von 6-FDA selektiv abgetötet werden, während andere ohne NA-T (Zellen der SK-N-LO-Linie) nicht betroffen sind. Parallel dazu sollte das Vergleichssystem mit 6-ODHDA untersucht werden, um die allgemeine Toxizität reaktiver Sauerstoffverbindungen auf die verwendeten Zelllinien und den Einfluss auf das Testsystem zu prüfen. Vor allem beim Einsatz von 6-FDA ist anzunehmen, dass die Inkuba-

tionszeit mit den Wirksubstanzen (wegen der zeitlich verzögerten Umwandlung in 6-OHDA) einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat.

Chemische Untersuchungen in zellfreien Systemen haben dabei gezeigt, dass die Umwandlung des 6-FDA unter dem Einfluss von Ascorbat deutlich zeitverzögert stattfindet, so dass theoretisch die Möglichkeit bestehen sollte, die unerwünschte Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA außerhalb der Zelle zu steuern.

Im letzten Teil der Arbeit sollte dann geprüft werden, ob hämatopoetische Stammzellen durch 6-FDA (wie schon bei der Anwendung von 6-OHDA) geschädigt werden, oder ob 6-FDA selektiver wirkt und die hämatopoetischen Zellen nicht beeinträchtigt. Hierbei haben sich koloniebildende Tests bewährt, die nach der Hochdosischemotherapie auch als Maß für die Regenerationsfähigkeit der hämatopoetischen Zellen herangezogen werden.

3. 1. 2. Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf das Wachstum von SK-N-SH und SK-N-LO-Zellen

3. 1. 2. 1. Optimierung der Zellzahl

Bei der Auswertung eines Versuchs mit Hilfe eines Photometers ist die Genauigkeit der Messergebnisse vom Verhältnis zwischen absorbiertem und nicht absorbiertem Licht abhängig. Unter der Annahme, dass die optimalen Ergebnisse erzielt werden, wenn die Extinktion der unbehandelten Kontrollen, die im MTT-Test gemessen wird, im Bereich zwischen 0,3 und 0,5 liegt, sollte in diesem Versuch die Zellzahl bestimmt werden, die notwendig ist, um nach Ablauf der 4-tägigen Wachstumszeit Werte innerhalb dieses Bereichs zu erhalten. Auf Erfahrungswerte aus früheren Versuchen kann dabei nicht immer zurückgegriffen werden, da sich das Wachstumsverhalten der Zelllinien nach einigen Passagen häufig ändert. Auch im Laufe der weiteren Versuche musste die ausgesäte

Zellzahl mehrmals leicht angepasst werden. Der Versuch erbrachte die in Tabelle 3.1. dargestellten Ergebnisse:

TABELLE 3.1. Durchschnittliche Extinktion der unbehandelten Kontrollen nach 4-tägiger Inkubation, *angegebene Werte sind Durchschnittswerte aus 22 Einzelbestimmungen, in Klammern ist die einfache Standardabweichung angegeben*

	SK-N-SH	SK-N-LO
ausgesäte Zellzahl	**20 000**	**15 000**
gemessene Extinktion	**0,33 (+/-0,04)**	**0,58 (+/-0,07)**

Die Extinktion lag für beide Zelllinien in etwa im angestrebten Bereich, für die SK-N-LO-Linie wurde die ausgesäte Zellzahl aber zunächst reduziert, da das Nährmedium als Zeichen der Übersäuerung durch von den Zellen produziertes Laktat bei der Auswertung nach 4 Tagen in Gelb umschlug. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass die Werte, die am Rand der Platte lagen, stärker von den Mittelwerten abwichen, als die übrigen Werte. Die Felder am Rand der Platte wurden deshalb in den weiteren Versuchen nicht mehr benutzt.

3. 1. 2. 2. Die Wirkung von 6-Hydroxydopamin in Abhängigkeit von der Konzentration

Schon aus früheren Arbeiten war bekannt, dass 6-OHDA unspezifische Effekte auf beide Zelllinien (SK-N-SH und SK-N-LO) hatte. Das Wachstum beider Zelllinien wurde dabei dosisabhängig gehemmt.

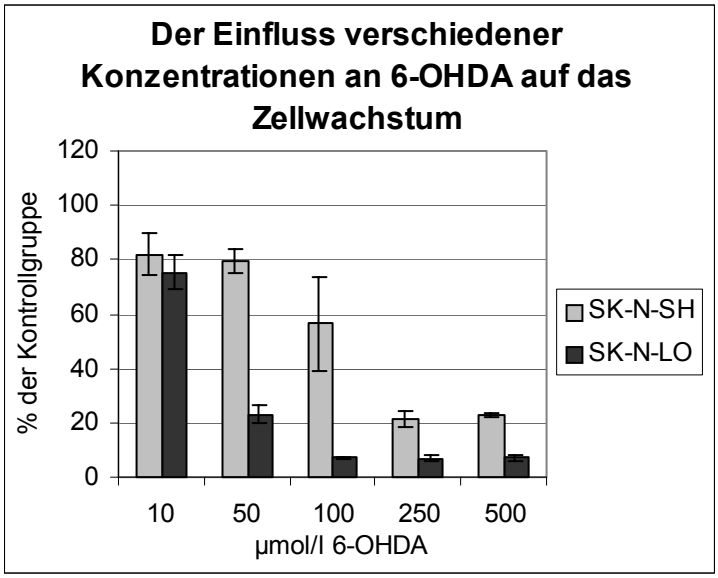


ABBILDUNG 3.1. Der Einfluss verschiedener Konzentrationen an 6-Hydroxydopamin auf das Zellwachstum bei 2,5stündiger Inkubation: *17 000 SK-N-SH-Zellen und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag nach 4 Tagen bei 0,341 für die SK-N-SH-Kontrolle und bei 0,44 für die SK-N-LO-Kontrolle. Beide Ansätze wurden 2,5 h mit 6-OHDA inkubiert und dann für 4Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Man sieht in Abbildung 3.1., dass wie erwartet eine klar dosisabhängige Wachstumshemmung bei beiden Zelllinien eintritt. Obwohl die SK-N-LO Zellen über keinen NA-T verfügen, reagieren sie viel empfindlicher auf 6-OHDA (ab 100µmol/l kaum mehr Wachstum). Höhere Konzentrationen haben dann nur noch einen geringen zusätzlichen Effekt auf das Wachstum der SK-N-LO-Zellen. SK-N-SH-Zellen reagierten weniger empfindlich auf das 6-OHDA.

Obwohl SK-N-LO-Zellen keinen NA-T exprimieren, war ihr Wachstum stärker beeinträchtigt als das von SK-N-SH-Zellen. Ursache ist die schnelle Autooxidation von 6-OHDA, die zur Bildung der zytotoxischen ROS (reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffverbindungen, vor allem H_2O_2) bereits im Außenmedium führt. Auf diese reagieren Zellen der SK-N-LO-Linie stärker als

Zellen der SK-N-SH-Linie. Diese höhere Empfindlichkeit wurde in anderen Arbeiten damit erklärt, dass diese Zelllinie keine Catalase exprimiert und eine geringere Konzentration an Gluthation-Peroxidase (GSH-Px) aufweist (Seitz, 2000). Beide Enzyme spielen eine wesentliche Rolle beim Abbau von reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die im nächsten Kapitel noch näher eingegangen werden soll.

3. 1. 2. 3. Der Einfluss von Vitamin C auf das Testsystem

Ein Teil der Versuche wurde in Gegenwart von Ascorbat durchgeführt, um den Einfluss dieser Substanz auf die Zytotoxizität von 6-FDA und 6-OHDA zu bestimmen. Wie in Kapitel 2 beschrieben, ist Ascorbat in der Lage, MTT zu reduzieren und könnte deshalb die Ergebnisse beeinflussen. Um diese potentiellen Störeffekte zu erkennen, wurde vorab der folgende Versuch durchgeführt. Dabei wurde das Ascorbat nach Zugabe nicht -wie in den anderen Versuchen- durch Austausch des Nährmediums entfernt, sondern während der gesamten Wachstumsphase belassen. Nach 4 Tagen wurde das Nährmedium mit dem Ascorbat abgesaugt und wie beschrieben der MTT-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 3.2. dargestellt.

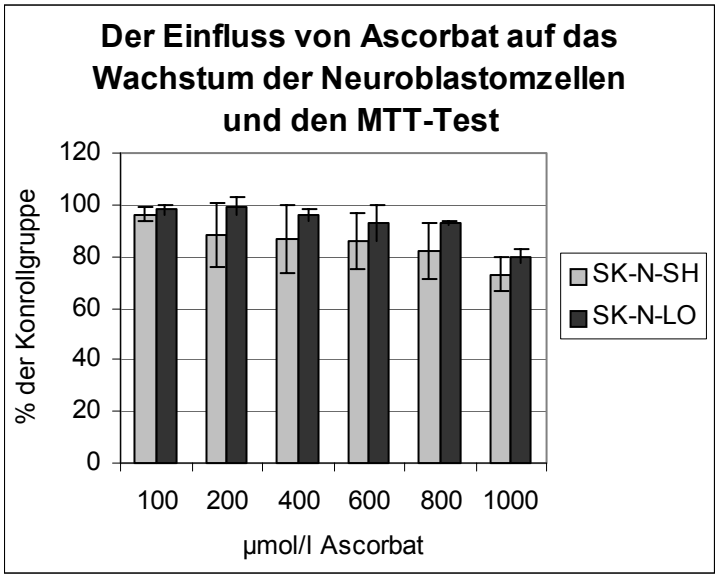


ABBILDUNG 3.2. Der Einfluss von 100-1000 µmol/l Ascorbat als Dauerinkubation auf das Wachstum der beiden verwendeten Zelllinien und den MTT-Test: *20 000 SK-N-SH und 15 000 SK-N-LO wurden ausgesät, Extinktionen lagen bei 0,55 für die SK-N-LO und bei 0,32 für die SK-N-SH-Linie; das zugegebene Ascorbat wurde nicht wieder entfernt; die Auswertung erfolgte nach 4d; alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten, die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Aus dem Versuch ging hervor, dass Ascorbat auch unter diesen ungünstigen Bedingungen das Testsystem nicht stört, indem es MTT in Formazan umwandelt und somit durch höhere Extinktion ein höheres Zellwachstum vortäuscht. Das bestätigte sich auch mikroskopisch, da die Zellzahl in allen Ansätzen in etwa gleich groß war. In höheren Konzentrationen um 1000µmol/l hemmte Ascorbat das Wachstum beider Zellreihen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von D'Cruze 1996.

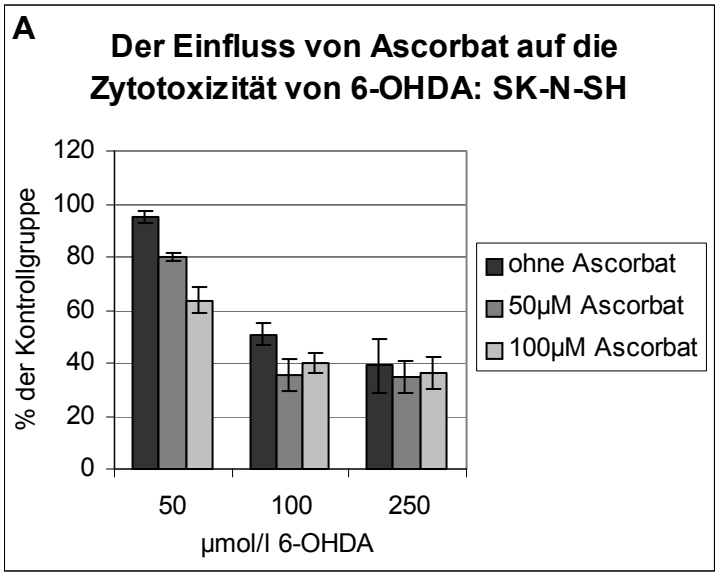
Der fehlende Einfluss des Ascorbats auf den MTT-Test erklärt sich vermutlich dadurch, dass Vitamin C in wässriger Lösung und bei 37°C sehr instabil ist und zum Zeitpunkt der Messung, also nach 4 Tagen, bereits nicht mehr nachweisbar ist (Balis, 1988). In den weiteren Versuchen wurden weit geringere Ascorbat-Konzentrationen verwendet (meist 10-100µmol/l) und das zugegebene Ascorbat

wurde nach der kurzen Inkubationszeit von 1-2,5 Stunden wieder entfernt, so dass ein unspezifischer Einfluss auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden kann.

3. 1. 2. 4. Der Einfluss von Vitamin C auf die Wirkung von 6-Hydroxydopamin

In der Literatur wird bei Kombination von Ascorbat und 6-OHDA der Effekt des Redox-Cyclings beschrieben. Wird bei niedrigen Konzentrationen an 6-OHDA Ascorbat im 10fachen Überschuss zugegeben (100µmol/l 6-OHDA und 1000µmol/l Ascorbat), so erhöht dies die Wirkung des 6-OHDA deutlich. Bei der Autooxidation von 6-OHDA entstehen zu gleichen Teilen reaktive Sauerstoffverbindungen, vor allem H_2O_2, und das Chinon des 6-OHDA. Bei geringen Konzentrationen an 6-OHDA entstehen daher nur geringe Mengen an H_2O_2. Als starkes Reduktionsmittel kann Ascorbat das bei der Oxidation entstandene Chinon wieder in 6-OHDA überführen. Dieses kann dann unter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen erneut zum Chinon oxidieren und die Konzentration an reaktiven Sauerstoffverbindungen erhöht sich deutlich. Gleichzeitig gilt Ascorbat als ein wichtiger Radikalfänger und könnte somit unter diesen Bedingungen die Toxizität des 6-OHDA auch aufheben.

In den späteren Versuchen sollte 6-FDA nicht mit einem 10fachen Überschuss an Ascorbat angewandt werden, sondern in gleicher oder geringerer Dosis. Deshalb war es sinnvoll, zuerst die Auswirkungen von niedrigen Dosen Ascorbat auf die Toxizität von 6-OHDA zu untersuchen. Dazu sollte der folgende Versuch dienen, dessen Ergebnisse in Abbildung 3.3. dargestellt sind.



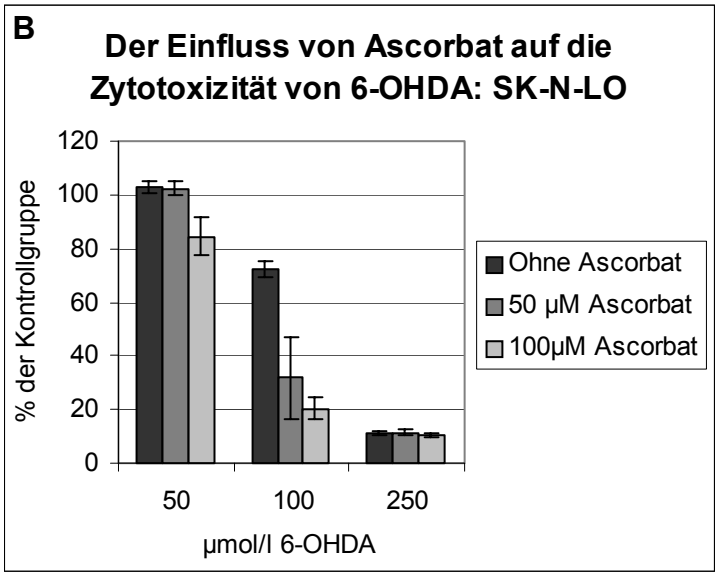


ABBILDUNG 3.3. Einfluss von Ascorbat auf die Toxizität von 6-OHDA A auf die SK-N-SH-Linie B auf die SK-N-LO-Linie: *18 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,235 für die SK-N-SH und bei 0,771 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1,5h mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Besonders bei niedrigen 6-OHDA-Dosen verstärkt Ascorbat die Wirkung des 6-OHDA, was darauf schließen lässt, dass das Redox-Cycling auch bei niedrigen Ascorbat-Konzentrationen wirksam ist. In keinem Ansatz zeigte Ascorbat einen hemmenden Effekt auf die Wirkung von 6-OHDA. Bei 50 µmol/l 6-OHDA kann 50 µmol/l Ascorbat theoretisch zu einem Redox-Cycling führen, 100 µmol/l zu zwei, bis es aufgebraucht ist (Bildung von Dehydroascorbat).

3. 1. 3. Der Einfluss von 6-Fluordopamin auf das Wachstum der Zelllinien

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Unterschiede zwischen 6-FDA und 6-OHDA zu quantifizieren und Informationen über die bestmögliche Inkubationszeit zu erhalten. Die Inkubationszeit musste lange genug sein, um eine ausreichende Aufnahme des 6-FDA in die SK-N-SH-Zellen zu ermöglichen. Gleichzeitig musste sie jedoch so kurz wie möglich gewählt werden, um die Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA im Außenmedium möglichst gering zu halten. Die Zeit, die verstreichen muss, um eine ausreichende Aufnahme von 6-FDA in die Zelle zu erhalten, hängt im Wesentlichen von der Zahl der Transporter in der Zellmembran und von der Affinität des 6-FDA zum Noradrenalin-Transporter (NA-T) ab. Über die Anzahl der NA-T in der Membran der SK-N-SH-Zellen ist wenig bekannt, und sie kann sich auch im Laufe mehrerer Passagen ändern. Daher war es also eines der wesentlichen Ziele der Arbeit, die für eine eventuelle spätere Anwendung bei der autologen Stammzelltransplantation optimale Inkubationszeit zu ermitteln. In dieser Versuchreihe bedeutete das, die Zeit zu finden, bei der die zytotoxische Wirkung von 6-FDA auf die SK-N-SH-Linie maximal ist, die SK-N-LO-Zellen jedoch nicht nennenswert geschädigt werden sollten.

3. 1. 3. 1. Die konzentrationsabhängige Wirkung von 6-Fluordopamin bei 2,5stündiger Inkubation

Zunächst sollte die Wirkung des 6-FDAs mit der des 6-OHDAs aus den vorangehenden Versuchen verglichen werden. Dazu wurden die Zellen bei den gleichen Bedingungen wie bei dem in Abbildung 3.1. gezeigten Ansatz (2,5 Stunden Inkubationszeit), behandelt, statt 6-OHDA wurde jedoch 6-FDA eingesetzt (in Konzentrationen von 10-500µmol/l). Die Ergebnisse dieses Versuchs finden sich in Abbildung 3.4..

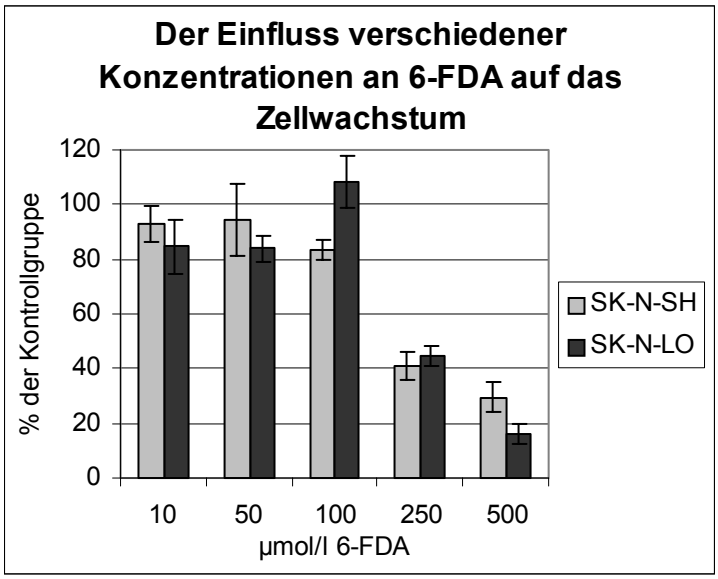


ABBILDUNG 3.4. Der Einfluss verschiedener Konzentrationen an 6-FDA auf das Zellwachstum bei 2,5stündiger Inkubation: *17 000 SK-N-SH-Zellen und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion lag bei 0,341 für die SK-N-SH-Linie und bei 0,44 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 2,5 h inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben wurden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Die Ergebnisse zeigen, dass bei 2,5stündiger Inkubationszeit eine konzentrationsabhängige Wirkung von 6-FDA besteht, die auf beide Zelllinien ungefähr gleich intensiv ist. Die Wirkung ist erwartungsgemäß deutlich geringer als die

von 6-OHDA. Da die toxische Wirkung über die Kaskade 6-FDA --> 6-OHDA --> ROS entfaltet wird, lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Würde die Wirkung von 6-FDA vorwiegend intrazellulär ablaufen (d. h. nach spezifischer Aufnahme über den NA-T), müsste der Effekt gegenüber den SK-N-SH deutlich höher sein als gegenüber den SK-N-LO-Zellen
2. Da die Zytotoxizität von 6-OHDA/reaktiven Sauerstoffverbindungen unter den gewählten Inkubationsbedingungen (siehe Abbildung 3.3.) gegenüber SK-N-LO-Zellen deutlich höher als gegenüber SK-N-SH-Zellen ist, bedeutet die ungefähr gleich starke Zytotoxizität von 6-FDA auf SK-N-SH und SK-N-LO-Zellen, dass eine Mischung aus spezifischer Aufnahme [--> die zu einer erhöhten Zytotoxizität gegenüber SK-N-SH-Zellen führt] und Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA und ROS im Außenmedium [--> was zu einer erhöhten Zytotoxizität gegenüber SK-N-LO-Zellen führt] vorliegt.

Zur Reduzierung der unspezifisch wirkenden Umwandlung von 6-FDA im Außenmedium wurde deshalb in weiteren Versuchen untersucht, welchen Einfluss eine Verkürzung der Inkubationszeit auf die Selektivität des 6-FDA hat.

