

Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

Direktor: Prof. Dr. R. Schneppenheim

**Evaluierung von fluoreszenzassoziierter Zytospektrometrie
im Vergleich zu radioaktiv markierten Transportmessungen
für Zytostatika an resistenten Tumorzellkulturen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Martin Meyer-Schneider

aus Winsen / Luhe

Hamburg, 1998

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 12. April 1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. R. Erttmann

Koreferent: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Zellkulturen	9
2.1.1	Murine Erythroleukämie-Zellen	10
2.1.2	Humane T-Zell-Leukämie-Zellen	11
2.1.3	Humane Pankreaskarzinom-Zellen	12
2.1.4	Vesikelbildende, MDR-positive humane Magenkarzinom-Zellen	13
2.1.5	Versuchsvorbereitung der Zellen	15
2.2	Versuchsaufbau	16
2.3	Silikonöfiltrationsmethode	17
2.3.1	Versuchsablauf	17
2.3.2	Proteinbestimmung	20
2.3.3	Volumenmessung	20
2.3.4	Einflußgrößen auf die Messungen und deren Kontrolle	20
2.3.5	Versuchsauswertung	21
2.4	Die Durchflußzytometrie	22
2.4.1	Eigenschaften des Meßgerätes	22
2.4.2	Versuchsablauf	27
2.5	Darstellung der Ergebnisse	31
2.6	Statistische Methoden	31
2.7	Verwendete Materialien	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Linearität	35
3.1.1	Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Dexniguldipin	36
3.1.2	Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Ciclosporin	38

3.1.3	Korrelation der Gesamtaufnahme	40
3.2	Zelluläre Daunorubicinakkumulation	41
3.2.1	Murine Erythroleukämie-Zellen	43
3.2.2	Humane T-Zell-Leukämie-Zellen	43
3.2.3	Humane Pankreaskarzinom-Zellen	44
3.2.4	Humane Magenkarzinom-Zellen	44
3.3	Meßergebnisse nach Inkubation mit Dexniguldipin oder Ciclosporin	45
3.4	Meßunterschiede bei vesikelbildenden Zellen	47
3.5	Messungen von Subpopulationen in der Zellkultur	49
3.6	Meßunterschiede bei Temperaturveränderungen	51
4	DISKUSSION	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATUR	61
7	DANKSAGUNGEN	68
8	LEBENS LAUF	69
ANHANG		70
8.1	Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Dexniguldipin	71
8.2	Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Ciclosporin	73
8.3	Humane T-Zell-Leukämie +/- Dexniguldipin	75
8.4	Humane T-Zell-Leukämie +/- Ciclosporin	77
8.5	Humane Pankreaskarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin	79
8.6	Humane Magenkarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin	81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CCRF CEM	sensitiver Klon einer menschlichen T-Zell-Leukämie-Zelllinie
CCRF CEM DAC	resistenter Klon der menschlichen T-Zell-Leukämie-Zelllinie
CsA	Cyclosporin A (Ciclosporin)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNIG	Dexniguldipin
DNR	Daunorubicin (Daunomycin)
EPG85-257P	sensitiver Klon einer menschlichen Magenkarzinom-Zelllinie
EPG85-257DAU	resistenter Klon der menschlichen Magenkarzinom-Zelllinie
EPP85-181P	sensitiver Klon einer menschlichen Pankreaskarzinom-Zelllinie
EPP85-181RDB	resistenter Klon der menschlichen Pankreaskarzinom-Zelllinie
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter; Synonym: Durchflußzytometer
F4-6	sensitiver Klon einer murinen Erythroleukämie-Zelllinie
F4-6RADR	resistenter Klon der murinen Erythroleukämie-Zelllinie
FSC	Forward-Scatter (Vorwärtsstreulicht)
P-Gp 170	P-Glykoprotein 170
IC ₅₀	Inhibition Concentration (Konzentration, die zu einer 50%igen Wachstumshemmung von Zellen benötigt wird.)
MDR	Multidrug-Resistenz
MEM	minimal essential medium (Kulturmedium der Fa. Gibco, Deutschland)
MG	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuche
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase chain reaktion (Polymerasekettenreaktion)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SSC	Side-Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
Transport	Transportassay; Synonym: Silikonölfiltrationsmethode

1 Einleitung

Maligne Erkrankungen stellen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in West-Europa dar (Gause et al. 1991). Ihre Therapie ist ein zentrales Thema der Medizin. Ein großes Problem ist dabei die zu beobachtende Entwicklung von Therapieresistenzen. Neben einer hohen natürlichen Unempfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, als Primärresistenz bezeichnet, werden Sekundärresistenzen als erworbene Form der Resistenz beobachtet, bei der sich die malignen Zellen während der Therapie anpassen und dadurch überleben: Bei zunächst erfolgreicher Erstbehandlung mit Remission des Tumors kommt es nach einer Latenzzeit zu therapierefraktären Rezidiven. Zu finden sind diese Sekundärresistenzen besonders häufig bei kleinzelligen Bronchialtumoren, Leukämien und einigen Brust- und Ovarialtumoren (Erttmann 1989).

Einige wichtige Beispiele verschiedener maligner Resistenzmechanismen sind:

- Veränderung von Zielenzymen. Führt zu einer geringeren Affinität und Wirkung des Chemotherapeutikums auf die Zelle. Beispiel: Änderungen der Dihydrofolsäurereductase unter Methotrexatbehandlung (Galivan 1981, Frei et al. 1984).
- Steigerung der Reperaturgeschwindigkeit der Zelle bei aufgetretenen DNA-Schäden. Gezeigt wurde dies bei Schädigungen der DNA durch Mitomycin (Willson et al. 1984), Cisplatin (Seeber et al. 1982, Teicher et al. 1987) und Adriamycin (Zijlstra et al. 1987).
- Vermehrter Auswärtstransport von Chemotherapeutika aus der Zelle. Das P-Glykoprotein als ein membranständiges ATP-abhängiges Tunnelprotein verursacht eine Kreuzresistenz gegen strukturell unterschiedliche Chemotherapeutika (Kartner et al. 1983, Hamada and Tsuruo 1988).
- Verminderung des aktiven Influx eines Chemotherapeutikums in die Zelle. Beschrieben für Methotrexat (Frei et al. 1984) und Cisplatin (Richon et al. 1987).
- Erhöhung der Aktivität der Gluthation-S-Transferase. Konjugation von Alkylanzien, Mitoxantron und Cyclophosphamid mit nachfolgender Ausschleusung aus der Zelle bewirkt eine schnelle intrazelluläre Zytostatikainaktivierung (Wolf et al. 1986, Dulik et al. 1986, McGown et al. 1986, Deffie et al. 1988).

- Verminderung der Aktivität der Topoisomerase-II. Dies führt zu verminderten Genreplikationen und Zelldifferenzierungsprozessen, so daß weniger Doppelstrangbrüche entstehen (Danks et al. 1987, Reichle et al. 1991).
- Verminderte Aktivierung von Zytostatika in der Zelle. Eine verminderte enzymatische Umwandlung von 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin zu einem zytotoxischen Metaboliten konnte bei akuten Leukämien nachgewiesen werden (Kees et al. 1989).
- Exozytose von in Vesikeln akkumulierten Chemotherapeutika aus der Zelle. Beschrieben ist eine Akkumulation von Chemotherapeutika in zelleigene Vesikel mit nachfolgender mikrotubuliabhängiger Exozytose (Dietel et al. 1990).
- Verminderung der intrazellulären Daunorubicinakkumulation durch neue energieabhängige Exportprozesse. Hedley et al. beschreiben 1997 einen neuen, vom P-Glykoprotein abgrenzbaren, Auswärtstransport von Daunorubicin aus Zellen.

Die „Multidrug-Resistenz“ (MDR) ist ein in-vitro Modell für klinisch zu beobachtende Therapieresistenzen maligner Erkrankungen. Juliano und Ling konnten 1976 eine Korrelation der Expression eines Glykoproteins auf der Zelloberfläche mit einer teilweisen oder auch kompletten Aufhebung der Sensitivität maligner Zellen gegenüber strukturell unterschiedlichen Therapiesubstanzen nachweisen. Dieses 170-180 kD große P-Glykoprotein (P = Permease) ist dimer strukturiert und hat eine Gesamtlänge von 1280 Aminosäuren. Beide Untereinheiten besitzen jeweils eine im Zytoplasma der Zelle lokalisierte Bindungsstelle für ATP und sechs transmembranäre Domänen. Vermutlich ergibt sich nach der Bindung der beiden Molekülstrukturen aneinander ein in die Zellmembran integriertes Tunnelprotein (Kartner et al. 1983, Juranka et al. 1989). Hinweise auf die Funktion des Glykoproteins brachte die Beobachtung der herabgesetzten intrazellulären Akkumulation für Anthrazykline, Vinca-Alkaloide und Epipodophyllotoxine. Aber auch andere Substanzen wie z.B. Cortison, Dexamethason, Aldosteron, Proteine, Zucker-Polymere und Ionen werden über das P-Gp transportiert (Ueda et al. 1992, Juranka et al. 1989). Eine chemische Veränderung von Daunorubicin zu 4-demethoxy-Daunorubicin führt hingegen dazu, daß diese Substanz nicht mehr aus der Zelle transportiert werden kann (Hedley et al. 1997).

Vergleiche der Molekularstrukturen lassen Ähnlichkeiten des P-Glykoproteins zu anderen bakteriellen Tunnelproteinen wie z.B. dem Chloroquin-Resistenz verursachenden Transportprotein von Plasmodium falciparum, dem Überträger der Malaria tropica (Foote et al. 1990),

und zum Hämolysin Transportprotein (hyl B) aus *E. coli* erkennen (Gerlach et al. 1986). Nachweise des P-Glykoproteins auf humanen Geweben, meist mit immunhistochemischen Methoden durchgeführt, konnten das Protein in Niere und Nebenniere (Fojo et al. 1987), Leber, Pankreas, Colon, Jejunum (Thiebaut et al. 1987) und auf Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Sugawara et al. 1988, Thiebaut et al. 1989) aufzeigen. Im Uterus der Maus wurde eine durch Gravidität hervorgerufene starke Induktion des P-Glykoprotein kodierenden *mdr1*-Gens festgestellt (Arceci et al. 1988). Die Expression auf der meist lumenwärts gerichteten Oberfläche der Epithelien könnte ein Hinweis auf eine physiologische Beteiligung bei der Sekretion von Stoffwechselprodukten und natürlich toxischen Substanzen u.a. in Galle, Urin und direkt in das Lumen des Gastrointestinaltraktes sein (Thiebaut et al. 1987). Klinische Bedeutung erhielt das P-Gp 170 durch die Unempfindlichkeit von P-Gp-positiven Zellen gegenüber mehreren gebräuchlichen Chemotherapeutika. Beschrieben sind hohe Resistenzgrade gegenüber Vinca-Alkaloiden, Anthrazyklinen, Actinomycin D, Colchicin und Bleomycin (Kartner et al. 1983, Nielsen et al. 1992). Eine Möglichkeit zur Überwindung der Multidrug-Resistenz ergibt sich durch den Einsatz von sogenannten „Chemosensitizern“. Ihre genaue Wirkungsweise in Bezug auf das P-Glykoprotein ist nicht bekannt. Gemeinsamkeit besteht jedoch in der Erhöhung der Empfindlichkeit der resistenten Tumorzellen.

Zu der chemisch heterogenen Gruppe von Chemosensitizern gehören:

- Ca-Antagonisten, z.B. Verapamil (Tsuruo et al. 1982)
- Kalmodulin Inhibitoren, z.B. Phenothiazine (Tsuruo et al. 1982)
- Ciclosporin (Cyclosporin A) (Twentyman et al. 1990, 1992)
- Dihydropyridinderivate, z.B. Dextropropylidipin (Reymann et al. 1993)
- Antiöstrogene, z.B. Tamoxifen, RU486 (Gruol et al. 1994).

Klinische Studien zur Überwindung von P-Gp bedingten Tumorresistenzen wurden beispielsweise mit Ciclosporin und Verapamil durchgeführt. Ein Nachteil beim Einsatz dieser beiden Chemosensitizer ergab sich aus den dosislimitierenden Nebenwirkungen (Dalton et al. 1989, Sikic et al. 1991). Eine weitere Möglichkeit zur Überwindung der Resistenzen von Zellen zeigten Rahmann et al. 1992 auf. Sie beschrieben eine höhere Zelltoxizität bei Verwendung eines liposomal enkapsulierten Doxorubicins gegenüber freiem Doxorubicin.

Insgesamt ist die spezifische Behandlung Multidrug-resistenter Tumorerkrankungen klinisch noch nicht etabliert. Dies liegt auch daran, daß im therapeutischen Einzelfall nur ganz ausnahmsweise und zu Forschungszwecken der Versuch einer Resistenzdiagnose durchgeführt wird (Murren et al. 1991). Neben immunhistochemischen und molekularbiologischen Metho-

den zur Resistenzdiagnose könnte vor allem der funktionellen Resistenzmessung besonderer Aussagewert zukommen. Erniedrigte intrazelluläre Zytostatikaspiegel können direkt gemessen und ihre Anhebung durch geeignete Chemosensitizer experimentell geprüft werden. Merlin et al. beschreiben 1995 eine gegenüber der Analyse der Expression des P-Glykoproteins bessere klinische Vorhersagbarkeit der Prognose bei Patienten mit akuter myeloische Leukämie durch eine funktionelle Messung mittels der Durchflußzytometrie.

Diese Arbeit befaßt sich deshalb mit dem Versuch der Evaluierung einer durchflußzytometrischen Meßmethode zur zellulären Aufnahme von Anthrazyklinen. Zum Vergleich ist eine quantitative auf Radioaktivitätsmessung ausgerichteten Silikonöfiltrationsmethode gewählt worden, die Rückschlüsse auf Verteilungsunterschiede des Transportmittels innerhalb der Zelle zuläßt. Es soll untersucht werden, welche Einflüsse intrazelluläre Verteilungsunterschiede von akkumulierten Daunorubicin auf die Ergebnisse in der Durchflußzytometrie haben. Das Ziel der vorliegenden Experimente ist es also, die Möglichkeiten und Grenzen der Durchflußzytometrie näher zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

Die Versuche zum Vergleich der beiden Meßmethoden wurden an vier Zelllinien und ihren resistenten Subklonen durchgeführt. Es wurden bereits in der Forschung etablierte Zelllinien mit unterschiedlicher biologischer Herkunft, unterschiedlichen Zelleigenschaften und unterschiedlichen Resistenzgraden verwendet.

Gemeinsames Merkmal der verschiedenen Zelllinien ist eine Expression des P-Glykoproteins in der Zellmembran der resistenten Subklone.

2.1.1 Murine Erythroleukämie-Zellen

Bei den verwendeten F4-6-Zellen handelt es sich um eine von C. Friend vom Sloan-Kettering Institut for Cancer Research, New York, transformierte murine Erythroleukämie-Zelle. Die permanente Kultivierung gelang Friend 1966 durch eine Virusinduktion des Mäusestammes DBA/2 (Friend et al. 1966). Prof. Dr. W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institute für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg, selektionierte einen gegen Doxorubicin resistenten Subklon dieser Zelllinie (F4-6RADR). Zur Verfügung gestellt wurden diese beiden Linien durch Dr. A. Schaefer und Dr. G. Steinheider, Pharmakologisches Institut, Abteilung Allgemeine Toxikologie, Universität Hamburg. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ zur Atmosphärenluft in MEM-alpha-Medium, 10% fetalem Kälberserum, L-Glutamin (2 mmol/l), Penicillin G (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml) und Natriumpyruvat (100 µmol/l). Zur Erhaltung der Resistenz der F4-6RADR Zellen wurde bei diesen zusätzlich 1 µg Doxorubicin / ml Kulturmedium hinzugefügt. Der Nachweis des *mdr1*-Gen-Transkriptes in den resistenten F4-6RADR-Zellen gelang mittels RT-PCR. Das P-Glykoprotein konnte durch die monoklonalen Antikörper C219, MRK16, 4E3 (Kapaun 1994) immunzytochemisch nachgewiesen werden.

Die Tabelle 2.1-a zeigt den Resistenzfaktor der resistenten Zellen gegenüber den sensitiven Zellen. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten der jeweiligen IC₅₀-Konzentration, d. h. der Konzentration bei der 50% der Zellen im Proliferationsassay nach 48 Stunden abgestorben sind.

<u>Chemotherapeutika:</u>	<u>Resistenzfaktor*:</u>
Daunorubicin	35
Doxorubicin	51
Vincristin	19
Etoposid (VP16)	17

Tabelle 2.1-a: Resistenzspektrum der resistenten F4-6RADR-Zellen (Nielsen et al. 1992).

* IC₅₀ F4-6RADR / IC₅₀ F4-6

2.1.2 Humane T-Zell-Leukämie-Zellen

Die CCRF CEM-Zellen entstammen einer humanen T-Zell-Leukämie. Die Zelllinie wurde von G. E. Foley (Foley et al. 1967) aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankten 4jährigen Mädchens nach einer zur Remission führenden Therapie entnommen. Diese Therapie bestand aus einer Bestrahlung und der Gabe von Methotrexat und Prednisolon, sowie Vincristin, Cytosin und 6-Mercaptopurin. Wenige Tage nach der Entnahme des Blutes, aus dem später diese Zelllinie etabliert wurde, verstarb das Mädchen. Nach Entwicklung verschiedener mehrfachresistenter Zelllinien aus diesem Klon wurden diese Sublinien von Dr. H. Diddens, Medizinisches Laserzentrum, Lübeck, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ zur Atmosphärenluft in RPMI 1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 5% NaHCO₃ (7,5%). Weitere Zusätze bestanden in 1% Glutamin (200 mM), 1% Amphotericin B (200 µg/ml) und 1% Gentamycin (10 mg/ml). Der resistente Subklon CCRF CEM DAC wurde zusätzlich zur Erhaltung der vorhandenen Resistenz bei 400 ng/ml Actinomycin D kultiviert. Die Resistenz der beschriebenen Zelllinie ist ebenfalls vom Typ der Multidrug-Resistenz. Der immunzytochemische Nachweis des P-Glykoproteins gelang mit dem monoklonalen Antikörpern C-219, MRK16, 4E3. Die *mdr1*-Gen-Expression wurde mittels RT-PCR dokumentiert (Kapaun 1994).

Die Tabelle 2.1-b zeigt den Resistenzfaktor der resistenten CCRF CEM DAC-Zellen gegenüber den sensitiven Zellen. Er errechnet sich, wie bereits bei Tabelle 2.1-a beschrieben, aus dem Quotienten der jeweiligen IC₅₀-Konzentration.

<u>Chemotherapeutikum:</u>	<u>Resistenzfaktor*:</u>
Daunorubicin	90
Doxorubicin	83
COL	20
Vincristin	100
Etoposid (VP16)	70

Tabelle 2.1-b: Resistenzspektrum der resistenten CCRF CEM DAC-Zellen (Nielsen et al. 1992). *IC₅₀ CCRF CEM DAC / IC₅₀ CCRF CEM

2.1.3 Humane Pankreaskarzinom-Zellen

Die Primär-Kultur dieser Zelllinie EPP85-181P entstammt einem humanen Pankreaskarzinom. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Leibowitz-15 Medium. 500 ml Medium wurden angereichert mit 5% fetalem Kälber Serum, 500 µg Glutamin, 40 E Insulin, 1,25 mg Transferrin, 0,56 g NaHCO₃, 5 ml Medium-Vitaminen und 250 mg Glucose. Durch die Kultivierung der Zellen mit Daunorubicin in zunehmender Konzentration konnte der Klon EPP85-181RDB selektiert werden. Die Multidrug-Resistenz dieses resistenten Klons wurde durch Nachweis des *mdr1*-Transkriptes mittels RT-PCR und Northern Blot gezeigt. Mit dem zytoplasmatisch an P-Glykoprotein bindenden Antikörper C219 wurde eine Expression des Proteins in den resistenten Zellen nachgewiesen (Holm et al. 1994). Funktionell konnte eine Kreuzresistenz gegenüber Doxorubicin, Vincristin und Daunorubicin nachgewiesen werden. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Dietel, Institut für Pathologie, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Labor von Dr. A. Reymann, Pharmakologisches Institut, Universität Hamburg.

Die Tabelle 2.1-c zeigt den Resistenzfaktor der resistenten EPP85-181RDB-Zellen gegenüber den sensitiven EPP85-181P-Zellen. Die Resistenz der Zellen errechnet sich, anders als in den vorhergehenden Tabellen, aus dem Quotienten der IC₅₀-Konzentration für halbmaximale Wachstumshemmung der Kulturen über 72 Stunden (Dietel et al. 1990).

<u>Chemotherapeutikum:</u>	<u>Resistenzfaktor*:</u>
Daunorubicin	173
Doxorubicin	240
Vincristin	338

Tabelle 2.1-c: Resistenzspektrum der resistenten EPP85-181RDB-Zellen (Schäfer 1996).

* $IC_{50} \text{ EPP85-181RDB} / IC_{50} \text{ EPP85-181P}$

2.1.4 Vesikelbildende, MDR-positive humane Magenkarzinom-Zellen

Diese Zelllinie entstammt einer humanen Magenkarzinom-Zelle. Histologisch wurde die Diagnose eines Adenokarzinoms vom intestinalen Typ gestellt. Nach Kultivierung der Zelllinie EPG85-257P konnte durch schrittweise Erhöhung der Daunorubicinkonzentration im Nährmedium der resistente Subklon EPG85-257DAU innerhalb von 385 Tagen bis auf eine Resistenz von 2,5 µg/ml Daunorubicin herangezogen werden. Prof. Dr. M. Dietel stellte auch diese Zelllinie vom Typ der Multidrug-Resistenz freundlicherweise zur Verfügung. Die weitere Kultivierung erfolgte im Labor von Dr. A. Reymann, Pharmakologisches Institut, Universität Hamburg. Das P-Glykoprotein wurde immunzytochemisch durch monoklonale Antikörper, die *mdr1*-Gen-Expression mittels RT-PCR nachgewiesen (Dietel et al. 1990). Der weitaus bedeutendere Resistenzmechanismus ist jedoch die zusätzliche intrazelluläre Bildung von Vesikeln. Diese befreien den Zellkern innerhalb von 48 Stunden von bereits an DNA gebundenem Daunorubicin. Wahrscheinlich ermöglichen zusätzlich veränderte Enzyme wie z.B. die Topoisomerase-II und DNA-Ligasen das Überleben während dieser 48 Stunden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Leibowitz-15-Medium. 500 ml Medium wurden angereichert mit 5% fetalem Kälber Serum, 500 µg Glutamin, 40 IE Insulin, 1,25 mg Transferrin, 0,56 g NaHCO₃, 5 ml Medium-Vitaminen und 250 mg Glucose. Die resistenten Zellen wurden in Anwesenheit von zusätzlich 0,25 µg/ml Daunorubicin gezogen. Um die Vesikelbildung der Zellen auf ein Maximum anzuregen, sind die Zellen 7 Tage vor dem Versuch in daunorubicinfreies Medium umgesetzt und dann 48 Stunden vor Versuchsbeginn erneut mit 0,25 µg/ml (0,474 µmol/l) Daunorubicin belastet worden.

Die Tabelle 2.1-d zeigt den Resistenzfaktor der resistenten Zellen gegenüber den sensitiven Zellen. Dieser errechnet sich wie auch in der Tabelle 2.1-c aus dem Quotienten der IC₅₀-Konzentration für halbmaximale Wachstumshemmung der Kulturen über 72 Stunden (Dietel et al. 1990).

<u>Chemotherapeutikum:</u>	<u>Resistenzfaktor*:</u>
Daunorubicin	8450
Doxorubicin	1250
Epirubicin	5714

Tabelle 2.1-d: Resistenzspektrum von EPG85-257DAU (Seidel et al. 1995).

*IC₅₀ EPG85-257DAU / IC₅₀ EPG85-257P

Die Abbildungen zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der EPG85-257P Zellen und ihres resistenten Subklons EPG85-257DAU. Zu erkennen ist in den sensitiven Zellen eine gleichmäßige Verteilung des fluoreszierenden Daunorubicin über das gesamte Zytosol (Abb. 2.1-a), in den resistenten Zellen eine deutliche Akkumulation des Daunorubicins in Vesikeln (Abb. 2.1-b).

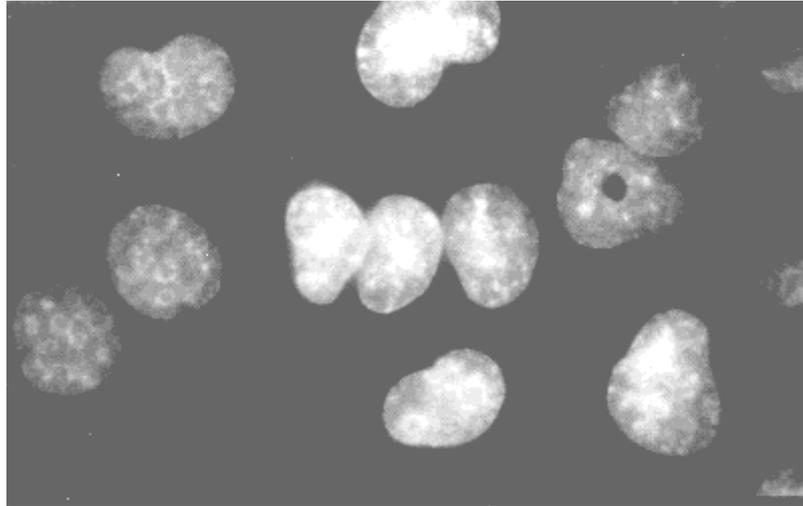


Abbildung 2.1-a: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Daunorubicin inkubierten sensitiven EPG85-257P Zellen. Das intrazelluläre Daunorubicin ist intranukleär annähernd gleichmäßig verteilt.

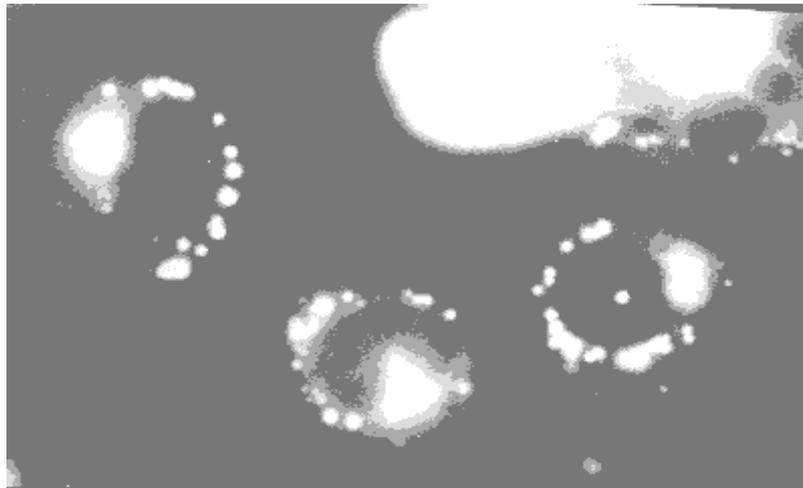


Abbildung 2.1-b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Daunorubicin inkubierten vesikelbildenden resistenten EPG85-257DAU Zellen. Deutlich zu erkennen sind intrazelluläre, mit fluoreszierendem Daunorubicin gefüllte Vesikel. Das Zytosol ist annähernd frei von Daunorubicin.

