
4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wie Plasmidpräparation, Restriktionsverdau, gelelektrophoretische Auftrennungen, Sequenzierung, PCR usw. wurden nach Maniatis und Sambrook et al. (1989) oder dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4.2. Vektorkonstruktion

Die humane bak-cDNA wurde aus humaner cDNA mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

Sense: 5'-TGA AAA ATG GCT TCG GGG CAA GGC-3'

Antisense: 5'-TCA TGA TTT GAA GAA TCT TCG TAC CA-3'

Das resultierende PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Not I und Apa I verdaut und in die korrespondierenden Restriktionsstellen des pcDNA3-Expressionsvektors kloniert. Die Bik/Nbk-cDNA wurde von der Arbeitsgruppe M.Strauss (Max Delbrück Zentrum, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde als 528 bp-myc-getaggttes bik/nbk-Fragment nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I im Expressionsvektor pcDNA3 generiert. Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli*-Bakterienstamm JM 109 verwendet. Die generierten Plasmide sind in der Abbildung 11 dargestellt.

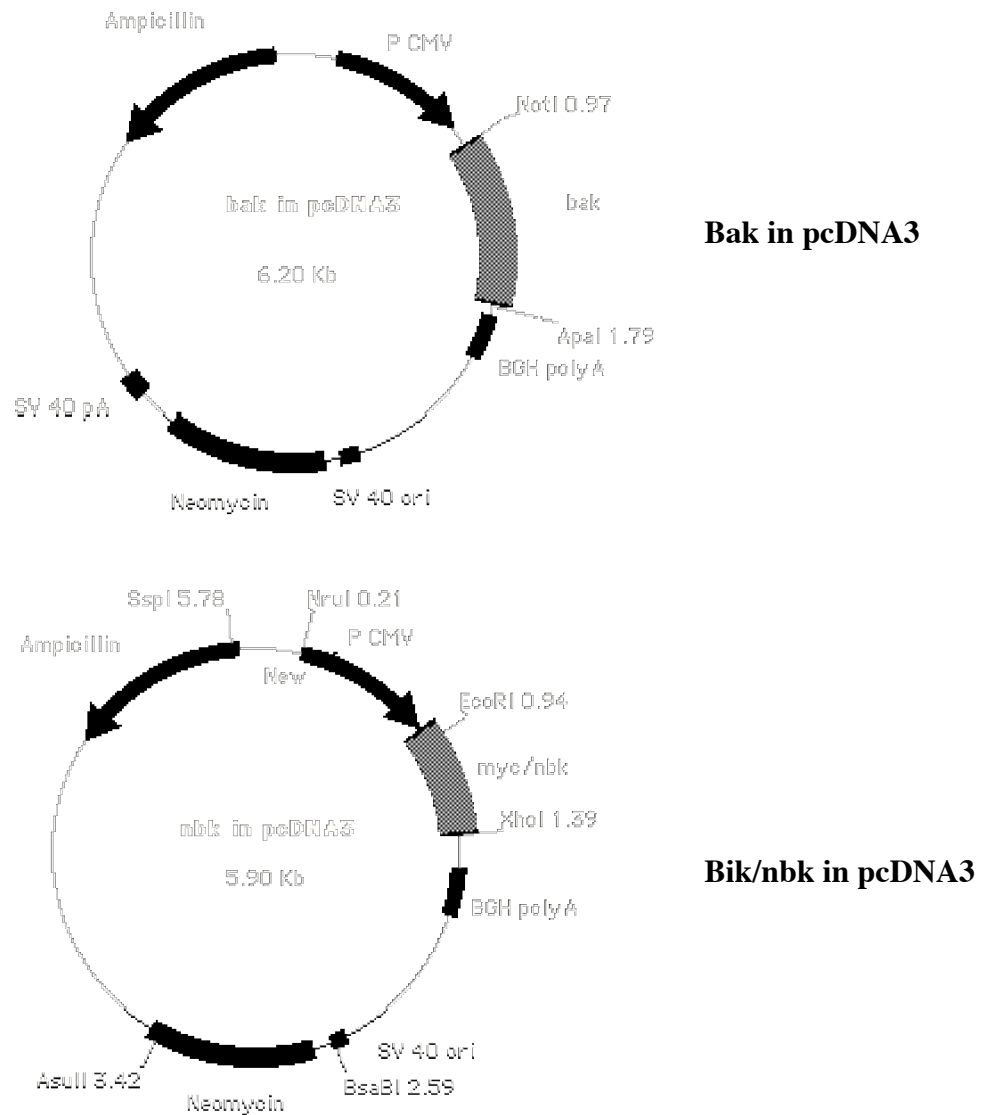


Abb. 11: Plasmidkarten der generierten Plasmide

4.3. Zellkultur

4.3.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um optimalen Gasaustausch zu gewährleisten, wurden Kulturflaschen mit gas-permeablem Deckel verwendet. Die Zellen wurden alle 3 Tage passagiert. Da es sich bei allen 6 Zelltypen um adhärenente Zelllinien handelt, mußten die Zellen zu diesem Zweck für 3 min mit 0,1 %iger Trypsin/EDTA-Lösung behandelt werden. Nach Inkubieren für 5 min bei 37°C konnten die am Boden der

Zellkulturflaschen haftenden Zellen abgelöst werden. Bei allen Experimenten wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt.

4.3.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämocytometer mit Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen keinen Farbstoff auf. Zellen mit permeabilisierter Zellmembran werden durch Trypanblau blau angefärbt.

4.3.3. Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

1×10^7 Zellen wurden 5 min bei $724 \times g$, 4°C pelletiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Einfriermedium langsam dazugegeben, gemischt und die Suspension auf 2 Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen langsam mit 1 ml Medium in 10 ml Medium überführt. Nach zweimaligem Waschen zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die aufgetauten Zellen vor dem Einsatz in Experimenten mindestens zweimal passagiert.

4.3.4. Gentransfer in eukaryontische Zellen mittels Elektroporation

