

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Synthese des VP-16-Prodrugs

Die Synthese des neuen Prodrugs und dessen Strukturanalyse geschah unter Anleitung des Chemikers Wolfgang Wrasidlo und wurde bereits publiziert [30]. Die Synthese des ProVP-16 I aus seiner Muttersubstanz VP-16 wurde folgendermaßen bewerkstelligt: 1,2 mmol VP-16 (Sigma-Aldrich, München) wurde in 50 ml Dichlormethan gelöst und anschließend auf  $-10^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 1,2 mmol Pyridin und fünfminütiges Rühren. Daran schloß sich eine Titration einer äquivalenten Menge von Solketal Chloroformat gelöst in 5 ml Dichlormethan über 15 min an. Nach einer einstündigen Inkubationsphase wurde das Produkt mittels HPLC aufgereinigt und konzentriert ( $\text{C}_{18}$ -Säule; Mobile Phase 50/50 vol% Acetonitril-Wasser; Flussgeschwindigkeit 1 ml/min). Der Strukturnachweis des neuen Prodrugs von Etoposid erfolgte mittels Massenspektrometrie.

### 5.2. Zellen

Tumor Zellen wurden in RPMI mit 10% fetalem Kälber Serum (FCS) (Nalm-6, Reh, Molt-3, Jurkat, HL-60, K562, HeLa, Cem, A2780, SW480) oder in DMEM mit 10% FCS (NXS2, SK-N-SH, HAT-29) in Gegenwart von 100 IU/ml Penicillin/Steptomycin kultiviert ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Luftfeuchtigkeit). Die murine NXS2 Neuroblastomlinie wurde bereits beschrieben [31]. Die restlichen Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen, bis auf VCR100, ADR5000 und A2780 welche freundlicherweise von James Beck (Greifswald, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Zur Generierung einer resistenten Zelllinie wurden MDR-1-negative Molt-3 Zellen benutzt. Sie wurden einer schrittweise steigenden VP-16-Konzentration ausgesetzt. Nach 6 Monaten wuchsen die Zellen in Gegenwart von bis zu  $5 \times 10^{-6}$  M VP16. Die Expression von MDR-1 mRNA wurde mittels RT-PCR nachgewiesen.

### 5.3. RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion

Zellen wurden geerntet und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die gesamte zelluläre RNA wurde mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Der RNA-Gehalt wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgte mit 1  $\mu\text{g}$

RNA mittels der Reversen Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe) in Anwesenheit von Hexaoligonucleotiden (Roche, Mannheim) dNTPs, DTT und *Ist strand buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) bei 42°C im Wasserbad nach Empfehlungen des Herstellers. Danach folgte ein Denaturierungsschritt (100°C, 2 min) und Abkühlung auf Eis. Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit 100 ng cDNA Äquivalent durchgeführt. Dies erfolgte mit 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl DMSO, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5µl PCR Puffer, 35 µl Wasser, 2 µl des jeweiligen Primer-Mixes (0.5 µM sense bzw. antisense) und 1µl Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim). Das Temperaturprogramm war: 15 sec, 96°C, 30 sec bei entsprechender Anlagerungstemperatur spezifisch für den jeweiligen Primer, 90 sec, 72°C. Die PCR Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese analysiert.

### 5.4. Zytotoxizitätstests

#### 5.4.1. Vitalitätsbestimmung mittels XTT-Test

100 µl Zellsuspension wurden auf einer 96 Lochplatte mit einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Substanzen über einen Konzentrationsbereich von 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-12</sup> M. Die Testung auf Vitalität der Zellen erfolgte nach vorher festgelegten Zeitpunkten (6-72 Stunden) mit dem Tetrazoliumsalz XTT. XTT (Sigma-Aldrich, München) aktiviert durch 0.2 Vol% Phenazine Methosulfat (PMS) (Sigma-Aldrich, München) [32]. Das gelb gefärbte XTT wird in den Mitochondrien lebender Zellen durch Reduktasen der Atmungskette zum orangefarbenen wasserlöslichen Formazan metabolisiert. Dieser Farbumschlag wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei 450 nm an einem Plattenleser (ThermoLife Sciences, Engelsbach, Deutschland) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mittels PRISM oder SIGMAPLOT. Hierzu wurde die OD als Funktion der Zellviabilität gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen. Die Inhibitorische Konzentration, bei der noch 50 % der Zellen vital sind (IC<sub>50</sub>), wurde anschließend durch sigmoidale Regression berechnet.