Die Bilder wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Dietel, Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Versuchsvorbereitung der Zellen

Die zeitliche Planung der Versuche richtete sich nach dem Wachstum der Zellen. Es wurde darauf geachtet, daß die Ernte der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellvermehrung stattfand. Eine Woche vor den Versuchen wurde die jeweilige Zelllinie in ein frisches Kulturmedium ohne Chemotherapeutikazusatz überführt. Nach einem Mediumwechsel kommt es bei den resistenten Zellen zu einer Rückverteilung des ehemals eingesetzten Chemotherapeutikums aus den Zellen heraus in das frische Kulturmedium. Deshalb wurden nach 24 Stunden die Zellen erneut bei 350 g für 10 min zentrifugiert und nach zwei Waschvorgängen mit Hank's Lösung wiederum in chemotherapeutika-freies Medium gesetzt. Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Zellen bei 300 g zentrifugiert, geerntet und in frisches MEM-alpha-Medium überführt. Nach Einstellung einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen / ml sind die Zellen in eine Versuchsgruppe (mit Chemosensitizer) und eine Kontrollgruppe (ohne Chemosensitizer) aufgeteilt worden.

Die Abbildung 2.2-a verdeutlicht den zeitlichen Ablauf und die Koordination der beiden Meßmethoden während der Experimente. Es ergeben sich bei jedem Versuch 8 Aliquots: resistente und sensitive Zellen jeweils mit und ohne Chemotherapeutikum separat für die Messung im Transportassay und mit der Durchflußzytometrie. Die Messungen wurden bei vier verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Meßpunkte bei dem Transportassay wurden jeweils mit einer Dreipunktmessung bestimmt.

2.2 Versuchsaufbau

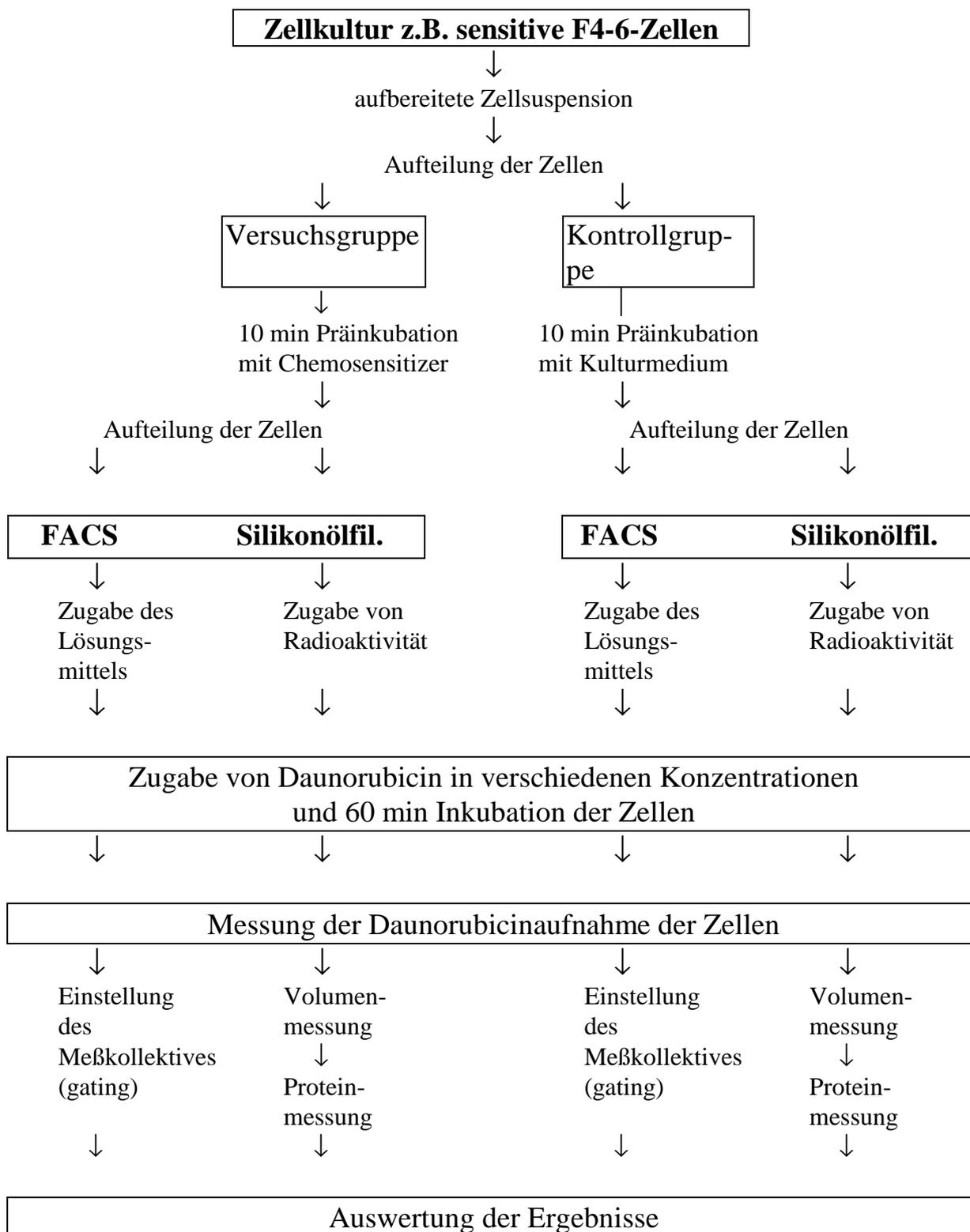


Abbildung 2.2-a: Dieses Diagramm zum Versuchsaufbau veranschaulicht die Zusammenhänge der Versuche für den Vergleich der Silikonölfiltrationsmethode (Silikonölfil.) mit der durchflußzytometrischen Meßmethode (FACS). Die Darstellung gilt für die sensitiven oder resistenten Zellen bei derselben Meßkonzentration.

2.3 Silikonölfiltrationsmethode

Diese von Reymann et al. 1993 beschriebene Methode ist ein Verfahren zur Messung der funktionellen Transportkinetik von Zellen. Bei der Analyse von Tumoren dient sie dem quantitativen Nachweis einer Resistenz von Zellen gegenüber Zytostatika, sowie deren Aufhebung durch Chemosensitizer. Es wird die Akkumulation von radioaktiv markierten Transportsubstanzen in Zellen gemessen. Als Transportsubstanz wurde ^3H -Daunorubicin verwendet. Jedoch ist diese Meßmethode auch mit jeder anderen radioaktiv markierten Substanz durchführbar.

Die Zellen werden mit ^3H -Daunorubicin für eine Stunde inkubiert und danach durch eine Silikonölschicht in eine Phase mit Trichloressigsäure zentrifugiert. In dieser Phase werden die Zellen in ihre säurelöslichen und säureunlöslichen Bestandteile aufgeteilt. Die säurelöslichen Zellbestandteile und die dort akkumulierte Transportsubstanz befinden sich in der Trichloressigsäure in Lösung. Sie wurden als „zytosolisch“ definiert. Die säurefällbaren Bestandteile fallen als Sediment aus. Die im Präzipitat enthaltene Transportsubstanz wurde als an Proteine, DNA und RNA „gebunden“ definiert. Das Volumen der Zellen wird in einer parallelen Messung bestimmt. Dabei werden die Zellen mit $^3\text{H}_2\text{O}$ und dem sich ausschließlich extrazellulär verteilenden ^{14}C -Polyethylenglykol (PEG) inkubiert. Zuletzt erfolgt eine photometrische Ermittlung der Proteinmenge der eingesetzten Zellen. Die aufgenommene Menge an Daunorubicin wurde für die zytosolische Phase auf das Volumen der Zellen bezogen und als Konzentration angegeben. Die gebundene Fraktion wurde im Bezug zum Proteingehalt der Zellen angegeben. Die Gesamtaufnahme ist eine Addition der Daunorubicinaufnahmen beider Zellfraktionen bezogen auf den Proteingehalt der Zellen.

2.3.1 Versuchsablauf

Die Zellen werden zu Beginn des Versuches für 10 min präinkubiert. Die Präinkubation diente der Absättigung der Zellen mit einem Chemosensitizer. Zu dem Zeitpunkt $t = 0$ ist den verschiedenen Zellsuspensionen Daunorubicin in vorgeschriebener Konzentration zugesetzt worden. Inkubiert wurden die Zellen nun 60 min bei 37°C im Wärmeschrank. 5 min vor Ende der Inkubationszeit ist die Suspension in die zuvor mit 200 μl Trichloressigsäure und 400 μl Silikonöl beschickten Reaktionsgefäße pipettiert worden. Diese waren in einem Wärmeblock auf 37°C vortemperiert, damit die Versuchstemperatur weiterhin konstant gehalten werden

kann. Die Versuchszeit endete mit der Zentrifugation für 4 min bei 16.000 g. Diese Zentrifugation bewirkt, daß die Zellen aus der Suspension herausgeschleudert werden und durch die Silikonölschicht hindurch in die Trichloressigsäure (TCA) gelangen. In dieser Phase gehen die säurelöslichen Bestandteile der Zelle in der TCA in Lösung. Der verbliebene Überstand über dem Silikonöl enthält jetzt noch die nicht von den Zellen aufgenommene Transportsubstanz. Davon wird eine Probe entnommen und der restliche Überstand abgesaugt. Es beginnt nun die Präparation der unteren Phasen. Die Reaktionsgefäße werden in flüssigem Stickstoff solange abgekühlt, bis das TCA gefroren ist und die darüber befindliche Silikonölschicht gerade noch abgesaugt werden kann. Nach der Entfernung des Silikonöls wird eine Probe der TCA entnommen und der Rest der Säure ebenfalls abgesaugt. Zurück bleibt das Präzipitat am Boden. Dieses wird mit 1 ml 10% TCA gewaschen. In 200 µl 1 M NaOH wird das Präzipitat daraufhin innerhalb von 60 min bei 56°C im Wärmeblock gelöst und dann mit 200 µl 1 M HCl neutralisiert. Eine weitere Probe wird entnommen, wobei der Rest dieser Phase zur Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen aufbewahrt wird.

Versuchsablauf

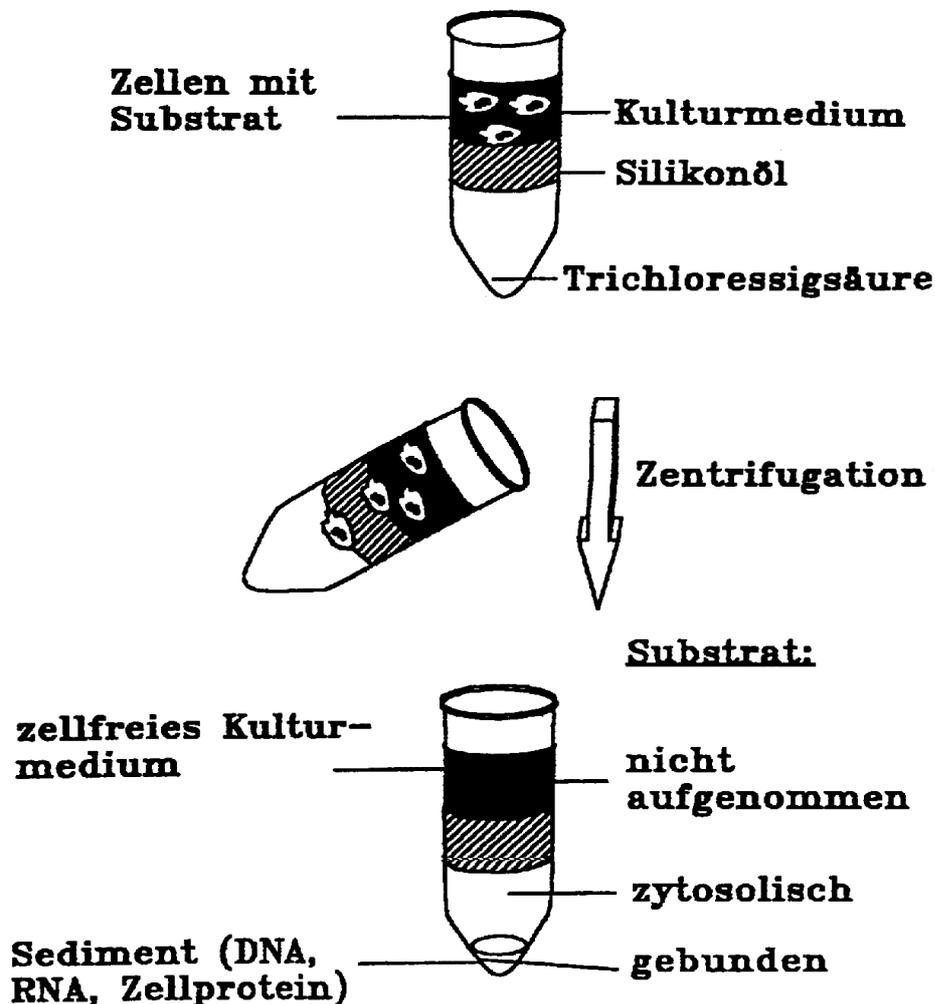


Abbildung 2.3-a: Diese Abbildung zeigt schematisch den Versuchsablauf der Silikonölfiltrationsmethode (Dörner 1996). Durch die Zentrifugation des Reaktionsgefäßes werden die Zellbestandteile in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Die Phasen in einem Reaktionsgefäß lassen sich folgenden Zellkompartimenten zuteilen:

- der Überstand → nicht aufgenommene Transportsubstanz im Medium
- die Trichloressigsäure → „zytosolische“ Phase der Zellen und darin befindliche Transportsubstanz
- das Sediment (Präzipitat) → Proteine, DNA und RNA, sowie daran „gebundene“ Transportsubstanz

2.3.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt jeder Probe wird bestimmt. Für diese Messung wird dem Rest des Präzipitates Bio-Rad-Reagenz zugesetzt. Dieses bildet mit Proteinen zusammen einen blauen Protein-Farbstoffkomplex mit einem Extinktionsmaximum zwischen 465 nm und 595 nm. Der Farbumschlag wurde bei 578 nm im Photometer gemessen und der Proteingehalt errechnet. Geeicht wurde diese Messung mit bovinem Serumprotein.

2.3.3 Volumenmessung

Zur Messung des Zellvolumens, zeitlich parallel zu der Transportmessung, wurde eine Anzahl von Zellen direkt in ihrem Nährmedium mit $^3\text{H}_2\text{O}$ und ^{14}C -Polyethylenglycol für 30 min inkubiert. Polyethylenglykol kann nicht in Zellen eindringen und verteilt sich ausschließlich extrazellulär, während das radioaktiv markierte $^3\text{H}_2\text{O}$ sich gleichmäßig im Intra- und Extrazellulärraum verteilt. Aus den gemessenen Differenzen der Verteilungsvolumina wird das Zellvolumen bestimmt. Die Reaktionsgefäße wurden hierfür mit 200 μl 2 M NaOH gefüllt, mit Silikonöl überschichtet und auf die Zellsuspension pipettiert. Die weiteren Versuchsschritte und die Präparation der Phasen erfolgte wie bereits oben beschrieben.

2.3.4 Einflußgrößen auf die Messungen und deren Kontrolle

Adhäsion der Chemikalien an Kunststoffe:

Anthrazykline: Einige der verwendeten Chemikalien haften an Kunststoff. In der Literatur ist diese Adhäsion für Anthrazykline bereits beschrieben worden (Ramu et al. 1989). Versuche zur Quantifizierung dieser Ungenauigkeiten sind bereits bei der Validierung dieser Meßmethode durchgeführt worden. Sie ergaben bei Daunorubicin eine Adhäsion von ca. 5% an allen benutzten Kunststoffen (Edens 1994).

Dexniguldipin (DNIG): Bei der Verwendung von Dexniguldipin sind besondere Versuchsbedingungen entwickelt und eingehalten worden. Die hohe Lipophilie der Substanz führt zu einer starken Adhäsion an Kunststoffen. Aus diesem Grunde wird mit dieser Substanz ausschließlich in Gläsern gearbeitet. Die verwandten Plastikpipettenspitzen wurden vor deren Benutzung in Dexniguldipin abgesättigt.

Zentrifugation:

Verteilung der Zellen: Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen wie beschrieben durch eine Silikonölschicht in die TCA zentrifugiert. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß bereits 20 Sekunden nach Erreichen der maximalen Zentrifugalgeschwindigkeit keine Zellen mehr im Medium oder im Silikonöl vorhanden waren (Neurath 1992).

Verteilungsungenauigkeiten des nicht akkumulierten Daunorubicins: Durch die Zentrifugation wird neben den Zellen auch ein Teil des Nährmediums (ca. 0,3-1 μ l) und folglich auch nicht aufgenommene Transportsubstanz durch das Silikonöl transportiert. Deshalb wurde zu dem ^3H -Daunorubicin zusätzlich auch mit ^{14}C -Inulin inkubiert, denn Inulin verteilt sich ausschließlich extrazellulär. Eine Messung der Inulinkonzentration innerhalb der TCA erlaubt somit eine Quantifizierung des mitgerissenen daunorubicinhaltigen Nährmediums. Die in der TCA befindliche Daunorubicinmenge wurde um diesen zusätzlichen Anteil in der Auswertung rechnerisch korrigiert.

2.3.5 Versuchsauswertung

Die Radioaktivität der markierten Stoffe in den einzelnen Proben wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Die Proben aller Phasen sowie der externe Standard werden direkt in einen mit Szintillationscocktail gefüllten Zählbehälter pipettiert. Die Szintillationsflüssigkeit bewirkt eine Umwandlung der radioaktiven Strahlung zu Lichtblitzen. Die radioaktiven Zerfälle innerhalb des Zählbehälters werden somit in Form von Lichtimpulsen meßbar und das Ergebnis für jede Probe über 10 min gemittelt. Die Lichtemissionen der Proben mit den unterschiedlichen radioaktiven Markierungen überlappen sich teilweise in ihren Wellenspektren. Diese Meßfehler werden automatisch berechnet und die Messungen entsprechend korrigiert. Durch mitgeführte Leercocktails wurde die natürliche radioaktive Hintergrundaktivität ermittelt und berücksichtigt.

2.4 Die Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um eine vor ca. 20 Jahren entwickelte Methode, mit deren Hilfe schnelle Messungen physikalischer Parameter an Partikeln oder Zellen innerhalb einer Suspension durchgeführt werden können (Givan 1992). Das Durchflußzytometer der Fa. Becton Dickinson, Niederlande, erlaubt die gleichzeitige Erfassung von insgesamt fünf verschiedenen Parametern pro Zelle bei bis zu 4000 Zellen in der Sekunde. Darüber hinaus bietet das verwendete Gerät die Möglichkeit, bestimmte Zellkollektive für eine Auswertung auszuwählen sowie nach unterschiedlichen Kriterien zu analysieren und zu vergleichen.

2.4.1 Eigenschaften des Meßgerätes

Physikalische Grundlagen der Durchflußzytometrie:

Als Ausgangslichtquelle des Durchflußzytometers dient in dem Gerät der Fa. Becton Dickinson (FACS) ein luftgekühlter Argonionenlaser mit der Wellenlänge von 488 nm. Ein großer Vorteil bei der Verwendung eines Lasers (Light Amplifikation by Stimulated Emission of Radiation) liegt in der Beschaffenheit seines Lichtes. Es ist monochromatisch, hat eine hohe Energiedichte, ist gerichtet und kohärent, d.h. gleichphasig und von einheitlicher Amplitude. Ein Laser hat als Lichtquelle den Nachteil, daß nur das Licht einer einzigen Wellenlänge ausgesendet wird. Somit müssen die Exzitationsspektren der benutzten fluoreszierenden Farbstoffe innerhalb dieser Wellenlänge liegen, um diese zum Leuchten anregen zu können. Als Fluoreszenz bezeichnet man eine fast gleichzeitig mit dem Ende der Bestrahlung erlöschende Emission von Licht nach Absorption einer meist energiereicheren bzw. kurzwelligeren Bestrahlung. Nach Anregung eines Elektrons, eines Atoms oder Moleküls springt dieses wieder rasch in seinen Ausgangszustand zurück. Hierbei kommt es zur Emission eines Photons bzw. Lichtquanten. Der Abstand zwischen der Anregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokes'scher shift bezeichnet. Er stellt eine physikalische Eigenschaft eines jeweiligen Stoffes dar. Unterschiedliche Farbstoffe mit unterschiedlich großem Stokes'schen shift bei gleichem Exzitationsspektrum machen es nun möglich z.B. in Verbindung mit verschiedenen Antikörpern mehrere Zelleigenschaften gleichzeitig zu untersuchen.

Der Lichtstrahl des Lasers ist in dem Durchflußzytometer über ein optisches Linsensystem auf eine Meßzelle gerichtet. Durch diese fließen die einzelnen Zellen in laminarer Strömung. Die Bestrahlung läßt die Zellen entsprechend ihrer morphologischen Eigenschaften, ihrer Beladung mit fluoreszierenden Antikörpern und ihrer Aufnahme bestimmter Stoffe Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Dieses in Richtung oder Wellenlänge veränderte Licht wird durch verschiedene Farbfilter und mehrere Spiegel auf für die Lichtwellenlänge spezifische Zählkammern gelenkt und dort registriert.

Die möglichen zu untersuchenden Parameter während einer Messung sind:

1. Relative Größe der Zelle
2. Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle
- 3.-5. verschiedene Fluoreszenzintensitäten z.B. durch Beladung der Zellen mit Anthrazyklinen oder Bindung fluoreszierender Antikörper an die Zelle

Das Gerät ist in drei verschiedene Bauteile gegliedert:

- Flüssigkeitssystem
- Optisches System
- Signalverarbeitung

In den folgenden Abschnitten wird der Aufbau eines Durchflußzytometers beschrieben.

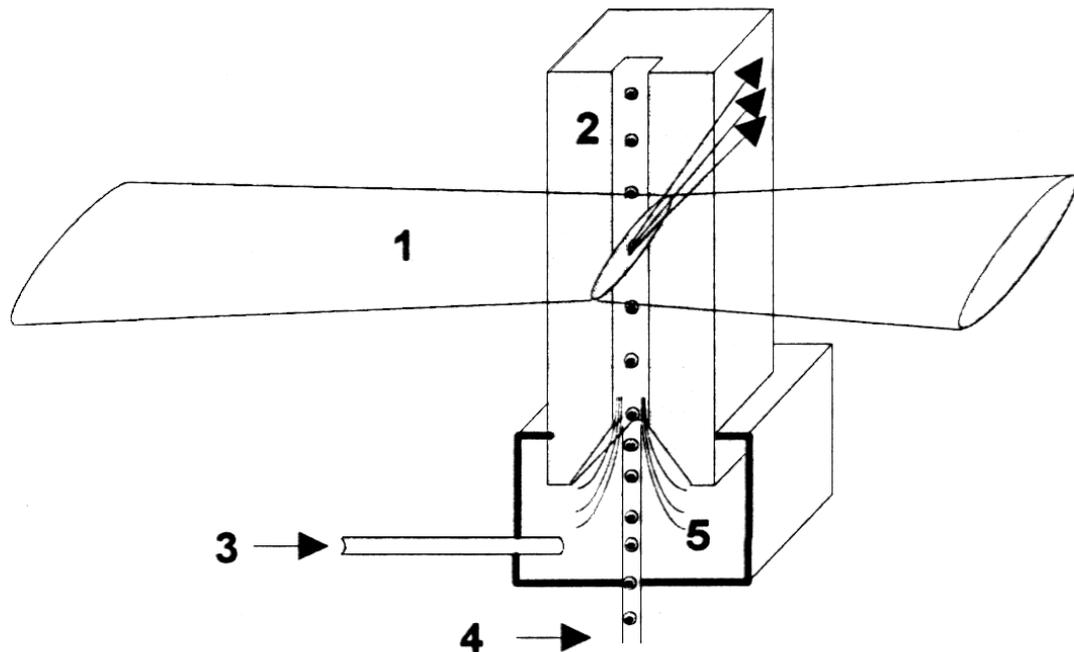
Das Flüssigkeitssystem eines Durchflußzytometers:

Abbildung 2.4-a: 1. Laserstrahl, 2. Meßküvette, 3. Trägerflüssigkeit, 4. Zellsuspension, 5. hydrodynamische Fokussierung (nach Raffael 1994).

Vereinfacht besteht das Flüssigkeitssystem aus zwei Leitungen (Abbildung 2.4-a). Über eine Zuleitung drückt eine Pumpe kontinuierlich eine „Trägerflüssigkeit“ durch die Meßkammer und weiter in den Abfallbehälter. Eine zweite Leitung dient dem Transport der Zellen vom Probenröhrchen zur Meßkammer, in der sich beide Leitungen vereinen. Hier wird die Zellsuspension von der durch die Küvette strömenden Trägerflüssigkeit erfaßt und mitgerissen. Durch die Verengung des Probenstroms zum Zentrum der Küvette hin erfährt die Suspension eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern in der Sekunde auf etwa sieben Meter pro Sekunde (ca. 25 km/h). Diesen Vorgang bezeichnet man als „hydrodynamische Fokussierung“. Er gewährleistet, daß die Zellen einzeln nacheinander den Meßpunkt und somit den Laser passieren.

Das optische System eines Durchflußzytometers:

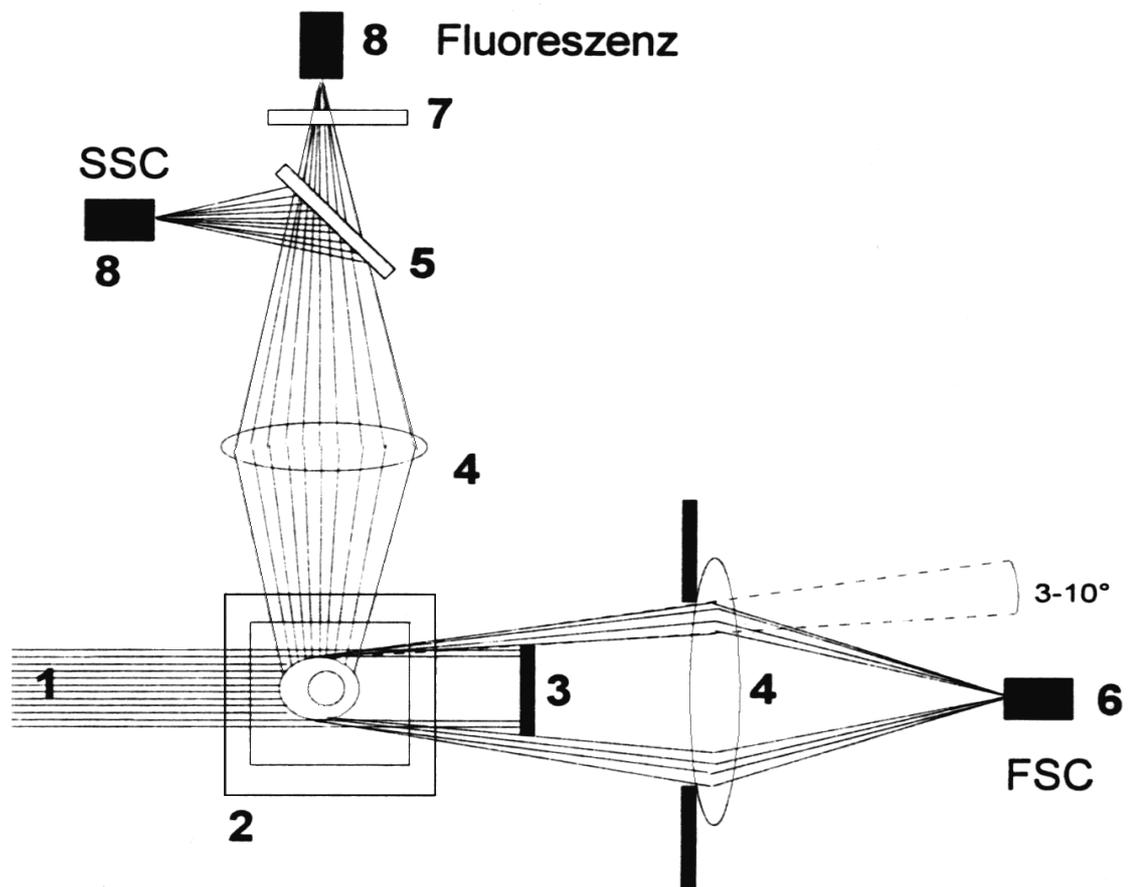


Abbildung 2.4-b: Anordnung der optischen Elemente zur Messung von Fluoreszenz und Streulicht. 1. Laserstrahl, 2. Quarzglasküvette, 3. Blockerstreifen, 4. Sammellinse, 5. Teilerspiegel, 6. Photodiode, 7. Lichtfilter, 8. Photomultiplier (nach Raffael 1994).