Zur Herstellung stabiler Transfektanten wurden Suspensionen der genannten Zelllinien in Gegenwart einer DNA-Lösung einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt. Diese elektrische Spannung führt zur Polarisierung der Zellmembran. Die Überschreitung einer kritischen transmembranalen Spannung führt durch eine lokale Zerstörung der Membranintegrität spontan zur drastischen Erhöhung der Leitfähigkeit. Es entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die die DNA durch Diffusion in die Zelle eindringen kann. Die Plasmid-DNA lagert sich an bevorzugte Stellen der Wirts-DNA, wird linearisiert und die Fragmente der Fremd-DNA und die Chromosomen der Wirtszelle werden durch Enzyme der Wirtszelle, und zwar DNA-Reparaturenzyme, ligiert. Die DNA kann nach ihrer Übertragung an unterschiedlichen Stellen in das Wirtsgenom inseriert werden. Da die Transfektionseffizienz bei Elektroporationen relativ gering ist, wurden die

stabil transfizierten Zellen mit Hilfe von Neomycin, einem Gen in der Fremd-DNA, das für eine Resistenz gegen Geneticin (G 418) kodiert, selektiert.

Es wurden jeweils 15 μg Plasmid-DNA in einer 0,4 cm Elektroporations-Küvette mit 1×10^7 MT-1/Adr bzw. MT-3/Adr Zellen in 250 μl Medium ohne Zusätze gemischt und bei 960 F und 0,25 kV mit einer Zeitkonstante zwischen 25-35 ms elektroporiert.

Als Plasmid-DNA wurden bak in pcDNA3, bik in pcDNA3 bzw. ein Kontrollplasmid des pcDNA3-Vektors ohne Transgen eingesetzt. Es erwies sich als notwendig, die Zellen sofort nach der Elektroporation in 20 ml auf 37°C vorgewärmtes komplettes Kulturmedium zu resuspendieren. Anschließend wurden die Zellen in 6 verschiedenen Konzentrationen zwischen 1×10^5 und 2×10^6 , bezogen auf die ursprüngliche Zellzahl, mit 20 ml Kulturmedium in großen Petrischalen (15 cm Durchmesser) ausplattiert. Nach 48 h wurde mit der G 418 (Geneticin, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) Selektion begonnen. Zunächst wurde mit 1 mg/ml, später mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418-haltigem Medium alle 8 Tage selektiert, bis nach ca. 4 Wochen die ersten Klone sichtbar wurden. Diese aus einer transfizierten Einzelzelle herangezogenen Kolonien von Zellen wurden dann gepickt und vermehrt bis jeweils mindestens 20 bak- bzw. bik-transfizierte Klone und 10 Kontrollklone in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Nach der Überprüfung der Transgenexpression wurden jeweils mindestens 6 Einfrierröhrchen (5×10^6 Zellen) der stabilen Transfektanten in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4. Analyse zur Kontrolle der Transgenexpression

