

# Migrationsanalysen an den humanen Glioblastomzelllinien U-373 MG und U-87 MG unter Anwendung von Medikamenten des klinischen Alltags

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Bianca Besteher geb. Scharein  
geboren am 05.05.1988 in Jena  
eingereicht am 21.12.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Kalff, Jena
  2. Gutachter: PD Dr. Sebastian Scholl, Jena
  3. Gutachter: Prof. Dr. Volker Tronnier, Lübeck
- Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.09.2013

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	<i>Cell Index</i> (englisch „Zellindex“)
cm	Centimeter
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (englisch „Unterscheidungsgruppen“)
COX	Zyklooxygenase
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium</i> (englisch „Dulbeccos Modifiziertes Medium nach Eagle“)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat, sechszähliger Komplexbildner
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i> (englisch „Extrazelluläre signalbezogene Kinase“)
Fa.	Firma
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (englisch „Fetales Rinderserum“)
h	Stunde
MAO	Monoaminoxidase
MIF	<i>Macrophage Migration inhibitory factor</i> (englisch „Makrophagen- Migrationsinhibierender Faktor“)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
min	Minute
MAPK-1	Map-Kinase Phosphatase 1
NKCC1	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter, Isoform-1
nm	Nanometer

ob. Gr.	obere Grenze
PenStrep	Penicillin und Streptomycin kombiniert
PET	Polyethylenterephthalat
R0	Nach WHO makro- und mikroskopisch vollständige Resektion eines malignen Tumors
R <sub>b</sub>	Hintergrundwiderstand
R <sub>n</sub>	gemessener Widerstand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<i>revolutions per minute</i> (englisch „Umdrehungen pro Minute“)
RTCA™	<i>Real time cell analysis</i> (englisch „Echtzeit-Zellanalyse“)
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
St-Fehler	Standardfehler
Tab.	Tabelle
U	<i>Unit</i> (englisch „Einheit“)
unt. Gr.	untere Grenze
WHO	<i>world health organization</i> (englisch „Weltgesundheitsorganisation“)
ZNS	zentrales Nervensystem

<b>MIGRATIONSANALYSEN AN DEN HUMANEN GLIOBLASTOMZELLINIEN U-373 MG UND U-87 MG UNTER ANWENDUNG VON MEDIKAMENTEN DES KLINISCHEN ALLTAGS .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
2.1 DAS GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....	9
2.1.1 Einordnung und histologische Einordnung .....	9
2.1.2 Klinik .....	10
2.1.3 Die Fähigkeit der Migration .....	10
2.2 METHODEN DER IN-VITRO-MIGRATIONSANALYSE VON GLIOBLASTOMEN .....	12
2.2.1 Kulturformen .....	12
2.2.2 Versuchsaufbau .....	13
2.2.3 Das Zeitkriterium der Messung.....	15
<b>3 ZIELE DER ARBEIT.....</b>	<b>17</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
4.1 MATERIAL .....	18
4.1.1 Zelllinien.....	18
4.1.2 Zellkultur .....	18
4.1.3 Kombiniertes Proliferations-Migrations-Assay .....	19
4.1.4 Colorimetrie-Zellmigrations-Assay.....	20
4.1.5 xCelligence™ .....	21
4.1.6 Medikamente .....	22
4.2 METHODEN .....	23
4.2.1 Zellkultur .....	23
4.2.2 Kombiniertes Proliferations-Migrations-Assay .....	23
4.2.3 Colorimetrie-Zellmigrations-Assay.....	25
4.2.4 xCelligence™ .....	26
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
5.1 VORBETRACHTUNGEN MITTELS DES KOMBINIERTEN PROLIFERATIONS-MIGRATIONS-ASSAYS.....	27
5.2 EINFLUSS ANTICHOLINERGER MEDIKAMENTE AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN .....	31
5.2.1 Ergebnisse des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays.....	31
5.2.2 Ergebnisse im Colorimetrie-Zellmigrations-Assay .....	33
5.2.3 Ergebnisse im xCelligence™.....	35
5.3 EINFLUSS ANTIHISTAMINISCHER MEDIKAMENTE AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN .....	38
5.3.1 Ergebnisse des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays.....	38
5.3.2 Ergebnisse im Colorimetrie-Zellmigrations-Assay .....	39
5.3.3 Ergebnisse im xCelligence™.....	41
<b>6 DISKUSSION .....</b>	<b>43</b>
6.1 EVALUIERUNG DER METHODEN .....	43
6.1.1 Endpunktverfahren.....	43
6.1.2 Impedanzbasiertes Echtzeitverfahren .....	44
6.2 VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BEEINFLUSSUNG DES CHOLINERGEN SYSTEMS.....	45
6.2.1 Anticholinerge Medikamente .....	45
6.2.2 Acetylcholinesteraseinhibitor Physostigmin.....	46
6.3 VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BEEINFLUSSUNG DES HISTAMINISCHEN SYSTEMS .....	47
6.4 VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI VARIATION DES EXTRAZELLULÄREN IONENGEHALTES .....	48

6.5	VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BLOCKADE VON IONENKANÄLEN UND -TRANSPORTERN .....	49
6.5.1	<i>Blockade von Ionenkanälen</i> .....	49
6.5.1.1	Natriumkanalblocker .....	49
6.5.1.2	Kaliumkanalblocker .....	50
6.5.1.3	Benzodiazepine .....	51
6.5.2	<i>Blockade von Ionentransportern</i> .....	51
6.5.2.1	Blockade des Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporters .....	51
6.5.2.2	Inhibition der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase .....	52
6.6	VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BEEINFLUSSUNG DES ADRENERGEN SYSTEMS .....	53
6.7	VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BEEINFLUSSUNG VON DNS UND PROTEINSYNTHESE .....	54
6.7.1	<i>Glukokortikoide</i> .....	54
6.7.2	<i>Temozolomid</i> .....	54
6.7.3	<i>Phytomenadion</i> .....	55
6.7.4	<i>Clindamycin</i> .....	55
6.8	VERÄNDERUNG DER MIGRATIONSRATE BEI MEDIKAMENTÖSER BEEINFLUSSUNG WEITERER METABOTROPER SIGNALWEGE .....	55
6.8.1	<i>Metamizol</i> .....	55
6.8.2	<i>Theophyllin</i> .....	56
6.8.3	<i>Tramadol</i> .....	56
6.9	SONSTIGE .....	57
6.9.1	<i>Acetylcystein</i> .....	57
6.9.2	<i>Levetiracetam</i> .....	58
6.9.3	<i>Thiamazol</i> .....	58
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>68</b>
9.1	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	68
9.2	DANKSAGUNG .....	69
9.3	LEBENS LAUF .....	70

## 1 Zusammenfassung

Das *Glioblastoma multiforme* ist einer der häufigsten hirneigenen Tumoren des Menschen und die Prognose für die daran erkrankten Patienten trotz multidisziplinärer Therapieschemata noch immer infaust. Insofern verwundert es kaum, dass diese Tumorentität unter anderem in der experimentellen Forschung in Bezug auf die molekularen Stoffwechselmechanismen und die Interaktion der Zellen mit der Umwelt weit verbreitet ist. Und obwohl immer mehr dieser Signalwege entschlüsselt werden, hat sich bis jetzt noch kein bahnbrechender Therapieansatz offenbart. Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Wirkung von Medikamenten der alltäglichen, klinischen Praxis auf die Migrationsrate kultivierter humaner Glioblastomzellen zu untersuchen. Hintergrund dessen ist vor allem die Erkenntnis, dass infolge der malignen Tumorbilogie des Zellverbandes *in vivo* eine Störung der Blut-Hirn-Schranke resultiert (Long 1970), sodass letztlich jedes systemisch verabreichte Medikament auf sie einwirken kann. Daher wurde ein breites Spektrum häufig angeordneter Wirkstoffe in ihrer handelsüblichen Zubereitungsform (für die intravenöse Gabe) ausgewählt, auch im Hinblick auf eine ähnliche Studie über eine intrazelluläre Kalziumantwort unter einer erstaunlichen Vielzahl solcher Medikamente (Kuhn et al. 2009). Diese wurden Glioblastomzellen der Linien U-373 MG und U-87 MG in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und deren Migrationsrate in drei unterschiedlichen *Transwell*-Verfahren erfasst. Zwei davon waren Endpunktverfahren, lichtmikroskopisch bzw. photometrisch ausgewertet, das dritte ein impedanzbasiertes Echtzeitverfahren (xCelligence™). Dadurch ist es auch möglich das letztgenannte, innovative Verfahren weiter zu evaluieren. Die statistische Auswertung der damit erhobenen Ergebnisse kann mit multiplen signifikanten Effekten der Medikamente auf die Wanderungsbestrebungen der beiden Zelllinien aufwarten. Darunter sind Antiarrhythmika, Neuroleptika, Antikonvulsiva, Glukokortikoide, Ionen und vieles mehr. In der Mehrzahl hemmen die Medikamente die Migration der untersuchten Zellen, wenige fördern sie auch. Manche, wie **Valproat**, **Levetiracetam** und **Haloperidol** zeigten genau gegensätzliche Effekte bei beiden Zelllinien oder mit steigender Dosierung. An vielen Stellen spiegelten sich ähnliche Ansätze in der Literatur wider und konnten bestätigt werden. Manches lässt sich am ehesten im Kontext einer Veränderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration werten (z.B. **Ketamin**), manches auch über gut bekannte Rezeptorwirkungen von Neurotransmittern (z.B. **Haloperidol**). Auch die Veränderung des extrazellulären

Ionenmilieus beeinflusste die Wanderungsbestrebungen, teils durch toxische, teils durch osmotische Wirkungen (z.B. **Natriumchlorid**lösung). Vieles bedarf jedoch weiterer Aufklärung, vor allem im Hinblick auf die molekularen Mechanismen, die diese Veränderungen bewirkt haben. Zudem könnten weitere Überlegungen zur effektiven Wirkstärke der verwendeten Substanzen, sowie eine genauere Differenzierung von Störeinflüssen durch Zusatzstoffe der Zubereitungsformen angestellt werden.



## 2 Einleitung

Entsprechend der WHO-Klassifikation werden Neoplasien von Gehirn und Rückenmark nach histopathologischen, klinisch-diagnostischen und epidemiologischen Kriterien in ein weltweit anerkanntes System eingeordnet, das in der aktuellen Version von 2007 ca. 130 Entitäten umfasst (Louis et al. 2007). Des Weiteren hat die Einteilung in vier Grade, die das biologische Verhalten der Tumoren im Sinne von Teilungs- und Infiltrationsrate kennzeichnet, wesentlichen Einfluss auf Prognose und Therapieentscheidung in der klinischen Praxis.

Derzeit erkranken in Deutschland jährlich etwa 4000 Männer und 3000 Frauen neu an einem Tumor des zentralen Nervensystems. Dabei kommen Glioblastome, andere gliomatöse Tumoren und Astrozytome am häufigsten vor, wohingegen Meningeome an zweiter Stelle stehen. Der Manifestationsgipfel liegt in der fünften bis sechsten Lebensdekade (Krebsregister-Deutschland).

### 2.1 Das *Glioblastoma multiforme*

#### 2.1.1 Einordnung und histologische Einordnung

Nach der oben genannten Klassifikation ist das *Glioblastoma multiforme* der Gruppe der Astrozytome zugehörig, leitet sich also von den Astrozyten, einer Untergruppe von Gliazellen, ab, die im gesamten Gehirn große Bedeutung für die Abgrenzung der Nervenzellen zu den Hirnhäuten und Blutgefäßen und die Aufrechterhaltung des empfindlichen extrazellulären Milieus besitzen, indem sie den Gehalt an Ionen und Neurotransmittern und die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen. Demzufolge sind die Zellen schon im physiologischen Zustand mit einer Vielzahl von Rezeptoren und Kanälen versehen, um dieser Aufgabe gerecht werden zu können (Verkhatsky und Steinhauser 2000, Verkhatsky 2006, Verkhatsky und Kirchhoff 2007). Die Neoplasien dieser Zellart zeigen starke histologische Variabilität. Das *Glioblastoma multiforme* entsteht entweder *de novo* aus den glialen Zellen („primär“), seltener entwickelt es sich über einen längeren Zeitraum unter Anhäufung genetischer Alterationen sekundär aus einem geringgradig malignen Astrozytom. Es entspricht *per definitionem* dem WHO-Grad IV, weil es diverse zytologische Malignitätskriterien erfüllt, mitotisch hochaktiv ist und zu zentralen Nekrosen neigt. Es entsteht meist supratentoriell in der weißen Substanz des Gehirns und wächst diffus-infiltrierend über

Nervenfaserzüge in die kontralaterale Hemisphäre ein (Russel 2006, Burger et al. 1988). Fernmetastasen werden jedoch fast nie beobachtet.

### 2.1.2 Klinik

Die Verdachtsdiagnose eines malignen Hirntumors zu stellen, gestaltet sich bei weitem nicht einfach, da ein solcher sich oft zuerst unspezifisch mit Müdigkeit und Leistungsabfall manifestiert. Fröhorgendliche Kopfschmerzen und Erbrechen, Wesensveränderungen, fokale-neurologische Defizite und im Erwachsenenalter neu aufgetretene epileptische Anfälle stellen deutlichere Hinweise dar und sollten immer Anlass zu einer gründlichen Abklärung bieten. Ist die Diagnose eines *Glioblastoma multiforme* schließlich gestellt, stehen chirurgische, chemo- und radiotherapeutische Therapieformen zur Behandlung bereit (Bartek et al. 2012, Johnson und Chang 2012). Trotz hochauflösender Bildgebung, großer klinischer Expertise und moderner Operationstechniken unterstützt von Neuronavigation ist die R0-Resektion dieses Tumors aufgrund der diffusen Verteilung der malignen Zellen in makroskopisch gesundem Hirngewebe nahezu unmöglich. Selbst unter Einsatz eines multimodalen Therapiekonzeptes kann in der Regel keine Heilung erreicht werden. Ein *Glioblastoma multiforme* rezidiert oft noch innerhalb des ersten Jahres nach der Exzision und schreitet dann rasch fort. Das mittlere Überleben liegt derzeit bei 6 bis 15 Monaten postoperativ (Stupp et al. 2005), die Prognose ist daher stets infaust.

### 2.1.3 Die Fähigkeit der Migration

Die oben geschilderten biologischen Leistungen werden in der aktuellen Forschung auf verschiedene Fähigkeiten des Tumorzellverbandes zurückgeführt. Neben Proliferation und Neovaskularisation, die damit in Wechselwirkung stehen, nimmt die Fähigkeit der Invasion eine zentrale Rolle in der Pathogenese des *Glioblastoma multiforme* als Systemerkrankung des Gehirns ein. Der Begriff umfasst dabei sowohl den Abbau der extrazellulären Matrix durch Freisetzung von Proteasen, als auch die zelluläre Fortbewegung, also die Migration. Diese wird wiederum von aktiven und auch passiven Mechanismen bestimmt, wie beispielsweise der Liquorzirkulation (Tysnes und Mahesparan 2001). Als physiologische Eigenschaft vieler menschlicher Zellen wie Stammzellen, Leukozyten, Fibroblasten und Spermatozyten, aber auch Tumorzellen, besteht die aktive Fortbewegung aus zwei Komponenten. Diese sind Chemokinese, die eine zufällige ungerichtete Bewegung darstellt, und Chemotaxis, eine gerichtete

Bewegung, die vom Vorhandensein bestimmter Chemoattraktanden abhängig ist. Obwohl eine Vielzahl von Studien dazu vorliegt, was genau es den Glioblastomzellen erlaubt, sich auf diese Art durch das Gewebe und auch über dessen anatomische Grenzen hinaus zu bewegen, ist dieser komplexe Mechanismus noch immer nicht zufrieden stellend aufgeklärt. Auch fördernde und hemmende Einflüsse dieses Vorgangs sind Gegenstand der Forschung.

Man stellt sich diesen multifaktoriellen Prozess *in vivo* derzeit modellhaft als Ablauf von mehreren Phasen vor. Zuerst ist die Ablösung der migratorischen Subklone von der Zellmasse des Haupttumors nötig. Dazu müssen interzelluläre Cadherin- und *Gap-Junction*-Verbindungen gelöst werden, was von der genetischen Konstitution und metabolischen Faktoren der Einzelzelle abhängig ist. Dann folgt die Kontaktaufnahme zu den Komponenten der extrazellulären Matrix. Dazu steht den Zellen eine Vielzahl von transmembranären Integrinen zur Verfügung, die sich spezifisch oder unspezifisch an die umgebenden Strukturen anheften können. Als entscheidendes Moment der Invasion ins umliegende Gewebe erfolgt daraufhin der Abbau extrazellulärer Matrix durch Metalloproteasen, die die Glioblastomzellen sezernieren, um ihrer Bewegung Platz zu verschaffen. Mittlerweile sind diverse physiologische wie auch pharmakologische Induktoren und Suppressoren dieser Enzymfreisetzung nachgewiesen. Erst in der letzten Phase wird die aktive Fortbewegung der Tumorzellen notwendig. Analog zu den glialen Progenitorzellen werden dabei lange, zytoplasmatische Fortsätze ausgebildet, worauf eine starke Vorwärtsbewegung des Zellkörpers folgt. Es ist bekannt, dass dazu Typ A und B-Myosin II benötigt werden, deren Aktivität von ihrer Phosphorylierung abhängig ist (Onishi et al. 2011).

Da dieser Prozess nur durch ein Zusammenspiel der zellulären Konstitution und externen Faktoren gelingen kann, hat man sich bemüht, die Zellmembran mit all den molekularen Strukturen, die dieses Zusammenspiel vermitteln, genau zu charakterisieren. Dabei wurden beispielsweise mittels der *Patch-clamp*-Technik seit den 80er und 90er Jahren zahlreiche Ionenkanäle und Rezeptoren für Neurotransmitter an diesen Zellen identifiziert (Verkhratsky und Steinhauser 2000). Auch immunhistochemische Verfahren finden breite Anwendung dabei, die genauen Signalwege zu entschlüsseln. Aufgrund der Breite, der in dieser Arbeit untersuchten Medikamente wird auf die relevanten Mechanismen in der Diskussion eingegangen.

## 2.2 Methoden der *In-vitro*-Migrationsanalyse von Glioblastomen

Je nach wissenschaftlicher Fragestellung steht aktuell eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, um die gerichtete oder ungerichtete Fortbewegung humaner Zellen experimentell zu untersuchen. Da in der vorliegenden Studie drei verschiedene Assays zum Einsatz kamen, die alle *In-vitro*-Bedingungen unterlagen, soll hier eine kurze Darstellung der derzeit anerkannten Versuchsanordnungen in dieser Sparte erfolgen. Jegliches Experiment, das sich im Reagenzglas statt im lebenden Organismus abspielt, stellt eine Vereinfachung dar, die die Bedingungen *in vivo* zwar nachahmen, aber auf wenige, beherrschbare Faktoren reduzieren soll. Ausdruck findet dies in der Entscheidung über die Kulturform, die man im Experiment wählt. Ein weiteres Kriterium ist der Versuchsaufbau: Soll zum Beispiel ein Gradient eines Chemoattraktanden geschaffen werden oder will man die ungerichtete Bewegung der Zellen untersuchen? Beides führt zu technischen Veränderungen in der Durchführung. Eine weitere Überlegung, die vor Aufnahme solcher Untersuchungen angestellt werden sollte, ist die, ob man den zeitlichen Ablauf der Migration, beispielsweise im Hinblick auf bestimmte Phasen, untersuchen will, oder ob es ausreicht, das Ergebnis am Ende der Laufzeit zu bestimmen.

### 2.2.1 Kulturformen

Besonders häufig kommen für *In-vitro*-Migrationsstudien dauerhafte Zelllinien zum Einsatz, da ihre Verfügbarkeit gut, ihre Kultivierung verhältnismäßig einfach und die damit erzielten Ergebnisse reproduzierbar sind. Es ist jedoch einzuräumen, dass die Zellen mit steigender Passagezahl genetischen Veränderungen unterliegen, die im Versuchsablauf nicht immer offensichtlich sind. Der Metabolismus der Zellen kann dadurch stark von dem der ursprünglichen Tumorform abweichen, was die Validität des Experimentes erheblich senkt, bemüht man sich nicht darum, die Passagezahl gering zu halten (Onda et al. 1988, Paulus et al. 1994). Eine andere Möglichkeit ist die Gewinnung und Kultivierung der benötigten Zellen aus einem Tumorbioptat.

Bezüglich der Kulturform werden bei den *In-vitro*-Migrationsexperimenten oft zwei Prinzipien unterschieden: Die Monoschicht- und die Sphäroid- Kultur. Bei der Monoschicht-Kultur werden kultivierte Glioblastomzellen in einlagiger Schichtstärke verschiedener Konfluenz auf künstlichen Oberflächen betrachtet. Diese Oberflächen können je nach Ansatz unbeschichtet, mit unspezifischen Proteinlösungen oder speziellen extrazellulären Matrixkomponenten beschichtet sein, die die Anheftung der

Zellen ermöglichen (Chicoine und Silbergeld 1995). Tumor-Sphäroide bestehen hingegen aus einer dreidimensionalen, artifiziellen Matrix, beispielsweise basierend auf Kollagen I als vorherrschende extrazelluläre Matrixkomponente des Körpers. Weitere Komponenten werden hinzugefügt, um bestimmte humane Gewebe in ihrer Zusammensetzung modellhaft nachzuahmen, bevor schließlich die Tumorzellen auf dem Konstrukt angesiedelt werden können. In dieser Form bleiben wie *in vivo* sowohl vom Tumor gebildete extrazelluläre Matrixbestandteile wie auch interzelluläre Kontakte bestehen. Sphäroide können mit Hilfe kultivierter Zelllinien künstlich hergestellt oder durch Biopsie gewonnen werden, was sich aufgrund der großen Nähe zur *In-vivo*-Situation besonders gut für Invasionsstudien eignet (Bräuner und Hülser 1990, Bräuner et al. 1990, Lund-Johansen et al. 1990, Tysnes und Mahesparan 2001).

Aufgrund diverser Unterschiede der zellulären Architektur und molekularen Struktur in beiden Ansätzen lassen sie voneinander abweichende Beobachtungen zu, die jeweils mit eigenen Vor- und Nachteilen verbunden sind. Zweidimensionale Modelle eignen sich daher zwar für die Untersuchung gewisser Botenstoffe und Medikamente in ihrer Wirkung auf die Wanderungsbestrebungen der Zellen, reichen aber nicht aus, um aussagekräftige Beobachtungen über die molekularen Abläufe der Migration *per se* vorzunehmen, wie es mit dem dreidimensionalen Modell eher gelingt. Es wird daher ein experimentelles Vorgehen unter Anwendung mehrerer Methoden empfohlen (Palm et al. 2005).