3. 1. 3. 2. Die Wirkung von 6-Fluordopamin bei kürzerer Inkubationszeit (0,5 - 1,5 Stunden)

Da im vorhergehenden Versuch bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden die unspezifisch toxischen Effekte zu groß waren, war die nächste Frage, die es zu beantworten galt, ob mit kürzeren Inkubationszeiten als bisher die Wirkung selektiver wird, d.h. ob die Wirkung auf die SK-N-SH-Linie erhalten bleibt, während die SK-N-LO-Linie unempfindlicher reagiert, da weniger 6-FDA im Außenmedium in 6-OHDA umgewandelt wird. Zunächst wurde im folgenden Versuch eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden gewählt, mit dem in Abbildung 3.5. gezeigten Ergebnis:

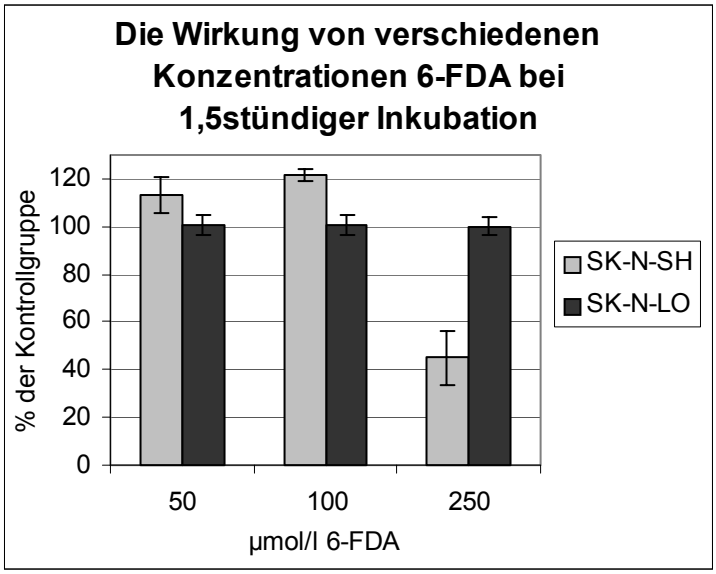


ABBILDUNG 3.5. Die Wirkung von 50-250µmol/l 6-Fluordopamin bei 1,5stündiger Inkubation: *18 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,235 für die SK-N-SH und bei 0,771 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1,5h mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Die Reduktion der Inkubationszeit von 2,5 Stunden (Abbildung 3.4.) auf 1,5 Stunden (Abbildung 3.5.) führte dazu, dass SK-N-LO-Zellen auch bei Inkubation mit 250µmol/l 6-FDA nicht in ihrem Wachstum beeinflusst wurden. Im Gegensatz dazu zeigten sich deutliche Effekte auf die den NA-T exprimierenden SK-N-SH-Zellen. Somit führte die Reduzierung der Inkubationszeit von 2,5 auf 1,5 Stunden zu den gewünschten selektiven Effekten. Wie bereits in Abbildung 3.4. gezeigt, waren 100µmol/l 6-FDA jedoch nicht ausreichend, um Effekte sowohl bei den SK-N-SH als auch bei den SK-N-LO-Zellen zu erzielen (im Vergleich zur Kontrollgruppe).

In weiteren Versuchen sollte nun geprüft werden, ob eine deutlich reduzierte Inkubationszeit von 1 bzw. 0,5 Stunden ausreicht, um gleiche Effekte zu erzielen. Dazu wurde geprüft, ob eine Erhöhung der Konzentration auf 500µmol/l mit

dieser verkürzten Inkubationszeit einen Vorteil bringt. Abbildung 3.6. zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse.

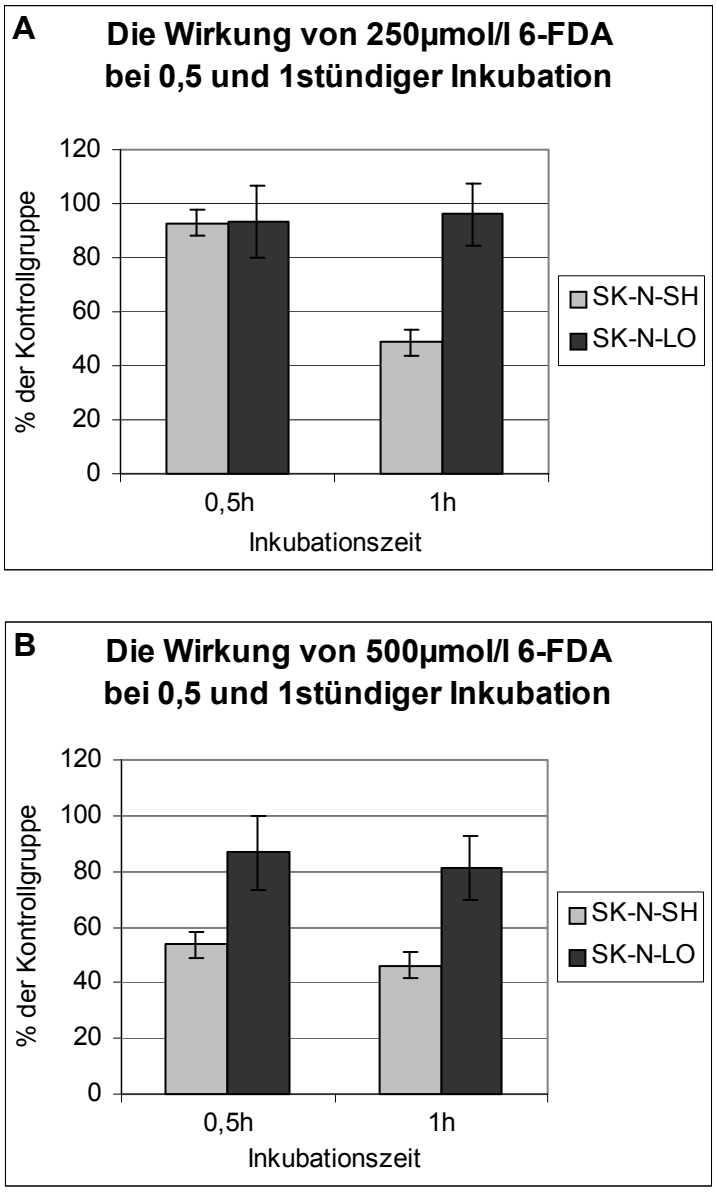


ABBILDUNG 3.6. Die Wirkung von 6-Fluordopamin bei Inkubationszeiten von 0,5 und 1 Stunde A bei 250µmol/l 6-Fluordopamin B bei 500µmol/l 6-Fluordopamin: *17 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,041 für die SK-N-SH und bei 0,202 für die SK-N-LO-Linie. Die Zellen wurden für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus*

mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.

Man sieht in Abbildung 3.6. eine deutlich selektive Wirkung bei fast allen Wirkstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten. Bei der einstündigen Inkubation mit 250µmol/l 6-FDA zeigte sich eine ausgeprägte Wirkung auf die SK-N-SH-Zellen, die gegenüber der Kontrollgruppe zu 50% abgetötet wurden, während über 90% der SK-N-LO-Zellen überlebten. Bei der höheren Konzentration von 500µmol/l 6-FDA war die Wirkung auf die SK-N-SH-Linie nur unmerklich höher als bei 250µmol/l, die unspezifischen Effekte auf die SK-N-LO-Zellen waren allerdings stärker ausgeprägt. Die besten Ergebnisse wurden hier also mit 250µmol/l 6-FDA erzielt. Eine halbstündige Inkubation führte bei Verwendung von 250µmol/l 6-FDA zu keinen Effekten bei beiden Zelllinien. Dagegen führten 500µmol/l 6-FDA bei halbstündiger Inkubation wieder zu einer selektiven Wirkung auf die Zellen mit NA-T.

3. 1. 3. 3. Der Einfluss der Zelldichte auf das Ergebnis

Zunächst wäre nicht zu erwarten, dass die Zelldichte einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Da jedoch im vorhergehenden Versuch bei einer sehr geringen Zelldichte sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, wurden im folgenden Versuch die Ergebnisse bei hoher und bei geringer Zelldichte einander gegenüber gestellt. Es wäre durchaus möglich, dass bei einer hohen Zelldichte die in den SK-N-SH-Zellen vorhandenen Enzyme Catalase oder Glutathion-Peroxidase einen Teil der entstehenden Sauerstoffverbindungen abfangen und somit die Wirkung des 6-FDA abschwächen, während bei niedriger Zelldichte auch absolut gesehen weniger dieser Enzyme vorhanden sind und die Wirkung der reaktiven Sauerstoffverbindungen somit stärker sein könnte.

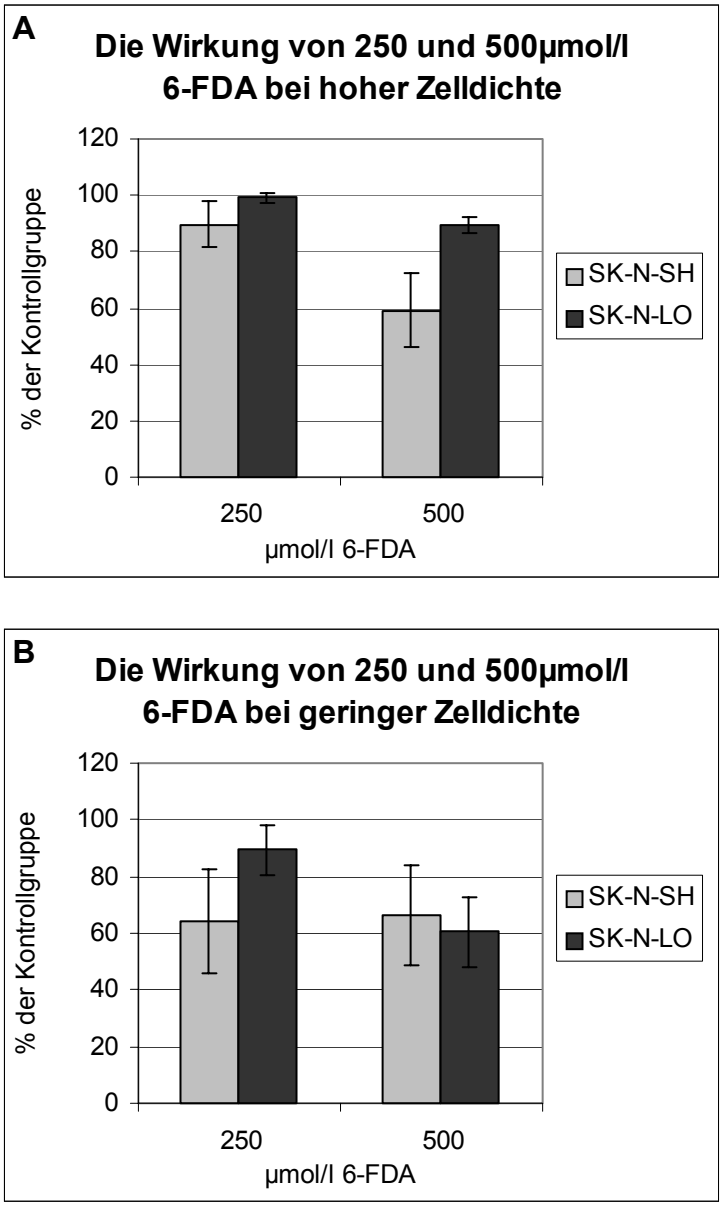
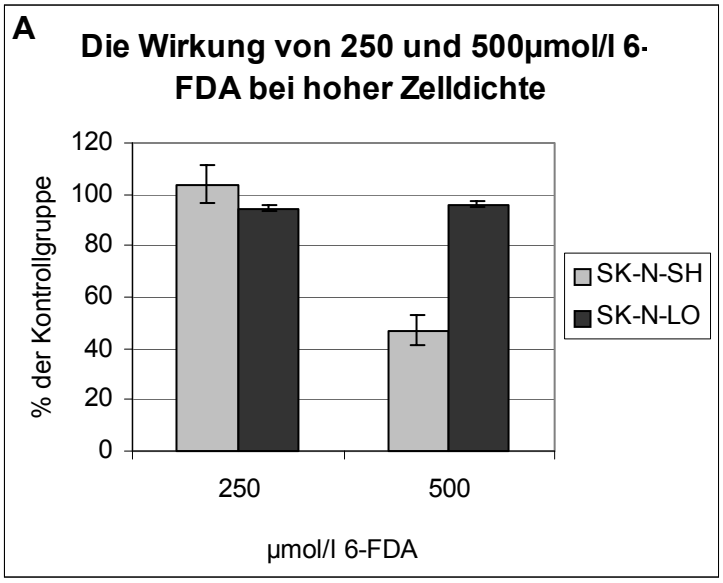


ABBILDUNG 3.7. Die Wirkung von 250 und 500µmol/l 6-Fluordopamin bei verschiedenen Zelldichten nach 1 stündiger Inkubation A bei hoher Zelldichte B bei geringer Zelldichte: *Bei der hohen Zelldichte wurden 20 000 SK-N-SH und 9 000 SK-N-LO ausgesät, bei der geringen Zelldichte 10 000 SK-N-SH und 4 500 SK-N-LO. Die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,092 bzw. 0,238 für die SK-N-SH und bei 0,356 bzw. 0,643 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1h inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Wie man aus Abbildung 3.7. entnehmen kann, war 6-FDA wiederum in fast allen Fällen selektiv wirksam. Lediglich bei 500µmol/l 6-FDA und niedriger Zelldichte ergibt sich überraschenderweise eine starke Toxizität gegenüber der SK-N-LO-Linie. Da dies bei einstündiger Inkubationszeit in keinem der übrigen Versuche beobachtet wurde, schien dieser Wert am ehesten artifiziell bedingt und wurde nicht in die weiteren Überlegungen einbezogen. Bei 250µmol/l 6-FDA waren die Ergebnisse bei niedriger Zelldichte besser, d.h. selektiver, als bei hoher. Dennoch waren die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien weit weniger groß als im vorrangehenden Versuch, so dass die Zelldichte möglicherweise nicht der einzige Grund für die sehr guten Ergebnisse im vorhergehenden Versuch waren. Ergebnisse aus früheren Arbeiten deuten außerdem darauf hin, dass langsam wachsende SK-N-SH-Zellen mehr Noradrenalin-Transporter besitzen als schnell wachsende. Erfahrungsgemäß wachsen die SK-N-SH-Zellen vor allem dann langsamer, wenn sie mit geringer Zelldichte ausgesät werden. Somit könnte dieser Umstand für die beobachteten Effekte verantwortlich sein.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde der Versuch ein zweites Mal unter denselben Bedingungen durchgeführt, also wiederum mit 1 Stunde Inkubationszeit und bei hoher und geringer Zelldichte. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.8. dargestellt:



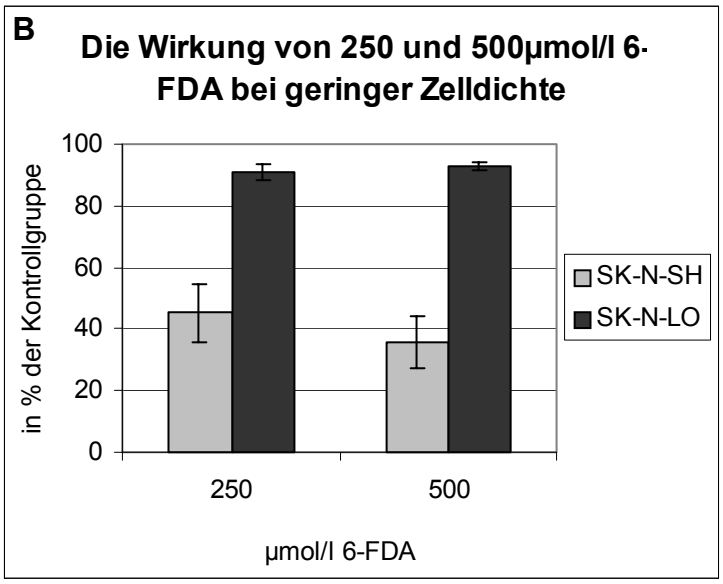


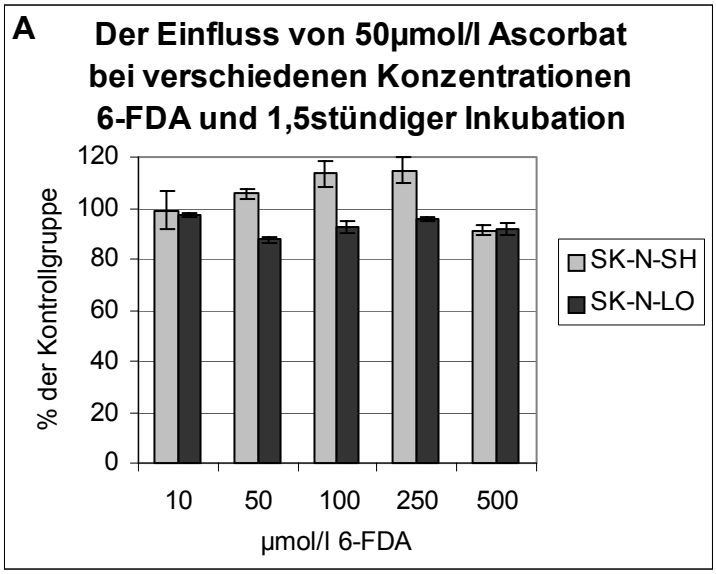
ABBILDUNG 3.8. Die Wirkung von 250 und 500µmol/l 6-Fluordopamin bei verschiedenen Zelldichten nach 1 stündiger Inkubation A bei hoher Zelldichte B bei geringer Zelldichte: *Bei der hohen Zelldichte wurden 20 000 SK-N-SH und 10 000 SK-N-LO ausgesät, bei der niedrigen Zelldichte 10 000 SK-N-SH und 5 000 SK-N-LO. Die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,168 bzw. 0,340 für die SK-N-SH und bei 0,549 bzw. 0,874 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1h inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Obwohl in diesem Versuch bei hoher Zelldichte und geringer Wirkstoffmenge (250 µmol/l) Zellen der SK-N-SH-Linie nicht auf 6-FDA ansprachen, ergibt sich in den übrigen Gruppen ein einheitliches Bild: Insgesamt sprechen die SK-N-SH-Zellen auf die Behandlung mit 6-FDA gut an. In allen Versuchen war die Wirkung auf diese Zelllinie ein wenig größer, wenn die Zelldichte gering war und die Wirkstoffmenge größer (500 µmol/l statt 250 µmol/l). Dagegen tötete 6-FDA unter gleichen Bedingungen nur etwa 10% der SK-N-LO-Zellen ab, d. h. ca. 90% der Zellen blieben unbeeinflusst. Die Wirkung auf diese Zellen scheint von der Zelldichte weitestgehend unabhängig zu sein, schien jedoch größer, wenn die Konzentration an 6-FDA größer war.

3. 1. 4. Der Einfluss von Vitamin C auf die Wirkung von 6-Fluordopamin

3. 1. 4. 1. Die Wirkung verschiedener Konzentrationen an 6-Fluordopamin in Kombination mit Vitamin C

Obwohl die Wirkungsweise des 6-FDA in seiner Umwandlung in 6-ODHDA begründet liegt, gab es schon vor Beginn dieser Arbeit Hinweise darauf, dass 6-FDA nicht wie 6-OHDA durch Ascorbat in seiner Wirkung gesteigert wird, sondern dass der Wirkstoff 6-FDA im Gegenteil durch Ascorbat stabilisiert wird. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Ascorbat ein starkes Antioxidans ist, das die Umwandlung von 6-FDA in 6-OHDA verzögert. Theoretisch sollte die Reaktion erst ablaufen, wenn das zugegebene Ascorbat verbraucht wurde. Unbekannt ist jedoch wie groß die Ascorbat-Konzentration im Vergleich zur Konzentration an 6-FDA sein muss, um dieses zu stabilisieren.



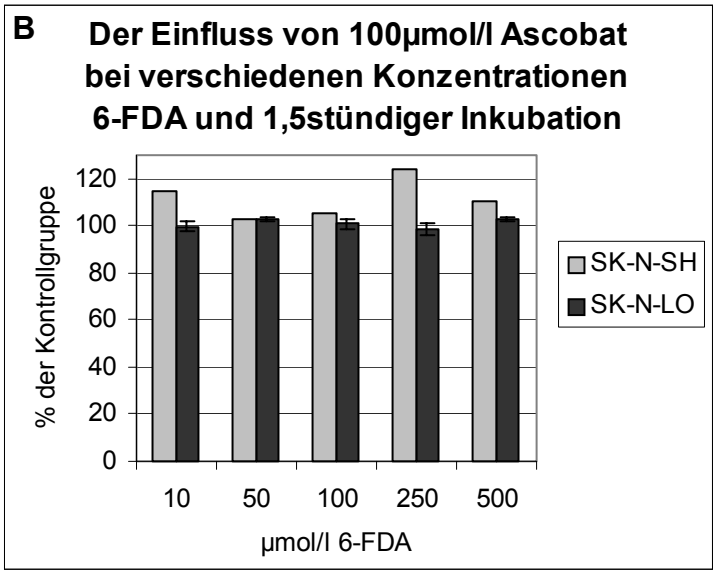
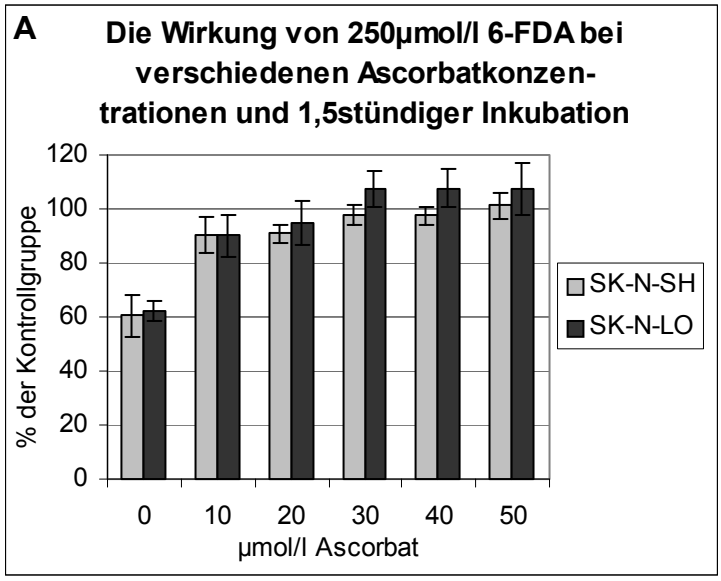


ABBILDUNG 3.9. Der Einfluss von Ascorbat auf die Toxizität von verschiedenen Konzentrationen an 6-Fluordopamin A 50µmol/l Ascorbat B 100µmol/l Ascorbat: *18 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,235 für die SK-N-SH und bei 0,771 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1,5h mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Abbildung 3.9. zeigt, dass die Wirkung des 6-FDA (bis 500 µmol/l) durch Zugabe von nur 50 µmol/l Ascorbat sowohl für die SK-N-SH-Zellen als auch für die SK-N-LO-Zellen völlig aufgehoben wurde, so dass deren Wachstum weitestgehend dem Wachstum der Kontrollgruppe entsprach. Dies galt genauso für die Kombination von 6-FDA mit 100µmol/l Ascorbat. Offensichtlich ist unter den gewählten Bedingungen (10 bis 500 µmol/l, 1,5 Stunden Inkubation) der Effekt des von den SK-N-SH-Zellen ebenfalls aufgenommenen Ascorbats so stark, dass auch eine intrazelluläre Umwandlung in 6-OHDA (nach erfolgter 6-FDA-Aufnahme) noch unterdrückt wird.

3. 1. 4. 2. Wirkung verschiedener Ascorbat-Konzentrationen auf die Toxizität von 6-Fluordopamin bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Bereits 50µmol/l Vitamin C hatte im vorhergehenden Versuch einen großen Einfluss auf die Toxizität von 6-FDA, indem es offensichtlich die Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA gänzlich unterbindet. Ziel der Arbeit sollte es aber sein, eine Kombination zu finden, bei der die Wirkung lediglich verzögert eintritt, damit den Zellen genug Zeit bleibt, ausreichende Mengen an 6-FDA aufzunehmen. Daher sollte im folgenden Versuch nun die Ascorbatkonzentration ermittelt werden, mit der das 6-FDA stabilisiert werden kann, ohne dass die toxische Wirkung auf Zellen mit Noradrenalin-Transporter verloren geht. Eine längere Inkubationszeit könnte die Aufnahme von 6-FDA in die Zellen erhöhen und somit auch die toxische Wirkung auf die SK-N-SH-Zelllinie. Ergebnisse hierzu finden sich in Abbildung 3.10..