4.4.1. Proteinpräparation

Es wurden ca. 5×10^6 Zellen zweimal mit PBS gewaschen, pelletiert und in 200 μl Lysepuffer 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugieren (16000 x g) für 3 min bei 4°C entfernt.

4.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Bei dieser Methode werden die Aminogruppen von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blue G-250 komplexiert (Bradford, 1976). Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben.

1 μl Proteinextrakt wurde mit 800 μl H_2O und 200 μl Farbstoffreagenz (BioRad, München, Deutschland) gemischt, 20 min bei RT inkubiert und die Extinktion von 100 μl des Gemisches in einer Küvette bei 595 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe.

4.4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit BCA-Reagenz (Pierce)

Als Grundlage dient die Reaktion von Proteinen mit alkalischem Cu^{2+} zu Cu^{1+} (Biuret-Reaktion). Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bildet in alkalischem Medium einen 2:1 Komplex mit Cu^{1+} -Ionen. Dabei entsteht ein stabiles rotes Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

In einer Mikrotiterplatte wurden 10 μl Proteinextrakt mit 200 μl Arbeitslösung (Reagenz A/Reagenz B: 50/1) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 620 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe.

4.4.4. Gelelektrophorese von Proteinen

Die Western-Blot Analyse ist eine sehr empfindliche und spezifische Methode, um Proteine nachzuweisen. Dabei wird die Proteinmischung zunächst mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, auf eine Membran übertragen, dann werden bestimmte Proteine durch eine spezifische Antikörperreaktion detektiert und mit einer Enzymreaktion auf der Transfermembran sichtbar gemacht.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Lämmli, 1970). Zuerst werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionischem Detergens in der Gegenwart von β -Mercaptoethanol als reduzierendem Agens denaturiert. Das SDS umgibt dabei die Proteine mit den sich elektrostatisch abstoßenden Sulfatgruppen mit einer negativ geladenen Hülle. Dadurch dissoziieren alle Proteine in ihre Untereinheiten und die einzelnen Polypeptidketten entfalten sich vollständig. Somit haben die räumliche Gestalt der Proteine und die ursprüngliche Nettoladung der Peptide (negative saure und positive basische Aminosäurereste) keinen Einfluß mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, und die Kettenlänge, d.h. das Molekulargewicht ist der einzige bestimmende Parameter.

Die SDS-PAGE wird in einem diskontinuierlichen System aus Trenn- und Sammelgel bezüglich Acrylamidkonzentration, Pufferzusammensetzung und β -konzentration und pH-

Wert durchgeführt, um eine maximale Auflösung und Trennschärfe zu erzielen. Das Molekulargewicht der Proteine wird durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke mit denen von Standardproteinen ermittelt.

Hierzu wurden die Proteine mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung wurden 20 µg Protein pro Gel-Tasche aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einer Mini-Protean-2-Gelkammer mittels 12 %-igem Polyacrylamid-Gel mit einer Dicke von 1,2 mm und einem ca. 1,5 cm langen 5 %-igem Sammelgel in 5 min bei 90 V und anschließend für ca. 60 min bei 120 V.

4.4.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Molekülen auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran ermöglicht Nachweismethoden von elektrophoretisch getrennten Proteinen mittels diverser immunologischer Tests, Proteinsequenzierung oder Aminosäureanalyse.

