

Durch die BIOX-Stiftung geförderte Projekte / Verwendung der Mittel

Unsere onkologische Forschung konzentriert sich auf den Themenkomplex: Tumorstammzellen / Motilität und Migration / Radiotherapie.

Im Zentrum steht die Motilität von Tumorzellen, insbesondere von Tumorstammzellen. Migration ist ein ganz wesentlicher Teil der Rezidivbildung und damit der Aggressivität eines Malignoms. Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze, die zelluläre Motilität zu bestimmen. Wir haben uns für die Videographie vitaler Zellen entschieden, da hier durch sorgfältige Beobachtung des Verhaltens wesentlich mehr, auch neue und unerwartete Informationen zu erlangen sind, als durch in-vitro-Untersuchungen. Ausserdem vermuten wir, dass Tumorzellen und Tumorstammzellen eine Art „soziales“ Verhalten zeigen, dass ihre Bewegungsmuster beeinflusst werden durch Nachbarzellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen oder Fibroblasten des Stromas. Es ist geplant, diese Mitspieler hinzuzufügen, wenn die singulären Muster der Tumorzellen untersucht sind.

Mit Mitteln der BIOX-Stiftung wurde ein Videographiesystem selbst aufgebaut – kommerzielle Systeme lagen ausserhalb unserer finanziellen Möglichkeiten. Eine Publikation hierzu mit dem Titel „Automated multi-chamber system for long-term observation of migrating cells under in vivo conditions by time-lapse videography“ wird in Kürze eingereicht.

Die bisherigen Untersuchungen wurden an kultivierten Tumorzellen und Tumorstammzellen durchgeführt, die vom humanen Glioblastom und vom Mammakarzinom stammen.

- Beim Glioblastom ist eine Bestrahlung in aller Regel Teil der Therapie. Rezidive beobachtet man häufig in unmittelbarer Nachbarschaft des primären Tumors, so dass die Möglichkeit besteht, dass hier Zellen aus dem Strahlungsfeld ausgewandert sind. Hierbei könnte es sich um Tumorstammzellen handeln, da Rezidive nach der Stammzell-Hypothese vornehmlich aus solchen Progenitorzellen entstehen.
- Der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wird in der Literatur ein hoher Anteil an Tumorstammzellen zugeschrieben, so dass hier die Gewinnung dieser Zellen besonders lohnend erscheint.

Stand der einzelnen Projekte und Ausblick:

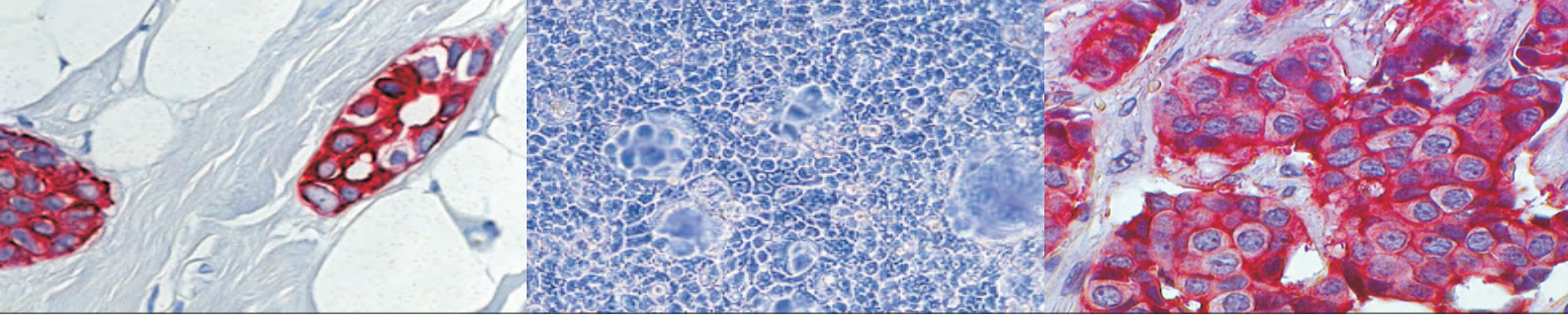
Migration von Glioblastomzellen:

Verschieden Glioblastom-Zelllinien wurden zur Untersuchung herangezogen. Bisher gelang es noch nicht, Tumorstammzellen in ausreichender Menge und Qualität zu präparieren. Daher führen wir die Versuche zur Zeit mit normalen Gliomzellen durch. So soll eine Datenbasis geschaffen werden für die künftigen Experimente mit Stammzellen. Wir sind zuversichtlich, dass es mit einem präparativen FACS-Gerät (FACS= fluorescence activated cell sorting) gelingen wird, diese zu isolieren. Bestrahlt wurde mit Photonenstrahlung am Linearbeschleuniger und mit energiereichen Elektronen (P32).

Photonen: Nach einmaliger Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich kein auffälliger Unterschied in der Videographie. Nach sequenzieller Bestrahlung mit mehreren Dosen war die durchschnittliche Migration ebenfalls nahezu unverändert, jedoch scheint ein Teil der Zellen langsamer, ein anderer Teil schneller geworden zu sein. Nach einigen bestrahlungsfreien Tagen war dann auch die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit angestiegen. Die Daten müssen jedoch noch überprüft werden, die Experimente dauern an.

Elektronen:

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es bei sequenzieller Bestrahlung mit mehreren kleinen Dosen nach einer Latenzzeit zu vermehrter Migration aus dem Strahlungsfeld kommt, während eine Einmaldosis hier nur wenig Unterschiede zur Kontrolle aufweist. Die Zelllinien wurden durch Transfektion des GFP-Gens (bewirkt eine grüne Fluoreszenz der Zellen) markiert, um ihre Migration auch bei dichter „Besiedlung“ beobachten zu können. Wenige grüne Zellen werden in eine dichte Population von farblosen Zellen eingebracht und zeigen, dass auch dann eine deutliche Migration stattfindet.