Das optische System (Abbildung 2.4-b) gliedert sich in einen Anregungs- und einen Detektionsteil.

Anregungsteil:

Der Anregungsteil dient der horizontalen elliptischen Strahlformung des Lichtes und stellt einen Kompromiß dar zwischen einer hohen räumlichen Auflösung (kleiner Strahl zur Unterscheidung nah aufeinanderfolgender Zellen) und einer ausreichenden Signalintensität (großer Strahl).

Detektionsteil:

Der Detektionsteil besteht aus zwei Baugruppen:

1. Bereich zur Messung des *Vorwärtsstreulichtes* (FSC) in axialer Lichtrichtung; Dieses gibt Auskunft über die Größe der Zelle.
2. Bereich zur Messung des *Seitwärtsstreulichtes* (SSC) orthogonal zum Lichtstrahl; Es gibt Informationen über die Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen und wird auf die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (FL1-3) hin analysiert.

Die Signalverarbeitung eines Durchflußzytometers:

Photodetektoren konvertieren die optischen Lichtimpulse des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes in elektrische Impulse um. Die Amplitude dieser elektrischen Impulse korreliert mit der Intensität der Lichtimpulse. Die elektrischen Impulse gleicher Größe werden durch einen Analog-Digital-Wandler einer bestimmten Kanal- bzw. Klassenzahl zugeordnet. Ein Durchflußzytometer besitzt je nach Auflösungsvermögen 0-255 bzw. 0-1023 verschiedene Kanäle.

Die somit erfaßten Rohdaten werden mit Hilfe eines Computers in einer Listendatei gespeichert. Hierbei werden die Meßwerte der einzelnen Zellen in der gleichen Reihenfolge gespeichert in der die Zellen den Analysepunkt passiert haben.

Eine solche Listendatei ist hier für 4 gemessene Zellen dargestellt:

1. Zelle					2. Zelle					3. Zelle					4. Zelle				
FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
80	43	55	320	9	75	42	10	480	1	12	40	12	5	10	91	80	10	30	2

Diese Form der Speicherung der Rohdaten ermöglicht es, einmal durchgeführte Messungen zu einem späteren Zeitpunkt oder nach neuen Kriterien wieder neu auszuwerten.

2.4.2 Versuchsablauf

Die Zellen für die Messung mit der Durchflußzytometrie wurden zeitgleich mit den Zellen für die Silikonölfiltrationsmethode mit einem Chemosensitizer präinkubiert. Erst unmittelbar vor Zugabe des Zytostatikums wurden die Zellen für die weitere Analyse aufgeteilt. Die separate Inkubation wurde durchgeführt, damit keinerlei Radioaktivität, die bei der Silikonölfiltrationsmethode erforderlich ist, bei der Messung in das Durchflußzytometer gelangt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Daunorubicintransport der Zellen durch Zugabe von 4°C PBS gestoppt und die Zellsuspension dann bei 900g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die Zellen sammeln sich durch diesen Vorgang am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach dem Abkippen des Überstandes wurden die Zellen wieder mit frischem Medium aufverdünnt und bis zur anschließenden Messung in einem Eisgefäß gekühlt.

Messung der Zellen mit dem Durchflußzytometer:

Die Ergebnisse wurden nach der Messung der Fluoreszenzintensität der Zellen durch den FACS mit dem Programm Lysis II (beides Fa. Becton Dickinson) ausgewertet.

Zellen haben unterschiedliche morphologische Eigenschaften. Die Einstellung des Durchflußzytometers muß der unterschiedlichen Größe und Granularität der Zellen angepaßt werden. Die Auflösung des Durchflußzytometers läßt sich aus diesem Grunde in verschiedene Bereiche digitalisiert verschieben. Die Einstellung beginnt mit der Zweiparameterdarstellung Größe (FSC) zu Granularität (SSC) der Zellen. In Abbildung 2.4-c, einem der Zellmorphologie angepaßten Konturliniendiagramm, sind Isoamplituden von Zellenmengen mit gleichen Eigenschaften wiedergegeben. Diese Darstellung ermöglicht eine quantitative Abschätzung der Zellen.

Konturliniendiagramm am Beispiel der resistenten T-Zell-Leukämiezelle CCRF CEM DAC:

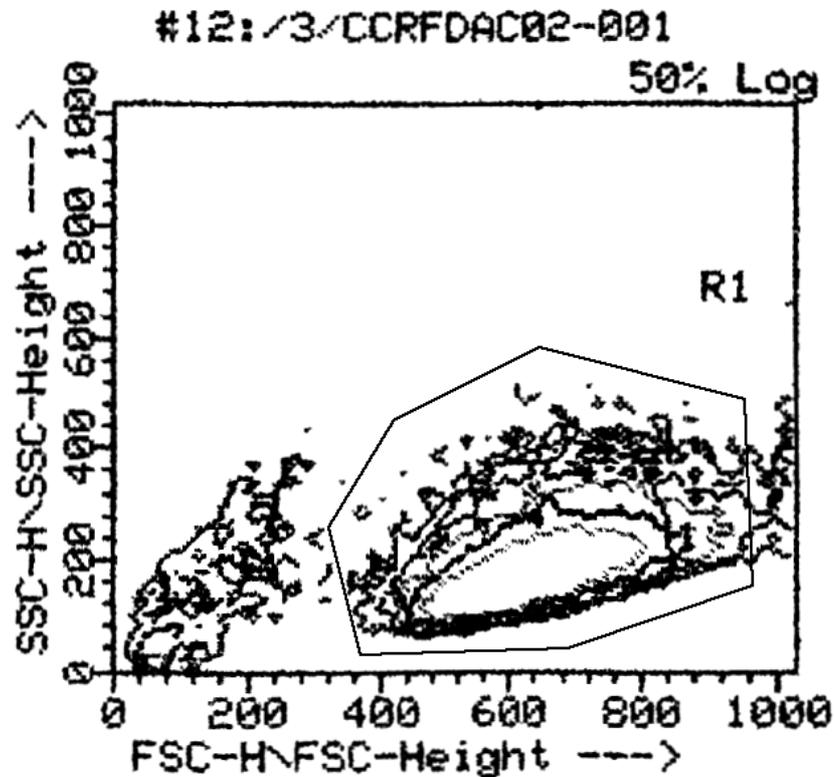


Abbildung 2.4-c: Originalprotokoll: Die Abbildung zeigt die Messungen der CCRF CEM DAC Zellen in einem Konturliniendiagramm. Die Abszisse zeigt die Größe der Zellen (FSC), die Ordinate die Granularität der Zellen (SSC), angegeben in willkürlichen Einheiten. R1 bezeichnet einen ausgewählten Bereich (Gate), in dem sich die vitalen Zellen für die weitere Auswertung befinden.

Durch das Setzen eines Auswertefensters (Gate) werden die zu messenden Zellen von Aggregaten, Zelltrümmern und anderen Zellarten abgegrenzt. Die Überprüfung der richtigen Auswahl der Zellen fand mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumjodid statt. Propidiumjodid penetriert nicht durch intakte Zellmembranen und kann sich nur bei Zellen mit defekter Zellmembran an die DNA im Zellkern anlagern. Durch Einrahmen der nicht fluoreszierenden Zellen lassen sich so die vitalen Zellen von den toten Zellen abgrenzen. Bei der weiteren Auswertung werden nur noch die ausgewählten vitalen Zellen berücksichtigt.

Messung der Fluoreszenz mit dem FACS:

Daunorubicin verhält sich wie ein fluoreszierender Farbstoff. Das Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ liegt sehr nahe an dem Licht des Lasers mit 488 nm. Chaires et al. ermittelten 1982 das Emissionsmaximum von Daunorubicin mit $\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$.

Das von Daunorubicin emittierte Licht kann in dem Fluoreszenz-Band-Paß-Filter FL2 mit dem Bereich von 560 nm bis 640 nm (rotes Licht) gemessen werden.

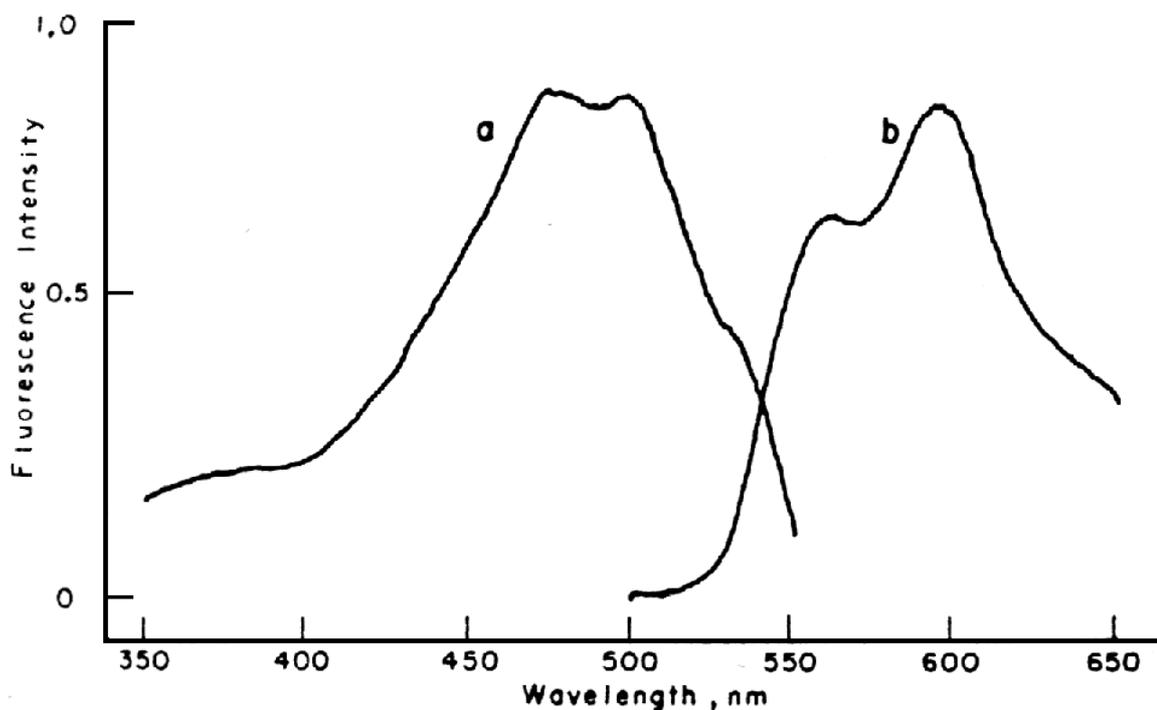


Abbildung 2.4-d: Dargestellt ist in a) die Fluoreszenzexcitation und in b) die -emission von Daunorubicin bei verschiedenen Wellenlängen; modifiziert nach Chaires et al. 1982

Wie die Größe und Granularität der Zellen muß auch die Eigenfluoreszenz der Zellen kompensiert werden. Hierzu wird das von den Zellen emittierte Licht in der Histogrammdarstellung in einen Bereich von 0 bis 10 willkürlichen Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Der errechnete „Mean-Channel“ als Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz wird als Leerwert angenommen. Die Meßergebnisse werden ebenfalls in Form von Histogrammen angegeben und der „Mean-Channel“ berechnet. Das Endergebnis der Durchflußzytometrie als „korrigierter Mean-Channel“ oder als um den Leerwert korrigierte mittlere Fluoreszenzintensität errechnet sich dann als Versuchswert subtrahiert um den Leerwert.

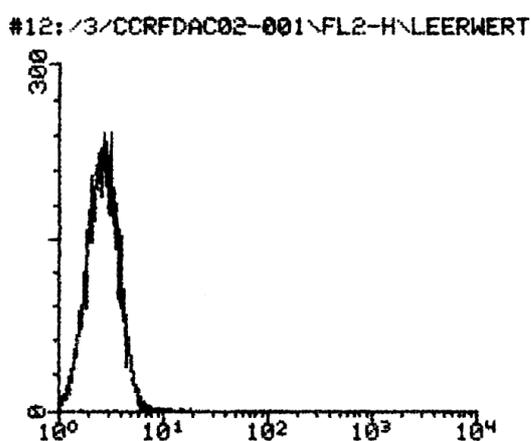


Abbildung 2.4-e: Originalprotokoll: Zeigt ein Histogramm zur Berechnung der Eigenfluoreszenz der resistenten T-Zell-Leukämie-Zellen CCRF CEM DAC.

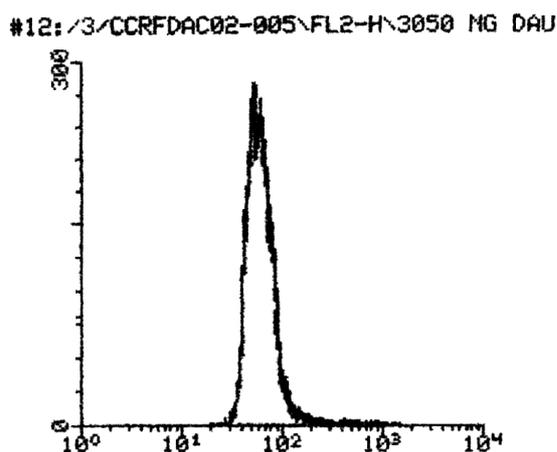


Abbildung 2.4-f: Originalprotokoll: Zeigt ein Histogramm zur Berechnung der Anthrazyklinaufnahme in die resistenten T-Zell-Leukämie-Zellen CCRF CEM DAC nach Inkubation mit einer Daunorubicinkonzentration von 3050 µg/l.

Abszisse: Kanäle des Durchflußzytometers, entspricht den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten; Ordinate: Anzahl der Zellen mit der gleichen Fluoreszenz.

2.5 Darstellung der Ergebnisse

Um eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu erreichen, sind mehrere Darstellungsformen erarbeitet worden.

- Regressionsanalyse: Die Regressionsanalyse wurde in Form von Diagrammen durchgeführt. Auf der Ordinate befinden sich die Ergebnisse der Silikonölfiltrationsmethode in Bezug zu der auf der Abszisse befindlichen korrigierten mittleren Fluoreszenzintensität des Durchflußzytometers. Die Meßpunkte in diesen Diagrammen wurden durch eine Regressionsgerade gemittelt. Die Steigung der Gerade sowie ihr Korrelationskoeffizient wurden berechnet und für verschiedene Meßbedingungen verglichen.
- Relativitätsbezüge (Ratios): Die Anthrazyklinaufnahme der Zellen zwischen den einzelnen Versuchen unterliegt experimentellen und biologischen Schwankungen. Um diese auszugleichen, wurde eine relative Ergebnisgröße eingeführt. Die Anthrazyklinaufnahme der sensitiven Zellen ohne Zusatz von Chemosensitizer wurde mit 100% angenommen. Die Daunorubicinaufnahme der resistenten Zellen mit und ohne Chemosensitizer sowie die der sensitiven Zellen mit Chemosensitizer wurden hierzu in Bezug gesetzt. Durch diese prozentuale Darstellungsform ist es möglich, die Anthrazyklinakkumulation der Durchflußzytometrie und des Transportassays direkt miteinander zu vergleichen.

2.6 Statistische Methoden

Als statistische Methoden wurden folgende Berechnungen angewendet.

- Arithmetisches Mittel: Die Ergebnisse der Silikonölfiltrationsmethode wurden in Dreifachmessung durchgeführt. Versuchsbedingte Abweichungen sind durch das arithmetische Mittel dieser drei Punkte minimalisiert worden. Zur weiteren Berechnung in dem Vergleich ist nur noch der errechnete Mittelwert der Meßergebnisse berücksichtigt worden.
- Mean-Channel: Bezeichnet den errechneten Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensitäten einer gemessenen Population. Dieser Wert wird durch das Auswertungsprogramm Lysis II des Durchflußzytometers direkt angegeben.
- Lineare Regression: Die Steigung der Regressionsgeraden wurde durch das von C.F. Gauss erarbeitete Ausgleichsprinzip in der Form $y = mx + b$ angegeben.

- Korrelationskoeffizient r^2 : Dieses Bestimmtheitsmaß beschreibt die Übereinstimmung der durch die lineare Regression errechneten Geraden mit den tatsächlichen Meßpunkten. Es kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Bei $r^2 = 1$ gilt eine völlige Korrelation der berechneten Werte mit den Tatsächlichen, während r^2 nahe null nur einen sehr schwachen oder keinen Zusammenhang der Regressionsgeraden mit den Meßpunkten anzeigt (Bronstein, Semendjajew 1989).

2.7 Verwendete Materialien

- **Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland:** RPMI 1640 Medium, L-Glutamin 200 mM / 100%, Penicillin-Streptomycin-Lösung (5000 IU/ml Penicillin, 5000 UG/ml Streptomycin)
- **Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland:** MEM-alpha-Medium (Eagle's minimal essential medium)
- **Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland:** Leibowitz-15-Medium, fetales Kälberserum
- **Fa. Sigma, München, Deutschland:** Transferrin, MEM-Vitaminmischung, NaHCO₃
- **Fa. MSD Sharp & Dohme, München, Deutschland:** Actinomycin D
- **Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland:** Trypan Blau
- **Fa. E. Merck, Darmstadt, Deutschland:** Dimethylsulfoxid reinst (DMSO), C₂H₆OS
- **Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland:** Hanks-Salz-Lösung
- **Fa. Dupont-NEN, Dreieich, Deutschland:** ³H-Daunorubicin (118,4 GBq/mmol, [G]), ¹⁴C-Inulin (0,093 GBq/g, [U]), ³H₂O (37 Mbq/g)
- **Fa. Amersham-Bucheler Braunschweig, Deutschland:** 1,2-¹⁴C-Polyethylenglykol 4000 (2,22 GBq/mmol),(PEG)
- **Fa. Famitalia Carlo Erba GmbH, Freiburg, Deutschland:** Daunorubicin
- **Dr. K. H. Sanders, Fa. Byk Gulden Chemische Fabrik, Konstanz, Deutschland:** Dexamethason (DNIG)
- **Dr. Ryffel, Fa. Sandoz, Basel, Schweiz:** Cyclosporin A (Ciclosporin)
- **Fa. Wacker-Chemie GmbH, München, Deutschland:** Silikonöl, AR 200 und AR 20 Salben
- **Fa. Packard, Frankfurt, Deutschland:** Ultima-Gold-Cocktail
- **Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland:** Phosphat Buffer Saline (PBS)
- **Fa. Bio-Rad, München, Deutschland:** Bio-Rad-Reagenz, Coomassie-Brillant-Blau-Reagenz G-250
- **Fa. Packard, Frankfurt, Deutschland:** Szintillationszähler, Tri Carb 2000 CA,
- **Fa. Becton Dickinson, Evenbodegem-Aalst,Belgien:** FACS

3 Ergebnisse

Gemessen wurde die Anthrazyklinakkumulation in vier verschiedenen Zelllinien und deren resistenten Subklonen in Abhängigkeit von der extrazellulär eingestellten Daunorubicinkonzentration.

Der Transportassay und die Durchflußzytometrie wurden im Hinblick auf den Nachweis von intrazellulären Anthrazyklinen gegenübergestellt. Bevor jedoch die beiden Meßmethoden miteinander verglichen werden können, ist es wichtig, für beide Meßmethoden die Linearität der Meßergebnisse als Grundvoraussetzung festzustellen. Diese Untersuchungen sind für alle Zelllinien durchgeführt worden. Die Versuche wurden bei vier verschiedenen Daunorubicinkonzentrationen zwischen 0,286 $\mu\text{mol/l}$ (150 $\mu\text{g/l}$) und 5,784 $\mu\text{mol/l}$ (3050 $\mu\text{g/l}$) durchgeführt. Für die quantitative Gegenüberstellung der Ergebnisse der Durchflußzytometrie mit dem Transportassay wurden die Meßergebnisse bei der mittleren Daunorubicinkonzentration von 1,991 $\mu\text{mol/l}$ (1050 $\mu\text{g/l}$) betrachtet. Die resistenten sowie die sensitiven Zellen sind jeweils mit und ohne den Zusatz eines Chemosensitizer gemessen worden. Die Chemosensitizer wurden in Konzentrationen eingesetzt, von denen eine vollständige Aufhebung der durch P-Gp vermittelten Resistenz bei F4-6RADR-Zellen bekannt ist. Beschrieben wurde eine Anhebung der Sensitivität zu 100% auf das Niveau der sensitiven Zellen F4-6 bei Konzentrationen von 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Dexniguldipin und 10 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin (Reymann et al. 1996).

Alle Versuche finden als Dreifachbestimmung statt und sind durch einen weiteren Versuch mit gleichem Protokoll bestätigt worden.

3.1 Linearität

Die Durchflußzytometrie und auch der radioaktiv markierte Transportassay produzieren beide lineare Meßergebnisse (Abb. 3.1-a bis Abb. 3.1-h).

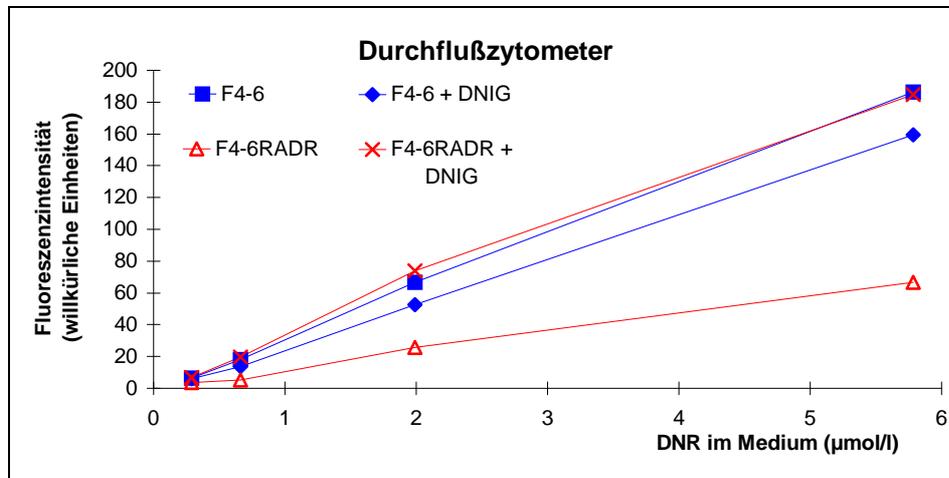
In beiden Meßmethoden wird nachgewiesen, daß steigende extrazelluläre Daunorubicinkonzentrationen im Medium im Bereich von 0,286 - 5,784 $\mu\text{mol/l}$ zu einem linearen Anstieg des Daunorubicingehaltes in den sensitiven wie auch in den resistenten Zellen führt. Exemplarisch werden hier die Meßergebnisse der murinen Erythroleukämie-Zelllinie F4-6 und ihres resistenten Subklons F4-6RADR gezeigt, jeweils mit und ohne 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Dexniguldipin inkubiert. Die weiteren Meßergebnisse der anderen Versuchsreihen befinden sich im Anhang (Grafik 9.1-a bis 9.6-g).

Ergebnisse, die durch den einfachen Vergleich der Daunorubicinaufnahme in die Zellen deutlich geworden sind:

- Sensitive und resistente Zellen zeigen einen linearen Anstieg der Daunorubicinaufnahme in Abhängigkeit von der Daunorubicinaußenkonzentration.
- Resistente Zellen nehmen unter Kontrollbedingungen weniger Daunorubicin auf als sensitive Zellen.
- Bei den sensitiven F4-6-Zellen kommt es nach Zugabe von Dexniguldipin zu keiner signifikanten Änderung der Daunorubicinaufnahme.
- Nach Präinkubation der resistenten Zellen F4-6RADR mit 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Dexniguldipin ist eine signifikante Erhöhung der Anthrazyklinaufnahme in diesen Zellen nachweisbar. Sie akkumulieren dann entsprechend viel Daunorubicin wie die sensitiven F4-6 Zellen.
- Bei Behandlung der Zellen mit Ciclosporin kommt es bei den sensitiven wie auch bei den resistenten Zellklonen zu einer höheren Daunorubicinakkumulation als bei den sensitiven Zellen ohne Chemosensitizer. Dieser Effekt der höheren intrazellulären Akkumulation durch Ciclosporin ist besonders deutlich in der gebundenen Fraktion nachweisbar.

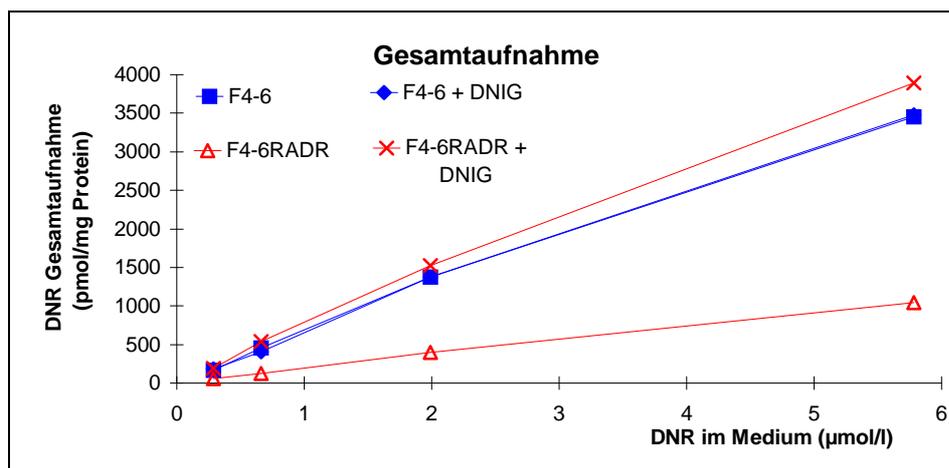
3.1.1 Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Dexniguldipin

Durchflußzytometrie



Grafik 3.1-a: Meßergebnisse der Durchflußzytometrie. Dargestellt ist die Anthrazyklinaufnahme der sensitiven Zelllinie F4-6 und seines resistenten Subklons F4-6RADR mit und ohne 3,3 µmol/l Dexniguldipin (DNIG). Im Diagramm sind die Fluoreszenzintensitäten in willkürlichen Einheiten in Bezug zur extrazellulär steigenden Daunorubicinkonzentration angegeben.

