

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von CIC-3 bei der
Chemotherapieresistenz neuroendokriner
Tumorzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maxim Nebrig

aus Strausberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann
2. Prof. Dr. med. H. Scherübl
3. Prof. Dr. med. R. Arnold

Datum der Promotion: 02.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Neuroendokrine Tumoren des Gastroenteropankreatischen Systems... 1	1
1.1.1. Definition, Geschichte und Einteilung.....	1
1.1.2. Epidemiologie.....	3
1.1.3. Ätiologie.....	3
1.1.4. Klinik, Prognose und Therapie.....	3
1.2. Multidrug Resistance (MDR).....	5
1.2.1. Allgemeines.....	5
1.2.2. ABC-Transporter.....	6
1.2.3. pH und MDR.....	7
1.3. CIC-Kanäle und CIC-3.....	8
1.3.1. CIC-Chlorid-Kanäle.....	8
1.3.2. CIC-3.....	9
1.4. Aufgabenstellung.....	10
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Material.....	13
2.1.1. Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.2. Geräte.....	13
2.1.3. Chemikalien und andere Reagenzien.....	13
2.1.4. Software.....	14
2.2. Zellkultur.....	15
2.2.1. Allgemeines.....	15
2.2.3. Passagierung.....	15
2.2.4. Einfrieren.....	15
2.2.5. Auftauen.....	16
2.2.6. Kulturmedien, Passagezeiten, Herkunft der Zelllinien.....	16
2.3. Konfokale Mikroskopie.....	17
2.3.1. Deckgläser.....	17
2.3.2. Immunfärbung.....	17

2.3.3. Mikroskopie.....	18
2.4. Durchflußzytometrie.....	18
2.4.1. Allgemeines.....	18
2.4.2. Lamp1-Färbung.....	19
2.4.3. Prinzip der pH-Messung mit Acridin Orange.....	20
2.4.4. Acridin Orange-Färbung.....	21
2.4.5. Statistik.....	22
2.5. Messung der Zytotoxizität mit dem XTT-Test.....	22
2.5.1. XTT.....	22
2.5.2. Etoposid.....	23
2.5.3. Statistik.....	24
2.6. Western Blot.....	24
2.6.1. Membran Präparation.....	24
2.6.2. CIC-3-Kontrolle.....	25
2.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
2.6.4. SDS-Gel.....	25
2.6.5. Western Blot der Proteine.....	25
2.6.6. Immunblot.....	26
2.7. Durchflußzytometrie mit isolierten Lysosomen.....	27
2.7.1. Lysosomenpräparation.....	27
2.7.2. Färbung und Vorbereitung.....	28
2.7.3. Durchflußzytometrie.....	29
2.7.4. Statistik.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Expression von humanem CIC-3-GFP in neuroendokrinen Zelllinien.....	31
3.2. Intrazelluläre Lokalisation von humanem CIC-3-GFP in neuroendokrinen Tumorzellen	32
3.3. Einfluss von CIC-3 auf den intralysosomalen pH.....	37
3.4. Einfluss heterologer CIC-3-GFP-Überexpression auf die Größe des lysosomalen Kompartiments.....	40
3.5. Einfluß von CIC-3 auf die Zytotoxizität von Etoposid.....	42
3.6. Pharmakologische Manipulation des lysosomalen pH.....	44

3.7. Einfluß von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) auf lysosomale Azidifizierung.....	44
3.8. Präparation und durchflußzytometrische Analyse isolierter Lysosomen aus BON-Zellen.....	49
3.9. Pgp und MRP1 in BON-Zellen.....	53
4. Diskussion.....	55
4.1. Intrazelluläre Lokalisation von CIC-3-GFP in neuroendokrinen Zellen... 	55
4.2. Kollokalisationsstudien mittels Überexpression von CIC-3-GFP.....	56
4.3. CIC-3 und Sekretion.....	56
4.4. CIC-3 und pH des intrazellulären Kompartiments.....	57
4.5. CIC-3 und Zytotoxizität von Etoposid.....	58
4.6. pH-abhängige Anreicherung von Chemotherapeutika als Mechanismus für Multidrug Resistance.....	59
4.7. Messung des intravesikulären pH mit Acridin Orange.....	61
5. Zusammenfassung.....	63
6. Referenzen.....	64
7. Selbständigkeitserklärung.....	73
8. Danksagung.....	74
7. Lebenslauf.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Vesikuläre Ansäuerung und CIC-3, schematische Darstellung einer intrazellulären Organelle.....	10
Abbildung 2.1. HEK293 Zellen nach Behandlung mit dem selektiven v-H ⁺ ATPase-Inhibitor Concanamycin A (conA).....	20
Abbildung 2.2. Schichtung der Dichtegradienten vor Zentrifugation.....	28
Abbildung 2.3. Durchflußzytometrie der 9. Fraktion aus der Dichtegradient-Zentrifugation nach entsprechender Verstärkung des Signals und Festsetzen des Schwellenwerts.....	30
Abbildung 3.1. Expression von CIC-3 in neuroendokrinen Tumorzelllinien und der Kolonkarzinomlinie CaCo-2.....	31
Abbildung 3.2. CIC-3-GFP kolokalisiert mit Acridin Orange in BON-CIC-3-GFP-Zellen.....	33
Abbildung 3.3. CIC-3-GFP kolokalisiert in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht mit Synaptophysin, einem Marker für Synaptic-like-Microvesicles (SLMV).....	35
Abbildung 3.4. CIC-3-GFP kolokalisiert in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht mit Chromogranin A, einem Marker für Large-Dense-Core-Vesicles (LDCV).....	35
Abbildung 3.5. CIC-3-GFP zeigt in BON-CIC-3-GFP-Zellen Kolokalisation mit Lamp-1, einem Marker für Lysosomen und späte Endosomen.....	36
Abbildung 3.6. BON-CIC-3-GFP-Zellen haben ein azidischeres intrazelluläres Kompartiment als BON-Zellen.....	38
Abbildung 3.7. Werden die CIC-3-GFP-überexprimierenden Klone aus BON (BON-CIC-3-GFP) und HEK293 (HEK293-CIC-3-GFP) in Subpopulationen hohen und niedrigen Expressionsniveaus sortiert, so bleibt dieser Unterschied für mindestens 2 Wochen stabil.....	38
Abbildung 3.8. Überexpression von CIC-3-GFP führt zu einem azidischeren intravesikulären pH in (A) BON-CIC-3-GFP und (B) HEK293-CIC-3-GFP Zellen.....	39
Abbildung 3.9. Überexpression von CIC-3-GFP in BON (A) und	

HEK293 (B) führt nicht zu einer Vergrößerung des lysosomalen / endosomalen Kompartiments.....	41
Abbildung 3.10. Überexpression von CIC-3-GFP in BON (A) und HEK293 (B) erhöht die Resistenz gegenüber Etoposid.....	43
Abbildung 3.11. Kurzzeitinkubation mit niedrigen Dosen Concanamycin A hebt den intravesikulären pH in BON (A) und LCC-18 (B).....	43
Abbildung 3.12. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP- (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Concanamycin A senkt die Resistenz gegenüber Etoposid.....	46
Abbildung 3.13. Vorbehandlung von BON- (A) oder LCC-18-Zellen (B) mit Concanamycin A (30min, 10nM) ist nicht toxisch.....	46
Abbildung 3.14. Vorbehandlung mit den Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol (A) and Pantoprazol (B) verändert den intravesikulären pH in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht.....	47
Abbildung 3.15. Vorbehandlung mit den Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol (A) and Pantoprazol (B) verändert den intravesikulären pH in LCC-18-Zellen nicht.....	47
Abbildung 3.16. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP- (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Omeprazol verändert die Resistenz gegenüber Etoposid nicht.....	48
Abbildung 3.17. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP- (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Pantoprazol verändert die Resistenz gegenüber Etoposid nicht.....	48
Abbildung 3.18. Nach Ultrazentrifugation von BON-CIC-3-GFP-Zellen zeigt Fraktion 9 (grün) sowohl in FI-1 (A) als auch FI-4 (B) die höchste Fluoreszenzintensität.....	50
Abbildung 3.19. Lysosomen von BON-CIC-3-GFP-Zellen haben einen azidischeren pH als Lysosomen von BON-Zellen (A); Lysosomen von BON-CIC-3-GFP hoch-exprimierenden Zellen haben einen azidischeren pH als Lysosomen aus BON-CIC-3-GFP niedrig-exprimierenden Zellen (B).....	52
Abbildung 3.20. Inkubation in chloridfreiem Medium alkalisiert den pH in Lysosomen aus BON-Zellen (A); Inkubation in Gegenwart von Concanamycin A alkalisiert den pH in Lysosomen aus BON-Zellen (B).....	52

Abbildung 3.21. BON-Zellen exprimieren kein Pgp (A) oder MRP1 (B).....	54
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. NET-Klassifikation.....	1
Tabelle 1.2. Immunohistochemische neuroendokrine Marker.....	2
Tabelle 1.3. Zellen und Tumoren des diffusen neuroendokrinen Systems.....	2
Tabelle 1.4. humane CIC-Kanäle – Expression, Knockout-Modelle, Erbkrankheiten.....	9
Tabelle 2.1. Mischungsverhältnis der verschiedenen Dichtegradienten.....	27

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung	GRF	growth hormone releasing factor
ABC	ATP binding cassette	HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure
AML	Akute myeloische Leukämie	Lamp-1	lysosome-associated membrane protein-1
BCECF	Biscarboxyethyl)carboxyfluorescein	LDCV	large dense-core vesicle
BSA	Bovines Serumalbumin	MDR	Multidrug Resistance
bzw.	beziehungsweise	MEN	Multiple endokrine Neoplasie
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie	NET	Neuroendokriner Tumor
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	PBS	Phosphate-Buffered-Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PPI	Protonenpumpeninhibitor
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVDF	Polyvinylidenfluorid
ECL	Enhanced Chemo-luminiscence	RNA	Ribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	siRNA	Small interfering RNA
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraetat	SLMV	Synaptic-like microvesicle
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	SSC	Side-scatter
FACS	Fluorescence activated cell sorting	SSV	small synaptic vesicle
FCS	Fetal calf serum	UV	Ultraviolett
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	v-H⁺-ATPase	Vacuolar H ⁺ -ATPase
GEP-NET	Neuroendokriner Tumor des gastro-entreo-pankreatischen Systems	XTT	(2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid)
GERD	Gastroesophageal Reflux Disease	ZNS	Zentrales Nervensystem
GFP	green fluorescent protein		

1. Einleitung

1.1. Neuroendokrine Tumoren des Gastroenteropankreatischen Systems

1.1.1. Definition, Geschichte und Einteilung

Der Begriff *Neuroendokriner Tumor* (NET) umfasst eine heterogene Gruppe von Tumoren, welche potentiell maligne sind und deren Zellen Eigenschaften neuraler und endokriner Zellen aufweisen.

Oberndorfer prägte 1907 den Begriff *Karzinoide*, um eine morphologisch selbständige Gruppe intestinaler Tumoren von den in ihrem Verhalten aggressiveren und sehr viel häufigeren intestinalen Adenokarzinomen abzugrenzen (Oberndorfer, 1907).

Eine Einteilung der Tumoren entsprechend ihrem entwicklungsgeschichtlichen Ursprung wird seit 1963 angewandt (Williams & Sandler, 1963). Man unterscheidet Foregut- (Respirationstrakt, Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), Midgut- (unteres Jejunum, Ileum, Appendix und rechtes Kolon) und Hindgut-Karzinoide (linkes Kolon und Rektum). Seit dem Jahr 2000 werden in der WHO-Klassifikation die neutralen und umfassenden Begriffe des neuroendokrinen Tumors und des neuroendokrinen Karzinoms gewählt (Solcia, 2000). Im Einzelnen unterscheidet man zwischen dem hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor, mit dem sich ein benignes Verhalten verbindet, dem hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinom, welches durch ein niedrigmalignes Verhalten charakterisiert ist, und dem niedrig differenzierten (meist kleinzelligen) neuroendokrinen Karzinom, welches eine hohe Malignität aufweist (**Tabelle 1.1.**). Der Begriff des Karzinoids wurde nicht vollständig aufgegeben, sondern wird bei den gastroenteralen neuroendokrinen Tumoren synonym zum hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor verwendet.

WHO-Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET)
1a Hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor
1b Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom
2 Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom

Tabelle 1.1. NET-Klassifikation

In den letzten Jahren wurde unter Verwendung der Immunhistochemie die Diagnostik der NET wesentlich verfeinert. Es stehen zahlreiche neuroendokrine Marker zur Verfügung, die zur Charakterisierung der neuroendokrinen Differenzierung dieser Tumoren beitragen können.

Unter NET werden daher heute Tumoren zusammengefasst, welche immunhistochemisch eine neuroendokrine Differenzierung, d.h. mindestens einen der in **Tabelle 1.2.** angegebenen Marker, aufweisen oder bei denen sich elektronenmikroskopisch neuroendokrine Granula zeigen lassen (Hofler et al., 1997).

Zytoplasmatisch	Vesikulär	Granulär
NSE	Synaptophysin	Chromogranin A,B
PGP 9,5		Sekretogranin II, III, IV, V,
Neurofilament		Phe 5
		Ileu 6

Tabelle 1.2. Immunohistochemische neuroendokrine Marker

Entsprechend ihrer embryonalen Herkunft kann man NET in Tumoren epithelialen oder neuralen Ursprungs einteilen (**Tabelle 1.3.**(Hofler et al., 1997)).

	Ursprungsgewebe	Tumoren
Neural differenziert	Nebennierenmark	Phäochromozytom, Neuroblastom, Ganglioneuroblastom
	Paraganglien	Paragangliom
Epithelial differenziert	Neuroendokrine Zellen in Gastrointestinaltrakt, Pankreasinseln, Pankreasgangsystem, Bronchien und Lunge, ableitenden Gallenwegen, Leber, Mamma, Cervix, Ovar, Prostata etc.	Neuroendokrine Tumoren
	Merkel-Zellen der Haut	Merkelzell-Karzinom

Tabelle 1.3. Zellen und Tumoren des diffusen neuroendokrinen Systems

Des Weiteren unterscheidet man gemäß der klinischen Symptomatik funktionelle Tumoren, welche durch Sekretion eines zelltypischen Hormons oder Signalpeptids auffallen, von nonfunktionellen, welche dies nicht tun. Etwa die Hälfte aller NET ist funktionell aktiv (Tiling et al., 2002).

1.1.2. Epidemiologie

Neuroendokrine Tumoren treten in der Regel sporadisch auf und werden mit einer Inzidenz von etwa 1-2/100.000 Einwohner angegeben (Modlin et al., 2003). Man kann jedoch annehmen, dass ein Großteil der Patienten, bei fehlender Symptomatik und geringem Progress der Erkrankung, während ihres Lebens nicht diagnostiziert werden. So zeigt eine große schwedische Studie, in der die Inzidenz neuroendokriner Tumoren auf der Grundlage von Patientendaten, Autopsien bei 62,6% aller Todesfälle und chirurgisch gewonnenen Gewebeproben untersucht wurde, ein 4fach höheres Vorkommen an (Berge & Linell, 1976).

Etwa 64% der NET finden sich im Gastrointestinaltrakt, 28% in Lunge oder Bronchialsystem. Die meisten gastrointestinalen NET sind in Ileum oder der Appendix vermiformis lokalisiert (Modlin et al., 2003).

1.1.3. Ätiologie

Die meisten NET treten sporadisch auf, einige genetische Störungen werden mit einer erhöhten Inzidenz assoziiert. Die bekannteste ist die autosomal-dominant vererbte multiple endokrine Neoplasie (MEN-I), bei welcher die Patienten unter anderem in 80-100% der Fälle einen nonfunktionellen NET des Pankreas entwickeln. Weitere genetische Erkrankungen mit erhöhtem Risiko für neuroendokrine Tumoren sind das Hippel-Lindau-Syndrom, die Neurofibromatose Recklinghausen und die Tuberöse Sklerose (Harrison, 2004).

1.1.4. Klinik, Prognose und Therapie

Die klinische Symptomatik neuroendokriner Tumoren ist unterschiedlich und hängt vom Ursprungsort und der malignen Aussaat des Tumors ab. 40 bis 60% aller NET bleiben dabei ohne Symptome, was sich auch darin widerspiegelt, dass ein Teil der endokrinen Tumoren als Zufallsbefund im Rahmen von Appendektomien (1 von 250 Appendektomien) diagnostiziert wird (Collins, 1963; Lyss, 1988).

Bei funktionell aktiven Tumoren ergeben sich die Symptome aus der Wirkung des sezernierten Hormons oder Peptids. Das häufigste Syndrom ist dabei das klassische

Karzinoid-Syndrom, das in den meisten Fällen ein hepatisch metastasiertes Geschehen anzeigt und bei circa 4% der Patienten auftritt (Burke et al., 1997; Moertel et al., 1961). Die Symptome aufgrund erhöhter Serotoninspiegel sind anfallsartiger Flush, Diarrhöen, abdominelle Schmerzen, Klappenfibrosen vor allem der Trikuspidalklappe, asthmatische Beschwerden und periphere Ödeme. Eine andere Symptomatik findet sich entsprechend dem Hormonprodukt bei Gastrinomen, VIPomen, Insulinomen, Glukagonomen oder GRFomen.

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate aller NET wird mit $50\pm 6,4\%$ angegeben (Modlin & Sandor, 1997). Die Prognose variiert jedoch stark mit Ursprung und Lokalisation des Tumors.

Zahlreiche Faktoren wie Wachstumsindizes, Tumorgröße und Differenzierung sind zur Einschätzung von Überlebensrate und Aggressivität des Tumors relevant. Einer der Wichtigsten ist dabei das Vorhandensein von Lebermetastasen. So beträgt bei Gastrinomen die 5-Jahres-Überlebensrate ohne Lebermetastasen 98%, bei Metastasierung in nur einen Leberlappen 78% und bei diffuser Metastasierung 16% (Modlin & Sandor, 1997).

Die Therapie der Wahl mit kurativem Ansatz bei NET ist die chirurgische Exstirpation. Bei funktionellen neuroendokrinen Tumoren kommen zusätzlich vor allem langwirksame Somatostatinanaloga (Octreotid) zur Coupierung der hormonvermittelten Symptomatik zum Einsatz (Kulke & Mayer, 1999).

Eine pharmakologische Inhibition des Wachstums ist mit Interferon- α und Octreotid möglich (Faiss et al., 2003; Janson & Oberg, 1993).

Eine randomisierte Multicenter-Studie aus dem Jahr 2003 zeigte, dass das Somatostatinanalogon Lanreotid, Interferon- α oder auch die Kombination der beiden Substanzen vergleichbare antiproliferative Effekte bei der Behandlung metastasierter GEP-NET haben, unabhängig von ihrer Funktionalität (Faiss et al., 2003).

Bei hepatischer Metastasierung und fehlender chirurgischer Therapieoption führt die arterielle Chemoembolisation in mehr als 50% zur vorübergehenden Tumorregression (Eriksson et al., 1998; Ruzniewski & O'Toole, 2004).

Neuere Therapieansätze machen sich die hohe Somatostatinrezeptordichte auf NET zu Nutze und versuchen die gezielte Zerstörung neuroendokriner Tumorzellen mit radioaktiv markierten Somatostatinanaloga (Buscombe et al., 2003; Krenning et al., 2005). Die hohe Rezeptor- und damit auch Tumoraffinität bietet dabei hohe

Wirksamkeit bei geringer Gesamtoxizität. Bei inoperablen oder metastasierten NET findet diese Therapieform Anwendung.

Die Erfolge der Chemotherapie bei gut differenzierten NET gelten als unbefriedigend, die Interpretation der Studien zur Chemotherapie neuroendokriner Tumoren wird durch die oft nur geringe Größe des Patientenkollektivs und die Inkonsistenz von Tumorentität und Differenzierungsgrad erschwert (Oberge, 2001; Syrigos et al., 2002). Die Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie ist bei anaplastischen, schnell wachsenden Tumoren im Allgemeinen größer als bei NET von guter Differenzierung und langsamem Wachstum. Pankreatische NET wiederum sprechen besser auf Zytostatika an, als NET des übrigen Gastrointestinaltrakts (Arnold et al., 2005).

Monotherapien mit 5-Fluorouracil, Streptozotozin oder Doxorubicin weisen Ansprechraten bis circa 20% auf (Moertel, 1983). Die Therapie mit einer Kombination von Streptozotozin und Doxorubicin erreicht bei NET des Pankreas Ansprechraten von bis zu 60% (Moertel et al., 1992). Die Gabe von Etoposid in Kombination mit einer Platinsubstanz ist ein Therapieschema, welches bei der Behandlung von niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen zur Anwendung kommt (Fjallskog et al., 2001; Hainsworth et al., 2006; Kulke & Mayer, 1999; Mitry et al., 1999; O'Toole et al., 2004; Rougier & Mitry, 2000). Obwohl die Ansprechraten bei signifikanter Tumorregression zufriedenstellend sind, entwickeln die meisten der Tumoren schnell Resistenzen gegen die Chemotherapie, die zum Fortschreiten der Erkrankung führen.

1.2. Multidrug Resistance (MDR)

1.2.1. Allgemeines

Multidrug Resistance (MDR) beschreibt das Phänomen, dass Tumorzellen gegen eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Chemotherapeutika Resistenzen haben bzw. entwickeln.

Die Ursachen für MDR finden sich auf allen Ebenen des zellulären Metabolismus. Die Hauptmechanismen bestehen dabei in der

- Beeinflussung des Transports durch erhöhten Substratausstrom bzw. erniedrigte Aufnahme der Substanz in die Zelle,
- Intrazellulären Abgrenzung der Substanz vom Wirkort,

- Veränderung am Wirkort
- Reduzierten Aktivierung oder erhöhten Deaktivierung der Substanz.

Die am meisten erforschte Beobachtung bei MDR ist die erniedrigte zelluläre Akkumulation von Chemotherapeutika. So zeigen zahllose Untersuchungen einen verminderten Influx, erhöhten Efflux oder eine verstärkte Sequestration der Substanz in subzellulären Kompartimenten (Beck et al., 1983; Chauhan et al., 2003; Coley et al., 1989; Dano, 1973; Hurwitz et al., 1997; Lee & Tannock, 2006; Ling & Thompson, 1974; Rajagopal & Simon, 2003; Schindler et al., 1996; Skovsgaard, 1978; Stow & Warr, 1993; Versantvoort et al., 1992).

1.2.2. ABC-Transporter

Eine wichtige Rolle bei der durch verstärkten Efflux vermittelten MDR spielen sogenannte ABC-Transporter (ATP binding cassette transporter), deren bekanntester Vertreter das Pgp (P-glycoprotein) ist (Juliano & Ling, 1976; Szakacs et al., 2006). Sie erwirken durch primär aktiven Transport die Ausschleusung toxischer Substanzen über die Plasmamembran. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine dieser Familie nicht nur auf der Plasmamembran exprimiert werden, sondern MDR ebenso durch aktiven Transport von Zytostatika in intrazelluläre Vesikel vermitteln können (Molinari et al., 2002; Rajagopal & Simon, 2003).

Trotz eindeutiger Ergebnisse aus *in vitro*-Studien ist die klinische Relevanz der Expression von Pgp für die Chemotherapie-Resistenz *in vivo* bei Fehlen universal akzeptierter Richtlinien für die analytische oder klinische Validierung einerseits und bei der Heterogenität Pgp- und nicht Pgp-vermittelter Resistenzmechanismen andererseits schwer zu beurteilen (Leonard et al., 2003).

Eine Meta-Analyse von 31 Brustkrebsstudien demonstrierte eine 3fache Reduktion der Ansprechrate auf Chemotherapie bei Pgp-exprimierenden Tumoren (Trock et al., 1997). Bei akuter myeloischer Leukämie (AML) konnte erhöhte Pgp-Expression als Determinante verminderter Ansprechraten auf Chemotherapie und reduzierter Überlebensraten gezeigt werden (Pallis & Russell, 2004; van der Holt et al., 2005).

Klinische Studien mit spezifischen Inhibitoren können diesen Wert von Pgp als prognostischer Marker jedoch kaum in eine therapeutische Anwendbarkeit übersetzen. Seit 1992 konnten in über 20 abgeschlossenen Phase III-Studien mit

Pgp-Inhibitoren nur sehr vereinzelt Verbesserungen von Überlebensrate oder Rate an kompletter Remission festgestellt werden (Szakacs et al., 2006).

Im Gegensatz zu Pgp existieren für andere ABC-Transporter nur wenig aussagekräftige Daten zur Beurteilung ihrer klinischen Relevanz.

MRP1 ist kein signifikanter Faktor für Chemotherapie-Resistenz in AML und sein prognostischer Wert in CLL, Mamma- und Bronchialkarzinom ist widersprüchlich (Berger et al., 2005; Filipits et al., 2005; Leith et al., 1999).

Es liegen keine Daten zur klinischen Anwendbarkeit spezifischer MRP1-Inhibitoren vor.

1.2.3. pH und MDR

Die vermehrte Sequestration von Chemotherapeutika in azidischen Organellen ist ein weiterer Resistenzmechanismus bei MDR.

Die meisten Zytostatika sind schwach basische Substanzen mit pK-Werten zwischen 7,4 und 9,8 (O'Neil, 2001). In Ihrer neutralen Form sind sie lipophil und membrangängig. In saurem Milieu werden sie protoniert und sind dann durch ihre Ladung nicht mehr in der Lage, Membranen zu passieren. Dies führt dazu, dass sich basische Chemotherapeutika in ihrer protonierten Form in sauren Organellen wie Lysosomen, Endosomen oder dem Golgi-Apparat anreichern und nicht mehr am eigentlichen Wirkort, meist dem Nukleus, verfügbar sind. Der Grad der Anreicherung wird dabei durch den pH-Gradienten zwischen Zytosol und Organelle einerseits und dem pK der Substanz andererseits bestimmt.