Präparation von Tumorzellen des Mammakarzinoms:

Durch ein abgewandeltes Spheroid-Verfahren, gelang es, eine reine Tumorstammzellfraktion aus der MDA231-Zelllinie zu präparieren. Diese Arbeiten wurden beim wichtigsten europäischen Krebskongress, ECCO/ESMO, und beim Deutschen Krebskongress in Berlin präsentiert.

Selektive Inhibitoren von Tumorstammzellen:

In der Literatur wird beschrieben, dass eine spezielle Stoffklasse (Ionophore, bilden Poren für einwertige Kationen in der Zellmembran) selektiv Tumorstammzellen inhibieren. Wir konnten diese Befunde in unserem System verifizieren. Als Gegenpart zur Tumorstammzelle wurde ein transfizierter Klon der selben Mutterzelllinie verwendet, der durch die Reexpression eines verlorengegangenen Strukturproteins wieder „benigne“ gemacht worden war.

Unbekannt ist bislang, durch welchen Mechanismus die Tumorstammzellen geschädigt werden. Wir haben hier eine interessante Hypothese, die wir vordringlich überprüfen wollen.

Hemmung der Migration von Tumorstammzellen durch Zoledronsäure:

Interessante klinische Befunde zeigen, dass das Bisphosphonat Zoledronsäure die Prognose von Brustkrebspatientinnen deutlich verbessert. Zoledronsäure stabilisiert den Knochen bei osteolytischen Metastasen. Die Studien zeigen jedoch, dass nicht nur Knochenmetastasen, sondern Metastasierung generell verringert wird. Seit längerem ist bekannt, dass das Mammakarzinom schon früh Mikrometastasen im Knochenmark bildet, die dann auch nach längerer Zeit wieder aktiv werden können. Gemäß der Tumorstammzellhypothese müsste es sich dabei wohl um Stammzellen handeln.

Wir vermuten nun, dass Zoledronsäure diese Aktivierung der Stammzellen verhindert. Untersucht wurde zunächst, ob eventuell eine Redifferenzierung der Zellen induziert wird. Die experimentellen Befunde aus Westernblot und qRT-PCR sprechen jedoch dagegen.

Durch Videographie konnten wir zeigen, dass die Beweglichkeit der Zellen drastisch eingeschränkt und eventuell auf diesem Wege eine systemische Metastasierung verhindert wird. Diese Befunde wurden zum wichtigsten senologischen Kongress, dem San Antonio Breast Cancer Symposium eingereicht. Sobald dieser Beitrag angenommen ist, möchten wir die Daten gern auf der Homepage der BIOX-Stiftung präsentieren (San Antonio nimmt nur unveröffentlichte Originaldaten an). Ein Vorbefund wurde beim Osteologiekongress 2010 präsentiert und stieß auf großes Interesse.

Die Untersuchungen sollen fortgeführt und zusätzlich Zoledronsäure noch mit Bestrahlung kombiniert werden. Weiterhin sollen auch andere Tumorentitäten untersucht werden, die ebenfalls in den Knochen metastasieren, bisher jedoch nicht mit Bisphosphonaten behandelt werden (z.B. Prostata-Karzinom).

Verbesserung der Strahlentherapie beim Glioblastom durch Chloroquin:

Eine kleine klinische Studie, die bisher wenig Resonanz fand, zeigte, dass das Überleben von Glioblastompatienten annähernd verdoppelt werden konnte, wenn man die Strahlentherapie (mit und ohne kombinierte Chemotherapie) durch das bekannte Malariamedikament Chloroquin unterstützte.

Chloroquin ist ein Radikalbildner, die Wirkung ionisierender Strahlung besteht in der intrazellulären Freisetzung von freien Radikalen, so dass ein synergistischer Effekt durchaus plausibel erscheint. Unsere in-vitro-Experimente zeigen, dass in der Tat eine deutliche Verstärkung des Bestrahlungserfolgs eintritt, gemessen an der Fähigkeit der bestrahlten Zellen zur Koloniebildung. Durch in-vivo Bestimmung der freien Radikale mittels Fluoreszenz konnten wir zeigen, dass in der Tat die Radikallast durch Chloroquin ansteigt.

Diese experimentellen Daten sollen soweit erhärtet werden, dass sie eine Basis für klinische Untersuchungen werden können. Untersucht werden soll auch, ob durch die Kombination mit Temozolomid (schädigt DNA) und PARP-Inhibitoren (verhindern DNA-Reperaturprozesse) synergistische Effekte erzielt werden können. Ferner soll geklärt werden, ob auch hier gestörte Motilität zum klinischen Effekt beiträgt.

Ausblick:

Die makroskopischen in-vivo Untersuchungen zu Migration und Motilität sollen ergänzt werden durch Untersuchungen zum Mechanismus dieser Effekte. Hier ist insbesondere an das FAK-System und die variable Expression von Integrinen, sowie deren Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix zu denken. Generell soll bei den Untersuchungen zu Motilität und Strahlung die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jan Meijer am RUBION verstärkt werden, die sich jetzt auch mit diesem Thema beschäftigen will. Perspektivisch werden eventuell auch Tierexperimente nicht zu umgehen sein. Das RUBION bietet durch seinen Tierstall und unseren dort installierten Linearbeschleuniger mit Vorrichtung zur Tierbestrahlung hierfür gute Möglichkeiten.

Ansprechpartner: Herr Dr. Helmut Bühler

Weitere Informationen zum Stiftungsfonds BIOX finden Sie unter www.stiftungsfonds-biox.de