5. Ergebnisse

5.1. Antagonisierung von Chemoresistenz

5.1.1. Zelliniencharakterisierung

Eines der Hauptprobleme bei der Behandlung von Tumorerkrankungen ist die Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose. Deshalb wurde untersucht, ob die Überexpression der Zelltod-fördernden Bcl-2-Homologen Bak oder Bik/Nbk die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose in Zellinienmodellen erhöhen kann.
Ausgewählt wurden die beiden Mamma-Karzinom-Zellinien MT-1/Adr und MT-3/Adr. Die beiden Zellinien wurden durch Kultivieren der maternalen MT-1- und MT-3-Zellen mit steigenden Konzentrationen Adriamycin (Doxorubicin) selektiert, bis sich die IC_{50} Werte für Zytostatika-induzierten Zelltod erhöhten. Dazu wurde die Zellinie MT-1 über 26 Passagen mit Adriamycin im Konzentrationsbereich von 5-20 ng/ml, die MT-3-Zellen über 22 Passagen mit 50-200 ng/ml Adriamycin inkubiert. In den MT-1/Adr-Zellen wurde eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Adriamycin mit dem Faktor 3,5 und in den MT-3/Adr-Zellen mit dem Faktor 5 erreicht (Stein et al. 1997). Für die *in vivo* Charakterisierung der Resistenz wurden die Zellen in Nacktmäuse transplantiert. Dann wurden die Tumore mit der in früheren Experimenten ermittelten maximal tolerablen Dosis Adriamycin behandelt. Dabei verringerte sich das Tumorvolumen der MT-1/Adr-Sublinie nur noch auf 47 % im Vergleich zu 9 % bei den MT-1-Zellen, bzw. auf 66 % bei den MT-3/Adr-Zellen im Vergleich zu 28 % bei der maternalen MT-3 Linie.

5.1.1.1. Messung der Zytostatikasensitivität

Zunächst wurden die vorhandenen Zellinienpaare MT-1 und MT-1/Adr sowie MT-3 und MT-3/Adr hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika untersucht. Dabei wurde das Ansprechen auf Apoptoseinduktion durch das Anthrazyklin Epirubicin, den Topoisomerase II Inhibitor Etoposid und das Spindelgift Taxol bestimmt.

Zur Messung der Zytostatikasensitivität wurden die Zellen mit Epirubicin (0 bis 10 μg/ml), Etoposid (0 bis 100 μg/ml) und Taxol (0 bis 1 μg/ml) versetzt und für 72 h kultiviert. Anschließend wurde der Zelltod der MT-1- und MT-3-Zellen auf Einzelzellniveau bzw. die Vitalität der MT-3-Zellen mittels des MTT-Assays bestimmt.
In den MT-1- und MT-1/Adr-Zellen wurde der Zelltod auf Einzelzellniveau durch Anwendung einer modifizierten Zellzyklusanalyse gemessen, wobei der nukleäre DNA Gehalt bestimmt wurde, der durch die Apoptose-typische DNA Fragmentierung herabgesetzt wird. In diesen Zellen resultiert die Apoptose in einem charakteristischen sub-G1 DNA Peak, wodurch der hypodiploide DNA-Gehalt von Zellen in Folge der Fragmentierung der genomischen DNA während der Apoptose nachgewiesen wird.

In Abbildung 12a ist die Induktion von Apoptose durch Epirubicin von sensitiven MT-1-Zellen im Vergleich zu resistenten MT-1/Adr-Zellen dargestellt. Die MT-1/Adr-Zellen zeigten bei 10 μg/ml Epirubicin in 29 % der Zellen Apoptose, während die MT-1-Zellen diesen Wert bereits bei 0,6 μg/ml Epirubicin aufwiesen.
Der Nachweis der Kreuzresistenz der MT-1/Adr-Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose ist in der Abbildung 12b gezeigt. Die MT-1-Zellen waren im Bereich von 0 – 100 μg/ml Etoposid sensitiver als die resistenten MT-1/Adr-Zellen. Bei 50 μg/ml Etoposid-Zugabe wurden 75 % apoptotische MT-1-Zellen im Gegensatz zu 25 % apoptotischen MT-1/Adr-Zellen gemessen.
Nach Apoptoseinduktion mit Taxol im Konzentrationsbereich 0-1 μg/ml konnte ab 0.1 μg/ml Taxol ein Unterschied in der Zytostatika-Sensitivität zwischen den MT-1 und MT-1/Adr-Zellen festgestellt werden (Abb. 12c). Bei 1 μg/ml Taxol-Zugabe zeigten 57 % MT-1-Zellen im Gegensatz zu 21 % MT-1/Adr-Zellen Apoptose.
Es wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