Tatsächlich ist der zytosolische pH in MDR-Zellen oft alkalischer als in Chemotherapie-sensitiven Zellen (Keizer & Joenje, 1989; Thiebaut et al., 1990). Andere Studien zeigen beim Vergleich von resistenten Zellen mit chemosensitiven Zellen einer Zelllinie einen erniedrigten pH in Organellen der resistenten Zellen (Altan et al., 1998; Schindler et al., 1996). Beide Zustände vergrößern den pH-Gradienten über der Vesikelmembran und begünstigen eine intravesikuläre Anreicherung schwach basischer Substanzen.

Mehrere Studien zeigen, dass die gezielte medikamentöse Neutralisierung des lysosomalen pH zur Chemosensitivierung gegenüber schwach-basischen

Chemotherapeutika wie Daunomycin, Doxorubicin, Mitoxantron und Topotecan führt (Altan et al., 1999; Lee & Tannock, 2006; Ouar et al., 2003; Petrangolini et al., 2006). Eine weitere Untersuchung demonstriert, dass die Vorbehandlung von Tumorzelllinien mit den klinisch als Antazida verwendeten Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol oder Pantoprazol den pH im intrazellulären azidischen Kompartiment alkalisiert und die Empfänglichkeit für die Therapie mit Cisplatin, 5-FU und Vinblastin erhöht. In dieser Studie konnte dieser Effekt für Cisplatin sogar in *in vivo*-Experimenten aufgezeigt werden (Luciani et al., 2004).

Die Behinderung vesikulärer Azidifizierung könnte dementsprechend ein künftiges Ziel für die Verbesserung der Chemotherapie von Tumoren sein. Insbesondere der in der Therapie neuroendokriner Karzinome verwendete Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid (siehe Kapitel 1.1.4) ist mit einem pK von 9,8 in seiner intrazellulären Verteilung stark abhängig von der pH-Differenz zwischen intrazellulären Organellen und Zytosol (O'Neil, 2001).

1.3. CIC-Kanäle und CIC-3

1.3.1. CIC-Chlorid-Kanäle

CIC-Proteine stellen eine Familie von 9 bisher bekannten Chlorid-Kanälen dar. Sie finden sich in fast allen pro- und eukaryotischen Zellen und sind in der Plasmamembran oder der Membran intrazellulärer Vesikel lokalisiert. Die einzelnen Mitglieder sind für viele verschiedene physiologische Prozesse wie Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, Ionentransport oder vesikuläre Azidifizierung von Bedeutung. Wenigstens 4 humane Erbkrankheiten lassen sich auf Defekte in CIC-Proteinen zurückführen (Jentsch et al., 2005a; Jentsch et al., 2005b).

Unter den CIC-Proteinen bilden die Kanäle CIC-3, CIC-4 und CIC-5 eine Subgruppe mit 80%iger Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Steinmeyer et al., 1995). Diese Kanäle sind vornehmlich in intrazellulären Organellen lokalisiert. Eine Übersicht über die 9 CIC-Kanäle in Säugetieren gibt **Tabelle 1.4.** (Jentsch et al., 2005a; Jentsch et al., 2005b).

	Spezifische Gewebeexpression	Intrazelluläre Expression	Knockout-Maus-Model	Humane Erbkrankheit
CIC-1	Skelettmuskel	Plasmamembran	Myotonie	Myotonia congenita Thomsen
CIC-2		Plasmamembran	Degeneration von Testes und Retina	Idiopathische generalisierte Epilepsie
CIC-Ka	Niere und Ohr	Plasmamembran	Diabetes Insipidus	Barter-Syndrom
CIC-Kb	Niere und Ohr	Plasmamembran		
CIC-3	Vorwiegend Nervensystem	Endosomen, synapt. Vesikel	Hypocampus-Degeneration, Blindheit	
CIC-4		Endosomen		
CIC-5	Niere und Darm	Endosomen	Proteinurie	Dent'sche Erkrankung
CIC-6		Endosomen		
CIC-7		Späte Endosomen und Lysosomen	Osteopetrose, Blindheit, lysosomale Speicherkrankheit	Maligne Osteopetrose

Tabelle 1.4. humane CIC-Kanäle – Expression, Knockout-Modelle, Erbkrankheiten (Jentsch et al., 2005a; Jentsch et al., 2005b; Weylandt et al., 2001)

1.3.2. CIC-3

Das CIC-Protein CIC-3 findet sich vorwiegend in Zellen des zentralen Nervensystems und wird in azidischen intrazellulären Vesikeln exprimiert (Li et al., 2002; Weylandt et al., 2001). Seine vermutliche Funktion besteht in der Unterstützung vesikulärer Azidifizierung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Azidifizierung sekretorischer Insulin-Granula in pankreatischen β -Zellen – ein entscheidender Schritt bei der Bahnung der Sekretion – die simultane Chloridaufnahme durch CIC-3 erfordert (Barg et al., 2001).

Eine andere Studie demonstrierte, dass die Überexpression von CIC-3 in CHO-K1- und HUH-7-Zellen eine erhöhte Azidifizierung von Lysosomen bewirkt (Li et al., 2002). Andersherum ist der lysosomale pH von Hepatozyten CIC-3-defizienter Mäuse weniger sauer und das intralysosomale Milieu chloridärmer als in Wild-Typ-Hepatozyten (Hara-Chikuma et al., 2005). Die homologen, ebenfalls in intrazellulären Vesikeln exprimierten CIC-Proteine CIC-4 und CIC-7 spielen ebenfalls eine Rolle bei Sekretionsprozessen und der Modulation des pH intrazellulärer Kompartimente (Jentsch et al., 2005b; Kasper et al., 2005; Mohammad-Panah et al., 2003).

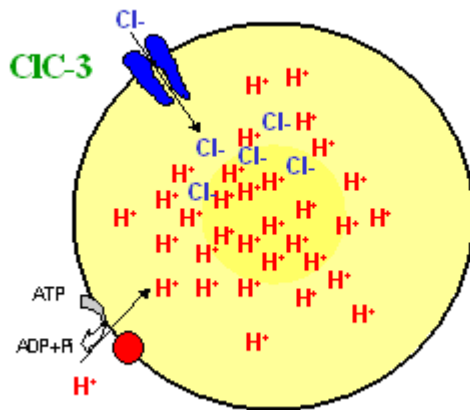


Abbildung 1.1. Vesikuläre Ansäuerung und CIC-3, schematische Darstellung einer intrazellulären Organelle

Der Chlorid-Kanal CIC-3 ermöglicht einen passiven Anioneneinstrom in die Organelle, der dem Aufbau eines zu hohen elektrochemischen Gradienten entgegenwirkt und so die Arbeit der v-H⁺-ATPase erleichtert.

Wie wird die Azidifizierung azidischer Kompartimente durch Chloridströme beeinflusst?

Der azidische pH in intrazellulären Vesikeln wird durch Aktivität einer v-H⁺-ATPase bewirkt. Protonentransport über die Membran resultiert in einer positiven Ladung intravesikulär, welche die weitere Ansäuerung erschwert. Der passive Einstrom von Chlorid reduziert den sich aufbauenden elektrochemischen Gradienten und erleichtert so die Azidifizierung der Organelle (**siehe Abbildung 1.1.**). Dass Chlorideinstrom die vesikuläre

Azidifizierung begleitet, ist ein seit mehr als 20 Jahren bekanntes Phänomen (Glickman et al., 1983). Lokalisationsstudien und funktionelle Experimente legen nahe, dass CIC-3 an der Bereitstellung dieses Shunts zur Verringerung des elektrochemischen Gradienten in Endosomen und Lysosomen zumindest beteiligt ist (Barg et al., 2001; Hara-Chikuma et al., 2005; Li et al., 2002).

Neu ist die Entdeckung, dass die strukturhomologen CIC-4, CIC-5 und vermutlich auch CIC-3 nicht ausschließlich Chlorid-Kanäle sind, sondern auch als Cl⁻-H⁺-Austauscher funktionieren (Picollo & Pusch, 2005; Scheel et al., 2005). Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die funktionelle Bedeutung intrazellulärer CIC-Kanäle müssen im Licht neuer Untersuchungen bewertet werden.

1.4. Aufgabenstellung

Die Beeinflussung des intravesikulären pH als Maßnahme zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapie ist häufiger Gegenstand experimenteller Forschung (siehe Kapitel 1.2.3.). Die meisten Studien konzentrieren sich dabei auf die Rolle der vesikulären Protonenpumpe. Ein Anionenshunt zur Nivellierung der

elektrochemischen Potentialdifferenz ist jedoch ebenso für die suffiziente Anreicherung von Protonen in intrazellulären Kompartimenten notwendig.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob der Chloridkanal CIC-3 in neuroendokrinen Tumorzellen in der Rolle dieses vesikulären Anionenshunts die vesikuläre Azidifizierung beeinflusst und damit auch die Resistenz der Zelle gegenüber schwach basischen Zytostatika vergrößert. Es sollte insbesondere das Resistenzverhalten bezüglich des Topoisomerase-II-Inhibitors Etoposid untersucht werden, da Etoposid eine Substanz mit hohem pK (9,8) ist und standardmäßig in der Therapie niedrig differenzierter neuroendokriner Karzinome verwendet wird (Fjallskog et al., 2001; Hainsworth et al., 2006; Mitry et al., 1999; O'Neil, 2001; O'Toole et al., 2004; Rougier & Mitry, 2000).

Die notwendigen Experimente wurden im Vorfeld der Arbeit in folgenden Einzelaufgaben geplant:

1. Es ist bekannt, dass CIC-3 in Zellen des ZNS und in Phäochromozytomzellen exprimiert wird (Li et al., 2002; Salazar et al., 2004; Weylandt et al., 2001). Wichtige Voraussetzung der Arbeit ist, dass sich CIC-3 auch in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON, LCC-18 und QGP-1 mittels Western Blot nachweisen lässt.
2. Eine intrazelluläre Lokalisation von CIC-3 in der Membran azidischer Vesikeltypen wird von verschiedenen Autoren aufgezeigt (Barg et al., 2001; Hara-Chikuma et al., 2005; Li et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit soll die intrazelluläre Lokalisation von CIC-3 in neuroendokrinen Zelllinien anhand von immunhistochemischen Kolokalisationsstudien mit der CIC-3-GFP-überexprimierenden Zelllinie BON-CIC-3-GFP erfasst werden.
3. Der Einfluß von CIC-3 auf den pH im intrazellulären azidischen Kompartiment soll untersucht werden. Dazu wird mit einer geeigneten Methode der intravesikuläre pH von BON mit BON-CIC-3-GFP-Zellen und von HEK293 mit HEK293-CIC-3-GFP, einem CIC-3-GFP-überexprimierenden Klon, verglichen.
4. Des Weiteren soll der Einfluß vermehrter CIC-3-Expression in neuroendokrinen Tumorzellen auf die Chemotherapieresistenz gegenüber Etoposid überprüft werden. Die Toxizität des schwach basischen Zytostatikums wird durch den Vergleich von BON-CIC-3-GFP Zellen mit hoher CIC-3-GFP Expression gegenüber BON-CIC-3-GFP Zellen mit niedriger CIC-

3-GFP Expression in einem Proliferationstest gemessen. Ebenso sollen HEK293-CIC-3-GFP-Zellen mit unterschiedlichem Niveau der CIC-3-GFP-Expression verglichen werden.

5. Verschiedene Autoren berichten über Alkalisierung des lysosomalen/endosomalen pH mit spezifischen Inhibitoren der vesikulären v-H⁺-ATPase oder Protonenpumpeninhibitoren (PPI) wie Pantoprazol. Die Autoren demonstrieren, dass dieser Effekt die Chemosensitivität gegenüber schwach basischen Zytostatika beeinflusst (Lee & Tannock, 2006; Luciani et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des spezifischen v-H⁺-ATPase-Inhibitors Concanamycin A und der PPI Pantoprazol und Omeprazol auf den vesikulären pH einerseits und die Sensitivität gegenüber Etoposid andererseits in den neuroendokrinen Zelllinien BON-CIC-3-GFP und LCC-18 geprüft werden.
6. Es soll der Versuch unternommen werden, intakte Lysosomen aus der neuroendokrinen Zelllinie BON und dem CIC-3-GFP-Überexpressor BON-CIC-3-GFP zu isolieren und in funktionellen Experimenten bezüglich ihres pH miteinander zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterial

Deckgläser 22mm	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Gefrier Röhrchen	Nunc, Hereford, UK
Corning-Pipetten Stripette 5-, 10-, 20ml	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Oxford, UK
Falcon-Reagenzröhrchen 15-, 50ml	BD Biosciences, Oxford, UK
Kodak XOMATor BioLight X-ray	Kodak, Rochester, USA
Pipettenspitzen steril 2-, 10-, 100-, 1000µl	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
PVDF Membranen	Millipore, Watford, UK
Whatman Filter-Papier	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Zellkulturflaschen 25-, 75-, 175cm ²	Nunc Nalge Hereford, UK
Zellkulturplatten 6-, 96-Loch	Nunc Nalge Hereford, UK

2.1.2. Geräte

Confokales Mikroskop SP1	Leica, Milton Keynes, UK
100x/1.4 NA PlanApoChromat- Öl-Immersion-Objektiv	Zeiss, Jena, Deutschland
FACScan	BD Biosciences, Oxford, UK
FACS-Diva	BD Biosciences, Oxford, UK
FACScalibur	BD Biosciences, Oxford, UK
L8-70M Ultrazentrifuge	Beckman, High Wycombe, UK
Microplate Reader	Molecular Devices, Wokingham, UK
Micro-Osmometer	Camlab, Cambridge, UK
Mini Protean III Apparat	Biorad, Hemel Hempstead, UK
Semi dry western transfer chamber	Biometra, Glasgow, UK
SW50.1 rotor	Beckman, High Wycombe, UK
TL-100 Tabletop Ultrazentrifuge	Beckman, High Wycombe, UK
TLA100.2 rotor	Beckman, High Wycombe, UK
Ultra turrex T-8 homogenizer	IKA, Staufen, Deutschland

2.1.3. Chemikalien und andere Reagenzien

Acridin Orange	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Alexa 568-Sekundärantikörper	Molecular Probes, Carlsbad, USA
Biorad Dc Protein Assay	Biorad, Hemel Hempstead, UK
CaCl ₂	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Ca-Glukonat	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Chromogranin A-Antikörper DAK-A3	Dako, Ely, UK
Ciprobay	Bayer, Leverkusen, D

CIC-3 –Antikörper	(Weylandt, 2000)
Concanamycin A	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Cy5-Sekundärantikörper	Abcam, Cambridge, UK
DAPI	Molecular Probes, Paisley, UK
DMEM	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
DMEM/Ham's F-12 1:1	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
DMSO	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
EDTA	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
EGTA	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Ethidiumbromid	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Etoposid	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Facs Flow	BD Biosciences, Oxford, UK
FCS	Helena Biosciences, Tyne & Wear, UK
Geneticin (G418)	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Glukose	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
HCl	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
HEPES	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
HITES	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
Horseradish peroxidase- Sekundärantikörper Dako P0447	Dako, Ely, UK
KCl	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
KOH	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
K-Glukonat	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Lamp-1-Antikörper	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Lysosome Isolation Kit	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Mannitol	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Methylenblau	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
MRP1-Antikörper MRPm5	Abcam, Cambridge, UK
MgCl ₂	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
MgATP	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
NaCl	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Omeprazol	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Pantozol	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
PBS	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
P-Glykoprotein-Antikörper C219	Dako, Ely, UK
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
SDS	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Synaptophysin-Antikörper	Geschenk von C. Grötzinger, Berlin, D
TOTO-3-Iodid	Molecular Probes, Paisley, UK
Triton-X	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Tris-HCl	Sigmaaldrich, Gillingham, UK
Trypsin	Gibco/Invitrogen, Paisley, UK
Vectashield-Einbettmedium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
XTT-Kit	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

2.1.4. Software

Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, USA
Cellquest®	BD Biosciences, San Jose, USA

Flowjo®
Metamorph®
SigmaPlot®

Tristar, San Carlos, USA
Universal Imaging, Downingtown, USA
Systat Software, San Jose, USA

2.2. Zellkultur

2.2.1. Allgemeines

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Es wurden Zellkulturflaschen mit den Bodenflächen 25cm², 75cm² und 175cm² verwendet. Vor jedweder Manipulation an den Zellen wurden die benötigten Flüssigkeiten auf 37°C vorgewärmt. Alle Arbeiten an nicht geschlossenen Kulturgefäßen fanden zum Schutz vor Kontamination unter einer sterilen Zellkulturbank statt. Der Zustand der Zellen wurde täglich makroskopisch und unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.2.3. Passagierung

Bei den adhärent wachsenden Zelllinien BON und HEK 293 und LCC-18 wurde der Zellrasen bei Erreichen einer Oberflächenabdeckung von circa 80% vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und 1:4 in neue Flaschen mit frischem Medium überführt. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden daraufhin durch vorsichtiges Einlassen, Schwenken und Absaugen mit 10ml PBS gewaschen. Der Flaschenboden wurde dann mit 2ml Trypsin benetzt, überflüssiges Trypsin wurde wieder abgesaugt. Nach circa 5min Warten konnten die Zellen unter vorsichtigem Klopfen an den Flaschenrand abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt werden.

2.2.4. Einfrieren

BON, LCC-18 und HEK293 können in einem Gemisch aus DMSO: FCS im Verhältnis 1:10 in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Dazu wurden die Zellen, wie beschrieben, aus der Kulturflasche entnommen und in 15ml-Reagenzröhrchen der Firma Falcon bei 1000U/min 2min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde die zentrifugierte Zellmasse einer Kulturflasche in 1,5ml DMSO/FCS

resuspendiert, in Gefrierröhrchen aliquotiert, 24h bei -20°C tiefgefroren und dann in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank zur weiteren Lagerung überführt.

2.2.5. Auftauen

Das Gefrierröhrchen mit dem Aliquot wurde dem Stickstofftank entnommen und in einfaches Wasser mit Raumtemperatur getaucht. Nach circa 60s hatte sich die Zellsuspension verflüssigt, wurde in 15ml Medium resuspendiert und konnte in eine 25cm^2 Zellkulturflasche überführt werden. Diese wurde für 48h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.6. Kulturmedien, Passagezeiten, Herkunft der Zelllinien

BON

Die 1986 erstmals kultivierte Zelllinie BON entstammt dem neuroendokrinen Pankreastumor eines 28jährigen Patienten. *In vitro* wird die Verdopplungszeit mit 60h angegeben (Evers et al., 1991). Die BON-Zellen wurden in einem DMEM- und HAM's F12 Mediumgemisch (1:1), mit Zusatz von 10% FCS und $10\mu\text{g/ml}$ Ciprofloxacin kultiviert.

LCC-18

Die Zelllinie wurde 1991 erstmals beschrieben. Sie entstammt einem neuroendokrinen differenzierten Kolonkarzinom. Der Zeitraum der Zellzahlverdopplung betrug circa 24h (Lundqvist et al., 1991). Das Zellkulturmedium für die Zelllinie LCC-18 besteht aus 500 ml RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, $10\mu\text{g/ml}$ Ciprofloxacin, $1,81\mu\text{g}$ Hydrokortison, $665\mu\text{g}$ Insulin, 20 mg Transferrein, $0,54\mu\text{g}$ Estradiol und $1,93\mu\text{g}$ Natriumselenit (HITES-Medium).

HEK293

Die HEK293-Zelllinie stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (**H**uman **E**mryonal **K**idney Cells), die durch den DNA haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden (Graham et al., 1977). Die Verdopplungszeit beträgt *in vitro* circa 24h. Die HEK293-Zellen wurden in DMEM mit Zusatz von 10% FCS und $10\mu\text{g/ml}$ Ciprofloxacin kultiviert.

Transgene Zelllinien

Die Herstellung eines BON- und eines HEK293-Zellklons, welche ein CIC-3-GFP-Plasmid stabil exprimieren, wurde von Dr. Karsten Weylandt durchgeführt (Weylandt, 2000; Weylandt et al., 2001). Sie wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie BON- und HEK293-Zellen. Für den Erhalt stabiler Expression des Plasmids wurden die Zellen permanent in Gegenwart von Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von 500µg/ml kultiviert.

Die überexprimierenden Klone werden im Folgenden als BON-CIC-3-GFP bzw. HEK293-CIC-3-GFP bezeichnet.

2.3. Konfokale Mikroskopie

2.3.1. Deckgläser

Deckgläser mit 22mm Durchmesser wurden in reines Ethanol getaucht, unter sterilen Bedingungen getrocknet und jeweils eine Glasscheibe in ein Loch einer 6-Loch-Platte getan. Steriles, 0,1%iges Poly-L-Lysin wurde hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3mal Waschen mit PBS waren die Deckgläser bereit für die Zellaussaat.

2.3.2. Immunfärbung

Für die immunzytochemische Darstellung wurden Zellen des CIC-3-GFP überexprimierenden BON-Zellklons BON-CIC-3-GFP auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Nach 48h Kultur wurden die Zellen 30min in 4% Formaldehyd in PBS fixiert. In den folgenden Wasch- und Inkubationsschritten wurde darauf geachtet, dass die Zellen niemals austrockneten.

Die Deckgläser wurden 3mal mit PBS, dann 3mal mit 0,2% Fischhaut-Gelatine in PBS und wieder 3mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zum Zwecke der Permeabilisation mit 0,1% Triton X-100 für 4min inkubiert und wieder 3mal in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper für 12h bei 4°C: Chromogranin-A-Ak (1:200, DAK-A3, Dako®); Synaptophysin-Ak (zur Verfügung gestellt von C. Grötzinger, Charite, Berlin); Lamp-1-Ak (1:50, 1D4B Santa Cruz). Der verwendete Sekundärantikörper war mit dem

Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 (1:600, Invitrogen) konjugiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; 15 mg/ml; 1:10 000).

Die Zellen wurden dann in Vectashield Mounting Medium eingebettet und mit Nagellack verschlossen.

Bei der supravitalen Darstellung azidischer Kompartimente wurden die Deckgläser in eine Perfusionskammer überführt und unter dem konfokalen Mikroskop erst mit Acridin Orange und dann, nach Permeabilisierung mit Triton X-100 0,1%, mit DAPI gefärbt.

2.3.3. Mikroskopie

Die Darstellung der Zellen erfolgte mit einem Leica SP1 Confocal Mikroskop, welches mit einem 100x/1.4 NA PlanApoChromat Öl-Immersion-Objektiv ausgerüstet war. GFP wurde mit dem 488nm Argon Laser und Alexa 568 mit 568nm eines Krypton Lasers angeregt. Die Emission von GFP wurde bei 500-552nm, von Alexa 568 bei 594-620nm abgelesen. Um ein Überlappen der Emissionsspektren zu vermeiden erfolgte die Exzitation sequentiell. DAPI zur Darstellung der Nuklei wurde mit einem UV-Laser von 351nm angeregt und bei 396-508nm detektiert. Die beiden Darstellungen von GFP und der Immunfärbung wurden digital überlagert.

Bei der supravitalen Färbung erfolgte zuerst die Visualisierung des GFP. Dann wurde das Medium in der Perfusionskammer durch Medium mit 10µM Acridin Orange ausgetauscht und nach 5min Wartezeit bei 488nm angeregt und im roten Wellenlängenbereich von 670-723nm eingelesen. Daraufhin wurde das Medium durch 0,1%iges Triton X-100 ausgetauscht und mit DAPI angefärbt. Die Darstellung erfolgte durch Exzitation bei 351nm und Detektion des Signals im Wellenlängenbereich 396-508nm. Die 3 Sequenzen wurden digital überlagert.

2.4. Durchflußzytometrie

2.4.1. Allgemeines

Die Zellen wurden mit dem Facscalibur (BD) analysiert. Das Instrument verfügt über 2 Laser mit 488nm und 633nm Wellenlänge. Die Fluoreszenzemission bei 488nm

Exzitation wurde in den Kanälen FI-1 (530nm±15nm), FI-2 (585±21nm) und FI-3 (>670nm) detektiert. Die Emission bei 633nm Exzitation wurde in FI-4 (661nm±8nm) abgelesen. Als Laufpuffer wurde Facs Flow™ verwendet. Die Proben wurden bei Flussrate medium gefahren, die Daten mit der Software Cellquest® gesammelt. Die Instrumenteinstellungen zu Signal und Signalverstärkung wurden bei Beginn einer Experimentreihe festgesetzt, gespeichert und fortan für dieses Experiment ständig verwendet. Die Datenanalyse erfolgte offline mit der Software Flowjo®.

2.4.2. Lamp-1-Färbung

Das Ausmaß des lysosomalen/endosomalen Kompartiments verschiedener Zellpopulationen wurde durch Darstellung der Expression des lysosomalen Markerproteins Lamp-1 bestimmt.

BON- oder HEK293-Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert, in frischem Medium in ein Reagenzröhrchen überführt und bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Resuspension in 2ml PBS mit 10% FCS erfolgte die Fixation durch tropfenweise Zugabe von 10ml – 20°C kaltem 70%igem Methanol. Nach 5min Inkubationszeit wurde die Lösung zentrifugiert und die Zellmasse am Boden des Reagenzröhrchens in 10ml PBS mit 0,2% Fischhautgelatine resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde 2mal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Zellmasse in 1ml PBS mit 10% FCS aufgelöst, der Lamp-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology®; H4A3; 1:50 Verdünnung) hinzugegeben und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. In der Kontrollgruppe wurde dieser Färbeschritt ausgelassen. Danach wurde erneut 3mal mit 10ml 0,2% Fischhautgelatine in PBS gewaschen und die Zellmasse anschließend wieder in 1ml FCS-PBS aufgelöst. Es erfolgte die Hinzugabe des Cy5-konjugierten Sekundärantikörpers (Abcam; ab6563; 1:400 Verdünnung). Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung erneut 3mal gewaschen, die Zellmasse in FCS-PBS aufgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben sofort im Durchflußzytometer untersucht. Mit der Kontrollgruppe für dieses Experiment wurde ebenso verfahren, einzig die Färbung mit dem Primärantikörper wurde ausgelassen.