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE Elektrophorese mit einer senkrecht zum Gel angelegten Spannung auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran, von der die meisten Proteine auf Grund hydrophober Wechselwirkungskräfte fest gebunden werden, übertragen. Der Transfer der Proteine wurde mit einer Blotting-Apparatur in 60 min bei 1 mA/cm² Membran nach dem Semidry-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde ein Sandwich in der folgenden Reihenfolge von der Anode zur Kathode aufgebaut: 3 Lagen mit 1x Blot-Puffer equilibriertes Whatman Filterpapier (2 mm, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland), Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, 3 Lagen Whatman Filterpapier. Nach jeder Lage wurden die Luftblasen sowie überschüssiger Puffer entfernt. Der Transfer der Proteine wurde mit einer Ponceau S-Färbung kontrolliert.

4.4.6. Proteinnachweis mittels Antikörper

Die Membran wurde mit einer Blocklösung inkubiert, um die unspezifische Bindung von Proteinen zu blockieren und dadurch Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde die Proteindetektierung mittels Antikörper mit einem Dreifachsystem durchgeführt. Dabei reagiert der Primärantikörper spezifisch mit dem Zielprotein. Daran wird ein biotinylierter Sekundär-Antikörper gebunden. Im letzten Schritt wird ein Konjugat mit dem Peroxidase gekoppelten Streptavidin gebildet. Nach Zugabe des Substrates für die Peroxidase kann die an die Membran gebundene

Proteinmenge mittels Chemilumineszenz (ECL) detektiert und quantifiziert werden. Dabei wird die chemische Reaktion eines zyklischen Diazylhydrazides (Luminol) mit Peroxidase und Wasserstoffperoxid ausgenutzt. Die sofortige Oxidation des Luminols durch die an das Protein gekoppelte Peroxidase bewirkt eine Lichtemission, die durch Exponieren mit einem Autoradiographiefilm erfaßt werden kann. Eine erhöhte Sensitivität und verlängerte Lichtemission wird durch Zugabe eines chemischen Enhancers (Phenol) erreicht.

Die jeweiligen Antikörperversdünnungen wurden entsprechend den Firmenbeschreibungen in Blocklösung hergestellt. Die Nitrozellulosemembran wurde 90 min bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert, anschließend mit Waschlösung ab gespült und nacheinander die jeweiligen verdünnten Antikörper zugegeben. Nach jeder Inkubationszeit eines Antikörpers bei Raumtemperatur (1. Antikörper 2 h, 2. Antikörper 1 h, Peroxidase gekoppeltes Streptavidin 45 min) wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen für 10 min auf dem Schüttler entfernt. Dann wurde die Membran 1 min mit den ECL-Lösungen inkubiert und die Proteinbanden mittels Autoradiographie mit Hyperfilm ECL-Filmen (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) sichtbar gemacht.

4.5. Durchflußzytometrie

Das FACScan-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mißt die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen, die mit spezifischen fluoreszierenden Reagenzien angefärbt wurden.

Suspendierte Einzelzellen werden in einer laminaren Strömung in einer Quarzküvette an einem fokussierten Lichtstrahl an einem luftgekühlten Argon-Laser (488 nm, 15 mW) vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Fluoreszenz- und Streusignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Durch die Trägerflüssigkeit wird eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt, von dem die zugeführten Zellen erfaßt werden.

Es können simultan verschiedene Parameter, der Forward Scatter (FSC), der Side Scatter (SSC) sowie drei unterschiedliche Fluoreszenzen (FL1 = 537 nm, FL2 = 597 nm, FL3 = 650 nm) gemessen werden. Dies wird mittels Bandpass-Filter erreicht, die unpolarisiertes Licht herausfiltern und hierdurch die selektive Messung bei den genannten Wellenlängen ermöglichen. Der Forward Scatter (Anregungswellenlänge) mißt entlang

der Achse des einfallenden Lichtes die zur Zelloberfläche (Zellgröße) proportionale Lichtbeugung. Der Side Scatter (Anregungswellenlänge) erfaßt im 90° Winkel zum einfallenden Licht die Lichtbrechung und Reflektion der Zellen. Diese ist proportional zur Zellgranularität. Das Fluoreszenzlicht (FL1, FL2, FL3) wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen und verhält sich proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Die Wellenlänge der Fluoreszenz ist vom verwendeten Fluorochrom abhängig.