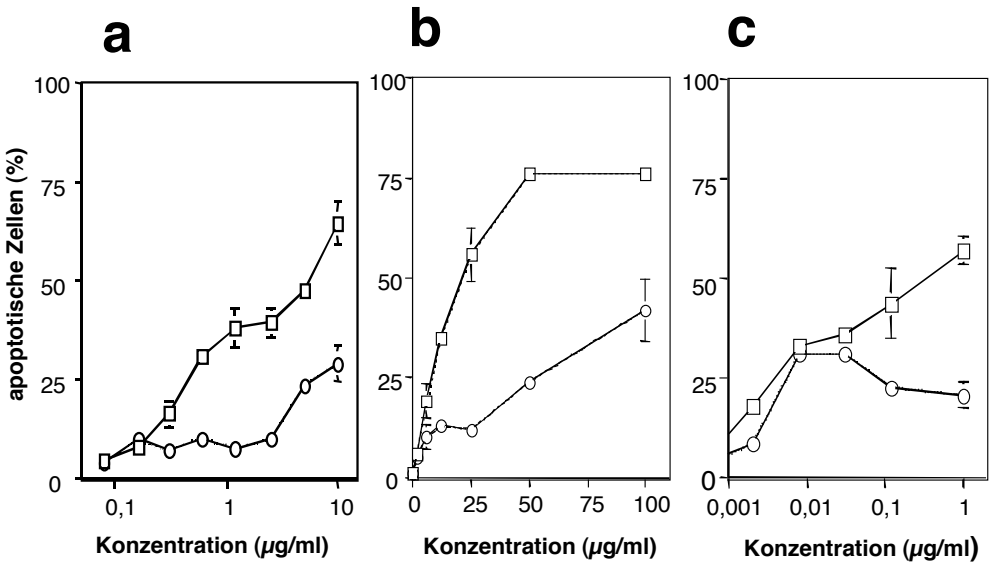


Abb. 12: Apoptoseinduktion mit Epirubicin, Etoposid und Taxol beim MT-1, MT-1/Adr Zellsystem
Es wurden jeweils 1,5x10^5 Zellen ausplattiert, nach 24h mit dem Zytostatikum versetzt und 72h inkubiert. Nach Fixieren der Zellen wurde die Apoptose auf Einzelzellniveau durch Messen des DNA-Gehaltes einzelner Zellen (10000) durchflußzytometrisch bestimmt.
a) Epirubicininduktion b) Etoposidinduktion c) Taxolinduktion
Offene Quadrate: MT-1-Zellen, offene Kreise: MT-1/AdrZellen. Es sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus Triplikaten aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Aus diesen Daten geht hervor, daß die MT-1/Adr-Zellen im Vergleich zu den maternalen MT-1-Zellen Resistenz gegenüber Epirubicin-, Etoposid- und Taxol-induzierter Apoptose aufweisen. Ein ähnliches Resistenzverhalten wurde in dem zweiten verwendeten Zellsystem MT-3 und MT-3/Adr für Epirubicin-induzierte Apoptose beobachtet.

Die Apoptose in den MT-3 und MT-3/Adr-Zellen nach Zytostatikaexposition ist durch typische morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung und Membranausstülpungen gekennzeichnet, zeigt jedoch überraschenderweise kaum fragmentierte DNA als sub-G1 DNA Peak. Der Grund hierfür ist unbekannt, könnte jedoch Folge eines Defekts der Aktivierung von Endonukleasen sein. Deshalb wurde der Zelltod in diesem System mittels einer Kombination aus Propidiumjodid-Aufnahme und Veränderungen im „Side Scatter“ gemessen (Darzynkiewicz 1992). Dabei erscheinen die toten Zellen im Dotplot bei größerem SSC und kleinerem FSC, das heißt, sie sind granulärer und kleiner. Im Gegensatz zu den intakten Zellen kann das Propidiumjodid bei fortgeschrittener Apoptose in die apoptotischen Zellen eindringen. Dieser Effekt wurde zur Quantifizierung bei der durchflußzytometrischen

Messung ausgenutzt. Es wurde der prozentuale Anteil Propidiumjodid-gefärbter Zellen infolge von Zytostatika-Inkubation im Vergleich zu den Mediumkontrollen ermittelt (Abb.13).