### 2.2.2 Versuchsaufbau

Bezüglich des Versuchsaufbaus lassen sich zwei- und dreidimensionale Verfahren unterscheiden. Im zweidimensionalen Verfahren werden Zellen auf eine künstliche Oberfläche ausgesät und unter festgelegten Bedingungen über kurze Zeit inkubiert. Obwohl beschrieben ist, dass die Zellen dabei oft eine für Migration typische Morphologie wie zum Beispiel Pseudopodien ausbilden, zeigen sie in dieser Anordnung doch nur geringe Wanderungstendenzen (Entschladen et al. 2005). Eine Modifikation dieses Verfahrens stellt das *Scratch-Assay* dar, bei dem in eine geschlossene Zellschicht mit einem dünnen Kratzer versehen und dann beobachtet wird, in welchem Zeitraum die Zellen den frei gewordenen Raum erneut besiedeln. Dies ist neben migratorischen auch von proliferativen Leistungen bestimmt (Yarrow et al. 2004).

Eine Zwischenform zwischen zwei- und dreidimensional stellen die Filter- oder *Transwell-Assays* dar, die in einer breiten Palette kommerziell vertrieben werden. Dabei

migrieren die Zellen einer Versuchsmulde (englisch „*Well*“) durch eine Filtermembran mit Poren von definierter Größe. Um bei Tumorzellen die aktive Migration notwendig zu machen, liegt diese normalerweise zwischen drei und acht Mikrometern. Die Membran kann, wie auch beim zweidimensionalen Aufbau, blank, mit Proteinen oder gar Zellen beschichtet sein, um bestimmte *In-vivo*-Bedingungen nachzubilden. Da die Urform dieses Aufbaus erstmals 1962 von S. Boyden beschrieben wurde, wird er im englischen Sprachraum auch als „*Boyden-Chamber-Assay*“ bezeichnet (BOYDEN 1962). Die Filtermembran unterteilt das *Well* auf der Zellkulturplatte dabei in eine obere und eine untere Kammer. Der ursprüngliche Zweck, durch Positionierung eines Chemoattraktanden in der unteren Kammer eine isolierte Messung der gerichteten zellulären Bewegung (Chemotaxis) im Gegensatz zur Chemokinese zu ermöglichen, ließ sich jedoch nicht erfüllen. Weiterführende Arbeiten zeigten nämlich, dass sich allzu schnell ein Gleichgewicht löslicher Substanzen im Medium der oberen und der unteren Kammer ausbildet (Zigmond und Hirsch 1973). Nach Ablauf des Testzeitraumes können dann die Zellen an der Unterseite des Filters bzw. auf dem Boden der unteren Kammer, also die migratorisch aktive Fraktion, ausgezählt oder anderweitig quantitativ erfasst werden.

Während die bisher genannten Versuchsanordnungen leicht zu handhaben sind und sich gut für Screening-Zwecke eignen, ist der dreidimensionale Ansatz weit komplexer. Die Zellen werden hier in eine artifizielle Matrix aus unterschiedlichen Komponenten (s.o.) eingebettet, die Leitstrukturen für die Migration bereithält. Methode der Wahl zur Erfassung dessen stellt hier die kontinuierliche Videomikroskopie dar.

Um die Wanderungsrichtung der Zellen zu analysieren, bedarf es, wie oben bereits angedeutet, noch aufwändigerer Überlegungen. Schließlich muss ein Gradient des Chemoattraktanden geschaffen und aufrecht erhalten werden, damit vor allem langsam migrierende Zellen wie Fibroblasten und Tumorzellen untersucht werden können. Inzwischen gibt es eine Vielzahl spezieller Chemotaxis-Kammern für diesen Zweck. Auf jene soll aber in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden, da sie nicht zu den hier angewandten Methoden gehören. Es sei jedoch auf die aufschlussreiche Übersichtsarbeit von F. Entschladen und Kollegen verwiesen (Entschladen et al. 2005).

Als Innovation der letzten Jahre auf dem Gebiet der Methoden, bei denen eine kontinuierliche Messung erfolgt, ist die impedanzbasierte Messung zu nennen. 2002 von C. Keese und Mitarbeitern erstmals beschrieben, kommt es zur Änderung des

Elektrodenwiderstandes, wenn sich eine dort angesiedelte Zellkultur darauf ausbreitet (Keese et al. 2002, Keese et al. 2004). Durch diese Beobachtung ist es wie bei der Videomikroskopie auch möglich, den zeitlichen Ablauf von Proliferation, Migration und Invasion in Abhängigkeit von multiplen, variierbaren Faktoren zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit kam eine Weiterentwicklung dieser Erkenntnis - das xCelligence™-System der Firma Roche - zum Einsatz, weshalb das Prinzip für das *Transwell*-Migrationsexperiment an dieser Stelle kurz erläutert werden soll. Hier befinden sich die Gold-Mikroelektroden an der Unterseite der Filtermembran (Porengröße 8µm), die das einzelne *Well* der speziellen Mikrotiterplatte (CIM™-Platte 16) in eine obere und eine untere Kammer unterteilt, analog zur traditionellen Boyden-Kammer. In individuell festlegbaren Zeitabständen erfolgt ein automatischer Stromfluss über die Elektroden, durch den das System den Widerstand an diesen bestimmt. Der Widerstand nimmt zu, je mehr Zellen aus dem oberen Kompartiment die Poren passieren und sich an die Unterseite anheften. Die automatische Aufzeichnung eines Index-Parameters für die einzelnen Messzeitpunkte vereinfacht Durchführung und Auswertung im Vergleich zu den anderen, oben beschriebenen Verfahren (Keogh 2010).

### 2.2.3 Das Zeitkriterium der Messung

Ein weiteres Kriterium für die Einteilung von *In-vitro*-Migrationsexperimenten stellt der zeitliche Ablauf der Messung dar. Grundsätzlich werden Endpunktverfahren von kontinuierlichen Messungen unterschieden. Bei ersteren wird das Ergebnis nur am Ende des Testzeitraumes erhoben, was letztlich keine qualitativen Aussagen über den Ablauf der Wanderung zulässt, sondern nur das quantitativ zu verwertende Endergebnis bereithält.

Bei kontinuierlichen Messungen werden die Werte nach der experimentellen Intervention über einen längeren Abschnitt des Ablaufes hin erfasst. Auf diese Art ist es möglich, die Geschwindigkeit der Wanderung und migratorisch aktive und inaktive Phasen zu erfassen, sowie die Richtung der Migration, sofern die Messung mittels Zeitraffer-Videomikroskopie erfolgt. All diese Parameter werden unter dem migratorischen Verhalten zusammengefasst und können auch bei mehreren betrachteten Zellarten voneinander getrennt analysiert werden. In derartigen Experimenten hat sich gezeigt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit von Tumorzellen sehr niedrig ist, ca. 0,1 - 0,3 µm/min abhängig von der Art des Tumors (T-Lymphozyten hingegen mit 10 µm/min) Das Verfahren bietet eine hohe zeitliche Auflösung und ermöglicht eine

lange Beobachtungszeit (Niggemann et al. 1997, Niggemann et al. 2004). Während die Aufnahme durch eine Kamera an einem Lichtmikroskop für größere Kohorten von Zellen geeignet ist, ermöglicht der Einsatz eines konfokalen Laser-Scanningmikroskopes sogar die Betrachtung einzelner Zellen und deren morphologischer Veränderungen während der Migration.

Je nach Fragestellung kann auch die Kombination mehrerer Methoden angezeigt sein, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde.



### 3 Ziele der Arbeit

Infolge des aggressiven biologischen Verhaltens der Glioblastomzellen *in vivo*, beispielsweise durch Freisetzung von Proteasen, kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix und damit auch zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke (Long 1970). Dies hat zur Folge, dass jedwedes systemisch verabreichte Medikament auf die Zellen des Tumors einwirkt, die, wie zahlreiche Studien belegen, mit einer Vielzahl von Rezeptoren versehen sind (Kanu et al. 2009, Kuhn et al. 2009). Zudem zeigen die epidemiologischen Daten, dass es sich bei Patienten mit Glioblastomen häufig um ältere und multimorbide Menschen handelt, die zudem auf ein breites Spektrum verschiedener Pharmaka eingestellt sind.

So stellt sich die Frage, inwiefern der Metabolismus dieses hochmalignen Tumors von diesen Medikamenten beeinflusst wird und ob die Wachstums- und Migrationsraten der Zellen unter diesen Einflüssen tatsächlich variieren. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen soll *in vitro*, genauer gesagt in der Monoschicht-Zellkultur, untersucht werden, ob Medikamente des klinischen Alltags die Migrationsbestrebungen der Zellen im Vergleich zu medikamentenfreien Kontrollen signifikant verändern. Es wurde dafür zunächst eine Reihe von 32 häufig angeordneten Medikamenten im Sinne eines Screeningverfahrens in ihrem Einfluss auf das Migrationsverhalten kultivierter Glioblastomzellen untersucht. Unter den Medikamenten, die eine Reaktion verursachten, wurde eine Auswahl getroffen, welche für die weitere Testung mit objektiveren Verfahren infrage kommen konnten. Darüber sollten sich nicht nur Hinweise ergeben, welche Medikamente tatsächlich einen Einfluss auf die Tumorzellen besitzen, den man in Zukunft möglicherweise im Hinblick auf seine molekularbiologischen Mechanismen aufklären könnte. Zudem sollte ein Vergleich der angewandten Methoden ermöglicht werden. Von den drei Methoden handelt es sich bei zweien um Endpunktverfahren, von denen eines manuell und eines photometrisch ausgewertet wurde. Das dritte ist ein impedanzbasiertes Echtzeit-Verfahren (xCelligence™-System) und damit wie oben beschrieben eine Innovation auf diesem Gebiet, die noch weiterer praktischer Validierung bedarf.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Zelllinien

U-373 MG                      Glioblastomzellen eines 61-jährigen Kaukasiers. Isoliert von J. Ponten und Mitarbeitern im Jahr 1973. Bezogen von der Fa. ATCC, Wesel

U-87 MG                      Glioblastomzellen einer 44-jährigen Kaukasierin, die zwischen 1966 und 1969 von J. Ponten und Mitarbeitern isoliert wurden. Bezogen von der Fa. CLS-Cell-Lines-Service, Eppelheim

#### 4.1.2 Zellkultur

Zellkulturflaschen            75cm<sup>2</sup>, 250ml, für Monoschichtkulturen (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen)

DMEM                         Zellkulturmedium, 500ml, mit 4,5g/l Glucose, mit L-Glutamin, ohne Pyruvat (Fa. GIBCO invitrogen, Darmstadt)

FBS                            Als Supplement der Wachstumsfaktoren zum Zellkulturmedium (Fa. GIBCO invitrogen, Darmstadt)

PenStrep                      Zusatz von 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zum Zellkulturmedium; Stammlösung mit 10000U/ml und 10000µg/ml (Fa. GIBCO invitrogen, Darmstadt), 100fach verdünnt mit destilliertem Wasser

0,05% Trypsin-EDTA        Zum Ablösen der Zellen aus der Kulturflasche (Fa. GIBCO invitrogen, Darmstadt)

Zellschaber                    28cm lang (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro (Fa. Brand GmbH&CO.KG, Wertheim)
Pipetten	Glaspipetten für 5 und 10ml und Pasteurpipetten zum Absaugen (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Falcon-Röhrchen	15 und 50ml, konisch (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Gasbrenner	Fireboy Plus (Fa. INTEGRA Biosciences, Fernwald)
Gasflaschen	Butan CV360 (Fa. Campingaz, Hungen)
Absaugpumpe	Integra Vacusafe (Fa. INTEGRA Biosciences, Fernwald)
Inkubator	HERA Cell (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Reinraumwerkbank	HERA Safe (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Zentrifuge	Biofuge Primo R Centrifuge (Fa. Thermo Electron Corporation, Erlangen)
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25 (Fa. Zeiss, Jena)

#### 4.1.3 Kombiniertes Proliferations-Migrations-Assay

24-Well-Platten	Zellkultur-Testplatte mit 24 Wells (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
Filtereinsätze	ThinCert™ - dreiarmige Filtereinsätze für die einzelnen Wells mit 8µm Porengröße aus Polycarbon (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) (Abb.1)

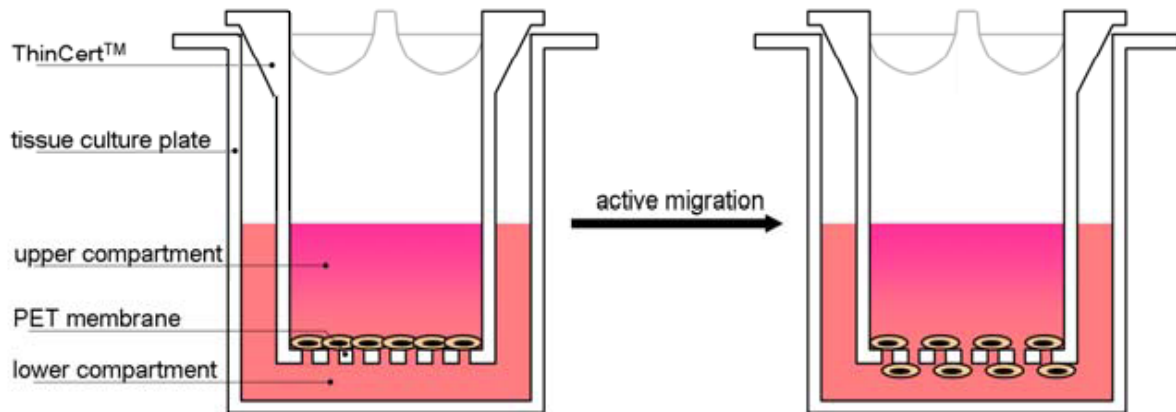


Abb.1 Schematische Darstellung von Aufbau und Funktionsweise des ThinCert™-Systems. Übernommen von der Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Neubauer-Zählkammer	Neubauer CC, Tiefe: 0,100mm, Fläche: 0,0025mm <sup>2</sup> (Fa. Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen)
Mikroliter-Pipetten	Finnpipette 0,5 - 10µl (Fa. Thermo Labsystems, Dreieich) Pipetman 2 - 20µl, 50 - 200µl, 200 - 1000µl (Fa. GILSON, Limburg-Offheim)
Pipettenspitzen	0,5 - 10µl, 5 - 200µl, 100 - 1000µl für Gilson-Mikroliterpipetten (Fa. A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Wattestäbchen	Holz, 4 - 5mm Watte (Fa. NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter)
Einhandzähler	Metall, Zahlen von 0 bis 9999 (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

#### 4.1.4 Colorimetrie-Zellmigrations-Assay

Färbelösung	Bestehend aus 3,6ml 99,8% Ethanol, 250µl Methanol, 250µl Isopropanol, einer Spatelspitze Kristallviolett (alles bezogen von der Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und 45,9ml destilliertem Wasser
-------------	---

Extraktionspuffer	Bestehend aus 22,5ml 98,9% Ethanol, 1,25ml Methanol, 1,25ml Isopropanol, 0,75g Natriumacetat, 0,25ml Essigsäure (alles bezogen von der Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und 24,75ml destilliertem Wasser
96-Well-Mikrotiterplatte	Zellkultur-Testplatte 96 Wells (Fa. Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud)
Photometer	SLT Spectra (Fa. SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim)
4.1.5 xCelligence™	
CIM™-Plate 16	Migrationsanordnung für das xCelligence™ RTCA DP™-Gerät mit zwei durch eine Filtermembran mit Porengröße 8µm getrennte Kammern (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Zusammenbauhilfe	Gussstück zum Einsatz des unteren Teils der Platte und sicherem Aufsatz des oberen (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Mehrfachpipette	Multipette® plus mit Aufsätzen für 25 - 500µl (Fa. Eppendorf AG, Hamburg)
Reagiergefäße	Safe Seal Reagiergefäße 2ml (Fa. Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)
xCelligence™ RTPA DP	Gerät mit Messplätzen für drei Platten simultan und Anschluss an den Computer (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Computer	EliteBook 6930p™ mit RTCA™-Software 1.2 und Anschluss an den Messplatz (Fa. Hewlett-Packard GmbH, Berlin)

## 4.1.6 Medikamente

Die verwendeten Präparate sind der nachfolgenden Tabelle (Tab.1) zu entnehmen.

Tab.1 Auflistung der verwendeten Medikamente und ihrer Hersteller

<b>Wirkstoff</b>	<b>Zubereitung und Hersteller</b>
<b>Acetylcystein</b>	ACC injekt 300mg/3ml von HEXAL AG, Holzkirchen
<b>Adrenalin</b>	Adrenalin 1:1000 1mg/1ml von Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena
<b>Amiodaron</b>	Cordarex 150mg/3ml von Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
<b>Atropin</b>	Atropinsulfat B.Braun 0,5mg/1ml von B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Bupivacain</b>	Bucain-Actavis Dt.0,5% 50mg/10ml von Actavis Deutschland GmbH München-Riem
<b>Clindamycin</b>	Clindamycin-ratiopharm 300mg/2ml von ratiopharm Arzneimittel VertriebsGmbH, Ulm
<b>Clonidin</b>	Clonidin-ratiopharm 0,15mg/1ml von ratiopharm Arzneimittel VertriebsGmbH, Ulm
<b>Dexamethason</b>	Dexa 4mg inject 4mg/1ml von Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena
<b>Diazepam</b>	Faustan 10mg/2ml von Temmler Werke Holding GmbH, Marburg
<b>Digoxin</b>	Lanicor 0,25mg/1ml von TEOFARMA S.R.L, Pavia
<b>Dimetinden</b>	Fenistil 4mg/4ml von Novartis Consumer Health GmbH, Nürnberg
<b>Furosemid</b>	Furorese 20mg/2ml von HEXAL AG, Holzkirchen
<b>Haloperidol</b>	Haldol-Janssen 5mg/1ml von Janssen-Cilag GmbH, Neuss
<b>Hydrokortison</b>	Hydrokortison 100mg von ROTEXMEDICA GmbH, Trittau
<b>Kalium</b>	Kaliumchlorid 7,45% 1mmol/1ml von B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Kalzium</b>	Calcium-Sandoz 10% 10ml von Sandoz Pharmaceuticals GmbH, Holzkirchen
<b>Ketamin</b>	Ketamin 100mg/2ml von AlleMan Pharma GmbH, Rimbach
<b>Levetiracetam</b>	Keppra 100mg/ml von UCB GmbH, Kerpen
<b>Metamizol</b>	Novaminsulfon-ratiopharm 1g/2ml von ratiopharm Arzneimittel VertriebsGmbH, Ulm
<b>Midazolam</b>	Midazolam-ratiopharm 5mg/5ml von ratiopharm Arzneimittel VertriebsGmbH, Ulm
<b>Natrium</b>	Natriumchlorid 5,85% 1mmol/1ml von B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Orciprenalin</b>	Alupent 0,5mg/1ml von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim/Rhein
<b>Phenytoin</b>	Phenhydantoin 250mg/5ml von Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
<b>Physostigmin</b>	ANTICHOLIUM 2mg/5ml von Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim
<b>Phytomenadion</b>	Konaktion MM 10mg/1ml von Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
<b>Promethazin</b>	Atosil 50mg/2ml von Bayer Vital GmbH, Leverkusen
<b>Temozolomid</b>	Temodal 100mg von SP Europe, Brüssel
<b>Theopyllin</b>	Euphyllong 200mg/10ml von Nycomed Germany Holding GmbH, Konstanz
<b>Thiamazol</b>	Thiamazol inject 40mg/1ml von Hennig Arzneimittel GmbH & Co. KG, Flörsheim/Main
<b>Tramadol</b>	Tramal 100mg/2ml von Grünenthal GmbH, Aachen
<b>Urapidil</b>	Ebrantil 50mg/10ml von Nycomed Germany Holding GmbH, Konstanz
<b>Valproat</b>	Orfiril 100mg/ml von Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der U-373 MG- und U-87 MG-Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen mit DMEM und 10% FBS, sowie 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin im Inkubator bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Spannung von 5%. Außer täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei einer Konfluenz von 90 bis 100% wurden die Zellen durch 0,05%iges Trypsin unter Einsatz des Zellschabers abgelöst und unter Zugabe von 10ml Medium in ein 50ml-Falconröhrchen überführt. Das Trypsin wurde bei 4°C unter 800rpm zehn Minuten lang abzentrifugiert. Die in Medium resuspendierten Zellen wurden dann auf mehrere neue Kulturflaschen aufgeteilt und erneut inkubiert.

### 4.2.2 Kombiniertes Proliferations-Migrations-Assay

Für diese Messung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90% kultiviert. Am ersten Tag erfolgten deren Ablösung mittels 0,05%igem Trypsin und Zellschaber, das Zentrifugieren (siehe unter 4.2.1) und schließlich die Resuspension des Pellets in 2ml FBS-haltigem Medium. Von dieser Suspension wurden 10µl mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Stammlösung mit FBS-haltigem Medium so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 500 Zellen pro Milliliter resultierte. Dann wurde in 24-Well-Platten 500µl FBS-haltiges Medium pro Well vorgelegt und in jede Vertiefung ein Polycarbonfilter eingehängt. Auf den Filter wurden 500µl der Zellsuspension gegeben und die Platten anschließend für 24 Stunden inkubiert.

Am zweiten Tag wurde das Medium aus jedem Well komplett abgesaugt und durch 1ml FBS-freies Medium ersetzt. Während erneuter 24-stündiger Inkubation kam es zur Synchronisation des Zellzyklus. Am dritten Tag erfolgte in der Reihe A erneut ein Mediumwechsel zu FBS-haltigem Medium (Positivkontrolle), in Reihe B keine Veränderung (Negativkontrolle) und in Reihe C und D die Zugabe von Medikamenten oben auf den Filter in drei verschiedenen Konzentrationen (Tab.2).

Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung wie folgt: Zunächst wurden alle Zellen gezählt, die man am Filter sehen konnte, unabhängig, ob sie an dessen Ober- oder Unterseite gewachsen waren. Dann wurde mit einem Wattestäbchen die Oberseite der porösen Membran von Zellen befreit und erneut ausgezählt. Somit wurden jene erfasst, die migriert und an der Unterseite angewachsen

waren. Und zuletzt wurde der Filtereinsatz entfernt und der Boden des *Wells* begutachtet. Waren dort Zellen angelangt, so wurden auch diese ausgezählt. Mittels dieser drei Werte konnte der Anteil an migrierten Zellen an der Gesamtzahl pro *Well* ermittelt werden. Dieser Anteil wurde mit der Negativkontrolle verglichen.

Diese Methode kam an beiden Zelllinien für alle 32 Medikamente (s.Tab.1), in drei verschiedenen Konzentrationen und drei Wiederholungen zum Einsatz.