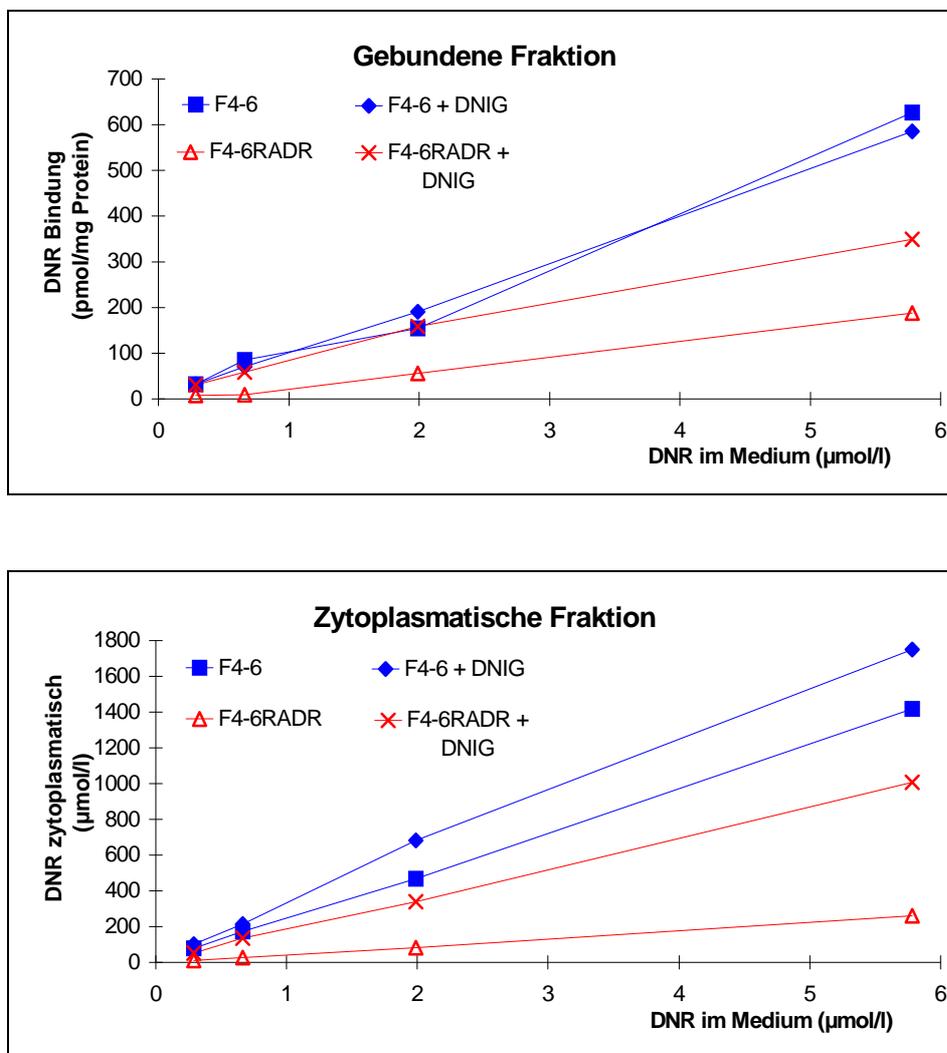
Transportassay



Grafik 3.1-b: Meßergebnisse des Transportassays. Gezeigt ist die Anthrazyklingsamtaufnahme der F4-6 Zelllinie und seines resistenten Subklons F4-6RADR mit und ohne 3,3 µmol/l Dexniguldipin (DNIG) bei steigender extrazellulären Daunorubicinkonzentration. Die Gesamtaufnahme an Daunorubicin ist bezogen auf den Proteingehalt der Zellen in pmol/mg Protein.

Der Transportassay ermöglicht eine Aufschlüsselung der intrazellulären Anthrazyklinakkumulation in eine gebundene und zytosolische Zellfraktion.

Transportassay

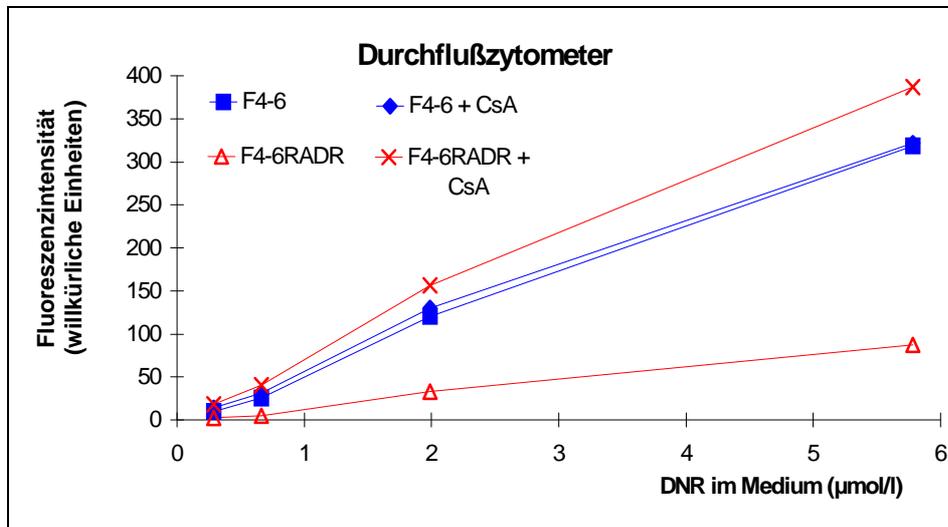


Grafik 3.1-c und Grafik 3.1-d: Gebundene und zytoplasmatische Anthrazyklinaufnahme der resistenten F4-6RADR und der sensitiven Zelllinie F4-6 mit und ohne 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Dexniguldipin (DNIG) in Abhängigkeit von der extrazellulären Daunorubicinkonzentration.

Die Addition des Daunorubicingehaltes der gebundenen und zytosolischen Fraktion ergibt die Daunorubicinesamtaufnahme der Zellen (Grafik 3.1-b). Diese Aufschlüsselung der Daunorubicinakkumulation in verschiedenen Zellfraktionen ist mit der Durchflußzytometrie nicht möglich.

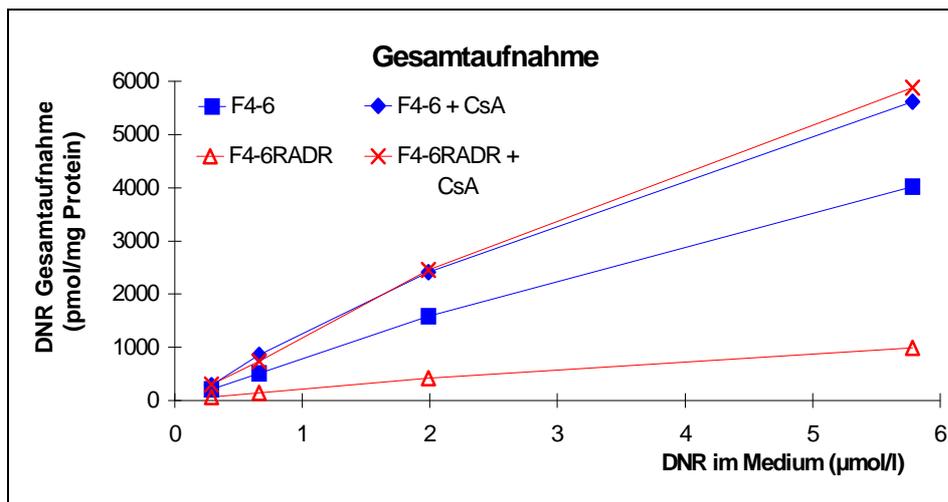
3.1.2 Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Ciclosporin

Durchflußzytometrie



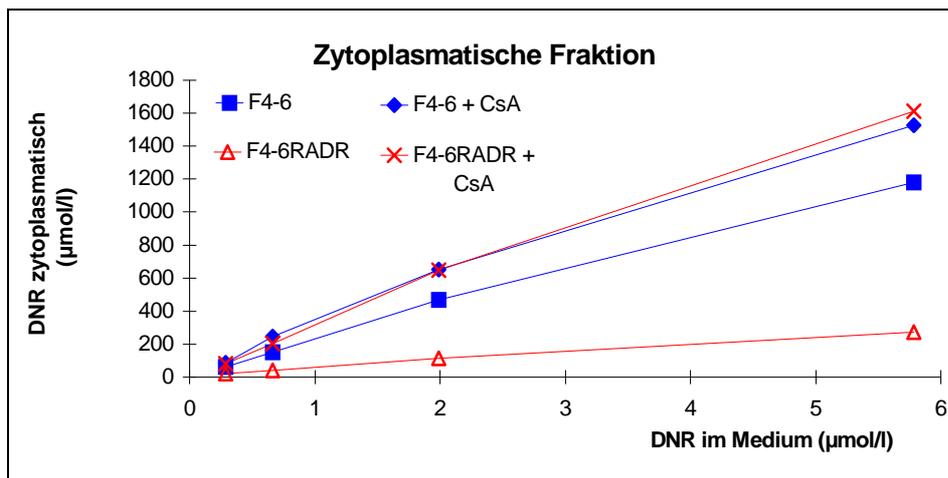
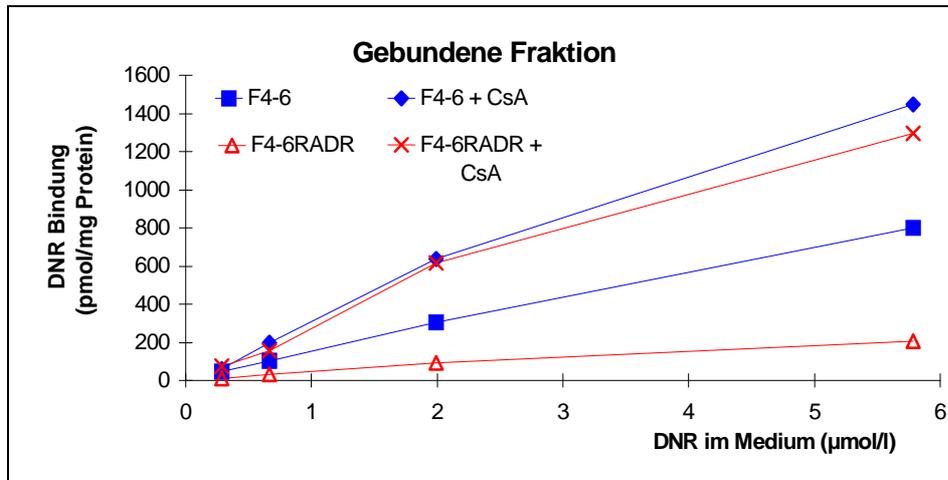
Grafik 3.1-e: Anthrazyklinaufnahme der sensitiven Zelllinie F4-6 und seines resistenten Subklons F4-6RADR mit und ohne 10 µmol/l Ciclosporin (CsA) bei steigender extrazellulärer Daunorubicinkonzentration. Gemessen wurde die relative Fluoreszenzintensität der Zellen in willkürlichen Einheiten.

Transportassay



Grafik 3.1-f: Anthrazyklingsamtaufnahme der sensitiven Zelllinie F4-6 und seines resistenten Subklons F4-6RADR mit und ohne 10 µmol/l Ciclosporin (CsA) bei steigendem extrazellulärem Daunorubicinangebot. Die Gesamtaufnahme ist bezogen auf den zellulären Proteingehalt angegeben in pmol/mg Protein.

Transportassay



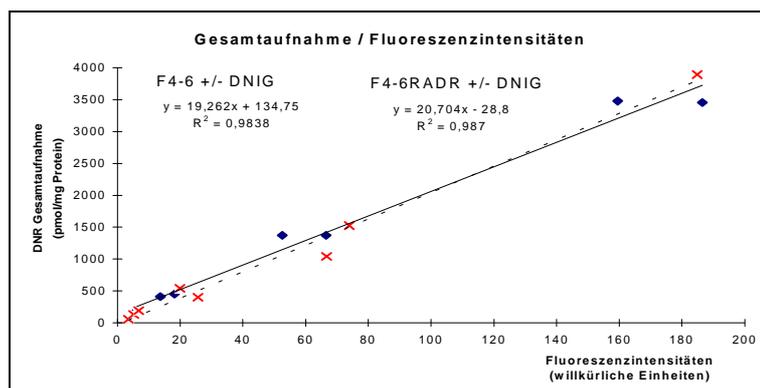
Grafik 3.1-g und Grafik 3.1-h: Anthrazyklinbindung und zytoplasmatische Akkumulation der resistenten F4-6RADR und der sensitiven F4-6 Zelllinie an Zellproteine mit und ohne 10 µmol/l Ciclosporin bei steigender Konzentration der extrazellulären Daunorubicinkonzentration. Ein zur Aufhebung der Resistenz zusätzlich Daunorubicin akkumulierender Effekt des Ciclosporin in den sensitiven und resistenten Zellen ist in der gebundenen Fraktion zu erkennen (Zunahme der Daunorubicinaufnahme in weiteren Versuchen um durchschnittlich 28% bestätigt).

3.1.3 Korrelation der Gesamtaufnahme

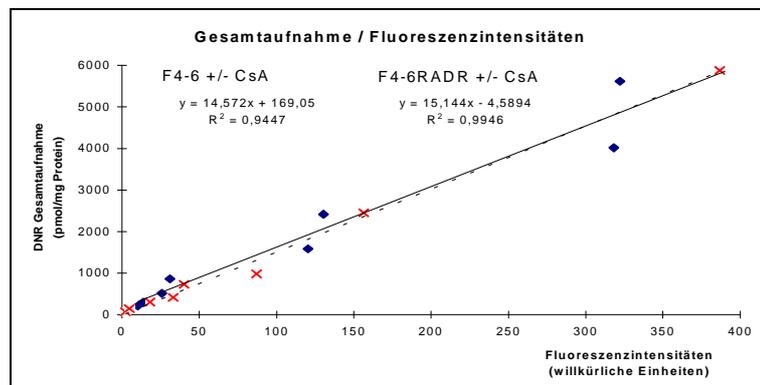
In einem weiteren Schritt ist die Korrelation der Meßergebnisse des Transportassays mit denen der Durchflußzytometrie untersucht worden.

Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde mit der Gesamtaufnahme der Daunorubicinakkumulation korreliert dargestellt. Wenn die beiden Korrelationsgeraden, die die gemittelten Geraden der Meßergebnisse darstellen, übereinander liegen, so besteht für beide Versuchsmethoden die gleiche Sensitivität für die Erkennung intrazellulär akkumulierten Daunorubicins. Bei zunehmender Differenz der Steigungen der Geraden überwiegt jeweils die Sensitivität der Meßmethode, deren Meßachse der Korrelationsgerade am nächsten ist. Bei der Gesamtaufnahme der F4-6-Zellen sind die jeweiligen Korrelationsgeraden fast deckungsgleich. Die beiden Meßmethoden korrelieren bei diesen Zellen gut miteinander.

F4-6, F4-6RADR +/- Dexniguldipin



F4-6, F4-6RADR +/- Ciclosporin



Grafik 3.1-i und 3.1-j: Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die F4-6 (♦) und F4-6RADR (×) mit und ohne Dexniguldipin bzw. Ciclosporin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

3.2 Zelluläre Daunorubicinakkumulation

In der Tabelle 3.2-a werden die Ratios aus der Durchflußzytometrie mit denen der Daunorubicingesamtaufnahme des Transportassays verglichen. Hierzu sind die Quotienten der Resultate berechnet worden. Als Basis ist die Anthrazyklinaufnahme der jeweiligen sensiblen Zelllinie als 1 gesetzt worden, und die Aufnahme an Daunorubicin der anderen Zellen der gleichen Linie ist im Verhältnis dazu angegeben.

Kleinere Unterschiede der Grafiken (Grafik 3-1a bis 3.1-j und Anhang Grafik 9.1-a bis 9.1-g) zu den angegebenen Ratios in der Tabelle 3.2-a beruhen auf der unterschiedlichen Fallzahl der Proben. Während die Grafiken jeweils die Ergebnisse eines unmittelbar vergleichbaren Versuchstages (n=3) darstellen, sind in den Tabellen die Befunde aller Versuche mit gleichen Versuchsbedingungen (n=6) zusammenfassend aufgeführt.

Daunorubicingesamtakkumulation

	Sensitive Zellen						Resistente Zellen							
	Durchflußzytometrie			Transportassay			Durchflußzytometrie				Transportassay			
	Fluoreszenz Ratio (n = 2)	Stabw	Versuch / Kontrolle	Gesamt- aufnahme Ratio (n = 6)	Stabw	Versuch / Kontrolle	Fluoreszenz Ratio (n = 2)	Stabw	Versuch / Kontrolle	Versuch / Sensitive Zellen	Gesamt- aufnahme Ratio (n = 6)	Stabw	Versuch / Kontrolle	Versuch / Sensitive Zellen
F4-6														
Kontrolle	1,00			1,00			0,25	0,10		-75%	0,32	0,05		-68%
DNIG	0,78	0,01	-22%	1,02	0,02	+2%	1,07	0,06	+328%	+37%	1,62	0,72	+406%	+59%
CsA	1,28	0,28	+28%	1,59	0,08	+59%	1,50	0,28	+500%	+17%	1,88	0,47	+488%	+18%
CCRF CEM														
Kontrolle	1,00			1,00			0,18	0,05		-82%	0,27	0,05		-73%
DNIG	1,08	0,33	+8%	1,25	0,02	+25%	0,79	0,45	+339%	-27%	1,01	0,12	+274%	-19%
CsA	1,15	0,06	+15%	1,16	0,24	+16%	1,34	0,45	+644%	+17%	1,70	0,63	+530%	+47%
EPP85-181														
Kontrolle	1,00			1,00			0,11	0,05		-89%	0,14	0,03		-86%
DNIG	0,72	0,03	-28%	0,89	0,12	-11%	0,37	0,13	+236%	-49%	0,41	0,08	+193%	-54%
EPG85-257														
Kontrolle	1,00			1,00			0,29	0,03		-71%	0,31	0,11		-69%
DNIG	0,90	0,08	-10%	0,94	0,01	-6%	0,47	0,04	+62%	-48%	0,57	0,16	+84%	-39%

Tabelle 3.2-a: Zusammenfassung sämtlicher Versuchsergebnisse zur Daunorubicingesamtaufnahme, angegeben als Ratios. Als Basis der jeweiligen Quotienten sind die sensitiven Zellen (Kontrolle) gleich 1 gesetzt. In „Versuch / Kontrolle“ sind die prozentualen Änderungen der Akkumulation mit Chemosensitizer im Vergleich zur parenteralen Zelle angegeben. „Versuch / sensitive Zellen“ stellt bei gleichen Versuchsbedingungen die prozentualen Änderungen der Akkumulation der resistenten zu den sensitiven Zellen dar.

Extrazelluläre Konzentration: * 1,991 µmol/l Daunorubicin, ** 5,784 µmol/l Daunorubicin. Daten aus n = 6 Messungen aus zwei Versuchstagen.

3.2.1 Murine Erythroleukämie-Zellen

F4-6, F4-6RADR

- Durch die Inkubation der sensitiven F4-6 mit Dexniguldipin scheinen die Zellen im Transportassay (Transport) nicht ihrer Empfindlichkeit gesteigert (Transport +2%) zu werden. In der Durchflußzytometrie (FACS) scheinen die Zellen sogar in ihrer Aufnahme behindert zu werden (FACS -22%).
- Nach einer Inkubation mit Ciclosporin akkumulieren die sensiblen Zellen F4-6 jedoch in der Durchflußzytometrie und im Transportassay (FACS +28%, Transport +59%) mehr Daunorubicin als unter Kontrollbedingungen.
- Der resistente Klon F4-6RADR verliert bei beiden Methoden nach Inkubation der Zellen mit einem Chemosensitizer seine Resistenz vollständig. Die Akkumulation liegt über dem Niveau der ebenso behandelten sensitiven Zellen (DNIG: Durchflußzytometer +37%, Transport +59%; CsA: Durchflußzytometer +17%, Transport +19%).
- Die F4-6RADR-Zellen inkubiert mit Dexniguldipin oder Ciclosporin nehmen nach Auswertung beider Meßmethoden ein Vielfaches an Daunorubicin gegenüber den unbehandelten F4-6RADR-Zellen auf. Mit dem Durchflußzytometer ist eine erhöhte Daunorubicinaufnahme durch Dexniguldipin um +328% und durch Ciclosporin um +500% zu verzeichnen. Im Transportassay bewirkt Dexniguldipin eine Anthrazyklinakkumulation von +406% und Ciclosporin eine von +488% mehr als die unbehandelten resistenten Zellen.

3.2.2 Humane T-Zell-Leukämie-Zellen

CCRF CEM, CCRF CEM DAC

- In der Durchflußzytometrie und auch im Transportassay akkumulieren die sensiblen CCRF CEM-Zellen nach einer Inkubation mit Dexniguldipin (FACS +8%, Transport +25%) oder Ciclosporin (FACS +15%, Transport +16%) mehr Daunorubicin als unter Kontrollbedingungen.
- Der resistente Klon CCRF CEM DAC akkumuliert in beiden Methoden in Anwesenheit von Dexniguldipin mehr als +270% und von Ciclosporin mehr als +500% mehr als ohne Chemosensitizer.
- Dexniguldipin führt anders als in F4-6RADR-Zellen nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Resistenzmechanismen der resistenten CCRF CEM DAC-Zellen. Die

Akkumulation bleibt unterhalb des Niveaus der mit Dexniguldipin behandelten sensitiven Zellen (FACS -27%, Transport -19%).

- Ciclosporin bewirkt im Gegensatz zu Dexniguldipin auch bei den resistenten CCRF CEM DAC-Zellen eine Anhebung der Daunorubicinaufnahme in die Zellen über das Niveau der mit Ciclosporin behandelten sensiblen Zellen hinaus (FACS +17%, Transport +47%).

3.2.3 Humane Pankreaskarzinom-Zellen

EPP85-181P, EPP85-181RDB

- In der Durchflußzytometrie und auch im Transportassay akkumulieren die sensiblen EPP85-181P-Zellen nach einer Inkubation mit Dexniguldipin weniger Daunorubicin als ohne die Behandlung mit einem Chemosensitizer (FACS -28%, Transport -11%).
- Der resistente Klon EPP85-181RDB wird durch Dexniguldipin in beiden Methoden um mehr als +190% in seiner Daunorubicinaufnahme gegenüber den unbehandelten resistenten Zellen gesteigert.
- Dexniguldipin führt jedoch nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Resistenzmechanismen der resistenten EPP85-181RDB-Zellen, sondern nur zu einer teilweisen Annäherung an das Akkumulationsniveau der mit Dexniguldipin behandelten sensitiven Zellen (FACS -49%, Transport -54%).

3.2.4 Humane Magenkarzinom-Zellen

EPG85-257P, EPG85-257DAU

- Die sensiblen EPG85-257P-Zellen akkumulieren nach einer Inkubation mit Dexniguldipin möglicherweise weniger Daunorubicin als ohne Behandlung mit einem Chemosensitizer (FACS -10%, Transport -6%).
- Der resistente Klon EPG85-257DAU wird durch Dexniguldipin in beiden Methoden jedoch um mehr als +60% in seiner Daunorubicinaufnahme gegenüber den unbehandelten resistenten Zellen gesteigert (FACS +62%, Transport +84%).
- Dexniguldipin führt auch hier nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Resistenzmechanismen der resistenten EPG85-257DAU-Zellen, sondern nur zu einer teilweisen Annäherung an das Sensitivitätsniveau der mit Dexniguldipin behandelten sensitiven Zellen (FACS -48%, Transport -39%).

3.3 Meßergebnisse nach Inkubation mit Dexniguldipin oder Ciclosporin

Sowohl der Transportassay als auch die Durchflußzytometrie messen, wie in 3.1-a bis 3.1-j beschrieben, lineare Zusammenhänge der intrazellulären Daunorubicinkonzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Daunorubicinkonzentration. Trotz dieser Linearität sind Meßunterschiede beider Methoden beim Vergleich von Zellen, die mit Chemosensitizer inkubiert wurden, gegenüber der Kontrollgruppe vorhanden.

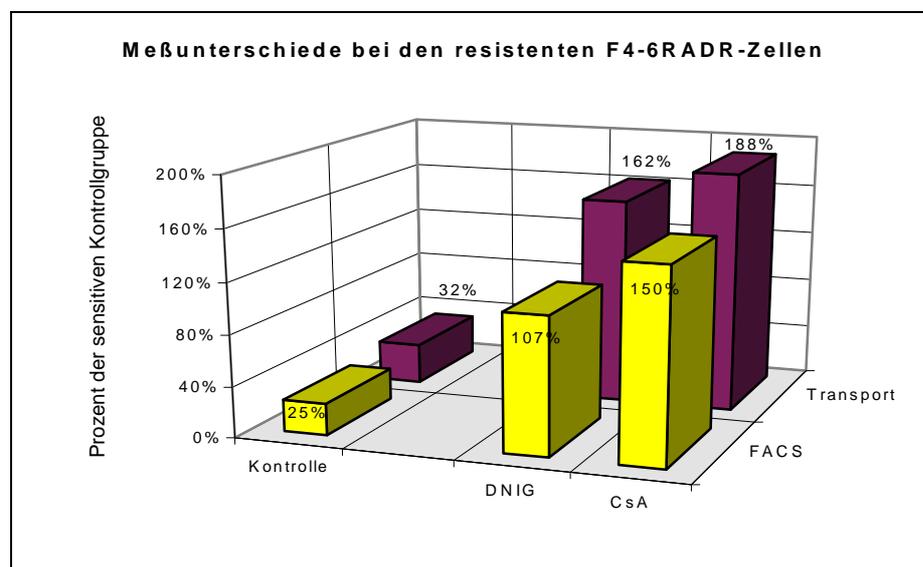
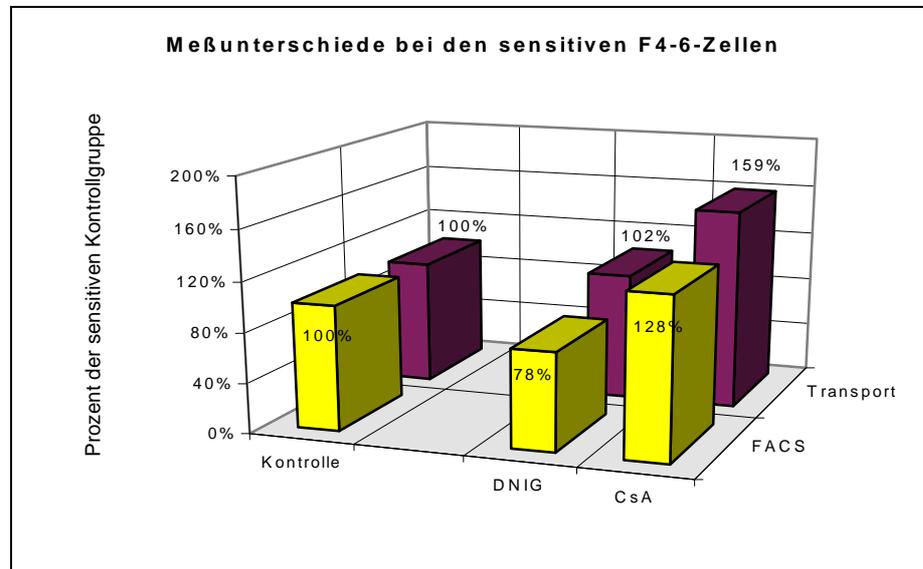
Bei den sensitiven F4-6-Zellen ergaben die Untersuchungen (Grafik 3.3-a):

- Das Durchflußzytometer analysiert eine Minderakkumulation der F4-6-Zellen nach der Inkubation mit Dexniguldipin unter das Niveau der nicht behandelten sensitiven Zellen. Da dieses im Transportassay nicht zu bestätigen war, muß eine direkte Minderung der Daunorubicinfluoreszenz durch Dexniguldipin in Betracht gezogen werden.
- Nach Inkubation der sensitiven Zellen mit Ciclosporin verzeichnen sowohl die Durchflußzytometrie als auch der Transportassay eine intrazelluläre Akkumulation von Daunorubicin über das Niveau der nicht behandelten sensitiven Zellen hinaus. Die Akkumulation liegt höher als nach Inkubation der Zellen mit Dexniguldipin.
- Bei den sensitiven F4-6-Zellen beschreibt das Durchflußzytometer gegenüber dem Transportassay eine Minderakkumulation nach Inkubation mit Dexniguldipin bzw. Ciclosporin von mehr als 19%.