Für die Auswertung wurden die Daten in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen (Dot Plots) dargestellt. In einem Histogramm werden die Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzen veranschaulicht. Die x-Achse repräsentiert die Lichtintensität, die y-Achse die Zellzahl. In einem Dot-Plot werden die Lichtintensitäten beliebiger Parameterpaare in einem x/y-Diagramm dargestellt. Jede Zelle wird durch einen Punkt repräsentiert.

4.6. Apoptosenachweisverfahren

Für die Apoptosemessungen wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in 2 ml Medium in 6-Loch Schalen ausplattiert, nach 24 h mit Zytostatika versetzt und weitere 72 h inkubiert.

4.6.1. Modifizierte Zellzyklusanalyse

Die Apoptose wurde auf Einzelzellniveau durch Bestimmung des DNA-Gehaltes einzelner Zellen am FACScan nach DNA-Färbung mit Propidiumjodid gemessen.

Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol und Formaldehyd kann das Propidiumjodid in die Zellen eindringen und an die DNA und RNA binden. Die Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid (PI) kann nach RNase-Verdau als Maß für den DNA-Gehalt der Zellen dienen.

Der zelluläre DNA-Gehalt der Zellen wurde im FL-3 Kanal des FACS-Gerätes gemessen und logarithmisch verstärkt. Die einzelnen Zellen wurden identifiziert. Zellaggregate wurden durch Pulse Code Prozessierung der Fläche und Weite des Signales von der Analyse ausgeschlossen. Dabei wurde der Zelldebris durch geeignetes Einstellen eines Schwellenwertes für die Zellgröße ausgeschlossen.

Bei dieser Methode zeigen apoptotische Zellkerne, bedingt durch die aus den fixierten Zellen herausdiffundierenden niedermolekularen DNA-Fragmente als Folge der

Aktivierung von Endonukleasen während der Apoptose, einen niedrigeren DNA-Gehalt als die Kontrollzellen in Form eines Sub- G₁Phase-Peaks.

Die Zellen wurden nach Zytostatikabehandlung abtrypsiniert, in eine Mikrotiterplatte überführt und mit 200 μ l 2 % Formaldehyd in PBS für 30 min auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 339 x g wurde der Überstand entfernt, die Zellpellets resuspendiert und mit 50 μ l eiskaltem PBS, gefolgt von 100 μ l Ethanol (-20°C) 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 3 min bei 339 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt, 50 μ l DNase freie RNase in PBS (40 μ g/ml, Boehringer Mannheim) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellpellets in 100 μ l Propidiumjodid (50 μ g/ml) in PBS resuspendiert.

4.6.2. Morphologische Veränderungen und Messung der Membranintegrität

Weiterhin wurde die Apoptose mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt, in dem die Veränderung der Morphologie (d.h. Granularität, Side Scatter) und die Aufnahme des Fluorochroms Propidiumjodid (PI) gemessen wurde (Darzynkiewicz, 1992). Die Zellmembran wird während der Nekrose, in der Spätphase der Apoptose oder künstlich durch die oben beschriebene Fixierung permeabel. Nicht permeabilisierte (fixierte) Zellen schließen DNA-spezifische Farbstoffe wie PI aus. PI färbt aber die DNA von Membrangeschädigten Zellen.

Apoptotische Zellen zeigen Veränderungen in ihren Licht Scatter Eigenschaften. Im Dot Plot erscheinen apoptotische Zellen bei kleinerem Forward Scatter, d.h. die Zellgröße nimmt ab, aber größerem Side Scatter. Dies weist auf eine größere Granularität hin. Die Veränderungen in der Lichtbeugung bzw. Lichtbrechung- und Reflexion werden durch die Chromatinkondensation und Kernfragmentierung sowie Veränderungen der Zellorganellen wie den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum hervorgerufen (Swat et al., 1991). Chromatinveränderungen sind oft von Verwindungen der nukleären Außenlinie begleitet. Granuläre intrazelluläre Strukturen, die eine andere Lichtreflexion als normale Zellen hervorufen, sind ein Charakteristikum dieses Prozesses (Kerr et al., 1972).

4.7. Nachweis des MDR-Phänotyps

Die MDR1-Genexpression wurde durch Färbung mit einem monoklonalen Antikörper untersucht. Ergänzend wurde die Aktivität dieser ATP-abhängigen Pumpe mittels funktioneller Effluxversuche bestimmt.