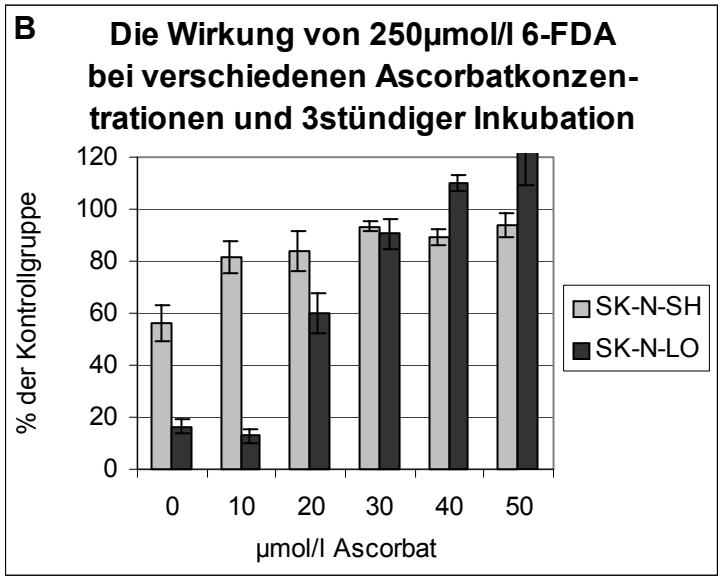


ABBILDUNG 3.10. Toxizität des 6-Fluordopamin bei Ascorbat-Konzentrationen von 0-50µmol/l A bei 1,5stündiger Inkubation B bei 3stündiger Inkubation: *17 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,397 für die SK-N-SH und bei 0,266 für die SK-N-LO-Linie Beide Ansätze wurden 1,5h mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Bei der Inkubationszeit von 1,5 Stunden zeigte hier 6-FDA in einer Konzentration von 250 µmol/l auf beide Zelllinien keine wachstumshemmende Wirkung mehr, sobald es mit mehr als 30µmol/l Ascorbat kombiniert wurde. Bei 20µmol/l und 10µmol/l war die hemmende Wirkung des Ascorbats nur noch gering. Leider war in diesem Versuch keine selektive Wirkung des 6-FDA festzustellen, beide Zelllinien waren gleichermaßen betroffen. Ein gleich starkes Ansprechen beider Zelllinien spricht jedoch auch bereits für eine gewisse Selektivität, da das im Außenmedium gebildete 6-OHDA auf SK-N-LO-Zellen deutlich stärker wirken würde (siehe Kapitel 3. 1. 3. 1.).

Bei der längeren Inkubationszeit von 3 Stunden waren bereits 40µmol/l oder 50µmol/l Vitamin C notwendig, um die Wirkung des 6-FDA aufzuheben. Bei geringeren Konzentrationen zeigte sich, ähnlich wie bei den Versuchen mit 6-OHDA, ein deutlich empfindlicheres Ansprechen der SK-N-LO-Linie, die keinen Transporter für 6-FDA hat. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von geringen Ascorbat-Konzentrationen (10-20 µmol/l) nicht ausreicht, um die Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA im Außenmedium gänzlich zu verhindern.

3. 1. 4. 3. Wirkung von 6-Fluordopamin bei kürzerer Inkubationszeit in Gegenwart geringer Ascorbatkonzentrationen

Im vorigen Versuch waren bei der Inkubationszeit von 3 Stunden die unspezifisch toxischen Effekte weit größer als bei der kürzeren 1,5-stündigen Inkubation. Daher wurde im nächsten Versuch ausprobiert, ob mit kürzeren Inkubationszeiten als bisher die Wirkung selektiver wird, d. h. ob die Wirkung auf die SK-N-SH-Linie erhalten bleibt, während die SK-N-LO-Linie besser geschützt ist. Da sich zu hohe Ascorbatkonzentrationen in den vorangegangenen Versuchen als unpraktikabel erwiesen haben, wurde hier nur noch eine Konzentration von 10µmol/l Ascorbat eingesetzt.

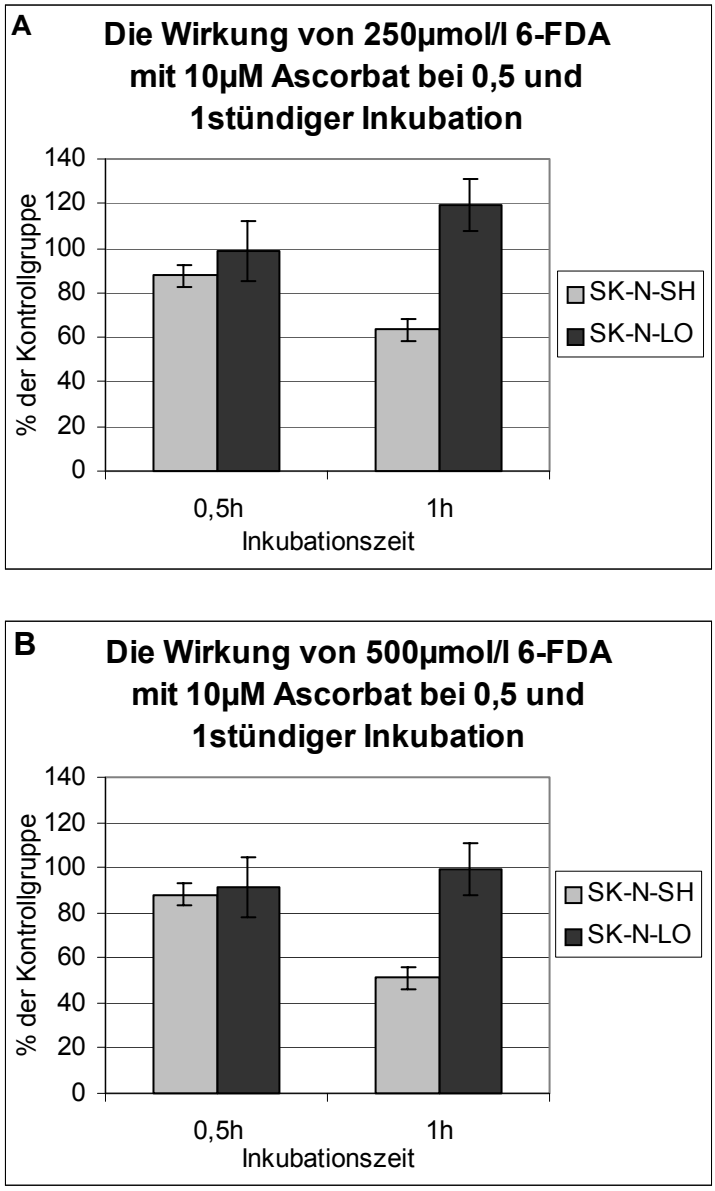


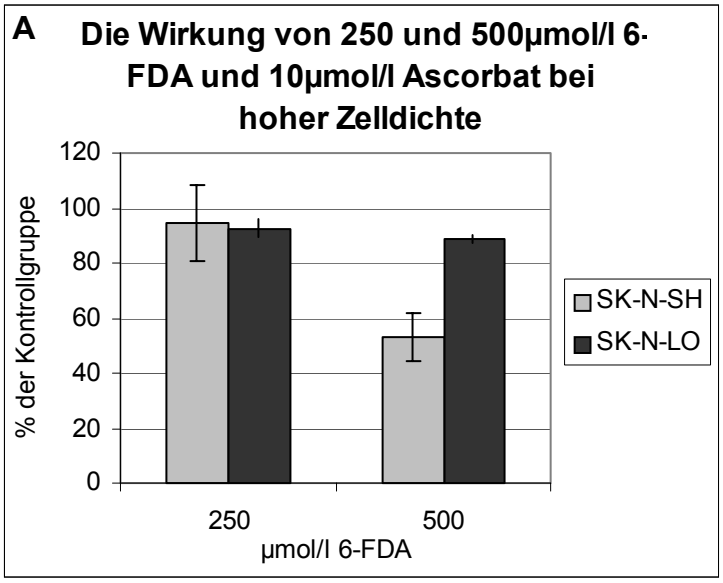
ABBILDUNG 3.11. Die Wirkung von 6-Fluordopamin und 10µmol/l Ascorbat bei Inkubationszeiten von 0,5 und 1 Stunde A bei 250µmol 6-Fluordopamin B bei 500µmol/l 6-Fluordopamin: 1*7 000 SK-N-SH und 7 500 SK-N-LO-Zellen wurden ausgesät, die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,041 für die SK-N-SH und bei 0,202 für die SK-N-LO-Linie. Die Zellen wurden 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Abbildung 3.11. zeigt, dass bei einer halbstündigen Inkubation die Zugabe von 10µmol/l Ascorbat ausreicht, um sowohl die Wirkung von 250 µmol/l als auch von 500µmol/l 6-FDA auf beide Zelllinien zu verhindern. Diese Inkubationsdauer wurde daher auch in Verbindung mit Ascorbat nicht weiter in Betracht gezogen.

Bei der einstündigen Inkubationszeit zeigte sich durchweg eine spezifische Toxizität auf die SK-N-SH-Linie, während dank des Ascorbats die SK-N-LO-Linie auch bei der hohen 6-FDA-Konzentration von 500µmol/l praktisch vollständig geschützt blieb. Im Vergleich dazu führte eine einstündige Inkubation mit 500µmol/l 6-FDA in Abwesenheit von Ascorbat bereits zu einer deutlichen Wachstumshemmung (siehe Abbildung 3.8.). Allerdings lag die Hemmung des Wachstums der SK-N-SH-Zellen bei etwa 50% der Kontrollgruppe und war damit etwas schwächer als bei den vergleichbaren Versuchen ohne Ascorbat (ebenfalls Abbildung 3.8.).

3. 1. 4. 4. Durchführung weiterer Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse

Auch wenn sich die Inkubationsdauer, wie aus den vorangehenden Versuchen hervorging, durch Zugabe von Ascorbat nicht verlängern ließ, stellte sich dennoch die Frage, ob sich die Zellen ohne Noradrenalin-Transporter durch die Zugabe von Ascorbat besser schützen ließen. Um zu klären, ob mit einer Kombination aus 6-FDA und Ascorbat bei den gleichen Bedingungen, die sich ohne Ascorbat als sinnvoll erwiesen hatten, eine höhere Selektivität erzielen ließ, wurden die weiteren Versuche durchgeführt. Um die Ergebnisse mit denen ohne Ascorbat vergleichen zu können, wurde wieder von beiden Zelllinien eine Gruppe mit hoher und eine mit geringer Zelldichte gewählt. Die Inkubationszeit betrug wieder eine Stunde (Abbildung 3.12.).



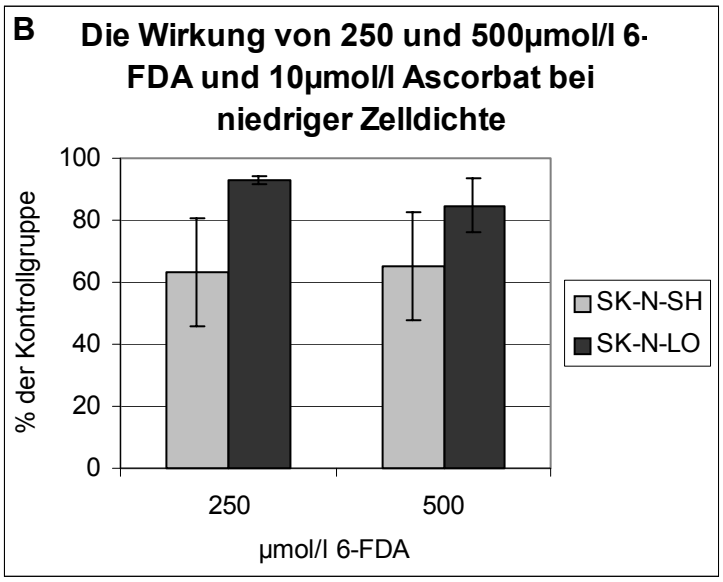
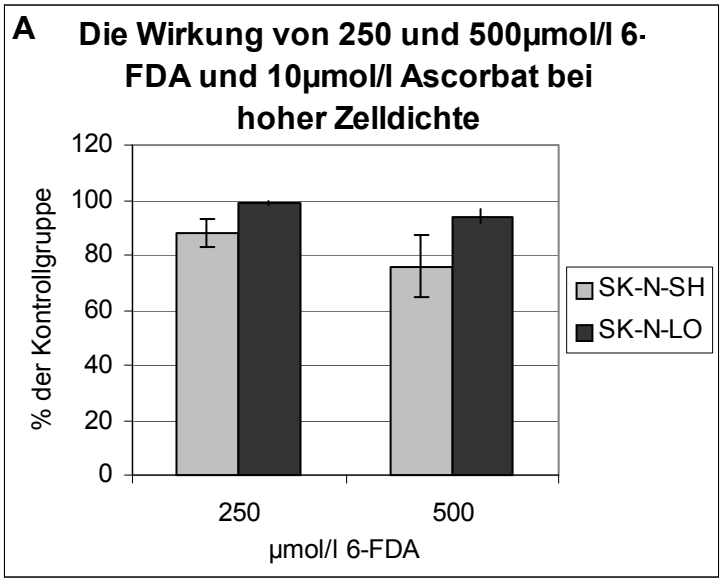


ABBILDUNG 3.12. Die Wirkung von 250 und 500µmol/l 6-Fluordopamin und 10µmol/l Ascorbat bei verschiedenen Zelldichten A bei hoher Zelldichte B bei geringer Zelldichte: *Bei der hohen Zelldichte wurden 20 000 SK-N-SH und 9 000 SK-N-LO ausgesät, bei der niedrigen Zelldichte 10 000 SK-N-SH und 4 500 SK-N-LO. Die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,092 bzw. 0,238 für die SK-N-SH und bei 0,356 bzw. 0,643 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1h inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Während 10µmol/l Ascorbat die Wirkung von 250µmol/l 6-FDA bei einstündiger Inkubation sowohl bei SK-N-SH als auch bei SK-N-LO-Zellen fast 100%ig hemmte, wenn die Zellen in hoher Konzentration ausgesät wurden, war bei niedriger Zellzahl eine deutliche Selektivität zugunsten der SK-N-SH-Zellen zu erkennen. 500µmol/l 6-FDA führte bei SK-N-SH-Zellen sowohl bei niedriger als auch bei hoher Zelldichte zu deutlichen Effekten, während SK-N-LO-Zellen durch das Ascorbat weitgehend geschützt wurden.

Der Versuch wurde unter denselben Bedingungen ein weiteres Mal durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 3.13. dargestellt.



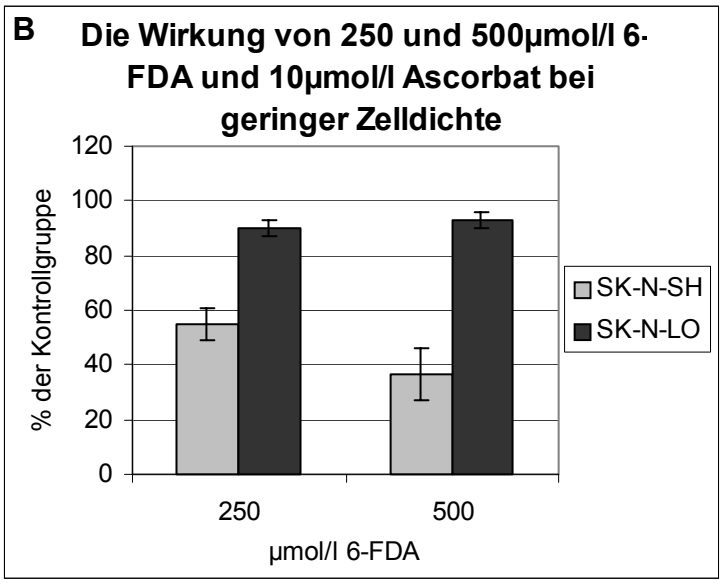


ABBILDUNG 3.13. Die Wirkung von 250 und 500µmol/l 6-Fluordopamin und 10µmol/l Ascorbat bei verschiedenen Zelldichten A bei hoher Zelldichte B bei geringer Zelldichte: *Die Extinktion der Kontrollgruppe lag bei 0,168 bzw. 0,340 für die SK-N-SH und bei 0,549 bzw. 0,874 für die SK-N-LO-Linie. Beide Ansätze wurden 1h inkubiert und dann für 4 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Einzelwerten die im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben werden, es wurde die einfache Standardabweichung angetragen.*

Die Wiederholung des Versuches führte tendenziell zu den gleichen Ergebnissen.

3. 1. 5. Zusammenfassung der Ergebnisse für die Neuroblastomzellen

6-OHDA wirkt auf beide verwendete Zelllinien toxisch, auf die SK-N-LO-Linie stärker als auf die SK-N-SH-Linie. Die Zugabe selbst geringer Mengen Vitamin C im Bereich zwischen 50µmol/l und 100µmol/l steigert die Wirkung des 6-OHDA zum Teil deutlich, vor allem bei den für diese Substanz empfindlichen SK-N-LO-Zellen.

Im Gegensatz zu 6-OHDA besitzt 6-FDA theoretisch die Eigenschaft selektiv SK-N-SH-Zellen, also Zellen die den Noradrenalin-Transporter besitzen, abzutöten oder in ihrem Wachstum zu hemmen und gleichzeitig Zellen ohne Noradrenalin-Transporter, hier SK-N-LO-Zellen, weitestgehend nicht in ihrem Wachstum zu beeinflussen. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass man auch unter optimalen Bedingungen keine vollständige Selektivität erreicht, sondern nur eine relativ stärkere Wachstumshemmung der SK-N-SH-Zellen gegenüber den SK-N-LO-Zellen. Die optimale Inkubationszeit für diesen Vorgang scheint etwa eine Stunde zu sein. Ist die Zeit kürzer, so ist, vermutlich wegen der geringeren Aufnahme von 6-FDA in die Zelle, die toxische Wirkung geringer. Ist die Inkubationszeit länger, so ähnelt die Wirkung auf die beiden Zelllinien immer mehr der Wirkung von 6-OHDA, d. h. die SK-N-LO-Linie ist aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffverbindungen stärker betroffen.

Vitamin C hat auf 6-FDA eine deutlich stabilisierende Wirkung. Bei Anwesenheit von über 30µmol/l Ascorbat ist bereits keine Wirkung des 6-FDA bei Konzentrationen von 250 und 500µmol/l mehr nachweisbar. Die Gegenwart von 10µmol/l Ascorbat allerdings führt zu einer recht deutlichen Selektivität: Während bei

einer einstündigen Inkubation mit 250 oder 500µmol/l 6-FDA SK-N-LO-Zellen praktisch vollständig geschützt blieben, führte dieser Ansatz zu einer deutlichen Hemmung des Wachstums von SK-N-SH-Zellen, die den Noradrenalin-Transporter exprimieren.

3. 2. Einfluss des 6-Fluordopamins auf hämatopoetische Stammzellen

3. 2. 1. Einfluss von 6-Fluordopamin auf hämatopoetische Stammzellen bei geringer Ascorbat-Konzentration

Unter den Bedingungen, die sich für die Neuroblastomzelllinien als die selektivsten erwiesen haben, wurden nun Kolonietests mit den angereicherten Knochenmarkstammzellen durchgeführt. Sie wurden eine Stunde mit den Wirkstoffen 6-FDA und Ascorbat inkubiert. Danach wurden die Substanzen wieder entfernt und die Stammzellen auf dem Methylzellulose-Medium ausgesät, wo sie nach 14 Tagen Kolonien bildeten, die ausgezählt werden konnten. Dabei wurden rote und weiße Kolonien getrennt ausgezählt und ins Schaubild eingetragen. Die aufgetragene Standardabweichung bezieht sich jedoch immer auf die gesamte Zellzahl.

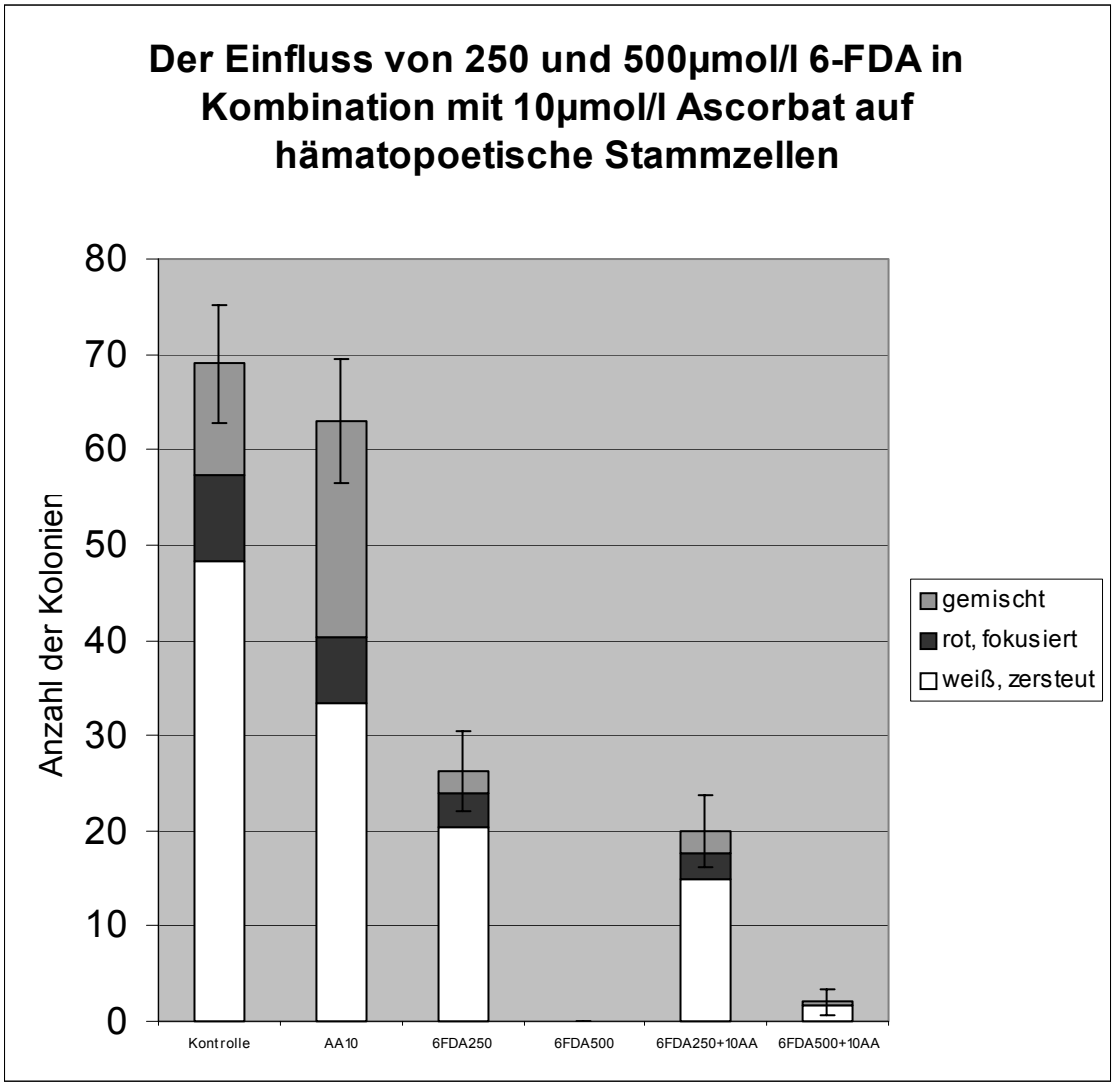


ABBILDUNG 3.14. Der Einfluss von 250 und 500µmol 6-Fluordopamin und 10µmol/l Ascorbat auf die Koloniebildung hämatopoetischer Stammzellen: *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen, die sich immer auf die Gesamtzahl der Kolonien bezieht (rote, weiße und gemischte Kolonien). Kontrolle = Kontrollgruppe ohne Wirkstoffe; AA10=10µmol/l Ascorbat*; 6FDA250=250µmol/l 6-FDA; 6FDA500=500µmol/l 6-FDA; 6FDA250+10AA=250µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat; 6FDA500+10AA=500µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat

Abbildung 3.14. zeigt, dass 6-FDA eine deutliche Wachstumsabschwächung gegenüber der Kontrollgruppe bewirkt. Das betrifft alle Kolonien: rote, weiße und

gemischte. Diese wachstumshemmende Wirkung ist deutlich dosisabhängig, so dass bei 500µmol/l 6-FDA keine Kolonie mehr wachsen konnte. 10µmol/l Ascorbat hatte auch hier einen gewissen Schutzeffekt auf die Gruppe mit 500µmol/l 6-FDA, der aber bei weitem nicht ausreichte um die toxische Wirkung des 6-FDA zu verhindern.