Ähnlich wie bei den sensitiven F4-6-Zellen unterscheiden sich auch die Ergebnisse bei den resistenten F4-6RADR-Zellen (Grafik 3.3-a). Am deutlichsten wird diese Diskrepanz der Meßergebnisse zwischen der Durchflußzytometrie und dem Transportassay bei den resistenten F4-6RADR-Zellen nach Inkubation mit Dexniguldipin.

- Während mit der Durchflußzytometrie bei diesen Zellen nur eine Daunorubicinakkumulation auf 107% der Aufnahme sensitiver Zellen gefunden wird, beschreibt der Transportassay eine Akkumulation auf 162% der gleichbehandelten sensitiven Zellen. Das ist ein Meßunterschied von mehr als 50%.
- Wie auch schon bei den sensitiven Zellen festzustellen war, verzeichnen sowohl die Durchflußzytometrie als auch der Transportassay nach Inkubation der Zellen mit CsA eine intrazelluläre Akkumulation von Daunorubicin über das Niveau der nicht behandelten sensitiven Zellen hinaus.

Gezeigt werden hier die Meßergebnisse der sensitiven F4-6 und der resistenten F4-6RADR-Zellen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit sind die Resultate in Prozent nach Inkubation der Zellen mit 1,991 µmol/l Daunorubicin angegeben.



Grafik 3.3-a und 3.3-b: Diese Abbildungen zeigen die Meßergebnisse der sensitiven F4-6 und resistenten F4-6RADR-Zellen jeweils mit Dexniguldipin (DNIG) oder Ciclosporin (CsA) im Vergleich zu nicht inkubierten Kontrollgruppen. Die extrazelluläre Daunorubicinkonzentration beträgt 1,991 µmol/l. Als 100% wurde die Daunorubicinakkumulation der nicht behandelten sensitiven Zellen gesetzt. Die Kontrollgruppen sind die jeweils nicht mit Chemosensitizer behandelten sensitiven bzw. resistenten Zellen.

Bei dem Vergleich der Daunorubicinakkumulationsratios aller Zelllinien nach Zugabe von Ciclosporin oder Dexniguldipin ist in der Tabelle 3.2-a zu sehen:

- Die Durchflußzytometrie ermittelt bei den sensitiven und resistenten Zellen aller Zellreihen in Anwesenheit eines Chemosensitizers eine geringere Daunorubicinakkumulation als der Transportassay. Nach Zugabe eines Chemosensitizers zu den Zellen beträgt bei den F4-6-Zellen mit Dexniguldipin die gemessene Minderakkumulation bis zu 22% gegenüber den nicht mit Dexniguldipin behandelten Zellen. Im Transportassay ist diese verminderte Daunorubicinaufnahme nicht zu verifizieren. Diese Ergebnisse weisen auf einen systematischen Meßfehler der Durchflußzytometrie nach Inkubation von Zellen mit Dexniguldipin bzw. Ciclosporin hin.

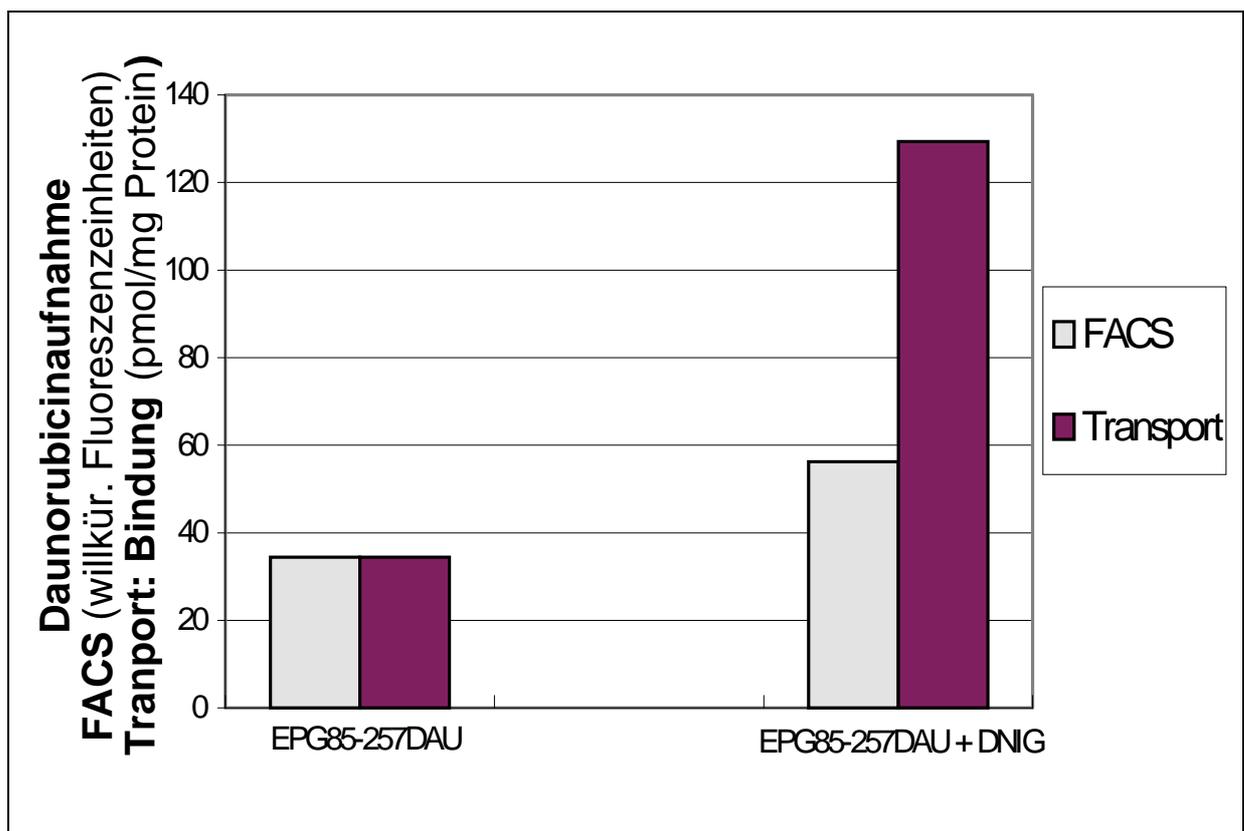
3.4 Meßunterschiede bei vesikelbildenden Zellen

Die bisherigen Ergebnisse betrachteten jeweils die Gesamtaufnahme an Daunorubicin in die Zellen. Das besagt jedoch wenig über die wirksame Menge an Daunorubicin am Angriffsort des Chemotherapeutikums. Daunorubicin interkaliert in dem Zellkern mit der DNA und verursacht eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese. Die Menge des an DNA gebundenen Daunorubicins gibt somit Aufschluß über die eigentliche Sensitivität der Zelle. Daher wurde die gemessene Fluoreszenzintensität zusätzlich zu der Gesamtaufnahme noch jeweils mit der Daunorubicinakkumulation in der gebundenen und zytoplasmatischen Fraktion korreliert. Bei den F4-6, CCRF CEM und EPP85-181-Zellen konnte eine gute Korrelation der gebundenen Fraktion im Transportassay mit der in der Durchflußzytometrie ermittelten Gesamtaufnahme an Daunorubicin festgestellt werden. Die vollständigen Grafiken zur Daunorubicinakkumulation aller Zellreihen sowie die Korrelationen zwischen Transportassay und Durchflußzytometrie befinden sich im Anhang (Grafik 9.1-a bis 9.6-g).

Gezeigt werden hier Ergebnisse der resistenten Magenkarzinom-Zellen EPG85-257DAU, bei denen keine gute Korrelation der durchflußzytometrischen Meßergebnisse mit der gebundenen Fraktion des Transportassays gefunden werden konnte. Die Zelleigenschaften dieser Zellen unterscheiden sich von den Eigenschaften der anderen gemessenen Zellen. Die resistenten

Magenkarzinom-Zellen EPG85-257DAU bilden bei Belastung mit Zytostatika Vesikel, in denen z.B. das Daunorubicin akkumuliert und aus der Zelle transportiert wird.

Bei gleichen Ausgangswerten nach Inkubation der Zellen mit Daunorubicin entsteht eine signifikante Diskrepanz der Meßergebnisse nach Inkubation der resistenten Zellen mit Dexniguldipin. Die Durchflußzytometrie mißt eine Zunahme der Daunorubicinakkumulation von 34% auf 56% des Niveaus der sensitiven Zellen. Der Transportassay ergibt hingegen in der gebundenen Fraktion der Zellen einen Anstieg der Daunorubicinaufnahme von 34% auf 129%. Dies bedeutet eine 2,3-fach geringere Sensitivität des Durchflußzytometers (FACS) bei Messung der Zellen nach Inkubation mit Dexniguldipin gegenüber dem Transportassay (Transport).

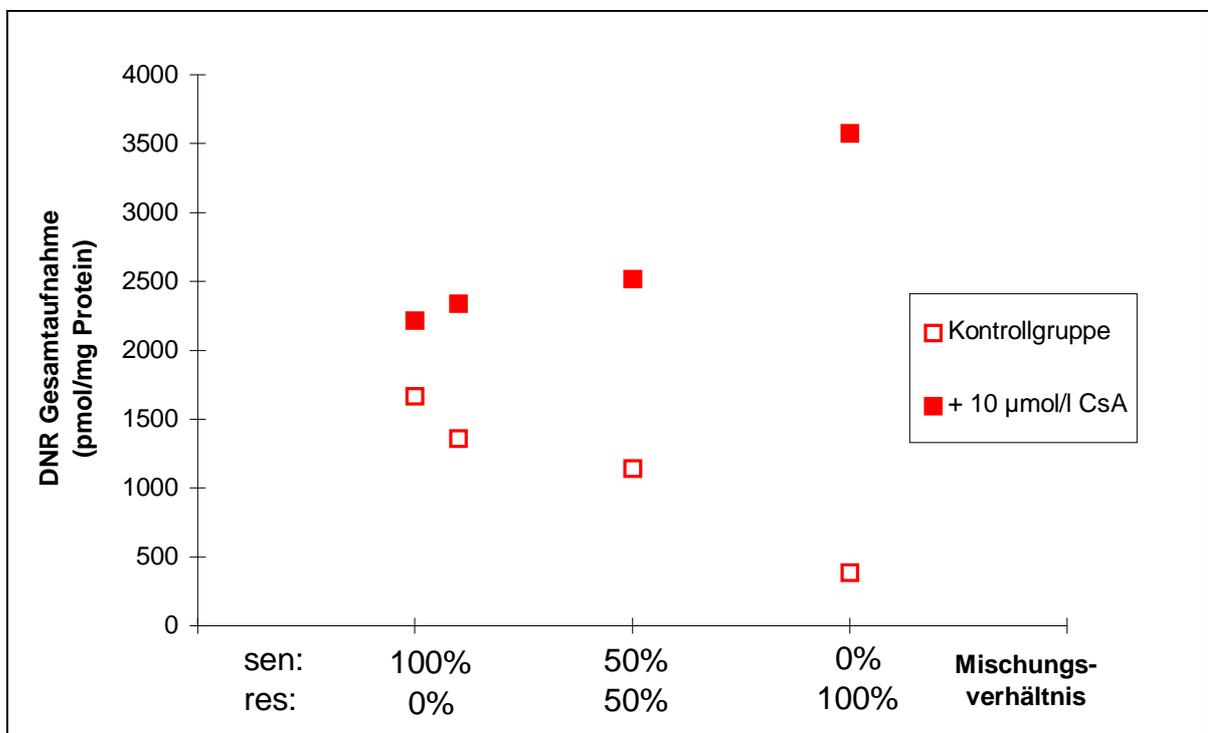


Graphik 3.4.1: Meßergebnisse des Durchflußzytometers (FACS) und der gebundenen Fraktion des Transportassays (Transport) bei den vesikelbildenden resistenten EPG85-257DAU-Zellen. Inkubiert wurde bei $1,991\mu\text{mol/l}$ Daunorubicin mit und ohne $3,3\mu\text{mol/l}$ Dexniguldipin (DNIG).

3.5 Messungen von Subpopulationen in der Zellkultur

Gewebe und auch Blut bestehen aus Zellen unterschiedlicher Populationen. Innerhalb dieser Gewebe ist zu Beginn einer Zellentartung nur ein geringer Prozentsatz der Zellen möglicherweise resistent gegen Chemotherapeutika. Eine Möglichkeit, diese in vivo vorkommenden Zellpopulationen in vitro zu simulieren, ist die Mischung von resistenten und sensitiven Zellen. Es wurde untersucht, wie der Transportassay und die Durchflußzytometrie diese zusammengesetzten Zellsuspensionen messen.

Transportassay

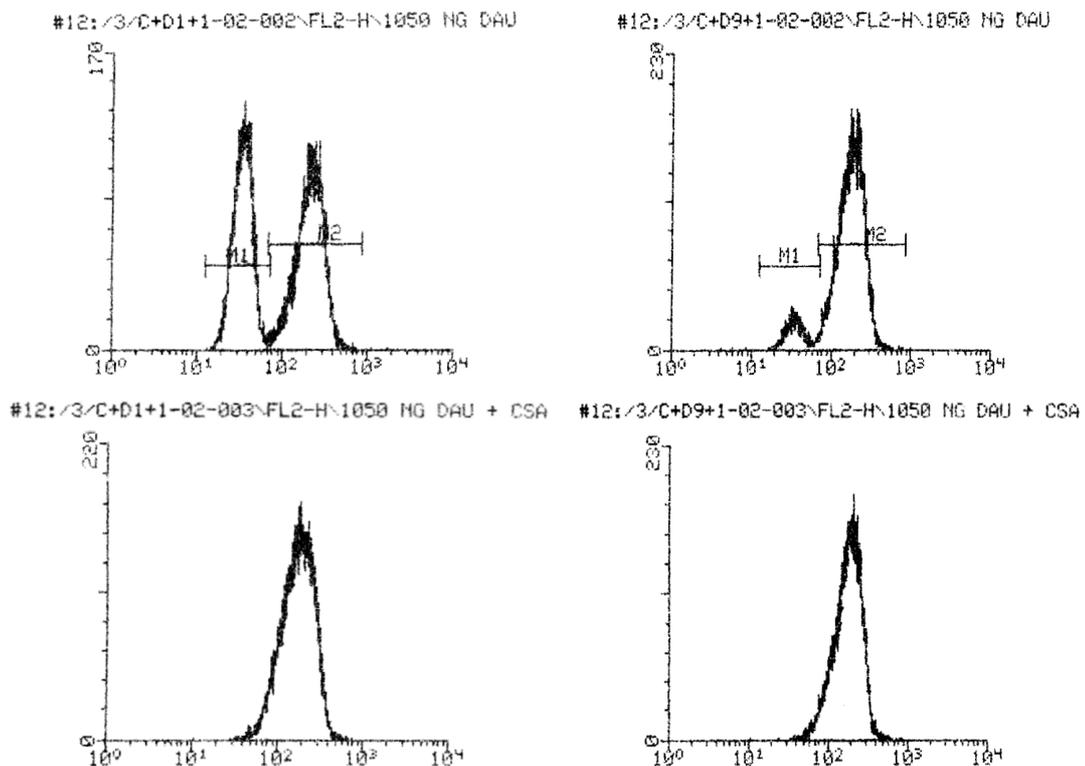


Grafik 3.5-a: Grafische Auswertung des Transportassays zur Analyse von gemischten Populationen. Gezeigt sind Ergebnisse des Transportassay bei Messungen verschiedener Gemische sensitiver (CCRF CEM) und resistenter Zellen (CCRF CEM DAC ; Anteil: 0%, 10%, 50%, 100%) unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und in Anwesenheit von Ciclosporin (CsA) 10 µmol/l (geschlossene Symbole). Mittelwert von $n=3$.

Der Transportassay ermöglicht bei Mischungen von Zellpopulationen nur eine relative und zudem nicht sehr genaue Analyse der Mischungsverhältnisse. Eine Abschätzung ist nur möglich, wenn zumindest die Daunorubicinakkumulation einer Zellreihe bekannt ist. Anhand der Gesamtaufnahme der Mischpopulation im Vergleich zu der Akkumulation bekannter Zellreihen kann eine Abschätzung probiert werden.

Das Durchflußzytometer mißt die Fluoreszenz des akkumulierten Daunorubicins jeder einzelnen Zelle. Diese Einzelergebnisse können dann in einem Diagramm wiedergegeben und auch als absolute oder prozentuale Zellzahl angegeben werden. Durch diese Methode kann eine Mischung von Zellen $> 1:100$ erkannt und dargestellt werden.

Durchflußzytometrie



Grafik 3.5-b:

Grafik 3.5-c:

Dargestellt sind Originalprotokolle von Messungen der Durchflußzytometrie. Gezeigt werden in Grafik 3.5-b Messungen von gemischten Zellpopulationen aus 50% sensitiven und 50% resistenten Zellen, in Grafik 3.5-c von 90% sensitiven und 10% resistenten Zellen. In den oberen Grafiken ist kein Chemosensitizer verwendet worden, in den unteren Grafiken wurde zusätzlich mit 10µmol/l CsA inkubiert.

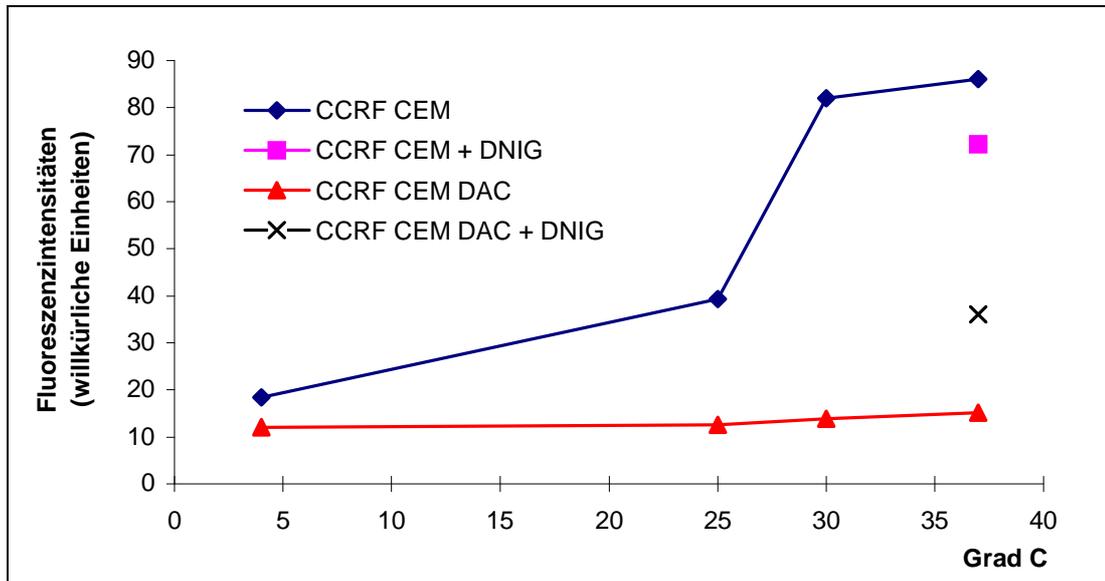
3.6 Meßunterschiede bei Temperaturveränderungen

Die Funktion des P-Glykoproteins als membranständige Effluxpumpe für Zellgifte ist abhängig von der Umgebungstemperatur. Das bedeutet, daß nach Inkubation von MDR-Zellen mit Daunorubicin, es durch Abkühlung der Zellen zu einer Mehranreicherung des Daunorubicins innerhalb der Zelle kommen wird.

Eine vermehrte Aufnahme in die resistenten Zellen ließ sich nur mit dem Transportassay nachweisen. Die Abnahme der Temperatur von 37°C auf 4°C führte zu einer Zunahme des Daunorubicin innerhalb der Zelle um 135%. Mit der Durchflußzytometrie konnte keine Zunahme der Akkumulation in der Zelle festgestellt werden. Statt dessen nahm die Fluoreszenzintensität bei den resistenten Zellen bei Abkühlung von 37° auf 4°C um 24% ab. Die temperaturbedingte Abnahme der Fluoreszenz überlagert also als physikalischer Effekt die eigentlich gegensinnig ansteigende Signalintensität der Daunorubicinakkumulation.

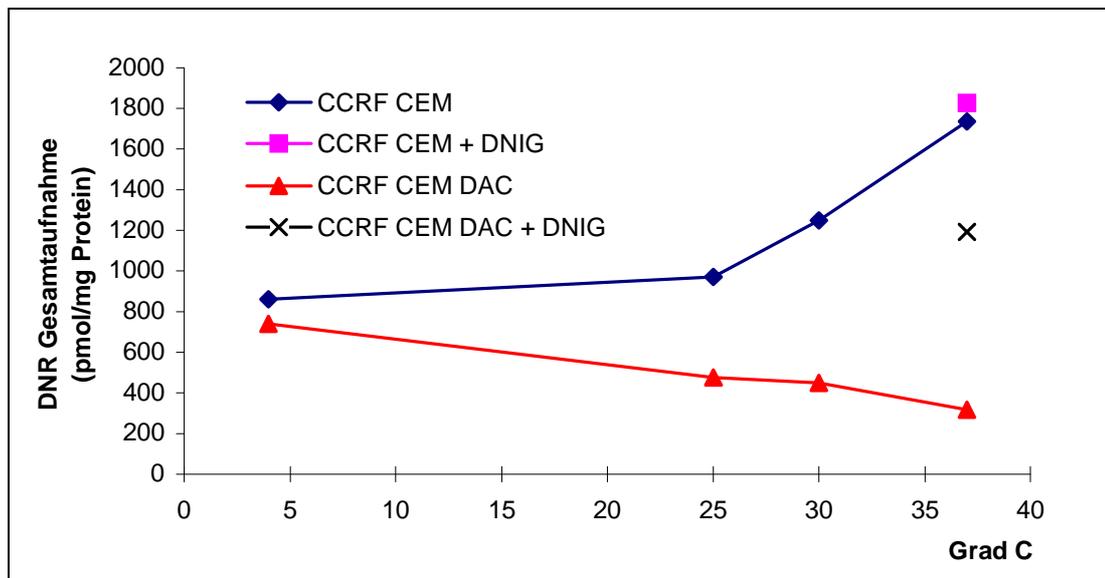
In den sensitiven Zellen ist in beiden Meßmethoden eine Abnahme der Daunorubicinaufnahme nachgewiesen. Jedoch ist auch hier die Verminderung des Signals in der Durchflußzytometrie mit Abnahme der Fluoreszenz um 79% deutlich stärker als beim Transportassay mit einer Abnahme des Daunorubicingehaltes um 50%.

Durchflußzytometrie



Grafik 3.6-a: Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation der Zellen mit 1,991 $\mu\text{mol/l}$ Daunorubicin bei unterschiedlichen Temperaturen.

Transportassay



Grafik 3.6-b: Gezeigt ist die Daunorubicingesamtaufnahme nach Inkubation der Zellen mit 1,991 $\mu\text{mol/l}$ Daunorubicin bei unterschiedlichen Temperaturen.

4 Diskussion

Funktionelle Assays bieten die genaueste und sensitivste Methode zur Bestimmung von transportassoziierten Chemotherapeutikaresistenzen in Zellsystemen (McGown et al. 1983). Durch sie ist eher eine Vorhersage klinischer Prognosen in der Tumorthherapie möglich, als durch die alleinige Expressionsanalyse beispielsweise des P-Glykoproteins (Guerci et al. 1995).

Diese Arbeit vergleicht die Ergebnisse zweier funktioneller Assays in der Tumorresistenzforschung. Analysiert wurde die Daunorubicinaufnahme in P-Glykoprotein-positiven Tumorzellen mit einer Silikonölfiltrations- und einer durchflußzytometrischen Meßmethode. Es stand die Daunorubicinaufnahme in vier verschiedene Zelllinien (F4-6, CCRF CEM, EPP85-181 und EPG85-257) mit unterschiedlicher Herkunft und teilweise unterschiedlichen Resistenzmechanismen zur Diskussion.

Das verwendete Durchflußzytometer (FACS) der Firma Becton Dickinson mißt die Fluoreszenzintensität von Stoffen, die mit einem Argonionenlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden können. Daunorubicin wird zur Fluoreszenz mit der Wellenlänge von 580 nm angeregt und ist im FACS semiquantitativ meßbar (Chaires 1982). Meßdaten zur Struktur und Funktion von Zellen werden gleichzeitig mit einer Messung registriert. Das Meßgerät ermöglicht die Erfassung gemischter Zellpopulationen in einem Meßvorgang und erlaubt bei der Auswertung durch ein „gating“ diese Populationen voneinander abzugrenzen. Gegenüber herkömmlichen Proliferationsassays wird, durch die geringe Anzahl von benötigten Zellen pro Meßvorgang, eine Unabhängigkeit des Meßzeitpunktes von der teilweise langwierigen Anzucht bis zur exponentiellen Vermehrung der Zellen in einer Kultur erreicht. Ein Nachteil der Durchflußzytometrie ist, daß nur fluoreszierende Stoffe gemessen werden können. Eine durchflußzytometrische Resistenzdiagnostik von Tumorzellen wird daher immer unvollständig bleiben. Auch läßt die Gesamtaufnahme von Chemotherapeutika in eine Zelle ohne genaue Kenntnis der jeweiligen Zelleigenschaften keine eindeutige Aussage über den intrazellulär wirksamen Anteil des Zellgiftes zu. Ein bisher nicht genau geklärtes Problem liegt in der Abschwächung der Fluoreszenzintensität von Stoffen, „Quenching“ (Unterdrückung) genannt, welches für Daunorubicin nach Bindung an DNA nachgewiesen wurde (McGown et al. 1983, Tarasiuk et al. 1989, Lankelma et al. 1991, Dordal et al. 1995).