#### 5.4.2. Bestimmung der Apoptose-Induktion mittels Annexin-Färbung

Während der frühen Phase der Apoptose wird durch Verlust symmetrischer Eigenschaften der Phospholipidzellmembran Phosphatidylserin (PS) auf der extrazellulären Seite der Zellmembran präsentiert. Dieses befindet sich bei vitalen Zellen nur auf der intrazellulären

Seite der Zellmembran. Diese Expression von PS auf der Zellmembran kann durch Annexin V, ein Phosphatidylserin bindendes Protein, detektiert werden [33]. Die Unterscheidung von früh- und spätapoptotischen Zellen kann mittels Propidiumiodid (PI) erfolgen. PI ist ein DNA-Interkalator, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird und zur Färbung nekrotischer Zellen im Durchflußzytometer verwendet werden kann [34,35].

Die Untersuchungen erfolgten nach folgendem Prozedere mit dem *Phosphatidyl Serine Detection Kit* (IQ Products, Groningen, Niederlande):

Zellen wurden auf einer 6-Lochplatte mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden erfolgte die Zugabe von VP-16 bzw. ProVP-16 I in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 1 ml Calcium-Puffer (2.6 g HEPES, 8.18 g NaCl und 0.28 g  $\text{CaCl}_2$  gelöst in 1000 ml demineralisiertem Wasser, pH 7.4, 4 °C) durch Zentrifugation (5 min, 270 g) gewaschen und in 200 µl Calcium-Puffer (4 °C) resuspendiert. Zu jeder Probe wurde 10 µl Annexin (100 µg/ml, PBS, pH 7.4) zugegeben. Nach Inkubation (4 °C, 20 min) wurden die Zellen erneut mit Calcium-Puffer (4 °C) durch Zentrifugation (5 min, 270 g) gewaschen und in 400 µl Calcium-Puffer resuspendiert. Zu jeder Probe wurden dann 10 µl Propidiumiodid (100 µg/ml, PBS, pH 7.4) zugegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Bis zur Messung am FACS wurden die Zellen bei 4 °C aufbewahrt.

### 5.5. Tubulin-Depolymerisation

Die Quantifizierung des Effektes der neuen Prodrugs auf den Spindelapparat erfolgte mit einem Tubulin-Depolymerisations-Kit (Cytoskeleton, Denver, USA). Tubulin wurde hierzu in einem speziellen Puffer, bestehend aus 910 µl *general-tubulin-buffer*, 80 µl 60%igen *glycerol-buffer* und 10 µl GTP-Lösung, auf Eis gelöst. Polymerisation erfolgte im Plattenleser bei 37 °C unter ständiger Kontrolle der OD bei 340 nm. Nach Erreichen eines Plateaus erfolgte die Zugabe der jeweiligen Substanz in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M. 1 mM Calciumchlorid wurde zur Initiierung der Depolymerisation zugegeben. Die Messung der OD erfolgte über einen Zeitraum von 15 min.

### 5.6. Topoisomerase-Aktivität

Messung des Effektes der Medikamente auf die Topoisomerase erfolgte durch dreistündige Inkubation der humanen T-lymphatischen Zellen CCRF-CEM mit und ohne Medikamente.