Tab. 2 Auflistung der im Experiment verwendeten Dosen der einzelnen Medikamente

<b>Wirkstoff</b>	<b>Dosis im Experiment pro ml Medium</b>		
Acetylcystein	30µg	300µg	3mg
Adrenalin	0,1µg	1µg	10µg
Amiodaron	5µg	50µg	500µg
Atropin	0,3µg	3µg	30µg
Bupivacain	0,5µg	5µg	50µg
Clindamycin	30µg	300µg	3mg
Clonidin	0,015µg	0,15µg	1,5µg
Dexamethason	0,4µg	4µg	40µg
Diazepam	0,5µg	5µg	50µg
Digoxin	0,075µg	0,75µg	7,5µg
Dimetinden	0,1µg	1µg	10µg
Furosemid	3µg	30µg	300µg
Haloperidol	0,5µg	5µg	50µg
Hydrokortison	0,5µg	5µg	50µg
Kalium	0,01mmol	0,1mmol	1mmol
Kalzium	0,7mmol	7mmol	70mmol
Ketamin	8µg	80µg	800µg
Levetiracetam	0,1mg	1mg	10mg
Metamizol	50µg	500µg	5mg
Midazolam	0,5µg	5µg	50µg
Natrium	0,1mmol	1mmol	10mmol
Orciprenalin	0,05µg	0,5µg	5µg
Phenytoin	10µg	100µg	1mg
Physostigmin	0,04µg	0,4µg	4µg
Phytomenadion	5µg	50µg	500µg
Promethazin	2,5µg	25µg	250µg
Temozolomid	200µmol	400µmol	800µmol
Theopyllin	2µg	20µg	200µg
Thiamazol	2µg	20µg	200µg
Tramadol	10µg	100µg	1mg
Urapidil	0,5µg	5µg	50µg
Valproat	0,12mg	1,2mg	12mg



#### 4.2.3 Colorimetrie-Zellmigrations-Assay

Bei den zu 80 bis 90% konfluenten Zellkulturflaschen erfolgte am ersten Tag ein Mediumwechsel zu FBS-freiem Medium. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, wie unter 4.2.2 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde hier mit FBS-freiem Medium resuspendiert und nach Auszählung unter weiterer Zugabe von FBS-freiem Medium auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter verdünnt.

Wieder wurden in 24-Well-Platten Polycarbonfilter eingehängt und je 300µl der Zellsuspension mit dem zu testenden Medikament in die obere Kammer pipettiert. In die untere Kammer wurden 500µl serumhaltiges Medium eingefüllt.

Nach 24 Stunden im Inkubator wurde das Medium abgesaugt und in die untere Kammer jeden Wells 400µl Färbelösung pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Einsätze aus der Platte genommen, in destilliertem Wasser gespült und die Oberseite der Filtermembran mittels Wattestäbchen von Zellen und durchgedrungener Farbe befreit. Nachdem die Filter luftgetrocknet waren, wurde mit 200µl Extraktionspuffer pro Einsatz die Farbe aus den Zellen herausgelöst und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 100µl der Lösung in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte überführt. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550nm.

Mit dieser Methode erfolgte die Testung von fünf Medikamenten in drei verschiedenen Konzentrationen (Tab.3) mit je drei Wiederholungen an beiden Zelllinien. Es wurden je drei Wells mit Leerwert (nur Medium ohne Zellen), Negativkontrolle (kein Medikament, FBS-freies Medium in der unteren Kammer) und Positivkontrolle (kein Medikament) mitgeführt.

Tab.3 Im Colorimetrie-Zellmigrations-Assay verwendete Medikamente mit Dosierungen

<b>Wirkstoff</b>	<b>Dosierungen im Experiment pro ml Medium</b>		
<b>Atropin</b>	5µg	10µg	25µg
<b>Dimetinden</b>	10µg	25µg	50µg
<b>Haloperidol</b>	5µg	10µg	25µg
<b>Ketamin</b>	100µg	250µg	500µg
<b>Promethazin</b>	0,25µg	0,5µg	1µg

#### 4.2.4 xCelligence™

Bei den zu 80 bis 90% konfluenten Zellkulturflaschen erfolgte am ersten Tag ein Mediumwechsel zu FBS-freiem Medium. Am zweiten Tag wurde zuerst die CIM™-Platte 16 vorbereitet. Unter Benutzung der Zusammenbauhilfe wurden in die *Wells* des unteren Anteils je 160µl FBS-haltiges Medium eingefüllt. Nachdem der Aufsatz des oberen Anteils erfolgt war, wurde die Oberfläche der Membran mit 25µl FBS-freiem Medium bedeckt. Zur Äquilibration der Membranoberfläche wurde die Platte 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Hintergrundwiderstände an den Filtermembranen der einzelnen *Wells* am RTCA™-Messplatz bestimmt und die Daten des Experimentes in die Software eingegeben.

Die Zellen wurden abgelöst und zentrifugiert, wie unter 4.2.2 beschrieben. Nach der Auszählung erfolgte die Herstellung einer Zellsuspension in FBS-freiem Medium mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter. Nach Zusatz des zu analysierenden Medikamentes wurden der oberen Kammer 100µl der Lösung hinzugefügt. Damit sich die Zellen auf die poröse Membran absetzen konnten, wurden die Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Messung am Gerät gestartet werden konnte. Unter konstanten Inkubationsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt) erfolgten dann alle 15 Minuten insgesamt 97 Messungen, deren Ergebnisse automatisch von der Software gesichert wurden.

Mit diesem Verfahren wurden fünf Medikamente in je drei verschiedenen Konzentrationen und drei Wiederholungen bei der Zelllinie U-373 MG getestet (vgl. Tab.3). In jedem Durchgang wurden zwei *Wells* als Leerwert (keine Zellen, nur Medium) und vier *Wells* als Negativkontrolle (kein Medikament) mitgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vorbetrachtungen mittels des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays

Wie unter 4.2.2 beschrieben, erfolgte am vierten Tag des Experimentes, nachdem die Glioblastomzellen über 24 Stunden unter dem Medikament inkubiert waren (Konzentrationen siehe Tab. 2), jeweils deren Auszählung am Lichtmikroskop. Daraus resultierten drei Werte pro *Well*, aus denen ermittelt werden konnte, wie viele Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle durch Proliferation hinzu gekommen waren und wie viele im Vergleich zur Gesamtzahl des *Wells* den Filter durch Migration passiert hatten. Für jedes der 32 Medikamente wurde dieser Anteil sechsmal für jede der drei Konzentrationen bei beiden Zelllinien erhoben. Das Pipettierschema der 24-*Well*-Zellkulturplatten wurde so gewählt, dass in einem Durchlauf über 72 Stunden je zwei *Wells* mit identischer Konzentration der Testsubstanz ausgewertet und einer Negativkontrolle in sechs *Wells* derselben Platte zugeordnet werden konnten. Die Medikamente wurden dabei immer frisch angesetzt, um die volle Aktivität zu gewährleisten.

Da für jedes *Well* drei Werte erhoben wurden, konnten die Unterschiede in den Proliferations-, Migrations- und kombinierten Proliferations-Migrationsraten über den Testzeitraum zwischen der Negativkontrolle und den mit Medikamenten versetzten Proben verglichen werden.

Unter Benutzung von Microsoft Excel™ wurden die Rohdaten zunächst erfasst und geordnet. Von den Negativkontrollen der einzelnen Zellkulturplatten wurden dann die Mittelwerte der Gesamtzahlen, der migrierten Zellen und des Verhältnisses der beiden gebildet. Die daraus erhaltenen Werte bildeten die Richtwerte einer Platte. Diesen wurden die entsprechenden Werte der mit Medikamenten versetzten *Wells* des gleichen Durchlaufes zugeordnet. Daraus ließ sich ein Anteil bilden, der der statistischen Auswertung zugänglich gemacht werden konnte.

Dazu wurden die Daten mittels der Statistik-Software SPSS 19™ zunächst auf Normalverteilung überprüft und dann einer univariaten Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) unterzogen. Je nach Ergebnis wurden dann der Tukey- oder der Tamhane-Test zur Feststellung signifikanter Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen herangezogen. Tab. 4 zeigt eine Zusammenstellung der Fälle, bei denen sich ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ergeben hat. Proliferation, Migration und

die kombinierte Rate wurden getrennt ausgewertet, um im Hinblick auf die lange Laufzeit des Experimentes (über 72 Stunden) den Einfluss der Proliferation auf das Ergebnis des Migrationsverhaltens evaluieren zu können. Außer in den unten aufgeführten Fällen hat sich kein signifikanter Effekt der Medikamente gezeigt.

Tab. 4 Auflistung der als signifikant getesteten Unterschiede zur Negativkontrolle

WIRKSTOFF	ZELLINIE	KONZ./ML	VOR- GANG	TREND	ST.- FEHLER	P- WERT	95%- KONFIDENZ- INTERVALL	
							UNT.GR.	OB.GR.
<b>Adrenalin</b>	U-373 MG	10 µg	Prol.	↓	1,74	0,0001	87,41	101,99
	U-87 MG	1 µg	Prol.	↓	8,01	0,003	32,39	99,67
	U-87 MG	10 µg	Prol.	↓	9,17	0,002	41,77	118,75
	U-87 MG	1 µg	Mig.	↓	13,12	0,044	1,75	111,92
	U-87 MG	10 µg	Mig.	↓	14,52	0,019	15,76	137,66
<b>Amiodaron</b>	U-373 MG	5µg	Prol.	↓	4,48	0,005	12,76	50,39
	U-373 MG	500µg	Prol.	↓	1,12	0,0001	16,87	27,09
	U-373 MG	5µg	Mig.	↓	7,2	0,001	46,9	107,35
	U-373 MG	50µg	Mig.	↓	10,54	0,01	37,32	132,54
	U-373 MG	5µg	Prol.-Mig.	↓	8,09	0,003	45,33	123,4
	U-87 MG	500µg	Prol.	↓	11,16	0,007	-120,16	-26,49
	U-87 MG	5µg	Mig.	↓	7,2	0,002	50,77	120,21
	U-87 MG	50µg	Mig.	↓	2,82	0,0001	61,25	84,92
	U-87 MG	5µg	Prol.-Mig.	↓	5,56	0,001	60,72	114,33
	U-87 MG	50µg	Prol.-Mig.	↓	5,19	0,0001	47,22	90,8
<b>Bupivacain</b>	U-87 MG	10µg	Prol.-Mig.	↓	2,06	0,019	2,25	19,55
<b>Clinda- mycin</b>	U-373 MG	3mg	Prol.	↓	16,6	0,0001	45,34	138,26
	U-373 MG	3mg	Mig.	↓	6,28	0,0001	57,63	110,37
	U-87 MG	3mg	Prol.	↓	1,79	0,0001	88,1	103,11
	U-87 MG	3mg	Mig.	↓	2,11	0,0001	85,52	103,2
<b>Dexametha- son</b>	U-87 MG	4µg	Prol.	↑	4,6	0,008	-49,34	-10,71
<b>Diazepam</b>	U-373 MG	50µg	Mig.	↓	10,29	0,016	13,19	99,58
	U-87 MG	50µg	Prol.	↓	8,21	0,005	25,4	95,32
	U-87 MG	50µg	Mig.	↓	6,49	0,003	24,74	79,21
<b>Digoxin</b>	U-373 MG	0,75µg	Prol.	↓	3,16	0,001	22,98	49,47
	U-373 MG	7,5µg	Prol.	↓	7,05	0,001	49,94	109,12
	U-373 MG	0,75µg	Mig.	↓	7,89	0,002	35,84	102,07
	U-373 MG	7,5µg	Mig.	↓	4,03	0,0001	71,61	105,46
	U-87 MG	0,075µg	Prol.	↓	8,82	0,019	9,76	83,84
	U-87 MG	0,75µg	Prol.	↓	6,48	0,018	7,8	62,22
	U-87 MG	7,5µg	Prol.	↓	4,06	0,0001	57,91	91,99
	U-87 MG	7,5µg	Mig.	↓	5,19	0,001	33,18	76,76
	U-87 MG	7,5µg	Prol.-Mig.	↓	16,23	0,014	-160,3	-24,06
	<b>Haloperidol</b>	U-373 MG	0,5µg	Mig.	↑	13,17	0,004	-154,36
U-373 MG		5µg	Mig.	↑	48,74	0,05	-408,62	0,5
U-373 MG		0,5µg	Prol.-Mig.	↑	7,41	0,002	-94,51	-32,34
U-373 MG		5µg	Prol.-Mig.	↑	26,03	0,028	-235,37	-16,88
U-373 MG		50µg	Prol.-Mig.	↑	21,65	0,001	-296,45	-114,67
U-87 MG		50µg	Prol.	↓	4,95	0,001	33,8	75,38
U-87 MG		50µg	Mig.	↓	7,46	0,004	24,32	88,46

WIRKSTOFF	ZELLINIE	KONZ./ML	VOR- GANG	TREND	ST.- FEHLER	P- WERT	95%- KONFIDENZ- INTERVALL	
							UNT.GR.	OB.GR.
<b>Kalium</b>	U-373 MG	0,1mmol	Prol.	↓	9,75	0,042	1,83	83,67
	U-373 MG	1mmol	Prol.	↓	15,58	0,032	7,79	138,56
	U-373 MG	1mmol	Mig.	↓	14,74	0,0001	93,81	103,81
	U-373 MG	1mmol	Prol.-Mig.	↓	1,23	0,0001	93,63	103,92
	U-87 MG	0,1mmol	Prol.	↓	2,08	0,0001	60,82	78,26
	U-87 MG	1mmol	Prol.	↓	3,88	0,0001	73,6	106,15
	U-87 MG	0,1mmol	Mig.	↓	4,58	0,0001	46,87	85,3
	U-87 MG	1mmol	Mig.	↓	6,86	0,0001	60,74	118,33
<b>Ketamin</b>	U-373 MG	800µg	Prol.	↓	12,52	0,01	24,73	129,81
	U-373 MG	800µg	Mig.	↓	4,07	0,0001	76,67	110,83
	U-373 MG	800µg	Prol.-Mig.	↓	6,84	0,0001	61,19	118,6
	U-87 MG	800µg	Prol.	↓	10,27	0,043	1,54	87,73
	U-87 MG	800µg	Prol.-Mig.	↓	5,86	0,001	-83,22	-34,01
<b>Levetir- acetam</b>	U-373 MG	10µg	Prol.	↑	7,84	0,0001	-144,34	-78,84
	U-373 MG	0,1µg	Mig.	↓	10	0,013	15,77	99,75
	U-373 MG	10µg	Mig.	↑	30,12	0,006	-332,01	-79,25
	U-373 MG	0,1µg	Prol.-Mig.	↓	4,68	0,001	31,11	70,34
	U-373 MG	10µg	Prol.-Mig.	↑	10,61	0,046	-89,98	-0,89
<b>Metamizol</b>	U-87 MG	50µg	Prol.	↓	8,69	0,011	16,2	89,17
	U-87 MG	500µg	Prol.	↓	11,15	0,038	3,27	96,58
	U-87 MG	5mg	Prol.	↓	6,89	0,001	40,32	98,14
	U-87 MG	5mg	Mig.	↓	13,08	0,021	12,93	122,71
<b>Natrium</b>	U-373 MG	1mmol	Mig.	↓	7,13	0,028	4,69	64,56
<b>Physostig- min</b>	U-87 MG	0,4µg	Prol.	↓	4,24	0,003	16,71	52,29
<b>Prometha- zin</b>	U-373 MG	25µg	Prol.	↓	6,66	0,001	47,83	103,74
		250µg	Prol.	↓	2,49	0,0001	62,22	83,16
	U-87 MG	2,5µg	Mig.	↓	11,41	0,028	-103,05	-7,27
<b>Temozolo- mid</b>	U-373 MG	200mmol	Mig.	↑	12,61	0,043	-107,83	-1,98
<b>Thiamazol</b>	U-373 MG	200µg	Prol.-Mig.	↑	12,04	0,019	-114,12	-13,07
<b>Tramadol</b>	U-373 MG	1mg	Prol.	↓	5,17	0,0001	56,48	100,2
	U-373 MG	1mg	Mig.	↓	12,44	0,015	17,71	122,12
	U-87 MG	1mg	Prol.	↓	4,96	0,0001	40,27	81,94
	U-87 MG	1mg	Mig.	↓	14,67	0,011	14,64	80,67
<b>Valproat</b>	U-373 MG	0,12mg	Mig.	↑	26,05	0,038	-226,31	-7,65
	U-373 MG	1,2 mg	Mig.	↑	31,44	0,02	-296,1	-32,21
	U-373 MG	12mg	Mig.	↑	12,96	0,002	-173,28	-64,46
	U-373 MG	12mg	Prol.-Mig.	↑	11,21	0,005	-127,12	-33,04
	U-87 MG	12mg	Prol.	↓	3,66	0,0001	47,55	78,28
	U-87 MG	12mg	Mig.	↓	8,41	0,022	7,63	78,12

Die Daten wurden geordnet nach Wirkstoff, Zelllinie, Konzentration und dem ausgewerteten Vorgang. Die Spalte mit der Überschrift „Trend“ kennzeichnet eine signifikante Verminderung oder Erhöhung des gemessenen Parameters im Vergleich zur Negativkontrolle.

Wie aus Tabelle 4 abzulesen, zeigte sich unter Inkubation mit **Amiodaron** in beiden Zelllinien sowohl eine Verringerung der Proliferations- als auch der Migrationsraten, weshalb eine Beeinflussung des Ergebnisses der Migration durch die verringerte Zellzahl nahe liegt. Schließlich konnten nur die vitalen Zellen den Filter passieren und sich an der Unterseite der Membran anheften. Bei einer toxischen Medikamentenwirkung ergibt sich demnach ein anderes Ergebnis bei der Betrachtung des Migrationsverhaltens. Dennoch wurde schon in den niedrigen Konzentrationen ein Abfall der Migrationsrate deutlich, während die Wachstumsrate erst in der höchsten der getesteten Konzentrationen einen Rückgang zeigte. Ein ähnliches Resultat ergab sich bei den Ansätzen mit **Adrenalin**, **Bupivacain**, **Clindamycin**, **Digoxin**, (U-87 MG), **Kalium**, **Ketamin** und **Tramadol**. **Digoxin** hatte, wie auch **Amiodaron**, einen sichtbaren Effekt auf die Morphologie der Glioblastomzellen beider verwendeter Linien, der die Vermutung einer toxischen Wirkung unterstützte (vgl. Abb. 2).

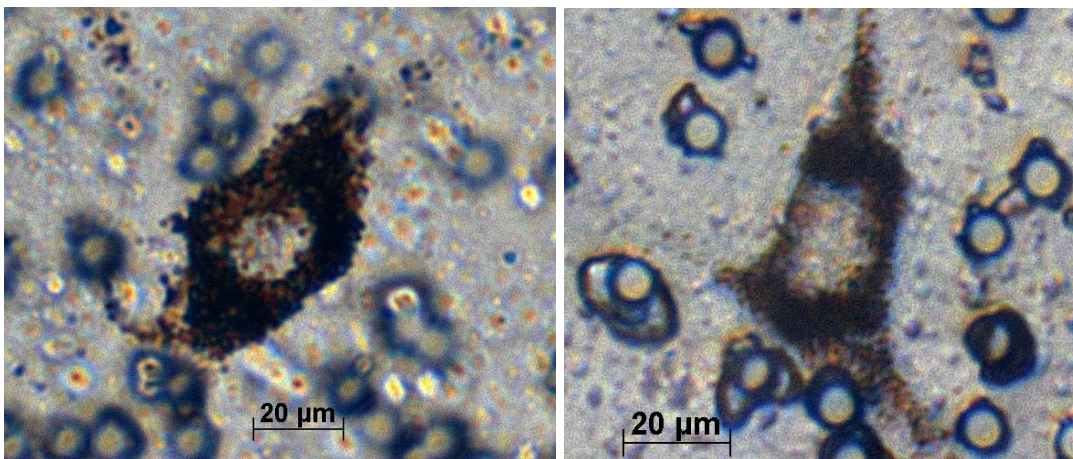


Abb.2 Zellen der Linie U-373 MG nach Inkubation mit **Amiodaron** über 24 Stunden auf der Filtermembran (ungefärbt)

Unter einigen Medikamenten kam es ausschließlich zur Veränderung der Proliferationsrate, ohne dass ein Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Zellen gezeigt werden konnte. Da diese für die Fragestellung der Arbeit nicht relevant sind, seien sie hier lediglich der Vollständigkeit halber erwähnt. **Metamizol** und **Physostigmin** riefen solche Wirkungen hervor. Unter **Promethazin** proliferierten die U-373 MG weniger, die U-87 MG zeigten - jedoch lediglich in der niedrigsten der untersuchten Konzentrationen - eine Verminderung der Wanderungsrate.

Der einzige Fall, bei dem das Wachstum der Zellen signifikant stärker gefördert wurde als in der Negativkontrolle, war unter Inkubation mit **Dexamethason**.

Natürlich gab es auch Ansätze, bei denen die Migrationsrate solitär beeinflusst wurde, ohne dass ein Wachstumseffekt berücksichtigt werden muss. Unter Einfluss von **Diazepam** zum Beispiel war bei der Zelllinie U-373 MG allein die Migrationsrate erniedrigt, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied in der Gesamtzellzahl gezeigt hätte. Dies deutet darauf hin, dass hier eine echte Reduktion der Wanderungsbestrebungen erfolgt ist. Ebenso verlief der Versuch bei Inkubation mit den **Natrium**-Ionen. Eine Erhöhung der Migrationsrate trat bei den U-373 MG unter **Temozolomid** in der niedrigsten, getesteten Dosis in Erscheinung.

Eine Dosisabhängigkeit konnte bei den Ergebnissen mit **Levetiracetam** gefunden werden. Hier wurden bei beiden untersuchten Zelllinien die Wachstums- und Wanderungsraten in niedrigen Konzentrationen gesenkt, in den hohen Konzentrationen gesteigert. Unter der mittleren getesteten Dosis wurde kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt.

**Haloperidol** hatte in seiner Wirkung einen paradoxen Effekt auf die gemessenen Werte der beiden Zelllinien. Bei den U-373 MG steigerte es in fast allen Konzentrationen die Migrations- und auch die kombinierte Rate, wobei kein Einfluss der Proliferation zu vermuten ist. Bei U-87 MG hingegen senkte es gleichermaßen die Wachstums- wie auch die Wanderungsrate. Ein ähnliches Resultat konnte für **Valproat** ermittelt werden.

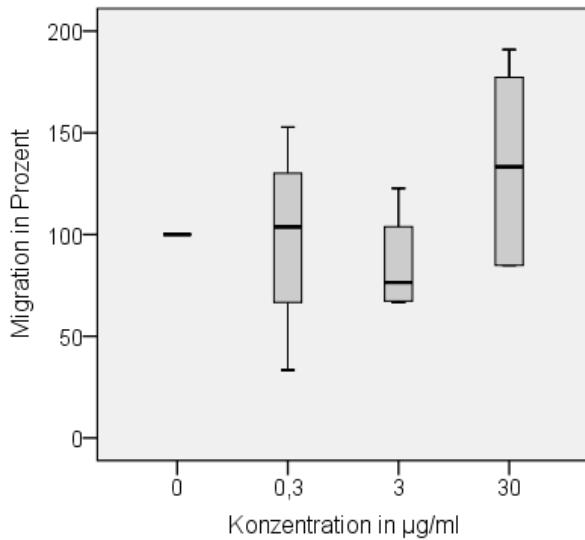
Zur weiteren Betrachtung wurden drei Medikamente mit anticholinergem, nämlich **Atropin**, **Ketamin** und **Haloperidol**, und zwei mit antihistaminischer (**Promethazin**, **Dimetinden**) Wirkkomponente ausgewählt.