Die Durchflußzytometrie wurde am Facscalibur (BD) durchgeführt. Die Zellen wurden durch den 635nm Red-Diode-Laser angeregt und ihre Fluoreszenz in FI-4 (661nm±8nm) detektiert. Dadurch wurde Überlagerung mit dem GFP-Signal

ausgeschlossen. Mindestens 30 000 Zellen wurden je FACS-Röhrchen gezählt. Die Auswertung der Daten und Darstellung als Fluoreszenzhistogramme erfolgte offline mit Flowjo®.

2.4.3. Prinzip der pH-Messung mit Acridin Orange

Acridin Orange ist ein fluoreszentes, membrangängiges, schwach basisches Amin. Durch Protonierung in saurem Milieu verliert es Lipophilie und damit Membrangängigkeit und kann sich so in azidischen Vesikeln von Zellen anreichern (Palmgren, 1991). Bei höheren Acridin Orange-Konzentrationen führt die spontane Formation von Di- und Oligomeren zur Verschiebung der Fluoreszenzemission vom grünen in den langwelligen roten Wellenlängenbereich (Millot et al., 1997). Die Akkumulation im azidischen Kompartiment hängt dabei von der extrazellulären Konzentration der Substanz ab und ist proportional zur Größe des pH-Gradienten über der Membran. Wenn mehr als eine Membran das intravesikuläre Milieu vom extrazellulären trennen, so ist die Akkumulation proportional zum Netto-pH-Gradienten. Wird der extrazelluläre pH konstant gehalten, dann ist die intravesikuläre

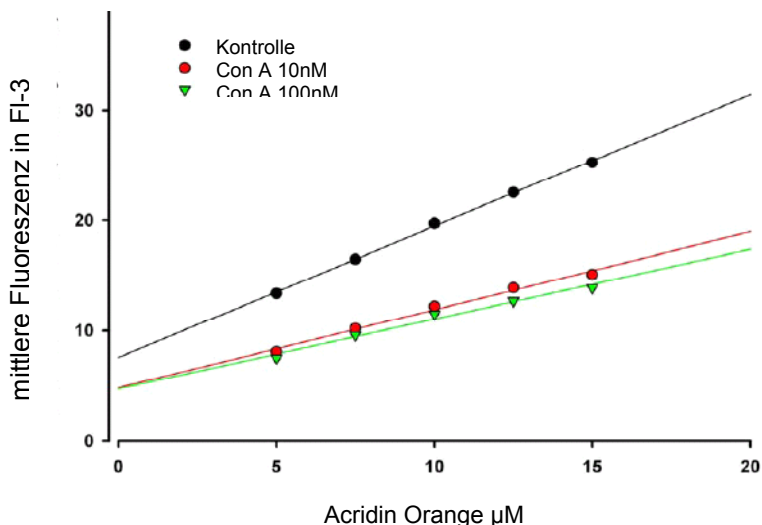


Abbildung 2.1. HEK293 Zellen nach Behandlung mit dem selektiven v-H+ATPase-Inhibitor Concanamycin A (ConA)

Die Alkalisierung des lysosomalen pH bewirkt einen geringeren Anstieg der Beziehung zwischen extrazellulärer Acridin Orange-Konzentration (X) und der gemessenen Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (Y).

Acridin Orange-Konzentration proportional zur extrazellulären (Dzekunov et al., 2000). Bei gegebener extrazellulärer Acridin Orange Konzentration und der Rotfluoreszenz als Maß für die intravesikuläre Konzentration sowie bei definiertem extrazellulärem pH kann also auf den transzellulären pH-Gradienten rückgeschlossen

werden. Unterschiede in der Azidität intrazellulärer Organellen können bestimmt werden, indem die Steigung der Beziehung zwischen extrazellulärer Acridin Orange-Konzentration und gemessener Fluoreszenz im roten Bereich bestimmt wird. Dies

wird durch den in **Abbildung 2.1.** dargestellten Unterschied in der Steigung der Gerade nach Behandlung mit Concanamycin A –einem selektiven Inhibitor der vesikulären v-H⁺ATPase – deutlich (Drose et al., 1993).

2.4.4. Acridin Orange-Färbung

BON, BON-CIC-3-GFP, LCC-18, HEK293 oder HEK293-CIC-3-GFP-Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert und in physiologischer Lösung (150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂, 10mM HEPES-Puffer; 1% FCS; pH 7,2 und 300mOsm) resuspendiert. Je nach Experiment erfolgte vor der Trypsinierung eine Inkubation mit Concanamycin A (30min), Pantoprazol oder Omeprazol (beide 24h).

Die Zellen wurden dann mit aufsteigenden Konzentrationen von Acridin Orange inkubiert. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie sich unterhalb des Sättigungsbereichs befanden, in dem eine steigende Konzentration die Fluoreszenz nicht mehr beeinflussen würde. Die Acridin Orange-Konzentration durfte andererseits nicht zu niedrig sein, da dies die Fluoreszenz zu stark von der Zelldichte im Medium abhängig macht. Die optimale Acridin Orange-Reichweite mit direkter Proportionalität von Acridin Orange-Konzentration und gemessener Fluoreszenz wurde für jede Zelllinie einzeln bestimmt und betrug für BON und BON-CIC-3-GFP-Zellen 5-15µM (Inkrement 2,5µM), für LCC-18-Zellen 2-5,5µM (Inkrement 0,5µM) und für HEK293-Zellen 2-5,5µM (Inkrement 0,5µM).

Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Durchflußzytometer Facscalibur (BD). Die Zellen wurden mit dem Argon Laser bei 488nm angeregt und die Emission in FI-3 (>670nm) detektiert. Die Messungen wurden im *steady state* der Acridin Orange-Akkumulation durchgeführt, bei der das Signal ein Plateau erreicht hatte. Die Inkubationszeit bis zum Erreichen des *steady state* wurde für jede Zelllinie bestimmt und betrug bei BON und BON-CIC-3-GFP-Zellen 8min, bei LCC-18-Zellen 7min und bei HEK293-Zellen 6min.

Um tote Zellen von der Auswertung auszuschließen wurden die Zellen zusätzlich mit 10nM des für Zellmembranen impermeablen DNA-Farbstoffs TOTO-3 inkubiert. TOTO-3 wurde mit dem Red Diode-Laser bei 633nm angeregt und die Fluoreszenz in FI-4 (661nm±8nm) detektiert.

Die so erhaltenen Daten wurden offline mit der Software Flowjo® analysiert. Dazu wurden zuerst die TOTO-3-positiven Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren erfolgte der Ausschluss von Ereignissen von extrem hoher Granularität (hohe Werte in SSC-Kanal) oder Größe (hohe Werte in FSC). Dabei wurde darauf geachtet, dass die so eingegrenzten Zellen noch mindestens 85% der gesamten Ereignisse umfassten.

2.4.5. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Sigmaplot® vorgenommen. Für jede getestete Acridin Orange-Konzentration wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation von 10000 Zellen in FI-3 bestimmt und gegen die extrazelluläre Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde mit der Methode *der kleinsten Fehlerquadrate* eine lineare Regression der 1. Ordnung berechnet (Sigma-Plot® Version 8) Die Anstiege der linearen Regression verschiedener Zellpopulationen wurden durch Kovarianzanalyse (SPSS® Version 16) miteinander verglichen (F-Test, $p < 0,05$).

2.5. Messung der Zytotoxizität mit dem XTT-Test

2.5.1. XTT

Die Zytotoxizität unter Etoposid und den verschiedenen Vorbehandlungen wurde mit dem *Cell Proliferation Kit II* bestimmt (Scudiero et al., 1988). Die Nachweismethode basiert auf der Reduktion des Tetrazolium-Salzes XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide). Mitochondriale Enzyme metabolisch aktiver Zellen wandeln das gelbe XTT in ein oranges Formazan um, dessen Absorption zwischen 450 und 500nm gemessen wird und als Maß für die Anzahl lebendiger Zellen genommen werden kann.

100µl Zellsuspension in Kulturmedium wurden in jedes Loch in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Für jede Zelllinie wurde die optimale Zellkonzentration verwendet, bei welcher nach 3 Tagen Wachstum die Zellen einerseits nicht durch Überwucherung tot waren und sich andererseits im linearen Bereich der Wachstumskurve befanden:

200 000 Zellen/ml für BON-CIC-3-GFP, 300 000 Zellen/ml für LCC-18 und 20 000 Zellen/ml für HEK293-CIC-3-GFP-Zellen.

Nach 24h Wachstum wurde nach vorsichtigem Absaugen des Mediums 100µl frisches Medium hinzugefügt, das kein Phenolrot enthält. Dieses Medium enthielt aufsteigende Konzentrationen von Etoposid. Bei den Untersuchungen zum Effekt einer PPI-Vorbehandlung wurden die Zellen in 100µl Medium mit 10µM Omeprazol oder Pantoprazol ausgesät, welches nach 24h gegen das Etoposid enthaltende Medium ausgetauscht wurde. Bei den Experimenten zum Effekt einer Vorbehandlung mit Concanamycin A wurde 24h nach Aussaat der Zellen das Medium vorsichtig entfernt und gegen Medium mit 5nM (LCC-18) oder 10nM (BON-CIC-3-GFP) ausgetauscht und für 30min darin inkubiert. Die Zellen wurden dann 2mal mit PBS gewaschen bevor frisches Medium mit Etoposid in aufsteigender Konzentration hinzugefügt wurde.

Die Platten wurden danach weitere 48h im Brutschrank belassen und anschließend die Zellviabilität mit dem XTT-Test gemessen.

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 5ml XTT-Reagenz mit 0,1ml des *Electron Coupling Reagent* (N-Methyl-Dibenzopyrazinmethylsulfat, PMS) vermischt und 50µl der Lösung in jedes Loch der Platte gegeben. Nach 5h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten in einem ELISA-Reader bei 490nm eingelesen, unter Verwendung von 650nm als Referenzwellenlänge.

Die Prozentzahl des Zellüberlebens wurde in den Abbildungen als normalisierter Wert aus vier Replikaten \pm Standard-Deviation dargestellt.

2.5.2. Etoposid

Etoposid ist ein schwach basisches Chemotherapeutikum, dessen Wirkmechanismus in der Hemmung der Topoisomerase-II besteht. Seine Wasserlöslichkeit wird mit 80 µg/l bzw. 136µmol/l angegeben. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde reines Etoposid (Sigma®) zur Herstellung einer Ausgangslösung in DMSO gelöst. Es wurden 14,7 mg Etoposid in 1ml DMSO gelöst, was einer Konzentration von 25mmol/l entspricht. Diese Ausgangslösung wurde bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Die Stammlösung wurde zum Erhalt der gewünschten Endkonzentrationen mit Medium entsprechend verdünnt.

2.5.3. Statistik

Der prozentuale Anteil des Zellüberlebens wurde als durchschnittlicher Absorptionswert von 4 Replikaten jeder Etoposid-Konzentration \pm Standard-Deviation dargestellt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden als logistische Kurven mittels nonlinearer Regression durch die Datenpunkte mit der Software Sigmaplot[®] (Version 8) errechnet. Die Substanzkonzentration, welche notwendig wäre, um 50% Zellwachstum zu vermindern (IC50), wurde so für jede Behandlung berechnet. Diese errechneten IC50-Werte wurden dann im t-Test zwischen den beiden Gruppen verglichen, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

2.6. Western Blot

2.6.1. Membranpräparation

Zur Herstellung einer Membranpräparationen wurden 3mal 175cm² konfluente Kulturflaschen nach Absaugen des Mediums und Waschen mit eiskaltem PBS mit Trypsin aus der Flasche gelöst und in eiskaltem PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5min bei 150g wurden die Zellen in 100 μ l 50mM Mannitol, 50mM Tris-HCl, pH 7,6 mit Protease-Inhibitoren resuspendiert und im Ultra-Turrex-Homogenisierer bei maximaler Geschwindigkeit unter Verwendung eines Innendurchmessers von 5mm 3mal 30 Sekunden homogenisiert, mit jeweils 30s Pause dazwischen. Das Homogenisat wurde bei 4°C und 500g 10min zentrifugiert und die Überstände auf 750 μ l 300mM Mannitol mit 50mM Tris-HCl, pH 7,6 mit Proteaseinhibitoren geladen und bei 4°C für 45min bei 100000g zentrifugiert. Das entstandenen Sediment wurde je nach Größe in mindestens 40 μ l 50mM Mannitol, 50mM Tris-HCl, pH 7,6 mit Proteaseinhibitoren mit Hilfe einer Spritze mit 16g-Nadel homogenisiert. Die Proben wurden mit 100 IU Benzocnuclease auf Eis 1h inkubiert, 10% SDS zu einer finalen Konzentration von 1% hinzugefügt und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.6.2. CIC-3-Kontrolle

Als Kontrolle wurden HEK 293-Zellen benutzt, die das Wildtyp-CIC-3-Protein (ohne die GFP-Fusion) überexprimieren. Der verwendete Antikörper ist der im Rahmen von Vorarbeiten im Londoner Labor etablierte polyklonale Antikörper gegen das N-terminale Ende von CIC-3 (Weylandt, 2000; Weylandt et al., 2001).

2.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit dem Biorad Dc Protein-Test bestimmt, welcher kompatibel mit den niedrigen Konzentrationen der Detergenzien in den verwendeten Lösungen ist. Eine Standardkurve wurde mit Rinderserumalbumin in aufsteigender Konzentration von 0,05 bis 1,4mg/ml erstellt. Die Proben wurden mit einem Mikroplattenleser gelesen.

2.6.4. SDS-Gel

Die Membranpräparationen wurden in einem Viertelvolumen eines Puffers, mit 200mM Tris-HCl (pH 6,8), 50% Glycerol, 400 mM Dithiothreitol, 8% SDS und 0.2% Bromophenol Blue gelöst, bei 65°C für 5 min inkubiert und 30µg Protein der jeweiligen Membranpräparation auf 1,5mm dicken, 8%igen Polyacrylamid-Gelen mit dem Mini Protean III elektrophoretisch separiert (Laemmli, 1970).

2.6.5. Western Blot der Proteine

Die elektrophoretisch separierten Proteine wurden in einer Halbtrocken-Blot Transfer-Kammer vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran kurz in 100% Methanol geschwenkt und auf Filterpapier in den Transferpuffer (25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,3) gelegt. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese 10min in Transferpuffer getan, dann auf die Membran gelegt, mit Filterpapier bedeckt und die Transferkassette verschlossen. Bei 5W wurden die Proteine innerhalb von 90min in Richtung Kathode auf die PVDF-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt und zur Dokumentation eingescannt. Die PVDF-Membran wurde kurz in 100% Methanol geschwenkt und dann für mindestens 1h in 4%

Magermilchpulverlösung in PBS bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Proteinbindungsstellen zu besetzen.

2.6.6. Immunblot

Nach Transfer wurden die Blots über Nacht bei 4°C mit einem Antikörper gegen CIC-3 (polyklonal, D1, 1:100 Verdünnung) oder Pgp (Dako[®], monoklonal, C219, 1:1000 Verdünnung) bzw. MRP-1 (Abcam[®], monoklonal, MRPm5, 1:50 Verdünnung) in 4% Magermilchpulver in PBS inkubiert. Bei den Antikörpern gegen Pgp und MRP-1 handelt es sich um kommerziell verfügbare Antikörper, der polyklonale CIC-3-Antikörper wurde im Londoner Labor etabliert (Weylandt, 2000; Weylandt et al., 2001). Nach Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper wurde die Membran für 3mal 5min mit PBS gewaschen und mit dem einem HRP anti-Maus-Sekundärantikörper (Dako[®] P0447, 1:1000 Verdünnung) inkubiert. Für den CIC-3-Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-Sekundärantikörper verwendet (Dako[®] Cytomation, 1:1000 Verdünnung). Nach 3mal 5min Waschen mit PBS wurden die Blots mit den ECL-Reagenzien (Enhanced Chemiluminescence) behandelt und durch Auflegen eines Röntgenfilms für 1 – 20min, je nach Stärke des erwarteten Signals, entwickelt.

2.7. Durchflußzytometrie mit isolierten Lysosomen

2.7.1. Lysosomenpräparation

Metabolisch aktive Lysosomen wurden mit dem *Lysosome Isolation Kit* von Sigma® gewonnen. In einem modifizierten Protokoll erfolgte die Isolation der Organellen durch differentiale Zentrifugation und anschließende Dichtegradient-Zentrifugation.

Die Anwesenheit von Lysosomen wurde anschließend durch Färbung mit einem Antikörper gegen den lysosomalen Marker Lamp-1 getestet.

Um die Lysosomen nicht zu schädigen, wurde die gesamte Prozedur bei 4°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen, Puffer und Geräte wurden vor der Verwendung gekühlt.

In Vorbereitung auf die Zentrifugation wurden aus den im Kit enthaltenen Lösungen verschiedene Dichtegradienten gemischt (**Tabelle 2.1.**).

Optiprep (%)	Optiprep (ml)	Optiprep-Verdünnungs-Puffer (ml)	2,3 M Saccharose (ml)	mOsm
27	4,5	4,9	0,6	312
22,5	3,75	5,63	0,62	304
19	3,17	6,19	0,64	298
16	2,67	6,68	0,65	280
12	2	7,29	0,71	300
8	1,33	7,9	0,77	282

Tabelle 2.1. Mischungsverhältnis der verschiedenen Dichtegradienten.

Mindestens 7 konfluente 175cm²-Kulturflaschen mit BON oder BON-CIC-3-GFP-Zellen, entsprechend einem reinen Zellvolumen von mindestens 2ml, wurden gewaschen, durch Trypsinierung gelöst und anschließend in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann bei 600g zentrifugiert, in eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Sediment dann im 2,7fachen Volumen des im Kit enthaltenen Extraktionspuffers mit Proteinasehemmer gelöst. Nach diesem Waschvorgang wurde das Sediment in einem Dounce Homogenisator unter Verwendung des kleinen Pistills mit 20 Hüben aufgeschlossen und dann bei 1000g 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 20 000g in einer

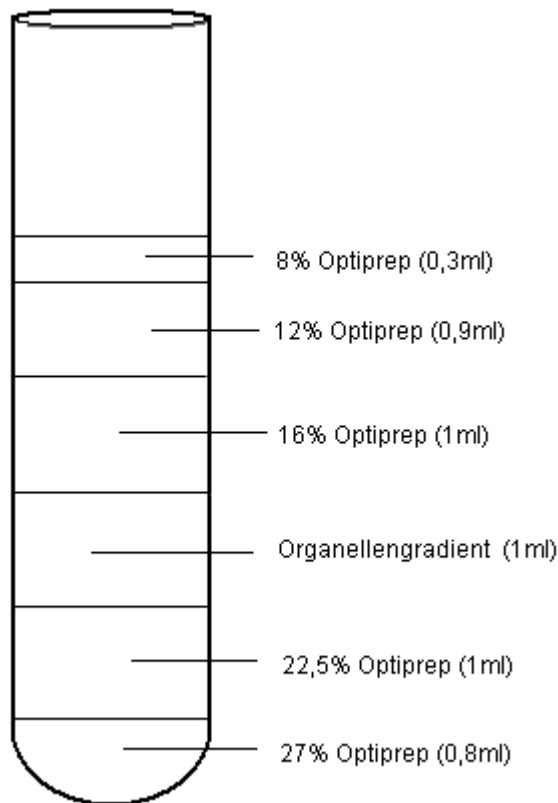


Abbildung 2.2. Schichtung der Dichtegradienten vor Zentrifugation. Der Organellengradient besteht aus dem Organellsediment gelöst in Extraktionspuffer, 19%igem Optiprep-Puffer, Optiprep-Verdünnungs-Puffer und Saccharose.

Mini-Ultrazentrifuge (Beckmann TL-100 Tabletop Ultracentrifuge, Rotor: TLA-100.1) für 20min zentrifugiert und das so entstandene Sediment – bestehend aus einem Mix aus Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen und Endoplasmatischem Retikulum – nach Verwerfen des Überstandes in 1ml Extraktionspuffer resuspendiert. 400µl dieser Organellenlösung wurden mit 505µl 19%igem Optiprep-Puffer und 650µl Optiprep Verdünnungs-Puffer (beide Puffer Bestandteile des Kits) vermischt und mit 30µl 2,3M Saccharose auf 290mOsm verdünnt. Diese Lösung wird als Organellengradient bezeichnet.

Für die Dichtegradient-Zentrifugation wurden die vorbereiteten Gradienten, beginnend mit der 27%igen Optiprep-Lösung, in einem 5ml-Ultrazentrifugen-Röhrchen aufeinandergeschichtet und anschließend mit Mineralöl aufgefüllt (**Abbildung 2.2.**). Nach Ausbalancieren erfolgte die Zentrifugation für 4h bei 150000g und 4°C in einem SW50.1 Rotor. Nach der Zentrifugation zeigten sich 9 Bänder innerhalb der 6 Dichtegradienten des Zentrifugenröhrchens. Im Abstand 0,5-0,7ml wurden von oben beginnend in 9 Fraktionen die 9 Bänder abpipettiert und durchnummeriert. Fraktion 1 enthielt dabei das oberste Band im Zentrifugenröhrchen, Fraktion 2 das darunterliegende Band usw. bis hin zu Fraktion 9, in der das unterste Band enthalten war.

2.7.2. Färbung und Vorbereitung

Aus jeder einzelnen der 9 Fraktionen wurde ein Teil in jeweils ein neues Reagenzglas pipettiert, um zuerst eine immunzytochemische Färbung von Lysosomen durchführen zu können und danach, unabhängig davon, die

lysosomenreichste Fraktion für Experimente im Acridin Orange-Test verwenden zu können. Zum Zwecke der Färbung wurde mit einem Lamp-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology®; H4A3; 1:50 Verdünnung) für 60min bei 4°C inkubiert und anschließend durch einmalige Ultrazentrifugation bei 20 000 g und Resuspension in physiologischer intrazellulärer Lösung (120mM KCl; 1mM CaCl₂; 2mM MgCl₂; 10mM Hepes; 11mM EGTA; pH 7,3) gewaschen.

Es folgte die Hinzugabe des Cy5-konjugierten Sekundärantikörpers (Abcam; ab6563; 1:400 Verdünnung) und erneute Inkubation für 30min bei 4°C mit anschließender Ultrazentrifugation und Resuspension des erhaltenen Sediments.

Nach durchflusszytometrischer Bestimmung der lysosomenreichsten Fraktion (**siehe 2.7.3.**) wurde ca. ein Viertel der Suspension, die nicht zur Immunzytochemie verwendet worden war, für 15min mit 10nM Concanamycin A inkubiert. Ein weiteres Viertel wurde nach Ultrazentrifugation mit 20 000g in chloridfreier intrazellulärer Lösung (120mM K-Glukonat; 1mM Ca-Glukonat; 2mM Mg-Glukonat; 10mM Hepes; 11mM EGTA; pH 7,3) resuspendiert.

2.7.3. Durchflußzytometrie

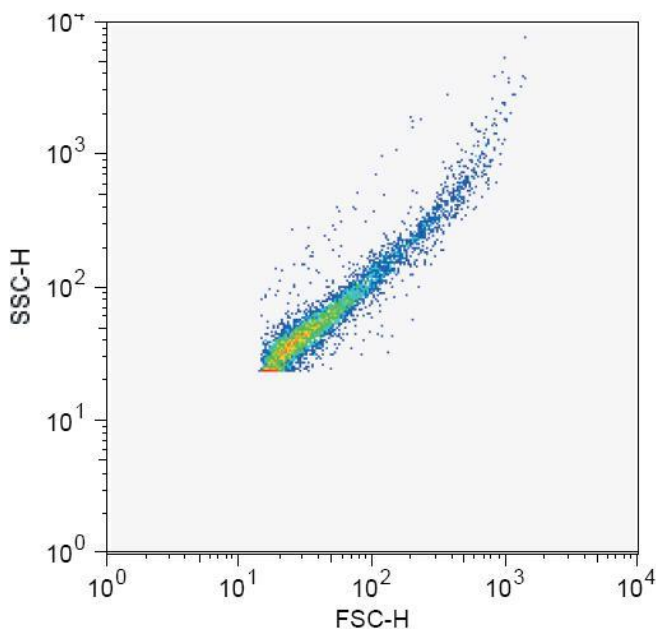


Abbildung 2.3. Durchflußzytometrie der 9. Fraktion aus der Dichtegradient-Zentrifugation nach entsprechender Verstärkung des Signals und Festsetzen des Schwellenwerts. FSC und SSC in logarithmischer Darstellung.

Die Durchflußzytometrie wurde am Facscalibur (BD) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine beliebige der 9 Fraktionen nach Anregung durch den 488nm Argon-Laser testweise in FSC und SSC unter Verwendung logarithmischer Skalen dargestellt. Die Auslöschschwelle wurde im FSC auf dem Niveau festgesetzt, ab dem kein Signal beim Durchlauf der partikelfreien, physiologischen, intrazellulären Lösung mehr zu sehen war. Unter den genannten Voreinstellungen zeigten sich die Organellenfraktionen in der Punktauftragung als dichte Wolke (Beispiel in **Abbildung 2.3.**). Nach

in der Punktauftragung als dichte Wolke

zusätzlicher Anregung durch den 635nm Laser erfolgte die Darstellung der selektierten Ereignisse jeder Fraktion auf logarithmischen Skalen in den Fluoreszenzkanälen FI-1 (530±15nm) und FI-4 (661nm±8nm). Mindestens 30000 Ereignisse wurden je Fraktion gezählt.

Der Vergleich des pH in der lysosomenreichsten Fraktion unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erfolgte mit dem Acridin Orange-Test (Prinzip siehe Kapitel 2.4.3.). Die durch vorbereitende Messungen bestimmte optimale Acridin Orange-Reichweite mit direkter Proportionalität zwischen Acridin Orange-Konzentration und gemessener Fluoreszenz in FI-3 (>670nm) betrug 0,4 -1,2µM bei einem Inkrement von 0,2µM. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in der stabilen Gleichgewichtsphase der Acridin Orange-Akkumulation, die bei der Lysosomenpräparation ab einer Inkubationszeit von 2min gegeben war.