3. 2. 2. Einfluss von höheren Vitamin C-Konzentrationen auf die Wirkung von 6-Fluordopamin bei hämatopoetischen Stammzellen

Im folgenden Versuch sollten die obigen Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich wurde jedoch eine weitere Gruppe eingeführt, die 100µmol/l Ascorbat erhielt, sowohl mit als auch ohne 6-FDA, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Wirkung des 6-FDA mit hohen Ascorbat-Dosen antagonisierbar ist, wie es schon bei den Neuroblastomzelllinien zu beobachten war. Ist dies nicht der Fall könnte man vermuten, dass der Mechanismus, über den 6-FDA toxisch auf die Stammzellen wirkt, ein anderer ist als beim Neuroblastom. Da sich in der Gruppe mit 250µmol/l 6-FDA schon eine ausgeprägt toxische Wirkung zeigte und mit 500µmol/l kein Wachstum mehr feststellbar war, wurde diese Gruppe in den folgenden Versuchen weggelassen, so dass wieder 6 verschiedene Wirkstoffkombinationen untersucht wurden (siehe Abbildung 3.15.).

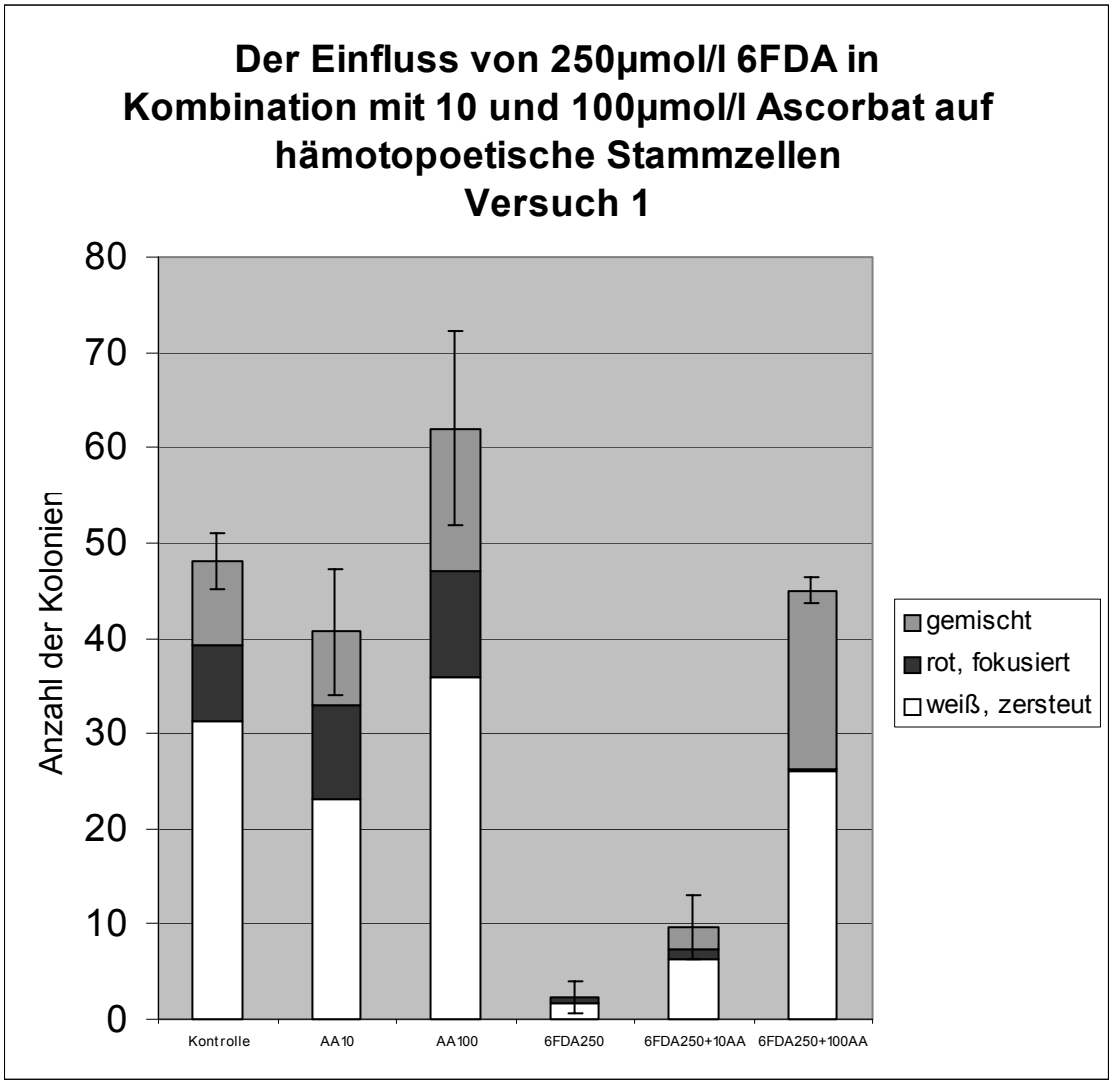


ABBILDUNG 3.15. Der Einfluss von 250µmol/l 6-Fluordopamin und 10 und 100µmol/l Ascorbat in auf die Koloniebildung hämatopoetischer Stammzellen, Versuch 1: *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen, die sich immer auf die Gesamtzahl der Kolonien bezieht (rote, weiße und gemischte Kolonien).* Kontrolle = Kontrollgruppe ohne Wirkstoffe; AA10=10µmol/l Ascorbat; 6FDA250=250µmol/l 6-FDA; 6FDA500=500µmol/l 6-FDA; 6FDA250+10AA=250µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat; 6FDA500+10AA=500µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat

Auch hier bestätigte sich wieder, dass bereits 250µmol/l 6-FDA einen sehr deutlichen hemmenden Effekt auf die Koloniebildung hatten. Dies lies sich zwar mit

geringen Ascorbat-Konzentrationen reduzieren, so dass sich das Koloniewachstum in Gegenwart von 10µmol/l Ascorbat verdreifachte, die Koloniebildung lag jedoch noch immer deutlich unter dem der Kontrollgruppe. Erst 100µmol/l Ascorbat hoben die Wirkung des 6-FDA gänzlich auf. Auffallend war der stark positive Einfluss von 100µmol/l Vitamin C auf das Wachstum der angereicherten Stammzellen.

Diese Effekte sollten in den nächsten Versuchen bestätigt werden (Abbildung 3.16. und Abbildung 3.17.).

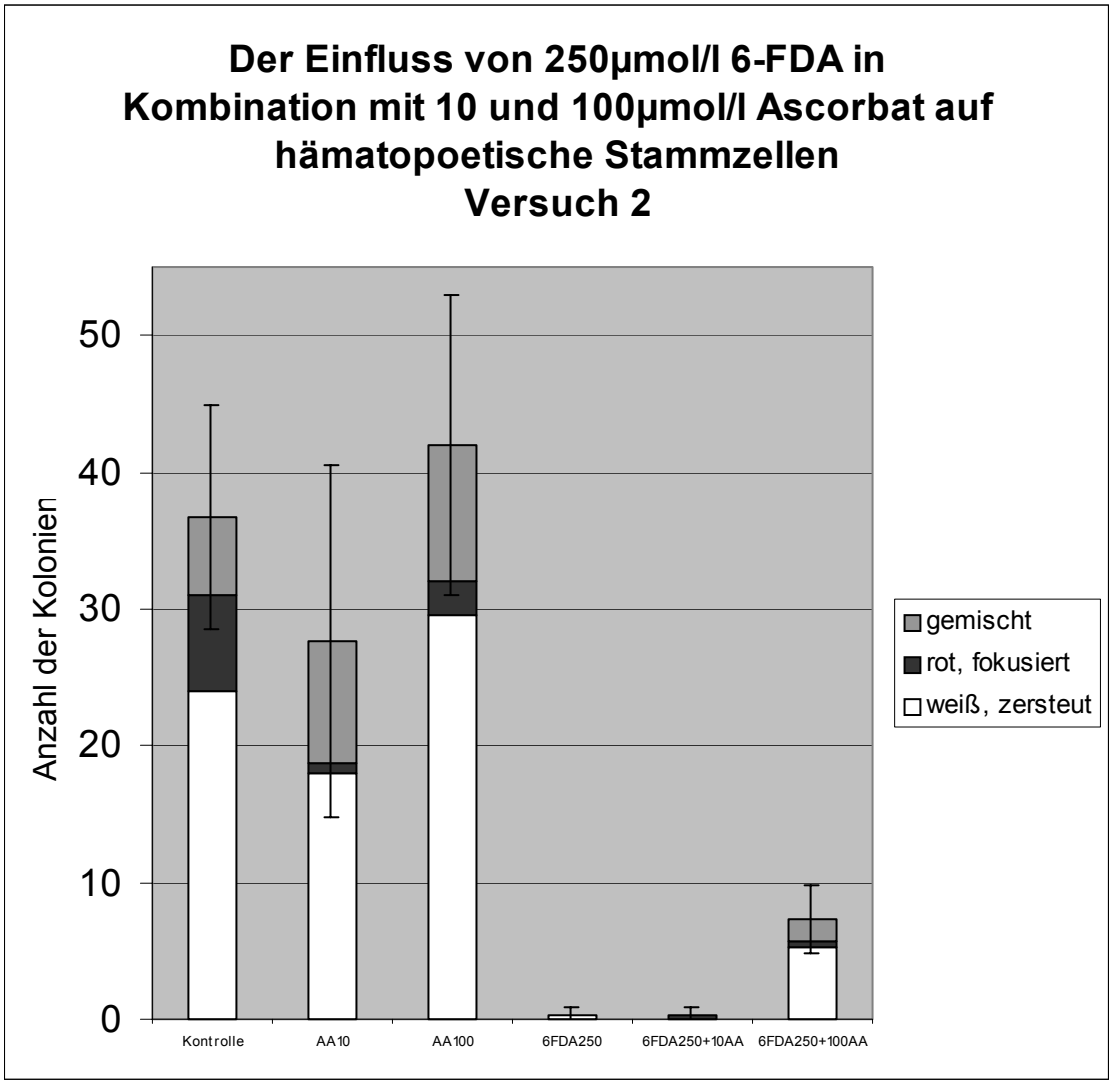


ABBILDUNG 3.16. Der Einfluss von 250µmol/l 6-Fluordopamin und 10 und 100µmol/l Ascorbat auf die Koloniebildung hämatopoetischer Stammzellen, Versuch2: *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen, die sich immer auf die Gesamtzahl der Kolonien bezieht (rote, weiße und gemischte Kolonien).* Kontrolle = Kontrollgruppe ohne Wirkstoffe; AA10 = 10µmol/l Ascorbat; 6FDA250 = 250µmol/l 6-FDA; 6FDA500 = 500µmol/l 6-FDA; 6FDA250+10AA = 250µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat; 6FDA500+10AA = 500µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat. In der Gruppe AA100 musste ein Wert als „Ausreißer" weggelassen werden, da er um 89% vom Mittelwert der übrigen Werte dieser Gruppe abwich.

Zu Abbildung 3.16: In diesem Versuch entsprachen die Ergebnisse qualitativ weitestgehend denen des vorhergehenden Versuchs. Die Gruppe mit 100µmol/l Ascorbat war hier wieder -allerdings nur geringfügig- besser gewachsen als die Kontrollgruppe. Die wachstumshemmende Wirkung des 6-FDA bestätigte sich auch hier, allerdings war der schützende Effekt des Ascorbat sowohl in der Konzentration von 10µmol/l als auch bei 100µmol/l geringer.

Um die Versuchsreihe zu komplettieren, wurde der Versuch noch ein drittes Mal wiederholt (Abbildung 3.17.).

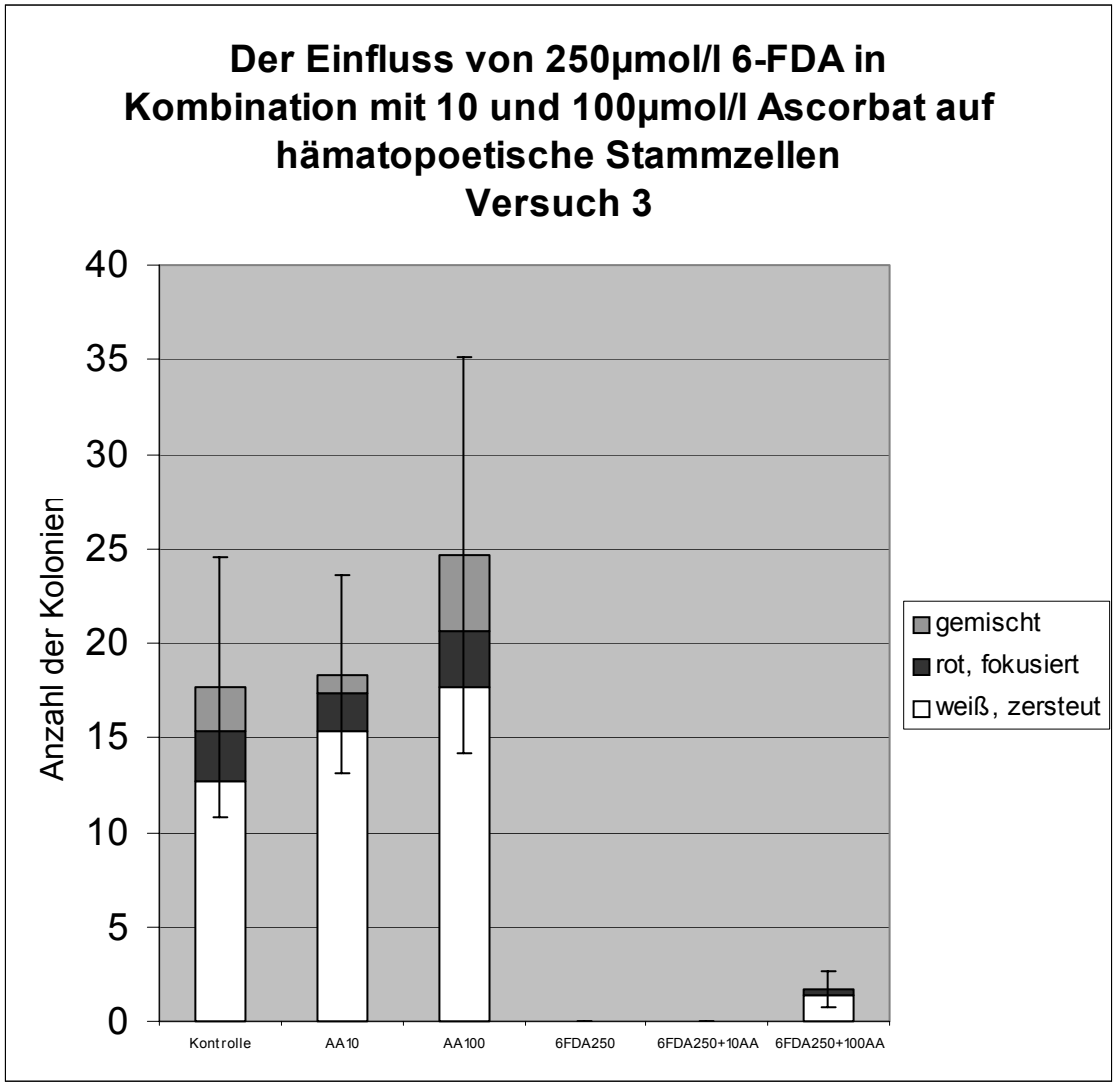


ABBILDUNG 3.17. Der Einfluss von 250µmol/l 6-Fluordopamin und 10 und 100µmol/l Ascorbat auf die Koloniebildung hämatopoetischer Stammzellen, Versuch 3: *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Alle Werte sind Mittelwerte aus 3 Kulturen. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen, die sich immer auf die Gesamtzahl der Kolonien bezieht (rote, weiße und gemischte Kolonien).* Kontrolle = Kontrollgruppe ohne Wirkstoffe; AA10 = 10µmol/l Ascorbat; 6FDA250 = 250µmol/l 6-FDA; 6FDA500 = 500µmol/l 6-FDA; 6FDA250+10AA = 250µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat; 6FDA500+10AA = 500µmol/l 6-FDA+10µmol/l Ascorbat.

Zu Abbildung 3.17.: Die Ergebnisse entsprachen qualitativ vollständig den Ergebnissen aus den beiden vorigen Versuchen, lediglich die Toxizität des 6-

FDA schien hier noch etwas ausgeprägter zu sein, sowohl mit als auch ohne Ascorbat.

3. 2. 3. Einfluss auf die Morphologie der Kolonien

Bei der Auswertung der Versuche fielen neben der unterschiedlichen Anzahl der Kolonien auch morphologische Unterschiede zwischen den Wirkstoffgruppen auf. So waren die Kolonien, denen 6-FDA beigegeben wurde, erkennbar kleiner, unabhängig von der Konzentration des 6-FDA oder der Zugabe von Ascorbat. Die Gruppe, die 10µmol/l Ascorbat erhalten hatte, verhielt sich im wesentlichen wie die Kontrollgruppe, zeigt also zahlreiche und größere Kolonien als in den 6-FDA-Gruppen. Zur Illustration wurden folgende Fotografien erstellt (Abbildung 3.18.):

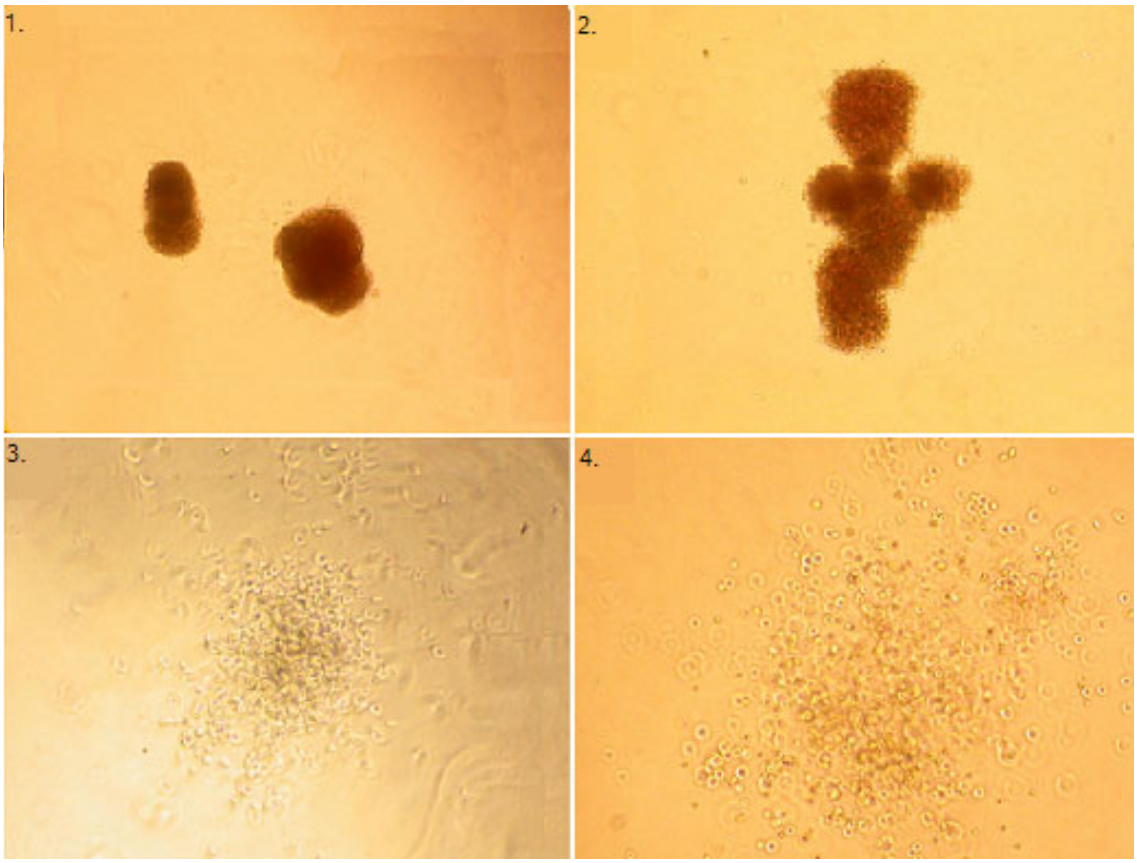


ABBILDUNG 3.18. Morphologie roter und weißer Kolonien bei einstündiger Inkubation mit 250µmol/l 6-FDA im Vergleich zur Kontrollgruppe, jeweils bei 100facher Vergrößerung: 1. Rote Kolonie (250µmol/l 6-FDA + 100µmol/l Ascorbat) 2. Rote Kolonie (Kontrolle, unbehandelt) 3. Weiße Kolonie (250µmol/l 6-FDA + 100µmol/l Ascorbat) 4. Weiße Kolonie (Kontrolle, unbehandelt)

Dieses typische Bild zeigt, dass sowohl weiße als auch rote Kolonien kleiner oder unreifer waren, wenn sie mit 6-FDA inkubiert wurden.