## 5.2 Einfluss anticholinergem Medikamente auf das Migrationsverhalten

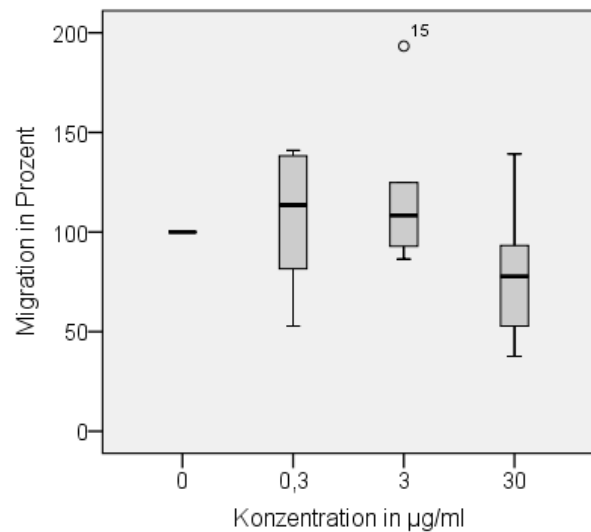
### 5.2.1 Ergebnisse des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays

Wie teils schon unter 5.1 beschrieben zeigten die drei Medikamente mit anticholinergem Wirkung in der Vorbetrachtung ganz verschiedene Ergebnisse. Während die Glioblastomzellen unter **Atropin** kein von der Negativkontrolle verschiedenes Wanderungsverhalten aufwiesen, kam es unter Inkubation mit **Ketamin** in der höchsten der getesteten Konzentrationen (800 µg/ml) zur Verringerung der Migrations- und auch Proliferationsraten. Dies schien noch deutlicher bei den U-373 MG als bei den U-87 MG. Unter **Haloperidol** hingegen ließ sich der paradoxe Effekt beobachten, dass Zellen der Linie U-373 MG verstärkt wanderten, während die getesteten biologischen Leistungen bei den U-87 MG eher zurückgingen, wobei hier ein Effekt der Proliferation nicht

auszuschließen ist (vgl. Tab. 4) Zur besseren Visualisierung folgen nun ausgewählte graphische Darstellungen der statistischen Auswertung (Abb 3-a bis -c).

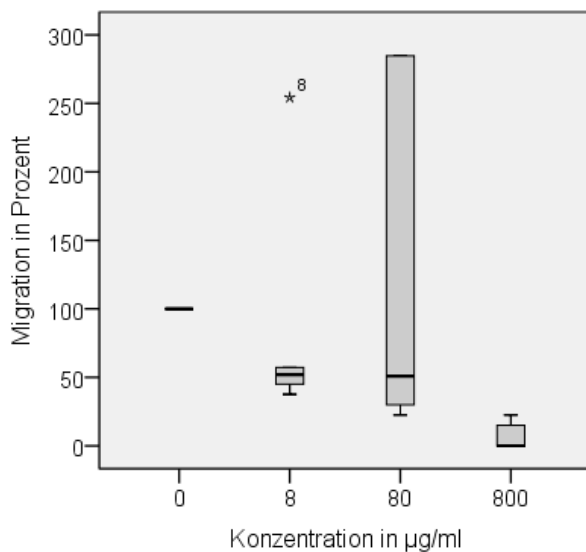


**A. Migrationsraten von U373 unter Atropin**

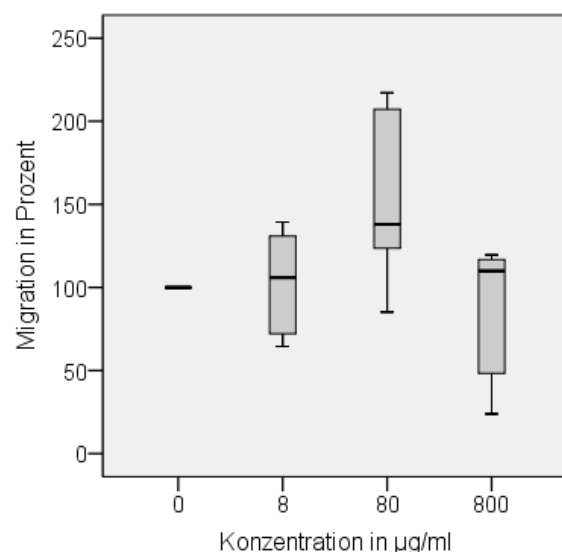


**B. Migrationsraten von U87 unter Atropin**

Abb. 3-a Grafische Darstellung der Migrationsraten der Glioblastomzellen der Linien U-373 MG (A) und U-87 MG (B) unter **Atropin**. Aufgetragen sind die Negativkontrolle als Richtwert und die drei getesteten Konzentrationen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle.



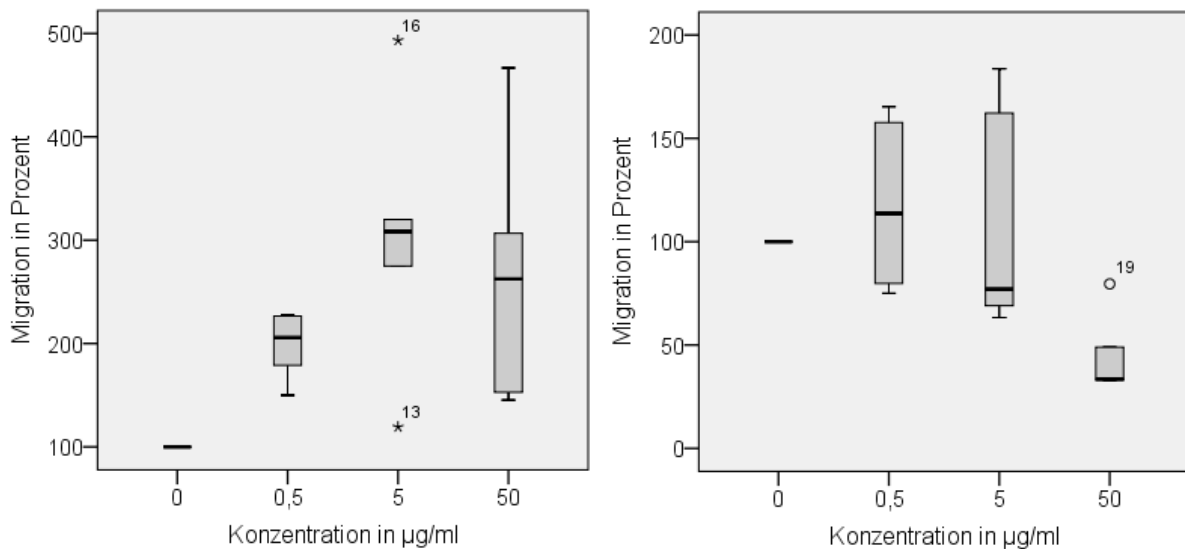
**C. Migrationsraten von U373 unter Ketamin**



**D. Migrationsraten von U87 unter Ketamin**

Abb. 3-b Grafische Darstellung der Migrationsraten der Glioblastomzellen der Linien U-373 MG (C) und U-87 MG (D) unter **Ketamin**. Aufgetragen sind die Negativkontrolle als Richtwert und die drei getesteten Konzentrationen. Es zeigt sich bei den U-373 MG eine bei 8µg/ml und 800µg/ml signifikante Verminderung der Wanderungsbestrebungen im Vergleich zur Negativkontrolle, wenn der Ausreißer bei 8µg/ml vernachlässigt wird. Dies ließ sich leider mit den U-87 MG nicht reproduzieren.





E. Migrationsraten von U373 unter Haloperidol

F. Migrationsraten von U87 unter Haloperidol

Abb. 3-c Grafische Darstellung der Migrationsraten der Glioblastomzellen der Linien U-373 MG (E) und U-87 MG (F) unter **Haloperidol**. Aufgetragen sind die Negativkontrolle als Richtwert und die drei getesteten Konzentrationen. Die U-373 MG lassen unter allen drei angewandten Konzentrationen des Medikamentes eine teils erhebliche, signifikante Steigerung der Migrationsrate erkennen. Bei den Zellen der Linie U-87 MG ist unter der höchsten Konzentration von **Haloperidol** (50µg/ml) hingegen eine signifikante Verminderung zu sehen, die in den niedrigeren Konzentrationen noch nicht auftritt.

### 5.2.2 Ergebnisse im Colorimetrie-Zellmigrations-Assay

Bei diesem Verfahren erfolgte kein manuelles Auszählen der Zellen sondern eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte des Zelllysates nach Anfärbung, wie unter 4.2.3 beschrieben. Dazu wurde der Farbstoff Kristallviolett ausschließlich aus den Zellen an der Unterseite des Filters extrahiert, weshalb bei diesem Experiment auch nur Aussagen zur Migration getroffen werden können. Die Ergebnisse waren hier am Messplatz auszudrucken. Wie schon beim kombinierten Proliferations-Migrations-Assay wurden die Rohdaten des Colorimetrie-Assays anschließend zuerst mit Microsoft Excel™ erfasst. Dort wurde der Mittelwert aus den Leerwerten jeder Platte einzeln gebildet und von den zugehörigen Ergebnissen der mit den Medikamenten inkubierten Zellen abgezogen. Diese Daten wurden dann in das Programm SPSS Statistics 19™ zur Auswertung übernommen, wobei auch hier als univariates Varianzverfahren die einfaktorielle ANOVA und wahlweise der Tamhane- oder der Tukey- Test zum Einsatz kamen. Verglichen wurden die Werte der von Medikamenten beeinflussten Tumorzellen mit denen der Positivkontrolle, die mit Ausnahme des Medikamentes den gleichen Versuchsbedingungen unterlag.

Bei **Atropin** und auch bei **Ketamin** zeigten sich sowohl bei den U-373 MG als auch den U-87 MG keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen (Tab. 5 und 6)

Tab.5 Ergebnisse der statistischen Auswertung von **Atropin** im Colorimetrie-Assay.

Atropin -Dosis/ml	Zelllinie	St.-Fehler	p-Wert	95%-Konfidenzintervall	
				untere Grenze	obere Grenze
5µg	U-373 MG	0,053	0,769	-0,2	0,1
10µg	U-373 MG	0,053	0,803	-0,2	0,1
25µg	U-373 MG	0,053	0,921	-0,12	0,19
5µg	U-87 MG	0,059	0,953	-0,2	0,14
10µg	U-87 MG	0,059	0,536	-0,09	0,25
25µg	U-87 MG	0,059	0,999	-0,16	0,18

Die Daten wurden geordnet nach Wirkstoff-Dosis, Zelllinie, Standardfehler, p-Wert und 95% Konfidenzintervall. Signifikante Unterschiede zwischen Wirkstoff und Positivkontrolle äußern sich dabei in einem p-Wert < 0,05. Daher hat **Atropin** hier in keiner der getesteten Konzentrationen einen tatsächlichen Einfluss auf die Migrationsrate der getesteten Zellen.

Tab.6 Ergebnisse der statistischen Auswertung von **Ketamin** im Colorimetrie-Assay.

Ketamin-Dosis/ml	Zelllinie	St.-Fehler	p-Wert	95%-Konfidenzintervall	
				untere Grenze	obere Grenze
100µg	U-373 MG	0,066	0,488	-0,09	0,28
250µg	U-373 MG	0,066	0,773	-0,25	0,12
500µg	U-373 MG	0,066	0,72	-0,12	0,25
100µg	U-87 MG	0,082	0,707	-0,14	0,32
250µg	U-87 MG	0,082	0,649	-0,13	0,33
500µg	U-87 MG	0,082	0,982	-0,2	0,26

Die Daten wurden geordnet nach Wirkstoff-Dosis, Zelllinie, Standardfehler, p-Wert und 95%-Konfidenzintervall. Signifikante Unterschiede zwischen Wirkstoff und Positivkontrolle äußern sich dabei in einem p-Wert < 0,05. Daher hat **Ketamin** hier in keiner der getesteten Konzentrationen einen tatsächlichen Einfluss auf die Migrationsrate der getesteten Zellen.

Bei **Haloperidol** zeigte sich, dass sich zumindest in der höchsten getesteten Konzentration bei U-373 MG eine Verringerung der Migrationsrate einstellte ( $p = 0,001$ ), was der Voruntersuchung widersprach. In allen anderen Fällen wurde bei diesem Medikament kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb.4).

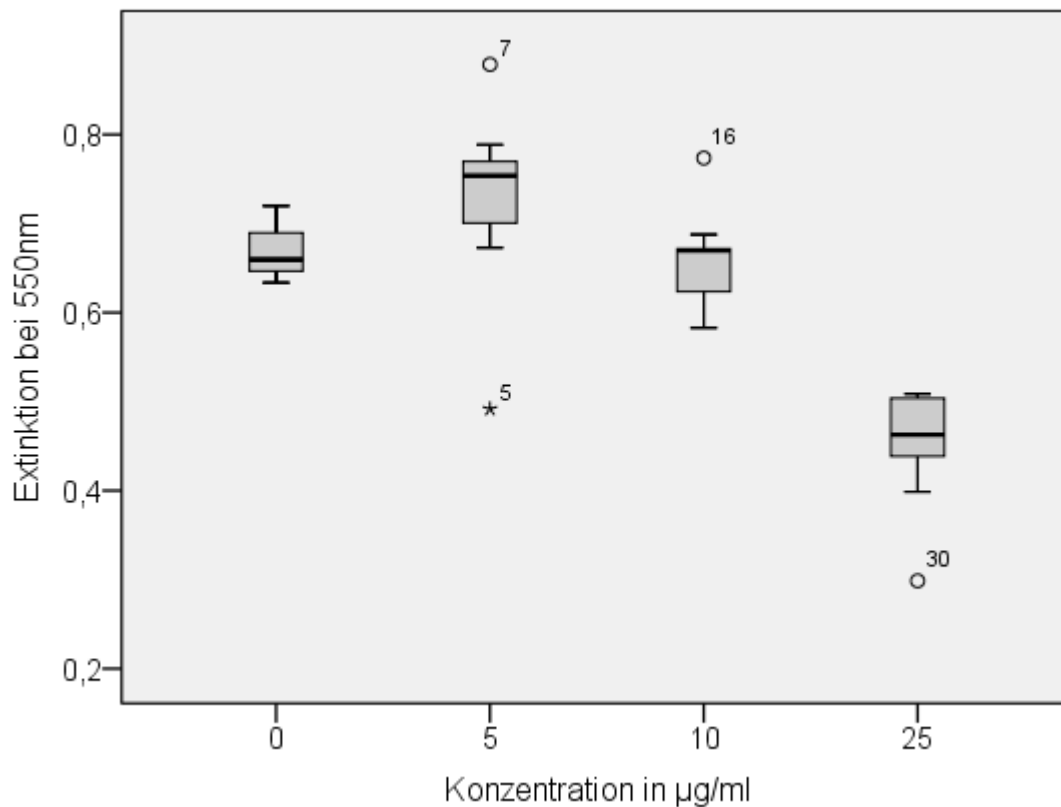


Abb. 4 Graphische Darstellung der Extinktionswerte von Kristallviolett unter der photometrischen Messung mit einer Wellenlänge von 550nm. Aufgetragen sind die Messwerte der Kontrolle (ohne Medikament) im Vergleich zu den Ergebnissen der U-373 MG unter dem Einfluss von **Haloperidol** in den Konzentrationen 5, 10 und 25µg/ml. Nur in der höchsten Dosis zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; die Extinktion des Farbstoffes, der lediglich den migrierten Zellen entstammt, ist deutlich geringer als in der Kontrolle, sodass auf eine Verminderung der Wanderungsrate zu schließen ist.

### 5.2.3 Ergebnisse im xCelligence™

Mit diesem Verfahren wurden die Einflüsse der ausgewählten anticholinergen und antihistaminischen Medikamente in je drei verschiedenen Konzentrationen und drei Wiederholungen bei der Zelllinie U-373 MG getestet (vgl. Tab.3). In jedem Durchgang wurden zwei *Wells* als Leerwert (keine Zellen, nur Medium) und vier *Wells* als Negativkontrolle (kein Medikament) mitgeführt. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde alle 15 Minuten durch einen automatischen Stromfluss über die Goldelektrode der Widerstand bestimmt. Nach dem Ende der Messung am RTCA™-Messplatz konnten die automatisch aufgezeichneten Verläufe der Widerstände in der zugehörigen Software eingesehen werden. Es ließen sich Graphiken erstellen, bei denen der so genannte Zellindex (CI) gegen die Zeit aufgetragen ist. Der Zellindex ist dabei ein willkürlich festgesetzter Wert, der aus dem Widerstand an den einzelnen Elektroden, respektive den mit Gold beschichteten Filtermembranen, gebildet wird, und damit direkt

proportional zu der Zelldichte an der Unterseite der Membran ist. Er ist definiert nach der Formel  $CI=(R_n-R_b)/15$ .  $R_b$  bezeichnet dabei den vor Beginn des Messzeitraums bestimmten Hintergrundwiderstand, bei dem ausschließlich Medium vorhanden ist, und  $R_n$  die zu den festgelegten Zeitpunkten gemessenen Elektrodenwiderstände im Beisein von Zellen. Der CI ist daher eine Funktion der absoluten Zellzahl, der Qualität der Anheftung an den Untergrund und der Morphologie von Einzelzellen und Zellverband.

Für **Atropin** ergab die graphische Darstellung eine konzentrationsabhängige Abnahme der Migrationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle. Jedoch machte die Betrachtung der Konfidenzintervalle deutlich, dass dieses Ergebnis aufgrund starker Schwankungen nicht signifikant ist (siehe Abb. 5). Die folgenden Diagramme zeigen stets den Ausschnitt zwischen der zweiten und der achtzehnten Stunde der Messung, weil der Kurvenverlauf jenseits davon nicht aussagekräftig ist. Vor zwei Stunden zeigt sich noch kein Auseinanderweichen der Kurven und nach achtzehn Stunden kommt es bei manchen Kurven zu Fehlmessungen mit plötzlich steilem Kurvenanstieg.

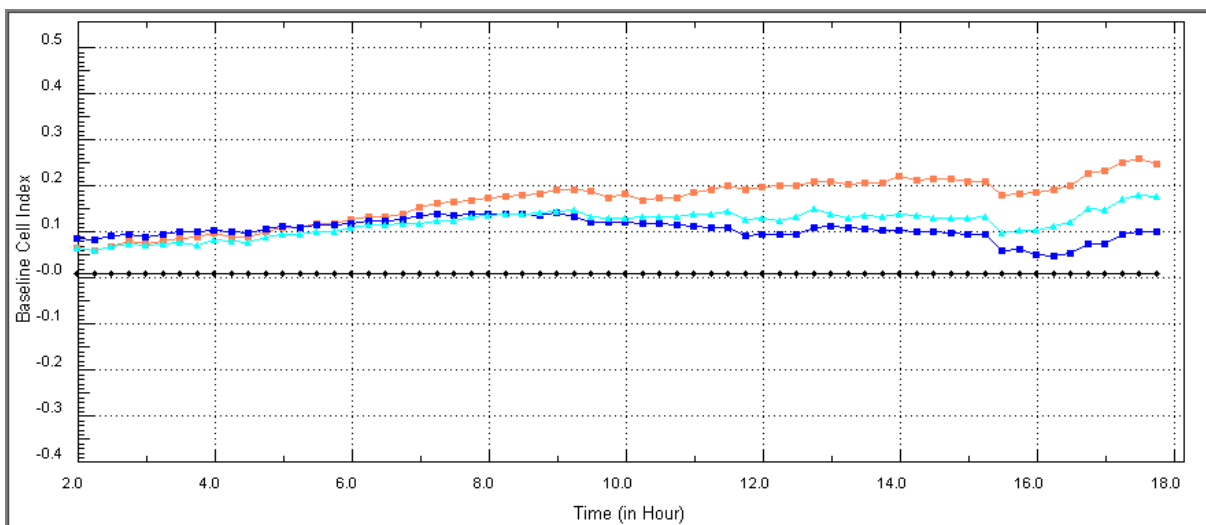


Abb. 5 Darstellung des Zellindex' der Zelllinie U-373 MG unter Einwirkung von **Atropin** über 16 Stunden gegen die Zeit. Aufgetragen sind der Leerwert (schwarz), die Negativkontrolle ohne Medikamentenzusatz (coral), die Werte bei einer Atropin-Dosis von 5µg/ml (hellblau) und 25µg/ml (dunkelblau).

Für die mittlere der getesteten Konzentrationen (10µg/ml) zeigte sich ein mit der niedrigen Dosis (5µg/ml) weitgehend überlappender Kurvenverlauf.

Bei der Messung unter **Ketamin** lässt sich zeigen, dass die Migration der Zellen in allen drei getesteten Konzentrationen (100, 250 und 500µg/ml) zu einer merklichen Erhöhung des Widerstandes an der Filtermembran geführt hat, jedoch nicht mehr und nicht weniger als bei der Negativkontrolle. Zudem ist hier keine Konzentrationsabhängigkeit

ersichtlich, da die Kurven nahezu denselben Verlauf nehmen (Abb. 6). Der Eindruck bestätigt sich unter Berücksichtigung der Konfidenzintervalle.

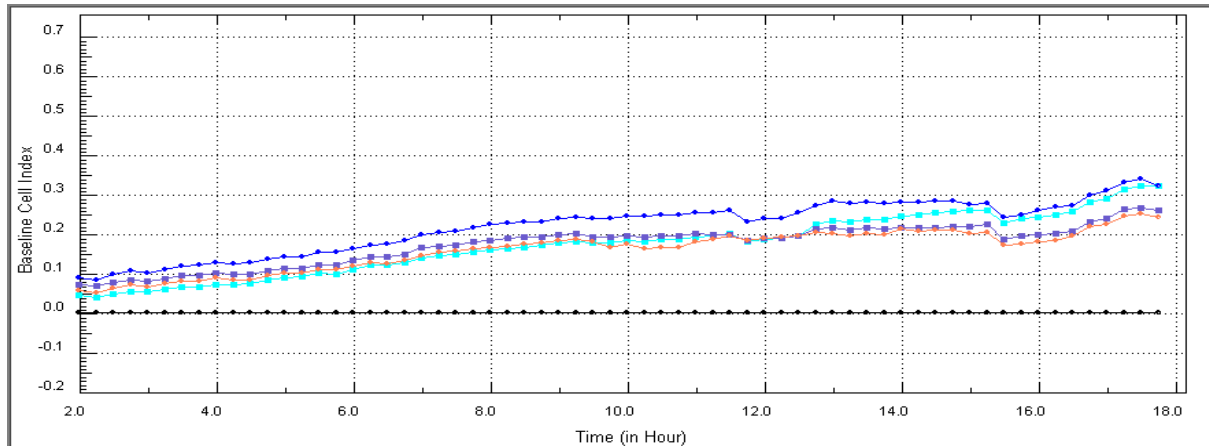


Abb. 6 Darstellung des Zellindex' der Zelllinie U-373 MG unter Einwirkung von **Ketamin** über 16 Stunden gegen die Zeit. Aufgetragen sind der Leerwert (schwarz), die Negativkontrolle ohne Medikamentenzusatz (coral) und die Werte bei einer **Ketamin**-Dosis von 100µg/ml (hellblau), 250µg/ml (mittelblau) und 500µg/ml (dunkelblau).