2.7.4. Statistik

Die Daten wurden mit der Software Cellquest[®] gesammelt. Die Datenanalyse erfolgte offline mit der Software Flowjo[®]. Die statistische Auswertung wurde mit der Software Sigma-Plot[®] vorgenommen. Für jede getestete Acridin Orange-Konzentration wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Ereignisanzahl von 4000 in FI-3 bestimmt und gegen die extrazelluläre Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde mit der Methode *der kleinsten Fehlerquadrate* eine lineare Regression der 1. Ordnung berechnet (Sigma-Plot[®] Version 8) Die Anstiege der linearen Regression verschiedener Zellpopulationen wurden durch Kovarianzanalyse (SPSS Version 16) miteinander verglichen (F-Test, p<0,05).

3. Ergebnisse

3.1. Expression von humanem CIC-3 (CIC-3) in neuroendokrinen Zelllinien

Es ist bekannt, dass CIC-3 in der murinen Phäochromozytomzelllinie PC-12 exprimiert wird (Salazar et al., 2004). Die CIC-3-Expression verschiedener humaner, neuroendokriner Zelllinien wurde hier mittels Western Blot getestet (**Abbildung 3.1.**): CIC-3 lässt sich in der murinen Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 und auch den neuroendokrinen Zelllinien LCC-18, BON und QGP-1 nachweisen.

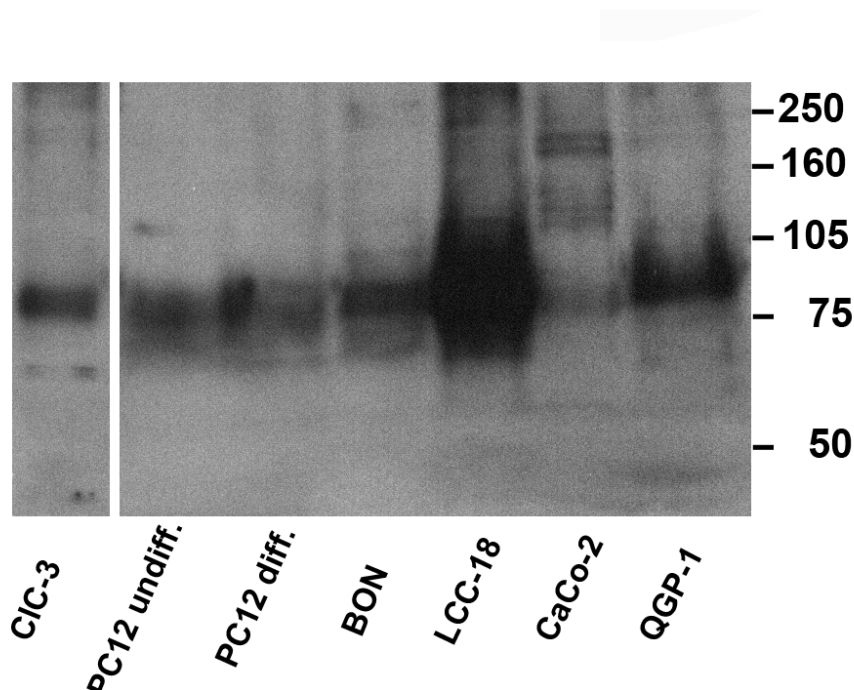


Abbildung 3.1. Expression von CIC-3 in neuroendokrinen Tumorzelllinien und der Kolonkarzinomlinie CaCo-2. Western Blot-Analyse einer Zellmembranpräparation. 50µg Membranprotein wurde in jede Tasche eines 7,5% SDS-Gels gelegt. Als Kontrolle wurden HEK 293-Zellen benutzt, die das Wildtyp-CIC-3-Protein (ohne die GFP-Fusion) überexprimieren. Molekulargewichte in kDa

- Bahn 1** – CIC-3-Kontrolle
- Bahn 2** – PC12, murine Phäochromozytomzellen
- Bahn 3** – PC12, ausdifferenziert
- Bahn 4** – BON, neuroendokrin
- Bahn 5** – LCC-18, neuroendokrin
- Bahn 6** – CaCo-2, Kolonkarzinom
- Bahn 7** – QGP-1, neuroendokrin

3.2. Intrazelluläre Lokalisation von humanem CIC-3 in neuroendokrinen Tumorzellen

In vorangegangenen Studien konnten intrazelluläre Vesikel als vornehmliche Lokalisation von CIC-3 gezeigt werden (Stobrawa et al., 2001; Weylandt et al., 2001). Zur näheren Untersuchung der subzellulären Verteilung von CIC-3 wurden an der Zelllinie BON-CIC-3-GFP – einem CIC-3-GFP-überexprimierenden Klon der Zelllinie BON – immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Idealerweise eignete sich ein Antikörper, spezifisch gegen CIC-3, für die Durchführung solcher Kollokalisationsexperimente. Jedoch ist der in dieser Arbeit verwendete, in unserem Labor in Vorstudien etablierte (Weylandt, 2000; Weylandt et al., 2001) Antikörper nicht für immunzytochemische Experimente geeignet und funktioniert ausschließlich im Western Blot. Es ist andererseits kein für die Immunzytochemie geeigneter Antikörper gegen CIC-3 kommerziell verfügbar. Ebenso wurden in der Experimentenserie **3.2.** lebende Zellen in einer Perfusionskammer beobachtet und die pH-abhängige Anreicherung von Acridin Orange in sauren Vesikeln dargestellt. Eine vorherige Permeabilisierung zur immunhistochemischen Färbung mit einem spezifischen Antikörper wäre ohne Fixierung nicht möglich gewesen.

In dieser Arbeit stellt die fluoreszente Markierung von heterolog exprimiertem CIC-3 durch GFP eine praktikable Alternative zur Visualisierung von intrazellulärem CIC-3 im konfokalen Mikroskop auch in der lebenden Zelle dar.

In **Abbildung 3.2.A** ist ein repräsentatives Nativbild von BON-CIC-3-GFP-Zellen im konfokalen Mikroskop zu sehen. Das GFP-Signal zeigt sich in einer großen Anzahl intrazellulärer Vesikel. Einige hohl erscheinende Vesikel deuten an, dass das CIC-3-GFP-Fusions-Protein in der Membran intrazellulärer Bläschen lokalisiert ist. Dieselben Zellen wurden anschließend mit Acridin Orange gefärbt, einem schwach basischen Farbstoff, der sich selektiv in sauren Kompartimenten anreichert. Bei Überlagerung der beiden Bilder mit dem GFP-Signal in grüner und dem Acridin Orange Signal in roter Farbe zeigt sich die Akkumulation von Acridin Orange in den GFP-positiven Vesikeln. Kollokalisierung von Acridin Orange und CIC-3-GFP legt einen sauren pH der GFP-markierten Vesikel nahe. Zur besseren Orientierung wurden im Experiment nach Darstellung von GFP und Anfärbung mit Acridin Orange zusätzlich die Zellkerne mit DAPI gefärbt. In der Abbildung sind sie blau dargestellt (**Abbildung 3.2.C**).

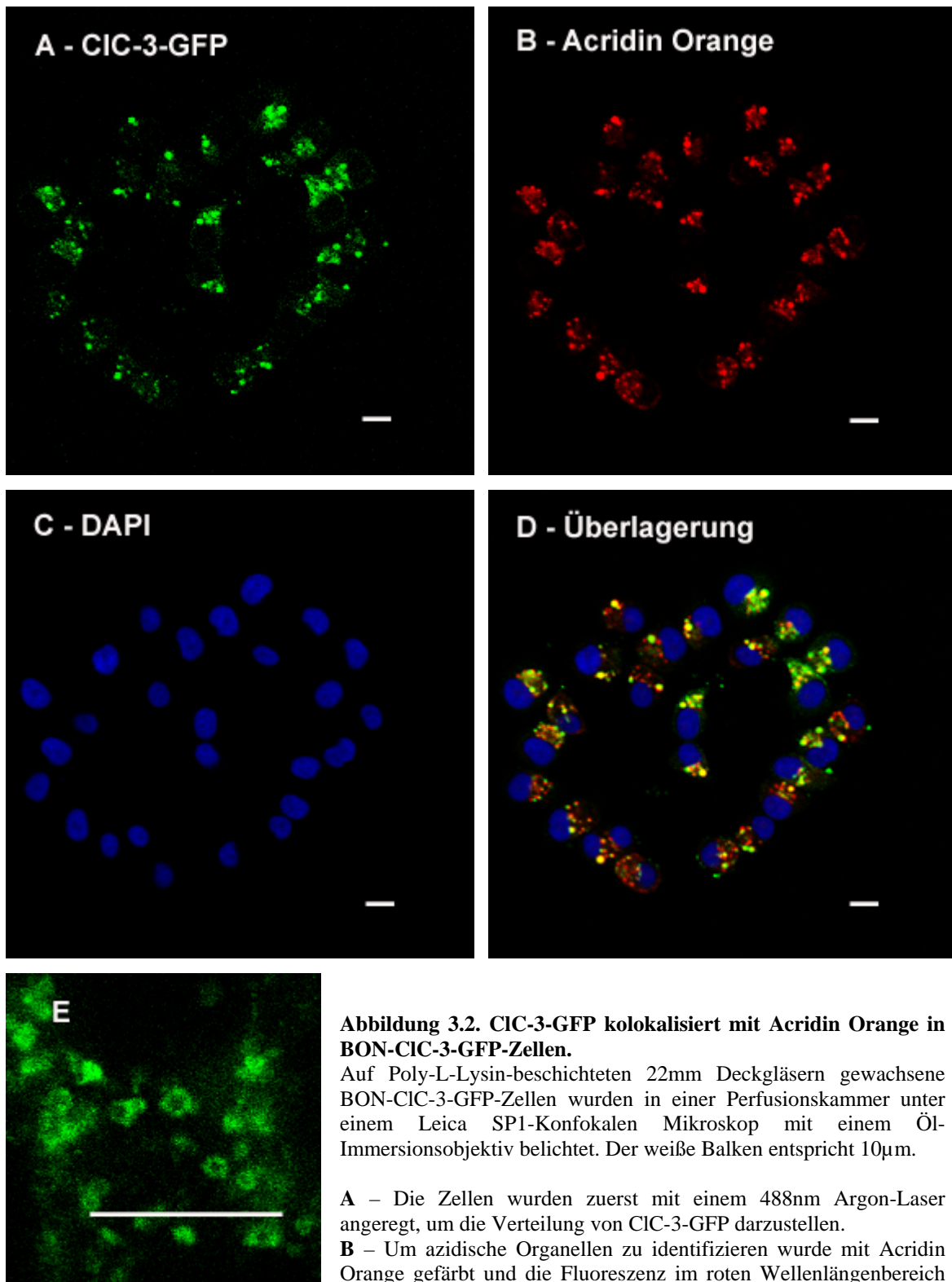


Abbildung 3.2. CIC-3-GFP kolokalisiert mit Acridin Orange in BON-CIC-3-GFP-Zellen.

Auf Poly-L-Lysin-beschichteten 22mm Deckgläsern gewachsene BON-CIC-3-GFP-Zellen wurden in einer Perfusionskammer unter einem Leica SP1-Konfokalen Mikroskop mit einem Öl-Immersionsobjektiv belichtet. Der weiße Balken entspricht 10µm.

A – Die Zellen wurden zuerst mit einem 488nm Argon-Laser angeregt, um die Verteilung von CIC-3-GFP darzustellen.

B – Um azidische Organellen zu identifizieren wurde mit Acridin Orange gefärbt und die Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich nach Exzitation mit 488nm gemessen.

C – Anschließend wurden die Zellen mit Triton X permeabilisiert und zur Darstellung des Nukleus mit DAPI angefärbt.

D – Die Überlagerung der 3 Aufnahmen zeigt die Kolokalisation von GFP und Acridin Orange in pseudogefärbtem Gelb.

E – CIC-3-GFP positive Vesikel aus einem anderen Bild der Serie in höherer Auflösung. Einige der GFP-positiven Vesikel erscheinen hohl.

Andere Arbeiten konnten die bevorzugte Anreicherung von CIC-3 in synaptischen Vesikeln hippokampaler Neuronen und in exozytotischen Vesikeln pankreatischer β -Zellen zeigen (Barg et al., 2001; Stobrawa et al., 2001).

In den hier durchgeführten immunzytochemischen Färbungen zeigte sich keine Kollokalisierung neuroendokriner Markerproteine mit CIC-3-GFP; die GFP-positiven Vesikel sind in der Überlagerung nicht mit den Chromogranin A- bzw. Synaptophysin-positiven Strukturen identisch (**Abbildungen 3.3. und 3.4.**).

In dem Bestreben, die Herkunft der CIC-3-GFP positiven Vesikel zu klären, wurden BON-CIC-3-GFP-Zellen auf ihre immunzytochemische Kollokalisierung mit dem *Lysosomal Associated Membrane Protein 1* (Lamp-1) geprüft. Lamp-1 ist ein Membranprotein, welches sich fast ausschließlich in den Membranen von Lysosomen und späten Endosomen findet (Obermuller et al., 2002).

Die Überlagerung der Bilder zeigt eine deutliche räumliche Übereinstimmung der subzellulären Verteilung des GFP-Signals mit dem Fluoreszenzsignal des Anti-Lamp-1-Antikörpers (**Abbildung 3.5.**).

Die Färbungen legen nahe, dass CIC-3-GFP und Lamp-1 das gleiche intrazelluläre Kompartiment besetzen.

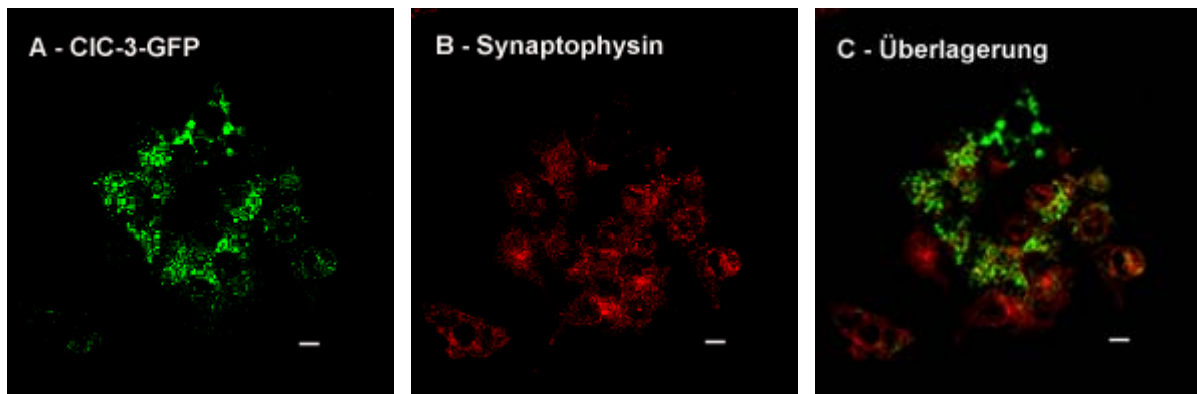


Abbildung 3.3. CIC-3-GFP kolokalisiert in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht mit Synaptophysin, einem Marker für Synaptic-like-Microvesicles (SLMV)

Immunzytochemie wurde an BON-CIC-3-GFP-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf 22mm Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausplattiert und bis 40 % Konfluenz gezüchtet, bevor sie mit 4% Paraformaldehyd fixiert wurden.

Die Zellen wurden erst für 12h bei 4°C mit einem Antikörper gegen Synaptophysin (monoklonal, von B. Wiedenmann, Berlin) inkubiert. Zur Visualisierung wurde ein Sekundärantikörper mit Alexa 568 (Molecular Probes®, 1:600 Verdünnung, 40min Inkubation bei Raumtemperatur) gewählt.

Der weiße Balken entspricht 10 µm.

A – Die Zellen wurden mit einem 488nm Argon-Laser angeregt, um die Verteilung von CIC-3-GFP darzustellen.

B – Alexa-568-markierte Anti-Maus Sekundärantikörper wurden mit einem 568nm-Krypton-Laser angeregt und bei 585-615nm dargestellt.

C – Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt, dass CIC-3-GFP und Synaptophysin auf unterschiedliche Subpopulationen von intrazellulären Vesikeln verteilt sind.

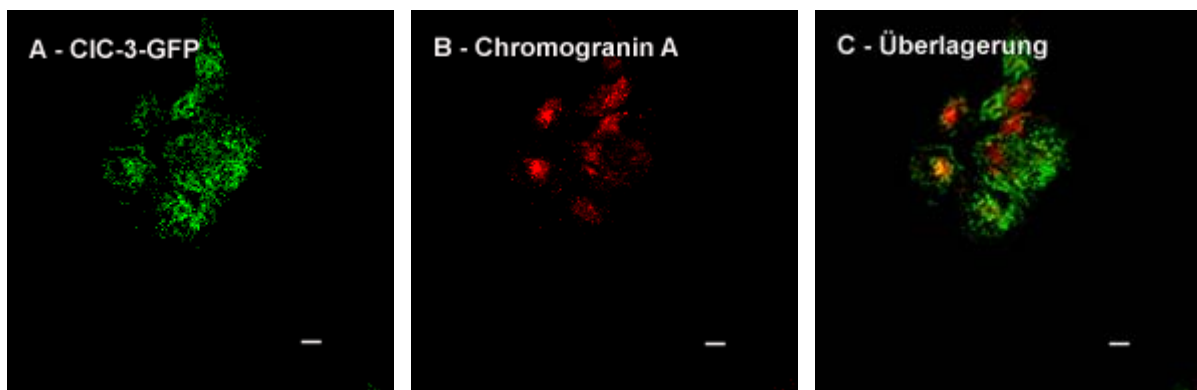


Abbildung 3.4. CIC-3-GFP kolokalisiert in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht mit Chromogranin A, einem Marker für Large-Dense-Core-Vesicles (LDCV)

Immunzytochemie wurde an BON-CIC-3-GFP-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf 22mm Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausplattiert, bis 40 % Konfluenz gezüchtet, und daraufhin mit 4% Paraformaldehyd fixiert.

Die Zellen wurden dann für 12h bei 4°C mit einem Antikörper gegen Chromogranin A (monoklonal, DAKO®, DAK-A3) inkubiert. Zur Visualisierung wurde ein Anti-Maus Sekundärantikörper mit Alexa 568 (Molecular Probes®, 1:600 Verdünnung, 40min Inkubation bei Raumtemperatur) gewählt.

Der weiße Balken entspricht 10 µm.

A – Die Zellen wurden mit einem 488nm Argon-Laser angeregt, um die Verteilung von CIC-3-GFP (grün) darzustellen.

B – Alexa-568-markierte Anti-Maus Sekundärantikörper wurden mit einem 568nm-Krypton-Laser angeregt und bei 585-615nm dargestellt.

C – Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt, dass CIC-3-GFP und Chromogranin A auf unterschiedliche Subpopulationen von intrazellulären Vesikeln verteilt sind.

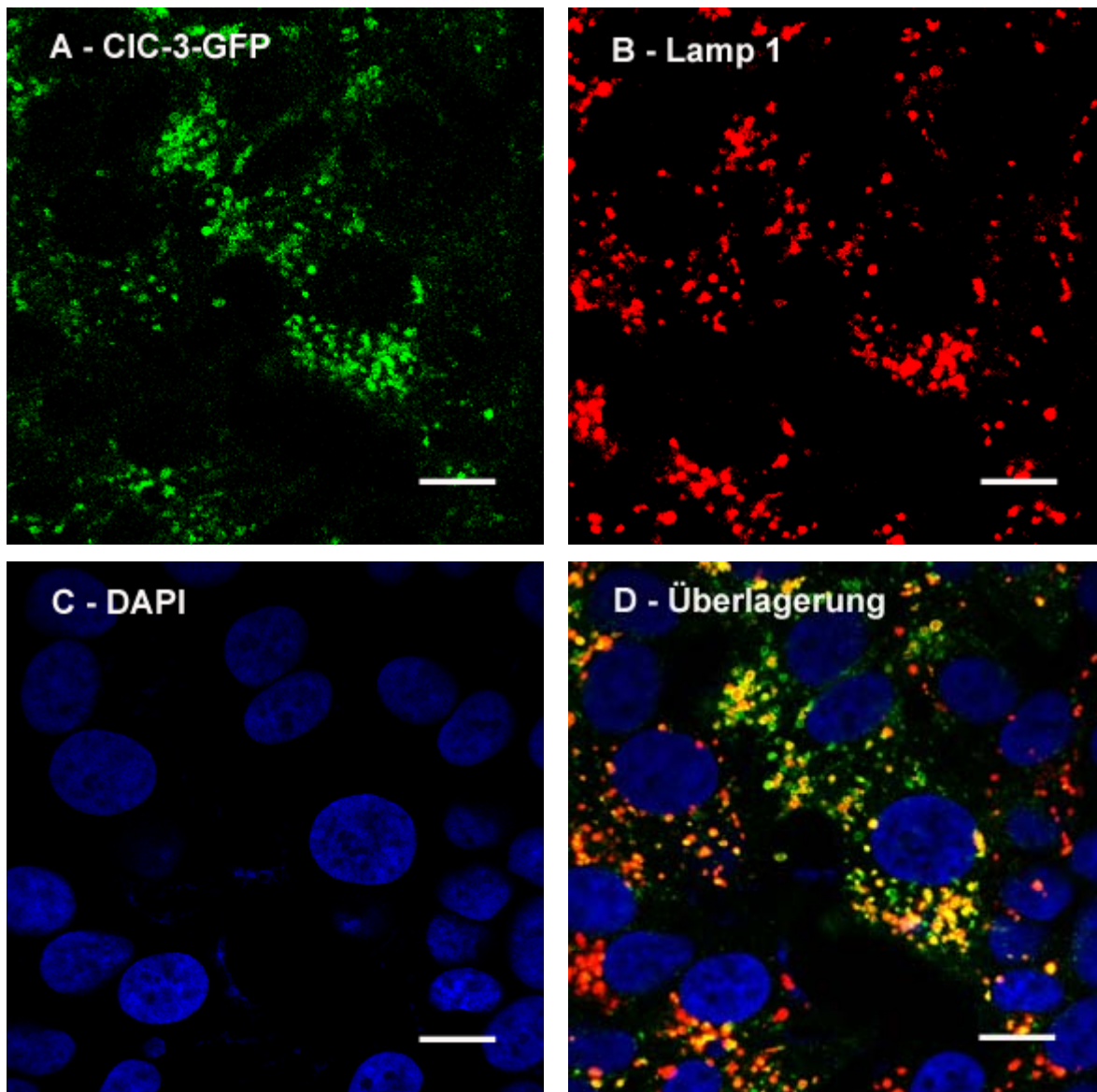


Abbildung 3.5. CIC-3-GFP zeigt Kolokalisation mit Lamp-1, einem Marker für Lysosomen und späte Endosomen

Immunzytochemie wurde an BON-CIC-3-GFP-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf 22mm Poly-Lysin beschichteten Deckgläsern ausplattiert, bis 40% Konfluenz gezüchtet, und daraufhin bei -20°C mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden dann für 12h bei 4°C in Gegenwart eines Antikörpers gegen Lamp-1 inkubiert (1:50, sc-20011, monoklonal, Santa Cruz). Zur Visualisierung wurde ein Anti-Maus Sekundärantikörper mit Alexa 568 (Molecular Probes®, 1:600 Verdünnung, 40min Inkubation bei Raumtemperatur) gewählt. Die gefärbten Deckgläser wurden mit DAPI gegengefärbt. Der weiße Balken entspricht $10\ \mu\text{m}$.

A – Zellen nach Exzitation durch einen 488nm Argon Laser, CIC-3-GFP erscheint grün.

B – Alexa-568-markierte Anti-Maus Sekundärantikörper wurden mit einem 568nm-Krypton-Laser angeregt und bei 585-615nm gemessen. Lamp-1 in rot

C – Der Nukleus wird mit DAPI angefärbt, das Präparat mit einem 351nm UV-Laser angeregt und die Emission bei 396nm – 508nm abgelesen

D – Die Überlagerung der Bilder zeigt deutliche Übereinstimmung der Signale von CIC-3-GFP und Lamp-1.

3.3. Einfluss von CIC-3 auf den intralysosomalen pH

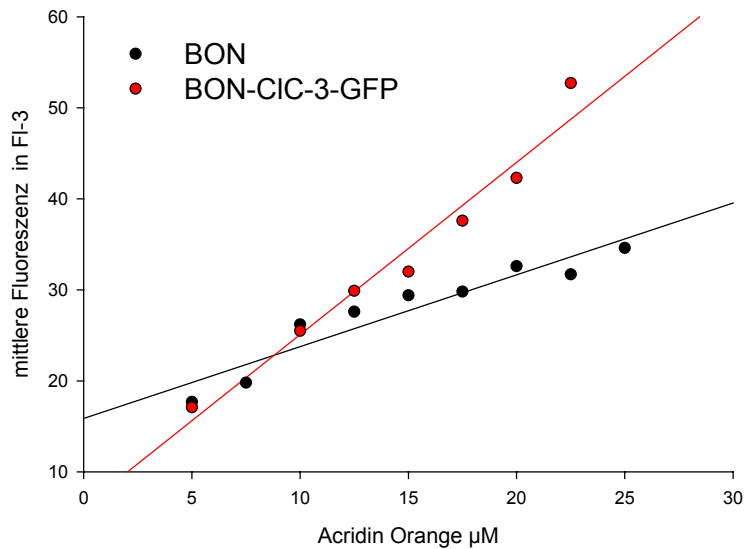
In den folgenden Experimenten wurde die Hypothese, dass CIC-3 die lysosomale Azidifizierung in neuroendokrinen Zellen verstärkt, überprüft. Für die Messung des pH im intrazellulären azidischen Kompartiment wurde Acridin Orange verwendet.

Acridin Orange ist eine schwache Base, die entlang eines pH-Gradienten in sauren Kompartimenten akkumuliert. Dabei verschiebt sich durch Konzentration der Base das Emissionsspektrum vom grünen in den roten Bereich sichtbaren Lichts. Diese Zunahme roter Fluoreszenz kann als Maß für den Vergleich verschiedener Zellpopulationen bezüglich des intrazellulären pH-Gradienten verwendet werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich im Kapitel Material und Methoden (2.4.3.).

