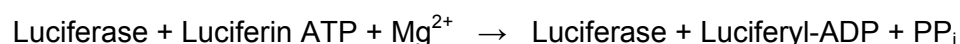


10 Pharmakologische Untersuchungen

10.1 *Testung der agonistischen und antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay*

Mit Hilfe des Luciferase-Assays wurde die estrogenen bzw. antiestrogenen Wirkung der Verbindungen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Plasmid ERE_{wtc}luc stabil transfizierte ER-positive humane MCF-7 Brustkrebszellen verwendet. Das von Meyer [296] klonierte Plasmid enthält neben der Enhancer- bzw. Promotorsequenz das Reportergen luc, welches das Enzym Luciferase codiert. Als Enhancersequenz dient das „estrogen response element“. Die resultierende MCF-7 2a Zelllinie exprimiert damit in Abhängigkeit von der estrogenen Potenz einer Testsubstanz Luciferase. Da die Luciferaseexpression ab der 42. Stunde [297] ein Maximum durchschreitet, wird der Test durch Zellyse nach 50 h abgebrochen (Kap. 14.2.2.4). Die Luciferase katalysiert bei Substratzugabe folgende Reaktion:



Das emittierte Licht deckt einen Wellenlängenbereich von 490 – 630 nm ab [298] und wird mit einem Luminometer in einem Wellenlängenbereich von 390 – 520 nm über einen Zeitraum von 10 s quantifiziert. Die Gesamtlichtausbeute wird durch Coenzym A in der Substratlösung um ein Vielfaches verstärkt [299]. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgt in „relative light units“ (RLU).

10.1.1 **Bestimmung der agonistischen Wirkung im Luciferase-Assay**

Zur Bestimmung der estrogenen Eigenschaften einer Verbindung wird die Stimulierung einer substanzbedingten Luciferaseexpression in Abhängigkeit von der Konzentration durchgeführt. Die MCF-7 2a Zellen werden dazu mit verschiedenen Substanzkonzentrationen inkubiert. Zur Background-Bestimmung werden weitere Zellen mit dem Lösungsmittel, zur Positivkontrolle mit 17 β -Estradiol (10⁻⁸ M) inkubiert. Nach Beendigung des Versuchs werden die RLU-Werte bestimmt. Aus den RLU-Werten wird nach Meyer [296] die Masse an Luciferase pro Proteinextrakt [fg/ μ l] berechnet. Das gewonnene Ergebnis wird durch den Gesamtproteingehalt, bestimmt nach Bradford [300], dividiert. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu erreichen, erfolgt die Angabe des

Ergebnisses als relative Aktivierung [%], bezogen auf 17β -Estradiol (10^{-8} M) als 100%-Kontrolle und auf das verwendete Lösungsmittel als 0%. Die Durchführung und Auswertung erfolgt wie in Kapitel 14.2.2.4 beschrieben.

10.1.2 Ermittlung der antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay

Bei der Bestimmung der antagonistischen Wirkung einer Substanz wird die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der E2-bedingten Luciferaseexpression ermittelt. Hierzu werden MCF-7 2a Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten und einer festen Konzentration von E2 (10^{-9} M) inkubiert. Die Durchführung entspricht der Bestimmung der agonistischen Wirkung (Kap. 14.2.2.4). Auch hier werden die verbleibenden E2-induzierten Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Antagonisten in einem Graphen dargestellt.

10.2 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor

Für die endokrine Wirkung einer Verbindung ist eine hinreichend hohe Affinität zum Rezeptor Voraussetzung. Da die neu synthetisierten Verbindungen nicht radioaktiv markiert wurden, ist eine direkte Quantifizierung der Bindung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die relative Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor (RBA-Wert) durch eine Methode bestimmt, die von der European Organization for Research on Treatment of Cancer (EORTC) vorgeschlagen wurde. Bei dem „Dextran Coated Charcoal Verfahren“ [301, 302] werden verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen bzw. Estradiol mit einer konstanten Konzentration an 17β - ^3H -Estradiol inkubiert. Das durch kompetitive Verdrängung vom Estrogenrezeptor frei vorliegende 17β - ^3H -Estradiol wird an dextranbeschichteter Aktivkohle gebunden und entfernt. Das gebundene 17β - ^3H -Estradiol wird mit einem Szintillationszähler quantifiziert und daraus der RBA-Wert errechnet (Kap. 14.2.2.1.2). Als Quelle für den Estrogenrezeptor dient aufkonzentriertes estrogenrezeptorhaltiges Cytosol aus den Uteri frisch geschlachteter Kälber (Kap. 14.2.2.1.2). Auch aus den Uteri von Lämmern, Kaninchen, Ratten und Mäusen lassen sich Cytosole herstellen, die vergleichbare Ergebnisse liefern [303].