Unter Inkubation mit **Haloperidol** zeigen die U373 unabhängig von der getesteten Konzentration überhaupt keine Migrationsbestrebungen; die Kurven weichen kaum vom Leerwert ab. Da auch die Negativkontrollen der jeweiligen Ansätze die Widerstände an den Gold-Elektroden nur geringfügig erhöhen, liegt ein Messfehler - wenn auch die Erhebungen für andere Medikamente auf denselben Platten gelungen scheinen - nahe (Abb. 7).

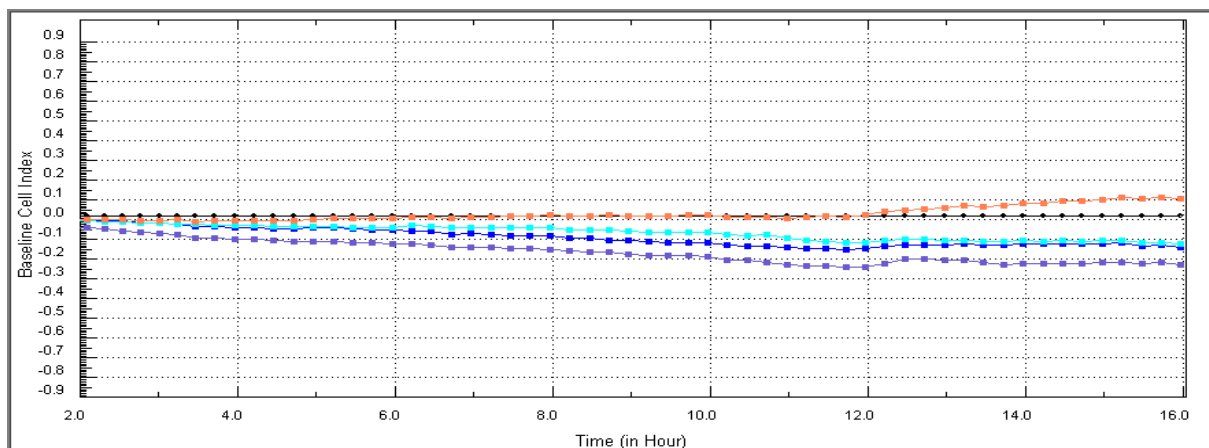


Abb. 7 Darstellung des Zellindex' der Zelllinie U-373 MG unter Einwirkung von **Haloperidol** über 16 Stunden gegen die Zeit. Aufgetragen sind der Leerwert (schwarz), die Negativkontrolle ohne Medikamentenzusatz (coral) und die Werte bei einer **Haloperidol**-Dosis von 5µg/ml (hellblau), 10µg/ml (mittelblau) und 25µg/ml (dunkelblau).

Zusammenfassend lässt sich vermerken, dass die anticholinergen Medikamente in der Testung mit dem xCelligence™-System allesamt keinen signifikanten Effekt auf die Wanderungsbestrebungen der Zelllinie U-373 MG gezeigt haben.

### 5.3 Einfluss antihistaminischer Medikamente auf das Migrationsverhalten

#### 5.3.1 Ergebnisse des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays

Analog den anticholinergen Medikamenten wurden auch **Promethazin** und **Dimetinden** zunächst der Vorbetrachtung im kombinierten Proliferations-Migrations-Assay unterzogen.

Bei Inkubation der Glioblastomzellen mit **Promethazin** ist keine für die Migration richtungsweisende Tendenz zu erkennen, wie auch unter 5.1. beschrieben (vgl. auch Abb. 8-a).

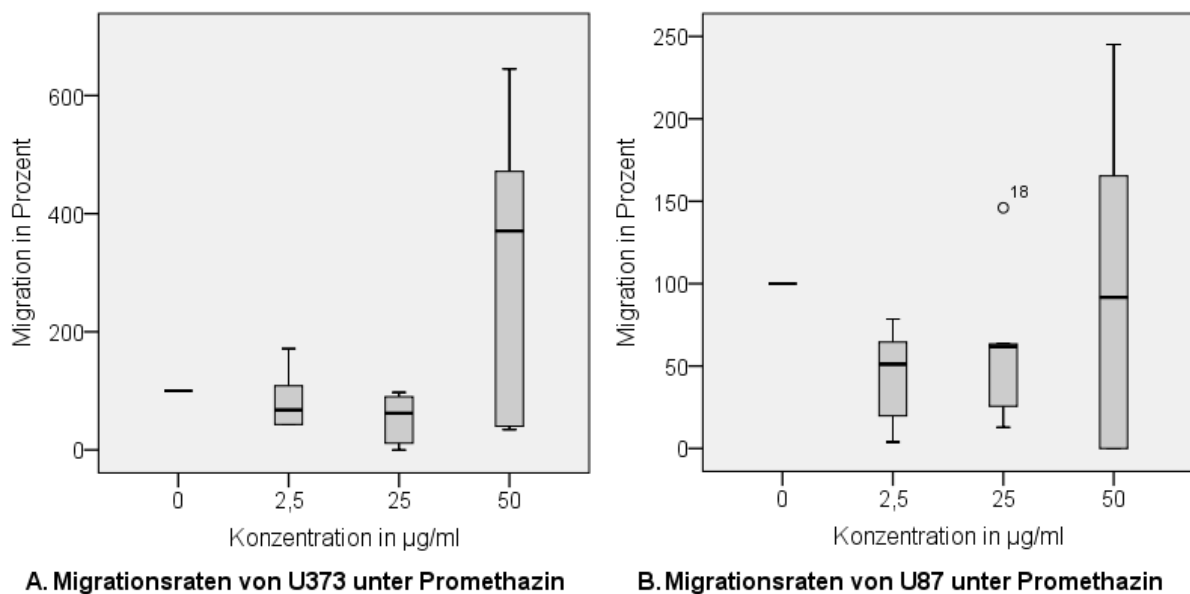


Abb. 8-a Grafische Darstellung der Migrationsraten der Glioblastomzellen der Linien U-373 MG (A) und U-87 MG (B) unter **Promethazin**. Aufgetragen sind die Negativkontrolle als Richtwert und die drei getesteten Konzentrationen. Lediglich bei den Zellen der Linie U-87 MG ist unter der niedrigsten Konzentration des Medikamentes (2,5µg/ml) ein Unterschied zur Kontrolle ersichtlich, der nicht mit dem Zufall zu erklären ist ( $p < 0,05$ ). Sonst entstehen keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Proben, die mit **Dimetinden** versetzt waren, ergab sich bei keiner der beobachteten biologischen Leistungen eine signifikante Veränderung bezogen auf die Negativkontrolle (Abb.8-b).

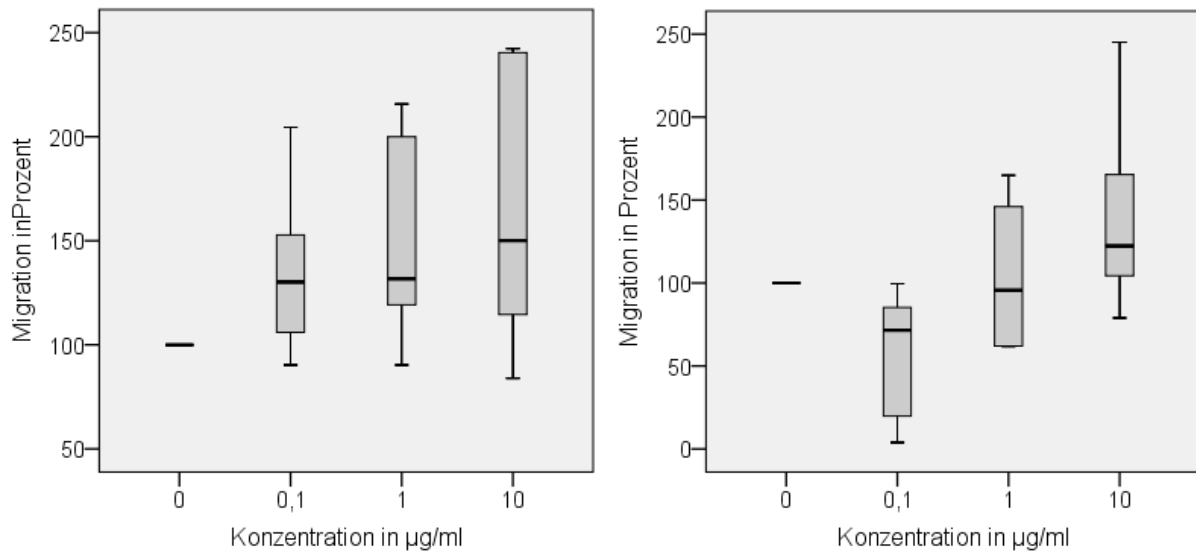


Abb. 8-b Graphische Darstellung der Migrationsraten der Glioblastomzellen der Linien U-373 MG (C) und U-87 MG (D) unter **Dimetinden**. Aufgetragen sind die Negativkontrolle als Richtwert und die drei getesteten Konzentrationen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle.

### 5.3.2 Ergebnisse im Colorimetrie-Zellmigrations-Assay

Beide Medikamente wurden nun ebenfalls weiterführend im Colorimetrie-Assay untersucht, bei dem die Messwerte photometrisch erfasst wurden. Unter **Promethazin** fanden sich bei beiden Zelllinien in der jeweils höchsten Konzentration von 1µg/ml signifikante Unterschiede zur Positivkontrolle. Bei U-373 MG stieg die Migrationsrate an ( $p = 0,004$ ), bei U-87 MG hingegen fiel sie ab ( $p = 0,003$ ). Bei allen anderen Konzentrationen gab es keinen Unterschied wie auch schon im kombinierten Assay (vgl. Abb. 9-a).

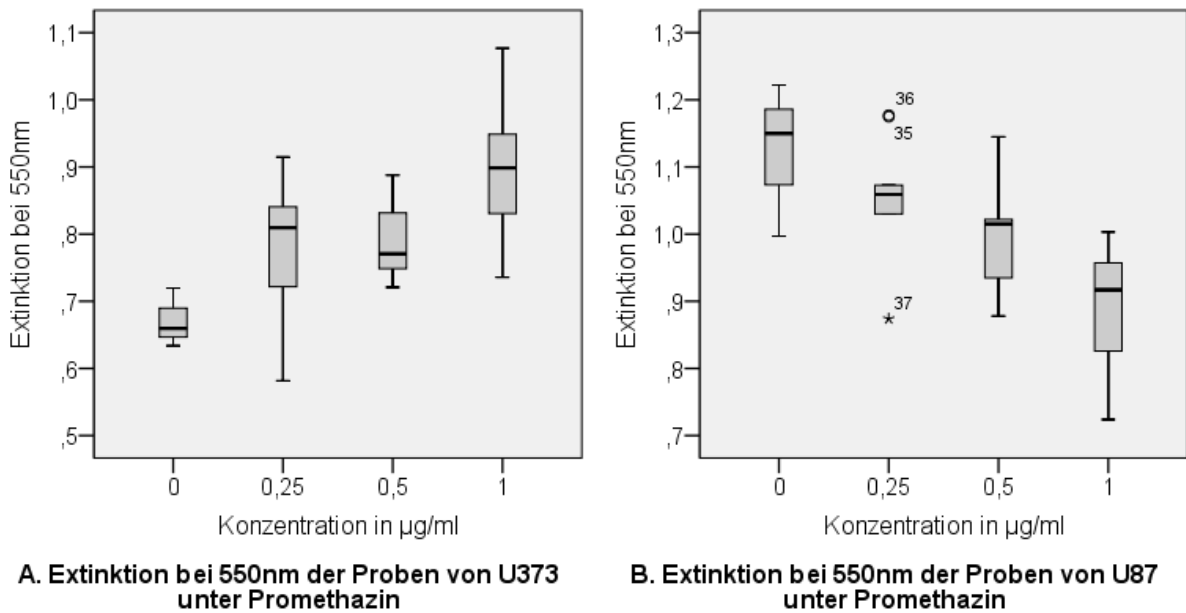


Abb. 9-a Graphische Darstellung der Extinktionswerte von Kristallviolett unter der photometrischen Messung mit einer Wellenlänge von 550nm. Aufgetragen sind die Messwerte der Kontrolle (ohne Medikament) im Vergleich zu den Ergebnissen der U-373 MG (A) und U-87 MG (B) unter dem Einfluss von **Promethazin** in den Konzentrationen 0,25, 0,5 und 1µg/ml.

**Dimetinden** führte in der höchsten Konzentration bei den U-87 MG zu einer signifikanten Verringerung der Migrationsrate ( $p = 0,001$ ). Ansonsten gab es jedoch keine weiteren Unterschiede (Abb. 9-b).

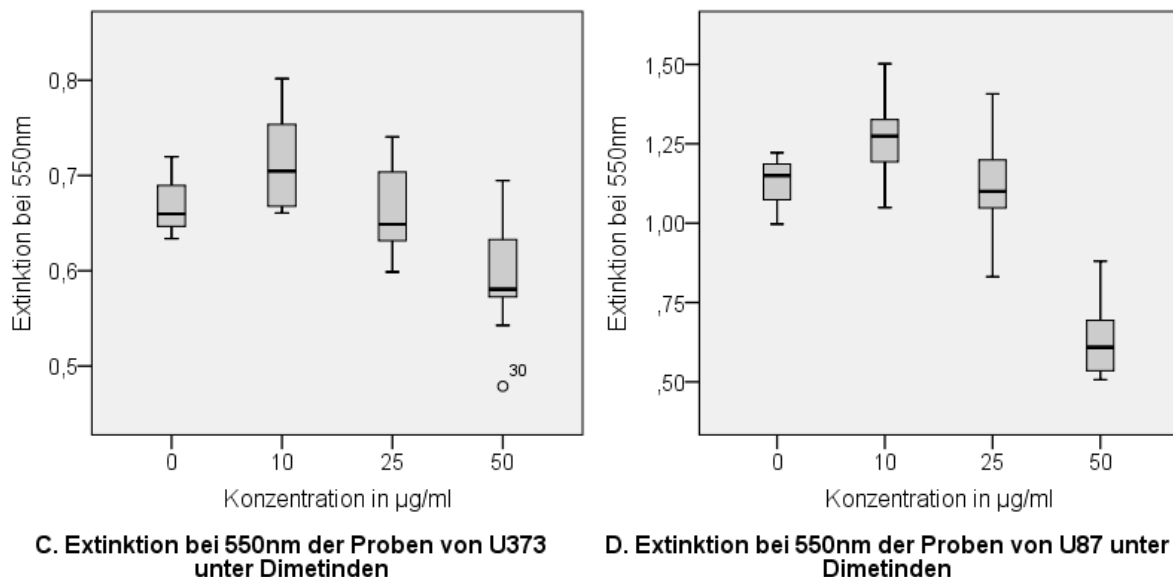


Abb. 9-b Graphische Darstellung der Extinktionswerte von Kristallviolett unter der photometrischen Messung mit einer Wellenlänge von 550nm. Aufgetragen sind die Messwerte der Kontrolle (ohne Medikament) im Vergleich zu den Ergebnissen der U-373 MG (C) und U-87 MG (D) unter dem Einfluss von **Dimetinden** in den Konzentrationen 10, 25 und 50µg/ml.



### 5.3.3 Ergebnisse im xCelligence™

Analog zu den anticholinergen Medikamenten erfolgte auch hier die Auswertung der Erhebungen mit dem impedanzbasierten Verfahren anhand der automatisch aufgezeichneten Verläufe der Widerstände an den Goldelektroden, nachdem das Messintervall von 24 Stunden beendet war.

Für die Proben, die mit **Promethazin** versetzt waren, lässt sich sagen, dass in allen drei getesteten Konzentrationen Widerstandsänderungen zu verzeichnen waren. Diese unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den Ergebnissen für die Negativkontrolle. In zwei verschiedenen Durchgängen zeigten sich zwei verschiedene Verläufe (Abb. 10). Die Betrachtung der Konfidenzintervalle ergibt zudem auch keinen Unterschied zwischen den Konzentrationen.

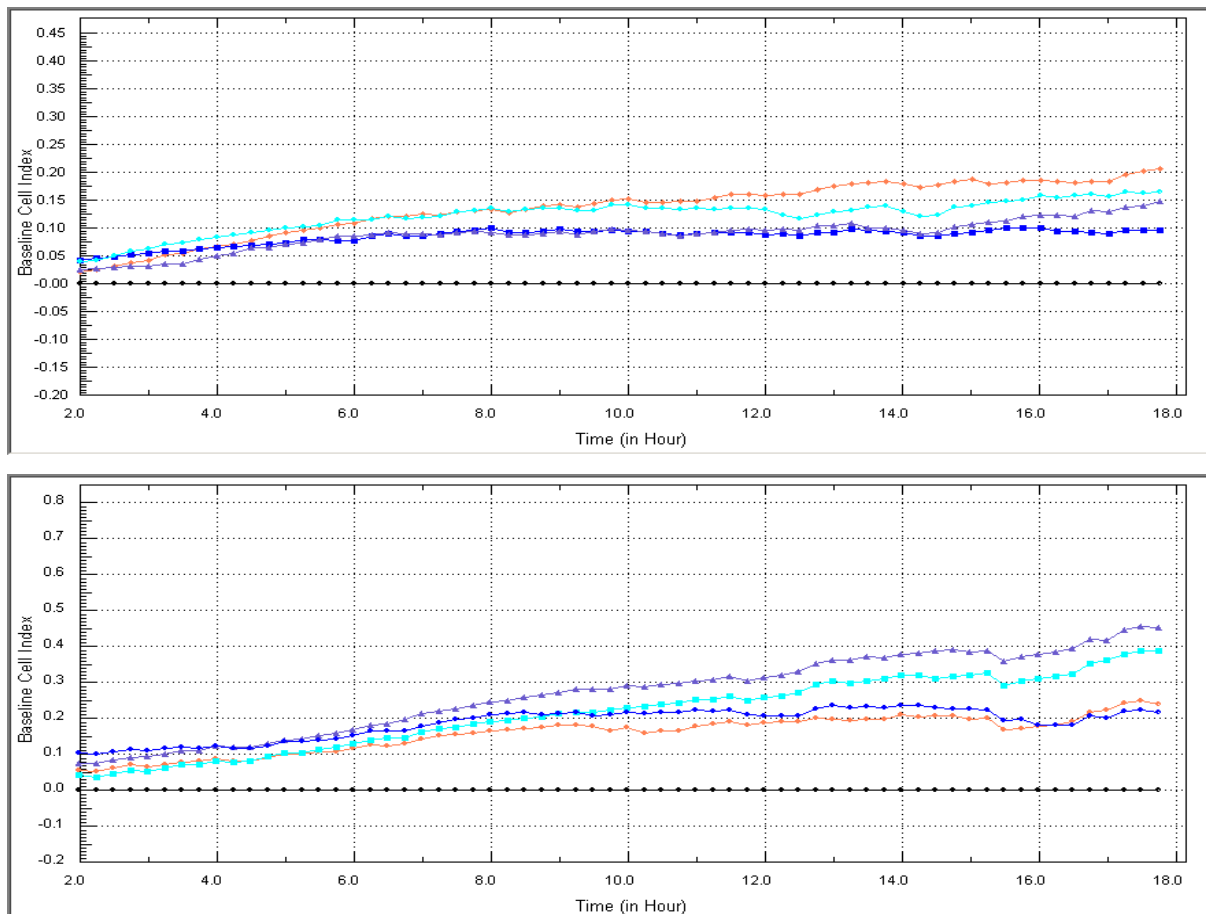


Abb. 10 Darstellung des Zellindex' der Zelllinie U-373 MG unter Einwirkung von **Promethazin** über 16 Stunden gegen die Zeit. Aufgetragen sind der Leerwert (schwarz), die Negativkontrolle ohne Medikamentenzusatz (coral) und die Werte bei einer **Promethazin**-Dosis von 0,25µg/ml (hellblau), 0,5µg/ml (mittelblau) und 1µg/ml (dunkelblau). Der obere Durchlauf fand am 22.06.2011 statt, der untere am 23.06.2011.

Das Migrationsverhalten der mit **Dimetinden** inkubierten Zellen unterschied sich in der Messung mit dem xCelligence™-System auch nicht signifikant von den U-373 MG der Negativkontrolle. Es zeigte sich zwar die Tendenz zu stärkeren Wanderungsbestrebungen, jedoch ist der Effekt nicht deutlich genug. Ebenso besteht keine über alle Durchläufe konstante Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 11).

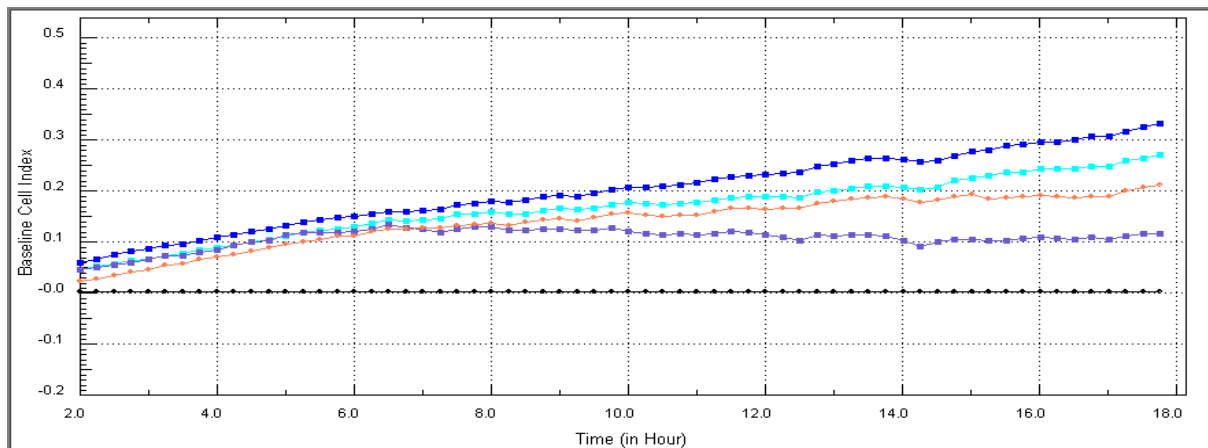


Abb. 11 Darstellung des Zellindex' der Zelllinie U-373 MG unter Einwirkung von **Dimetinden** über 16 Stunden gegen die Zeit. Aufgetragen sind der Leerwert (schwarz), die Negativkontrolle ohne Medikamentenzusatz (coral) und die Werte bei einer **Dimetinden**-Dosis von 5µg/ml (hellblau), 10µg/ml (mittelblau) und 25µg/ml (dunkelblau).