Als Transportassay wurde eine Silikonölfiltrationsmethode gewählt. Diese quantitative Methode beruht auf der Messung einer radioaktiv markierten Transportsubstanz und kann

Transportvorgänge erfassen, die sich durch eine Verschiebung der Substanz in extra- und intrazelluläre Räume ergeben. Eine umfassende Resistenzdiagnostik von Tumorzellen ist durch den Einsatz der jeweiligen radioaktivmarkierten Transportsubstanz möglich. Intrazellulär aufgenommene Transportsubstanz, in den vorliegenden Versuchen ^3H -Daunorubicin, wird mit dieser Messung einer „zytosolischen“ und einer „gebundenen“ Fraktion in der Zelle zugeordnet. Als weitere Aufnahmegröße ergibt sich aus der Addition dieser beiden Fraktionen die Gesamtaufnahme von Daunorubicin in die Zelle. Als Nachteil bei dieser Methode sind die vielen Pipettierschritte und Zentrifugationen anzusehen, die einen hohen personellen und zeitlichen Aufwand bedeuten. Des weiteren wird eine relativ große Anzahl von Zellen (ca. 10^6 - 10^7 Zellen) für diese Methode benötigt. Dieses und der Umgang mit Radioaktivität macht den Einsatz der Silikonöfiltrationsmethode in der täglichen klinischen Routinediagnostik unwahrscheinlich.

Als Chemosensitizer zur Resistenzüberwindung der *mdr1*-Gen-positiven Zellen wurden Ciclosporin und Dexniguldipin verwandt. Dexniguldipin ist ein Kalziumkanalblocker mit einer höheren Potenz als das bereits klinisch verwendete Verapamil (Höllt et al. 1992). Ihm gegenüber besitzt das Dexniguldipin auch den Vorteil über die Zeit der direkten Präsenz im Medium hinaus das P-Glykoprotein längerfristig zu inhibieren (Roller et al. 1993). Dexniguldipin wird in Zukunft möglicherweise eine Alternative zu dem stark kardial wirkenden Verapamil darstellen (Hofmann et al. 1994). Bei *mdr1*-Gen-positiven Zellen korreliert die Resensibilisierung resistenter Zellen durch Dexniguldipin mit der meßbaren Expression des P-Glykoproteins auf der Zelloberfläche. Bei anderen Resistenzmechanismen, wie z.B. der Veränderungen der Topoisomerase-II-Aktivität in den Tumorzellen, zeigt sich durch Dexniguldipin keine Zunahme der Sensitivität resistenter Zellen (Hofmann et al. 1994). Der andere verwendete Chemosensitizer Ciclosporin ist ein Immunsuppressivum und befindet sich bereits in klinischer Erprobung zur Beeinflussung von Resistenzen in der Tumorthherapie (Sikic et al. 1991). Ciclosporin verändert die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Funktion der Zellmembran (Phillips et al. 1993). Neben einer den Auswärtstransport hemmenden Komponente hat Ciclosporin noch unspezifische, bindungssteigernde Effekte an sensitiven und resistenten Zellen. Diese führen zu einer vermehrten Akkumulation besonders in der gebundenen Fraktion des Silikonöfiltrationsassays (Dietel et al. 1994, Dörner 1996). Zusätzlich weist das Lösungsmittel für Ciclosporin (Tween) einen eigenständigen zellsensibilisierenden Effekt auf (Dörner 1996). Der genaue Mechanismus von Ciclosporin und

Dexniguldipin, der zur Aufhebung der Resistenz in Tumorzellen führt, ist nicht bekannt. Eine unterschiedliche Wirkungsweise beider Chemosensitizer in der Sensitivierung von P-Glykoprotein-positiven Zellen konnten Dietel et al. 1994 nachweisen. Sie beschreiben eine Resensibilisierung der gegen Adriamycin und Ciclosporin resistenten Zelllinie F4-6RADR-Ciclosporin, durch die Kalziumkanalblocker Verapamil und Dexniguldipin.

In unseren Untersuchungen kann die Wirkungsweise der beiden Medikamente folgendermaßen dargestellt werden.

Resistente Zellen inkubiert mit einem Chemosensitizer:

- Die CCRF CEM DAC-Zellen, bei denen neben der Expression des P-Gp auch eine verminderte Topoisomerase-II-Aktivität nachgewiesen ist (Kapaun 1994), werden durch Dexniguldipin nicht vollständig auf das Akkumulationsniveau der gleichbehandelten sensitiven Zellen gebracht (FACS -27%, Transportassay -19%).
- Ciclosporin bewirkt hingegen eine Daunorubicinaufnahme in die CCRF CEM DAC Zellen über das Niveau der ebenso behandelten sensitiven Zellen hinaus (FACS + 47%, Transportassay + 17%).
- Bei den F4-6RADR-Zellen ist, wie bei den CCRF CEM DAC-Zellen, die Akkumulation nach Inkubation mit Ciclosporin ebenfalls größer als nach Inkubation mit Dexniguldipin.
- In beiden verwendeten Untersuchungsmethoden konnte Dexniguldipin die Daunorubicinaufnahme der resistenten Zellen EPG85-257DAU und EPP85-181RDB nicht auf das Akkumulationsniveau der mit Dexniguldipin behandelten sensitiven Zellen erhöhen (EPP85-181RDB: FACS -49%, Transport -54%; EPG85-257DAU: FACS -48%, Transport -39%). Für die EPG85-257DAU-Zelllinie sind in der Literatur neben dem durch Dexniguldipin gehemmten P-Glykoprotein noch andere funktionelle Resistenzmechanismen beschrieben (Dietel et al. 1990, Seidel et al. 1995, Reymann et al. 1996), was die persistierende Minderakkumulation erklären kann. Wahrscheinlich verfügen auch die EPP85-181RDB ebenfalls über weitere Mechanismen, die zur Resistenzentwicklung der Zellen beitragen.

Sensitive Zellen inkubiert mit einem Chemosensitizer:

- Ciclosporin verursacht in den sensitiven F4-6- und den CCRF CEM-Zellen eine Daunorubicinaufnahme über das Niveau der Kontrollen hinaus (F4-6: FACS +28%, Transport +59%, CCRF CEM: FACS +15%, Transport +16%).
- Bei den sensitiven Zelllinien F4-6 mit Dexniguldipin ist im Durchflußzytometer ein vermindertes Fluoreszenzsignal gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen. Dieses Ergebnis konnte im Transportassay nicht bestätigt werden (FACS -22%, Transport +2%) und beruht also nicht auf einer Änderung der Daunorubicinakkumulation sondern eher auf einer durch Dexniguldipin induzierten Dämpfung des Fluoreszenzsignals.
- Die Inkubation der CCRF CEM Zellen mit Dexniguldipin führte zu einem überraschenden Ergebnis. Diese sensitiven Zellen mit Dexniguldipin akkumulieren mehr Daunorubicin als die sensitive Kontrollgruppe (FACS +8%, Transport +25%). Der mögliche Hintergrund dieser gesteigerten Aufnahme ist, daß die CCRF CEM Zellen als humane T-Zell-Leukämie eine um 40% höhere P-Gp-Expression besitzen als periphere Lymphozyten des Normalblutes (Kapaun 1994).
- Dexniguldipin bewirkt bei den sensitiven Zellen EPG85-257P und EPP85-181P eine nicht eindeutig zu erklärende Minderakkumulation von Daunorubicin in den Zellen (EPP85-181RDB: FACS -28%, Transport -11%; EPG85-257DAU: FACS -10%, Transport -6%).

Der Transportassay und das Durchflußzytometer messen eine lineare Zunahme der Daunorubicingesamtaufnahme in Abhängigkeit von der eingesetzten extrazellulären Anthrazyklinmenge. Die vorliegenden Ergebnisse der Gesamtaufnahme zeigen mit $r^2 = 0,983$ eine gute Korrelation beider Meßmethoden miteinander. Die gute Vergleichbarkeit der durchflußzytometrisch gemessenen Daunorubicinmenge mit quantitativen Analysen befindet sich somit im Einklang zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (McGown et al. 1983, Merlin et al. 1994). Dordal et al. zeigten 1995 eine Proportionalität der gemessenen Daunorubicinaufnahme im Vergleich einer Silikonölfiltrationsmethode mit einer durchflußzytometrischen Messung im Bereich von 4 bis 20 μM Daunorubicin. Unsere Untersuchungen zeigen schon ab der gemessenen Anfangskonzentration von 0,286 $\mu\text{mol/l}$ Daunorubicin eine gute Korrelation beider Meßmethoden.

Daunorubicin verteilt sich nach der Diffusion durch die Zellmembran in verschiedene Zellkompartimente, aus denen es zum Teil nicht mehr in Lösung gehen kann (Dordal 1995). Die Fluoreszenz betreffend lassen sich diese Zellkompartimente in einen Bereich mit Quenching und einen Bereich ohne Quenching unterteilen. Nur im Bereich ohne Quenching kann das Daunorubicin normal zur Fluoreszenz angeregt werden und ist somit uneingeschränkt meßbar. Im Quenching-Bereich kann das Daunorubicin nach Bindung an die DNA nicht mehr normal zur Fluoreszenz gebracht werden und wird von der Durchflußzytometrie nur noch stark reduziert gemessen (Lankelma 1991). Tarasiuk et al. zeigten 1989, daß von der Fluoreszenzintensität des Daunorubicins durch Titration mit DNA mehr als 97% der Fluoreszenz gequenchet werden können. McGown et al. beschreiben 1983 eine gute Linearität zwischen einer direkten Messung der Gesamtaufnahme von Daunorubicin und einer durchflußzytometrischen Meßmethode. Sie beziffern dabei das Ausmaß des Quenching auf 15% des intrazellulären Daunorubicins. Dordal et al. weisen 1995 darauf hin, daß das Ausmaß des Quenching innerhalb einer Zelle nicht von der extrazellulären Anthrazyklkonzentration abhängig ist sondern nur von der Menge an DNA, die zur Bindung für die Anthrazykline bereitsteht. In der Literatur wurde der Zusammenhang zwischen dem Quenching von Fluoreszenz und der Bindung von Anthrazyklinen an DNA bisher nicht bestritten. Meinungsunterschiede bestehen darin, ob die Anthrazyklkonzentration oder aber die Menge an Zell-DNA die primäre Komponente ist, die zu diesem Phänomen führt. Fest steht, daß die Anthrazykline mit der DNA erst interkalieren müssen, um wirksam zu sein. Somit stellt vermutlich dieser Quenching-Bereich den eigentlich effektiven Anteil des aufgenommenen Daunorubicins dar.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine eindeutigen Aussagen zu diesem Mechanismus des Quenching in den Zellen zu. Sowohl in den CCRF, den F4-6 und den EPP85-181 Zelllinien ist die Korrelation zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der gebundenen-, zytosolischen- und der Gesamtaufnahme ab 0,286 $\mu\text{mol/l}$ bis 5,784 $\mu\text{mol/l}$ Daunorubicin annähernd gleich gut und im Schwankungsbereich von vitalem Untersuchungsmaterial. Bemerkenswert ist jedoch, daß im Vergleich der Ergebnisse der Gesamtaufnahmen beider Meßmethoden, bei der Durchflußzytometrie immer geringere Ratios berechnet wurden als im Transportassay. Dieses, verbunden mit der Linearität der Messungen und der guten Korrelation der Ergebnisse der beiden Methoden zueinander, könnte ein Hinweis auf ein prozentuales Quenching-Phänomen von intrazellulärem Daunorubicin sein.

Bei den vesikelbildenden Zellen EPG85-257DAU korreliert neben der Daunorubicinsamtaufnahme der Zellen nur noch die zytosolische Fraktion mit der gemessenen Fluoreszenzintensität. Das intrazellulär gebundene Daunorubicin nimmt in diesen Zellen überproportional zu. Eine Inkubation der resistenten EPG85-257DAU-Zellen mit 3,3 μmol Dexniguldipin ergibt im Durchflußzytometer eine Zunahme der Daunorubicinakkumulation um 34%, in der gebundenen Fraktion des Transportassay hingegen um mehr als 230% gegenüber der resistenten Kontrollgruppe. Bei den vorliegenden Ergebnissen befinden sich die mit Daunorubicin gefüllten intrazellulären Vesikel der EPG85-257DAU bei der Auswertung der Silikonölfiltrationsmethode wahrscheinlich in der gebundenen Fraktion. Hingegen konnten Reyman et al. 1996 zeigen, daß sich diese Vesikel im Silikonölfiltrationsassay in der zytosolischen Phase wiederfinden. Die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse kann durch die begrenzte Anzahl an Versuchen an den lebenden Zellsystemen begründet sein.

Das P-Glykoprotein als membranständige Effluxpumpe für Zellgifte arbeitet temperaturabhängig (Reyman et al. 1983). Resistente Zellen akkumulieren bei geringerer Inkubationstemperatur mehr Daunorubicin als bei 37°C. Eine Zunahme der intrazellulären Daunorubicinaufnahme konnte im Transportassay bei Abkühlung der Zellen von 37°C auf 4°C um 134% nachgewiesen werden. Dieses Akkumulationsverhalten konnte mit der Durchflußzytometrie nicht dargestellt werden. Die Fluoreszenz des Daunorubicins in den Zellen nahm bei gleichen Versuchsbedingungen sogar um 24% ab. Eine Ursache hierfür liegt in möglichen intrazellulären Vorgängen. So verändert sich die Fluoreszenz von Farbstoffen bei Änderung des pH-Wertes oder bei Auskristallisation. Bei Daunorubicin ändert sich die Farbe von blaßrot / rosa bei sauren pH-Werten hin zu blau bei alkalischen pH-Werten (Merck-Index 1996). Durch die radioaktive Markierung Daunorubicins im Transportassay hingegen führen intrazelluläre Änderung der Eigenschaften eines Farbstoffes nicht zu einer Veränderung des Ergebnisses. Übereinstimmend weisen beide Versuchsmethoden eine Abnahme der Daunorubicinakkumulation in den sensitiven Zellen nach. Dieser Vorgang könnte durch eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit des Daunorubicins in die Zelle hinein durch die herabgesetzte Brown'sche Molekularbewegung bei Verringerung der Temperatur verursacht worden sein.

Bei definierter Inkubationstemperatur von Zellen scheint die gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Meßmethoden eine Einführung der Durchflußzytometrie auf dem Gebiet der

funktionellen Tumordiagnostik zu rechtfertigen. Zudem ermöglicht die Durchflußzytometrie eine Analyse bestimmter Zellen innerhalb einer gemischten Zellsuspension bis zu einem Mischungsverhältnis von $> 1:100$ und es werden im Vergleich zur Silikonölfiltrationsmethode nur $1/20$ der Zellen und $1/10$ an Zeit für die Messungen benötigt. Mit dem Transportassay sind durch die Aufteilung der Daunorubicinakkumulation in verschiedene Zellkompartimente, Unterschiede im Akkumulationsverhalten von Zellen erforschbar. Beide Methoden erlauben mit der Darstellung der Gesamtaufnahme eine Abschätzung der vorhandenen Resistenz von Zellen. Die EPG85-257DAU zeigen, daß die Kenntnis von speziellen Zelleigenschaften bei beiden Meßmethoden für eine Auswertung der Meßergebnisse mit Abschätzung einer klinischen Prognose wichtig ist.

5 Zusammenfassung

Die Multidrug Resistenz als induzierte Kreuzresistenz von Tumorzellen wird durch das membranständige Glykoprotein P-Gp 170 vermittelt. Die bereits in klinischen Studien untersuchten Chemosensitizer Ciclosporin und Verapamil bewirken über nicht genau bekannte Mechanismen eine Resensibilisierung der resistenten Zellen. Funktionelle Transportassays bieten eine sensitive Möglichkeit zur Abschätzung der Resistenz von Tumorzellen, da durch sie auch atypische Resistenzformen von Zellen erfaßt werden können. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Validierung einer durchflußzytometrischen Methode zur Messung der Daunorubicinaufnahme von Tumorzellen mit unterschiedlichen Formen transportassoziierter Zytostatikaresistenz. Als Referenz wurde eine auf Radioaktivitätsmessung beruhende Silikonölfiltrationsmethode gewählt, die eine Aufteilung der Daunorubicingesamtaufnahme in einen gebundenen und zytosolischen Anteil ermöglicht.

Die Meßdaten der Daunorubicingesamtaufnahme zeigen in beiden Methoden mit $r^2 > 0,95$ eine gute Korrelation der beiden funktionellen Assays für die Tumorzelllinien CCRF CEM, F4-6, EPP85-181-Zellen, sowie für ihre resistente Subklone, bei denen überwiegend das P-Glykoprotein als Resistenzmechanismus wirksam ist. In folgenden Punkten ergaben sich jedoch Unterschiede zwischen den Meßergebnissen beider Methoden: In gemischten Zellsuspensionen war durchflußzytometrisch noch ein Zellanteil von $< 1\%$ erfaßbar, während im Transportassay allenfalls ein Zellanteil von $> 10\%$ nachgewiesen werden konnte. Der Einsatz der Chemosensitizer Dexniguldipin und Ciclosporin führte zu einer Verminderung der durchflußzytometrisch ermittelten Fluoreszenzintensität um bis zu 22%. Diese Abnahme der Daunorubicinakkumulation trat im Transportassay nicht auf. Eine Hemmung des P-Glykoproteins durch Verringerung der Temperatur auf 4°C führten im Transportassay in den resistenten CCRF CEM DAC-Zellen zu einer Erhöhung der Daunorubicinaufnahme um mehr als 130%. Durchflußzytometrisch wird diese vermehrte Daunorubicinaufnahme wahrscheinlich von einem Effekt der Abnahme der Fluoreszenzintensität überlagert, denn es wurde eine Abnahme der Fluoreszenz um $> 20\%$ gemessen. Bei den vesikelbildenden resistenten Zellen EPG85-257DAU mißt das Durchflußzytometer nach Inkubation der Zellen mit Dexniguldipin eine 2,3-fach geringere Daunorubicinaufnahme gegenüber der im Transportassay gemessenen gebundenen Daunorubicinakkumulation.

Eine gute Abschätzung der Daunorubicinaufnahme durch durchflußzytometrische Messungen ist somit abhängig von Kenntnissen über spezielle Resistenzmechanismen von Zellen und setzen standardisierte Untersuchungsbedingungen voraus.

6 Literatur

- Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SB, Housman D (1988) The gene encoding multidrug resistance is included and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4350-4354
- Bronstein IN, Semendjajew KA (1989) Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik. In: Taschenbuch der Mathematik, 24. Auflage, Herausgeber: Grosche G, Ziegler V, Ziegler D. Teubner, Leipzig
- Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM (1982) Studies on Interaction of Anthracyclines Acid: Equilibrium Binding Studies on Interaction of Daunomycin with Deoxyribonuclein Acid. *Biochemistry* 21: 3933-3940
- Coley HM, Twentyman PR, Workman P (1993) The efflux of Anthracyclines in multidrug-resistant cell lines. *Biochem Pharmacol* 46: 1317-1326
- Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS (1989) Drug resistance in multiple myeloma and non-Hodkin's lymphoma: Detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 7: 415-424
- Danks MK, Yalowich JC, Beck WT (1987) Atypical multidrug resistance in human leukemic cell line selected for resistant to teniposide (VM-26). *Cancer Res* 47: 1297-1301
- Dano K (1973) Aktive outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 323: 466-483
- Deffie AM, Alam T, Seneviratne C, Beenken SW, Batra JK, Shea TC, Henner WD, Goldenber GJ (1988) Multifaktoriell resistance to adriamycin; relationship of DNA repair, glutathion transferase activity, drug efflux and p-glycoprotein in cloned cell lines of Adriamycin-sensitive and -resistant P388 Leukemia. *Cancer Res* 48: 3595-3602
- Dietel M, Arps H, Lage H, Niendorf A (1990) Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res*, 50: 6100-6106
- Dietel M, Herzig I, Reymann A, Brandt I, Schaefer B, Bunge A, Heidelbrecht H-J, Seidel A (1994) Secondary combined resistance to the multidrug-resistance-reversing activity of Ciclosporin in the cell line F4-6RADR-CsA. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 263-271
- Dordal MS, Ho AC, Jackson-Stone M, Fu Yi F, Goolsby CL, Winter JN (1995) Flow Cytometric Assessment of the Cellular Pharmacokinetics of Fluorescent Drugs; *Cytometry* 20: 307-314

- Dörner, C (1996) Wechselwirkungen ausgewählter MDR-Modulatoren auf die resistenz-assoziierte Minderakkumulation von Daunorubicin am Modell einer Multidrug-resistenten Erythroleukämiezelle. Med. Dissertation, Universität Hamburg
- Dulik DM, Fenselau C, Hilton J (1986) Characterization of melphalanguitathion adducts whose formation is catalyzed by glutathion transferases. *Biochem Pharmacol* 58: 137
- Edens LH (1994) Messungen zur Pharmakokinetik von Doxorubicin und Daunorubicin an murinen Leukämiezellen vom Multidrug Resistance Phänotyp und dem sensitiven Vorläuferklon mit einer Silikonölfiltrationsmethode. Med. Dissertation, Universität Hamburg
- Erttmann R, Erb N, Forcadell de Dios P, Neurath C, Looft G, Landbeck G, (1989) Anthracyclintransport in a doxorubicin selected friend leukaemia cell line with multifactorial multidrug resistancs. *Eur J Cancer* 27: 1064
- Fojo AT, Ueda K, Siamon DJ, Popiack DG, Gottesman M, Patan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors und tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7735-7738
- Foley GE, Lazarus H (1967) The response in vitro, of contiuous cultur of human lymphoblasts (CCRF-CEM cells) to chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 16(4): 659-74
- Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Obduola MJ, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF (1990) Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resitance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345: 255-258
- Frei E, Roskowsky A, Wright JE, Cucchi CA, Lippke JA, Erverin TJ, Jolivet J, Haseltine WA (1984) Development of Methotrexate resistance in a human squamous cell carcinoma of head and neck in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2873-2877
- Friend C, Patuleia MC, de Harven E (1966) Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr* 22: 505-522
- Galivan J (1981) 5-Methytetrahydrofolate transport by hepatoma cells and methotrexate-resistant sublines in culture. *Cancer-Res.*41(5):1757-62
- Gause A, Pfreundschuh M, Diehl V (1991) Allgemeine internistische Onkologie. In: Clasen, Diehl, Kochsiek *Innere Medizin* 5. Überarb. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 96-112
- Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF (1986) Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324: 485-489

- Givan AL (1992) Flow cytometric: first principles. Wiley-Liss, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore
- Gruol DJ, Zee MC, Trotter J, Bourgeois S (1994) Reversal of Multidrug Resistance by RU 486. *Cancer Res* 54: 3088-3091
- Guerci A, Merlin JL, Missoum N, Feldmann L, Marchal S, Witz F, Rose C, Guerci O (1995) Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously by flow cytometry. *Blood* 85: 2147-2153
- Hamada H, Tsuruo T (1986) Functional role for the 179 to 180 kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7785-7789
- Hamada H, Tsuruo T (1988) Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J Biol Chem* 263: 1454-1548
- Hamada H, Tsuruo T (1988) Characterization of the ATPase activity of the MR 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K563/ADM cells. *Cancer Res* 48: 4926-4932
- Hedley DW, Xiu-Yan Xie, Minden MD, Choi CH, Chen H and Ling V (1997) A novel energy mechanism reducing daunorubicin accumulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11: 48-53
- Hofmann J, Gekeler V, Ise W, Noller A, Mitterdorfer J, Hofer S, Utz I, Gotwald M, Boer R, Glossmann H, Grunicke HH (1994) Mechanism of action of Dexiguldipine-HCL (B8509-035), a new potent modulator of Multidrug Resistance. *Biochem Pharmacol* 49: 603-609
- Höllt V, Kouba M, Dietel M, Vogt G (1992) Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 43: 2601-2608
- Holm PS, Scanlon KJ, Dietel M (1994) Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br J Cancer* 70: 239-2433
- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162

- Juranka PF, Zastawny RL, Ling V (1989) P-glycoprotein: multidrug-resistance and a super-family of membrane-associated transport proteins. *The FASEB Journal* 3: 2583-2592
- Kapaun P (1994) Hämatologische Ambulanz der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, persönliche Mitteilung
- Kartner N, Everden-Porelle D, Bradöey G, Ling V (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316: 820
- Kartner N, Ling V (1989) Multidrug Resistance in Cance. *Scientific American* 26-33
- Kartner N, Riordan JR, Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221: 1285-1288
- Kees UR, Ford J, Dawson M, Prall E, Aherne GW (1989) Development of resistance to 1 β -arabinofuranosylcytosine after high dose treatment in childhood lymphoblastic leukemia. Analysis of resistance mechanism in established cell lines. *Cancer Res* 49: 3015-3019
- Lankelma J, Mülder HS, Mourik FV, Wong Fong Sang HW, Kraayenhof R, Grondelle RV (1991) Cellular daunomycin fluorescence in multidrug resistant 2780^{AD} cells and its relation to cellular drug localisation. *Biochim Biophys Acta* 1093: 147-152
- McGown AT, Fox BW (1986) A proposed mechanism of resistance to cyclophosphamide and phosphoramide mustard in a Yoshida cell line in vitro. *Cancer Chemother Pharm* 17: 223-226
- McGown AT, Ward TH, Fox BW (1983) Comparative studies of the uptake of Daunorubicin in sensitive and resistant P388 cell lines by Flow Cytometry and Biochemical Extraction Procedures. *Cancer Chem Pharm* 11: 113-116
- Merck-Index (1996) Merck & Co, Inc; Rahway New York, S. 479
- Merlin J-L, Guerci A, Marchal S, Missoum N, Ramacci C, Humbert J-C, Tsuruo T, Guerci O (1994) Comparative evaluation of S9788, Verapamil, and Cyclosporin in K562 human leukemia cell lines and in P-Glycoprotein-Expressing samples from patients with hematologic malignancies. *Blood* 84: 262-269
- Merlin J-L, Marchal S, Ramacci C, Dieterlen A, Schultz G, Lucas C, Poullain M-G, Berlion M (1995) Influence of S9788, a new modulator of Multidrug Resistance, on the cellular accumulation and subcellular distribution of Daunorubicin in P-Glycoprotein-Expressing MCF7 human breast adenocarcinoma cells. *Cytometrie* 20: 315-323
- Murren JR, Buzaid AC, Hait WN (1991) Critical analysis of neoadjuvant therapy for Stage IIIa non-small cell lung cancer. *Am-Rev-Respir-Dis* 143: 889-894

- Neurath C (1992) Vergleich des Resistenzverhaltens der Erythroleukämie-Zell-Linie der Maus F-4-6 und ihres gegen Adriamycin resistenten Subklons unter Inkubation mit fünf verschiedenen Zytostatika. Med. Dissertation; Universität Hamburg
- Nielsen D, Skovsgaard T (1992) P-glycoprotein as multidrug transporter a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1139: 169-183
- Praet M, Stryckmans P, Ruyschaert J-M (1996) Cellular uptake, cytotoxicity, and transport kinetics of anthracyclines in human sensitive and multidrug-resistant K562 cells *Biochem Pharmacol* 51: 1341-1348
- Raffael A, Nebe CT, Valet G (1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G, Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Schattauer, Stuttgart
- Rahman A, Husain SR, Siddiqui J, Verma M, Agresti M, Center R, Safa AR, Glazer RI (1992) Liposome-mediated modulation of multidrug resistance in human HL-60 leukemia cells. *Natl Cancer Inst* 84: 1909-1915
- Ramu A, Pollard HB, Rosario LM (1989) Doxorubicin resistance in P388 leukemia-evidence for reduced drug influx. *Int J Cancer* 44: 539-547
- Reichle A, Diddens H, Rastetter J, Berdel WE (1991) Resistenzmechanismen maligner Zellen gegenüber Zytostatika. *Dtsch med Wschr* 116: 186-191
- Reymann A, Looft G, Woermann C, Dietel M, Erttmann R (1993) Reversal of multidrug resistance in Friend leukemia cells by dexniguldipine-HCl. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 25-30
- Reymann A, Bunge A, Lärer S, Dietel M (1996) Morphologische und funktionelle Befunde zur Zytostatika-Resistenz und der Wirksamkeit von MDR-Modulatoren. *Pharmazie* 51: 171-175
- Richon VM, Schulte N, Eastman A (1987) Multiple mechanisms of resistance to cis Diaminedichloroplatinum (II) in murine Leukemia L1219 cells. *Cancer Res* 47: 2056-2061
- Roller E, Klumpp B, Krause J, Eichelbaum M, Schumacher K (1993) Influence of sequential exposure to R-verapamil or B8509-035 on rhodamine 123 accumulation in human lymphoblastoid cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 151-155
- Schäfer B (1996) Institut für Pathologie / Charite, Humboldt Universität zu Berlin, persönliche Mitteilung
- Seeber S, Osieka R, Schmidt CG, Achterrath W, Crooke ST (1982) In vivo resistance towards Anthracyclines, Etoposide and cis-Diaminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 42: 4719-4725