4.7.1. Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Expression des MDR-1/ P-Glykoproteins quantitativ durchflußzytometrisch zu bestimmen. Dabei war der zweite Antikörper mit dem Farbstoff Fluorescein, der nach Anregung grünes Licht aussendet, chemisch gekoppelt. Als Primärantikörper wurde der gegen ein Oberflächenepitop gerichtete MRK16-Antikörper (Syrinx, Frankfurt) verwendet, von dem keine Kreuz-reaktionen mit dem MDR2- bzw. MDR3-Genprodukt bekannt ist.

1×10^6 Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und zum Blocken unspezifischer Bindungen mit $50 \mu\text{l}$ 10% humanem IgG in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der mit dem Zielprotein reagierende monoklonale anti-human P-Glykoprotein Antikörper MRK16 in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min bei 4°C mit dem polyklonalen Sekundärantikörper, Fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugierten Ziege-anti-Maus IgG+M F(ab)₂ Antikörper, in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ versetzt. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in $200 \mu\text{l}$ Propidiumjodid-Lösung ($10 \mu\text{g/ml}$) in PBS aufgenommen.

Die Oberflächenfluoreszenz der einzelnen Zellen wurde mit einem FACScan im FL-1 Kanal gemessen. Tote Zellen wurden mit der PI-Färbung ermittelt (FL-3 Kanal) und von der Messung ausgeschlossen.

4.7.2. Rhodamin-Efflux

Dieser funktionelle Assay, der die P-Glykoproteinaktivität erfaßt, beruht darauf, daß Rhodamin 123 zu den Substraten des P-Glykoproteins gehört, aktiv von den Zellen aufgenommen wird und der Gehalt an Rhodamin in Zellen durchflußzytometrisch nachweisbar ist. Eine P-Glykoprotein exprimierende Zellpopulation, die mit einem

fluoreszierenden Farbstoff inkubiert und beladen wurde, wird diesen wieder aus der Zelle pumpen, das heißt, sie verliert Fluoreszenz. Das Rhodamin 123 ist kein gutes Substrat für andere membranständige ABC-Transportproteine mit Bedeutung bei der Resistenzvermittlung und P-Glykoprotein-Modulatoren, wie z.B. Verapamil, hemmen die P-Glykoprotein-Aktivität relativ spezifisch, zeigen aber bei anderen ABC-Transportern nur geringe resistenzmodulierende Effekte (Twentyman and Versantvoort, 1996).

1,5 x10⁵ Zellen in 1 ml Medium wurden für 30 min bei 37°C mit 30 µg/ml Rhodamin 123 (Sigma) inkubiert und beladen. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, zweimal mit Medium gewaschen und weitere 2 h bei 37°C inkubiert, um den Efflux des Rhodamins zu erlauben. Nach zweimaligem Waschen wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 650 nm im FL-3 Kanal eines FACScan Durchflußzytometers gemessen. Kontrollzellen wurden parallel mit Farbstoff beladen und bei 4°C inkubiert, um den P-Glykoprotein unabhängigen Efflux zu bestimmen, da MDR1 bei 4°C nicht aktiv ist. Als weitere Kontrolle des spezifischen Effluxes wurden Zellen mit Rhodamin beladen und dann in Anwesenheit von Verapamil im 10fachen Überschuß zur spezifischen Blockade der MDR1-Pumpe inkubiert.

4.8. Indirekte Viabilitätsbestimmung mit dem MTT-Test

Dieser biochemische, mitochondriale Aktivitätstest zur Bestimmung der Zellviabilität beruht auf der Fähigkeit von lebenden Zellen, lösliches MTT in ein unlösliches Formazanreaktionsprodukt umzuwandeln (Mosmann, 1983).

Dabei wird der Tetrazoliumring des gelben Substrates (Tetrazoliumsals) durch die in aktiven Mitochondrien vorhandenen Dehydrogenasen gespalten, was zur Bildung von blauen, in Isopropanol, 0,05 M HCl, löslichen Formazankristallen führt. Die Absorption ist direkt proportional zur Menge des umgesetzten Farbstoffes und damit zur Zahl der lebenden Zellen. Der MTT-Test kann somit auch als indirekter Test zur Messung zytotoxischer Effekte in Zellkulturen eingesetzt werden.