10.3 *In vitro* Cytotoxizitätstest an der MCF-7 und MDA-MB 231 Zelllinie

Die antiproliferative Wirkung einer Substanz wurde über die Bestimmung der Zellmasse nach Gillies [304] mit Hilfe eines kolometrischen Verfahrens bestimmt. Die Zellmasse, die der Zellzahl proportional ist, wird hierbei mittels eines Kristallviolett-Assays bestimmt. Monolayerkulturen in Mikrotiterplatten [305] mit einer definierten Aussaatdichte werden mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen, sowie Cisplatin und Lösungsmittel, als positiv Kontrolle bzw. als Vergleichswert nach einer festgelegten Anwachszeit inkubiert. Da die zeitabhängige Cytotoxizität beurteilt werden soll, wird bei fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten das Medium mit der Testsubstanz entfernt, die Zellen mit Glutardialdehyd an der Mikrotiterplatte fixiert und mit PBS überschichtet. Nach Beendigung des Versuchs werden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff, der vorwiegend DNA-assoziierte Nucleoproteine anfärbt, wird mit 70%igem Ethanol aus den Zellen extrahiert und die ethanolische Lösung bei 590 nm vermessen. Die Messwerte korrelieren gut mit der Zellzahl [306]. Aus den erhaltenen Daten wird die relative prozentuale Wachstumshemmung $[T/C_{\text{korr}}]$ berechnet (Kap. 14.2.2.5.4).

Die T/C_{korr} -Werte, über die die antiproliferativen Eigenschaften der Testsubstanzen bewertet werden, werden nach folgender Einteilung interpretiert:

$T/C_{\text{korr}} > 80\%$	keine antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{korr}} < 80\%$	antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{korr}} 20 - 0\%$	cytostatische Wirkung
$T/C_{\text{korr}} < 0\%$	cytocide Wirkung.

Als cytotoxische Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

10.3.1 Die MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zelllinie (Michigan Cancer Foundation) ist eine humane, hormonsensitive Mammakarzinomzelllinie, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin isoliert, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre lang mit Hormon- und Radiotherapie [307] behandelt worden war. Die gut charakterisierte Zelllinie [308] besitzt neben Rezeptoren für Estrogene auch Rezeptoren für Androgene und Progesteron. Wegen des hohen Hormonrezeptorgehalts von 70 - 90 fmol/mg Protein [309, 310], wird sie als hormonabhängig bezeichnet.

10.3.2 Die MDA-MB 231 Zelllinie

Die 1974 etablierte Zelllinie wurde ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss mit metastasierendem duktalem Mammakarzinom gewonnen [310]. Auch hier wurde zuvor eine chemotherapeutische Behandlung über drei Wochen durchgeführt. Aufgrund der Abwesenheit von Estrogen- und Progesteronrezeptoren wird sie als hormonunabhängig bezeichnet [311].

10.4 *In vitro* Cytotoxizitätstest an der SUP-B15 und LAMA84 Zelllinie

Die Zelllinien SUP-B15 und LAMA84 von Patienten mit akuter lymphatischer bzw. chronischer myeloischer Leukämie werden als Suspensionskultur in 96-Lochrundbodenplatten ausgesät und für den Zeitraum von fünf Tagen mit der Testsubstanz in einem Konzentrationsbereich von 1 - 50 μM inkubiert. Der Test wird abgebrochen und die Zelldichte mit dem EZ4U Cell Proliferation Assay der Firma Biomedica bestimmt. Dabei werden die Zellkulturen mit einer Lösung eines Tetrazoliumsalzes versetzt und 2 - 5 h inkubiert. Die Zellen verstoffwechseln das Salz zu einem Formazanderivat, dessen Menge quantitativ bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt wird. Aus Background- und Standardmessungen wird die prozentuale proliferationsinhibitorische Wirkung berechnet.