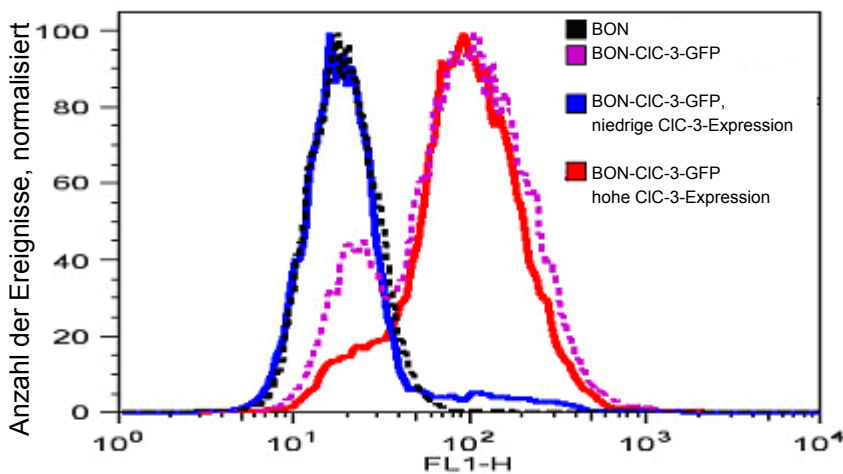
Vorläufige Experimente unter der Verwendung des Acridin Orange-Test konnten zeigen, dass BON-CIC-3-GFP-Zellen ein azidischeres lysosomales Kompartiment als BON-Zellen besitzen (**Abbildung 3.6.**). Diese Ergebnisse bedurften der Überprüfung durch anderweitige experimentelle Vorgehensweisen, um unspezifische Ursachen für diese Unterschiede sicherer auszuschließen.

Die stabile Transfektion von BON-Zellen mit CIC-3-GFP erfordert eine permanente Kultur in selektivem Medium: Das Plasmid mit dem CIC-3-GFP-Fusionsprotein enthält auch das bakterielle Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; transfizierte Zellen werden in Gegenwart des Neomycin-Analogs G418 selektiert. Es ist denkbar, dass die notwendige Langzeitkultivierung von BON-CIC-3-GFP-Zellen mit G418 auch andere Proteine hochreguliert, die an der zellulären Entgiftung beteiligt sind. So könnte der ständige Einfluss von G418 auch die intrazelluläre pH-Regulation beeinflussen.

Um die intrazelluläre Azidität exklusiv als Funktion der CIC-3-Expression zu messen, wurde die CIC-3-GFP überexprimierende Zelllinie BON-CIC-3-GFP mit Hilfe eines Cell Sorters (Facs Diva, BD) in 4 gleichgroße Subpopulationen entsprechend ihres GFP-Signals im FI-1-Kanal geteilt und anschließend die beiden Populationen mit der jeweils höchsten und niedrigsten GFP-Fluoreszenz (BON-CIC-3-GFP mit hoher CIC-3-Expression und BON-CIC-3-GFP mit niedriger CIC-3-GFP-Expression) für 2 Wochen kultiviert. Die Intensität des GFP-Signals von BON-CIC-3-GFP-hoch und BON-CIC-3-GFP-niedrig in FI-1, 2 Wochen nach Sortierung, ist in **Abbildung 3.7.A** aufgezeigt.



A



B

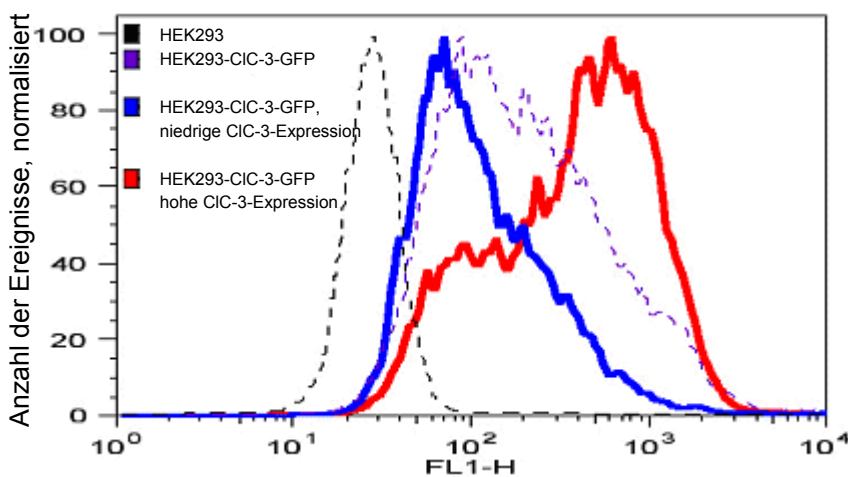


Abbildung 3.6. BON-CIC-3-GFP-Zellen haben ein azidischeres intrazelluläres Kompartiment als BON-Zellen.

BON und BON-CIC-3-GFP-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Acridin Orange ($5\mu\text{M}$ - $25\mu\text{M}$) für 7min inkubiert, anschließend im Durchflußzytometer (FACScalibur, BD) mit einem 488nm-Argon-Laser bestrahlt und ihre Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (FI-3; $>670\text{nm}$) erfasst. Die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte wurden offline mit Flowjo® errechnet und in Sigmaplot® gegen die Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Berechnung der Geraden durch die Datenpunkte mittels linearer Regression (Sigmaplot®). Die Anstiege der Geraden sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; F-test).

Abbildung 3.7. Werden die CIC-3-GFP-überexprimierenden Klone BON-CIC-3-GFP und HEK293-CIC-3-GFP in Subpopulationen hohen und niedrigen Expressionsniveaus sortiert, so bleibt dieser Unterschied für mindestens 2 Wochen stabil.

BON-CIC-3-GFP und HEK293-CIC-3-GFP-Zellen wurden im FACS-Gerät (FACS Diva) entsprechend ihrer GFP-Fluoreszenz in FI-1 (515nm - 545nm) in jeweils 2 Subpopulationen hoher und niedriger Expressionsrate getrennt. Nach 2 Wochen Kultur wiesen die Populationen noch immer die ursprünglichen Unterschiede in der Expression des Proteins auf:

A – Die mittlere Fluoreszenz in FI-1 des BON-CIC-3-GFP-Klons mit hoher Expression (rot) gleicht der Fluoreszenz des ursprünglichen, unsortierten BON-CIC-3-Klons (lila gestrichelt). Die CIC-3-Expression des niedrig exprimierenden Klons (blau) ist auf dem Niveau von nativen, nicht transfizierten Zellen (schwarz gestrichelt).

B – Die Histogramme von HEK293-CIC-3 mit hoher (rot) und niedriger (blau) CIC-3-Expression zeigen einen deutlichen Unterschied. Native, nicht transfizierte HEK293-Zellen in schwarz, HEK293-CIC-3 lila gepunktet.

Der Unterschied der beiden Subpopulationen bezüglich der Gesamtazidität ihrer Organellen im Sinne eines erniedrigten pH der stark CIC-3-GFP-positiven Zellen wurde in der Durchflußzytometrie mittels Acridin Orange, wie im Methodenteil beschriebenen, erfasst (**Abbildung 3.8.A**).

Um diese Ergebnisse weiter zu validieren, wurde der gleiche experimentelle Aufbau auf einen CIC-3-GFP überexprimierenden HEK293-Klon (HEK293-CIC-3-GFP) übertragen (**Abbildung 3.7.B, 3.8. B**).

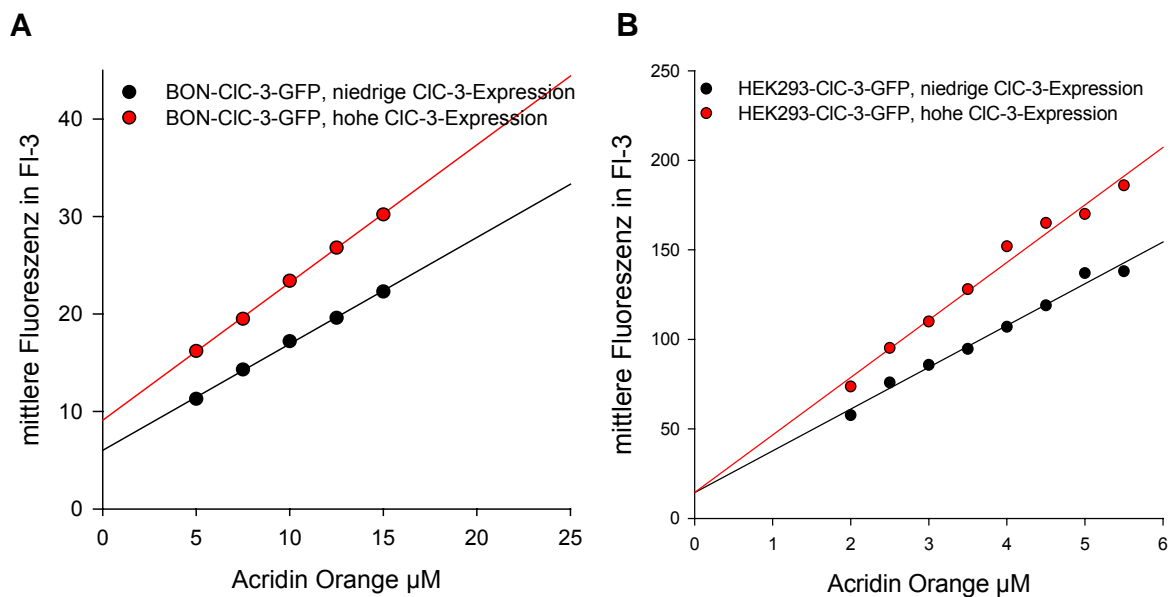


Abbildung 3.8. Überexpression von CIC-3-GFP führt zu einem azidischeren intravesikulären pH in (A) BON-CIC-3-GFP- und (B) HEK293-CIC-3-GFP-Zellen.

Es wurden Zellen hoher mit Zellen niedriger CIC-3-GFP-Expression verglichen. Nach Trypsin-Ablösung wurden die Zellen in physiologischer Lösung resuspendiert (pH 7,2; 300mosm), in Gegenwart steigender Konzentrationen von Acridin Orange (5–15 μM für BON-CIC-3-GFP, 2–5,5 μM für HEK293-CIC-3-GFP) inkubiert und die Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (FI-3; >670nm) im Durchflußzytometer (FacsCalibur, BD®) erfasst. Die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte wurden offline mit Flowjo® errechnet und in Sigmaplot® gegen die Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Berechnung der Geraden durch die Datenpunkte mittels linearer Regression (Sigmaplot®). Die Anstiege der Geraden sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$; F-test).

3.4. Einfluss heterologer CIC-3-GFP-Überexpression auf die Größe des lysosomalen Kompartiments

In Anbetracht der aufgezeigten Daten liegt der Schluss nahe, dass CIC-3 die lysosomale Azidifizierung verstärkt.

Die in der Durchflußzytometrie beobachtete Zunahme der Acridin Orange-Fluoreszenz in FI-3 träte jedoch nicht ausschließlich bei einer Zunahme des intrazellulären pH-Gradienten auf. Das gleiche Phänomen würde man ebenso bei einer isolierten, pH-unabhängigen Zunahme der Größe oder Anzahl azidischer Organellen beobachten.

Um zu zeigen, dass Überexpression von CIC-3-GFP den intralysosomalen pH und nicht Anzahl oder Größe azidischer Organellen beeinflusst, wurde das Ausmaß des lysosomalen Kompartiments mittels immunhistochemischer Färbung von LAMP-1, einem selektiven Markerprotein für Lysosomen und späte Endosomen, erfasst (Obermuller et al., 2002).

Die Färbung zeigt keinen Unterschied in der Expression von LAMP-1 zwischen BON-Zellen und CIC-3-GFP überexprimierenden BON-CIC-3-GFP-Zellen.

Expression von CIC-3-GFP führt somit nicht zu einer Expansion des lysosomalen/endosomalen Kompartiments, sondern zu einem größeren intrazellulären pH-Gradienten (**Abbildung 3.9.A**).

Gleichartige Ergebnisse wurden beim Vergleich der LAMP-1-Expression zwischen HEK293-Zellen und dem CIC-3-GFP überexprimierenden HEK293-Klon (HEK293-CIC-3-GFP) erzielt (**Abbildung 3.9.B**).

Die aufgeführten Experimente unterstützen die funktionelle Bedeutung von CIC-3 bei der Azidifizierung von Lysosomen.

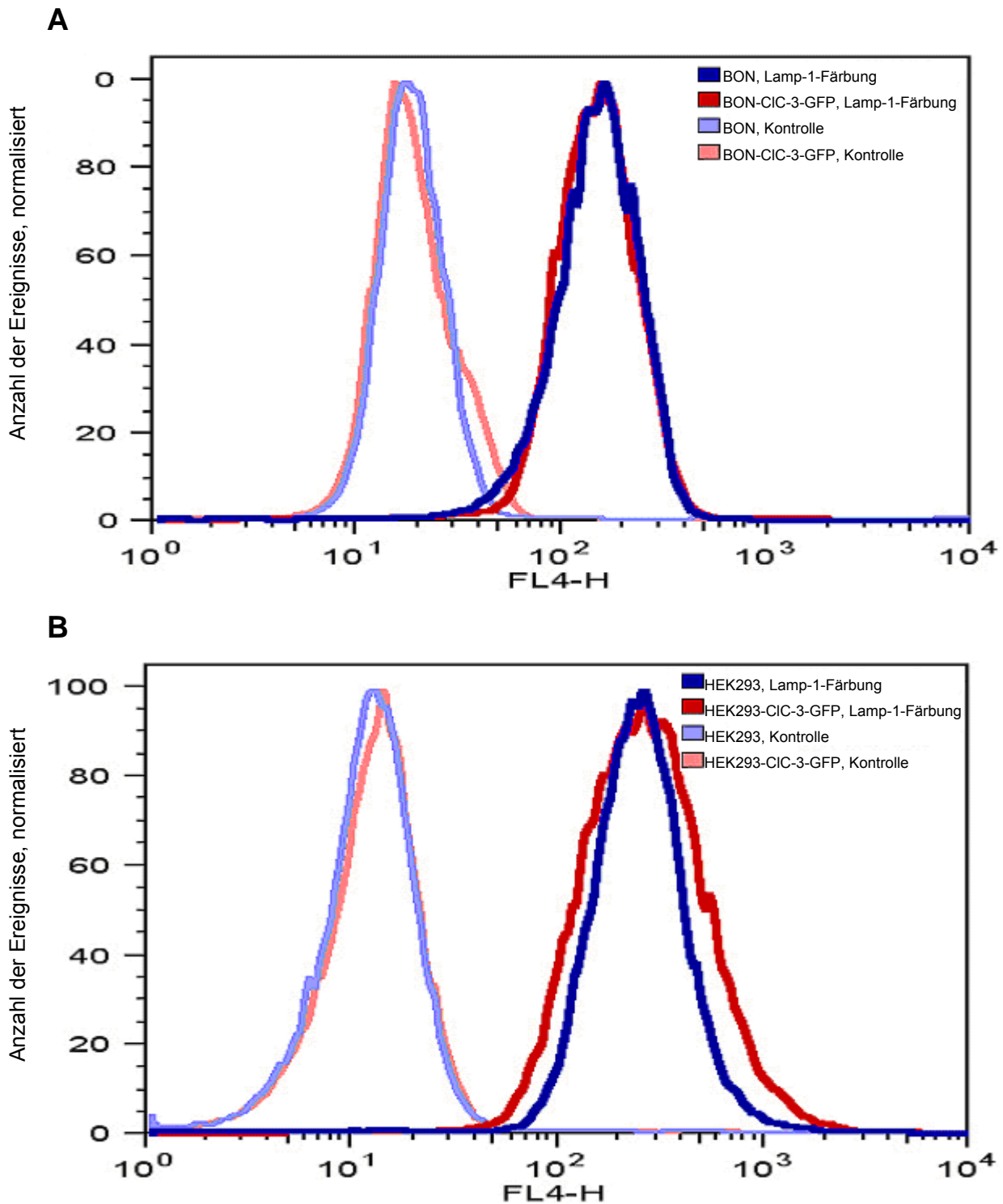


Abbildung 3.9. Überexpression von CIC-3-GFP in BON (A) und HEK293 (B) führt nicht zu einer Vergrößerung des lysosomalen / endosomalen Kompartiments.

Permeabilisierte Zellen wurden in Gegenwart eines Antikörpers gegen Lamp-1 (H4A3, Santa Cruz Biotechnics®) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Applikation eines Cy5-konjugierten Sekundärantikörpers (ab6563, Abcam; 30min Inkubation) erfolgte die Fluoreszenzmessung in der Durchflußzytometrie in FL-4 (Facsalibur, BD) und anschließende Datenanalyse mit Flowjo®.

Histogramme der Lamp-1-Färbeintensität der untransfizierten BON und HEK293-Zellen in blau, der CIC-3-GFP-überexprimierenden Klone BON-CIC-3-GFP und HEK293-CIC-3-GFP in rot.

In rosa und hellblau die jeweiligen Kontrollen, in denen nur der Sekundärantikörper verwendet wurde.

3.5. Einfluß von CIC-3 auf die Zytotoxizität von Etoposid

Resistenz von Tumorzellen gegen zytotoxische Substanzen ist ein zentrales Problem bei der Therapie von neuroendokrinen Tumoren. Neben anderen Mechanismen wie gestörter Apoptose oder vermehrter Expression von Effluxpumpen spielt die Anreicherung der meist schwach basischen Chemotherapeutika in intrazellulären azidischen Organellen eine wichtige Rolle. Hierbei wird die Substanz von ihrem intrazellulären Wirkort, welcher meist der Zellkern ist, ferngehalten und ihre Wirkung neutralisiert (Altan et al., 1998; Hurwitz et al., 1997; Raghunand et al., 2003).

Im Acridin Orange-Test konnte gezeigt werden, dass Überexpression von CIC-3-GFP den lysosomalen pH senkt. Ob CIC-3 eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Etoposid spielt, wurde mit dem XTT-Test untersucht; einer Methode zur Erfassung der Chemotherapiesensitivität von Tumorzelllinien (Scudiero et al., 1988).

Populationen von BON-CIC-3-GFP-Zellen mit hoher bzw. niedriger CIC-3-Expression wurden verschiedenen Konzentrationen von Etoposid über 48h ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass BON-CIC-3-GFP-Zellen mit hoher Expression von CIC-3-GFP stärkere Etoposid-Konzentrationen tolerieren, als solche mit niedriger. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse findet sich bei der vergleichenden Untersuchung von HEK293-CIC-3-GFP-Zellen mit hoher und mit niedriger Expression von CIC-3-GFP (**Abbildung 3.10. A und B**).

In den Versuchen mit BON-CIC-3-GFP-Zellen konnte die IC₅₀ experimentell nicht erreicht werden. Die hohe Resistenz dieser Zellen gegenüber Etoposid einerseits und eine nur begrenzte maximale Löslichkeit der Substanz andererseits verhinderten ein Abtöten von BON-CIC-3-GFP-Zellen bis zu dieser Schwelle (siehe auch Abschnitt 2.5.2. in Material und Methoden).

Die zum t-Test herangezogenen IC₅₀-Werte in den Experimenten mit BON-CIC-3-GFP-Zellen sind somit errechnete Werte, welche aus den experimentell ermittelten Datenpunkten (Sigmaplot[®] Version 8) durch nonlineare Regression bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.5.3.)

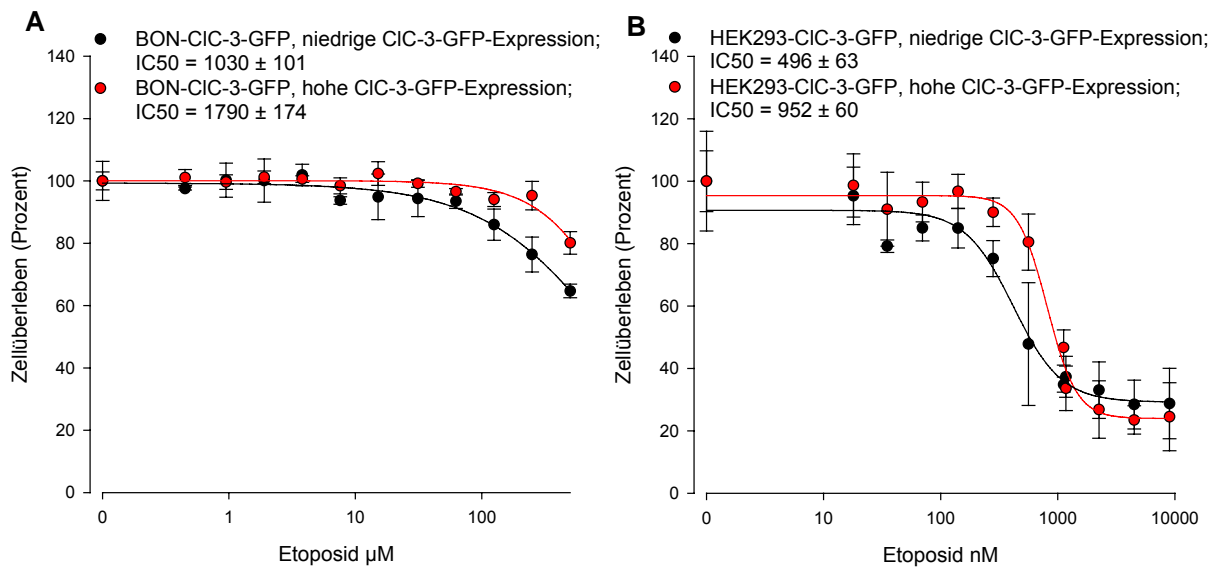


Abbildung 3.10. Überexpression von CIC-3-GFP in BON-CIC-3-GFP (A) und HEK293-CIC-3-GFP (B) erhöht die Resistenz gegenüber Etoposid.

CIC-3-GFP überexprimierende BON-CIC-3-GFP (A) oder HEK293-CIC-3-GFP-Zellen (B) wurden in Populationen mit hoher (rot) und niedriger (schwarz) Expression sortiert. Zellkultur erfolgte in Anwesenheit von Etoposid für 48h mit anschließender Messung der Zellüberlebensrate mit dem XTT-Test. Jede Etoposid-Konzentration wurde in 4 Replikaten getestet und das mittlere Zellüberleben berechnet. Berechnung der Kurven durch die Mittelwerte der Datenpunkte durch nonlineare Regression (Sigmaplot®). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die errechneten IC50 der beiden getesteten Zellpopulationen in BON-CIC-3-GFP und HEK293-CIC-3-GFP unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; t-Test; IC50-Werte und Standardabweichungen in Bildlegende).

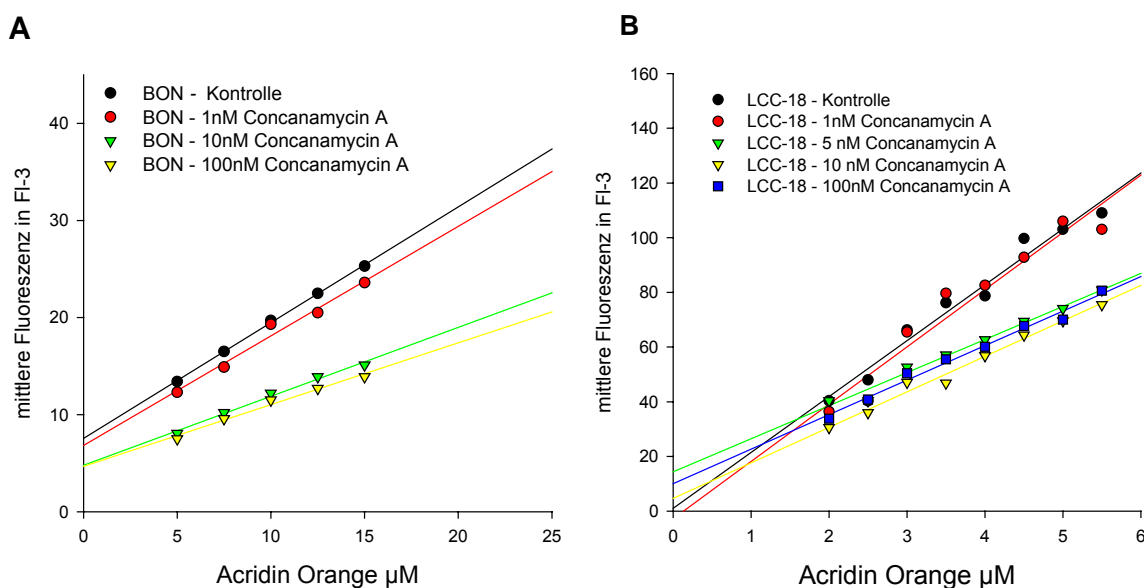


Abbildung 3.11. Kurzzeitinkubation mit niedrigen Dosen Concanamycin A hebt den intravesikulären pH in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON (A) und LCC-18 (B).

BON- und LCC-18-Zellen wurden mit verschiedenen nanomolaren Konzentrationen von Concanamycin A für 30 min inkubiert und anschließend trypsinisiert, gewaschen und in physiologischer Lösung (pH 7,2; 300mosm) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in Gegenwart aufsteigender Konzentrationen Acridin Orange (5-15µM für BON 8min; 1,5-5,5µM für LCC-18, 7min). Nach Erfassen der Fluoreszenz in FI-3 (>670nm; FACScalibur, BD) wurden in Flowjo® die mittleren Fluoreszenzwerte errechnet und gegen die Acridin Orange- Konzentration aufgetragen. Berechnung der Geraden durch die Datenpunkte mittels linearer Regression (Sigmaplot®). Die Anstiege der Geraden zwischen BON-Kontrolle und BON nach Behandlung mit 10nM Concanamycin A einerseits und LCC-18-Kontrolle und LCC-18 nach Behandlung mit 5nM Concanamycin A andererseits sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$; F-test).

3.6. Pharmakologische Manipulation des lysosomalen pH

Die durchgeführten Messungen zu Zytotoxizität und lysosomalem pH suggerieren einen kausalen Effekt erhöhter lysosomaler Azidität auf die Chemotherapieresistenz. Um den Einfluss des lysosomalen pHs auf die Empfänglichkeit neuroendokriner Zellen für Chemotherapie mit Etoposid aufzuzeigen, wurde in weiteren Experimenten der potente und spezifische Inhibitor der lysosomalen v-H⁺-ATPase Concanamycin A verwendet (Drose et al., 1993).