Es wurden 1 x 10⁴ Zellen pro Ansatz einer 96-Loch Mikrotiterplatte in 100 µl Medium ausplattiert und nach 24 h mit Zytostatika versetzt. Es wurden jeweils 8 Ansätze pro Zytostatikakonzentration gemessen. Nach weiteren 72 h wurde das Medium abgenommen und 10 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung (Sigma) in 100 µl Medium zu jeder Probe gegeben

und 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μ l 0,05M HCl in Isopropanol gestoppt und nach dem Lösen der Formazankristalle wurde mit einem Plattenphotometer die Absorption bei 620 nm gemessen.

4.9. Zytostatikaaufnahme und -efflux

Die Autofluoreszenz des Chemotherapeutikums Epirubicin wurde genutzt, um den Gehalt der Zellen an Epirubicin zu messen.

Zur Bestimmung der Zytostatikaaufnahme wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 1 ml Medium (Phenolrotfrei) für 5 min, 15 min und 30 min mit 25 μ g/ml Epirubicin bei 37°C inkubiert und beladen. Danach wurden die Zellen 5 min bei 724 x g zentrifugiert, zweimal gewaschen und anschließend zur Bestimmung des Epirubicin-Effluxes nach 30 min, 60 min und 120 min bei 37°C in Zytostatikafreiem Medium inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde bei 650 nm im FL-3-Kanal eines FACScan gemessen. Die relative Fluoreszenzintensität der Zellen im FL-3-Kanal eines FACScan ist direkt proportional zum Epirubicin-Gehalt der Zellen.

4.10. Gewinnung von Zellextrakten

1×10^7 Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, 5 min bei 724 x g pelletiert, mit 500 μ l Puffer A aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 724 x g wurden die Zellen mit 200 μ l Puffer A und 2 μ l PMSF (10 mM in Ethanol) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension 15-30 Mal mit einer 1 ml Insulinspritze durch eine Kanüle (0,8 x 40 mm) gezogen und anschließend unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen infolge der Scherung geplatzt waren. Danach wurden die Membranen in zwei Schritten durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 15777 x g abgetrennt. Der klare Überstand (Zellextrakt) wurde entweder sofort für die Messung der Caspase-Aktivität und Western-Blot Analysen eingesetzt, bzw. bei -80°C gelagert (Deveraux et al., 1997).

4.11. Messung der Caspase-3-Aktivität

4.11.1. Messung der Enzymaktivität nach *in vitro* Aktivierung

100 μl Zellextrakt wurden mit 1 μl Cytochrom C- und 1 μl dATP-Lösung versetzt und für 60 min bei 30°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Extrakte ohne Zugabe von Cytochrom C und dATP, die bei 4°C bzw. bei 30°C inkubiert wurden (Zou et al., 1997).

4.11.2. Caspase-3-Aktivitätstest

Auf Eis wurden zu 10 μl Enzymextrakt, 90 μl Puffer B, 2 μl Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-pNA in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde die enzymatische Umsetzung des Substrates colorimetrisch verfolgt. Die Absorption des Ansatzes wurde zu den Zeitpunkten t_0 , $t=30$, 60, 90 min (37°C) mit einem Plattenphotometer bei 405 nm gemessen. In der Auswertung wurde die Absorption als Funktion der Substratumsetzung gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Die Caspase-3-Aktivität entspricht dem Anstieg dieser Kurve im linearen Bereich.

4.12. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Das Membranpotential der Mitochondrien resultiert aus der asymmetrischen Verteilung von Protonen und anderer Ionen auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran. Dieser elektrochemische Gradient besteht aus zwei Komponenten: dem Membranpotential und dem pH Gradienten. Der Protonengradient durch die innere mitochondriale Membran entsteht durch den höheren Protonengehalt des Zwischenmembranraumes im Vergleich zur Matrix. Der größte Teil der Energie des Protonengradienten entspricht dem Membranpotential.