3. 2. 4. Zusammenfassung der Wirkung von 6-Fluordopamin und Vitamin C auf die hämatopoetischen Stammzellen

In allen Versuchen zeigte sich eine deutlich wachstumshemmende Wirkung von 6-FDA. Das Koloniewachstum lag in der Gruppe, der 250µmol/l 6-FDA zugege-

ben wurde im Mittel um 90% unter dem der Kontrollgruppe. 10µmol/l Ascorbat zeigten in Kombination mit 250µmol/l 6-FDA nur in einem Versuch einen deutlichen Schutzeffekt. In den anderen Versuchen war die Toxizität unverändert, in einem sogar geringfügig höher. Allerdings wurde im gleichen Versuch die Toxizität von 500µmol/l 6-FDA durch Ascorbat deutlich gesenkt. Daher kann man einen rein statistischen Effekt vermuten. Letztlich lässt sich aber hierüber keine endgültige Aussage treffen. Dagegen hatten 100µmol/l Ascorbat in Kombination mit 6-FDA durchgehend ein höheres Koloniewachstum zur Folge als in der Gruppe mit 6-FDA ohne Ascorbat. Es lag im Mittel fast 14mal so hoch. Allerdings war es immer noch im Mittel knapp 50% unter dem Wachstum der Kontrollgruppe.

3. 3. Der Einfluss von Vitamin C auf hämatopoetische Stammzellen

3. 3. 1. Wachstumssteigernder Effekt des Vitamin C

Schon bei den ersten Versuchen mit hämatopoetischen Stammzellen fiel auf, dass die Gruppe, der zu Vergleichszwecken nur 100µmol/l Ascorbat und kein 6-FDA gegeben wurde, ein deutlich höheres Wachstum zeigte als die entsprechende Kontrollgruppe. Da sich dieser Effekt durch die ganze Versuchsreihe hindurchzog, soll er in diesem Kapitel nochmals gesondert betrachtet werden.

In einem Vorversuch, der zur Optimierung der ausgesäten Zellzahl und zum Überprüfen der Methode dienen sollte, wurden u. a. 250µmol/l und 500µmol/l Ascorbat als Dauerinkubation getestet (Daten hier nicht gezeigt). Bei der Auswertung ergab sich ein um 9% gesteigertes Wachstum in der Gruppe, die 500µmol/l Ascorbat erhalten hatte. Auch in einem weiteren Versuch, bei dem

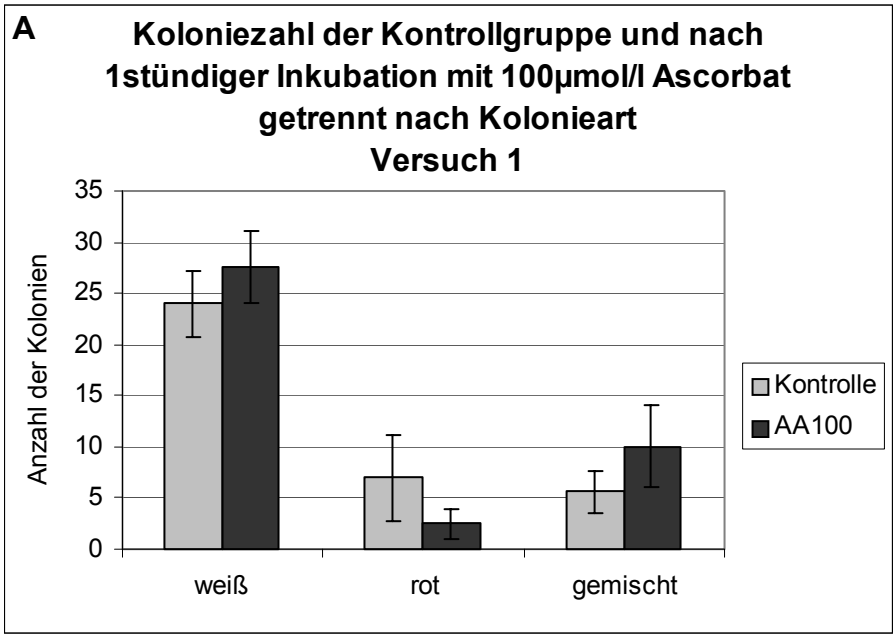
einer Gruppe 600µmol/l Ascorbat als Dauerinkubation zugegeben wurde, war das Wachstum um 28% höher als das der Kontrollgruppe (Ergebnisse in Abbildung 3.20. dargestellt). In beiden Versuchen wurde zur Auswertung ein Durchschnittswert aus je 3 Kulturschalen genommen.

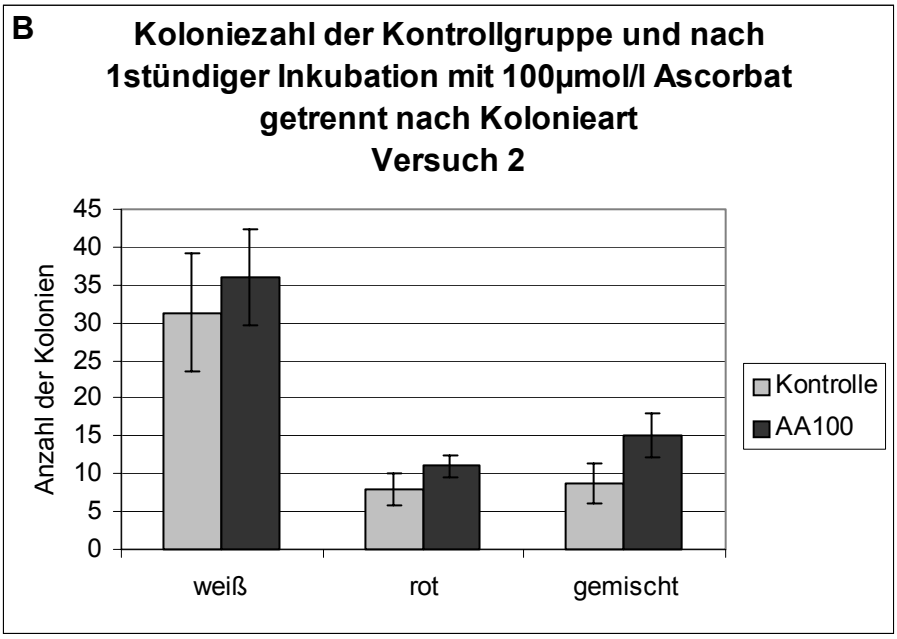
Des weiteren wurde in allen drei in Abbildung 3.15. bis Abbildung 3.17. gezeigten Versuchen unter dem Einfluss von 100µmol/l Ascorbat eine Steigerung der Koloniezahl im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Das Wachstum lag im ersten Versuch 29%, im zweiten 14% und im dritten 33% über dem der Kontrollgruppe.

3. 3. 2. Auswertung nach Kolonietypen

Da hämatopoetische Stammzellen in verschiedene Blutzellen ausdifferenzieren können, stellt sich die Frage, welcher Zelltyp von diesem wachstumssteigernden Effekt betroffen ist.

In Abbildung 3.19.a-c sind die Ergebnisse des Einflusses von 100µmol/l Ascorbat (1 Stunde Inkubation) auf das Wachstum der weißen, roten und gemischten Kolonien dargestellt:


A
Koloniezahl der Kontrollgruppe und nach 1stündiger Inkubation mit 100µmol/l Ascorbat getrennt nach Kolonieart
Versuch 1
Anzahl der Kolonien
0
5
10
15
20
25
30
35
weiß
rot
gemischt
Kontrolle
AA100


B
Koloniezahl der Kontrollgruppe und nach 1stündiger Inkubation mit 100µmol/l Ascorbat getrennt nach Kolonieart
Versuch 2
Anzahl der Kolonien
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
weiß
rot
gemischt
Kontrolle
AA100

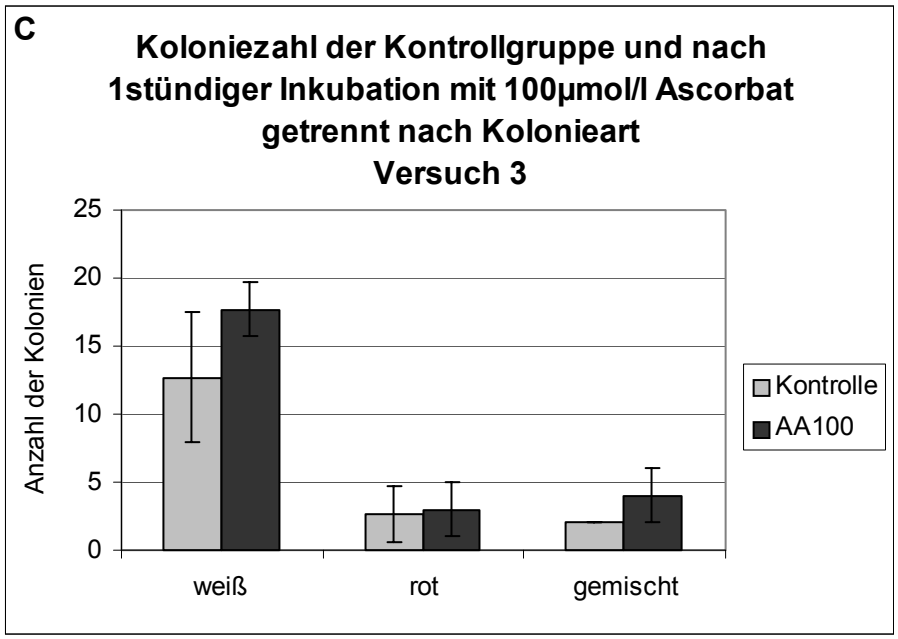


ABBILDUNG 3.19. Vergleich der Koloniezahl zwischen der Kontrollgruppe und nach 1stündiger Inkubation mit 100µmol Ascorbat getrennt nach Kolonieart, Ergebnisse aus A Versuch 1 B Versuch 2 C Versuch 3: *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Kulturenschalen. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen.*

In der Tendenz zeigt sich, dass die Versuchsgruppen, die mit 100µmol/l Ascorbat behandelt wurden, eine größere Zahl von weißen und von gemischten Kolonien ausbildeten.

Zuletzt wurde noch der Versuch, der als Dauerinkubation mit 600µmol/l Vitamin C durchgeführt wurde, nach Kolonietypen ausgewertet. Dabei ergab sich das folgende in Abbildung 3.20. gezeigte Bild:

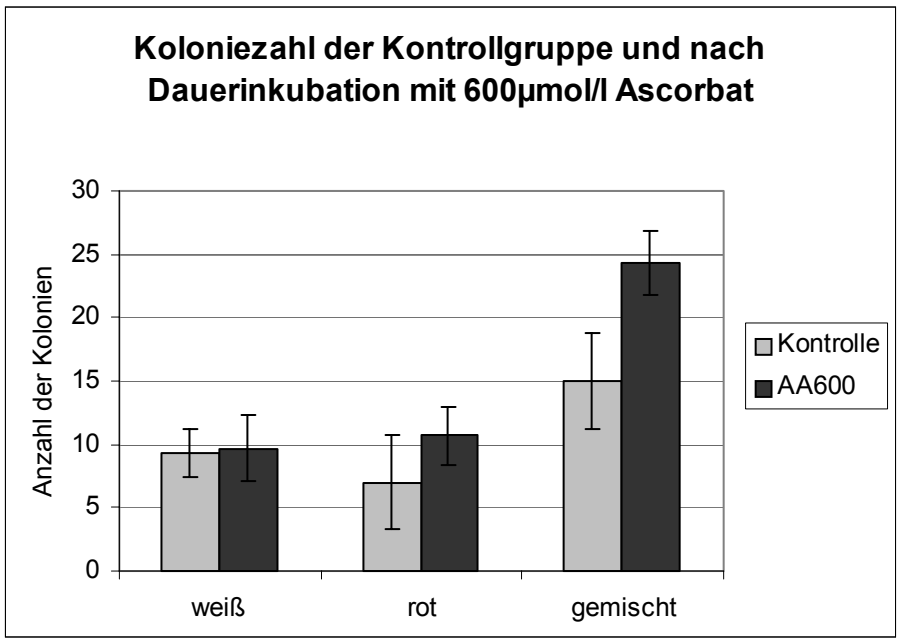


ABBILDUNG 3.20. Vergleich der Koloniezahl zwischen der Kontrollgruppe und nach Dauerinkubation mit 600µmol/l Ascorbat getrennt nach Kolonieart. *Die Zellen wurden 1 Stunde mit den Wirkstoffen inkubiert und dann für 14 Tage kultiviert. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Kulturenschalen. Es wurde die einfache Standardabweichung aufgetragen.*

Wie in jedem der vorrangegangenen Versuche war auch hier die Wirkung auf die gemischten Kolonien mit einem um 62% gesteigerten Wachstum am ausgeprägtesten. Im Gegensatz zu den einstündigen Inkubationen schien hier aber die rote Reihe mit ca. 50% mehr Wachstum vom Ascorbat zu profitieren, während die weiße unverändert blieb. Insgesamt ergaben sich aber auch mit der Dauerinkubation 42% mehr Kolonien als in der Kontrollgruppe.

Fazit. Bei der Planung der Arbeit wurden die koloniebildenden Tests als einfach durchführbare Testsysteme gewählt, um grobe Abweichung des Zellwachstums, wie sie bei Zugabe von 6-FDA entstehen, zu erkennen. Geringfügigere Wachstumsunterschiede, wie sie bei Zugabe von 100µmol/l Ascorbat entstehen, sind damit schwer nachzuweisen. Die Standardabweichung der einzelnen Versuche

ist hoch und die Ergebnisse schwanken von Versuch zu Versuch stark (eventuell aufgrund der Tatsache, dass die Zellen von unterschiedlichen Spendern stammten). Ferner wurde bei der Planung der Versuche kein besonderes Augenmerk auf die Unterscheidung der verschiedenen Kolonietypen gelegt. Die Auszählung nach Kolonietypen ist daher in dieser Versuchsreihe mit Unsicherheiten behaftet.

Versucht man dennoch die Wirkung des Ascorbats auf die verschiedenen Kolonietypen zu erfassen, ergibt sich folgendes Bild: Einzig die starke Zunahme bei den gemischten Kolonien zieht sich durch alle 4 Versuche durch. Von den anderen beiden Reihen scheint eher die weiße eine Wachstumszunahme zu erfahren, da sich in zwei Fällen mehr Kolonien gebildet haben und nur in der Dauerinkubation -bei einer weitaus höheren Dosis Vitamin C- weniger. Die Dauerinkubation mit 600µmol/l Ascorbat wurde jedoch nur einmal durchgeführt und auch hier sind die Standardabweichungen hoch. Eine endgültige Aussage zur Wirkung von 600µmol/l Ascorbat auf hämatopoetische Stammzellen in einer Dauerinkubation ist mit diesen Daten daher nicht möglich.

In jedem Fall jedoch zeichnet sich ab, dass Ascorbat tendenziell einen positiven Effekt auf die Koloniebildung hat. Es scheint daher sinnvoll diesem Phänomen nachzugehen, da die Applikation von Ascorbat klinisch nach einer Stammzelltransplantation eine Verbesserung des Anwachsens der Stammzellen und damit der Erholungsrate bewirken könnte.

3. 3. 3. Unterschiede in der Form und Größe der Kolonien nach Ascorbatbehandlung

Neben einer Zunahme in der Zahl der Kolonien wurde in den Versuchen noch beobachtet, dass die Morphologie der Kolonien in den verschiedenen Gruppen unterschiedlich war. Die Kolonien in der Gruppe mit 100 µmol/l Vitamin C waren

durchweg größer als die der Kontrolle. Auch die Zuordnung zu einer der Gruppen „weiß“, „rot“ oder „gemischt“ fiel schwerer. Zur Illustration wurden die folgenden Fotografien erstellt, die als typisch angesehen werden können (Abbildung 3.21.):

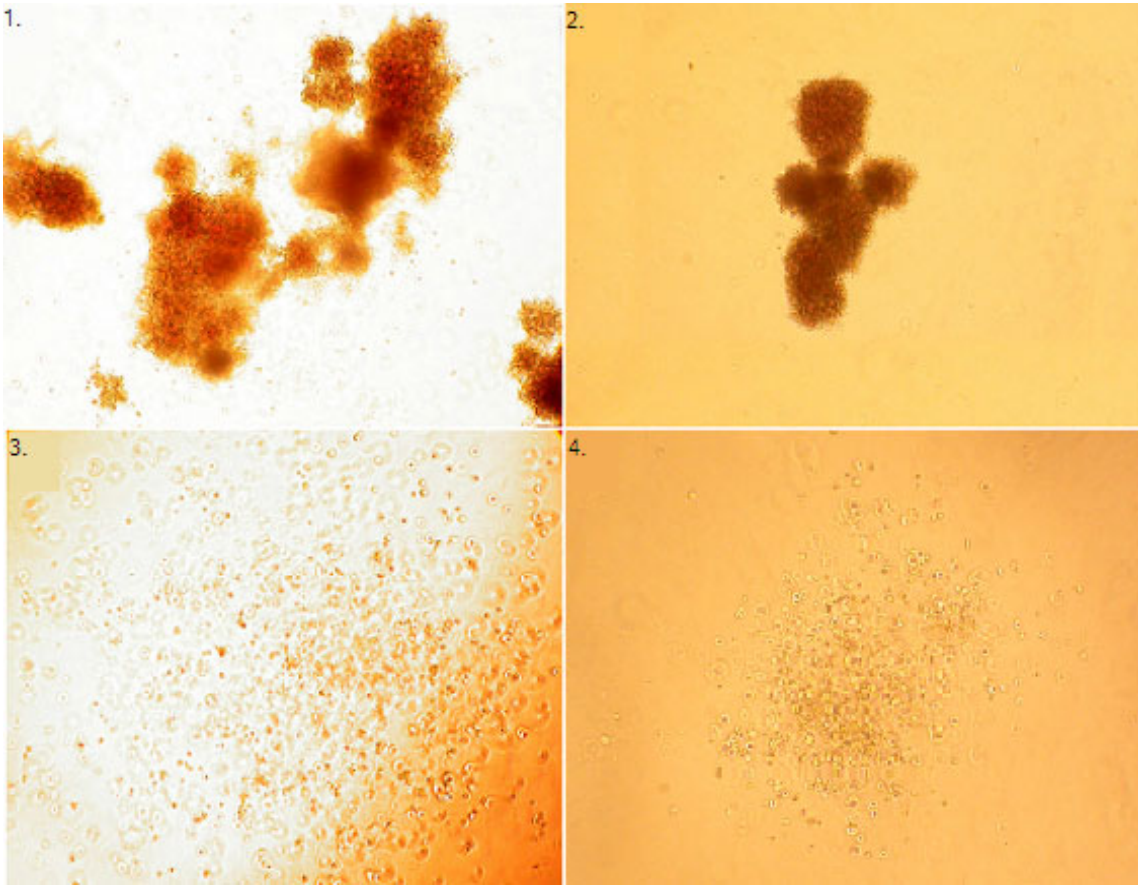


ABBILDUNG 3.21. Morphologie roter und weißer Kolonien bei einstündiger Inkubation mit 100µmol/l Vitamin C im Vergleich zur Kontrollgruppe, jeweils bei 100facher Vergrößerung: 1. Rote Kolonie mit 100µmol/l Vitamin C 2. Rote Kolonie der Kontrolle 3. Weiße Kolonie mit 100µmol/l Vitamin C 4. Weiße Kolonie der Kontrolle

Zunächst stellt man fest, dass die Kolonien, denen Ascorbat gegeben wurde, größer sind als die der Kontrollgruppe. Daneben fallen aber auch Unterschiede in der Form dieser Kolonien auf. Die Zellen sind in diesen Kolonien weniger dicht

gelagert, sondern scheinen sich über ein größeres Areal verteilt zu haben, so dass auch die Form, insbesondere der roten Kolonien, ausgefranster und weniger kompakt erscheint. Im Laufe der Versuche erwies sich, dass zunächst alle Kolonien eine Form wie die in der Kontrollgruppe hatten, und erst nach einer längeren Wachstumsphase die zerstreuten, weniger fokussierten Kolonien auftauchten. In der Gruppe, die mit 100µmol/l Ascorbat behandelt wurde, erscheinen die Kolonien daher nicht nur größer, sondern auch reifer.

3. 3. 4. Zusammenfassung der Wirkung von Vitamin C auf hämatopoetische Stammzellen

Werden hämatopoetische Stammzellen mit 100µmol/l Vitamin C für 1 Stunde behandelt, so zeigen sich in einem anschließend durchgeführten koloniebildenden Test mehr Kolonien als in der unbehandelten Gruppe. Die Zahl der Kolonien liegt in den so behandelten Gruppen im Durchschnitt um etwa 30% über der Kontrollgruppe. Bei der Auswertung nach den Koloniearten „rot“, „weiß“, „gemischt“ ergiebt sich die höchste Steigerung bei den gemischten Kolonien und eine weitere deutliche Steigerung bei den weißen Kolonien, während die Anzahl der roten Kolonien im wesentlichen unverändert bleibt. Morphologisch sind die Kolonien in der mit Ascorbat behandelten Gruppe größer und reifer als die der Kontrollgruppe. Eine Dauerinkubation mit 600µmol/l Vitamin C oder mit 500µmol/l führte hier ebenso zu einer Zunahme der Kolonien.

4. Diskussion

4. 1. Perspektiven des 6-Fluordopamins für die Behandlung des Neuroblastoms

Die Behandlung des Neuroblastoms in fortgeschrittenen Stadien vor allem bei älteren Kindern, der sogenannten Hochrisikogruppe, bleibt nach heutiger Sicht weiter problematisch. Zwar hat die Hochdosischemotherapie in Kombination mit autologer Stammzelltransplantation die Prognose verbessert, es bleibt aber dabei, dass mehr als die Hälfte der Kinder in der Hochrisikogruppe an ihrer Erkrankung versterben. Da die Dosierung der herkömmlichen Chemotherapeutika ausgereizt scheint, bleibt als einzige Möglichkeit, nach neuen Formen der Behandlung zu suchen, die spezifisch die Tumorzellen abtöten, ohne gleichzeitig den anderen Zellen des Körpers zu schaden. Eine solche Methode wird aller Wahrscheinlichkeit nach in absehbarer Zeit immer nur in Kombination mit der Hochdosischemotherapie erfolgversprechend sein. Daher muss es eine Behandlung sein, die mit den herkömmlichen Chemotherapeutika und besonders mit der autologen Stammzelltransplantation vereinbar ist oder sich im besten Fall mit ihr ergänzt.