- Seidel A, Hasmann M, Löser R, Bunge A, Schaefer B, Herzig I, Steidtmann K, Dietel M (1995) Intracellular localisation, vesicular accumulation and kinetics of daunorubicin in sensitive and multidrug-resistant gastric carcinoma EPG85-257 cells. *Virchows Archiv* 426: 249-256
- Sikic BI, Yahanda AM, Adler KM, Fisher G, Brophy NA, Halsey J, Gosland MP, Lum BL (1991) Use of Cyclosporin to reverse drug resistance. *Proc Am Assoc Cancer Res* 017
- Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsurua T, Itoyama S, Mori S (1988) Tissue distribution of P-Glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoklonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* 48: 1926-1929
- Tarasiuk J, Frézard F, Garnier-Suillerot A, Gattegno L (1989) Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration. *Biochim Biophys Acta* 1013: 109-117
- Teicher BA, Holden SA, Kellery MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, Henner WD (1987) Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 47: 388-398
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MS (1989) Immunohistochemical localisation in normal tissues of different epitopes in the Multidrug transport protein, P170: evidence for localisation brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37: 159-164
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MS (1987) Cellular localisation of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7735-7738
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1982) Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 42: 4730-4733
- Twentyman PR (1992) Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem Pharmacol* 43,1: 109-117
- Twentyman PR, Reeve J, Koch G, Wright KA (1990) Chemosensitisation by verapamil and ciclosporin in mouse tumor cells expressing different levels of P-glycoprotein and CP22 (sorcini) *Br J Cancer* 62: 89-95
- Ueda K, Okamura N, Hira M., Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, and Hori R (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone but not progesterone. *J Biol Chem* 267: 2428-2452

- Willson JK, Long BH, Marks ME, Brattain DE, Wiley JE, Brattain MG (1984) Mitomycin C resistance in a human colon carcinoma cell line associated with cell surface protein alterations. *Cancer Res* 44: 5880-5885
- Wolf CR, Macpherson JS, Smyth JF (1986) Evidence for the metabolism of mitoxantrone by microsomal glutathion transferase and 3-methylcholanthrene-inducible glucuronosyl transferase. *Biochem Pharmacol* 35: 1577
- Zijlstra JG, de Vries EGE, Mulder NH (1987) Multifactoriell drug resistance in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line. *Cancer Res* 47,7: 1780-1784

7 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Erttmann, Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie und Herrn Prof. Dr. Med. Dr. h.c. Scholz, Abteilung für Allgemeine Pharmakologie, danke ich für die freundliche Aufnahme und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in ihren Abteilungen. Herrn Prof. Dr. med. Dietel, Institut für Pathologie, Charité, Humboldt Universität Berlin, danke ich für die freundliche Überlassung der Zellkulturen. Herrn Guido Looft, Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, danke ich für die Kultivierung der Zellen. Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Unterstützung und die Diskussionen danke ich Frau Dr. med. Kapaun, Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie sowie Herrn Dr. med. Reymann, Abteilung für Allgemeine Pharmakologie. Für die Einarbeitung im Labor der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie danke ich Frau Dagmar Grabowski, im Labor der Abteilung für Allgemeine Pharmakologie Frau Cornelia Woermann, die mir auch in allen Situationen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Abschließend möchte meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht haben, meiner Frau die mich bei meiner Arbeit unterstützte und meinem Sohn, der dafür sorgte, daß immer noch Zeit für ein gemeinsames Zusammenleben vorhanden war.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Meyer-Schneider, geb. Meyer
Geburtsdatum	3. April 1968
Geburtsort	Winsen / Luhe
Eltern	Waltraud Meyer, geb. Dyck, Erzieherin Hennig Meyer, Diplom-Ingenieur
Familienstand	verheiratet seit dem 22. Juli 1994 mit Marion Schneider, Ärztin im Praktikum
Kinder	Jonas Benjamin Schneider, geb. am 12. Oktober 1994 Leonie Johanna Schneider, geb. am 15. Dezember 1999

Schulbildung

Aug. '74	Einschulung in die Grundschule II in Winsen / Luhe
Juli '87	Abitur am Technischen Gymnasium in Winsen / Luhe

Studium

Okt. '89-März '90	Elektrotechnik, Universität Hannover
ab April 1990	Medizin, Universität Hamburg
Okt. '93-Sept. '94	Nebenfachstudium Informatik, Universität Hamburg
Nov. '97	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit „sehr gut“ bestanden

Arbeitsverhältnisse

Sept. '87- April '89	Zivildienst als Rettungssanitäter beim DRK Landkreis Harburg
Mai '89 - Aug. '89	Angestellter des 23. Deutschen Evangelischen Kirchentages in Berlin
Feb. '98- Jul. '99	Arzt im Praktikum im AK-Altona, Hamburg Prof. Dr. med. Hanswerner Bause, Anästhesie und Intensivmedizin
Seit Aug '99	Assistenzarzt in der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main Prof. Dr. med Raffael Dudziak, Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Zentrums für Anästhesie und Wiederbelebung

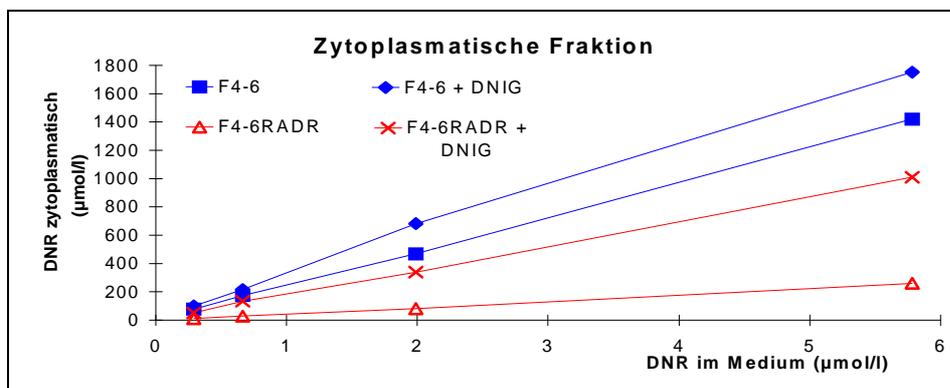
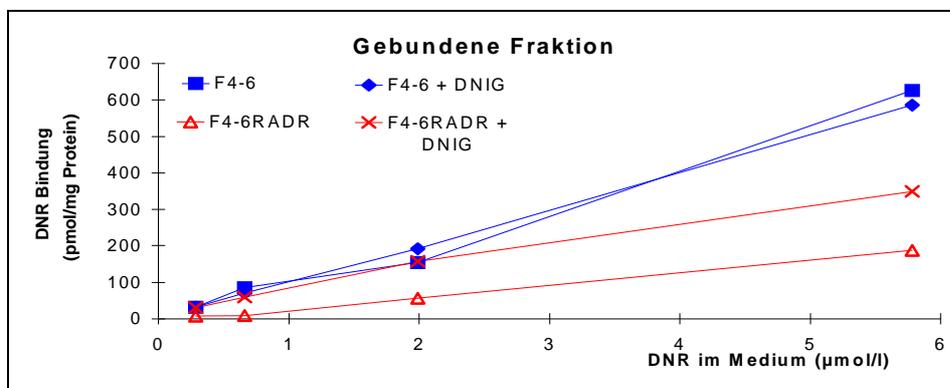
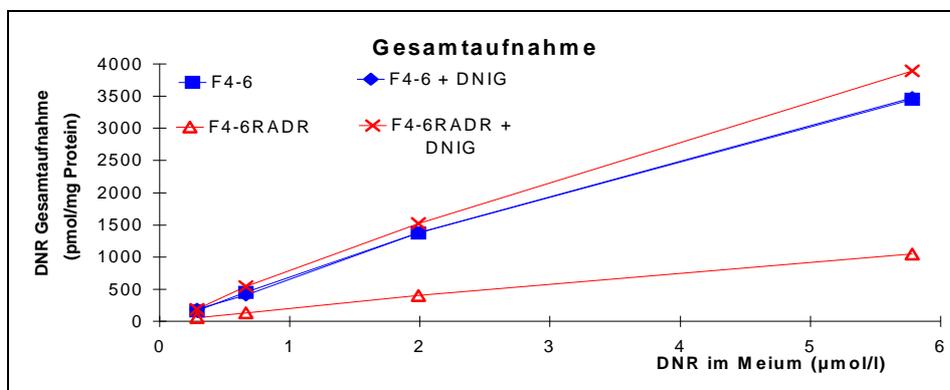
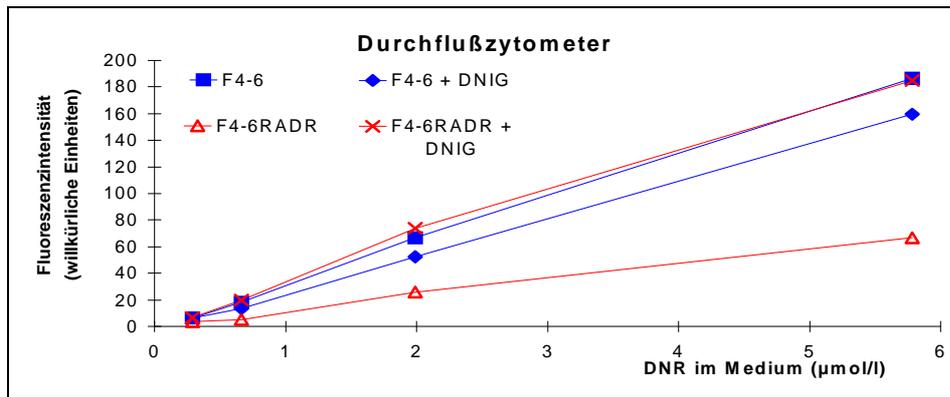
Anhang

Im Folgenden sind für alle gemessenen Zelllinien die Ergebnisse grafisch dargestellt. Exemplarisch wird jeweils ein Versuch mit den Zellen gezeigt.

Legende der nachfolgenden Diagramme:

- Grafik a: Durchflußzytometer: Angegeben ist die Fluoreszenzintensität der Zellen in Bezug zu der extrazellulären Daunorubicinkonzentration.
- Grafik b: Transportassay: Gesamtdaunorubicinkonzentration pro mg intrazellulären Proteins in Bezug zu der extrazellulären Daunorubicinkonzentration.
- Grafik c: Transportassay: Menge des intrazellulär gebundenen Daunorubicins pro mg intrazellulären Proteins in Bezug zu der extrazellulären Daunorubicinkonzentration.
- Grafik d: Transportassay: Menge des zytosolisch vorliegenden Daunorubicins bezogen auf das Zellvolumen in Bezug zu der extrazellulären Daunorubicinkonzentration.
- Grafik e: Vergleich der im Durchflußzytometer gemessenen Fluoreszenzintensität mit der Gesamtaufnahme im Transportassay.
- Grafik f: Vergleich der im Durchflußzytometer gemessenen Fluoreszenzintensität mit der im Transportassay ermittelten gebundenen Fraktion.
- Grafik g: Vergleich der im Durchflußzytometer gemessenen Fluoreszenzintensität mit der im Transportassay ermittelten zytosolischen Fraktion.

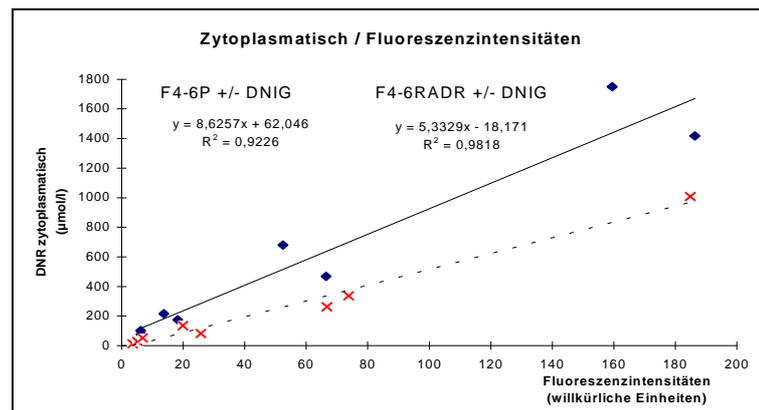
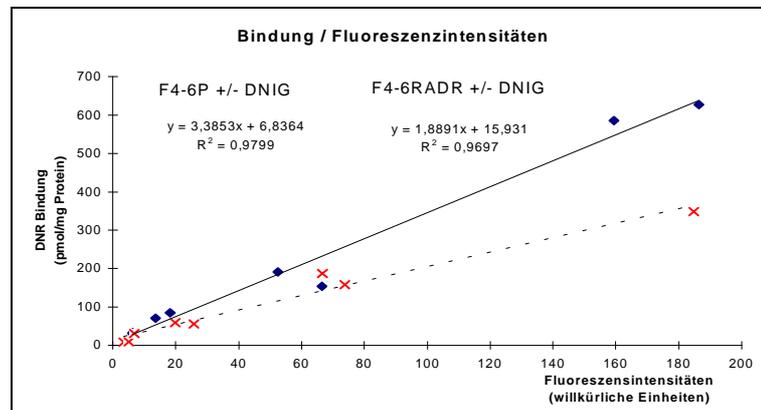
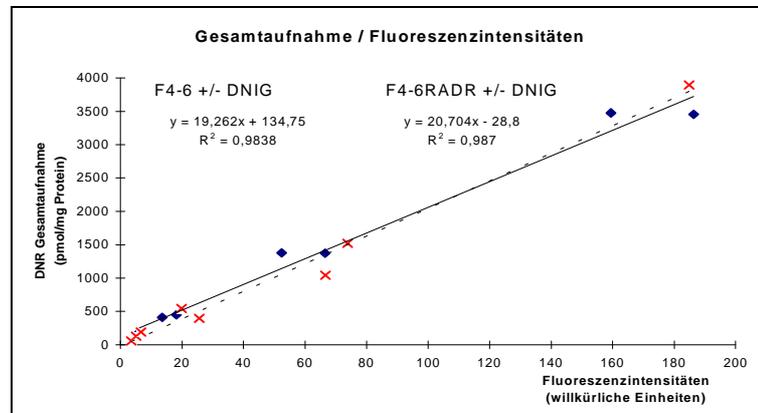
8.1 Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.1-a bis 9.1-d

Transportassay / Durchflußzytometrie

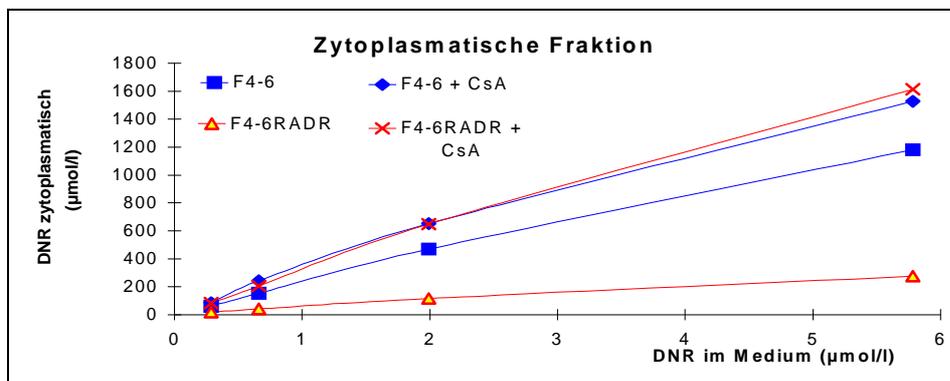
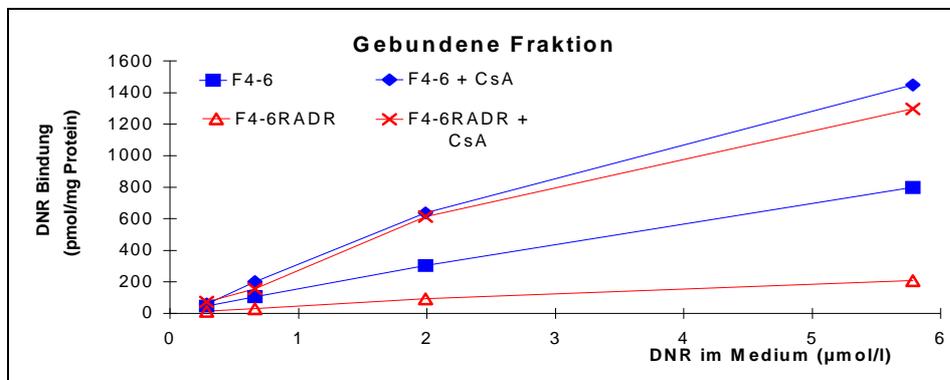
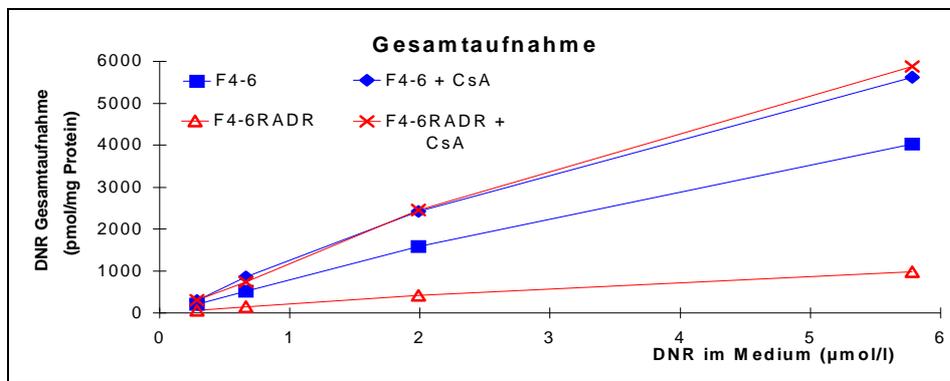
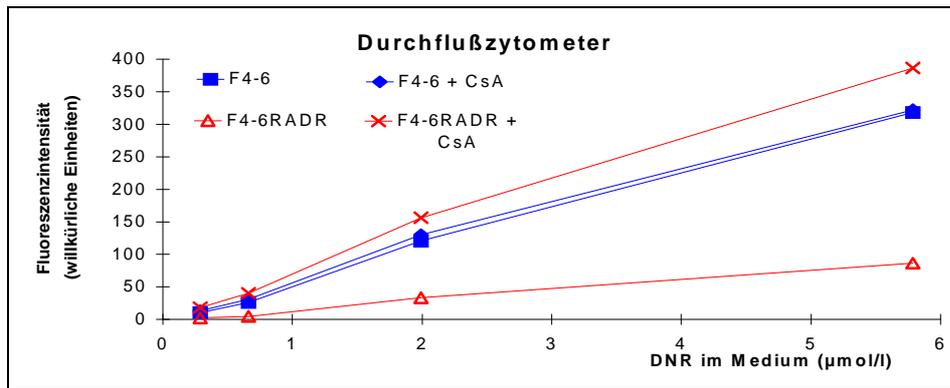
Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.1-e bis 9.1-g

Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die F4-6 (♦) und F4-6RADR (×) mit und ohne Dexniguldipin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

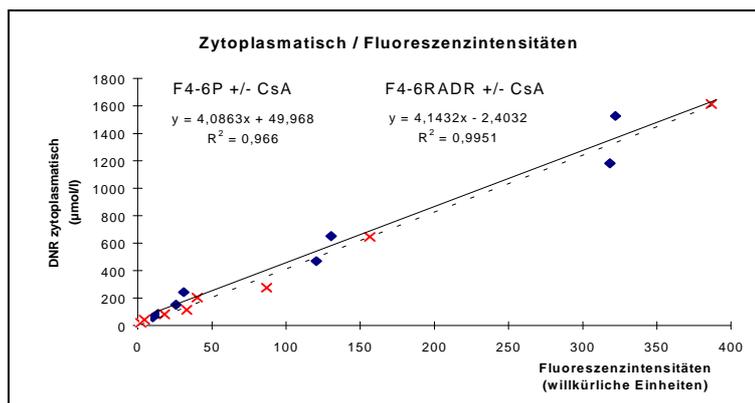
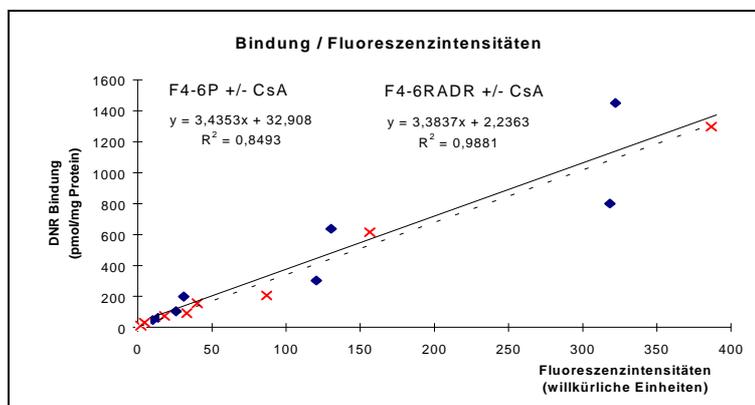
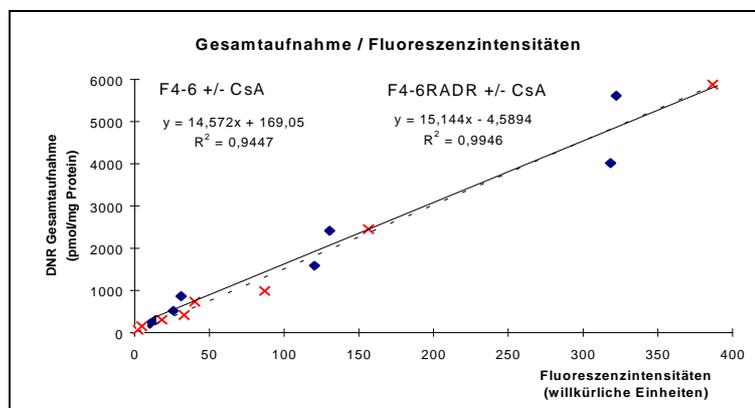
8.2 Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Ciclosporin



Grafik 8.2-a bis 9.2-d

Transportassay / Durchflußzytometrie

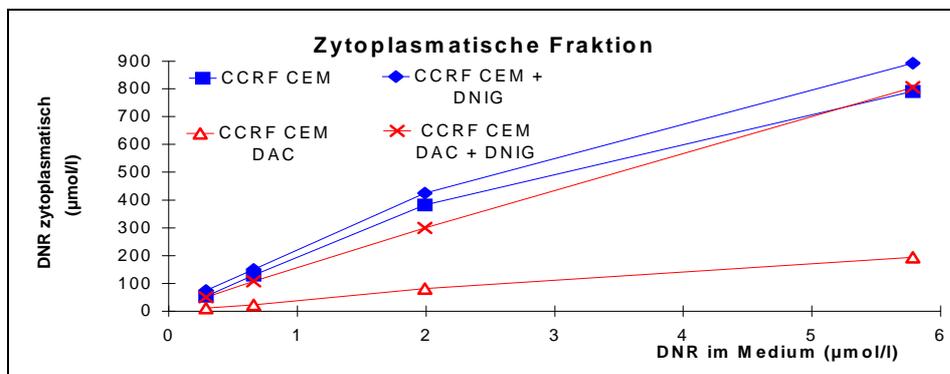
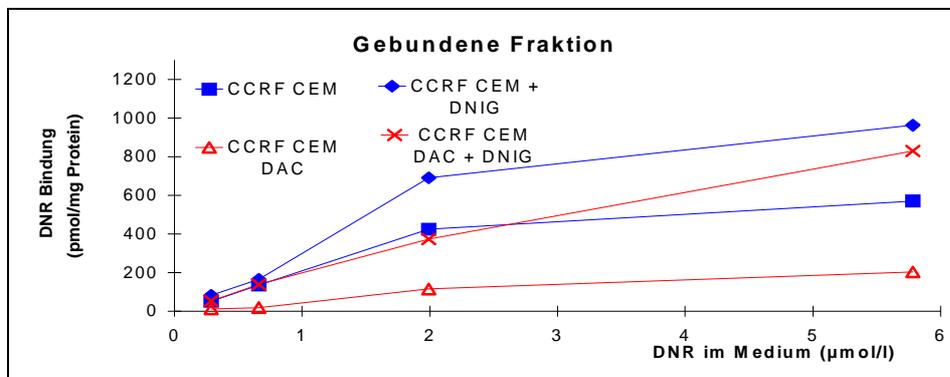
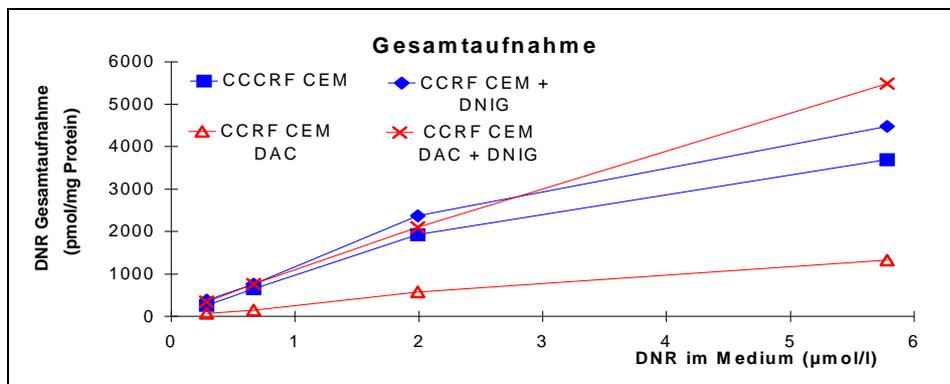
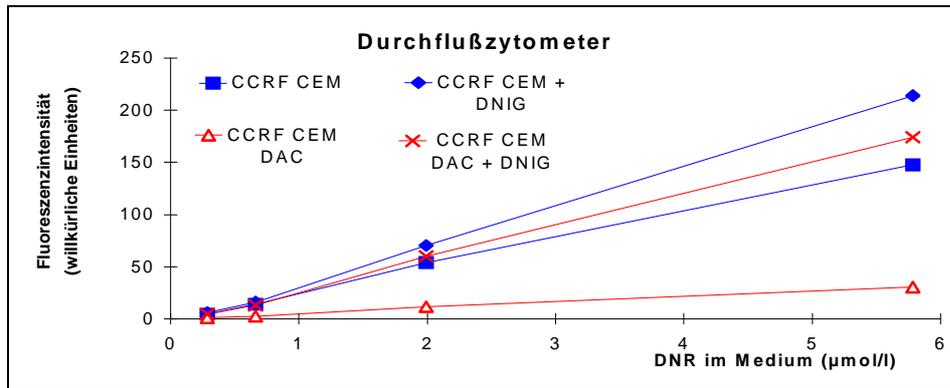
Murine Erythroleukämie-Zellen +/- Ciclosporin