## **6 Diskussion**

### **6.1 Evaluierung der Methoden**

#### 6.1.1 Endpunktverfahren

Bei den weiter oben erläuterten Analysen wurde auf eine stringente methodische Durchführung geachtet. Dennoch soll hier zuerst eine Betrachtung möglicher Fehlerquellen bei den einzelnen Verfahren erfolgen, um diese evaluieren und die Ergebnisse besser wichten zu können.

Beim kombinierten Proliferations-Migrations-Assay, bei dem ungefärbte Zellen am Lichtmikroskop mit einigem Aufwand ausgezählt wurden, können bei mangelnder Übung oder bei einem langen Auswertungszeitraum erhebliche Schwankungen in der ermittelten Zellzahl auftreten (Muir et al. 1993). Um dies zu verhindern, erfolgten vor der eigentlichen Reihe von Experimenten zahlreiche Vorversuche, in denen die entsprechenden Fähigkeiten am Lichtmikroskop ausgebaut wurden. Die ausgesäte Zellzahl wurde dabei auf 250 Zellen/Well festgelegt, um eine einhundertprozentige Konfluenz mit nicht mehr sicher differenzierbaren Zellgrenzen auf dem porösen Filter zu vermeiden und den zeitlichen Aufwand rational zu halten. Zudem wurden in jedem Durchgang nicht mehr als drei Platten ausgezählt, um den Einfluss nachlassender Konstitution des Untersuchers zu verringern. Die Einstellungen am Mikroskop und die Abrasterung beim Auszählen wurden stets identisch beibehalten.

Vereinfacht wurde das Ganze im Colorimetrie-Assay, bei dem die Quantifizierung mittels Photometrie vorgenommen wurde, nachdem der Farbstoff in einem standardisierten Vorgehen von der Testplatte abgelöst war. Es war dadurch auch möglich, höhere Zellzahlen zu verwenden. Hierbei wurde wiederum nur eine kurze, morphologische Kontrolle möglich, während bei der manuellen Auswertung genau auf Besonderheiten der Gestalt geachtet werden konnte. Zudem konnte durch die zusätzliche Erhebung der Gesamtzellzahl in der Auswertung später genau differenziert werden, welche mutmaßlichen Wanderungseffekte über den 72-stündigen Testzeitraum wahrscheinlich von Proliferationsphänomenen beeinflusst wurden.

Beide Verfahren verhindern als Endpunktverfahren die Beobachtung der zeitlichen Dynamik in der Entwicklung der Zellpopulation, insbesondere im Hinblick auf die Migration, von der ein phasenhafter Ablauf angenommen wird. Dieser Annahme geschuldet haben sich Echtzeitverfahren daher als Untersuchungsstandard bei vielen

Arbeitsgruppen etabliert. Wie jedoch in der Einleitung erwähnt, eignen sich Endpunktverfahren aufgrund der starken Vereinfachung sehr gut dazu, Anhaltspunkte über die mögliche Wirkung verschiedener Pharmaka auf eine definierte Zielgröße zu gewinnen, auch ohne den genauen Mechanismus mit zu beobachten (Palm et al. 2005). Daher sollte einem Echtzeit-Verfahren stets ein Endpunktverfahren zugeordnet sein, insbesondere, wenn es noch nicht derart stark erprobt ist, wie das xCelligence™-System zum Beispiel.

Es ist zu erwähnen, dass bei beiden Verfahren durch den raschen Konzentrationsausgleich der Testsubstanz zwischen oberer und unterer Kammer kein Gradient bestanden hat und daher weniger die Chemotaxis, sondern mehr die Chemokinese gemessen wurde. Wie in der Einleitung bereits beleuchtet, bedarf es eines viel höheren, experimentellen Aufwandes, um die gerichtete Bewegung der Zellen zu untersuchen (Entschladen et al. 2005). Hier lässt sich daher lediglich eine Aussage über Hemmung oder Verstärkung der ohnehin erfolgenden, ungerichteten Wanderung der Glioblastomzellen treffen.

#### 6.1.2 Impedanzbasiertes Echtzeitverfahren

Um nun auch die zeitliche Dynamik der Migration unter Inkubation zu erfassen, wurde mit ausgewählten Medikamenten ein Echtzeitverfahren angeschlossen. Hier war es im Gegensatz zu den Endpunktverfahren möglich, über 24 Stunden hinweg viertelstündlich das Verhalten der Zellpopulation aufzuzeichnen. Die impedanzbasierte Methode ist dabei präzise, wenn auch noch nicht in allzu vielen Studien bisher zum Einsatz gekommen. Die Untersuchung großer Zellzahlen war hier möglich, allerdings blieb die Beurteilung der Morphologie aufgrund sehr kleiner Testflächen auf der Strecke. Die graphischen Darstellungen des Zellindex´ über die Zeit sind letztlich das Ergebnis dieses Versuchsaufbaues, wobei ihre Interpretation schwierig und eine statistische Auswertung nur mit einigem Aufwand möglich ist. Die Ergebnisse dieses Verfahrens in der hier durchgeführten Form verstehen sich daher lediglich als Zusatzinformation.

## 6.2 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Beeinflussung des cholinergen Systems

### 6.2.1 Anticholinerge Medikamente

Aus dieser Gruppe wurden **Atropin** und **Haloperidol** als direkte Antagonisten an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren getestet. **Haloperidol** ist zudem antagonistisch an D1- bis D4- und  $\alpha_1$ -Rezeptoren. Außerdem wurde hier **Ketamin** zugeordnet, das als NMDA-Rezeptorantagonist unter anderem die glutamatabhängige Acetylcholinfreisetzung hemmt. Bereits 1984 konnte das Vorhandensein von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und auch der Cholinesterase an glialen Hirntumoren nachgewiesen werden; in größerer Streubreite und insgesamt höherer Zahl als am gesunden Gehirn (Gurwitz et al. 1984). Bei vielen humanen Tumoren konnte ermittelt werden, dass durch Acetylcholin über muskarinerge Rezeptoren angestoßene Signalkaskaden, teils auch autokrin, wesentliche metabolische Veränderungen zur Folge haben (Guizzetti et al. 1996, Shah et al. 2009). Gegenwärtig gibt es für verschiedene Karzinome (Belo et al. 2011, Zhang et al. 2010, Chiu et al. 2010) und für Gliomzellen (Bordey et al. 2000) Hinweise darauf, dass eine Aktivierung muskarinergere Rezeptoren durch Acetylcholin oder m-Rezeptor-Agonisten die Migrationsrate steigert, während Inhibitoren unter Anwesenheit des Neurotransmitters einen gegenläufigen Effekt besitzen.

Dies lässt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit insofern vereinbaren, als dass **Atropin** in keinem der Versuchsabläufe mit den verschiedenen Verfahren einen signifikanten Einfluss auf die Migrationsrate zeigt.

Für **Ketamin** lässt sich hier, möglicherweise durch die Verminderung des Acetylcholingehaltes an den Zellen - wobei eine autokrine Stimulation nicht explizit nachgewiesen ist - eine Senkung der Proliferations- und Migrationsrate feststellen. Es ist außerdem bekannt, dass die Stimulation von NMDA-Rezeptoren Aktionspotentiale und Anstiege der Kalziumionenkonzentration in den Glioblastomzellen verursachen (Labrakakis et al. 1998). Wie mittlerweile vielfach nachgewiesen, fördert intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  deren Wanderungsbestrebungen (Cuddapah und Sontheimer 2010, Wondergem und Bartley 2009). Die hier vorliegenden Ergebnisse stellen einen Hinweis darauf dar, dass eine verminderte Aktivität des Rezeptors die Migrationsrate folgerichtig hemmt. Dennoch hätte dieser Effekt unter Anwesenheit von Glutamat deutlicher charakterisiert

werden können, auch wenn für maligne Gliome eine autokrine Sekretion dieses Neurotransmitters nachgewiesen ist (Lyons et al. 2007).

**Haloperidol** hat indes auf die Proliferation und Migration der U-373 MG einen steigernden Effekt, und einen hemmenden bei den U-87 MG, was am ehesten auf einen unterschiedlichen Rezeptorbesatz der Zelllinien und auf die unspezifische Wirkung des Medikamentes auf verschiedene Rezeptoren zurückzuführen ist. Es wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass die Aktivierung der metabotropen Dopaminrezeptoren zu vermehrten Wanderungsbestrebungen von Tumorzellen führt, was für verschiedene Karzinome bereits nachgewiesen wurde. Hier konnte der Effekt von Dopamin durch spezifische Rezeptorantagonisten verhindert werden (Lang et al. 2004, Li et al. 2006). Demzufolge ließe sich ein hemmender Effekt von **Haloperidol** als D1 bis D4-Antagonist nachvollziehen, wie er sich bei den U-87 MG gezeigt hat. Dem stehen die Ergebnisse mit den U-373 MG und die Beobachtung von Kuhn et. al., dass das Medikament einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in beiden Zelllinien auslöst (Kuhn et al. 2009), entgegen. Letzteres gilt jedoch nur, wenn man die migrationsfördernde Wirkung des intrazellulären Kalziums (s.o.) annimmt. Außerdem wäre die Anwesenheit von Dopamin in den Versuchen theoretisch nötig, um eine deutliche Rezeptoraktivierung als Ausgangspunkt zu schaffen. Die  $\alpha_1$ -antagonistische Komponente ist hier sicherlich zu vernachlässigen. Auf sie wird unter 6.6 näher eingegangen.

### 6.2.2 Acetylcholinesteraseinhibitor Physostigmin

Aus der Literatur geht nicht klar hervor, ob und in welchem Ausmaß Glioblastomzellen mit Acetylcholinesterasen versehen sind, die sonst eher an cholinergen Synapsen angesiedelt sind. Es gibt jedoch Hinweise auf ihr Vorhandensein und ihren Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzellen, der jedoch *per se* als gering anzusehen ist (Schiffer et al. 1968, Lahiri et al. 1997). Eine Hemmung der Acetylcholinesterase in Verbindung mit dem Neurotransmitter würde infolge der weiter oben dargelegten Betrachtungen eine migrationsfördernde Wirkung zeigen, da ein muskarinerges Effekt entstünde. Da die Experimente dieser Arbeit jedoch ohne Anwesenheit von Acetylcholin durchgeführt wurden, deutet der fehlende Einfluss von **Physostigmin** auf die Wanderungsbestrebungen beider Zelllinien darauf hin, dass eine alleinige Hemmung der Esterase tatsächlich keinen Effekt darauf hat. Dabei lässt sich vermuten, dass auch keine autokrine Sekretion von Acetylcholin stattfindet.

### 6.3 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Beeinflussung des histaminischen Systems

In dieser Gruppe wurden die Einflüsse von **Dimetinden** als H1-Rezeptorantagonist und **Promethazin** als primärem H1- Rezeptorantagonist auf die Migrationsbestrebungen der Glioblastomzellen untersucht.

Im Rahmen des Ansatzes, den Erfolg von Chemotherapie durch ein antiinflammatorisches Adjuvans zu steigern, liegen einige Studien über die Wirkung von Antihistaminika auf humane Karzinomzellen vor. Das Vorhandensein von H1-Rezeptoren an Glioblastomzellen ist immunhistochemisch nachgewiesen (Li et al. 2003). Ebenso gibt es zahlreiche Hinweise, dass die Blockade der Histaminwirkung an H1- und H2-Rezeptoren die Wanderungsbestrebungen von Zellen verschiedener Tumorentitäten, darunter auch Glioblastome, im Vergleich zu einer ungehinderten Histaminwirkung vermindert (Tilly et al. 1990, Matsumoto et al. 2002, Lefranc et al. 2005, Rudolph et al. 2008). Da **Dimetinden** allein in keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen einen eigenständigen Effekt auf die Migrationsrate gezeigt hat, ist anzunehmen, dass dieser nur im Vergleich zu mit Histamin versehenen Versuchsansätzen deutlich würde.

Unter **Promethazin** hingegen ließ sich bei den U-373 MG eine Hemmung der Proliferation und bei den U-87 MG zumindest in der niedrigsten der getesteten Konzentrationen eine Migrationsverminderung nachweisen. Dies spricht dafür, wie auch der morphologische Aspekt der Zellen in den Vorversuchen zeigte, als noch höhere Dosen der Medikamente angesetzt waren, dass das Medikament schon in recht niedriger Dosierung zum Absterben der Zellen führt. Dies könnte einen migrationshemmenden Effekt überdeckt haben. Obwohl die primäre Wirkung von **Promethazin** die H1-antihistaminische ist, darf man die anticholinergen, antiserotonergen und membranstabilisierenden Wirkkomponenten nicht außer Acht lassen, die das Wirkprofil des Medikamentes sehr unspezifisch machen. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen unter **Dimetinden**, das einen spezifischeren H1-Inhibitor darstellt, wird es unwahrscheinlich, dass die Verminderung der Wanderungsbestrebungen hier tatsächlich über die antihistaminische Wirkung hervorgerufen wird, wenn es die Studienlage auch nahe legt.

#### 6.4 Veränderung der Migrationsrate bei Variation des extrazellulären Ionengehaltes

In dieser Arbeit wurden die Glioblastomzellen der Linien U-373 MG und U-87 MG mit **Natrium-, Kalium- und Kalzium-**Ionen versetzt. Es liegen ausnehmend viele Erkenntnisse zum extra- und intrazellulären Ionenmilieu, den elektrischen Erregungsvorgängen und den Kanälen und Transportern vor, die dieses aufrechterhalten. Letztere sollen im folgenden Unterkapitel 6.5 separat betrachtet, hier hingegen nur auf die direkte Veränderung der Ionenzusammensetzung eingegangen werden.

Die Erkenntnis, dass Glioblastomzellen wie Nervenzellen Aktionspotentiale bilden können, ist nicht neu (Labrakakis et al. 1998). Inwiefern sich Manipulationen am extrazellulären Ionenmilieu auf den Metabolismus der Zellen oder gar die Wanderungsbestrebungen auswirkt, ist leider weniger gut belegt. Davon ausgehend, dass eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes zu einer Steigerung der Migrationsrate führt (s.a. 6.2.1), bietet wiederum die Studie von Kuhn et. al. aus dem Jahr 2009 einen Hinweis, da sie bei den drei getesteten Ionen einen unregelmäßig konfigurierten Kalzium-Anstieg intrazellulär erfasst, den sie als „Ionentyp“ klassifiziert hat (Kuhn et al. 2009). Dem widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Hier wurden Proliferation und Migration unter **Kalium** gehemmt. Unter **Natrium** wurde lediglich die Migrationsrate reduziert, während die Proliferation unbeeinflusst blieb. Die Werte, die unter **Kalzium** erhoben wurden, mussten verworfen werden, weil die lichtmikroskopische Auswertung der Zellen durch eine kristalline Komplexbildung der Kalziumlösung mit dem Medium nicht zu verwerten waren. Daher lässt sich dazu keine Aussage machen.

Jedoch muss eingeräumt werden, dass der zytotoxische Effekt vor allem der kaliumhaltigen Lösungen möglicherweise unterschätzt und nicht ausreichend durch Vorversuche charakterisiert wurde, weshalb auch diese Ergebnisse nicht als valide gelten können.

Dass die U-373 MG lediglich unter der höchsten eingesetzten Konzentration der **Natriumchlorid**lösung einen signifikanten Effekt, nämlich einen Rückgang der Migrationsrate zeigten, lässt sich möglicherweise auch durch das Vorhandensein der Chloridionen erklären. Man hat herausgefunden, dass Gliomzellen einen enormen nach außen gerichteten Gradienten dieses Anions erzeugen können. Bei Migration durch die



8µm messenden Poren des Filters, ist es notwendig, dass sie ihr Volumen verringern. Dies geschieht nach gegenwärtigen Erkenntnissen durch einen raschen Chlorid-Ausstrom, dem osmotisch Wasser nachfolgt (Habela et al. 2009, Ernest et al. 2005). Der Gradient ist jedoch durch Zusatz von Chloridionen zum Medium verringert und dieser Mechanismus daher erschwert.

## 6.5 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Blockade von Ionenkanälen und -transportern

Es ist aufgrund neuer Techniken, wie der Sequenzierung des vollständigen Genoms, heute möglich eine Vielzahl von Ionenkanälen und –transportern an Glioblastomzellen nachzuweisen (Verkhatsky und Steinhauser 2000). Elektrophysiologische Techniken erlauben es darüber hinaus, den Ionenfluss an der Zellmembran und Veränderungen des Membranpotentials genau zu charakterisieren.

Unter dieser Einordnung wurde eine heterogene Auswahl von Medikamenten für die Experimente getroffen, daher wird im Folgenden eine weitere Untergliederung in Ionenkanäle und –transporter vorgenommen.

### 6.5.1 Blockade von Ionenkanälen

#### 6.5.1.1 Natriumkanalblocker

Es wurden die Einflüsse von **Bupivacain** und **Phenytoin** als Natriumkanalblocker und **Valproat** als Natrium- und Kalziumkanalblocker in ihrer Wirkung auf die Migrationsrate der Glioblastomzellen analysiert. Die aktuelle Forschung hat einwärts gerichtete, amiloridsensitive Natriumkanäle (Bubien et al. 1999) und unter diesen säuresensitive Kationenkanäle (Berdiev et al. 2003, Bubien et al. 2004) an Glioblastomzellen identifizieren können, die physiologische Astrozyten nicht besitzen. Deren Blockade durch spezifische Hemmstoffe hat eine Verringerung der Proliferations- und Migrationsraten der in diesen Veröffentlichungen untersuchten Zelllinien erbracht (Vila-Carriles et al. 2006, Kapoor et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine signifikanten Auswirkungen von **Bupivacain** und **Phenytoin** auf die Wanderungsbestrebungen der Glioblastomzellen, was vermuten lässt, dass die an den Zellen exprimierten Ionenkanäle keinen Angriffspunkt für die Wirkprofile dieser Medikamente bilden.

**Valproat** hingegen verursachte einen paradoxen Effekt, indem es die Migrationsraten der U-373 MG steigerte und die Wachstums- und Wanderungsraten der U-87 MG

verringerte. Es gibt nicht viele vergleichbare Arbeiten zur Wirkung von **Valproat** auf Glioblastomzellen. Erwähnenswert wäre die Erkenntnis, dass das Medikament im Rahmen einer Studie zu seiner Teratogenität *in vivo* und *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Migration der untersuchten Zellen hatte (Bacon et al. 1998). Desweiteren fanden Knüpfer et. al. ähnlich unterschiedliche Verläufe wie in der vorliegenden Arbeit, als sie Kulturen von vier Glioblastomzelllinien damit versetzten und die Migration sowohl im *Transwell-Assay* als auch in der Sphäroidkultur untersuchten. Zwei Zelllinien wurden in ihrer Wanderung gehemmt, eine stimuliert und die vierte blieb unbeeinflusst (Knüpfer et al. 2001). Eine schlüssige Erklärung dafür ließ sich nicht finden und genauere Untersuchungen wären erforderlich, um sich weitere Erkenntnisse zu verschaffen.

#### 6.5.1.2 Kaliumkanalblocker

Es ist heute eine Vielzahl von Kaliumkanälen an der Zellmembran der Glioblastomzellen bekannt. Beispielsweise gibt es die BK-Kanäle, die durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration einen Kaliumionenstrom über die Membran ermöglichen. Darunter steigt auch die Migrationsrate der so behandelten Zellen (Wundergem et al. 2008). Des Weiteren wurden bei dem Versuch, die Elektrophysiologie der Glioblastomzellen zu charakterisieren, einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{ir}$ ) und Ether À Go-Go  $K^+$  - Kanäle (EAG1) identifiziert (Molenaar 2011). Wie diese Kanäle an biologischen Leistungen wie der Migration beteiligt sind, ist noch unklar. Insofern ist es derzeit nicht möglich, die signifikante Reduktion von Proliferation und Migration bei beiden Zelllinien unter Inkubation mit **Amiodaron**, einem Kaliumkanalblocker mit vielen weiteren, unspezifischen Hemmwirkungen, an Ionenkanälen und Neurotransmitterrezeptoren zu klären, wie sie sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt haben. Jedoch liegt durch dieses deutliche Ergebnis die Vermutung nahe, dass das Medikament einen Angriffspunkt an den Glioblastomzellen findet. Ob dies an den Kaliumkanälen ist, oder einer anderen Struktur, kann ohne weitere Untersuchungen nicht präzisiert werden. Eindrucksvoll war hier im kombinierten Proliferations-Migrations-Assay die Beobachtung der morphologischen Veränderungen. Zellen beider untersuchter Linien zeigten nach 24 Stunden unter **Amiodaron** eine schwarze Granulierung des Zytoplasmas bei erhaltener äußerer Form (siehe Abb. 2). In höheren Konzentrationen wurde außerdem vermehrt Zelldetritus am Boden der unteren Kammer gesehen. Eine kombinierte Verminderung von Proliferations- und Migrationsrate legen,

wie weiter oben ausgeführt, auch die Vermutung nahe, dass ein zytotoxischer Effekt die Messungen der Migration verfälscht hat.

### 6.5.1.3 Benzodiazepine

Die Studienlage über die Wirkung der allosterischen GABA-A-Rezeptormodulatoren **Diazepam** und **Midazolam** ist denkbar schlecht. Unter ihrer Beteiligung werden vermehrt ligandenaktivierte Chlorid- und Bikarbonatkanäle an Nervenzellen geöffnet, dadurch deren Ruhepotential vertieft und ihre Erregbarkeit herabgesetzt. In der hier vorliegenden Arbeit hat von diesen beiden Medikamenten nur **Diazepam**, und dies auch nur in der höchsten der verwendeten Konzentrationen (50µg/ml), einen signifikanten Effekt im Vergleich zur medikamentenfreien Kontrolle gezeigt. Dieser bestand in einem Rückgang der Migrationsrate bei beiden untersuchten Zelllinien. Nun gibt es keine vergleichbaren Studien, aus denen sich weitere Hinweise ergeben. Man kann daher nur erneut über einen unterschiedlichen Rezeptorbesatz der U-373 MG und U-87 MG spekulieren oder die Experimente mit diesen Medikamenten unter Anwesenheit von GABA vertiefen.