Anschließend erfolgte die Isolation des Nukleus und die Lyse in Gegenwart von PMSF, um Proteinverdau entgegenzuwirken. Die Aufbewahrung erfolgte in 50%igem Glycerin bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Als Substrat für die Topoisomerase wurde pBR-322 *supercoiled* Plasmid-DNA eingesetzt. Relaxationspuffer bestehend aus 200 mM Glutaminsäure und Kochsalz wurde auf pH 7.9 für Topo II beta und pH 8.9 für Topo II alpha eingestellt. Proben wurden mittels Elektrophorese in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und an einer Geldokumentationsauflage (Eagle Eye ® II, Stratagene, La Jolla, USA) analysiert. Eine Enzymaktivität von 1 Unit ist definiert als die Menge Topoisomerase extrahiert aus  $10^4$  Kernen, die zur Relaxation von 90% von 1  $\mu\text{g}$  pBR-322 eingesetzt werden muß.

### 5.7. JC-1 assay

Zur Aktivitätsbestimmung der P-gp-Pumpe wurde JC-1 verwendet, ein fluoreszierender Farbstoff, der durch die P-gp-Pumpe erkannt und in den extrazellulären Raum transportiert wird [36]. Hierzu wurden Zellen ( $5 \times 10^5 / 100\ \mu\text{l}$ ) zweimal durch Zentrifugation (5 min, 270 g) mit PBS (pH 7.4) gewaschen und resuspendiert. JC-1 wurde in einer Konzentration von 0.1  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Um den Effekt möglicher Modulatoren der Pumpe zu bestimmen, wurde ProVP-16 I bzw. Etoposid in einer Konzentration von  $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  M zugegeben. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit 2  $\mu\text{M}$  Cyclosporin behandelt wurden. Nach 30 min Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen wiederum zweimal durch Zentrifugation (5 min, 270 g) mit PBS (pH 7.4) gewaschen und die Fluoreszenz am BD FACSort *flow cytometer* im FL-1 Kanal (530 nm) bestimmt. Eine Reduktion des JC-1-Signals wurde als Maß der Hemmung des Transports gewertet.

### 5.8. Zellzyklusanalyse

Zellen wurden in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen pro Loch auf einer 24-Lochplatte ausgesät. VP-16 bzw. ProVP-16 I wurden nach 24 Stunden in einer Konzentrationsreihe von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-8}$  M auf MOLT-3 bzw.  $5 \times 10^{-6}$  bis  $5 \times 10^{-9}$  M auf MOVP-3 Zellen appliziert. Nach jeweils 0, 9, 14, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Zellen geerntet, einmal in PBS gewaschen und in 1 ml resuspendiert. Jedem Ansatz wurden 3.5 ml auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperierten Ethanol hinzugefügt und die Proben bis zur Messung auf Eis im Kühlraum aufbewahrt. Zellen wurden einmal in PBS (pH 7.4) gewaschen und in einem Gemisch aus RNase (0.3 mg/ml PBS pH 7.4) und Propidiumiodid (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS pH 7.4) aufgenommen. Die

Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Es folgte die Messung am FACS und Auswertung der Daten mit dem Programm Cellquest.

### **5.9. Neuroblastom-Modell**

A/J-Mäuse wurden in vier Gruppen á sechs Mäuse aufgeteilt. Den Mäusen wurden  $1 \times 10^6$  NXS2-Zellen in 100  $\mu$ l PBS gelöst intravenös injiziert [31]. Der Kontrollgruppe wurde eine äquivalente Menge PBS verabreicht. An Tag 1 nach Tumorzellinjektion wurde mit der intraperitonealen (i.p.) Applikation von 20 mg/kg KG VP-16 bzw. ProVP-16 II begonnen. Die Dosierungen richteten sich nach in A/J-Mäusen gewonnenen Toxizitätsdaten für ProVP-16 II [A]. Weitere i.p. Applikationen der Agenzien erfolgten an den Tagen 4, 6, 11, 15 und 18 nach Tumorzellinjektion. Am Tag 24 wurde der Versuch beendet. Den Tieren wurde die Leber entnommen und deren Gewicht, sowie die Anzahl der Metastasen auf der Leberoberfläche bestimmt.