

Jonas Kroschke

Dr. med.

Untersuchung des zellulären Lipidprofils mit Bezug auf die Ceramid-induzierte Apoptose nach Bestrahlung

Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber

Durch technische Fortschritte ist es in jüngerer Zeit möglich geworden, unter Schonung des umliegenden, gesunden Gewebes maligne Tumore bei Patienten mit sehr hohen Einzeldosen zu bestrahlen. Die zunehmende Dosisescalation geht mit einer verbesserten *tumor response* einher, welche über den Vorhersagen der klassischen strahlenbiologischen Erklärungsmodelle liegt. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang der Mechanismus der Ceramid-vermittelten Apoptose diskutiert: Eine strahleninduzierte Translokation der sauren Sphingomyelinase (aSMase) in die Zellmembran mit konsekutiver Aktivierung, führe früh zu einer vermehrten Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid, was entweder durch Bildung von Ceramid-Clustern in der Zellmembran oder direkter Interaktion von Ceramid mit Zellproteinen zur Einleitung der Apoptose führen könne.

Ziel dieser Arbeit war es, mit neuen Verfahren den Ceramid-vermittelten Apoptosemechanismus auf Reproduzierbarkeit zu überprüfen und dabei eine Methodologie zu entwickeln, mit der die massenspektrometrische Lipidanalyse in der Strahlenbiologie angewandt werden kann, um etwaige Veränderungen der zellulären Lipidhomöostase nach Bestrahlung abbilden zu können.

Zu diesem Zweck wurden zunächst drei verschiedene murine Tumorzelllinien (B16-Melanom, Panc02-Pankreaskarzinom und LLC1-Lungencarcinom) und zwei humane Endothelzelllinien (HDMEC, *Human umbilical vein endothelial cells* und HDMEC, *Human dermal microvasculature endothelial cells*) mithilfe etablierter strahlenbiologischer Assays auf ihre Strahlensensibilität überprüft. Mithilfe zweier unterschiedlicher, durchflusszytometrischer Nachweisverfahren (Bestimmung des DNA-Gehalts und Caspase-3-Nachweis) wurden die Zelllinien anschließend auf ihre Apoptoserate zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht, um eine frühe Apoptoseinduktion darstellen zu können. Außerdem erfolgte eine Lipid-Massenspektrometrie mit Bestimmung der Sphingolipide Sphingomyelin und Ceramid sowie mehrerer Phospho- und Glycerolipide nach Bestrahlung. Im anschließenden Tierversuchsteil wurden bei Black-6-Mäusen B16- und Panc02-Tumore am rechten Hinterbein induziert. Nach dem Erreichen einer definierten Größe wurden die Tumore der Tiere bestrahlt. Eine Hälfte der Tumore wurde für die Histologie verwendet, die andere Hälfte wurde mittels Lipid-Massenspektrometrie entsprechend den in-vitro Versuchen untersucht.

Die Endothelzelllinien zeigten eine höhere Strahlensensibilität als die Tumorzelllinien, was sich mit den Ergebnissen in der Literatur deckt. Lediglich bei der

HUVEC-Endothelzelllinie konnte eine geringe Apoptoseinduktion 15 Minuten nach einer Bestrahlung mit einer hohen Einzeldosis von 20 Gy nachgewiesen werden. Die Endothelzelllinie HDMEC und die Tumorzelllinien zeigten keine frühe Apoptose. Insgesamt lag die Apoptoserate der Endothelzelllinien nach Bestrahlung, trotz der gezeigten höheren Strahlenempfindlichkeit, unter der der Tumorzelllinien. Im Rahmen dieses Projekts hat sich die Kombination aus subG1- und Caspase-3-Bestimmung in der Durchflusszytometrie als solide Methodologie zur Bestimmung der Apoptoserate in-vitro bestätigt.

Die histologische Untersuchung der Tumore ergab den Nachweis einer retikulären endothelialen Vaskularisation, die die Gesamtheit der Tumore einschloss. Die geplante immunhistochemische Untersuchung eines vermehrten Auftretens von Apoptose in den Tumorendothelien konnte bei starken Schnittartefakten der B16-Tumore nur qualitativ durchgeführt werden, wobei Endothelien nicht stärker als das umliegende Tumorgewebe betroffen zu sein schienen.

Der in der Literatur beschriebene Mechanismus einer frühen Apoptoseeinleitung bei Endothelzellen, der die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der HUVEC-Linie erklären könnte, die Ceramid-vermittelte Apoptoseinduktion durch aSMase-Aktivierung bei Hochdosisbestrahlung, konnte durch die massenspektrometrische Lipidanalyse nicht belegt werden. Es zeigten sich sowohl in-vitro als auch reproduzierbar in-vivo kein signifikanter Anstieg der Ceramid-Konzentrationen mit einem begleitendem Abfall der Sphingomyelin-Konzentrationen. Stattdessen wurden Veränderungen bei Phospho-/Glycerolipiden gefunden, insbesondere ein Anstieg der Diacylglycerol-Konzentration in Panc02-Tumoren, einem Lipid *second messenger*, die Ausgangspunkt für weitere Forschung sein können. Der Vergleich der Strahlensensibilität der Zelllinien mit deren Lipidprofilen ergab, dass die höhere Sphingomyelin-Konzentration in den Endothelzellen im Vergleich zu den Tumorzellen mit einer höheren Strahlensensibilität der Endothelien korreliert wobei sich dadurch noch kein kausales oder mechanistisches Bild abzeichnet.

Mit dieser hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das moderne Verfahren der Lipid-Massenspektrometrie belastbare und reproduzierbare Ergebnisse für die radiobiologische Forschung liefert. Damit eröffnen sich Möglichkeiten für vielfache Anwendungen der *Lipidomics*, um die Bedeutung von Lipid Signalwegen in der Strahlenbiologie zu untersuchen.