In vorbereitenden Messungen wurde die lysosomotrope Potenz von Concanamycin A in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON und LCC-18 untersucht, mit dem Ziel die minimale effektive Dosis zu bestimmen.

Eine deutliche Erniedrigung des intravesikulären pH konnte bei Applikation von 10nM in BON und 5nM in LCC-18 erreicht werden (**Abbildung 3.11. A und B**).

Werden BON-CIC-3-GFP und LCC-18-Zellen für eine halbe Stunde mit Concanamycin A vorbehandelt, so ergibt sich, im Vergleich zur Kontrolle, eine höhere Sensitivität für die Behandlung mit Etoposid (**Abbildung 3.12. A und B**).

Dabei ist die verwendete Konzentration von Concanamycin A selbst nicht toxisch für die Zellen (**Abbildung 3.13. A und B**).

3.7. Einfluß von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) auf lysosomale Azidifizierung

Concanamycin A ist ein hochselektiver Inhibitor der lysosomalen v-H⁺-ATPase. Seine hohe Toxizität verbietet jedoch die klinische Anwendung.

Omeprazol und Pantoprazol gehören zur Substanzklasse der Protonenpumpeninhibitoren (PPI) - einer Gruppe von Medikamenten, deren Zielstruktur die H⁺-ATPase der Parietalzellen des Magens ist. Sie sind Mittel der Wahl bei gastro-ösophagealer Refluxkrankheit (GERD) und von vergleichbar geringer Toxizität (Moayyedi & Talley, 2006). In verschiedenen Studien wird über ihre Eigenschaft berichtet, eine Wirkung auch auf die lysosomale v-H⁺-ATPase zu entfalten und Tumorzellen für die Behandlung mit schwach-basischen Chemotherapeutika zu sensibilisieren (Lee & Tannock, 2006; Luciani et al., 2004).

Keine Änderung des pH im intrazellulären azidischen Kompartiment ist messbar, wenn BON-CIC-3-GFP oder LCC-18-Zellen für 24h mit den PPI Omeprazol oder Pantoprazol behandelt werden (**Abbildung 3.14. A und B; 3.15. A und B**).

Werden BON-CIC-3-GFP und LCC-18-Zellen für 24h mit Omeprazol oder Pantoprazol vorbehandelt, so ergibt sich bezüglich der Toxizität des schwach basischen Chemotherapeutikums Etoposid kein Unterschied zur nicht vorbehandelten Kontrollgruppe (**Abbildung 3.16. A und B; 3.17. A und B**).

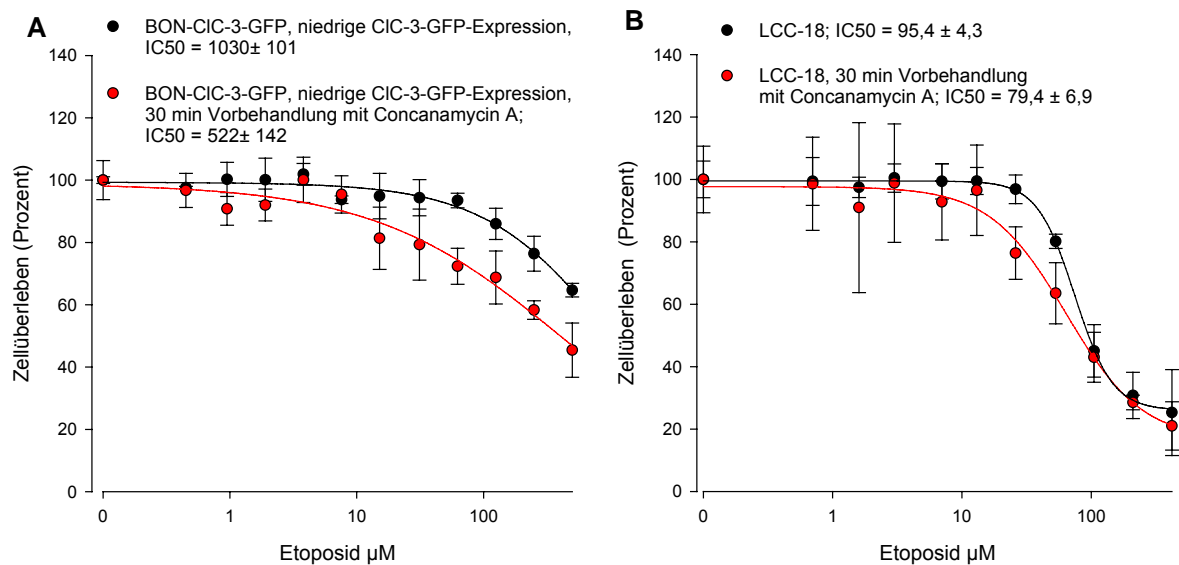


Abbildung 3.12. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Concanamycin A senkt die Resistenz gegenüber Etoposid.

BON-CIC-3-GFP-Zellen (A) oder LCC-18-Zellen (B) wurden 48h in Anwesenheit von Etoposid in 96-Loch-Platten kultiviert. Unmittelbar vorher erfolgte die Inkubation mit 10nM (BON-CIC-3-GFP) bzw. 5nM (LCC-18) Concanamycin A für 30min. In der Kontrollgruppe Vorbehandlung mit Zellkulturmedium. Die Messung der Zellüberlebensrate erfolgte mit dem XTT-Test. Es wurden 4 Replikate je Etoposid-Konzentration getestet und das mittlere Zellüberleben berechnet. Berechnung der Kurven durch die Datenpunkte durch nonlineare Regression (Sigmaplot®). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die errechneten IC₅₀ der beiden getesteten Zellpopulationen (Vorbehandlung vs. keine Vorbehandlung) in BON-CIC-3-GFP bzw. LCC-18 unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; t-Test; IC₅₀ und Standardabweichungen in Bildlegende).

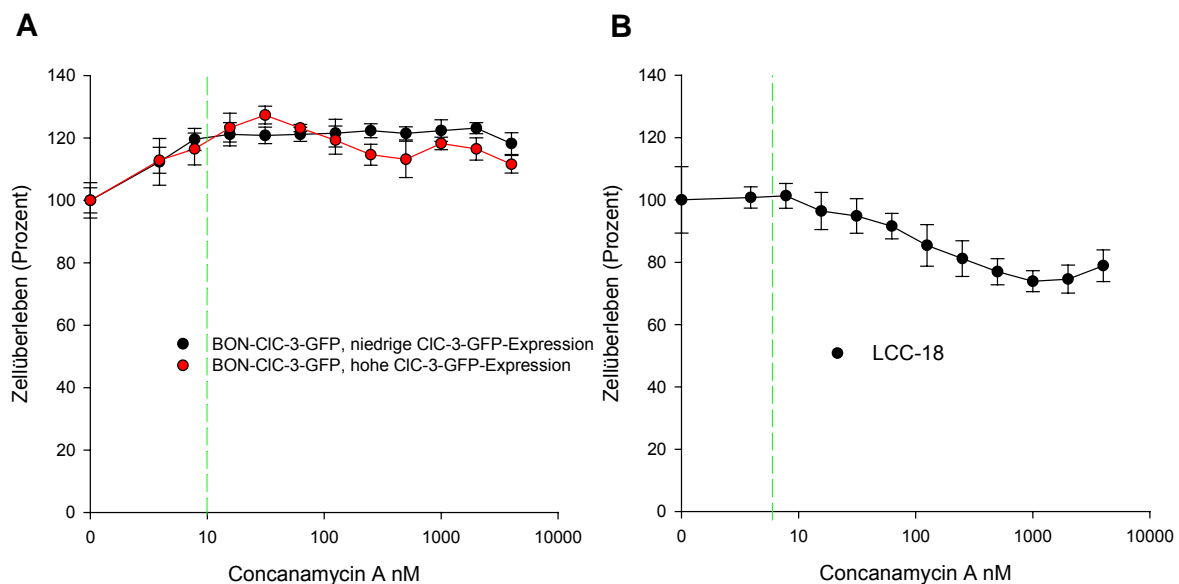


Abbildung 3.13. Die Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP (A) oder LCC-18-Zellen (B) mit Concanamycin A (30min, 10nM) ist nicht toxisch.

Zellen wurden in 96-Loch-Platten 30 min in Gegenwart ansteigender Konzentrationen Concanamycin A inkubiert und nach Waschen weitere 48h in Medium kultiviert. Die Zellüberlebensrate wurde mit dem XTT bestimmt. Es wurden 4 Replikate je Concanamycin A-Konzentration getestet und der Mittelwert errechnet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die grüngestrichelten Vertikalen repräsentieren die Concanamycin A-Konzentration, welche in den XTT-Tests verwendet wurde.

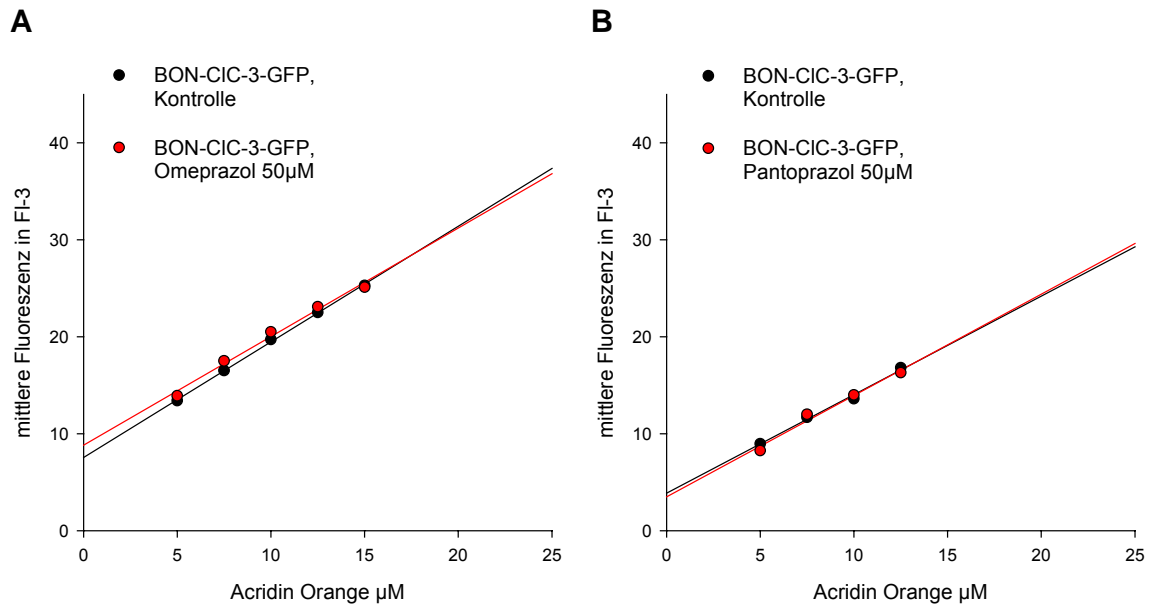


Abbildung 3.14. Behandlung mit den Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol (A) and Pantoprazol (B) verändert den intravesikulären pH in BON-CIC-3-GFP-Zellen nicht.

BON-CIC-3-GFP-Zellen wurden in Gegenwart von 50µM Omeprazol und Pantoprazol für 24h inkubiert und die intravesikuläre Azidität, wie in 2.4.4. beschrieben, bestimmt. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied des intravesikulären pH nach Behandlung mit PPI ($p > 0,05$; F-test).

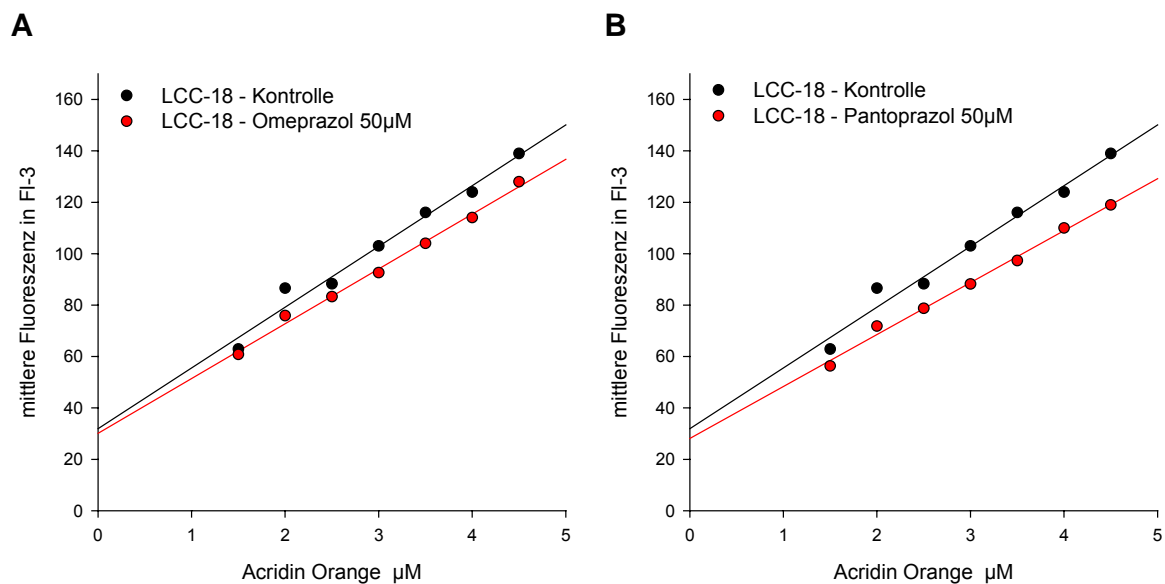


Abbildung 3.15. Behandlung mit den Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol (A) and Pantoprazol (B) verändert den intravesikulären pH in LCC-18-Zellen nicht.

LCC-18-Zellen wurden in Gegenwart von 50µM Omeprazol und Pantoprazol für 24h inkubiert und die intravesikuläre Azidität wie in 2.4.4. beschrieben, bestimmt. Die in den Graphen dargestellte Tendenz, dass PPI den intravesikulären pH leicht senken, ist nicht statistisch signifikant. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied des intravesikulären pH nach Behandlung mit PPI ($p > 0,05$; F-test).

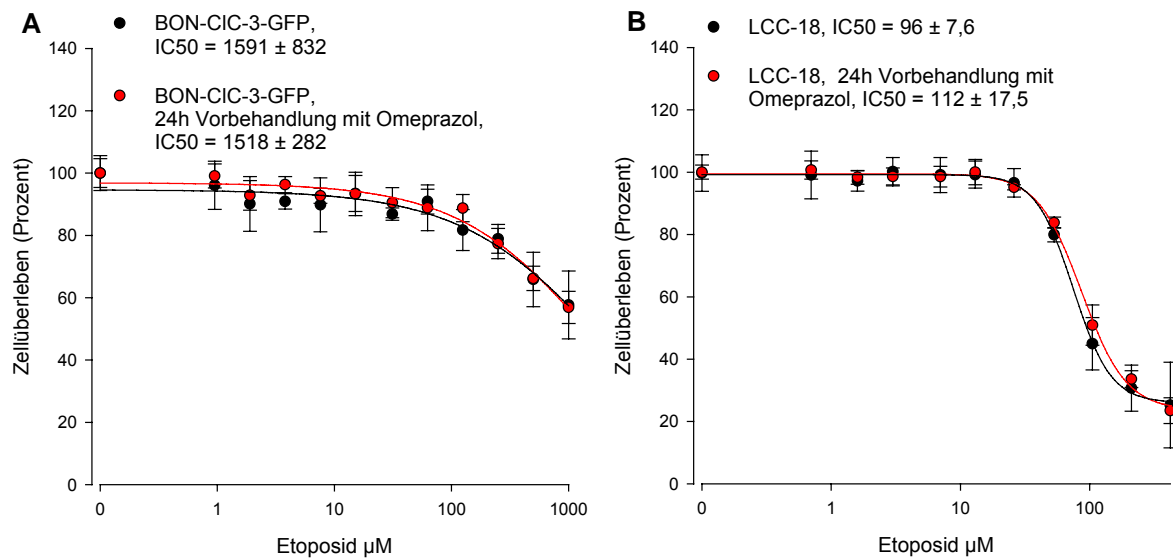


Abbildung 3.16. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP-Zellen (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Omeprazol verändert die Resistenz gegenüber Etoposid nicht.

BON-CIC-3-GFP (A) oder LCC-18-Zellen (B) wurden 48h in Anwesenheit von Etoposid in 96-Loch-Platten kultiviert. Unmittelbar vorher erfolgte die Inkubation mit 50 μM Omeprazol für 24h. In der Kontrollgruppe Vorbehandlung mit Zellkulturmedium. Die Messung der Zellüberlebensrate erfolgte mit dem XTT-Test. Es wurden 4 Replikate je Etoposid-Konzentration getestet und das mittlere Zellüberleben berechnet. Berechnung der Kurven durch die Datenpunkte durch nonlineare Regression (Sigmaplot®). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die errechneten IC₅₀ der beiden getesteten Zellpopulationen (Vorbehandlung versus keine Vorbehandlung) in BON-CIC-3-GFP bzw. LCC-18 unterscheidet sich nicht signifikant ($p > 0,05$; t-Test; IC₅₀-Werte und Standardabweichungen in Bildlegende).

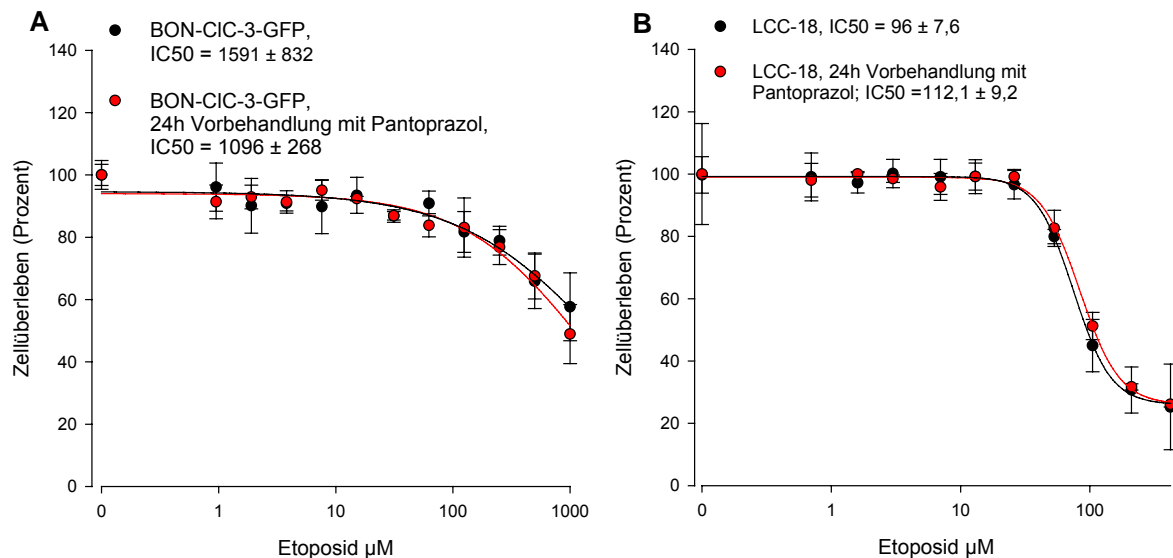


Abbildung 3.17. Vorbehandlung von BON-CIC-3-GFP-Zellen (A) und LCC-18-Zellen (B) mit Pantoprazol verändert die Resistenz gegenüber Etoposid nicht.

BON-CIC-3-GFP-Zellen (A) oder LCC-18-Zellen (B) wurden 48h in Anwesenheit von Etoposid in 96-Loch-Platten kultiviert. Unmittelbar vorher erfolgte die Inkubation mit 50 μM Pantoprazol für 24h. In der Kontrollgruppe Vorbehandlung mit Zellkulturmedium. Die Messung der Zellüberlebensrate erfolgte mit dem XTT-Test. Es wurden 4 Replikate je Etoposid-Konzentration getestet und das mittlere Zellüberleben berechnet. Berechnung der Kurven durch die Datenpunkte durch nonlineare Regression (Sigmaplot®). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die errechneten IC₅₀ der beiden getesteten Zellpopulationen (Vorbehandlung versus keine Vorbehandlung) in BON-CIC-3-GFP bzw. LCC-18 unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$; t-Test; IC₅₀-Werte und Standardabweichungen in Bildlegende).

3.8. Präparation und durchflußzytometrische Analyse isolierter Lysosomen aus BON-Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und weiterer Studien anderer Forschungsgruppen unterstützen die funktionelle Bedeutung von CIC-3 bei der lysosomalen Ansäuerung (Barg et al., 2001; Li et al., 2002).

Um die Funktion von CIC-3 ausschließlich in Lysosomen zu untersuchen, wäre es von Vorteil, mit isolierten, metabolisch aktiven Lysosomen zu arbeiten. Sie stellen ein weniger komplexes System als eine Zelle dar; pH-Messungen könnten an nur einem Kompartiment, welches nicht in ein anderes inkorporiert ist, durchgeführt werden.

Die hier angewandte Prozedur für die Lysosomenpurifikation aus BON-Zellen basiert auf Zelllyse und serieller Zentrifugation, gefolgt von Ultrazentrifugation entlang eines Dichtegradienten. Die einzelnen Fraktionen aus dem Dichtegradienten wurden anschließend mit einem Antikörper gegen den lysosomalen Marker LAMP-1 gefärbt. Zur Detektion des Lamp-1-Signals wurde ein Cy5-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. 9 Fraktionen entsprechend 9 Bändern aus den 6 in der Ultrazentrifuge verwendeten Dichtemedien wurden in der Durchflußzytometrie analysiert.

Ebenso wurden die Fraktionen der Lysosomenpurifikation aus BON-CIC-3-GFP-Zellen in der Durchflußzytometrie gemessen. **Abbildung 3.18. A** zeigt die Histogramme der 4 Fraktionen aus BON-CIC-3-GFP-Zellen mit der höchsten Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich (FI-1) – entsprechend der CIC-3-GFP-Präsenz - unter ihnen Fraktion 9 mit der hellsten durchschnittlichen grünen Fluoreszenzintensität. Misst man alle 9 Fraktionen im langwelligen roten Bereich (FI-4) – entsprechend der LAMP-1 Präsenz -, so haben dieselben 4 Fraktionen auch in rot die größte Fluoreszenzintensität. Auch in FI-4 zeigt Fraktion 9 die meiste Fluoreszenz (**Abbildung 3.18. B**).

Die durchflußzytometrischen Messungen zeigen, dass die Fluoreszenzintensität der Gradienten in FI-1 mit derjenigen in FI-4 einhergeht und unterstützen damit die kompartimentale Kolo-kalisation von LAMP-1 und CIC-3-GFP. Sie unterstreichen damit ebenfalls die lysosomale Lokalisation von CIC-3.

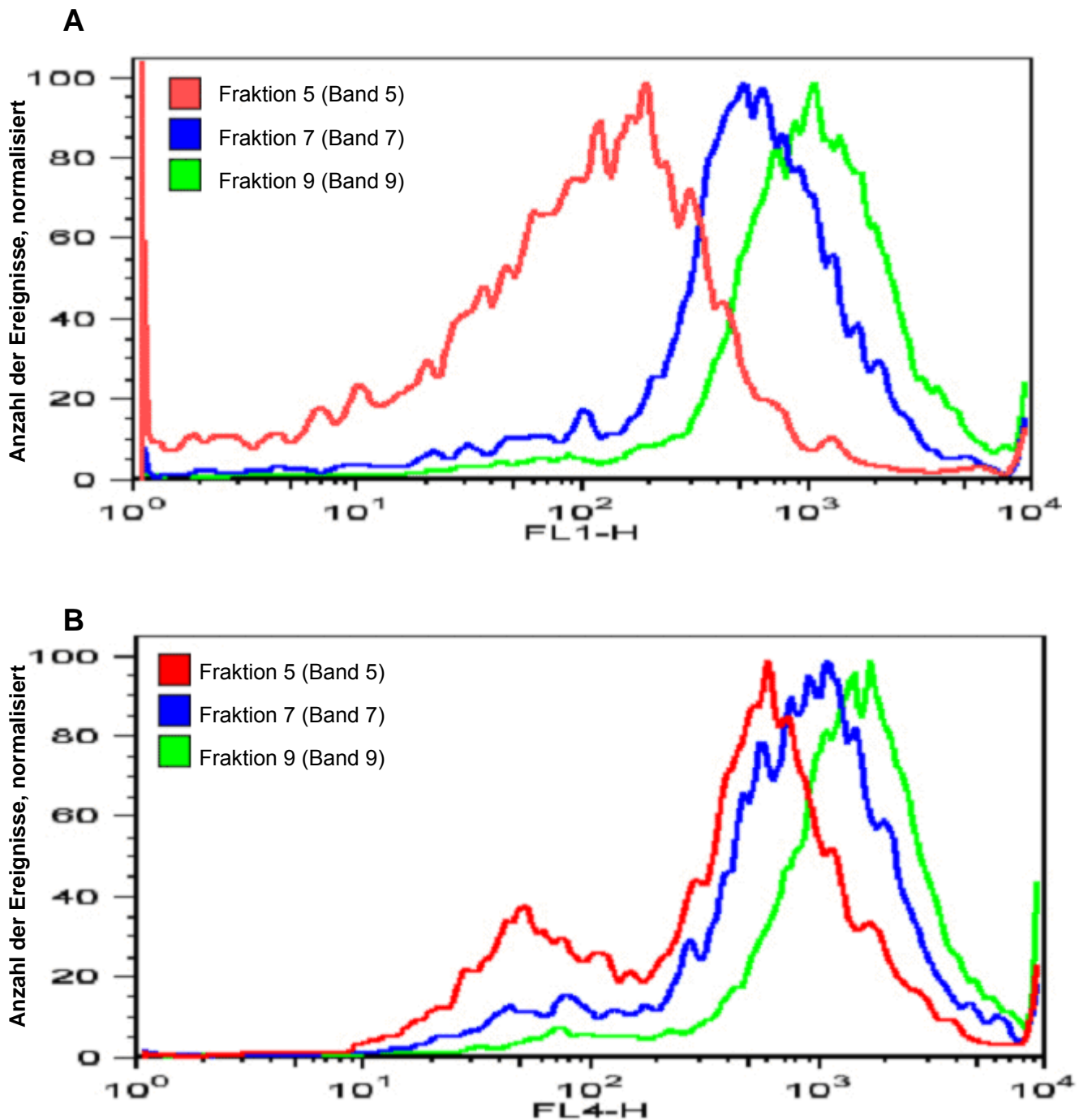


Abbildung 3.18. Nach Ultrazentrifugation eines Zellysats von BON-CIC-3-GFP-Zellen zeigt Fraktion 9 (grün) sowohl in Fl-1 (A) als auch Fl-4 (B) die höchste Fluoreszenzintensität.