Aufgrund der negativen elektrischen Ladung auf der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran können sich kationische lipophile Fluorochrome (z.B. Rhodamin 123, JC-1) in der Mitochondrienmatrix akkumulieren und entsprechend der Nernst-Gleichung verteilen. Die Bildung von Aggregaten aus diesen Farbstoff-Monomeren verursacht u.a. einen Shift in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Bei hohem

mitochondrialen Membranpotential bildet JC-1 oberhalb einer kritischen Konzentration sogenannte J-Aggregate, die einen Shift des Fluoreszenzmaximums von 537 nm (Monomer, grüne Bande) zu 597 nm (J-Aggregate, rote Bande) auslösen und die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in intakten Zellen auf Einzelzellniveau ermöglichen (Cossarizza et al., 1993; Reers et al., 1995). Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz durch J-Aggregatbildung und dem Anstieg des Membranpotentials.

Apoptosesignale bewirken eine Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials, d.h. bei der durchflußzytometrischen Messung lassen sich Zellen mit einer verminderten Fluoreszenz im FL-2-Kanal nachweisen. Der prozentuale Anteil dieses Signals im Vergleich zur Mediumkontrolle wurde für die Auswertung verwendet.

Die Zellen wurden nach Apoptoseinduktion mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin für 42 h mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 (8 μM) in 1 ml Phenolrot-freiem Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert, 1x mit PBS gewaschen und in 500 μl PBS aufgenommen. Dann wurde die Fluoreszenz der Zellen am FACS-Gerät im FL-1-Kanal (grüne Fluoreszenz) und FL-2-Kanal (rote Fluoreszenz) gemessen. Der Farbstoff JC-1 wird ebenfalls durch MDR1 Überexpression aus den Zellen herausgepumpt. Um die P-Glykoproteinpumpe zu blockieren, wurden die Zellen bei den Experimenten mit MT-3/Adr Transfektanten zusätzlich mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Verapamil versetzt.

4.13. Messung von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten bei Zytostatika-induzierter Apoptose

Intakte Mitochondrien zeigen ein hohes (bis zu 180 mV) negatives Membranpotential. Eine erhöhte Produktion von ROIs (reactive oxygen intermediates) infolge der Herabsetzung des mitochondrialen Transmembranpotentials spielt bei der Apoptose eine zentrale Rolle (Szabo et al., 1998). Die Messung der oxidativen Aktivität in lebenden Zellen mit fluorogenen, chemilumineszenten oder chromogenen Proben ist durch die Möglichkeit multipler Formen von reaktivem Sauerstoff in der gleichen Zelle schwierig. So können z.B. Stickoxidradikale die gleichen Veränderungen in den Farbstoffen hervorrufen wie andere reaktive Sauerstoffmoleküle. Blockierende Reagenzien und Enzyminhibitoren ermöglichen jedoch weitgehend spezifische Messungen.

Fluorescein, Rhodamin und andere Farbstoffe können chemisch zu farblosen, nicht fluoreszierenden Produkten reduziert werden. Diese Dihydroderivate oxidieren durch einige reaktive Sauerstoffspezies leicht zu den ursprünglichen Farbstoffen zurück und können somit als fluorogene Proben für die Detektion der Sauerstoffaktivität in lebenden Zellen und Geweben dienen.

Bekannt ist auch, daß Dihydroethidium, Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) und Dihydrorhodamin 123 mit intrazellulären Sauerstoffintermediaten reagieren. Dihydroethidium wird zum Nachweis von Superoxid-Radikalen eingesetzt. Es wird zu Ethidium oxidiert, das in die DNA interkaliert, den Zellkern färbt und rot fluoresziert.

Die Zellen wurden analog zu den Apoptosemessungen mit Zytostatika (2,5 µg/ml Epirubicin bzw. 50 µg/ml Etoposid) versetzt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und gezählt. Dann wurden 1x10⁵ Zellen in 3 ml Medium (Phenolrotfrei) mit 2 µM Dihydroethidium 30 min bei 37°C inkubiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen durchflußzytometrisch am FACScan im FL-3-Kanal gemessen. Die Histogramme zeigten bei der eingesetzten Zytostatika-Konzentration keine Überlappungen mit der Epirubicin-Eigenfluoreszenz.