

Thomas Robert Heinrich Büch
Dr. med.

Vergleichende Untersuchungen zur Chemosensibilität von Tumorzelllinien gegenüber drei Chlorethylnitrosoharnstoff-Derivaten (BCNU, ACNU, HeCNU) – Stellenwert von O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase und Glutathion als Resistenzfaktoren

Geboren am 16. 05. 1974 in Saarbrücken
Reifeprüfung am 24.06. 1993 in Homburg/ Saar
Studiengang der Fachrichtung Medizin von WS 93/94 bis SS 2000
Physikum am 28.08. 1995 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Mannheim
Staatsexamen am 19.05. 2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. J. Zeller

Die Frage, welche Bedeutung die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (O⁶-AGT) und der Gesamtglutathiongehalt (GSH/GSSG) maligner Zellen für deren Sensibilität bzw. Resistenz gegenüber verschiedenen Chlorethylnitrosoharnstoffen (CENUs) haben, stand im Mittelpunkt dieser In-vitro-Studie.

Die an acht Zelllinien gemessene Höhe der O⁶-AGT-Aktivität erstreckte sich über einen relativ großen Bereich (16–362 fmol/mg Protein). Bei den untersuchten Zelllinien waren solche mit niedriger (bis 60 fmol/mg Protein: L 5222, T-406 und K562) und mittlerer (um 200 fmol/mg Protein: HL-60 und Gw-116) von solchen mit hoher Transferaseaktivität (deutlich > 200 fmol/mg Protein: Capan-2, DanG und HT-29) zu unterscheiden.

An allen Zelllinien (mit Ausnahme von L 5222) wurde mit Hilfe des MTT-Assays die Zytotoxizität von Carmustin (BCNU), Nimustin (ACNU) und Elmustin (HeCNU) vergleichend untersucht. Die IC₅₀-Werte der CENUs lagen in folgenden Bereichen: BCNU = 18–126, ACNU = 9–240, HeCNU = 13–287 µM. An den Zelllinien mit hoher O⁶-AGT-Aktivität (HT-29, DanG und Capan-2) erwies sich BCNU mit deutlich niedrigeren IC₅₀-Werten gegenüber ACNU und HeCNU als der am stärksten wirksame CENU. ACNU war bei allen sieben Zelllinien stärker wirksam als HeCNU.

Die Korrelation der für jede Zelllinie gemessenen O⁶-AGT-Aktivität mit den entsprechenden IC₅₀-Werten der CENUs (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient) betrug für BCNU = 0,96, ACNU = 0,93 und HeCNU = 1,0. Demnach galt: Eine niedrige O⁶-AGT-Aktivität bei einer Zelllinie ging mit einer hohen Wirksamkeit der CENUs (niedrigem IC₅₀-Wert) einher; umgekehrt brachte eine hohe Transferase-Aktivität eine niedrige Wirksamkeit der CENUs (also einen hohen IC₅₀-Wert) mit sich.

Im Weiteren wurde die Zytotoxizität von BCNU, ACNU und HeCNU untersucht, nachdem die O⁶-AGT-Aktivität der Tumorzellen durch zusätzliche Behandlung mit 20 µM O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG) gehemmt worden war.

Bei Capan-2-, DanG- und HT-29-Zellen (hohe native O⁶-AGT-Aktivität) wurden durch die Kombination der CENUs mit O⁶-BG für BCNU Sensibilisierungsfaktoren im Bereich von 2,8–3,7 und für HeCNU von 3,2–9,4 erzielt; für ACNU waren sie mit 9–16,3 am höchsten. Auch an HL-60- und Gw-116-Zellen (mittlere O⁶-AGT-Aktivität) ergab sich nach O⁶-BG für alle CENUs eine deutliche Erhöhung der Wirkung. Bei T-406- und K562-Zellen (niedrige O⁶-AGT-Aktivität) war demgegenüber durch O⁶-BG keine weitere Steigerung der Sensibilität zu beobachten, die Sensibilisierungsfaktoren lagen unabhängig vom getesteten CENU im Bereich von 0,7–1,0. Demnach war in dieser Studie für die Erhöhung der Sensibilität durch 20 µM O⁶-BG Voraussetzung, daß die native O⁶-AGT-Aktivität der zu untersuchenden Zelllinie ≥ 60 fmol/mg Protein war.

Betrachtet man jeweils die Kombination mit O⁶-BG, so waren die IC₅₀-Werte für ACNU signifikant niedriger als für BCNU oder HeCNU ($p < 0,02$).

Bei systemischer Anwendung der CENUs in Kombination mit O⁶-BG stünde der zu erwartenden höheren antineoplastischen Potenz von ACNU im Vergleich zu BCNU die ebenfalls zu erwartende erhöhte Allgemeintoxizität entgegen, da auch Knochenmarkstammzellen eine niedrige O⁶-AGT-Aktivität aufweisen. Im Einklang hiermit steht, daß in der Klinik in Monotherapie-Schemata BCNU doppelt so hoch dosiert werden kann wie ACNU (Dosierung bezogen auf mg/m² Körperoberfläche). Bei einem Dosisvergleich auf molarer Basis ist der Faktor noch größer.

Um die Frage zu beantworten, welche Relevanz dem zellulären Glutathionspiegel für die Resistenz gegenüber den CENUs zukommt, wurde an sieben der acht Zelllinien (Ausnahme: L 5222) GSH/GSSG ohne und nach Exposition gegenüber 50 µM D,L-Buthioninsulfoximin (D,L-BSO) bestimmt; vor Behandlung mit D,L-BSO fand sich bei den Zelllinien ein Glutathiongehalt im Bereich von 2,8–25,2 nmol/10⁶ Zellen, nach D,L-BSO betrug er 0,7–3,4 nmol/10⁶ Zellen.

Die Korrelation der in den unbehandelten Zellen gemessenen GSH/GSSG-Konzentration mit den entsprechenden IC₅₀-Werten der CENUs (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient) betrug für BCNU = 0,64, ACNU = 0,36 und HeCNU = 0,61. Dementsprechend galt: Ein enger Zusammenhang zwischen der Höhe des GSH/GSSG der Zelllinien und den IC₅₀-Werten (als Maß für die Wirkungsstärke der CENUs) existierte nicht.

Eine Sensibilitätssteigerung nach D,L-BSO-Exposition wurde bei Capan-2-, HT-29- und DanG-Zellen (Zelllinien mit relativ hohem GSH/GSSG) nur für BCNU beobachtet. Die Sensibilisierungsfaktoren lagen hier im Bereich von 1,4–3,5. Für ACNU und HeCNU war nach D,L-BSO-Exposition keine Wirkungssteigerung nachweisbar.

Schließlich wurde die Zytotoxizität des BCNU-Zerfallsproduktes 2-Chlorethylisocyanat (CEIC) und dessen Einfluß auf die O⁶-AGT-Aktivität untersucht. Eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung auf HT-29-Zellen war im getesteten Konzentrationsbereich von 0–1000 µM nicht nachzuweisen. Auch ein signifikanter inhibierender Effekt auf die O⁶-AGT-Aktivität von HT-29-Zellen war durch deren Behandlung mit 100 µM CEIC über 1, 3 und 6 Stunden bzw. 200 µM CEIC über 30 und 60 Minuten nicht zu erzielen.