Grafik 8.2-e bis 9.2-g

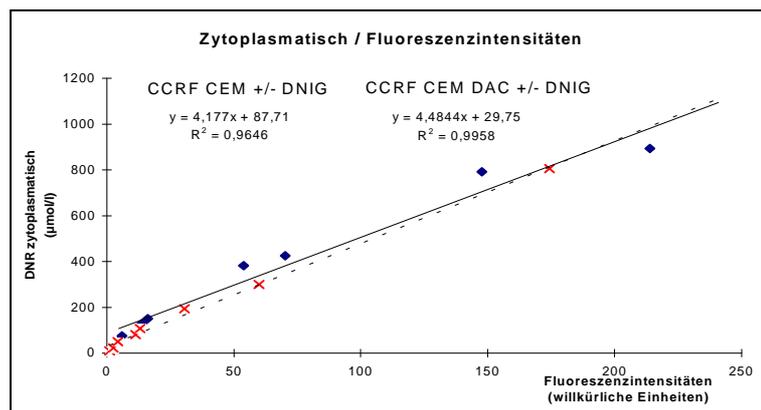
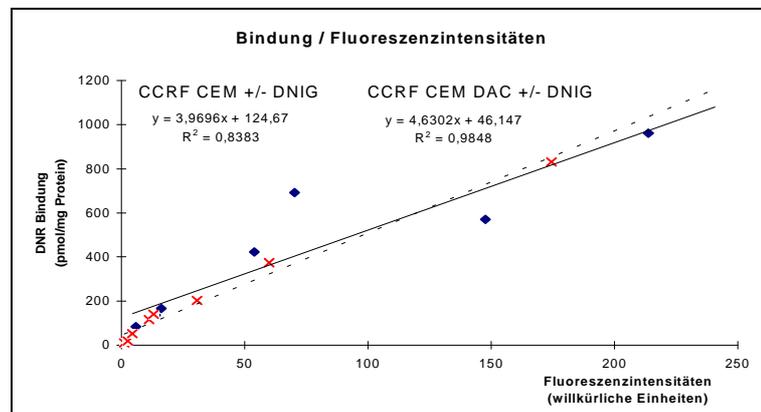
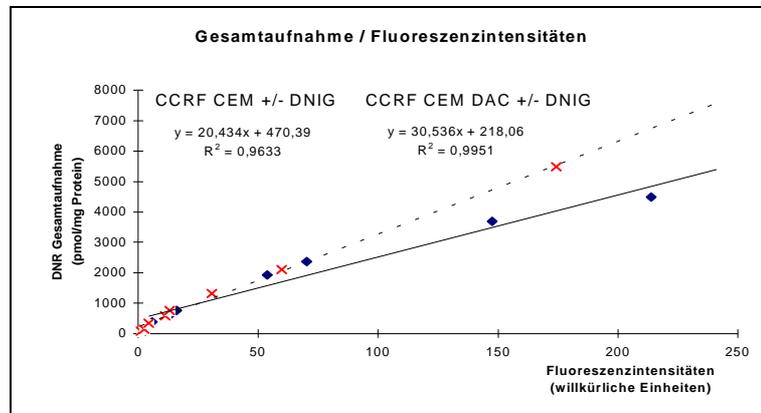
Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die F4-6 (♦) und F4-6RADR (×) mit und ohne Ciclosporin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

8.3 Humane T-Zell-Leukämie +/- Dexniguldipin



Grafik 8.3-a bis 9.3-d

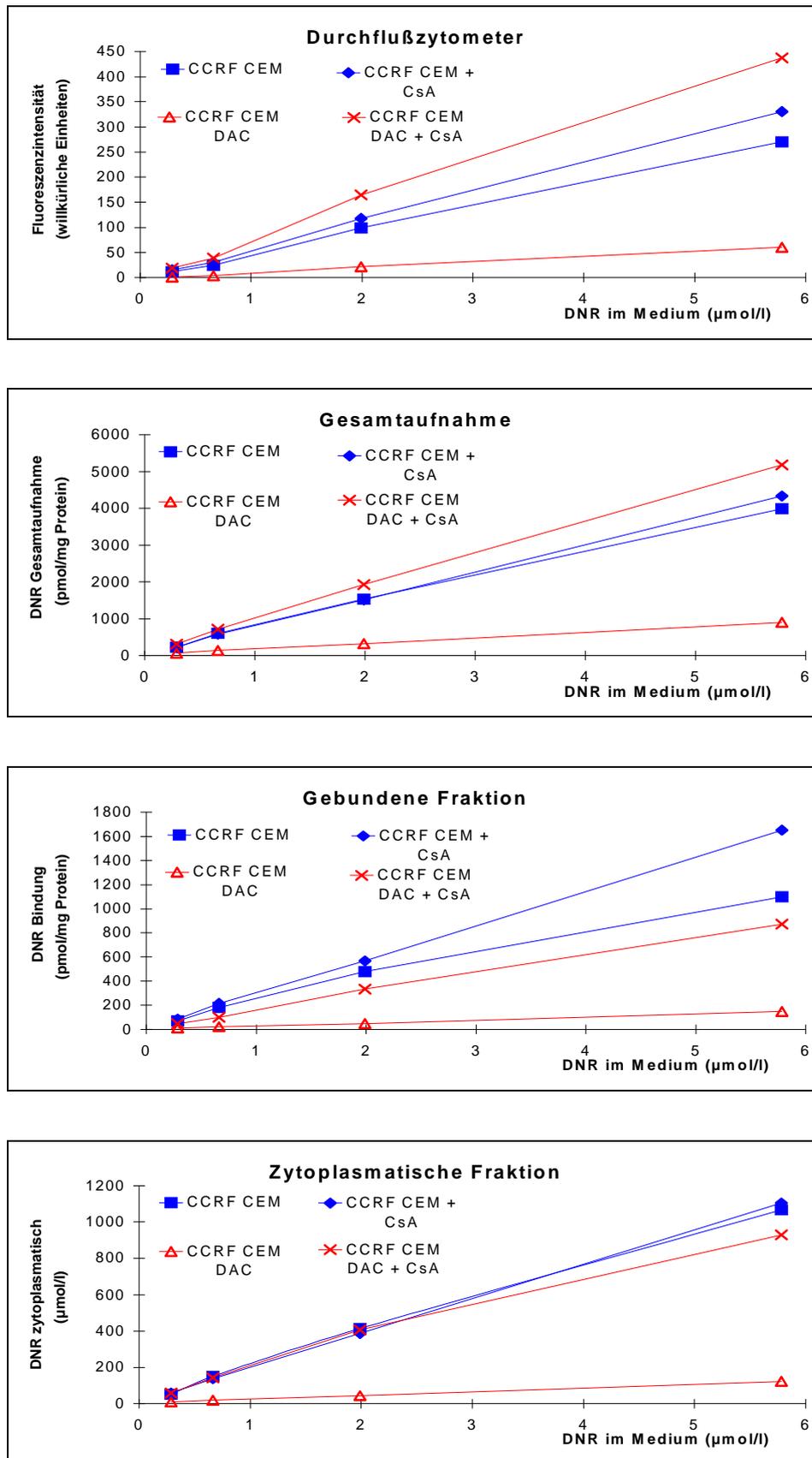
Transportassay / Durchflußzytometrie Humane T-Zell-Leukämie +/- Dexniguldipin



Grafik 8.3-e bis 9.3.g

Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die CCRF CEM (♦) und CCRF CEM DAC (×) mit und ohne Dexniguldipin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

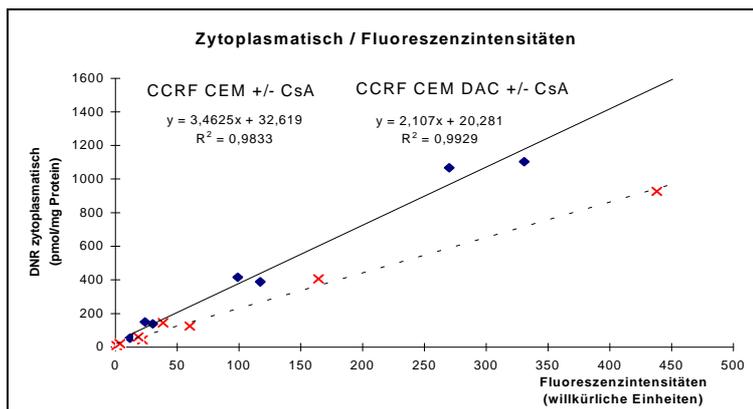
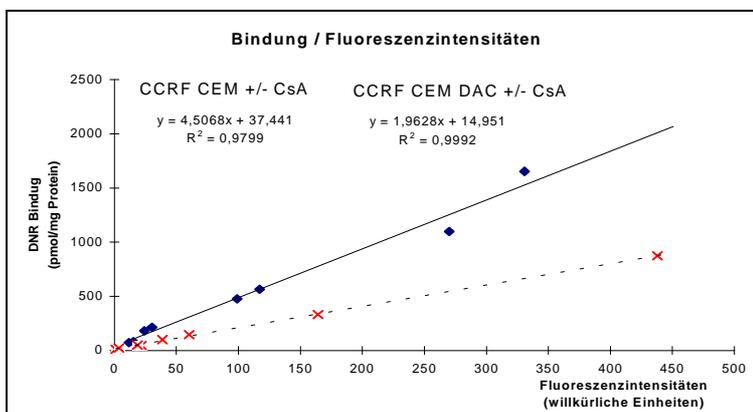
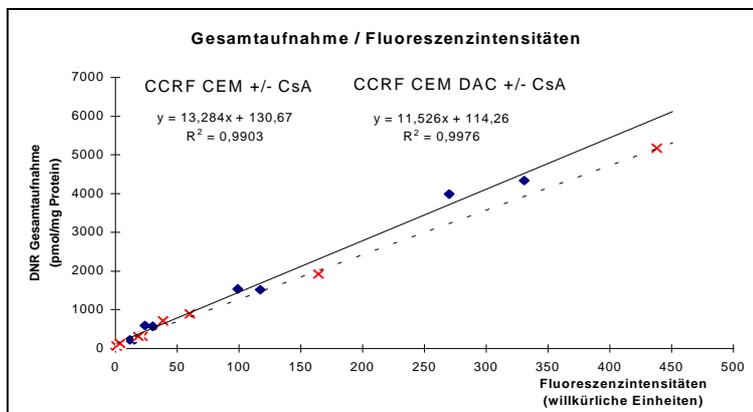
8.4 Humane T-Zell-Leukämie +/- Ciclosporin



Grafik 8.4-a bis 9.4-d

Transportassay / Durchflußzytometrie

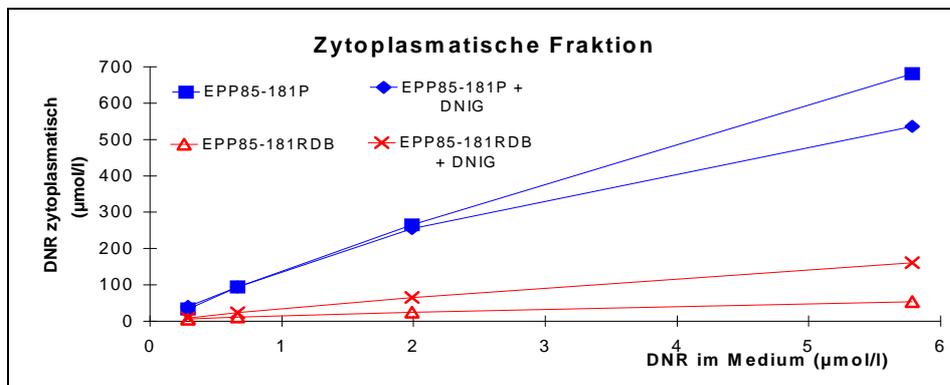
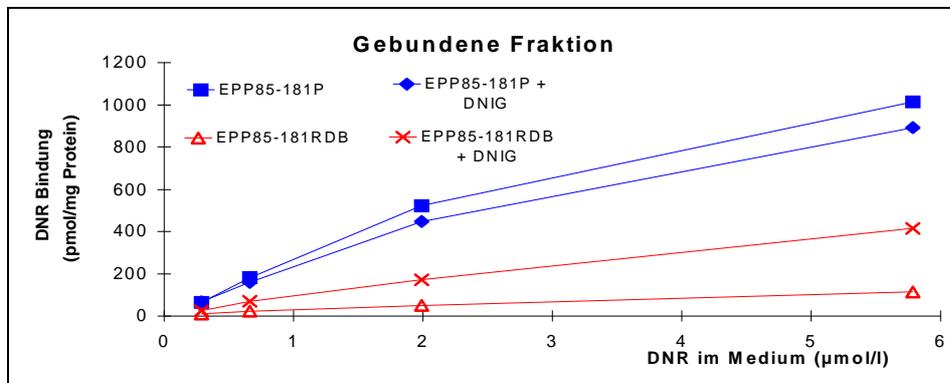
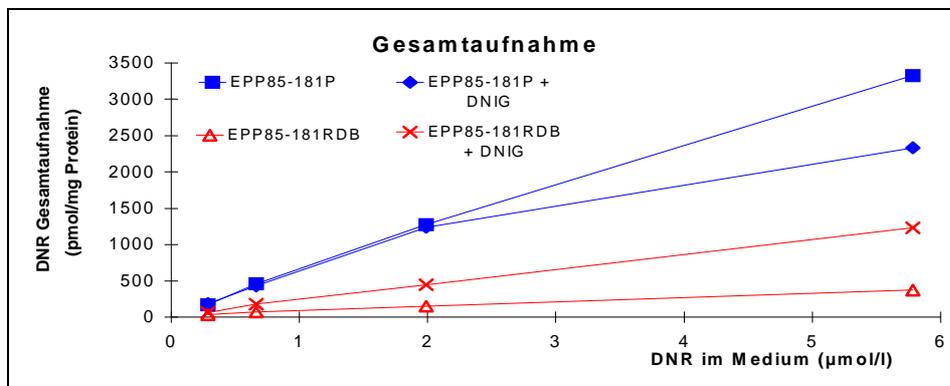
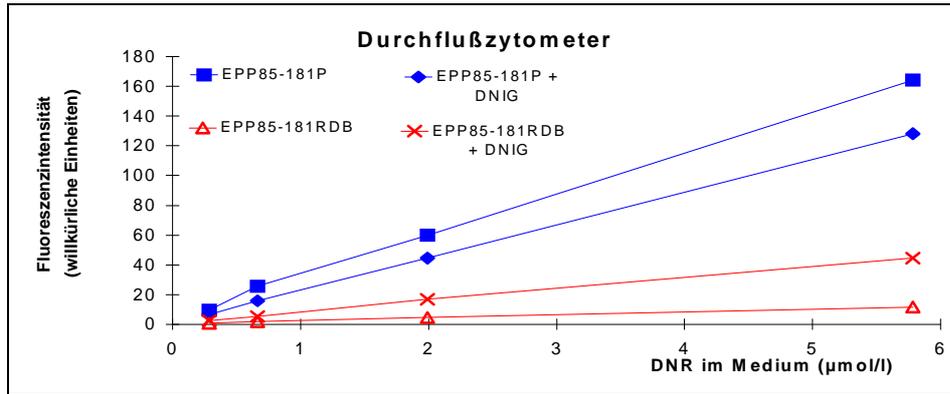
Humane T-Zell-Leukämie +/- Ciclosporin



Grafik 8.4-e bis 9.4-g

Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die CCRF CEM (♦) und CCRF CEM DAC (×) mit und ohne Ciclosporin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

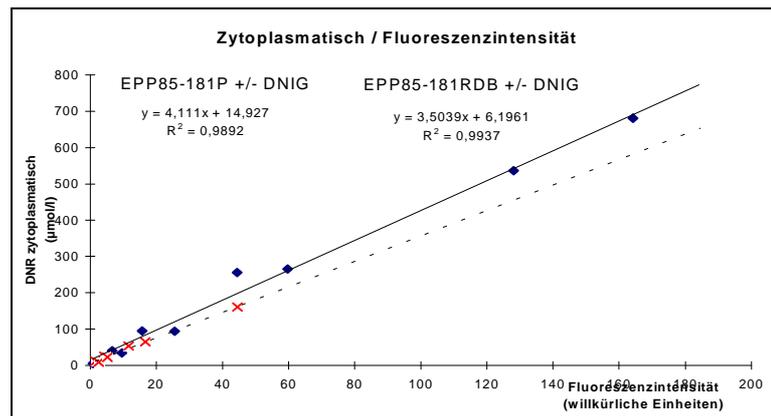
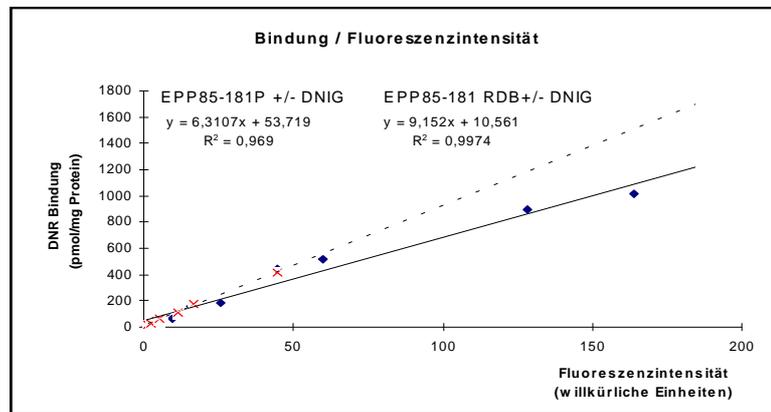
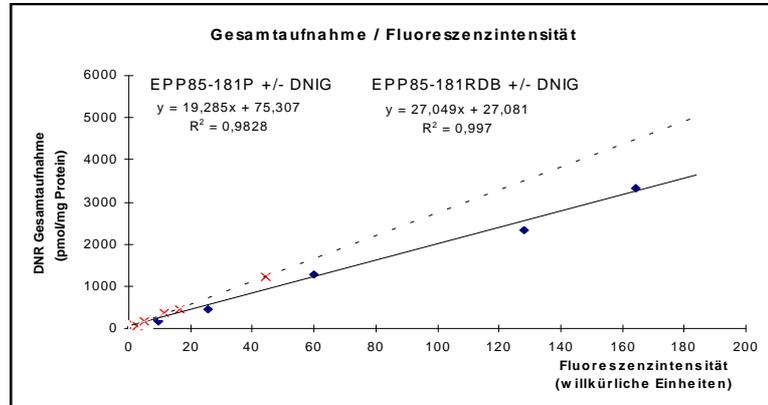
85 Humane Pankreaskarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.5-a bis 9.5-d

Transportassay / Durchflußzytometrie

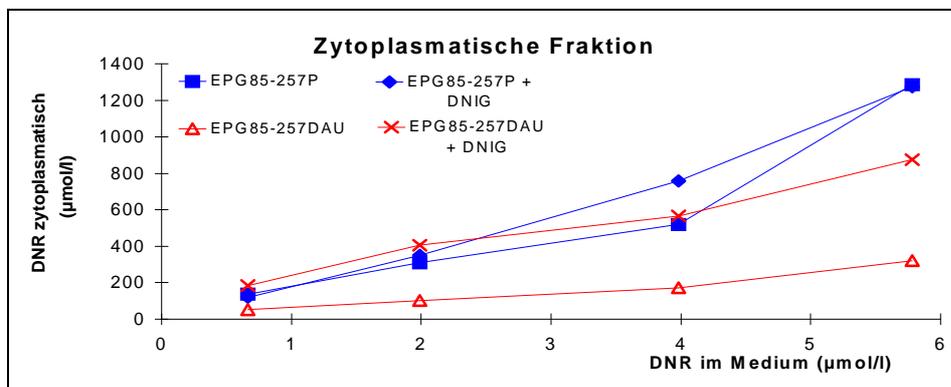
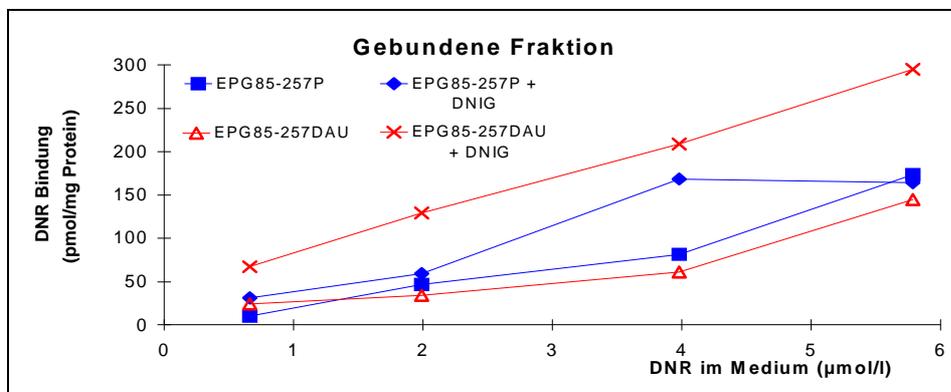
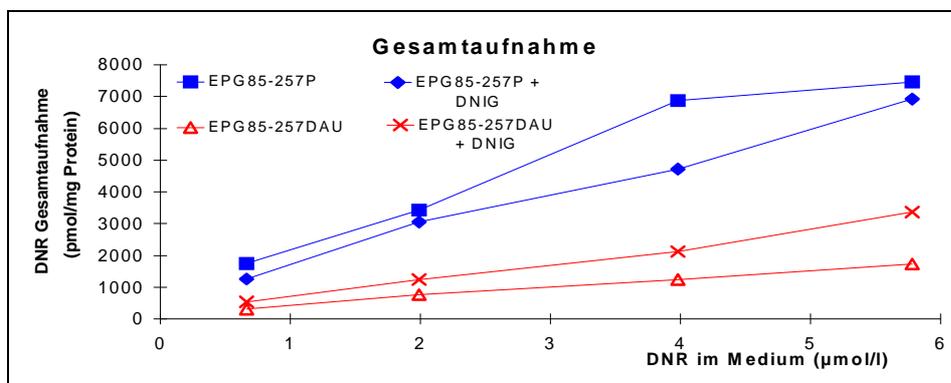
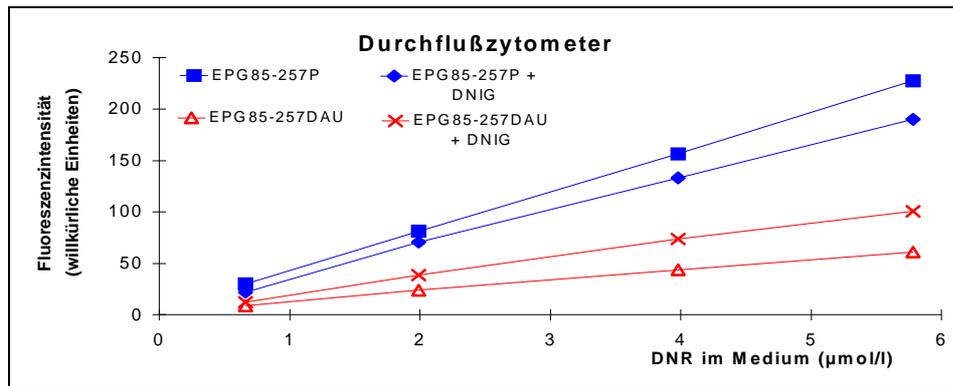
Humane Pankreaskarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.5-e bis 9.5-g

Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die EPP85-181P (♦) und EPP85-181RDB (×) mit und ohne Dexniguldipin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.

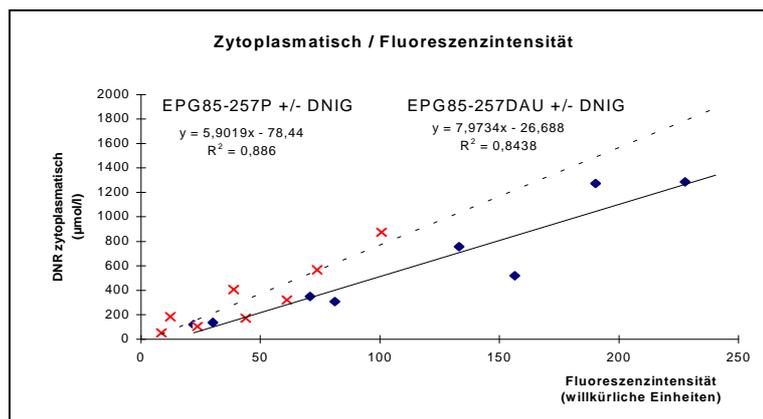
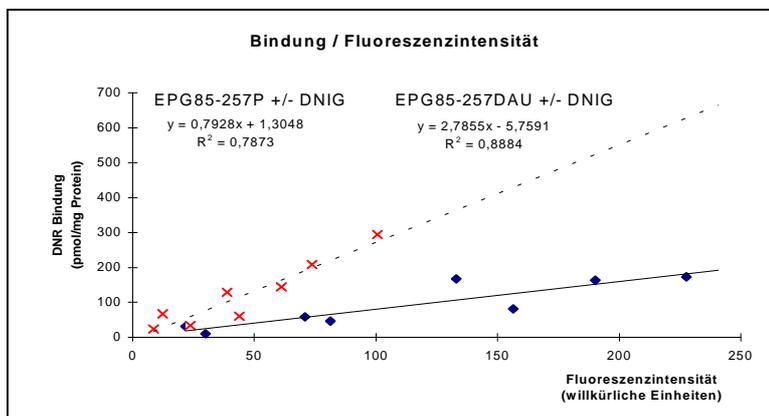
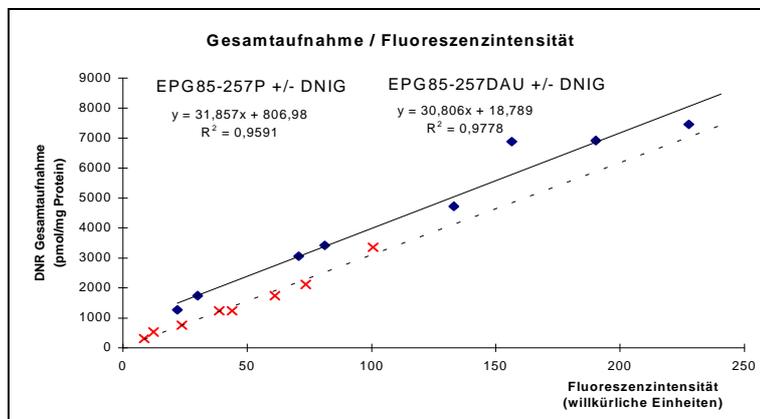
8.6 Humane Magenkarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.6-a bis 9.6-d

Transportassay / Durchflußzytometrie

Humane Magenkarzinom-Zellen +/- Dexniguldipin



Grafik 8.6-e bis 9.6-g

Gezeigt sind die Meßergebnisse der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die EPG85-257P (◆) und EPG85-257DAU (×) mit und ohne Dexniguldipin. Zusätzlich sind die Steigungen der Korrelationsgeraden und deren Wahrheitswert zu den Meßpunkten aufgetragen.