Die entnommenen und nach der Therapie (Konditionierung) zurückgegebenen autologen hämatopoetischen Stammzellen können mit Tumorzellen verunreinigt sein, da die Oberfläche der Neuroblastomzellen den Oberflächenmarker CD34 tragen können, der als Kriterium für die Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen dient. Da die mit den Stammzellen zurückinfundierten Tumorzellen mit der heute gebräuchlichen Methode folglich keine Behandlung erfahren haben, können sie für einen Teil der Rezidive nach einer solchen Behandlung

verantwortlich sein. Für die Suche nach einem Wirkstoff, der selektiv die Neuroblastomzellen abtötet, hat es viele Vorteile, wenn er nur ex vivo an einem Stammzelltransplantat angewandt wird, da er nur seine Verträglichkeit mit den hämatopoetischen Zellen unter Beweis stellen muss. Es wurde daher in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf den Einsatz des verwendeten Wirkstoffs zur Reinigung hämatopoetischer Stammzellen gelegt.

Ausgehend von der Annahme, dass der Noradrenalin-Transporter (NA-T) nur in der Membran von sympathischen Nervenzellen und in vielen Neuroblastomzellen exprimiert wird, nicht aber in den hämatopoetischen Stammzellen, sollte es möglich sein, eine Substanz zu finden, die dadurch selektiv wirkt, dass sie nur in die Neuroblastomzellen aufgenommen wird. Eine solche Substanz muss zum einen den Katecholaminen, die vom NA-T mit hoher Affinität aufgenommen werden, ähnlich sein und zum anderen innerhalb der Zelle eine toxische Wirkung entfalten. Bereits vor einigen Jahren glaubte man, eine solche Substanz mit dem 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) gefunden zu haben. Es zeigte sich jedoch, dass 6-OHDA bei physiologischem pH-Wert extrem schnell unter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (insbesondere H_2O_2) autooxidiert, bevor es mit Hilfe des NA-T in die Zielzelle aufgenommen werden kann. Daher hat es lediglich eine unspezifisch toxische Wirkung, die auf interstitiell freigesetzte reaktive Sauerstoffverbindungen zurückgeht und unabhängig von der Expression des NA-T ist.

In Zusammenarbeit mit Prof. Stegmann vom Institut für Organische Chemie an der Universität Tübingen wurde eine Substanz entwickelt, die diesen Nachteil nicht zu haben scheint: 6-Fluordopamin wird bei pH-Werten von 7,4 nur allmählich (innerhalb von 1-2 Stunden) in 6-OHDA umgewandelt. Somit verbleibt genug Zeit für die Aufnahme durch den NA-T.

4. 2. Bewertung der Methoden

4. 2. 1. Bewertung der Methode bei den Neuroblastomkulturen

4. 2. 1. 1. Bewertung des MTT-Tests

Der MTT-Test ist ein schnelles, einfaches und zuverlässiges Verfahren zur Messung der Vitalität der verwendeten Zellkulturen und der Zytotoxizität des angewandten Wirkstoffes. Da die gemessene Extinktion proportional zur Formazankonzentration ist und diese wiederum proportional zur Anzahl der überlebenden Zellen, ist dieses Verfahren sehr gut geeignet, um quantitative Angaben über die überlebenden Zellen zu erhalten und ist daher ein gutes Maß für die Zytotoxizität des Wirkstoffes. Dank der 96-Loch-Platten und des ELISA-Readers kann eine große Anzahl an Versuchen in kurzer Zeit und mit geringem Aufwand durchgeführt werden (Slater et al., 1963; Mosmann, 1983; Hussain et al., 1993). Die Methode hat eine gute Sensitivität.

Beide in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzelllinien wachsen adhärent, weshalb bei der Durchführung des Versuchs 96-Loch-Platten mit flachem Boden, auf dem die Zellen gut anwachsen können, verwendet wurden. Der Vorteil bestand darin, dass die wirkstoffhaltige Nährlösung nach Ablauf der Inkubationszeit bequem abgesaugt werden konnte und somit eine Beeinflussung des MTT-Tests, besonders durch Ascorbat, ausgeschlossen war. Stärkere Abweichungen vom durchschnittlichen Wachstum kamen in einzelnen Wells gelegentlich vor, es zeigte sich jedoch, dass diese bevorzugt in den Randbereichen der 96-Loch-Platte lagen. Sie wurden daher in allen Versuchen nicht genutzt.

4. 2. 1. 2. Vergleichbarkeit der Zellkulturen mit entnommenen Neuroblastom-Tumoren

Unter den zahlreichen in der medizinischen Forschung verwendeten Neroblastomzelllinien gilt die Zelllinie SK-N-SH als eine für diesen Tumor typische Zelllinie. Dennoch ergeben sich in Untersuchungen Unterschiede zwischen dieser Zelllinie und entnommenen Tumorproben. So wurde zum Beispiel bei der Zelllinie SK-N-SH festgestellt, dass die Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase negativ korreliert mit der Expression des NA-T (Lode et al., 1995). Dies schien zunächst schlüssig, da Zellen, die über eine hohe Expression der Tyrosinhydroxylase viele Katecholamine produzieren, weniger Katecholamine aus der Umgebung aufnehmen müssen. Untersuchungen an Tumorproben ergaben jedoch daraufhin eine positive Korrelation von Tyrosinhydroxylase und NA-T (Seitz, 2000).

Unter 33 untersuchten entnommenen Proben von Neuroblastomtumoren wurde bei RT-PCR-Untersuchungen (Reverse-Transkriptase-PCR) nur in drei Fällen keine m-RNA oder eine nur sehr geringe Menge m-RNA für den NA-T gefunden (Seitz, 2000). Die Tumorzellen ohne NA-T m-RNA waren jedoch alle als Tumorstadium I (nach INSS siehe Kapitel 1. 1. 1. 1. auf Seite 1) klassifiziert worden. Dieses Stadium wäre für die vorliegende Arbeit ohnehin nicht relevant, da dieses Stadium rein chirurgisch therapiert wird. Die anderen 30 Tumorproben exprimierten die m-RNA für den NA-T, darunter auch alle 8 untersuchten Proben von Tumoren im Stadium 4. In einer semiquantitativen Analyse wurde daraufhin die Menge der m-RNA mit der Expression von GAP-DH verglichen, in der Annahme, dass die Expression dieses Enzyms in den Tumorproben näherungsweise konstant bleibt. Dabei ergab sich eine sehr unterschiedliche Expression des NA-T, bei der die höchsten gemessenen Werte 10 mal höher als die niedrigsten gemessenen Werte lagen. Im Durchschnitt war die Expression in den Tumorproben jedoch im Vergleich zur Zelllinie SK-N-SH etwa um 20% höher.

Funktionelle Untersuchungen zum NA-T von Neuroblastom-Tumorproben wurden an größeren Patientenkollektiven im Zusammenhang mit der MIBG-Szintigrahie durchgeführt (Geatti et al., 1985), da auch die Aufnahme von MIBG über den NA-T erfolgt. Auch dabei zeigte sich, dass beim überwiegenden Teil (ca. 90%) der untersuchten Patienten die Neuroblastomtumorzellen MIBG anreicherten und daher den NA-T besaßen (Muller-Gartner et al., 1986).

Man kann also davon ausgehen, dass im Bezug auf die Aufnahme von 6-Fluordopamin (6-FDA) die untersuchte Zelllinie SK-N-SH repräsentativ für den Durchschnitt der Neuroblastomtumoren ist, dass jedoch die Unterschiede im Bezug auf die Expression des NA-T hierbei groß sind, d. h. einige Tumoren sollten 6-FDA sehr viel besser aufnehmen als andere und dürften daher auch wesentlich besser auf eine mögliche Behandlung ansprechen. Andere Tumoren dürften es deutlich schlechter aufnehmen, als für die SK-N-SH-Linie gezeigt.

4. 2. 2. Bewertung des koloniebildenden Tests

Koloniebildende Testsysteme sind bei der Untersuchung hämatopoetischer Zellen eine gebräuchliche Methode. Sie werden oft in Transplantationslaboren verwendet, um die Qualität der gesammelten Stammzellen zu ermitteln (Niederwieser et al., 1995; Gilabert et al., 1994). Dabei hat sich gezeigt, dass die Zahl der CFUs (=colony forming units), d.h. die Zahl der koloniebildenden Einheiten, deutlich besser mit der Regenerationszeit des Transplantats korreliert als die alleinige Bestimmung der Zahl der nukleären Zellen (Graham-Pole et al., 1991). Unter Regenerationszeit versteht man hierbei die Zeit bis zum Anwachsen des Transplantats und der Wiederaufnahme der blutbildenden Aktivität. Auch bei Untersuchungen zur Effektivität von Purging-Methoden werden koloniebildende Tests häufig verwendet (Reynolds et al., 1986; Saarinen et al., 1985; Bast et al., 1985). Der Test ist dabei ohne großen apparativen Aufwand

durchzuführen und sehr sensitiv, da bereits kleine Einschränkungen im Wachstum der Zellen zu einer deutlichen Verringerung der Zahl der Kolonien führt.

4. 2. 3. Unterschiede zwischen beiden verwendeten Testsystemen

Obwohl es in den Versuchen letztlich darum ging, eine Substanz zu finden, die die Neuroblastomzellen abtötet und unter denselben Bedingungen die Stammzellen verschont, sind die angewandten Methoden quantitativ nicht vergleichbar. Der koloniebildende Test reagiert wesentlich empfindlicher auf Veränderungen der Wachstumsbedingungen als der MTT-Test, da bereits eine kleine Einschränkung der Wachstumsfähigkeit der Zellen die Koloniebildung weitgehend unterdücken kann. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die hämatopoetischen Zellen durch die 6-FDA-Gabe nicht wesentlich beeinflusst würden. Aus den Versuchen ergibt sich jedoch, dass 6-FDA bei einstündiger Inkubationszeit sowohl in einer Konzentration von 250µM als auch von 500µm die Koloniebildung beträchtlich hemmt. Die Wirkung kann mit hohen Mengen (100µM) Ascorbat teilweise aufgehoben werden.

Obwohl die Koloniebildung im vorliegenden Versuch beträchtlich gehemmt wurde, gibt es Beispiele dafür, in denen man trotz vergleichbar schlechter Daten eine klinische Studie zur Reinigung von autologem Knochenmark begonnen hat. So wurde bei einigen malignen Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) oder dem Plasmozytom, der Versuch unternommen, das nach der Hochdosis-Therapie zurückgegebene Knochenmark vorher mit Mafosfamid (Asta-Z-7654) zu reinigen. Die Effekte von Mafosfamid auf die Koloniebildung waren dabei verheerend und bei 100µg/ml war die Koloniebildung um 90% geringer (Olivieri et al., 1997; Makrynikola et al., 1991). Trotz der stark toxischen Wirkung auf die Koloniebildung wurde bei fast allen Patienten ein Anwachsen

der Stammzellen nach Rücktransfusion beobachtet (Nagler et al., 1993; Colleselli et al., 1991). Das Anwachsen des Knochenmarks verlief bei einigen Patienten jedoch langsamer als es bei unbehandeltem Knochenmark zu erwarten gewesen wäre. Es ist somit nicht gänzlich auszuschließen, dass eine klinische Studie zur Stammzellreinigung mit 6-FDA trotz der vorliegenden Ergebnisse erfolgreich sein könnte. Man muss dabei jedoch bedenken, dass es auch Hinweise gibt, die andeuten, dass eine zu langsame Wiederherstellung des Immunsystems nach autologer Stammzelltransplantation die Prognose verschlechtert (Reimer et al., 2003), da ein intaktes Immunsystem für die Bekämpfung der malignen Zellen wichtig ist. Es muss daher die Reinigung des Knochenmarks gegen die schnellere Immunrekonstitution sorgfältig abgewogen werden. Wichtig wären dabei weitere Untersuchungen an Stammzellen und an Neuroblastomzellen mit Tests, deren Ergebnisse sich quantitativ besser vergleichen lassen. Möglich ist dies mit Hilfe von koloniebildenden Stammzellassays (Salmon-Assays) mit Neuroblastomzellen. Diese sind allerdings weitaus zeitaufwendiger als der MTT-Assay.

4. 3. Interpretation der Ergebnisse

4. 3. 1. Gründe für die schwache Wirkung des 6-Fluordopamins

4. 3. 1. 1. Unterschiedliche Empfindlichkeit der Neuroblastom-Zelllinien gegenüber reaktiven Sauerstoffverbindungen

6-OHDA und 6-FDA entfalten ihre Wirkung auf die Zellen durch die Abgabe von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Im Falle des 6-OHDA werden diese Sauerstoffverbindungen aufgrund der sehr schnellen Autooxidation der Verbindung bei neutralem pH bereits im extrazellulären Bereich gebildet, so dass die selektive Wirkung verloren geht und nur eine unspezifische Wirkung zu beobachten

ist. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Zelllinie, die keinen NA-T besitzt, also die SK-N-LO-Linie, wesentlich empfindlicher auf den Wirkstoff reagierte, als die SK-N-SH-Linie, die den NA-T exprimiert. Bereits vor Beginn der Arbeit waren mehrere Gründe dafür bekannt. So exprimieren SK-N-LO-Zellen die Katalase nicht, und sie exprimieren deutlich weniger m-RNA für das Enzym Glutathion-Peroxidase (Seitz, 2000). Beide Enzyme sind wesentlich beteiligt am Abbau von reaktiven Sauerstoffen, besonders H_2O_2. Es konnte dementsprechend gezeigt werden, dass H_2O_2 in SK-N-LO-Zellen eine deutlich längere Halbwertszeit besitzt als in Zellen der SK-N-SH-Linie (Gebhardt, 1997; Hagemann, 1999). Ebenso wurde nachgewiesen, dass eine längere Einwirkzeit von H_2O_2 die Zellen stärker schädigt als eine kurze Einwirkzeit (Schrauffstätter et al., 1988). Es war also bei Verwendung von 6-OHDA eine wesentlich stärkere Empfindlichkeit der SK-N-LO-Linie zu erwarten gewesen. Im Falle des 6-FDA liegen die Dinge anders: 6-FDA wird bei neutralem pH langsam (im Minuten bis Stundenbereich) in 6-OHDA umgewandelt, d. h. es steht genügend Zeit zur Verfügung, dass ein erheblicher Teil der Substanz von NA-T exprimierenden Zellen aufgenommen wird, bevor die Umwandlung zu 6-OHDA erfolgt. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen wurde die Wirkung von 6-FDA vergleichend auf eine NA-T exprimierende Zelllinie (SK-N-SH) und eine nicht exprimierende Zelllinie (SK-N-LO) vergleichend untersucht.

Da die vorliegende Arbeit vor allem mit dem Ziel durchgeführt wurde hämatopoetische Stammzellen von Neuroblastomzellen zu reinigen, kam es jedoch auch auf die Toxizität gegenüber den hämatopoetischen Stammzellen an. Diese exprimieren sowohl Katalase als auch Glutathion-Peroxidase. Es war also zunächst zu erwarten gewesen dass die Selektivität von 6-FDA zwischen den SK-N-SH-Zellen und den hämatopoetischen Stammzellen höher ist als zwischen den SK-N-SH-Zellen und den SK-N-LO-Zellen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Neben den in Kapitel 4. 2. 3 genannten Unterschieden der angewandten Testsysteme kommen dafür weitere Gründe in Betracht.

4. 3. 1. 2. Expression des Noradrenalin-Transporters innerhalb einer Zelllinie

Während bei Gabe von 250µM 6-FDA lediglich etwa 40-50% der SK-N-SH-Zellen abgetötet wurden, waren es bei einer äquimolaren Menge 6-OHDA etwa 80%, bei der SK-N-LO-Linie sogar über 90% nach 1stündiger Inkubation. Dieser relativ große Unterschied kann wie folgt erklärt werden:

1. Durch die schnelle Autooxidation des 6-OHDA wird sehr schnell eine große Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen gebildet. Im Gegensatz dazu fallen pro Zeiteinheit bei Inkubation mit 6-FDA diese reaktiven Sauerstoffmetabolite viel langsamer an, die Zelle hat also mehr Zeit, mit diesem oxidativen Stress fertig zu werden.
2. Neuroblastomtumoren gelten generell als sehr heterogen hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades und ihrer Eigenschaften. Dies gilt auch innerhalb etablierter Zelllinien. So konnte Ross et al., 1981 zeigen, dass sich die Katecholamin-Synthese, wie auch die Expression der dafür notwendigen Enzyme von Zelle zu Zelle stark unterscheidet und u.a. auch abhängig vom Wachstumszustand der jeweiligen Zelle ist. Es ist anzunehmen, dass das auch für die Expression des NA-T gilt. Die Funktionsfähigkeit des NA-T lässt sich beurteilen, indem man eine Substanz, die nur über den NA-T aufgenommen wird, in der Zelle nachweist. Dafür bietet sich [^{131}I]mIBG an. Es gelangt über den NA-T in die Zelle und lässt sich dank seiner Radioaktivität leicht nachweisen. Dabei wurde festgestellt, dass lediglich 10 Prozent der Zellen einer SK-N-SH-Linie eine eindeutige [^{131}I]mIBG-Aufnahme zeigten (Guerreau et al., 1990). Diese Ergebnisse sind jedoch lediglich eine Momentaufnahme. Hängt auch die NA-T-Expression vom

Zellwachstum ab, so könnten Zellen in einer anderen Passage mit stärkerem oder schwächerem Wachstum durchaus ein anderes Aufnahmeverhalten zeigen. Es sind also weitere Untersuchungen notwendig, um zu zeigen, wie viele der Neuroblastomzellen einer SK-N-SH-Linie tatsächlich funktionsfähige NA-T in ihrer Membran haben. Erst daraus kann dann auf die Wirksamkeit des 6-FDA geschlossen werden.

Für die Zelllinie SH-SY5Y, einer Tochterzelllinie der SK-N-SH-Linie wurde berichtet, dass sie nach 13-tägiger Behandlung mit Retinoiden in eine differenziertere Form übergeht (Preis et al., 1988). Während die undifferenzierte Form dabei mIBG nur langsam und nur in geringen Mengen aufnahm, konnte nach der Behandlung eine deutlich beschleunigte mIBG-Aufnahme beobachtet werden (Iavarone et al., 1993). Dieser Versuch zeigt, dass es mögliche sein sollte, die Zahl der NA-T in der Membran von Neuroblastomzellen zu steigern und damit auch die Wirksamkeit von 6-FDA zu erhöhen. Bisher fehlen jedoch noch geeignete Konzepte, mit denen eine solche Steigerung der membranständigen NA-T während eines Purgings der hämatopoetischen Zellen durchgeführt werden kann.

4. 3. 2. Gründe für die Empfindlichkeit der hämatopoetischen Stammzellen gegenüber 6-Fluordopamin und mögliche Gegenmaßnahmen

4. 3. 2. 1. Der Dopamin-Transporter der hämatopoetischen Stammzellen

6-FDA hatte auf die Neuroblastomzellen eine selektive Wirkung und tötete bevorzugt die SK-N-SH-Zellen ab, die den NA-T exprimieren -obwohl die NA-T negativen SK-N-LO-Zellen prinzipiell empfindlicher gegen reaktive Sauerstoffmetabolite sind. Überraschend war jedoch die starke Hemmung der Koloniebil-

dung bei den hämatopoetischen Stammzellen. Da die Stammzellen Katalase und Glutathion-Peroxidase exprimieren (Gonzales et al., 1984) und allgemein als weniger empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffverbindungen gelten (Bruchelt et al., 1985), reicht die unspezifische extrazelluläre Bildung von H_2O_2 nicht als Erklärung aus. Auf der anderen Seite scheint sich der Mechanismus, über den 6-FDA seine toxische Wirkung auf die Stammzellen entfaltet, nicht wesentlich von der Wirkung auf die Neuroblastomzellen zu unterscheiden. Denn hohe Mengen an Ascorbat, die die Umwandlung in 6-OHDA und damit die Freisetzung von H_2O_2 reduzieren, konnten die Toxizität für die Stammzellen teilweise aufheben. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass 6-FDA in die hämatopoetischen Zellen ebenfalls aufgenommen wird und sich dort genauso verhält wie in den SK-N-SH-Zellen und durch Umwandlung in 6-OHDA und Freisetzung von H_2O_2, die Zellen irreversibel schädigt.

Zyrafete Kuci aus unserem Labor hat in der Zwischenzeit mit PCR-Untersuchungen gezeigt, dass auch hämatopoetische Stammzellen geringe Mengen an NAT exprimieren. Darüber hinaus haben sich in den letzten Jahren neue Erkenntnisse über den Dopamin-Transporter ergeben. Während man früher annahm, dass Dopamin und damit auch der Dopamin-Transporter nur in den Nervenzellen als Neurotransmitter eine Rolle spielen, so weiß man heute, dass es eine enge anatomische (Felten, 1993) und auch funktionelle Beziehung (Friedman et al., 1997) zwischen dem Immunsystem und den Nervenendigungen gibt. Diese Beziehung scheint auch pathophysiologische Bedeutung zu haben, z. B. bei der Multiplen Sklerose (Chelmika-Schorr et al., 1994). Der Dopamin-Transporter wurde in der Membran von Lymphozyten nachgewiesen (Bergquist et al., 1994; Faraj et al., 1995). Dabei wurden immunfluoreszierende Antikörper, die spezifisch an das Carboxy- bzw. an das Amino-terminale Ende des Dopamin-Transporters binden, mit den Lymphozyten inkubiert und dabei zeigte sich eine spezifische Färbung der Plasmamembran der gesamten Lymphozyten-Popula-

tion. Ebenso konnte man zeigen, dass die Lymphozyten Dopamin aufnehmen können, und dass diese Dopaminaufnahme durch verschiedene Pharmaka wie Mazindol, GBR 12909 oder Benzotropin gehemmt werden kann (Amenta et al., 2001). Diese Pharmaka hemmen charakteristischerweise die Aktivität des Dopamin-Transporters. Desimipramin, eine Substanz, die vor allem den NA-T blokkiert, war erst in sehr hohen Konzentrationen wirksam, Fluoxetin, ein Hemmer des Serotonin-Transporters zeigte überhaupt keine Wirkung. Insbesondere die Tatsache, dass nicht nur Subpopulationen von Lymphozyten, sondern alle Lymphozyten diese Eigenschaften haben, unterstützte die Vermutung, dass auch die Vorläuferzellen der Lymphozyten, die hämatopoetischen Stammzellen, den Dopamin-Transporter besitzen. Marino et al. gelang es 1999 eine Dopamin-Aufnahme hämatopoetischer Zellen auch nachzuweisen. Gleichzeitig zeigte er, dass die hämatopoetischen Stammzellen auch Dopamin synthetisieren (Musso et al., 1996) und freisetzen können. Die Dopamin-Aufnahme dieser Zellen bei Zugabe von Dopamin-Aufnahme-Hemmern entsprach dabei der gleichen Charakteristik wie oben für die Lymphozyten beschrieben und lässt daher vermuten, dass hämatopoetische Stammzellen den Dopamin-Transporter besitzen.