10.5 *Untersuchung auf Apoptose durch Nachweis von Einzelstrang-DNA*

Das Auftreten von Einzelstrang-DNA („single-stranded“ DNA, ssDNA) ist ein wesentliches Charakteristikum für apoptotische Zellen und kann zur Unterscheidung gegenüber nekrotischen Zellen herangezogen werden. Die ssDNA entsteht durch die proteolytische Spaltung von DNA-stabilisierenden Eiweißen und dem Verlust der Chromatinstruktur. Die Leukämiezelllinien SUP-B15 und LAMA84 werden analog dem Cytotoxizitätstest mit der zu untersuchenden Verbindung im Konzentrationsbereich von 1 - 10 μM kultiviert. Die Zellkulturen werden nach sechs Tagen mit dem ssDNA Apoptose ELISA Kit der Firma Chemicon International auf das Auftreten von ssDNA untersucht. Dabei werden die Zellen auf dem Plattenboden fixiert und eine spezifische Denaturierung von DNA in apoptotischen Zellen mit Formamid bei 75°C durchgeführt. Die so behandelten Zellen werden mit einer Antikörpermischung aus monoclonalen Maus-Antikörpern gegen ssDNA und einem Peroxidase-markiertem anti-Maus IgM inkubiert. Die Zellen werden gewaschen und mit 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) erneut inkubiert. Die Farbreaktion wird

mit einer HCl-Lösung gestoppt und die Extinktion des entstandenen Farbstoffs bei 405 nm vermessen. Durch Background- und Standardmessungen wird die Menge an ssDNA bestimmt.

Die Versuche zur Cytotoxizität an der SUP-B15 und LAMA84 Zelllinie sowie zur Apoptose wurden von Frau Dr. Kircher im Labor für Tumor- und Immunbiologie, in der Klinischen Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Stadt Innsbruck durchgeführt.

10.6 *Untersuchung auf Inhibierung der Cyclooxygenase-1 und -2 Aktivität*

Die Untersuchung auf inhibitorische Wirkung der neu synthetisierten Verbindungen auf Cyclooxygenase-1 und -2 wurde mit dem Cox Inhibitor Screening Assay der Firma Cayman Chemical nach dem Prinzip eines Enzym Immunoassay (EIA) durchgeführt. Dazu wurde ovines Cox-1 und humanes rekombinates Cox-2 mit der Testsubstanz und dem Substrat Arachidonsäure inkubiert. Die Verbindungen erreichen im Assay Konzentrationen von 0.1 μM , 10 μM und 200 μM und werden mit Cox-1 und Cox-2 10 min bei 37°C präinkubiert bevor die Arachidonsäure zugesetzt wird. Die Reaktionszeit der Enzymreaktion beträgt 2 min. Das gebildete PGH_2 wird in einem weiteren Reaktionsschritt mit SnCl_2 in das stabilere $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduziert. Die gewonnenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Lösungen werden zusammen mit Acetylcholin-esterase markiertem $\text{PGF}_{2\alpha}$ und einem spezifischen Antikörper gegen $\text{PGF}_{2\alpha}$ in mit monoclonalen Maus-Antikörpern beschichteten 96-Lochplatten inkubiert. Nach 18 h wird der Überstand abgesaugt, gewaschen und mit Ellman's Reagenz beschickt. Das Ellman's Reagenz enthält eine Mischung aus Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure). Das Acetylthiocholin wird durch die Esterase in eine Acetylgruppe und das Thiocholin gespalten. Das Thiocholin reagiert mit der Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, dessen Extinktion bei 412 nm vermessen wird. Aus einer Standardmessreihe, Blank- und Backgroundwerten wird die prozentuale Inhibierung berechnet.