Nach der Auftrennung durch Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen bei Raumtemperatur für 1h in Gegenwart eines Antikörpers gegen Lamp-1 inkubiert (1:50, sc-20011, monoklonal, Santa Cruz). Detektion des Primärantikörpers erfolgte durch einen Cy5-konjugierten anti-Maus-Antikörper (abcam, ab6563).

In der Durchflußzytometrie erfolgte die Darstellung des CIC-3-GFP-Signals in Fl-1 (A). Messung der Lamp-1-gefärbten Strukturen in Fl-4. Die Fluoreszenzintensitäten der Ereignisse der einzelnen Gradienten wurden mit der Software Flowjo® als normalisierte Histogramme dargestellt.

In den darauffolgenden Experimenten wurde ausschließlich Fraktion 9 verwendet, um die funktionelle Relevanz von CIC-3 für die Azidität der isolierten Lysosomen zu untersuchen. Die Azidität von Lysosomen aus BON-Zellen wurde im Acridin Orange-Test mit Lysosomen aus BON-CIC-3-GFP-Zellen verglichen. Ebenso wurden Lysosomen aus BON-CIC-3-GFP- hoch und niedrig exprimierenden Subpopulationen der BON-CIC-3-GFP-Zellen untereinander verglichen. In beiden Experimenten weisen Lysosomen von Zellen mit hoher CIC-3-GFP-Expression einen azidischeren intralysosomalen pH auf (**Abbildung 3.19. A und B**).

In einem weiteren Versuch wurden Lysosomen aus BON-Zellen für 2 Stunden in chloridfreiem oder Chlorid in physiologischer intrazellulärer Konzentration enthaltendem Medium inkubiert und ihre Azidität verglichen. Lysosomen, die in Medium ohne Chlorid waren, wiesen einen alkalischeren pH auf.

Zur Demonstration der metabolischen Aktivität der aufgereinigten Lysosomen wurden die Lysosomen für 15 min in Anwesenheit von Concanamycin A inkubiert. Diese Behandlung alkalisierte den lysosomalen pH im Acridin Orange-Test (**Abbildung 3.20. A und B**).

Die den Abbildungen 3.19. und 3.20. zugrundeliegenden Experimente erforderten eine lange Phase der Vorbereitung, um geeignete Bedingungen für die erfolgreiche Organellenpräparation sowie deren durchflußzytometrische Analyse zu finden. Selbst bei hohem Ausgangsvolumen des für die Präparation verwendeten Zellpellets war die Ausbeute an lysosomenreicher Organellenfraktion nur gering.

Die Ergebnisse der in den Abbildungen 3.19. und 3.20. gezeigten FACS-Analysen sind deshalb nur als vorläufige Daten zu werten. Sie stützen die Hypothese, dass CIC-3 durch Bereitstellung eines Anionenstroms die lysosomale Azidifizierung befördert, bedürfen jedoch der endgültigen Bestätigung durch mehrfache Reproduktion.

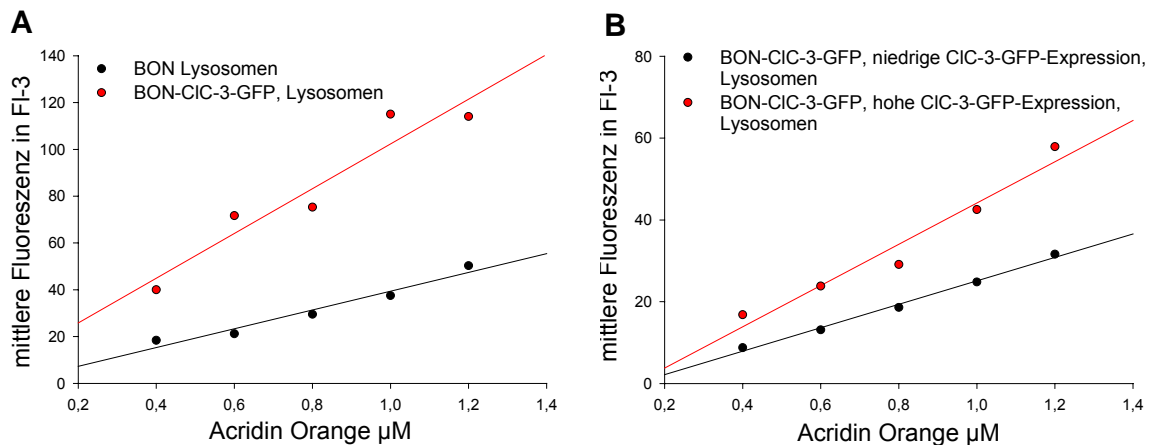


Abbildung 3.19.

(A) Lysosomen von BON-CIC-3-GFP-Zellen haben einen azidischeren pH als Lysosomen von BON-Zellen.

(B) Lysosomen von BON-CIC-3-GFP hoch-exprimierenden Zellen haben einen azidischeren pH als Lysosomen aus BON-CIC-3-GFP niedrig-exprimierenden Zellen.

Durch Ultrazentrifugation gewonnene Lysosomen wurden in Gegenwart von Acridin Orange (0,4-1,2µM) inkubiert und die Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (FI-3; >670nm) im Durchflußzytometer (Facsalibur, BD) erfasst. Die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte wurden nach der Messung mit Flowjo® errechnet, in Sigmaplot® gegen die Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Berechnung der Geraden durch die Datenpunkte mittels linearer Regression (Sigmaplot®). Die Anstiege der Geraden unterscheiden sich signifikant. ($p < 0,05$; F-test).

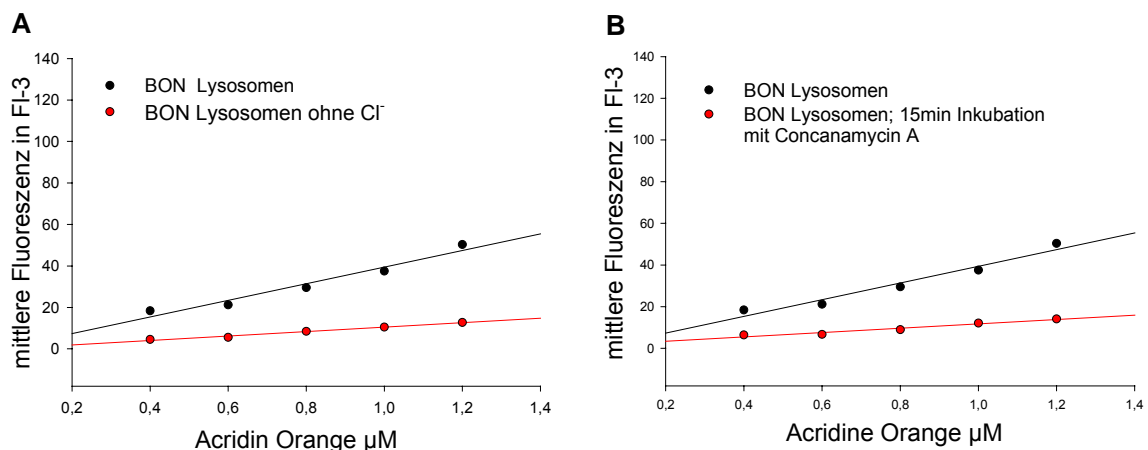


Abbildung 3.20.

(A) Inkubation in chloridfreiem Medium alkalisiert den pH in Lysosomen aus BON-Zellen.

(B) Inkubation in Gegenwart von Concanamycin A alkalisiert den pH in Lysosomen aus BON-Zellen.

Durch Ultrazentrifugation gewonnene Lysosomen wurden für mindestens 2h in chloridfreiem Medium (A) bzw. 15min in Gegenwart von 10nM Concanamycin A (B) inkubiert. Für die Messung lysosomaler Azidität wurde in Gegenwart von Acridin Orange (0,4-1,2µM) für 2min inkubiert und die Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (FI-3; >670nm) im Durchflußzytometer (Facsalibur, BD) erfasst. Die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte wurden nach Messung mit Flowjo® errechnet, in Sigmaplot® gegen die Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Berechnung der Geraden durch die Datenpunkte mittels linearer Regression (Sigmaplot®). Die Anstiege der Geraden unterscheiden sich signifikant. ($p < 0,01$; F-test).

3.9. Pgp und MRP1 in BON-Zellen

Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Studie zur Zytotoxizität zeigten die neuroendokrinen Tumorzellen eine hohe Toleranz für Etoposid.

Um eine erhöhte Expression von ABC-Transportern als Ursache für diese Resistenz auszuschließen, wurden BON und BON-CIC-3-GFP-Zellen im Western Blot auf das Vorhandensein der ABC-Transporter Pgp und MRP1, deren Substrat Etoposid ist, untersucht (Ambudkar et al., 1999; Borst et al., 2000; Kool et al., 1999). Es konnte keine Expression von Pgp oder MRP1 nachgewiesen werden (**Abbildung 3.21. A und B**).

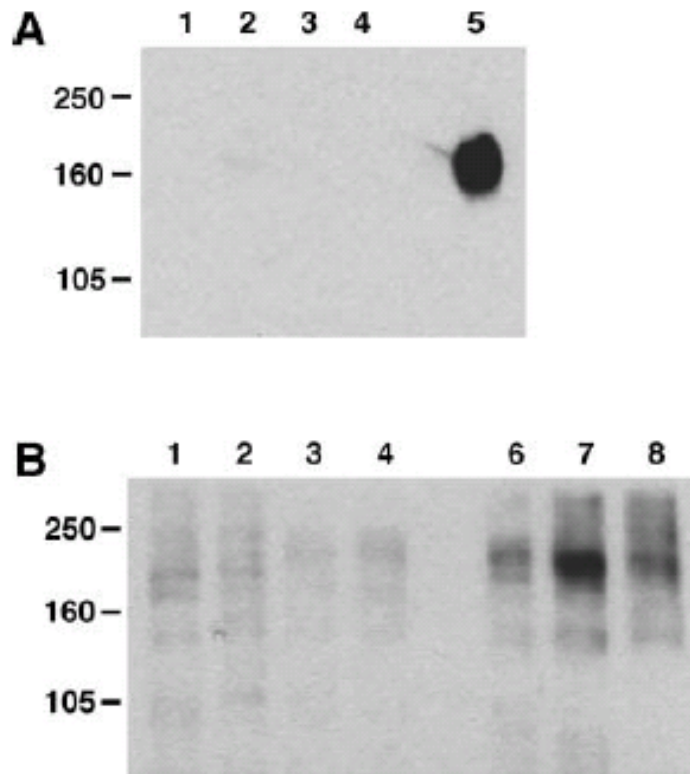


Abbildung 3.21. BON-Zellen exprimieren kein Pgp (A) oder MRP1 (B)

Western Blot Analyse in totaler Zellmembranpräparation. 30 μ g (A) bzw. 25 μ g (B) Protein Membranprotein wurde in jede Tasche eines 8% SDS-Gels gelegt. Molekulargewichte in kDa.

A - Pgp

Bahn 1, BON-Zellen

Bahn 2, BON-CIC-3-GFP-Zellen

Bahn 3, BON-CIC-3-GFP-Zellen mit hoher CIC-3-GFP-Expression

Bahn 4, BON-CIC-3-GFP-Zellen mit niedriger CIC-3-GFP-Expression

Bahn 5, NIH-3T3-MDR1-Zellen, Überexpressor von Pgp als Kontrolle

B – MRP1

Bahn 1, BON-Zellen

Bahn 2, BON-CIC-3-GFP-Zellen

Bahn 3, BON-CIC-3-GFP-Zellen mit hoher CIC-3-GFP-Expression

Bahn 4, BON-CIC-3-GFP-Zellen mit niedriger CIC-3-GFP-Expression

Bahn 5, leer

Bahn 6, SW-620, humane Kolon-Karzinom-Zelllinie als Kontrolle

Bahn 7, A-549, humane Adenokarzinom-Zelllinie als Kontrolle

Bahn 8, T98 G, humane Glioblastom-Zelllinie als Kontrolle

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Chloridkanals CIC-3 auf die lysosomale Azidifizierung in neuroendokrinen Tumorzellen und die Bedeutung dessen für die Chemotherapieresistenz dieser Zellen zu erforschen.

4.1. Intrazelluläre Lokalisation von CIC-3 in neuroendokrinen Zellen

Mithilfe eines CIC-3-GFP überexprimierenden BON-Zellklons wurde dargestellt, dass CIC-3-GFP in der Membran von Lysosomen und Endosomen lokalisiert ist – ein Ergebnis, welches durch die Untersuchungen von Li et al. und anderen Wissenschaftlern bestätigt wird (Hara-Chikuma et al., 2005; Li et al., 2002; Suzuki et al., 2006). Die meisten anderen Autoren schlagen ebenfalls intrazelluläre Lokalisationen wie exozytotische, endozytotische und synaptische Vesikel vor (Barg et al., 2001; Stobrawa et al., 2001).

In einigen wenigen Studien wird die Expression des Proteins in Zellkern oder Plasmamembran gezeigt (Shimada et al., 2000; Wang et al., 2000; Wang et al., 2006). Weylandt et al. konnten jedoch demonstrieren, dass der in den meisten dieser Studien verwendete kommerzielle Antikörper (Alomone[®]) nicht spezifisch für CIC-3 ist und auch mit anderen zellulären Proteinen kreuzreagiert. Dies könnte eine Erklärung für die Detektion des Proteins in Zellkern und Plasmamembran sein.

Ein wichtiges Problem bei derartigen Untersuchungen ist die begrenzte Spezifität, mit der subzelluläre Kompartimente mit Hilfe immunhistochemischer Färbemethoden voneinander abgegrenzt und identifiziert werden können. Dies liegt zum einen an der Kontinuität, mit der verschiedene Vesikelpopulationen ineinander übergehen, sich das endomembranöse System aus Golgi, ER, Zellkern, Lysosomen, Endosomen und anderen Vesikeln in ständigem Fluss befindet (Saraste & Goud, 2007). Andererseits können lysosomale Membranproteine und Enzyme in manchen Zelltypen regelhaft in fast allen endozytotischen und biosynthetischen Organellen gefunden werden (Baron et al., 1988).

Es ist somit denkbar, dass der Vesikeltyp, dem CIC-3 zugeordnet werden muss, mit der Herkunft der untersuchten Zelle variiert. In neuroendokrinen Zellen scheint der Kanal vornehmlich in Lysosomen und späten Endosomen exprimiert zu werden.

4.2. Kolokalisationsstudien mittels Überexpression von CIC-3-GFP

Die heterologe Überexpression von carboxyterminal GFP-markiertem CIC-3 in BON-CIC-3-GFP, einem transgenen Klon der neuroendokrinen Zelllinie BON, war die hier benutzte Methode der Wahl, die subzelluläre Lokalisation von CIC-3 zu untersuchen (Weylandt, 2000).

Die erzwungene Überexpression eines Proteins kann die Kapazität des intrazellulären Targeting-Mechanismus überschreiten und somit zu einem artifiziellen Verteilungsmuster führen. So wurde bei CIC-3-GFP exprimierenden HEK293-Zellen das Protein auch in der Plasmamembran nachgewiesen (Weylandt, 2000). Dies ist jedoch wahrscheinlich nicht mit der natürlichen Lokalisation von zelleigenem CIC-3 gleichzusetzen, sondern eher als Folge der Übersättigung des Targeting-Mechanismus zu deuten. Ein solcher Zusammenhang zwischen Überexpression und Erscheinen eines intrazellulären Proteins in der Plasmamembran konnte in ähnlicher Weise bereits für CIC-4 und CIC-5 in HEK293-Zellen und Igp120 (lysosomales Membranglykoprotein 120) in CHO-Zellen bestätigt werden (Friedrich et al., 1999; Harter & Mellman, 1992).

Die hier verwendete neuroendokrine Zelllinie BON weist im Western Blot eine hohe endogene Expression für CIC-3 auf und ist damit ein geeigneteres System für die Erforschung des Kanals als zum Beispiel HEK293-Zellen mit geringer endogener Expression. Bei der Untersuchung von BON-CIC-3-GFP im konfokalen Mikroskop war CIC-3-GFP ausschließlich in intrazellulären Vesikeln und Vesikelmembranen präsent. Deshalb wurden in weiteren Kolokalisationsexperimenten nur Marker für intrazelluläre Organellen benutzt.

4.3. CIC-3 und Sekretion

Andere Arbeiten konnten die bevorzugte Anreicherung von CIC-3 in synaptischen Vesikeln hippokampaler Neuronen und in exozytotischen Vesikeln pankreatischer β -Zellen zeigen (Barg et al., 2001; Stobrawa et al., 2001). Eine derartige Verteilung könnte auf die funktionelle Bedeutung von CIC-3 im Rahmen sekretorischer Prozesse hinweisen. Um diese Annahme zu prüfen wurden BON-CIC-3-GFP-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Chromogranin A und Synaptophysin immunzytochemisch gefärbt. Die genannten Proteine sind Marker für 2 Vesikelarten,

die die 2 wesentlichen Stoffwechselwege der Sekretion in neuroendokrinen Zellen repräsentieren (Bauerfeind et al., 1994). Chromogranin A ist ein Markerprotein für *large dense core vesicles* (LDCV), Synaptophysin für *small synaptic vesicles* (SSV). Die Tatsache, dass CIC-3-GFP an anderen intrazellulären Orten als den genannten detektierbar war, macht eine funktionelle Bedeutung des Kanals bei der Sekretion in neuroendokrinen Zellen unwahrscheinlich.

Kolokalisation mit LAMP-1 und Acridin Orange deuten eher in Richtung einer Rolle bei der lysosomalen Azidifizierung – eine vielfach von anderen Autoren bestätigte Hypothese (Hara-Chikuma et al., 2005; Li et al., 2002).

4.4. CIC-3 und pH des intrazellulären Kompartiments

Die durchgeführten Messungen des pH im intrazellulären Kompartiment stützen die Tatsache, dass CIC-3 die lysosomale Azidifizierung befördert.

An BON-Zellen konnte gezeigt werden, dass Überexpression von CIC-3-GFP, den pH im intrazellulären Kompartiment erniedrigt. Validiert wurden diese Daten durch gleichgerichtete Ergebnisse bei Experimenten mit einem CIC-3-GFP überexprimierenden HEK293-Klon.

Stabile heterologe Expression von CIC-3-GFP in BON-CIC-3-GFP und HEK293-CIC-3-GFP erfordert permanente Kultur der Zellen in Anwesenheit des Neomycin-Analogons G418. Denkbar ist, dass Langzeitbehandlung in selektivem Medium zu intrazellulären pH-Verschiebungen führt. Ein solches Artefakt wurde ausgeschlossen durch Vergleich von Subgruppen von BON-CIC-3-GFP-Zellen mit unterschiedlich hoher CIC-3-GFP-Expression. Ebenso wurde mit einem CIC-3-GFP überexprimierenden HEK293-Klon (HEK293-CIC-3-GFP) verfahren.

Ein anderes Problem bei stabiler Überexpression eines Proteins ist, dass sie die betroffene Zelle zur Vergrößerung ihres Proteinabbauapparates zwingen könnte. Das Ergebnis wäre eine möglicherweise veränderte Größe oder Anzahl von Lysosomen, welche im Acridin Orange-Test fälschlich als Senkung des intravesikulären pH erfasst würden. Der fehlende Unterschied bezüglich Größe und Anzahl von Lysosomen zwischen den nativen Zellen und ihrem CIC-3-GFP-überexprimierenden

Klon bei BON und HEK293 – durchflußzytometrisch gemessen als Expression des lysosomalen Markerproteins LAMP-1 – schließt dieses Artefakt jedoch aus.

Bei der angewandten experimentellen Vorgehensweise ist es nicht wahrscheinlich, dass die gesteigerte lysosomale Azidifizierung ein durch permanente Kultur in selektivem Medium verursachtes Artefakt ist.

Für die weitere Erforschung CIC-3-vermittelter Veränderungen wird es jedoch notwendig sein, eine Methode zu entwickeln, welche die endogene Kanalaktivität misst und sich nicht auf Beobachtungen in Systemen mit heterologer Expression verlassen muss. Eine mögliche Alternative wäre hier die Herabregulation von endogenem CIC-3 mittels Antisense-RNA oder RNA-Interferenz.

4.5. CIC-3 und Zytotoxizität von Etoposid

Es ist bekannt, dass intrazelluläre azidische Organellen durch Sequestration schwach basische Chemotherapeutika von ihrem Wirkort im Nukleus fernhalten und die Zelle somit vor Apoptose und Zelltod schützen können (Altan et al., 1998; Hurwitz et al., 1997; Rajagopal & Simon, 2003; Schindler et al., 1996).

Die durchgeführten Experimente mit Acridin Orange zeigten einen CIC-3-abhängigen Effekt auf die lysosomale Azidität in BON-CIC-3-GFP. Die Hypothese, dass dieser Effekt für die Resistenz gegenüber Etoposid relevant ist, konnte in Zytotoxizitätstests bestätigt werden – BON-CIC-3-GFP-Zellen, selektiert für eine hohe CIC-3-GFP-Expression, tolerieren höhere Dosen des Chemotherapeutikums als BON-CIC-3-GFP-Zellen, welche für eine geringe Expression des Proteins selektiert wurden.

Dieselben Ergebnisse bei HEK293-CIC-3-GFP-Zellen bekräftigen die Rolle von CIC-3 als Resistenzmechanismus.

Die Möglichkeit eines Artefakts wegen Langzeitbehandlung mit G418 wurde durch den Vergleich von Subgruppen unterschiedlich hoher CIC-3-GFP-Expression des jeweiligen überexprimierenden Klons ausgeschlossen.

Auch hier sind zukünftige Experimente unter Messung des Effekts von endogenem CIC-3 notwendig. Dies könnte unter Verwendung von siRNA gegen CIC-3-mRNA geschehen.

Ein Problem der vorliegenden Studien war die bereits basal vorliegende hohe Resistenz gegen Etoposid in den verwendeten neuroendokrinen BON-Zellen. Diese

fürte dazu, dass in den hier vorgestellten Experimenten mit BON-CIC-3-GFP Zellen – aufgrund der zu geringen Löslichkeit von Etoposid – die notwendigen hohen Dosen zum Erreichen des IC50 nicht verabreicht werden konnten. Daher wurde sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden, einen IC50-Wert zum Vergleich auch in den Experimenten zu berechnen, in denen die hierfür notwendige Konzentration des Chemotherapeutikums nicht erreicht werden konnte (siehe Material und Methoden 2.5.2. und 2.5.3.).

4.6. pH-abhängige Anreicherung von Chemotherapeutika als Mechanismus für Multidrug Resistance

Demant et al. und später auch Raghunand et al. haben die Auswirkung azidischer Vesikel auf Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika sowohl theoretisch als auch praktisch untersucht (Demant et al., 1990; Raghunand et al., 1999). In ihren Studien entwickeln sie rechnerische Modelle zur Beschreibung pH-abhängiger Chemoresistenz. Diese Modelle basieren auf der Annahme, dass sich die Moleküle eines Chemotherapeutikums auf 4 Kompartimente verteilen: das extrazelluläre Medium, das Zytosol, den Nukleus und azidische Vesikel. Die Gleichungen, um den Fluss der Moleküle zu beschreiben, schließen Faktoren wie den intra- und extrazellulären pH, den vesikulären pH, den pK der Substanz, die Rate an Vesikelumsatz, Zellvolumen etc. in physiologisch angemessenen Reichweiten ein. Entsprechend ihren Modellen kann eine Zelle die zytosolische Konzentration eines schwach basischen Medikaments unter anderem durch folgende Maßnahmen beeinflussen:

1. Aktiver Transport in azidische intrazelluläre Vesikel
2. erhöhte Erneuerungsrate des azidischen Kompartiments
3. erniedrigter pH des azidischen Kompartiments
4. erhöhter pH-Gradient über der Plasmamembran

Die Autoren betonen, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Volumen des extrazellulären Kompartiments unverhältnismäßig größer ist als Zytosol und intrazelluläres Kompartiment. Somit ist in diesem Modell die extrazelluläre Konzentration einer Substanz die wichtigste Determinante der intrazellulären Konzentration. Folglich könne allein die lysosomale Sequestration des protonierten Medikaments nicht dessen Konzentration im Zytoplasma und Nukleus erniedrigen.

Eine definierte Mindestrate von endosomalem/lysosomalem Umsatz müsse zusätzlich seine Ausschleusung aus der Zelle ermöglichen, damit der lysosomale pH ein maßgeblicher Faktor bei der Chemoresistenz sein kann.

Ein Effluxmechanismus jedoch, der auf alleiniger pH-abhängiger Medikamentenanreicherung durch Diffusion in ein endosomales/lysosomales Kompartiment von pH 5 und zusätzlicher Ausschleusung der Substanz durch Exozytose beruhe, könne nicht für eine suffiziente Elimination ausreichen. Dafür wären unrealistisch hohe Umsatz- und Exozytoseraten und/oder unrealistisch niedrige intravesikuläre pH notwendig. Die Autoren schlussfolgern daher, dass passive, pH-abhängige Sequestration nicht für Chemoresistenz verantwortlich sein kann.