## 6.5.2 Blockade von Ionentransportern

### 6.5.2.1 Blockade des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters

Arbeiten aus der Forschungsgruppe um Sontheimer haben nachgewiesen, dass die aktive Volumenveränderung von Gliomzellen, die zur Migration durch enge Spalten im Gewebe oder im dreidimensionalen Ansatz in der Kultur erforderlich ist, durch eine Verschiebung von Ionen und Wasser über die Zellmembran zustande kommt (Ernest und Sontheimer 2007). Die Rolle von Chlorid für die Volumenverminderung wurde bereits im vorangegangenen Kapitel 6.4 angesprochen. Nun wurde darüber hinaus die Expression eines von Schleifendiuretika hemmbaren  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporters (NKCC1) nachgewiesen, über den die osmotisch wirksamen Ionen wieder ins Zellinnere befördert werden können, um zum Ausgangsvolumen zurückzukehren (Ernest und Sontheimer 2007). Eine Blockade dieses Symporters führte dort zu einer deutlichen Reduktion der Invasionsrate, da die Akkumulation der Ionen verhindert wurde, die die Verminderung des Volumens erst ermöglichten (Haas und Sontheimer 2010). Leider konnte dieser Effekt in den hier durchgeführten Analysen nicht nachvollzogen werden. **Furosemid** hatte keinen signifikanten Effekt auf die Wanderungsbestrebungen der Glioblastomzellen. Die große Schwankungsbreite der Ergebnisse, eine fehlende

Wirkung von **Furosemid** auf NKCC1 oder gar das Fehlen des Kotransporters an U-373 MG und U-87 MG sind mögliche Erklärungen. Es ließen sich lichtmikroskopisch auch keine morphologischen Besonderheiten feststellen.

#### 6.5.2.2 Inhibition der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

Vor vier Jahren wurde bereits nachgewiesen, dass die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in Gliomzellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen verstärkt exprimiert wird und in direktem Zusammenhang zur Fähigkeit der Migration dieser Zellen und anderer Tumorentitäten steht. Die Blockade dieses Ionenaustauschers, dessen ATP-abhängige Aktivität der Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials dient, führte in diesen Studien zur einer Verringerung der Migrationsrate (Lefranc et al. 2008a, Lefranc et al. 2008b, Lefranc und Kiss 2008). Der signifikante proliferations- und migrationshemmende Effekt einer Blockade der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl mit den U-373 MG, als auch mit den U-87 MG nachvollzogen werden, obwohl es sich bei dem angewandten **Digoxin** um ein klassisches Cardenolid und keinen an die Alpha1-Untereinheit spezifisch angepassten Hemmstoff handelt, der in den genannten Studien angewandt wurde. Unklar verbleibt die Schwelle, ab welcher Konzentration schlicht ein zytotoxischer Effekt über den migrationshemmenden hinaus resultiert, der die Ergebnisse verfälscht haben könnte. Zumindest ließen die Zellmorphologie und das Vorhandensein von reichlich Zelldetritus in der unteren Kammer des *Transwell-Assays* den Schluss zu, dass Zellen direkt unter dem Medikament zugrunde gegangen sind. Dies wurde nur gelegentlich in der höchsten der verwendeten Konzentrationen, also mit 7,5µg beobachtet. Morphologisch erschienen die Zellen vermehrt abgerundet mit verminderter Ausbildung von zytoplasmatischen Fortsätzen. Andererseits würde dies die Hypothese der oben genannten Veröffentlichungen stützen, dass eine Hemmung der Wanderungsbestrebungen die Glioblastomzellen wiederum anfälliger für proapoptotische Signale macht. Jedenfalls ist der zytotoxische Effekt der Digitalisglykoside auch für andere humane Tumoren gut belegt (Goldin und Safa 1984, Mijatovic et al. 2007).

## 6.6 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Beeinflussung des adrenergen Systems

Viele Studien belegen, dass an Gliomzellen Katecholaminrezeptoren vorhanden sind, deren Aktivierung zu messbaren metabolischen Veränderungen im Zellinneren führt, wie beispielsweise zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionen- oder der cAMP-Konzentration. In Gegenwart von Betablockern gelingt es teilweise, diese Reaktionen zu unterbinden (Clark und Perkins 1971, Kuhn et al. 2009, Weydt et al. 1997). Für das Kolonkarzinom ist nachgewiesen, dass die Behandlung mit Noradrenalin zu einer Steigerung der Wanderungsrate führt, was mit einem unselektiven Betablocker wie Propranolol reversibel ist (Masur et al. 2001). Bei Mamma- und Prostatakarzinom wurde über eine stimulierende Wirkung der Katecholamine hinaus auch eine genetische Veränderung in Richtung eines migratorischen Subklons beobachtet (Lang et al. 2004). Auch dies war hier teils durch Betablocker aufzuhalten (Palm et al. 2006). Für das Ovarialkarzinom ist der Zusammenhang genau umgekehrt- die Migrationsrate sinkt unter Stimulation mit Noradrenalin (Bastian et al. 2009). Leider liegen nicht explizit für das Glioblastom vergleichbare Ergebnisse vor. Dennoch waren in der vorliegenden Arbeit die Einflüsse von **Adrenalin** als vornehmlichem Beta- aber auch Alpha-Agonist, von **Orciprenalin** als Beta-Agonist und von **Clonidin** als Alpha-2- gonist von Interesse. **Adrenalin** zeigte hier eine Minderung der Migrations- und Proliferationsraten bei den U-87 MG und eine isolierte Wachstumseinschränkung bei U-373 MG unter der höchsten, der getesteten Konzentrationen von 10µg/ml, was damit den meisten Ergebnissen bei anderen Tumorentitäten zuwider läuft. **Orciprenalin** und **Clonidin** hatten keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Parameter zur Folge. Auch hier fehlen vergleichbare Studien an Glioblastomzellkulturen. Eine bessere Charakterisierung des Rezeptorprofils wäre bereits hilfreich. Jedenfalls scheint zwar **Adrenalin** eine ausreichende Rezeptorwirkung zu besitzen, um einen Effekt zu erzeugen, die beiden anderen jedoch nicht. Möglicherweise waren aber auch deren eingesetzte Dosierungen zu niedrig gewählt.

Um einen Eindruck zu bekommen, ob eine sympatholytische Medikation einen Einfluss auf die Migrationsraten der damit inkubierten Glioblastomzellen hätte, wurde auch **Urapidil** als Alpha-Antagonist in die Experimente der vorliegenden Arbeit einbezogen. Es ist jedoch kein signifikanter Einfluss zu konstatieren. Es fehlt auch hier an vergleichbaren Ergebnissen; zudem wurden auch hier keine Testansätze mit oder ohne Anwesenheit von Katecholaminen durchgeführt.

## 6.7 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Beeinflussung von DNS und Proteinsynthese

### 6.7.1 Glukokortikoide

Im Rahmen der investigativen Sequenzierung des Genoms der Glioblastome ist der Glukokortikoidrezeptor auf Genebene schon längst nachgewiesen (Wang et al. 2000). Es handelt sich um einen zytoplasmatischen Rezeptor, der im Komplex mit seinem Liganden direkten Einfluss auf die Genexpression nimmt. Beispielweise wird direkt der Gehalt an Monoaminoxidase A (MAO A) hochreguliert (Ou et al. 2006). Ein weiterer Zusammenhang, der bisher gut charakterisiert wurde, ist der der Inhibition der Glukokortikoidwirkung durch den Makrophagen-Migrationsinhibierenden Faktor (MIF), der in vielen Glioblastomzelllinien den physiologischen Astrozyten gleich oder verstärkt exprimiert ist (Munaut et al. 2002). In Abwesenheit von endo- und exogenem MIF ließ sich nachweisen, dass Glukokortikoide Migration und Invasion durch Induktion der MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1) über den ERK1/2-MAPK-Signalweg inhibieren. So wurde es beispielweise bei den U-373 MG beobachtet, deren MIF-Gehalt sehr gering ist (Piette et al. 2009). Leider ließ sich dieser Effekt mit den U-373 MG und U- 87 MG unter Inkubation mit **Hydrokortison** beziehungsweise **Dexamethason** in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollziehen. Es wurde weder eine Reduktion noch eine Steigerung der Wanderungsbestrebungen gefunden, sodass eine ungünstige Wahl der verabreichten Konzentrationen anzunehmen ist.

### 6.7.2 Temozolomid

Zu **Temozolomid** als derzeit wirksamstem Chemotherapeutikum in der Therapie von *Glioblastoma multiforme* liegt eine Vielzahl von Studien vor. Resistenzen in der Behandlung, die in vielen Fällen *in vivo* auftreten, werden verschiedenen Mechanismen zugesprochen (Shi et al. 2010, Oliva et al. 2011, Giussani et al. 2012). Für beide in dieser Arbeit untersuchte Zelllinien, U-373 MG und U- 87 MG, sind solche Resistenzmechanismen nachgewiesen, sodass es nicht verwundert, dass keine verwertbaren, signifikanten Effekte nachgewiesen werden konnten. Die Steigerung der Migrationsrate bei einer 200mmolaren Dosierung bei den U-373 MG ist am ehesten als Fehler in der Durchführung zu werten. Nach der gegenwärtigen Studienlage, die eindeutig belegt, dass Temozolomid bei dafür sensitiven Zellpopulationen zwar einen Rückgang des Wachstums, aber keine Änderung der Migrationsrate zur Folge hat, gibt es dafür nämlich keine Erklärung (Günther et al. 2003).

### 6.7.3 Phytomenadion

**Phytomenadion** ist bekanntlich ein Kovitamin in der Produktion diverser Gerinnungsfaktoren, wobei es die posttranslationale Einführung einer Carboxygruppe in die  $\gamma$ -Position von Glutamylresten dieser Proteine ermöglicht. Dieser Mechanismus ist auch bei der Synthese von anderen Proteinen, zum Beispiel im Knochenstoffwechsel nachgewiesen, jedoch fehlen Belege über ähnliche Prozesse in Glioblastomzellen oder anderen Tumorentitäten. Das Medikament hat in der vorliegenden Studie keinen Hinweis auf eine Beeinflussung von Proliferations- oder Migrationsrate der beiden untersuchten Glioblastomzelllinien erbracht.

### 6.7.4 Clindamycin

Dieses Antibiotikum hemmt die 50-S-Untereinheit der prokaryontischen Ribosomen. Es führte in der vorliegenden Arbeit bei beiden der untersuchten Glioblastomzelllinien zu einem Rückgang des Wachstums und der Wanderungsbestrebungen. Der Mechanismus dahinter ist in Ermangelung eines Vergleiches in der wissenschaftlichen Literatur unklar. Da der Effekt lediglich in der höchsten der getesteten Konzentrationen von 3mg/ml zu beobachten war, ist möglicherweise eine zytotoxische Wirkung dafür verantwortlich.

## 6.8 Veränderung der Migrationsrate bei medikamentöser Beeinflussung weiterer metabotroper Signalwege

### 6.8.1 Metamizol

Im Rahmen älterer Studien zu den zellulären Mechanismen der physiologischen Entzündungsreaktion hat man entdeckt, dass **Metamizol**, seine Metaboliten und verwandte Antipyretika die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten zu inhibieren vermögen (Matzner et al. 1984, Khaitov und Rachkov 1976). Der konkrete Hergang dieser Hemmung wurde jedoch nicht vollständig aufgeklärt. **Metamizol** ist in erster Linie ein Inhibitor der Zyklooxygenase 1 und 2 (COX), beeinflusst jedoch auch den cGMP-Gehalt der Zellen, sowie den Opioid- und Serotoninstoffwechsel. Später wurde beim Kolonkarzinom eine positive Korrelation der darin überexprimierten COX-Isoformen mit gesteigerter Invasionsrate gezeigt (Tsuji et al. 1997). Auch in Gliom- und beigeordneten Endothelzellen konnte ein Zusammenhang zwischen hochregulierten Enzymen des Arachidonsäurestoffwechsels mit der Migration nachgewiesen werden, hier vor allem durch die Thromboxan-Synthetase vermittelt (Giese et al. 1999). Die vorliegende Arbeit kann diese Ergebnisse zumindest für die Glioblastomzelllinie U-87 MG nachvollziehen,

bei der in allen getesteten Konzentrationen die Proliferationsrate gesenkt wird, was mit der Vermutung einhergeht, dass eine Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels die entarteten Zellen auch anfälliger für apoptotische Signale werden lässt (Subbaramaiah et al. 1997, Jantke et al. 2004). In der höchsten hier verwendeten Dosierung von 5mg/ml wurde auch die Migrationsrate bei dieser Zelllinie gesenkt. Auf die U-373 MG hatte es jedoch keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur medikamentenfreien Kontrolle, was nicht ganz zu den bisherigen Erkenntnissen passt. Auch hier muss man wohl einräumen, dass das Wirkprofil von **Metamizol** recht unspezifisch ist.

### 6.8.2 Theophyllin

**Theophyllin** inhibiert die Adenosinrezeptoren 1, 2 und 3, was insbesondere kardiotope Folgen hat. Zudem hemmt es die für die cAMP-Degradation verantwortliche Phosphodiesterase. Schon 1991 wurde nachgewiesen, dass eine Stimulation des Adenylatzyklase-Signalweges wie zum Beispiel durch **Theophyllin** die Migrationsrate von Endothelzellen des Rindergehirns inhibiert (Rosen et al. 1991). Etwas später wurde dieser Effekt auch an invasiven Karzinomen und CD4-tragenden Zellen nachvollzogen (O'Connor et al. 1998, Tsukadaira et al. 2001, Okubo et al. 2001). Bezugnehmend auf die in der Einleitung dargestellte Notwendigkeit von charakteristischen zytoplasmatischen Veränderungen migrierender Zellen lässt sich leicht nachvollziehen, auf welche Art **Theophyllin** in den Vorgang der Chemotaxis interferiert. Es wird angenommen, dass der darunter erhöhte cAMP-Gehalt die Ausbildung von Lamellopodien und die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins inhibiert. Jedoch erfolgte dieser Nachweis an embryonalen und neoplastischen, murinen Zellen (Chen et al. 2008). Beim Glioblastom gibt es keine vergleichbaren Beobachtungen. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Hinweis darauf gefunden, dass **Theophyllin** die Migrationsbestrebungen der humanen Glioblastomzellen beeinflusst. Möglicherweise spielen hier andere, noch unbekannte Mechanismen eine Rolle, da Glioblastomzellen *per se* sensibel für das Medikament sein sollten, weil Adenosinrezeptoren an ihnen nachgewiesen sind (Caciagli et al. 1982).

### 6.8.3 Tramadol

**Tramadol** als Opiat mit Stimulation der  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren hemmt außerdem die Wiederaufnahme von Noradrenalin und verstärkt die Serotoninfreisetzung, wobei die beiden letztgenannten Effekte im *In-vitro*-Ansatz wohl kaum eine Rolle spielen. Das



Vorhandensein von Opioidrezeptoren an Glioblastom- und Astrozytomzellen wurde schon frühzeitig nachgewiesen (Thomas et al. 1990) Jedoch scheint der Rezeptorbesatz mit steigendem Malignitätsgrad der gliösen Neoplasie abzunehmen (Pan et al. 1998). Die wenigen existierenden Studien über den metabolischen Einfluss von Opioiden auf humane Zellen kommen zu divergierenden Ergebnissen. Während die Wanderung von Makrophagen durch Morphin inhibiert wird (Malik et al. 2002), migrieren Leukämiezellen (ALL) unter Enkephalinen verstärkt (Heagy et al. 1995). Und Biphalin, das die etwa 1000fache analgetische Potenz von Morphin aufweist, verringerte die Proliferationsrate einer Gliomzelllinie, während Morphin sie erhöhte (Lazarczyk et al. 2010). Auch hier besteht noch Bedarf, die molekularen Mechanismen der Wirkung der einzelnen Opiatrezeptoren differenziert aufzuklären, insbesondere an humanen Glioblastomzellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen Hinweis auf eine Hemmung von Proliferation und Migration der beiden getesteten Zelllinien gleichermaßen. Der Effekt trat hier in der höchsten der getesteten Konzentrationen bei 1mg/ml auf und unterschied sich signifikant von der medikamentenfreien Kontrolle. Ein Zusammenhang dieses Ergebnisses mit der analgetischen Potenz scheint nicht nahe liegend, da Tramadol als schwaches Opiat (0,1-fache analgetische Potenz von Morphin) eine ähnliche Wirkung zeigt wie das hochpotente Biphalin.

## 6.9 Sonstige

### 6.9.1 Acetylcystein

**Acetylcystein** bewirkt *in vivo* die Spaltung von Disulfidbrücken in Glykosaminykanen und ist Vorstufe für das Antioxidans Glutathion. Es hat jedoch auch *per se* antioxidative Wirkung. Für manche humanen Karzinome wurde nachgewiesen, dass die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges führt, was wiederum, wie weiter oben ausgeführt (Kapitel 6.7.1) zu einer Steigerung der Migrationsrate führt. Jedoch resultiert unter oxidativem Stress auch ein vermehrtes Absterben von Zellen. Diese Effekte sind unter Einsatz von Antioxidantien wie **Acetylcystein** zu verhindern und damit die Invasionsraten zu senken (Kumar et al. 2009, Wu et al. 2010, Song et al. 2011, Chaiswing et al. 2012). Der Zusammenhang scheint jedoch für Glioblastome nicht so stark zu sein, da in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in Proliferation und Migration beobachtet werden konnten, wie man sie aufgrund der oben genannten Ergebnisse hätte erwarten können.

Natürlich wurde auch kein besonderer oxidativer Stress erzeugt, sondern die Wirkung des Medikamentes allein untersucht.

### 6.9.2 Levetiracetam

Der Wirkmechanismus dieses Antikonvulsivums ist noch nicht komplett entschlüsselt. Die Effekte der vorliegenden Arbeit sind jedoch recht interessant. In der niedrigsten der angewandten Konzentrationen (0,1 µg/ml) führte es zu einer Reduktion der Migrations- und der kombinierten Proliferations-Migrationsrate. In der mittleren (1 µg/ml) hatte es keinen signifikanten Effekt und in der höchsten (10 µg/ml) wirkte es fördernd auf alle drei gemessenen Parameter, also Proliferation, Migration und den daraus kombinierten Wert. Jedoch ließ sich dies nur bei den U-373 MG beobachten, die U-87 MG zeigten sich gänzlich unbeeinflusst. Auch hier liegen keine vergleichbaren Studien vor, jedoch wäre eine eindringlichere Erforschung dieses Zusammenhanges sinnvoll. Schließlich wird **Levetiracetam** häufig zur Therapie epileptischer Anfälle bei Glioblastompatienten eingesetzt. Außerdem sind bereits andere molekularbiologische Wirkungen auf diesen Tumor, bis hin zu Beeinflussung der Genexpression und damit Veränderung der Therapiesensitivität für Imatinib und Temozolomid belegt (Pursche et al. 2008, Usery et al. 2010, Bobustuc et al. 2010). Eine Veränderung weiterer tumorbiologischer Leistungen liegt dabei nahe und wird von den oben genannten Daten unterstützt.

### 6.9.3 Thiamazol

Dieses Thyreostatikum inhibiert die Iodidbindung an die Thyreoperoxidase in der Schilddrüse. Jedoch ist hier auch lediglich ein Effekt auf das papilläre Schilddrüsenkarzinom nachgewiesen. Es reduziert hier Proliferation und Migration (McCall et al. 2007). Es liegen keine Nachweise einer ähnlichen Wirkung für andere humane Neoplasien vor und auch kein Nachweis des entsprechenden Enzyms oder einer wesentlichen Rolle des Iodstoffwechsels für die Zellbiologie der Glioblastome.

Die Erhöhung der kombinierten Proliferations-Migrationsrate bei den U-373 MG unter einer Dosierung von 200 µg/ml und damit der höchsten getesteten Konzentration ist aufgrund mangelnder Erhöhung der Einzelparameter kaum sinnvoll zu verwerten.

## 7 Schlussfolgerungen

In der Zusammenschau der vielen Ergebnisse, die sich teilweise in der bisherigen wissenschaftlichen Literatur widerspiegeln, oft aber noch nicht näher betrachtete Aspekte enthalten, lassen sich diverse Schlussfolgerungen und Anknüpfungspunkte ziehen. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die als Screening gedachten Analysen signifikante Ergebnisse erbrachten, wohingegen die erweiterten Experimente unter den oben genannten fünf Medikamenten keine weiterführenden Hinweise liefern konnten, liegt es nahe, nun weitere ausgewählte Ergebnisse als Grundlage erneuter experimenteller Arbeit heranzuziehen. Dabei sollten sowohl kontinuierlich messende Migrations-Assays durchgeführt werden, die den zeitlichen Ablauf der Migration oder gar die Veränderungen an der Einzelzelle dokumentieren können, als auch immunhistochemische oder genomische Analysen des Rezeptorbesatzes in Annäherung an das Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen der Medikamentenwirkungen. Und selbstredend stellt der *In-vitro*-Ansatz eine solche Vereinfachung dar, dass eine Übertragung auf das Tiermodell, sobald für gewisse Medikamente noch stärkere Hinweise auf eine Beeinflussung der Migrationsraten bestehen, sinnvoll erscheint. Dennoch waren diese verhältnismäßig einfach gehaltenen *In-vitro* Verfahren der korrekte Ansatz, um die oben formulierten Fragestellungen zu behandeln. In Bezug auf die Evaluation der Methoden ist weiterhin anzumerken, dass die manuellen Verfahren des kombinierten Proliferations-Migrations-Assays und des Colorimetrie-Assays mit den in der Diskussion genannten Einschränkungen gut verwertbare Ergebnisse bei akzeptabler Handhabbarkeit erbracht haben. Das innovative xCelligence™-System hat eine flexible, transparente und mehr als beschreibende Auswertung jedoch nur mit erheblichen Abstrichen ermöglicht, weshalb bei zukünftigen Studien eher ein alternatives Verfahren ins Auge gefasst werden sollte.

Zu den Ergebnissen selbst muss gesagt werden, dass trotz vieler signifikanter Einflüsse auf Proliferation und vor allem Migration auch Vieles ungeklärt bleibt. Ein erster Schritt könnte sein, Dosis-Wirkungs-Kurven ausgewählter Medikamente zu erstellen, um die effektiven Wirkstoffkonzentrationen zu ermitteln. Um etwas Licht in die einzeln diskutierten Resultate zu bringen, könnte man überlegen, bei geeigneten Medikamenten eine Betrachtung des bloßen Wirkstoffes im Vergleich zu der entsprechenden Arzneimittelzubereitung mit all ihren Zusatzstoffen vorzunehmen und deren mögliche Wirkungen auf den Metabolismus der Glioblastomzellen zu charakterisieren. Zudem

sollte, wie mehrfach oben erwähnt, bei Rezeptorblockern die rezeptoraktivierende Substanz respektive der entsprechende Neurotransmitter in den experimentellen Ansatz einbezogen werden, da sonst kein sinnvoller Referenzwert für die Messung mit dem Rezeptorantagonist zur Verfügung steht.