Im Gegensatz zum NA-T ist der Dopamin-Transporter, wie schon eingangs beschrieben, ein sehr spezifischer Transporter, der die meisten Katecholamin-Analoga, z. B. auch mIBG, nicht aufnimmt. Allerdings ist die räumliche Struktur des 6-FDA dem Dopamin sehr ähnlich. Es unterscheidet sich nur dadurch, dass ein Wasserstoff am 6. C-Atom durch ein Fluor-Atom ersetzt wurde. Für die Größe von Atomen sind bei kovalenten Bindungen die Kovalenzradien, bei unterschiedlichen Molekülen die van der Waals-Radien maßgeblich. Dabei nimmt man die maximale Annäherung, die zwischen zwei Atomen des gleichen Elements an verschiedenen Molekülen möglich ist, zwischen denen nur die van der Waals-Kräfte wirken. Diese wirken auch bei der Wechselwirkung von Dopamin mit seinem Transporter. Der van der Waals-Radius von Wasserstoff beträgt

120 pm, der von Fluor 147 pm, was wesentlich weniger ist als der van der Waals-Radius von anderen in organischen Verbindungen vorkommenden Elementen. So hat Sauerstoff 152 pm, Stickstoff 155 pm, Kohlenstoff 170 pm und Schwefel 180 pm (Mortimer, 2001). Noch wesentlich größer ist folglich auch der van der Waals-Radius der Hydroxy-Gruppe des 6-OHDA, da er sich aus dem Radius des Wasserstoffs und dem des Sauerstoffs zusammensetzt. Es wäre also denkbar und sogar wahrscheinlich, dass 6-FDA genau wie Dopamin durch den Dopamin-Transporter selektiv in die hämatopoetischen Stammzellen aufgenommen wird.

Ein weiterer Transporter für Katecholamine konnte bei den Lymphozyten nachgewiesen werden: der vesikuläre Monoamin-Transporter (VMAT) (Amenta et al., 2001). Er ist für die aktive Aufnahme der Monoamine in die Speichervesikel notwendig. Da die Speichervesikel bei der Ausschüttung der Katecholamine mit der Memban fusionieren, konnte er auch in der Zellmembran gefunden werden. Dabei ist jedoch die Innenseite der Vesikel nach außen gerichtet, so dass der aktive Transport aus der Zelle herausführt. Eine Aufnahme relevanter Mengen an Dopamin ist daher über diesen Transporter unwahrscheinlich.

4. 3. 2. 2. Kombination von 6-Fluordopamin mit einem selektiven Hemmer der Dopamin-Transporters

Die Grundlage der Arbeit beruhte auf der Annahme, dass es möglich sein muss Neuroblastomzellen mit 6-FDA spezifisch abzutöten, weil diese mit dem NA-T einen Transporter in ihrer Membran besitzen, den hämatopoetischen Zellen wahrscheinlich, wenn überhaupt, in weit geringerem Maße exprimieren. Dies scheint weiterhin wahrscheinlich, da andere Dopamin-Analoga wie mIBG, die ausschließlich vom NA-T aufgenommen werden, sich zwar in der Leber, nicht aber im Knochenmark anreichern (Muller-Gartner et al., 1986). So ist anzunehmen, dass 6-FDA über den Dopamin-Transporter aufgenommen wird. Grund-

sätzlich wäre es daher möglich, nach einer neuen Substanz zu suchen, die von dem für Dopamin spezifischen Dopamin-Transporter nicht aufgenommen wird, sondern nur vom wesentlich unspezifischeren NA-T. Einfacher wäre jedoch 6-FDA in Kombination mit einem selektiven Hemmer des Dopamin-Transporters zu kombinieren. Unter den Pharmaka, von denen bekannt ist, dass sie den Dopamin-Transporter hemmen, z. B. die Antidepressiva Desipramin und Fluoxetin oder auch Kokain, beeinflussen leider die meisten den NA-T ebenfalls (McElvain et al., 1992). Lediglich einige neuere Substanzen, die auf ihre Anwendbarkeit als Psychopharmaka getestet werden, unter ihnen Vanoxerine (GBR 12909) (Davids et al., 2002; Preti, 2000), GBR 13119, GBR 12783 (Drouin et al., 2002), Nomifensin (Palladini et al., 1996) oder Bupropion (Chouinard 1983) sollen selektiv den Dopamin-Transporter hemmen. Da sich in dieser Arbeit gezeigt hat, dass die Methode an sich funktioniert und NA-T-exprimierende Neuroblastomzellen wie die der SK-N-SH-Linie selektiver abgetötet werden und da in den Neuroblastomzellen vermutlich lediglich der NA-T und nicht der Dopamin-Transporter exprimiert wird (Lode et al., 1995), besteht mit Hilfe dieser Medikamente die Chance, dass damit die 6-FDA-Aufnahme in die Stammzellen gehemmt wird, ohne die Wirkung auf NA-T exprimierende Neuroblastomzellen zu beeinträchtigen. Somit könnte die Methode eventuell mit dieser Modifikation doch noch erfolgreich durchgeführt werden.

4. 3. 3. Nutzen der Stammzellreinigung

Schon seit die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation in der Krebsbekämpfung angewandt wird, bemüht sich die Forschung darum, eine Methode zu finden, um die transplantierten Stammzellen von Tumorzellen zu befreien. Dies gilt nicht nur für das Neuroblastom, sondern auch für alle Formen der Leukämie und andere häufig in das Knochenmark metasta-

sierende Tumoren. Dass eine Reinigung der Stammzellen die Prognose des Patienten verbessert, wurde lange Zeit als selbstverständlich vorrausgesetzt, zumal die Prognose von Patienten, die Knochenmark von einem fremden, allogenen Spender erhalten haben, signifikant besser ist, als die von autolog transplantierten (Matthay et al., 1994). Dennoch ist es bisher nicht gelungen mit einer Methode zur Reinigung autologer Stammzellen die Prognose der so behandelten Patienten zu verbessern (Gorin, 2002) und man kann sich durchaus fragen, ob Methoden zur Reinigung hämatopoetischer Zellen überhaupt einen Vorteil bringen (Gribben et al., 1993). Die bessere Prognose der Empfänger von fremdem Knochenmark erklärt man heute eher mit der starken immunologischen Reaktion des transplantierten Immunsystems als mit der fehlenden Kontamination durch Tumorzellen. Dabei führt die beständige Abstoßungsreaktion (Graft-versus-Host Effekt) der transplantierten immunkompetenten Zellen zu einer vermehrten Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorzellen (Graft-versus-Tumor Effekt). Auch wenn es gelingt, die in der Arbeit vorgestellte Methode, beispielsweise durch den Einsatz von Hemmern des Dopamin-Transporters, in den kommenden Jahren erfolgreich zu etablieren, wird daher noch zu klären sein, inwieweit die durchgeführte Reinigung der Stammzellen überhaupt einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie hat.

Bringt man alle Punkte zusammen, so entstehen doch gewisse Zweifel, ob es sinnvoll ist, -entgegen der ursprünglichen Zielsetzung- eine Substanz wie 6-Fluordopamin für eine spätere klinische Anwendung in Betracht zu ziehen: Eigenschaften die dagegen sprechen sind einerseits, dass nicht alle Neuroblastomzellen 6-FDA aufnehmen, andererseits auch die in dieser Arbeit erhobenen Befunde, dass 6-FDA eine unerwartet hohe Toxizität gegenüber hämatopoetischen Stammzellen aufwies. Nicht zuletzt ist es auch die Tatsache, dass die benötigten Konzentrationen zur Abtötung der Zellen recht hoch sind (>200µmol/l), sodass auch mit „Dopamin“-Nebenwirkungen gerechnet werden muss (es ist

anzunehmen, dass sich 6-FDA pharmakologisch ähnlich wie Dopamin verhalten würde). Auf alle Fälle scheint 6-FDA dem häufig verwendeten 6-OHDA bei experimenteller Zerstörung von Zellen, die Katecholamin-Transporter besitzen, überlegen zu sein: Die Aussage der „selektiven Zerstörung“ von Katecholamin-produzierenden Zellen (z.B. von Dopamin-produzierenden Substantia nigra Zellen) durch 6-OHDA ist offensichtlich nur dadurch machbar, dass man „Kollateralschäden“ beim Einsatz dieser Substanz nur wenig Beachtung schenkt.

Obwohl die Ergebnisse dieser Doktorarbeit nun zu dem Schluss geführt haben, das Konzept zur Verwendung von 6-FDA zur Therapie des Neuroblastoms fallen zu lassen, hat sich ein anderer, vielversprechender Ansatz aufgetan: 6-FDA kann in seiner [^{18}F]-markierten Form zur PET-Analyse eingesetzt werden. An der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in Tübingen werden zur Zeit Konzepte erarbeitet, diese Substanz in Kombination mit [^{18}F]-Desoxyglucose zur Diagnostik und Therapieverlaufskontrolle beim Neuroblastom einzusetzen. Dabei sollen mit [^{18}F]-6-FDA Katecholamin-aufnehmende Neuroblastomzellen erfasst werden, mit [^{18}F]-Desoxyglucose weniger differenzierte, die mit 6-FDA nicht erfasst werden. Da die Halbwertszeit von Fluor-18 nur ca. 2 Stunden beträgt, können in zeitlich kurzen Abständen beide fluorierten Verbindungen zum Einsatz kommen. Zur Zeit wird am PET-Zentrum in Tübingen die Synthese von [^{18}F]6-FDopa etabliert, aus dem mit enzymatischer Decarboxylierung [^{18}F]-FDA hergestellt werden soll.

4. 4. Zur Wirkung des Vitamin C auf die hämatopoetischen Stammzellen

4. 4. 1. Bewertung der Ergebnisse

Die Kombination 6-FDA+Ascorbat wurde in dieser Arbeit verwendet, um die extrazelluläre Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA zu verzögern und dadurch die Aufnahme von 6-FDA zu steigern. Dabei zeigte sich bei Kontrollexperimenten, bei denen nur Ascorbat (ohne 6-FDA) eingesetzt wurde, dass Ascorbat alleine einen steigernden Einfluss auf die Koloniebildung der hämatopoetischen Stammzellen hat.

In zwei Vorversuchen zeigte sich bei 500µM und 600µM Ascorbat als Dauerinkubation ein um 9% (400 Kolonien +/-10, gegenüber 365 Kolonien +/-30 in der Kontrollgruppe) bzw. 28% (41,6 +/- 21 Kolonien gegenüber 31,3 +/-17 Kolonien in der Kontrollgruppe) gesteigertes Wachstum. Dabei lag der zweite der beiden Werte allerdings innerhalb einer Standardabweichung. Außerdem wurden diese beiden Versuche nur als orientierende Vorversuche geplant und nicht 3 mal durchgeführt. Das Ergebnis bei Dauerinkubation hat daher keinerlei statistische Signifikanz, und weitere Versuche dazu sind unerlässlich, bevor eine Aussage zur Wirkung von Ascorbat als Dauerinkubation auf hämatopoetische Stammzellen gemacht werden kann.

Erst die weiteren Versuche wurden bei 100µM Ascorbat und einer Stunde Inkubation 3 mal durchgeführt. Auch hier lagen die Ergebnisse in zwei der drei Versuche innerhalb einer Standardabweichung. Dennoch war die Anzahl der Kolonien in allen drei Versuchen höher als in der Kontrollgruppe und es ergaben sich durchschnittlich 27% mehr Kolonien bei Inkubation mit Ascorbat.

Bei der Auswertung der Kolonien nach roten, weißen und gemischten Kolonien ergab sich nur in der Gruppe der gemischten Kolonien eine eindeutige Wachstumssteigerung, die sich in allen drei Versuchen zeigte. Daneben waren die Ergebnisse für die roten und weißen Kolonien unterschiedlich und weitere Versuche sind notwendig um hier eine eindeutige Aussage treffen zu können. Die Ergebnisse in dieser Versuchsreihe würden eher darauf hindeuten, dass die Reihe der weißen Kolonien stärker vermehrt ist. In der Literatur werden bei solchen koloniebildenden Tests die Kolonietypen noch weiter unterschieden. Die weiße Reihe wird untergliedert nach Makrophagen-Kolonien, Granulozyten-Kolonien und Megakaryozyten-Kolonien (Galli et al., 1994; Zauli et al., 1994; Lansdorp et al., 1992). Die roten Kolonien werden oft nach fokussierten roten und zerstreuten roten Kolonien unterschieden.

4. 4. 2. Anwendungsmöglichkeiten der Vitamin C-bedingten Wachstumssteigerung

In der Vergangenheit wurden schon große Anstrengungen unternommen, um das Wachstum hämatopoetischer Stammzellen bei Stammzelltransplantation nach der Konditionierung zu steigern, in der Hoffnung, dadurch ein schnelleres Anwachsen der Zellen zu erreichen. Klinisch wurden bisher mit Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF), Granulozyten-Colony-Stimulating-Faktor (G-CSF) und Erythropoeitin (EPO) signifikante Erfolge erzielt. Obwohl diese Medikamente teuer sind, werden sie mittlerweile routinemäßig eingesetzt, da sie in der Lage sind, die Phase der Aplasie zu verkürzen, und damit die Risiken für den Patienten zu verringern, an therapiebegleitenden nosokomialen Infektionen zu erkranken (Sohn et al., 2002). Dabei verkürzen diese Medikamente den Klinikaufenthalt (Linch et al., 1997), verbessern damit die Lebensqualität, senken den Verbrauch an Antibiotika und anderer Medikamente und können somit auch die Behandlungskosten reduzieren. Eine auch nur

geringe Stimulation der Koloniebildung durch Vitamin C könnte daher von großem Interesse sein, da auch minimale Wachstumssteigerungen bei den Stammzellen große Vorteile bringen, sowohl für den einzelnen Patienten als auch mit Blick auf die Behandlungskosten. Hinzu kommt noch, dass Vitamin C eine ungewöhnlich gut tolerierte Substanz ist (Friedrich, 1988), und eine Überdosierung aufgrund der guten Ausscheidung über die Niere als unwahrscheinlich gilt (Rivers, 1987). Erst bei Einnahme von 10g und mehr Vitamin C scheinen Durchfall, Erbrechen und Magenkrämpfe als Nebenwirkungen gesichert (Halliwell, 1994). Daneben ist Vitamin C eine Substanz, die von der chemischen Industrie in großer Menge zu vielfältigen Zwecken günstig produziert werden kann und deshalb nur einen Bruchteil der Kosten der oben genannten gentechnisch hergestellten Wachstumsfaktoren verursacht.

Im den vorliegenden Versuchen wurden Nährböden verwendet, die die Wachstumsfaktoren EPO (Erythropoeitin), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Colony Stimulating Faktor), IL-3 (Interleukin 3) und SCF (Stem Cell Faktor) zur besseren Anzüchtbarkeit der hämatopoetischen Zellen enthielten. Gerade in Kombination mit diesen Substanzen, die teilweise auch in vivo zur Wachstumsstimulation der Zellen verwendet werden, zeigte sich die Wirkung von Vitamin C. Es scheint daher sinnvoll, die Möglichkeit einer kombinierten Gabe von Vitamin C zusätzlich und den schon heute routinemäßig bei autologer Stammzelltransplantation gegebenen Wachstumsfaktoren zu prüfen.

Da in den Versuchen eher die Reihe der weißen Kolonien stimuliert wurde, könnten die Ergebnisse weiterer Untersuchungen auch einen Beleg für die immer wieder geäußerte Vermutung sein, dass Vitamin C in der Lage ist, das Immunsystem positiv zu beeinflussen (Perla, 1941).

5. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der zweithäufigste solide Tumor des Kindesalters und hat in fortgeschrittenen Stadien eine ungünstige Prognose. Da Screeninguntersuchungen zur Früherkennung keine Verbesserung der Heilungschancen erbrachten, lässt sich eine Verbesserung der Prognose lediglich durch eine bessere Therapie, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, erreichen. Die Therapie in fortgeschrittenen Stadien besteht dabei in einer Hochdosischemotherapie mit Konditionierung und anschließender Reinfusion eigener Stammzellen. Dabei weiß man, dass die nach der Therapie reinfundierten Stammzellen häufig bereits von Tumorzellen befallen sind. Zur Reinigung der autologen Stammzellen lässt sich theoretisch die Tatsache nutzen, dass Neuroblasomzellen in ihrer Membran den Noradrenalin-Transporter (NA-T) besitzen, der den meisten menschlichen Zellen fehlt. Hierzu benötigt man eine Substanz, die selektiv über den NA-T aufgenommen wird und in der Zelle toxisch wirkt. Die selektive Aufnahme von Noradrenalin-Analoga in Neuroblastomzellen wird heute bereits diagnostisch mit der [^{123}J]mIBG-Szintigraphie zur Suche von Metastasen genutzt.

Von der Substanz 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) erhoffte man sich, dass sie von den Neuroblastomzellen über den Noradrenalin-Transporter aufgenommen werden kann, und diese unter Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen zerstört. Es stellte sich aber heraus, dass 6-OHDA in wässriger Lösung in sein Chinon umgewandelt wird, bevor es von den Zellen aufgenommen werden kann. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen im extrazellulären Raum und damit zu einer nicht selektiven Toxizität. Die Stu-

dien zur Reinigung des autologen Knochenmarks mit 6-OHDA erfüllten daher die Erwartungen nicht.

Mit 6-Fluordopamin (6-FDA) wurde eine Substanz entwickelt, die in wässriger Lösung lange genug stabil bleibt, um vom Noradrenalin-Transporter selektiv in die Zellen aufgenommen zu werden. Nach einer Einwirkzeit wird 6-FDA in 6-OHDA umgewandelt und zerstört die Zelle durch Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Ein Vorteil bei der Verwendung von 6-FDA ist die Tatsache, dass die Umwandlung von 6-FDA in das toxisch wirkende 6-OHDA theoretisch durch Reduktionsmittel wie Ascobat verzögert werden kann. Durch die Kombination von Ascorbat und 6-FDA sollte es daher möglich sein, die Einwirkzeit so zu optimieren, dass die Zeit bis zur Umwandlung in 6-OHDA lange genug ist, um eine ausreichende Aufnahme über den NA-T zu gewährleisten.

Bei der Durchführung der Arbeit zeigte sich, dass 6-FDA nach einer einstündigen Einwirkzeit tatsächlich nur für die Neuroblastomzellen toxisch war, die den NA-T besaßen. Neuroblastomzellen ohne NA-T wurden hingegen wenig beeinträchtigt. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass 6-FDA auch auf das Wachstum und die Koloniebildung von hämatopoetischen Stammzellen eine stark hemmende Wirkung hatte. Dies ist bei einer späteren Anwendung zur Reinigung des Knochenmarks ungünstig, da die Koloniebildungsfähigkeit von entnommenen autologen Stammzellen mit der Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks nach Reinfusion korrelliert. Für diese starke Wirkung auf die hämotopoetischen Zellen kann es im wesentlichen zwei Erklärungsmodelle geben: Zum einen wäre es möglich, dass die hämatopoetischen Zellen selbst den NA-T exprimieren, zum anderen könnte das 6-FDA auch über einen anderen Transporter in die Zelle gelangen, wobei dafür vor allem der Dopamin-Transporter in Fräge käme. Letzteres erscheint dabei wahrscheinlicher, da es bisher keine Hinweise gibt, dass hämatopoetische Stamm-

zellen andere Noradrenalin-Analoga wie das [^{131}I]mIBG aufnehmen. Für die Kombination von 6-FDA mit Ascorbat konnte gezeigt werden, dass Ascorbat tatsächlich in der Lage ist, 6-FDA zu stabilisieren. Bereits in Konzentrationen von 30-100µmol/l hob Ascorbat die Wirkung des 6-FDA weitgehend auf. Geringe Dosen von 10µmol/l Ascorbat erbrachten hingegen keine wesentliche Verbesserung der Ergebnisse. Erstaunlicherweise zeigten jedoch die hämatopoetischen Stammzellen, die zu Vergleichszwecken ausschließlich mit Ascorbat (10 und 100µmol/l) behandelt wurden ein höheres Koloniewachstum. Da das Koloniewachstum wie bereits erwähnt mit der Regenerationsfähigkeit des reinfundierten autologen Knochenmarks nach Hochdosischemotherapie korrelliert, könnte Ascorbat in vivo womöglich die Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks nach Hochdosischemotherapie steigern.

Insgesamt konnte die Eingangshypothese bestätigt werden: 6-FDA bleibt in wässriger Lösung lange genug stabil um vom NA-T einer Neuroblastomzelle aufgenommen zu werden, setzt aber nach einer Einwirkzeit von etwa einer Stunde reaktive Sauerstoffverbindungen frei, die die Zelle schädigen. Dadurch hemmt 6-FDA selektiv das Wachstum von Neuroblastomzelllinien die den NA-T exprimieren. Andere Neuroblastomzellen werden weniger beeinträchtigt. Allerdings stellte sich auch heraus, dass hämatopoetische Stammzellen vermutlich ebenfalls in der Lage sind 6-FDA aufzunehmen und daher ebenfalls abgetötet werden. Geschieht dies wie vermutet nicht über den NA-T, sondern über den Dopamin-Transporter, so könnte es theoretisch möglich sein, die hämatopoetischen Stammzellen durch eine selektive Hemmung des Dopamin-Transporters zu schützen. Letztendlich haben die Ergebnisse dieser Untersuchung zum Schluß geführt, das ursprünglich vorgesehene Konzept der Verwendung von 6-FDA zur Therapie des Neuroblastoms zu verwenden fallen zu lassen.

Das erhöhte Koloniewachstum hämatopoetischer Stammzellen unter dem Einfluss von Ascorbat ist ein interresanter Nebenaspekt, der sich während der Arbeit ergab. Mit Blick auf die klinische Anwendung - die Gabe von Ascorbat ist nebenwirkungsarm und ein schnelleres Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen kann das Risiko schwerer Nebenwirkungen wie Infektionen vermindern - sind eine weitere Untersuchungen dazu aussichtsreich.

Literaturverzeichnis

Angeletti PU, Levi-Montalcini R (1970)[1]: Destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamin. Proc Natl Acad Sci U S, 65:114-121.

Angeletti PU, Levi-Montalcini R (1970)[2]: Specific cytotoxic effekt of 6-hydroxydopamin on sympatheic neuroblasts. Arch Ital Biol, 108:213-221.

Angeletti PU, Levi-Montalcini R (1970)[3]: Cytolytic effekt of 6-hydroxydopamin on neuroblastoma cells. Cancer Research 30: 2863-2869.

Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A, Tayebati SK (2001): Identifikation of dopamine plasma membrane and vesikular transporters in human peripheral blood lymphocytes. J Neuroimmunol 117:133-142.

Andreoli SP, Mallett CP, Bergstein JM (1986): Role of glutathion in protecting endothelial cells of hydrogen peroxide oxidant injury. J Lab Clin Med 108: 190-198.

Balis FM, (1988): Pharmacological consideration in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Pediar Clin North Am 35:835-851.

Bast C, De Fabbritis P, Lipton J, Gelber R, Maver C, Nadler L, Ritz J (1985): Elimination of malignant clonogenic cells from human bone marrow using multiple monoclonal antibodys and complement. Cancer Research 45:499-503.

Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T, Storb R, Weaver C, Weiden P, Buckner CD (1993): Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating faktor. Blood 81:3158-3163.

Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A (1994): Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. Proc Natl Acad Sci U S A 91:12912.

Biedler JL, Roffler TS, Schacer M, Freedman LS (1978): Multipe Neurotransmitter synthesis by human neuroblastome cell lines and clones. Cancer Res, 38: 3751-3757.

Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT,Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC (1991): Cloning and expression of funktional serotonin transporter from rat brain. Nature 354: 66-70.

Bowman LC, Castleberry RP, Cantor, A, Joshi V, Cohn SL, Smith EI, Yu A, Brodeur

GM, Hayes FA, Look AT (1997): Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. J Natl Cancer Inst, 89:373-380.

Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Kranz RA, Mirro J, Anderson WF, Ihle JN (1993): Gene-marking to trace origin of relapse after autologuous bon marrow transplantation, Lancet 341:85-86.

Brodeur GM, Castleberry JP (1993): Neuroblastoma. Principles and Practice of Pediatric Oncology 2nd ed. Pizzo PA, Poplack DG, editors. Philadelphia: J. B. Lippincott 739-767.

Bruchelt G, Buck J, Girger R, Treuner J, Niethammer D (1985): The Role of reaktive oxygen compounds derived from 6-hydroxydopamin for bone marrow purging from neuroblastoma cells. Biochem Biophy Res Commun 130: 168-174.

Bruchelt G, Schrauffstätter IU, Niethammer D, Cochrane CG (1991): Ascorbic acid enhances the effekts of 6-hydroxydopamin and H2O2 on iron dependant strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH. Cancer Res 51: 6066-6072.

Buttke TM, Sandstrom PA (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today, 15:7-10.

Chelmika-Schorr E, Arnason BG (1994): Nervous system-immun system interactions and their role in multiple sclerosis. Ann Neurol 36:29.

Chouinard G (1983): Bupropion and amitryptiline in treatment of depressed patients. J Clin Psychiatry 44(5):121-129.

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA (1989): Phenotypic diversisification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. Cancer Res 49: 219-225.

Claviez A, Hero B, Schneppenheim R, Berthold F (1996): Hepatopathie bei Patienten mit Neuroblastom. Klin Padiatr, 208(4): 221-228.

Cohn SL, Rademaker AW, Salwen HR, Franklin WA, Gonzales-Crussi F, Rosen ST, Bauer KD (1990): Analysis of DNA ploidy and proliferative aktivity in relation to histologie and N-myc amplification in neuroblastoma. Am J Pathol, 136:1043-1052.

Cohn SL, Moss TJ, Hoover M, Katzenstein HM, Haut PH, Morgan ER, Green AA, Kletzel M (1997): Treatment of poor risk neuroblastoma patients with high-dose chemotherapy and autologous peripheral stem cell rescue. Bone Marrow Transplant, 20:543-551.

Corbett R, Pinkerton R, Tait D, Meller S (1991): 131I-mIBG and high dose chemotherapy with bone marrow rescue in advanced neuroblastoma. J Nucl Biol Med 21:1587-1594.

D'Cruze (1996): Der Einfluß von Ascorbinsäure auf die Zytotoxizität von Methotrexat gegenüber Neuroblastom und ALL Zellen. Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

Davids E, Zhang K, Kula NS, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2002): Effekts of norepinephrine and serotonine transporter inhibitors on hyperaktivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesioning in rats. J Pharmacol Exp Ther 301(3):1097-1102.

De Kraker J, Hoefnagel CA, Caron H, Valdes-Olmos RA, Zsiros J Heij HA, Voute PA (1995): First line targeted radiotherapy, a new concept in the treatment of advanced stage neuroblastoma. Eur J Cancer 31: 600-602.

Di Caro A, Bostrom B, Moss TJ, Neglia J, Ramsay NK, Smith J, Sasky LC (1994): Autologous peripheral blood cell transplantation in the treatmen of advanced neuroblastoma. Am J Pediatr Hematol Oncol, 16:200-206.

Drouin C, Blanc G, Villegier AS, Glowinski J, Tassin JF (2002): Critical role of alpha-adrenergic rezeptors in acute and sensitized locomotor effekts of D-amphetamine and pharmacological charakteristics. Synapse 43(1):51-61.

Evans AE, Gerson J, Schnaufer L (1976): Spontanous regression of neuroblastoma. Natl Cancer Inst Monogr, 44:49-54.

Evans AE, D'Angio GJ, Propert K, Andersom J, Hann HL (1987): Prognostic factors in neuroblastoma. Cancer, 59:1853-1859.

Evans AE, Silber JH, Shpilsky A, D'Angio GJ (1996): Successful management of low-stage neuroblastomawithout adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single intitution. J Clin Oncol, 14:2504-2510.

Eversan TC; Cole W (1966): Spontanous regression in cancer. Philadelphia W. B. Saunders Co.

Fahn (1992): A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson´s disease. Ann Neurol 32: 128-132.

Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT (1995): A cocaine sensitive active dopamine transporter in human lymphocytes. Biochem Pharmacol 50:1007-1014.

Felten DL (1993): Direct innervation of lymphoid organ: substrate of neurotransmitter signalling of cells of the immun system. Neuropsychobiology 28:110.

Ferrari G, Yan CY, Greene LA (1995): N-acetylcystein (D- and L-stereoisomeres) prevent apoptotic death aof neural cells. J Neurosci 15: 2639-2644.

Friedman EM, Irwin MR (1997): Modulation of immune cell function by autonomic nervous system.Pharmacol Ther 74:27.

Froese MG (1998): Untersuchung zum Proliferationsverhalten von CD34 positiven Stammzellen in vitro. Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN(1994): The kit ligand stem cell faktor. Adv Immunol 55:1-96.

Gaze MN, Wheldon TE, O´Donoghue JA,Hilditch TE, McNee SG, Simpson E, Barrett A (1995): Multimodality megatherapy with [131I]metaiodobenzylguanidin, high-dose melphalan and total body irradiationwith bone marrow rescue: feasibility study of a new strategy for advanced neuroblastoma. Eur J Cancer 31A:252-256.

Geatti O, Shapiro B, Sisson JC, Hutchinson RJ, Malette S, Eyre P, Beierwaltes WH (1985): Iodine-131 metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the location of neuroblastoma: preliminary experience in ten cases. J Nucl Med 26(7):736-742.

Gebhardt S (1997): Pathophysiologische Aspekte des Catecholaminstoffwechsels von Neuroblastomzelle. Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

Gilabert R, Ayats R (1994): Human long-term bone marrow culture as a prognostic faktor for hematopoietic stem cell reconstitution in autologous transplantation. Bone Marrow Transplant 13(5):635-40.

Giros B, Caron MG (1993): Molekular charakterisation of the dopamine transporter. Trends Pharmacol Sci 14:43-49.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996): Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature 379:606-612.

Gitlow SE, Bertani LM, Rausen A, Gribetz D, Dziedzic SW (1976): Diagnosis of neuroblastoma by qualitative and quantitative determination of catecholamine metabolites in urine. Cancer 25(6):1377-1383.

Goodman R, Slater E, Herschman HR (1980): Epidermal Groth faktor induces tyrosin hydroxylasein a clonal pheochromocyroma cell line, PC-G2. J Cell Biol 84, 495-500.

Gorin NC (2002): Autologous stem cell transplantation in acute lymphocytic leukemia. Stem Cells 20(1):3-10.

Goth A, Littman I (1948): Ascorbic acid in human cancer tissue. Cancer Res 8:349-351.

Gräfe KH, Böhnisch H (1988): The transport of amines Across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurones. Handbook of Experimental Phamacology 193-245.

Graham-Pole J, Gee A, Emerson S, Gallo J, Lee C, Luzins, Janssen W, Pick T,Worthington-White D, Elfenbein G, Gross S, Weiner R (1991): Myeloablative chemotherapy and autologous bone marrow infusion for treatment of neuroblastoma: Faktors influencing engraftment. Blood 78:1745-1753.

Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson-EM J (1995): Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reaktive oxygen species in programmed neuronal death. Neuron 24:303-315.

Gribben JG, Nadler LM (1993): Bone marrow purging for autologous bone marrow transplantation. Leuk Lymphoma 22 Suppl2:141-148.

Gu H, Wall SC, Rudnick G (1994): Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. J Biol Chem 269:7124-7130.

Guerreau D, Thedez P, Fritsch P, Saccavini JC, Metivier H, Nolibe D, Masse R, Coornaert S, Chatal JF (1990): In vitro therapeutic targeting of neuroblastomas usin 125I-labelled meta-iodobenzylguanidine. Int J Cancer 45:1164-1168.

Hafer R, Voigt A, Gruhn B, Zintl F (1997): Expression of CD34 and other haematopoetic antigens an neuroblastoma cells: consequences for autologous bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation. J Neuroimmunol, 78:117-126.

Hafer R, Voigt A, Gruhn B, Zintl F (1999): Neuroblastom cells can express the hematopoietic progenitor cell antigen CD 34 as detected at surface protein and m-RNA level. J Neuroimmunol, 78:117-126.

Hagemann U (1999): Antioxidatives System von humanen Neuroblastomzelllinien im

Vergleich zu hämatopoetischen Zellen. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

Heikkila RE, Cohen G (1975): Cytotoxic aspekts of the interaction of ascorbic acid with alloxan and 6-hydroxydopamine. Ann N Y Acad Sci 258:221-230.

Hickman JA, Beere HM, Wood AC, Waters CM, Parmar R (1992): Mechanisms of Cytotoxicity caused by antitumor drugs. Toxicol-Lett 64-65:553-561.

Hockenberry DM, Oltai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993): BCL-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 75:241-251.

Hoffmann BJ, Mezey E, Brownstein MJ (1991): Cloning of a serotonine transporter affected by antidepressents. Science 254:579-580.

Iavarone A, Lasorella A, Servidei T, Riccardi R, Mastrangelo R (1993): Uptake and storage of m-Iodobenzylguanidine are frequent neuronal functions of human neuroblastoma cell lines. Cancer Res 53:304-309.

Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentin JS, Ord T, Bredesen DE (1993): Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science 262:1274-1277.

Kasparu H, Krieger O, Bettelheim P, Kolb A, Lutz D (1995): Autologe Stammzellgewinnung nach hochdosierter Chemo- und/oder Wachstumsfaktortherapie. Wiener med. Wochenschrift 2/3/1995:58-61.

Katzenstein H, Cohn SL (1998): Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. Curr Op Oncol 10:43-51.

Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992): Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substate transport and cocaine binding. Proc Natl Acad Sci USA 89(16):7782-7785.

Klaassen RJ, Trebo MM, Koplewitz BZ, Witzmann SS, Calderwood S (2003): High-risk neuroblastoma in Ontario: a report of experience from 1989 to 1995. J Pediatr Hematol Oncol 25(1): 8-13.

Klingebiel T, Handgrettinger R, Niethammer D (1994): Autologe KMT. Infusionstherapie/Transfusionsmedizin 21 (suppl 3):42-45.

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988): The leucine zipper, a hypothetical

structurecommon to a new class of DNA binding proteins. Science 240(4860):1759-1764.

Lansdorp PM (1992): Long-term erythropoesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from bone marrow. J Exp Med 175:1501-1509.

Lester HA, Mager S, Quick MW, Corey JL (1994): Permeation properties of neurotransmitter transporters. Ann Rev Pharmacol Toxicol 34:219-249.

Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1971): Two control mechanisms of groth and differentiation of the sympathetic nervous system. UCL-Forum-Med-Sci 14:253-268.

Lewis EJ, Chikarashi DM (1987): Regulated expression of the tyrosin hydroxylase gene by epidermal groth faktor. Mol Cell Biol 7:3332-3336.

Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, Beck J (1995): Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastomacell lines: correlation to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. Eur J Cancer 31A:586-590.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM (1991): Clinical relevance of tumor ploidy and N-myc Gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol 9:581-591.

Lopez-Ibor B, Schwartz AD (1985): Neuroblastoma. Ped Clin North Am 32:755-778.

Makrynikola V, Kabral A, Bradstock KF (1991): Effekt of mafosfamid (Asta-Z-7654) on the clonogenic cells in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: Significance for ex vivo purging of bone marrow for autologous transplantation. Bone Marrow Transplant 8:351-355.

Marino F, osentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G (1999): Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. Experimental Hematology 27:489-495.

Mastrangelo R, Lasorella A, Troncone L, Rufini V, Iavarone A, Riccardi R (1991): [131]metaiodo-benzylguanidinin neuroblastoma patients at diagnosis. J Nucl Biol Med 35:252-254.

Mastrangelo R, Tornesello A, Lasorella A, Iavarone A, Mastrangelo S, Riccardi R, Diociaiuti L, Rufini V, Pession A, Troncone L (1997): Optimal use of the 131-meta-iodobenzylguanidine and cisplatin combination in advanced neuroblastoma. J Neuro Oncol

31:600-602.

Matthay KK, Sather HN, Seeger RC, Haase GM, Hammon GD (1989): Excellent outcome of stage II neuroblastoma is independent of residual disease and radiation therapy. J Clin Oncol 7:236-244.

Matthay K, Seeger R, Reynolds C, Stram D, O'Leary M, Harris R, Selch M, Atkinson J, Haase G, Ramsay N (1994): Allogenic versus autologous purged bone marrow transplant for neuroblastoma. J Clin Oncol 12:2382-2389.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al., (1999): Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapie, radiotherapie, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. N Engl J Med, 341: 1165-1173.

McElvain JS, Schenk JO (1992): A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine. Biochem Pharmacol 43:2189-2199.

Michiels C, Raes M, Toussaint CB, Remacle J (1994): Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Rad Biol Med 17:235-248.

Miller AB (1985): Principles of screening and of the evaluation of screening programes. Academic press 1985:3-24.

Miltenyi S, Guth S, Radbruch A, Pflüger E, Thiel A (1994): Isolation of CD34+ hematopoetic progenitor cells by high-grdient magnetic cell sorting (MACS). Hematopoetic stem cells - The Mulhouse Manual, Alpha Med Press, Dayton, Ohio 201-213.

Minn AJ, Swain RE, Ma A, Thompson CB (1998): Recent progress on the regulation of apoptosis by bcl-2 family members. Adv Immunol 70:245-279.

Mitchell OL, Shepard VB, Proctor HM, Dainton M, Cabral SD, Pinkerton CR (1994): Peripheral blood stem cells used to augment autologous bone marrow transplantation. Arch Dis Child, 70:237-240.

Mortimer CE (2001): Basiswissen der Chemie. Thieme-Verlag.

Mosmann T, (1983): Rapid colorimetric assay for cellular groth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth 65:55-63.

Moyers JS, Babich JW, Carter R, Meller ST, Agrawal M, McElwin TJ (1989): Quantitative study of radioiodinated metaiodobenzylguanidin uptake in children with neuroblasto-

ma: a correlation with tumor histopathology. J Nucl Med 30:474-480.

Muller-Gartner HW, Erttmann R, Helmke K (1986): Meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in neuroblastoma--acomparison with conventional X-ray and ultrasound. Pediatr Hematol Oncol 3(2):97-109.

Niederwieser D, Eibl B, Nachbaur D (1995): Graft versus host disease after autologous bone marrow transplantation: a realistic expectation. Wiener Med Wochenschrift 2/3/ 1995:25-27.

Niessen KH (1993): Lehrbuch der Pädiatrie. Chapman & Hall.

O´Donoghue JA, Bardies M, Wheldon TE (1995): Relationship between tumor size and curability for targeted radionuclide therapy with beta-emitting radionucleids. J Nucl Med, 36:1902-1909.

Olivieri A, Poloni A, Montanari M, Cantori I, Corvatta L, Masia MC, Curzi L, Mancini S, Leoni P (1997): Pharmacologic bone marrow purging: Is there any place for etoposide? In vitro Comparison with mafosfamid. J Haematotherapy 6:137-144.

Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991): Expression cloning of a cocaine and antidepressant -sensitive human noradrenaline transporter. Nature 350:350-354.

Palladini G, Ruggeri S, Stocchi F, De-Pandis MF, Venturi G, Margotta V (1996): A pharmacological study of cocaine aktivity in planaria. Comp Biochem Physiol C Phamacol Toxicol Endokrinol 115(1):41-45.

Perla DM, (1941): Natural resistence and clinical medicine. Boston, Little Brown.

Preis PN, Saya H, Nadasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadee W (1988): Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. Cancer Res 48:6530-6534.

Preti A (2000): Vanoxerine National Institute on Drug Abuse. Curr Opinion Investig Drugs 1(2):241-251.

Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V (1993): Expression of a cocaine-sensitve norepinephrine transporter in the human placental syncytitrophoblast. Biochemistry 32:1346-1353.

Reimer P, Kunzmann V, Wilhelm M, Weissbrich B, Kraemer D, Berghammer H, Weissinger F (2003): Cellular and humoral immune reconstitution after autologous peripheral

bllod stem cell transplantation (PBSCT). Ann Hematol 82(2):263-270.

Reynolds CP, Seeger RC, Vo D, Black A, Ugelstad J (1986): Model system for removing neuroblastoma cells from bone marrow using monoclonal antibodys and magnetic immunobeads. Cancer Research 46:5882-5886.

Ross RA, Biedler JL, Spengler BA, Reis DJ (1981): Neurotransmitter-synthesizing enzymes in 14 human neuroblastoma cell lines. Cell Mol Neurobiol 1:301.311.

Rubi H, Hartmann O, Michon J, Frappaz D, Coze C, Chastagner P, Baranzelli MC, Plantaz D, Avet-Loiseau H, Benard J, et al. (1997): N-myc gene amplification is a prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. J Clin Oncol, 15:1171-1182.

Saarinen U, Coccia P, Gerson S, Pelley R, Cheung NK (1985): Eradikation of neuroblastoma cells in vitro by monoclonal antibody and human complement: method for purging autologous bone marrow. Cancer Research 45:5969-5975.

Sandstom PA, Buttke TM (1993): Autocrine production of intracellular catalaseprevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum free medium. Proc Natl Acad Sci U S, 90:4708-4712.

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, Michaelis J (2002): Neuroblastoma screening at one year of age. N Engl J Med 346:1047-1053.

Schrauffstätter IU, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG (1988): Oxidant-induced DNA damage of target cells. J Clin Invest 82:1040-1050.

Seeger C (1982): Neuroblastoma: Clinical perspectives, monoclonal antibodys and retinoic acid. Ann Intern Med 97:873.

Seitz G, Stegmann HB, Jäger HH, Schlude HM, Wolburf H, Roginsky VA, Niethammer D, Bruchelt G (2000): Neuroblastoma cells exprexssing the noradrenalin transporter are destroyed more selektively by 6-fluordopamine than by 6-hydroxydopamine. J Neurochem 75:511-520.

Seitz (2000): Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und klinischen Tumorproben. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

Sheridan WP, Beglaey CG, Juttner C, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn

G, Fox RM (1992): Effect of peripheral blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. Lancet 1:640-644.

Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K (1984): Histopathologic prognostic faktors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst, 73:405-416.

Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991): Cloning and expression of a cocaine sensitive dopamine transporter complementary DNA. Science 254:576-578.

Shimada H, Stram DO, Chatten J, JoschiVV, Hachitanda Y, Brodeur GM, Lukens JM, Matthay KK, Seeger RC (1995): Identification of subsets of neuroblastomas by combinedhistopathologic and N-myc analysis. J Natl Cancer Inst, 87:1470-1476.

Silber JH, Evans AE, Fridman M (1991): Models to predict outcome of childhood neuroblastoma: the role of serum ferritin and tumor histology. Cancer Res, 51:1426-1433.

Sitzmann (1995): Pädiatrie. Hippokrates-Verlag Stuttgart. 552-554.

Strader CD, Sigal IS, Dixon RA (1989): Mapping the functional domains of the beta-adrenergic rezeptor. Am J Respi Cell Mol Biol 1(2):81-86.

Thoenen H, Tranzer JP (1968): Chemical Sympathectomy by selektive destruction of adrenergic nerve endings with 6-OHDA. Arch Pharmakol Exptl Pathol, 261:271-288.

Tomson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267:1456-1462.

Tranzer JP, Thoenen H (1968): An electron microscopic study of selektive acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administation of 6-Hydroxydopamin. Experientia, 24:155-156.

Trendelenburg (1991): The TiPS lecture: funcional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. Trends Pharmacol Sci 12(9):334-337.

Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991): Cloning of the cocaine sensitve bovine dopamine transporter. Proc Natl Acad Sci USA 88:1168-1171.

Voigt A, Hafer R, Gruhn B, et al., (1997): Expression of CD34 and other haematopoetic antigens on neuroblastoma cells: consequences for autologous bone marrow and peri-

pheral blood stem cell transplantation. J Neuroimmunol, 78:117-126.

Voute PA, Kraker J, Burgers J (1986): Tumors of the sympathic nervous system. Cancer in children 2nd Edition Springer Verlag, Heidelberg. New York, Tokyo, 238-251.

Wafelman AR, Hoefnagel CA, Maes RAA, Beijnen JH (1994): Radioiodinated metajodobenzylguanidin: a review of pharmocokinetics, drug interaktions, cytotoxicity and dosimetry. Eur J Nucl Med, 21:348-353.

Wheldon TE, O´Donoghue JA, Barrett A, Michalowski AS (1991): The curability of tumors of different size by targeted radiotherapy using 131I or 90Y. Radiother Oncol, 21: 91-99.

Wieland DM, Wu J, Brown LE, Manger TJ, Swanson TP, Beierwalters WH (1980): Radiolabeled adrenergic neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with I-131-metaiodobenzylguanidin. J Nucl Med, 21:348-353.

Young JL Jr, Miller RW (1975): Incidence of malignant tumors in US children. J Pediatr, 86:254-258.

Zauli G, Vitale M, Visani G, Marchiso M, Milani D (1994): In vitro growth of human fetal cells in the presence of various combinations of recombinant cytokines under serum-free culture conditions. Br J Haematol 86:461-467.

Mein Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gernot Bruchelt für die einfühlsame und sachverständige Betreuung dieser Arbeit und Zyrafete Kuci, für die vielen Male, die sie mir mit Rat und Tat zur Seite stehen musste. Daneben möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Hämatologischen Labors für die gute Zusammenarbeit bedanken, besonders auch bei Dr. Selim Kuci.

Lebenslauf

Persönliche Information

Name: Alexander Schmid

Geburtsdatum: 01. 11. 1976

Geburtsort: Ehingen

Familienstand: Ledig

Eltern: Walter Paul Schmid und Gisela Maria Schmid

Schule

1983- 1987 Grundschule Schelklingen

1987-1996 Gymnasium Blaubeuren

Studium

1997- 2005 Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

Abschlüsse:

22. 09. 1999 Physikum

12. 04. 2001 1. Staatsexamen

11. 04. 2003 2. Staatsexamen

30. 11. 2004 3. Staatsexamen