Basierend auf diesen theoretischen Modellvorstellungen schlagen Raghunand et al. einen organischen Kation-Proton-Antiporter vor, dessen aktiver Transportmechanismus intravesikuläre Zytostatikakonzentration zusätzlich erhöhen kann. Gemäß Ihrem Model sind sogar sehr zurückhaltende Schätzungen der Aktivität dieses Kation-Proton-Antiportsystems suffizient, um schwach basische Substanzen in ausreichender Menge aus der Zelle zu befördern. Ihre Effektivität wäre in etwa mit der von ABC-Transportern wie Pgp vergleichbar (Raghunand et al., 1999).

Sowohl bei passiver Anreicherung als auch bei aktivem Transport sind jedoch der pK der Substanz sowie der intravesikuläre pH durch die Beeinflussung der maximalen Konzentration innerhalb der Organelle wichtige Determinanten der Resistenzentwicklung (Busch et al., 1994). Der Motor der vesikulären Sequestration bleibt der pH Gradient zwischen Zytosol und intrazellulärem Kompartiment; die Transportgeschwindigkeit des Antiporters korreliert mit der Größe des Gradienten, wird also durch Expression von CIC-3-GFP beeinflusst.

Das Messen von intrazellulären Verteilungsgleichgewichten und Effluxgeschwindigkeiten applizierter Chemotherapeutika war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die mögliche Relevanz dieser Parameter bei der Entstehung von Chemotherapieresistenz durch erhöhte Expression von CIC-3-GFP sollte jedoch in weiterführenden Projekten berücksichtigt werden.

4.7. Messung des intravesikulären pH mit Acridin Orange

Für die Aziditätsmessungen in dieser Arbeit war es notwendig, eine unkomplizierte, zuverlässige und wenig kostenintensive Möglichkeit zu finden, den intravesikulären pH zwischen Zellpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie zu vergleichen. Eine große Anzahl von fluoreszenten, pH-sensitiven Farbstoffen sind dafür kommerziell verfügbar, unter ihnen Fluoreszin Isothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran) und lipophile schwach-basische Monoamine und Diamine (Geisow, 1984; Nilsson et al., 2003; Ohkuma & Poole, 1978). In FITC-Dextran ist der pH-Indikator kovalent an ein Polysaccharid gebunden, wird durch Endozytose aufgenommen und von Endosomen zu Lysosomen prozessiert. Die wesentlichen Nachteile dieser häufig verwendeten Substanz für die pH-Messung sind die kosten- und zeitintensive experimentelle Präparation mit langen Inkubationszeiten und ein Fluoreszenzspektrum ähnlich dem von GFP (Nilsson et al., 2003). Des Weiteren erforderten die Versuche mit isolierten Lysosomen einen Indikator, der nicht durch aktive Aufnahme via Plasmamembranrezeptoren in die Vesikel gelangt, sondern passiv, durch Diffusion. Vom lipophilen, schwach basischen Kation Acridin Orange ist bekannt, dass es in azidischen Organellen protoniert und folglich konzentriert wird; wobei das Ausmaß der Akkumulation vom pH-Gradienten und dem intravesikulären Volumen abhängig ist (Barasch et al., 1991; Busch et al., 1994). Mit Akkumulation ändert Acridin Orange sein Fluoreszenzspektrum vom grünen in den roten Wellenlängenbereich, wahrscheinlich verursacht durch Bildung von Di- und Polymeren (Milot et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die rote Fluoreszenzintensität von Zellen, welche in Acridin Orange inkubiert worden sind, als Maß für den pH im azidischen Kompartiment verwendet.

Eine kurze Inkubationszeit bis zum Erreichen des Verteilungsequilibriums und die Verwendung eines Durchflußzytometers senkten die experimentelle Dauer zur Erfassung einer Zellpopulation auf einen Zeitraum von weniger als 15 Minuten und ermöglichten auf einfache Weise die schnelle Reihentestung einer Zelllinie bezüglich vieler verschiedener Stimuli.

Im Gegensatz zu FITC-Dextran, das sich selektiv in Lysosomen und Endosomen anreichert, ist die vesikuläre Akkumulation von Acridin Orange hauptsächlich pH-abhängig. Dies sichert die Messung des gesamten azidischen Kompartiments

einschließlich saurer Organellen wie sekretorischer Vesikel und des Golgi-Netzwerks.

Einerseits wird dadurch in den pH-Messungen der gesamte, für die Resistenz gegenüber Etoposid relevante, endomembranöse Raum berücksichtigt; denn schließlich ist das Kompartiment, in dem Etoposid akkumuliert gleich mit dem durch oligomeres Acridin Orange markierten Kompartiment. Andererseits werden jedoch nicht spezifisch die Vesikel untersucht, in denen CIC-3 vorrangig exprimiert wird.

Dieser Einschränkung konnte hier in weiteren Experimenten an isolierten Lysosomen begegnet werden.

Eine umfassende Studie zu Acridin Orange als pH-Indikator zeigt, dass Anionen wie Chlorid die Aggregation der Substanz stimulieren (Palmgren, 1991). Es ist also nicht vollständig auszuschließen, dass die erhöhte Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich in CIC-3-GFP überexprimierenden Zellen zu einem Teil durch erhöhte intralysosomale Chloridkonzentration besteht. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit der Rückgang roter Fluoreszenz bei selektiver Inhibition der lysosomalen $v\text{-H}^+$ -ATPase und somit der starke Einfluß des pH auf das Fluoreszenzspektrum von Acridin Orange deutlich gezeigt werden.

Die Messungen wurden mit steigenden Konzentrationen von Acridin Orange durchgeführt und die Fluoreszenzwerte über der verwendeten Acridin Orange-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Gerade wurde als Maß für den vesikulären pH gewertet. So konnte vermieden werden, dass Größe und Anzahl der Lysosomen, aber auch unterschiedliche Größe und Anzahl der untersuchten Zellen Einfluss auf die gemessenen Fluoreszenzwerte nimmt.

Zusammenfassend ist die Verwendung von Acridin Orange für die durchflußzytometrische Messung des intravesikulären pH ein einfaches und zuverlässiges Werkzeug. Dennoch ist ein geringer Einfluß organischer und anorganischer Ionen auf den gemessenen Wert nicht auszuschließen. Des Weiteren ist die Methode nicht quantitativ; mit ihr lässt sich vornehmlich die Änderung des intravesikulären pH als Reaktion auf einen experimentellen Stimulus qualifizieren.

Direkte Messungen der Protonenkonzentration mit pH-sensitiven Farbstoffen werden notwendig sein, die hier dargestellten Ergebnisse zu untermauern. Die Verwendung von FITC-Dextran oder BCECF-Acetoxymethylester zur Erfassung von lysosomalem oder zytosolischem pH wäre ein etablierter Weg, exakte pH-Gradienten zu bestimmen.

5. Zusammenfassung

Resistenz gegenüber Zytostatika ist ein wichtiges Problem bei der Therapie metastasierter Tumoren. Eine Resistenzentwicklung auf zellulärer Ebene kann verschiedene Ursachen haben. Ein Faktor scheint dabei der pH-Wert intrazellulärer Vesikel zu sein, da sich schwach basische Chemotherapeutika in sauren Vesikeln anreichern und so von ihrem Wirkort, dem Nukleus, ferngehalten werden.

CIC-3, ein Mitglied der CIC-Chloridkanal-Familie, wird in intrazellulären Vesikeln neuronaler Zellen exprimiert und ist durch Bereitstellung eines Anionenschunts an der vesikulären Azidifizierung beteiligt. Ausgangspunkt der vorliegenden Studie war die Hypothese, dass CIC-3 eine Rolle bei der Chemotherapieresistenz neuroendokriner Tumorzellen spielt.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass CIC-3 in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON, LCC-18 und QGP-1 und der murinen Phäochromozytomlinie PC12 exprimiert wird und in BON-Zellen in intrazellulären Vesikeln mit dem lysosomalen Marker Lamp-1 kolokalisiert. Überexpression eines CIC-3-GFP-Fusionsproteins erhöhte die durch Acridin Orange-Fluoreszenzmessung erhobene vesikuläre Azidität. Dies konnte in der vorliegenden Studie sowohl in Experimenten mit lebenden Zellen als auch in Untersuchungen isolierter Lysosomen gezeigt werden. Die Expression von CIC-3-GFP verstärkte zudem die Chemotherapieresistenz der Zellen gegenüber dem schwach basischen Etoposid ($pK = 9,8$) sowohl in BON- also auch HEK293-Zellen. Inhibition der vesikulären Azidifizierung durch den spezifischen v-H⁺-ATPase-Inhibitor Concanamycin A konnte den intravesikulären pH alkalisieren und die Sensitivität gegenüber Etoposid erhöhen. Ein in der Literatur beschriebener Effekt der Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol und Pantoprazol auf intravesikulären pH und Sensitivität gegenüber Etoposid ließ sich jedoch hier nicht nachweisen.

Somit zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse eine Rolle des pH-Wertes im lysosomalen Kompartiment für die Resistenz neuroendokriner Tumorzellen gegenüber schwach basischen Chemotherapeutika. CIC-3 konnte durch Unterstützung der vesikulären Azidifizierung die Resistenz gegenüber dem schwach basischen Zytostatikum Etoposid steigern.

6. Referenzen

- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. & Simon, S.M. (1998). Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J Exp Med*, **187**, 1583-98.
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. & Simon, S.M. (1999). Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4432-7.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M.M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 361-98.
- Arnold, R., Rinke, A., Schmidt, C. & Hofbauer, L. (2005). Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **19**, 649-56.
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D. & al-Awqati, Q. (1991). Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, **352**, 70-3.
- Barg, S., Huang, P., Eliasson, L., Nelson, D.J., Obermuller, S., Rorsman, P., Thevenod, F. & Renstrom, E. (2001). Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl⁻ uptake and acidification. *J Cell Sci*, **114**, 2145-54.
- Baron, R., Neff, L., Brown, W., Courtoy, P.J., Louvard, D. & Farquhar, M.G. (1988). Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *J Cell Biol*, **106**, 1863-72.
- Bauerfeind, R., Ohashi, M. & Huttner, W.B. (1994). Biogenesis of secretory granules and synaptic vesicles. Facts and hypotheses. *Ann N Y Acad Sci*, **733**, 233-44.
- Beck, W.T., Cirtain, M.C. & Lefko, J.L. (1983). Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Mol Pharmacol*, **24**, 485-92.
- Berge, T. & Linell, F. (1976). Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*, **84**, 322-30.
- Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., Cantonati, H., Attems, J., Gsur, A. & Micksche, M. (2005). Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol*, **131**, 355-63.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1295-302.

- Burke, A.P., Thomas, R.M., Elsayed, A.M. & Sobin, L.H. (1997). Carcinoids of the jejunum and ileum: an immunohistochemical and clinicopathologic study of 167 cases. *Cancer*, **79**, 1086-93.
- Busch, G.L., Schreiber, R., Dartsch, P.C., Volkl, H., Vom Dahl, S., Haussinger, D. & Lang, F. (1994). Involvement of microtubules in the link between cell volume and pH of acidic cellular compartments in rat and human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9165-9.
- Buscombe, J.R., Caplin, M.E. & Hilson, A.J. (2003). Long-term efficacy of high-activity ¹¹¹In-pentetreotide therapy in patients with disseminated neuroendocrine tumors. *J Nucl Med*, **44**, 1-6.
- Chauhan, S.S., Liang, X.J., Su, A.W., Pai-Panandiker, A., Shen, D.W., Hanover, J.A. & Gottesman, M.M. (2003). Reduced endocytosis and altered lysosome function in cisplatin-resistant cell lines. *Br J Cancer*, **88**, 1327-34.
- Coley, H.M., Twentyman, P.R. & Workman, P. (1989). Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporin A. *Biochem Pharmacol*, **38**, 4467-75.
- Collins, D.C. (1963). 71,000 Human Appendix Specimens. A Final Report, Summarizing Forty Years' Study. *Am J Proctol*, **14**, 265-81.
- Dano, K. (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, **323**, 466-83.
- Demant, E.J., Sehested, M. & Jensen, P.B. (1990). A model for computer simulation of P-glycoprotein and transmembrane delta pH-mediated anthracycline transport in multidrug-resistant tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, **1055**, 117-25.
- Drose, S., Bindseil, K.U., Bowman, E.J., Siebers, A., Zeeck, A. & Altendorf, K. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*, **32**, 3902-6.
- Dzekunov, S.M., Ursos, L.M. & Roepe, P.D. (2000). Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol Biochem Parasitol*, **110**, 107-24.
- Eriksson, B.K., Larsson, E.G., Skogseid, B.M., Lofberg, A.M., Lorelius, L.E. & Oberg, K.E. (1998). Liver embolizations of patients with malignant neuroendocrine gastrointestinal tumors. *Cancer*, **83**, 2293-301.
- Evers, B.M., Townsend, C.M., Jr., Upp, J.R., Allen, E., Hurlbut, S.C., Kim, S.W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J.C. & Thompson, J.C. (1991). Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*, **101**, 303-11.
- Faiss, S., Pape, U.F., Bohmig, M., Dorffel, Y., Mansmann, U., Golder, W., Riecken, E.O. & Wiedenmann, B. (2003). Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination

- for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors--the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group. *J Clin Oncol*, **21**, 2689-96.
- Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S., Grill, R., Pirker, R., Zielinski, C.C., Hausmaninger, H., Kubista, E., Samonigg, H. & Jakesz, R. (2005). Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, **23**, 1161-8.
- Fjallskog, M.L., Granberg, D.P., Welin, S.L., Eriksson, C., Oberg, K.E., Janson, E.T. & Eriksson, B.K. (2001). Treatment with cisplatin and etoposide in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer*, **92**, 1101-7.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T. & Jentsch, T.J. (1999). Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem*, **274**, 896-902.
- Geisow, M.J. (1984). Fluorescein conjugates as indicators of subcellular pH. A critical evaluation. *Exp Cell Res*, **150**, 29-35.
- Glickman, J., Croen, K., Kelly, S. & Al-Awqati, Q. (1983). Golgi membranes contain an electrogenic H⁺ pump in parallel to a chloride conductance. *J Cell Biol*, **97**, 1303-8.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Hainsworth, J.D., Spigel, D.R., Litchy, S. & Greco, F.A. (2006). Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: a Minnie Pearl Cancer Research Network Study. *J Clin Oncol*, **24**, 3548-54.
- Hara-Chikuma, M., Yang, B., Sonawane, N.D., Sasaki, S., Uchida, S. & Verkman, A.S. (2005). CIC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem*, **280**, 1241-7.
- Harrison, T. (2004). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol. 1. McGraw-Hill Professional.
- Harter, C. & Mellman, I. (1992). Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol*, **117**, 311-25.
- Hofler, H., Stier, A., Schusdziarra, V. & Siewert, J. (1997). Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas und ihre therapeutische Relevanz. *Chirurg*, **68**, 107-115.
- Hurwitz, S.J., Terashima, M., Mizunuma, N. & Slapak, C.A. (1997). Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. *Blood*, **89**, 3745-54.

- Janson, E.T. & Oberg, K. (1993). Long-term management of the carcinoid syndrome. Treatment with octreotide alone and in combination with alpha-interferon. *Acta Oncol*, **32**, 225-9.
- Jentsch, T.J., Neagoe, I. & Scheel, O. (2005a). CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 319-25.
- Jentsch, T.J., Poet, M., Fuhrmann, J.C. & Zdebik, A.A. (2005b). Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol*, **67**, 779-807.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455**, 152-62.
- Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J.C., Scheel, O., Zeitz, O., Ruether, K., Schmitt, A., Poet, M., Steinfeld, R., Schweizer, M., Kornak, U. & Jentsch, T.J. (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *Embo J*, **24**, 1079-91.
- Keizer, H.G. & Joenje, H. (1989). Increased cytosolic pH in multidrug-resistant human lung tumor cells: effect of verapamil. *J Natl Cancer Inst*, **81**, 706-9.
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith, A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F. & Borst, P. (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6914-9.
- Krenning, E.P., Teunissen, J.J., Valkema, R., deHerder, W.W., deJong, M. & Kwekkeboom, D.J. (2005). Molecular radiotherapy with somatostatin analogs for (neuro-)endocrine tumors. *J Endocrinol Invest*, **28**, 146-50.
- Kulke, M.H. & Mayer, R.J. (1999). Carcinoid tumors. *N Engl J Med*, **340**, 858-68.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lee, C.M. & Tannock, I.F. (2006). Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration. *Br J Cancer*.
- Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M., Eijdem, L., Slovak, M.L., McConnell, T.S., Head, D.R., Weick, J., Grever, M.R., Appelbaum, F.R. & Willman, C.L. (1999). Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, **94**, 1086-99.
- Leonard, G.D., Fojo, T. & Bates, S.E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, **8**, 411-24.
- Li, X., Wang, T., Zhao, Z. & Weinman, S.A. (2002). The ClC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C1483-91.

- Ling, V. & Thompson, L.H. (1974). Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol*, **83**, 103-16.
- Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F. & Fais, S. (2004). Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 1702-13.
- Lundqvist, M., Mark, J., Funa, K., Heldin, N.E., Morstyn, G., Wedell, B., Layton, J. & Oberg, K. (1991). Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. *Eur J Cancer*, **27**, 1663-8.
- Lyss, A.P. (1988). Appendiceal malignancies. *Semin Oncol*, **15**, 129-37.
- Millot, C., Millot, J.M., Morjani, H., Desplaces, A. & Manfait, M. (1997). Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry. *J Histochem Cytochem*, **45**, 1255-64.
- Mitry, E., Baudin, E., Ducreux, M., Sabourin, J.C., Rufie, P., Aparicio, T., Lasser, P., Elias, D., Duvillard, P., Schlumberger, M. & Rougier, P. (1999). Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer*, **81**, 1351-5.
- Moayyedi, P. & Talley, N.J. (2006). Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet*, **367**, 2086-100.
- Modlin, I.M., Lye, K.D. & Kidd, M. (2003). A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, **97**, 934-59.
- Modlin, I.M. & Sandor, A. (1997). An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer*, **79**, 813-29.
- Moertel, C.G. (1983). Treatment of the carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *J Clin Oncol*, **1**, 727-40.
- Moertel, C.G., Lefkopoulo, M., Lipsitz, S., Hahn, R.G. & Klaassen, D. (1992). Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **326**, 519-23.
- Moertel, C.G., Sauer, W.G., Dockerty, M.B. & Baggenstoss, A.H. (1961). Life history of the carcinoid tumor of the small intestine. *Cancer*, **14**, 901-12.
- Mohammad-Panah, R., Harrison, R., Dhani, S., Ackerley, C., Huan, L.J., Wang, Y. & Bear, C.E. (2003). The chloride channel CIC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J Biol Chem*, **278**, 29267-77.
- Molinari, A., Calcabrini, A., Meschini, S., Stringaro, A., Crateri, P., Toccaceli, L., Marra, M., Colone, M., Cianfriglia, M. & Arancia, G. (2002). Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells. *Curr Protein Pept Sci*, **3**, 653-70.

- Nilsson, C., Kagedal, K., Johansson, U. & Ollinger, K. (2003). Analysis of cytosolic and lysosomal pH in apoptotic cells by flow cytometry. *Methods Cell Sci*, **25**, 185-94.
- Oberg, K. (2001). Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours. *Ann Oncol*, **12 Suppl 2**, S111-4.
- Obermuller, S., Kiecke, C., von Figura, K. & Honing, S. (2002). The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *J Cell Sci*, **115**, 185-94.
- Oberndorfer, S. (1907). Karzinoide Tumoren des Dunndarms. *Frankfurter Zeitschrift fur Pathologie*, **1**, 425-9.
- Ohkuma, S. & Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 3327-31.
- O'Neil, M.J. (2001). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. The Merck Index: Whitehouse Station, NJ.
- O'Toole, D., Hentic, O., Corcos, O. & Ruzniewski, P. (2004). Chemotherapy for gastro-enteropancreatic endocrine tumours. *Neuroendocrinology*, **80 Suppl 1**, 79-84.
- Ouar, Z., Bens, M., Vignes, C., Paulais, M., Pringel, C., Fleury, J., Cluzeaud, F., Lacave, R. & Vandewalle, A. (2003). Inhibitors of vacuolar H⁺-ATPase impair the preferential accumulation of daunomycin in lysosomes and reverse the resistance to anthracyclines in drug-resistant renal epithelial cells. *Biochem J*, **370**, 185-93.
- Pallis, M. & Russell, N. (2004). Strategies for overcoming p-glycoprotein-mediated drug resistance in acute myeloblastic leukaemia. *Leukemia*, **18**, 1927-30.
- Palmgren, M.G. (1991). Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal Biochem*, **192**, 316-21.
- Petrangolini, G., Supino, R., Pratesi, G., Dal Bo, L., Tortoreto, M., Croce, A.C., Misiano, P., Belfiore, P., Farina, C. & Zunino, F. (2006). Effect of a novel vacuolar-H⁺-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther*, **318**, 939-46.
- Piccolo, A. & Pusch, M. (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature*, **436**, 420-3.
- Raghunand, N., Mahoney, B.P. & Gillies, R.J. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol*, **66**, 1219-29.
- Raghunand, N., Martinez-Zaguilan, R., Wright, S.H. & Gillies, R.J. (1999). pH and drug resistance. II. Turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol*, **57**, 1047-58.

- Rajagopal, A. & Simon, S.M. (2003). Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell*, **14**, 3389-99.
- Rougier, P. & Mitry, E. (2000). Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors. *Digestion*, **62 Suppl 1**, 73-8.
- Ruszniewski, P. & O'Toole, D. (2004). Ablative therapies for liver metastases of gastroenteropancreatic endocrine tumors. *Neuroendocrinology*, **80 Suppl 1**, 74-8.
- Salazar, G., Love, R., Styers, M.L., Werner, E., Peden, A., Rodriguez, S., Gearing, M., Wainer, B.H. & Faundez, V. (2004). AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (CLC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J Biol Chem*, **279**, 25430-9.
- Saraste, J. & Goud, B. (2007). Functional symmetry of endomembranes. *Mol Biol Cell*, **18**, 1430-6.
- Scheel, O., Zdebik, A.A., Lourdel, S. & Jentsch, T.J. (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature*, **436**, 424-7.
- Schindler, M., Grabski, S., Hoff, E. & Simon, S.M. (1996). Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). *Biochemistry*, **35**, 2811-7.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. & Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, **48**, 4827-33.
- Shimada, K., Li, X., Xu, G., Nowak, D.E., Showalter, L.A. & Weinman, S.A. (2000). Expression and canalicular localization of two isoforms of the CLC-3 chloride channel from rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**, G268-76.
- Skovsgaard, T. (1978). Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res*, **38**, 1785-91.
- Solcia, K.G., Sobin LH et al. (2000). *Histological typing of endocrine tumours. Second Edition. WHO international histological classification of tumours.* Springer: Berlin.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. & Jentsch, T.J. (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*, **270**, 31172-7.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bosl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. & Jentsch, T.J. (2001). Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, **29**, 185-96.

- Stow, M.W. & Warr, J.R. (1993). Reduced influx is a factor in accounting for reduced vincristine accumulation in certain verapamil-hypersensitive multidrug-resistant CHO cell lines. *FEBS Lett*, **320**, 87-91.
- Suzuki, T., Rai, T., Hayama, A., Sohara, E., Suda, S., Itoh, T., Sasaki, S. & Uchida, S. (2006). Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol*, **206**, 792-8.
- Syrigos, K.N., Sitara, D., Georgiou, E. & Harrington, K.J. (2002). Cytotoxic therapy of gastroenteropancreatic (GEP) tumors. *Anticancer Res*, **22**, 1311-4.
- Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 219-34.
- Thiebaut, F., Currier, S.J., Whitaker, J., Haugland, R.P., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1990). Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of a pH-sensitive dye. *J Histochem Cytochem*, **38**, 685-90.
- Tiling, N., Ricke, J. & Wiedenmann, B. (2002). [Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal-pancreatic system. Classification and diagnosis]. *Internist (Berl)*, **43**, 210-8.
- Trock, B.J., Leonessa, F. & Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 917-31.
- van der Holt, B., Lowenberg, B., Burnett, A.K., Knauf, W.U., Shepherd, J., Piccaluga, P.P., Ossenkoppele, G.J., Verhoef, G.E., Ferrant, A., Crump, M., Selleslag, D., Theobald, M., Fey, M.F., Vellenga, E., Dugan, M. & Sonneveld, P. (2005). The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood*, **106**, 2646-54.
- Versantvoort, C.H., Broxterman, H.J., Pinedo, H.M., de Vries, E.G., Feller, N., Kuiper, C.M. & Lankelma, J. (1992). Energy-dependent processes involved in reduced drug accumulation in multidrug-resistant human lung cancer cell lines without P-glycoprotein expression. *Cancer Res*, **52**, 17-23.
- Wang, L., Chen, L. & Jacob, T.J. (2000). The role of ClC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J Physiol*, **524 Pt 1**, 63-75.
- Wang, X.Q., Deriy, L.V., Foss, S., Huang, P., Lamb, F.S., Kaetzel, M.A., Bindokas, V., Marks, J.D. & Nelson, D.J. (2006). ClC-3 channels modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron*, **52**, 321-33.
- Weylandt, K.H. (2000). Towards a functional role for human ClC-3 and human ClC-4, two members of the ClC chloride channel family - Thesis. Oxford.

- Weylandt, K.H., Valverde, M.A., Nobles, M., Raguz, S., Amey, J.S., Diaz, M., Nastrucci, C., Higgins, C.F. & Sardini, A. (2001). Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem*, **276**, 17461-7.
- Williams, E.D. & Sandler, M. (1963). The classification of carcinoid tumors. *Lancet*, **1**, 238-9.

7. Selbständigkeitserklärung

Ich, Maxim Nebrig, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle von CIC-3 bei der Chemotherapieresistenz neuroendokriner Tumorzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

8. Danksagung

Bei der Arbeit an meiner Dissertation konnte ich auf die Hilfe vieler Menschen vertrauen, denen ich stets zu Dank verpflichtet sein werde. In besonderem Maße erwähnen möchte ich hier die Mitglieder der Membrane Transport Biology-Arbeitsgruppe und vor allem Alessandro Sardini und Karsten Weylandt. Ohne ihre geduldige Betreuung und ohne ihre Unterstützung in Rat und Tat wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.