Bei manchen viel versprechenden Ansätzen, wie der Blockade der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase oder den Katecholaminen könnte eine Ausweitung des Spektrums der getesteten Substanzen auf spezifischere Wirkstoffe mit verschiedenen Ansatzpunkten an der Zielstruktur weitere Aufklärung bringen. Darüber hinaus haben manche Einzelsubstanzen wie **Valproat** oder **Levetiracetam** interessante Ergebnisse erbracht, die sich auch in der Literatur wieder finden und auf jeden Fall lohnenswerte Anknüpfungspunkte für weitere Forschung darstellen.

Diese Arbeit stellt daher nur einen weiteren, kleinen Beitrag zur Aufklärung der multiplen Interaktionen der Glioblastomzelle mit dem extrazellulären Milieu dar, von denen eine möglicherweise in der Zukunft als Angriffspunkt für eine suffiziente Therapie dienen könnte.

## 8 Literatur

- Bacon CL, Berezin V, Bode G, Bock E, Bojic U, Doherty P, Ehlers K, Ellerbeck U, Julien P, Kawa A, Maar TE, Nau H, Pirovano R, Regan CM, Schousboe A, Spezia F, Walsh FS, Williams EJ. 1998. Cell proliferation, migration and CAM-dependent neurite outgrowth as developmental in vitro endpoints for screening teratogenic potential: Application to valproic acid and related analogues of varying potency. *Toxicol In Vitro*, 12 (2):101-109.
- Bartek J, Jr., Ng K, Bartek J, Fischer W, Carter B, Chen CC. 2012. Key concepts in glioblastoma therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83 (7):753-760.
- Bastian P, Balcarek A, Altanis C, Strell C, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. 2009. The inhibitory effect of norepinephrine on the migration of ES-2 ovarian carcinoma cells involves a Rap1-dependent pathway. *Cancer Lett*, 274 (2):218-224.
- Belo A, Cheng K, Chahdi A, Shant J, Xie G, Khurana S, Raufman JP. 2011. Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300 (5):G749-760.
- Berdiev BK, Xia J, McLean LA, Markert JM, Gillespie GY, Mapstone TB, Naren AP, Jovov B, Bubien JK, Ji HL, Fuller CM, Kirk KL, Benos DJ. 2003. Acid-sensing ion channels in malignant gliomas. *J Biol Chem*, 278 (17):15023-15034.
- Bobustuc GC, Baker CH, Limaye A, Jenkins WD, Pearl G, Avgeropoulos NG, Konduri SD. 2010. Levetiracetam enhances p53-mediated MGMT inhibition and sensitizes glioblastoma cells to temozolomide. *Neuro Oncol*, 12 (9):917-927.
- Bordey A, Sontheimer H, Trouslard J. 2000. Muscarinic activation of BK channels induces membrane oscillations in glioma cells and leads to inhibition of cell migration. *J Membr Biol*, 176 (1):31-40.
- BOYDEN S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115:453-466.
- Bräuner T, Hülser DF. 1990. Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids. *Invasion Metastasis*, 10 (1):31-48.
- Bräuner T, Schmid A, Hülser DF. 1990. Tumor cell invasion and gap junctional communication. I. Normal and malignant cells confronted in monolayer cultures. *Invasion Metastasis*, 10 (1):18-30.
- Bubien JK, Keeton DA, Fuller CM, Gillespie GY, Reddy AT, Mapstone TB, Benos DJ. 1999. Malignant human gliomas express an amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> conductance. *Am J Physiol*, 276 (6 Pt 1):C1405-1410.
- Bubien JK, Ji HL, Gillespie GY, Fuller CM, Markert JM, Mapstone TB, Benos DJ. 2004. Cation selectivity and inhibition of malignant glioma Na<sup>+</sup> channels by Psalmotoxin 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287 (5):C1282-1291.
- Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. 1988. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 68 (5):698-704.
- Caciagli F, Ciccarelli R, Ciancetta S, Di Iorio P, Caciagli P. 1982. Adenosine--norepinephrine interactions on cyclic AMP generating system in human tumoral brain slices. *Int J Tissue React*, 4 (3):233-241.
- Chaiswing L, Zhong W, Liang Y, Jones DP, Oberley TD. 2012. Regulation of prostate cancer cell invasion by modulation of extra- and intracellular redox balance. *Free Radic Biol Med*, 52 (2):452-461.

- Chen L, Zhang JJ, Huang XY. 2008. cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. *J Biol Chem*, 283 (20):13799-13805.
- Chicoine MR, Silbergeld DL. 1995. Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *J Neurosurg*, 82 (4):615-622.
- Chiu CC, Chen BH, Hour TC, Chiang WF, Wu YJ, Chen CY, Chen HR, Chan PT, Liu SY, Chen JY. 2010. Betel quid extract promotes oral cancer cell migration by activating a muscarinic M4 receptor-mediated signaling cascade involving SFKs and ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun*, 399 (1):60-65.
- Clark RB, Perkins JP. 1971. Regulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentration in cultured human astrocytoma cells by catecholamines and histamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (11):2757-2760.
- Cuddapah VA, Sontheimer H. 2010. Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *J Biol Chem*, 285 (15):11188-11196.
- Entschladen F, Drell TL, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS. 2005. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res*, 307 (2):418-426.
- Ernest NJ, Sontheimer H. 2007. Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res*, 1144:231-238.
- Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, Sontheimer HW. 2005. Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288 (6):C1451-1460.
- Giese A, Hagel C, Kim EL, Zapf S, Djawaheri J, Berens ME, Westphal M. 1999. Thromboxane synthase regulates the migratory phenotype of human glioma cells. *Neuro Oncol*, 1 (1):3-13.
- Giussani P, Bassi R, Anelli V, Brioschi L, De Zen F, Riccitelli E, Caroli M, Campanella R, Gaini SM, Viani P, Riboni L. 2012. Glucosylceramide synthase protects glioblastoma cells against autophagic and apoptotic death induced by temozolomide and Paclitaxel. *Cancer Invest*, 30 (1):27-37.
- Goldin AG, Safa AR. 1984. Digitalis and cancer. *Lancet*, 1 (8386):1134.
- Guizzetti M, Costa P, Peters J, Costa LG. 1996. Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur J Pharmacol*, 297 (3):265-273.
- Günther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H, Terzis AJ. 2003. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br J Cancer*, 88 (3):463-469.
- Gurwitz D, Razon N, Sokolovsky M, Soreq H. 1984. Expression of muscarinic binding sites in primary human brain tumors. *Brain Res*, 316 (1):61-70.
- Haas BR, Sontheimer H. 2010. Inhibition of the Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter Isoform-1 reduces glioma invasion. *Cancer Res*, 70 (13):5597-5606.
- Habela CW, Ernest NJ, Swindall AF, Sontheimer H. 2009. Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration. *J Neurophysiol*, 101 (2):750-757.
- Heagy W, Duca K, Finberg RW. 1995. Enkephalins stimulate leukemia cell migration and surface expression of CD9. *J Clin Invest*, 96 (3):1366-1374.
- Jantke J, Ladehoff M, Kürzel F, Zapf S, Kim E, Giese A. 2004. Inhibition of the arachidonic acid metabolism blocks endothelial cell migration and induces apoptosis. *Acta Neurochir (Wien)*, 146 (5):483-494.
- Johnson DR, Chang SM. 2012. Recent medical management of glioblastoma. *Adv Exp Med Biol*, 746:26-40.

- Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, Yan H, Adamson DC. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, 13 (6):701-718.
- Kapoor N, Bartoszewski R, Qadri YJ, Bebok Z, Bubien JK, Fuller CM, Benos DJ. 2009. Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. *J Biol Chem*, 284 (36):24526-24541.
- Keese CR, Bhawe K, Wegener J, Giaever I. 2002. Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture. *Biotechniques*, 33 (4):842-844, 846, 848-850.
- Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. 2004. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (6):1554-1559.
- Keogh RJ. 2010. New technology for investigating trophoblast function. *Placenta*, 31 (4):347-350.
- Khaitov SM, Rachkov SM. 1976. [Effect of certain antirheumatic preparations on the migration of T- and B-lymphocytes]. *Ter Arkh*, 48 (5):90-96.
- Knüpfer MM, Pulzer F, Schindler I, Hernaiz Driever P, Knüpfer H, Keller E. 2001. Different effects of valproic acid on proliferation and migration of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer Res*, 21 (1A):347-351.
- Krebsregister-Deutschland.  
[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2012/kid\\_2012\\_c70-72.pdf;jsessionid=A85925674240062A01EBD74891B00A00.2\\_cid292?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/kid_2012_c70-72.pdf;jsessionid=A85925674240062A01EBD74891B00A00.2_cid292?__blob=publicationFile)
- Kuhn SA, Mueller U, Hanisch U-K, Regenbrecht CRA, Schoenwald I, Brodhun M, Kosmehl H, Ewald C, Kalff R, Reichart R. 2009. Glioblastoma cells express functional cell membrane receptors activated by daily used medical drugs. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135 (12):1729-1745.
- Kumar B, Kumar A, Pandey BN, Mishra KP, Hazra B. 2009. Role of mitochondrial oxidative stress in the apoptosis induced by diospyrin diethylether in human breast carcinoma (MCF-7) cells. *Mol Cell Biochem*, 320 (1-2):185-195.
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H. 1998. Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur J Neurosci*, 10 (6):2153-2162.
- Lahiri DK, Farlow MR, Nurnberger JI, Greig NH. 1997. Effects of cholinesterase inhibitors on the secretion of beta-amyloid precursor protein in cell cultures. *Ann N Y Acad Sci*, 826:416-421.
- Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F. 2004. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*, 112 (2):231-238.
- Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski AW. 2010. A comparative study of morphine stimulation and biphalin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro. *Peptides*, 31 (8):1606-1612.
- Lefranc F, Kiss R. 2008. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia*, 10 (3):198-206.
- Lefranc F, Mijatovic T, Kiss R. 2008a. [The sodium pump could constitute a new target to combat glioblastomas]. *Bull Cancer*, 95 (3):271-281.
- Lefranc F, James S, Camby I, Gaussin JF, Darro F, Brotchi J, Gabius J, Kiss R. 2005. Combined cimetidine and temozolomide, compared with temozolomide

- alone: significant increases in survival in nude mice bearing U373 human glioblastoma multiforme orthotopic xenografts. *J Neurosurg*, 102 (4):706-714.
- Lefranc F, Mijatovic T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Debeir O, Krstic D, Vasic V, Gailly P, Kondo S, Blanco G, Kiss R. 2008b. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery*, 62 (1):211-221; discussion 221-212.
- Li L, Kracht J, Peng S, Bernhardt G, Buschauer A. 2003. Synthesis and pharmacological activity of fluorescent histamine H1 receptor antagonists related to mepyramine. *Bioorg Med Chem Lett*, 13 (7):1245-1248.
- Li L, Miyamoto M, Ebihara Y, Mega S, Takahashi R, Hase R, Kaneko H, Kadoya M, Itoh T, Shichinohe T, Hirano S, Kondo S. 2006. DRD2/DARPP-32 expression correlates with lymph node metastasis and tumor progression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg*, 30 (9):1672-1679; discussion 1680-1671.
- Long DM. 1970. Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J Neurosurg*, 32 (2):127-144.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2):97-109.
- Lund-Johansen M, Engebraaten O, Bjerkvig R, Laerum OD. 1990. Invasive glioma cells in tissue culture. *Anticancer Res*, 10 (5A):1135-1151.
- Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T, Sontheimer H. 2007. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res*, 67 (19):9463-9471.
- Malik AA, Radhakrishnan N, Reddy K, Smith AD, Singhal PC. 2002. Morphine-induced macrophage apoptosis modulates migration of macrophages: use of in vitro model of urinary tract infection. *J Endourol*, 16 (8):605-610.
- Masur K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. 2001. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res*, 61 (7):2866-2869.
- Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T. 2002. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer*, 86 (2):161-167.
- Matzner Y, Drexler R, Levy M. 1984. Effect of dipyrone, acetylsalicylic acid and acetaminophen on human neutrophil chemotaxis. *Eur J Clin Invest*, 14 (6):440-443.
- McCall KD, Harii N, Lewis CJ, Malgor R, Kim WB, Saji M, Kohn AD, Moon RT, Kohn LD. 2007. High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3) and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration. *Endocrinology*, 148 (9):4226-4237.
- Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. 2007. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1776 (1):32-57.
- Molenaar RJ. 2011. Ion channels in glioblastoma. *ISRN Neurol*, 2011:590249.
- Muir D, Sukhu L, Johnson J, Lahorra MA, Maria BL. 1993. Quantitative methods for scoring cell migration and invasion in filter-based assays. *Anal Biochem*, 215 (1):104-109.
- Munaut C, Boniver J, Foidart JM, Deprez M. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular



- endothelial growth factor (VEGF) expression. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 28 (6):452-460.
- Niggemann B, Maaser K, Lü H, Kroczeck R, Zänker KS, Friedl P. 1997. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three-dimensional collagen lattice. *Cancer Lett*, 118 (2):173-180.
- Niggemann B, Drell TL, Joseph J, Weidt C, Lang K, Zaenker KS, Entschladen F. 2004. Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix. *Exp Cell Res*, 298 (1):178-187.
- O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM. 1998. Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J Cell Biol*, 143 (6):1749-1760.
- Okubo Y, Tsukadaira A, Takashi S, Kubo K, Koyama S. 2001. Chemotaxis of human CD4+ eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 125 Suppl 1:19-21.
- Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. 2011. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One*, 6 (9):e24665.
- Onda K, Tanaka R, Washiyama K, Takeda N, Kumanishi T. 1988. Correlation of DNA ploidy and morphological features of human glioma cell cultures with the establishment of cell lines. *Acta Neuropathol*, 76 (5):433-440.
- Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. 2011. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol*, 28 (1):13-24.
- Ou XM, Chen K, Shih JC. 2006. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem*, 281 (30):21512-21525.
- Palm D, Lang K, Brandt B, Zaenker KS, Entschladen F. 2005. In vitro and in vivo imaging of cell migration: two interdepending methods to unravel metastasis formation. *Semin Cancer Biol*, 15 (5):396-404.
- Palm D, Lang K, Niggemann B, Drell TL, Masur K, Zaenker KS, Entschladen F. 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer*, 118 (11):2744-2749.
- Pan EC, Bohn LM, Belcheva MM, Thomas GE, Manepalli AN, Mamone JY, Johnson FE, Coscia CJ. 1998. Kappa-opioid receptor binding varies inversely with tumor grade in human gliomas. *Cancer*, 83 (12):2561-2566.
- Paulus W, Huettner C, Tonn JC. 1994. Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int J Cancer*, 58 (6):841-846.
- Piette C, Deprez M, Roger T, Noël A, Foidart JM, Munaut C. 2009. The dexamethasone-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion in glioma cell lines is antagonized by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and can be enhanced by specific MIF inhibitors. *J Biol Chem*, 284 (47):32483-32492.
- Pursche S, Schleyer E, von Bonin M, Ehninger G, Said SM, Prondzinsky R, Illmer T, Wang Y, Hosius C, Nikolova Z, Bornhäuser M, Dresemann G. 2008. Influence of enzyme-inducing antiepileptic drugs on trough level of imatinib in glioblastoma patients. *Curr Clin Pharmacol*, 3 (3):198-203.
- Rosen EM, Jaken S, Carley W, Luckett PM, Setter E, Bhargava M, Goldberg ID. 1991. Regulation of motility in bovine brain endothelial cells. *J Cell Physiol*, 146 (2):325-335.

- Rudolph MI, Boza Y, Yefi R, Luza S, Andrews E, Penissi A, Garrido P, Rojas IG. 2008. The influence of mast cell mediators on migration of SW756 cervical carcinoma cells. *J Pharmacol Sci*, 106 (2):208-218.
- Russel DuR, LJ. 2006. Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System. McLendon, Roger; Rosenblum, Marc; Bigner, Darrell.
- Schiffer D, Fabiani A, Monticone GF, Cognazzo A. 1968. Non-specific esterase in cerebral tumors. A histochemical study. *Acta Neuropathol*, 10 (2):143-150.
- Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. 2009. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296 (2):C221-232.
- Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. 2010. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res*, 1352:255-264.
- Song MK, Kim YJ, Song M, Choi HS, Park YK, Ryu JC. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction. *Cancer Sci*, 102 (9):1636-1644.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, Groups EOfRaToCBTaR, Group NClOCCCT. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352 (10):987-996.
- Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. 1997. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216 (2):201-210.
- Thomas GE, Szücs M, Mamone JY, Bem WT, Rush MD, Johnson FE, Coscia CJ. 1990. Sigma and opioid receptors in human brain tumors. *Life Sci*, 46 (18):1279-1286.
- Tilly BC, Tertoolen LG, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat SW, Moolenaar WH. 1990. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca<sup>2+</sup>(+)-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol*, 110 (4):1211-1215.
- Tsuji M, Kawano S, DuBois RN. 1997. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (7):3336-3340.
- Tsukadaira A, Okubo Y, Horie S, Koyama S. 2001. Theophylline inhibits TNF-alpha-induced CD4 expression on human eosinophils and CD4+ eosinophil migration. *Int Arch Allergy Immunol*, 125 (4):335-343.
- Tysnes BB, Mahesparan R. 2001. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol*, 53 (2):129-147.
- Usery JB, Michael LM, Sills AK, Finch CK. 2010. A prospective evaluation and literature review of levetiracetam use in patients with brain tumors and seizures. *J Neurooncol*, 99 (2):251-260.
- Verkhatsky A. 2006. Glial calcium signaling in physiology and pathophysiology. *Acta Pharmacol Sin*, 27 (7):773-780.
- Verkhatsky A, Steinhauser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev. Netherlands*, 380-412.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F. 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist. United States*, 28-37.

- Vila-Carriles WH, Kovacs GG, Jovov B, Zhou ZH, Pahwa AK, Colby G, Esimai O, Gillespie GY, Mapstone TB, Markert JM, Fuller CM, Bubien JK, Benos DJ. 2006. Surface expression of ASIC2 inhibits the amiloride-sensitive current and migration of glioma cells. *J Biol Chem*, 281 (28):19220-19232.
- Wang D, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN, Gladson CL. 2000. Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene*, 19 (50):5801-5809.
- Weydt P, Möller T, Labrakakis C, Patt S, Kettenmann H. 1997. Neuroligand-triggered calcium signalling in cultured human glioma cells. *Neurosci Lett*, 228 (2):91-94.
- Wundergem R, Bartley JW. 2009. Menthol increases human glioblastoma intracellular Ca<sup>2+</sup>, BK channel activity and cell migration. *J Biomed Sci*, 16:90.
- Wundergem R, Ecay TW, Mahieu F, Owsianik G, Nilius B. 2008. HGF/SF and menthol increase human glioblastoma cell calcium and migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 372 (1):210-215.
- Wu X, Zhu Y, Yan H, Liu B, Li Y, Zhou Q, Xu K. 2010. Isothiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer*, 10:269.
- Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. 2004. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol*, 4:21.
- Zhang S, Togo S, Minakata K, Gu T, Ohashi R, Tajima K, Murakami A, Iwakami S, Zhang J, Xie C, Takahashi K. 2010. Distinct roles of cholinergic receptors in small cell lung cancer cells. *Anticancer Res*, 30 (1):97-106.
- Zigmond SH, Hirsch JG. 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med*, 137 (2):387-410.

## **9 Anhang**

### **9.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Frau Dr. rer. nat. Susanne Grube

Herr Dr. med. Albrecht Waschke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit den Inhalten der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 17.09.2013

## 9.2 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Rolf Kalff für die freundliche Überlassung des Themas danken, das mir inhaltlich von Anfang an zugesagt und dessen Bearbeitung mich Vieles gelehrt hat. Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. med. Albrecht Waschke, der die Arbeit über den langen Zeitraum betreut und sich stets sehr viel Zeit genommen hat, den Problemen zu lauschen; und der die richtigen Worte gefunden hat, den Mut angesichts des manchmal sehr variablen Verlaufs der Experimente wieder aufzurichten. Als besonders wertvoll habe ich außerdem die Betreuung durch Frau Dr. rer. nat. Susanne Grube empfunden, die stets Rat im Experimentellen wie auch im Schreiben der Arbeit gewusst hat und ohne die die Dissertation so nicht zustande gekommen wäre.

Außerdem möchte ich meinem Ehemann Herrn Rico Besteher und meinen Eltern Frau Tina und Herrn Thomas Scharein für ihren Zuspruch und ihr Interesse danken. Ohne sie hätte ich die Flinte wohl zwischenzeitlich ins Korn geworfen. Vielen Dank für das aufgeschlossene Probelesen des fertigen Manuskriptes auch an meinen guten Freund Herrn Theiss Wystemp.

Für die gemeinsame Zeit im Labor, bei der die Arbeit über die Jahre nie langweilig geworden ist, möchte ich außerdem meiner Kommilitonin Frau Carolin Fabisch danken, die zeitgleich mit mir an der Klinik für Neurochirurgie promoviert.

### 9.3 Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Bianca Besteher geb. Scharein Stifterstraße 17a 07743 Jena	
	Geboren: 05.05.1988 in Jena Familienstand: Verheiratet	
<b>Ausbildung</b>		<b>Friedrich-Schiller-Universität Jena</b> Klinisches Studium
	10/2008 - 12/2012	Promotion: Prof. Dr. R. Kalff, Ärztlicher Direktor der Klinik für Neurochirurgie Jena Thema: „Migrationsanalysen an den humanen Glioblastomzelllinien U-373 MG und U-87 MG unter Anwendung von Medikamenten des klinischen Alltags“
	09/2008	1. Staatsexamen
	10/2006 - 03/2008	<b>Friedrich-Schiller-Universität Jena</b> Vorklinisches Studium
<b>Praktische Erfahrung</b>	03/2012 - 07/2012	<b>Universitätsklinikum Jena</b> 3. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin (Rheumatologie)
	12/2011 - 03/2012	2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie (Allgemein- und Visceral-, sowie Kinderchirurgie)
	08/2011 - 12/2011	1. Tertial des Praktischen Jahres, Psychiatrie (Akutaufnahmestation)
	02-03/2011	Famulatur an der Klinik für Psychiatrie
	07-08/2010	Famulatur an der Klinik für Neurochirurgie
	07-09/2009	Famulatur in der Abteilung für Gastroenterologie
02-03/2009	Famulatur am Institut für Pathologie	

**Schulbildung**

2003 - 2006

**Adolf-Reichwein-Gymnasium Jena**  
Sekundarstufe II,  
Abschluss: Abitur

1998 - 2003

**Adolf-Reichwein-Gymnasium Jena**  
Sekundarstufe I,  
Abschluss: BLF

1994 - 1998

**Westschule Jena**  
Grundschule