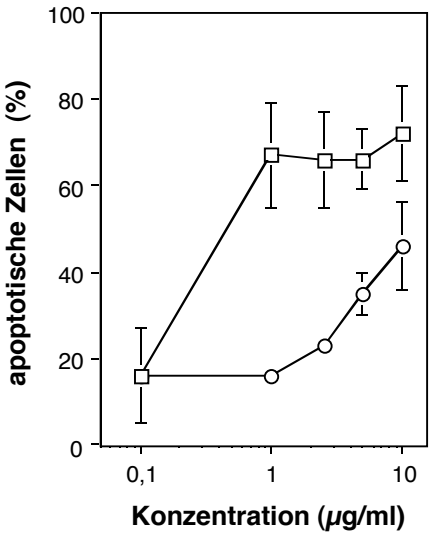


Abb. 13: Apoptoseinduktion mit Epirubicin beim MT-3, MT-3/Adr Zellsystem
Es wurden jeweils 1,5x10^5 Zellen ausplattiert, nach 24h mit Epirubicin versetzt und 72h inkubiert. Nach Färben der Zellen mit Propidiumjodid wurde die Apoptose durchflußzytometrisch bestimmt.
Offene Quadrate: MT-3-Zellen, offene Kreise: MT-3/Adr Es sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus Triplikaten aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

5.1.1.2. Untersuchung möglicher Resistenzursachen

Zur Bestimmung eines möglichen Resistenzmechanismus in den vorhandenen Zellsystemen wurde die Expression des vom *Mdr-1* Gen kodierten P-Glykoproteins mittels Immunfluoreszenz durch Verwendung des monoklonalen MRK16 Antikörpers bestimmt.

Dabei wurde die Oberflächenfluoreszenz mittels Durchflußzytomertrie gemessen, tote Zellen wurden durch Gegenfärbung mit Propidiumjodid ausgeschlossen. In der Abbildung 14 sind die Histogramme eines repräsentativen Experimentes gezeigt.

Es wurde deutlich, daß die MT-1/Adr-Zellen wie auch die maternalen MT-1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle kein Mdr-1 exprimieren. Die MT-3-Zellen exprimieren nur geringe MDR-1-Mengen, dagegen zeigen die MT-3/Adr-Zellen deutlich erhöhte Expression.

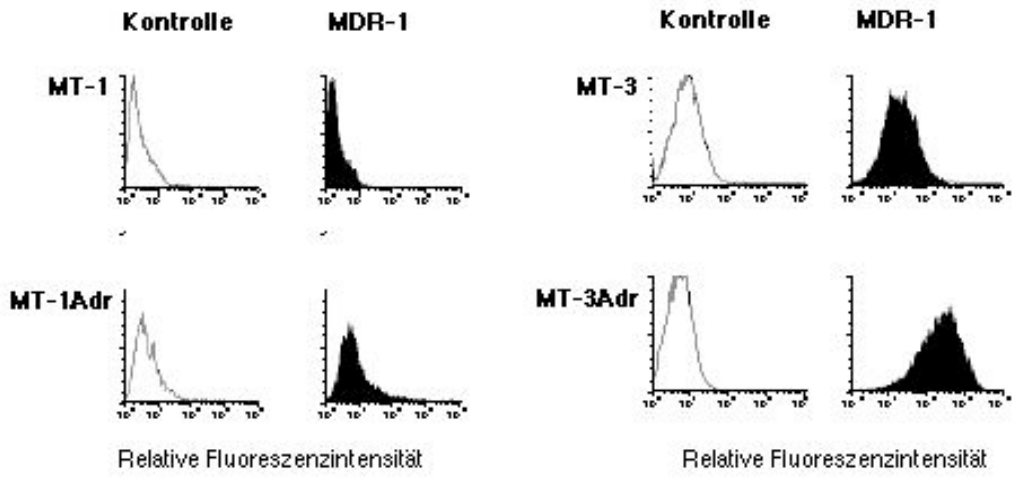


Abb.14: Nachweis der MDR-1 Expression in MT-1/Adr und MT-3/Adr-Zellen mittels Immunfluoreszenz
Zur Bestimmung der Oberflächenexpression des MDR-1/ P-Glykoproteins wurden die Zellen zuerst mit dem monoklonalen MRK16 Antikörper, gefolgt vom polyklonalen Sekundärantikörperkonjugat gefärbt. Die Oberflächenfluoreszenz wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen, tote Zellen wurden durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Es sind die Fluoreszenzdaten eines repräsentativen Experimentes gezeigt.

Die Resistenzen in den hier verwendeten Zellinien MT-1/Adr- und MT-3/Adr-Zellen beruhen auf verschiedenen Ursachen. In den MT-3/Adr-Zellen wird der resistente Phänotyp durch die Überexpression des P-Glykoproteins verursacht.

In den MT-1/Adr-Zellen jedoch konnte weder dieser Mechanismus noch eine erhöhte Expression der Transportproteine MDR-1, MRP, LRP nachgewiesen werden (Stein et al, 1997).

Die Western-Blot-Analyse zeigte hingegen eine erhöhte Expression von Bcl-2 in den MT-1/Adr-Zellen im Vergleich zu den maternalen MT-1-Zellen (Abb. 15a, b). Die Inkubation der Zellen mit Epirubicin im Bereich von 0-10 μg/ml für 72 h führte zu keiner Veränderung des hohen Bcl-2 Expressionsniveaus in den MT-1/Adr-Zellen verglichen mit den Aktinkontrollen.

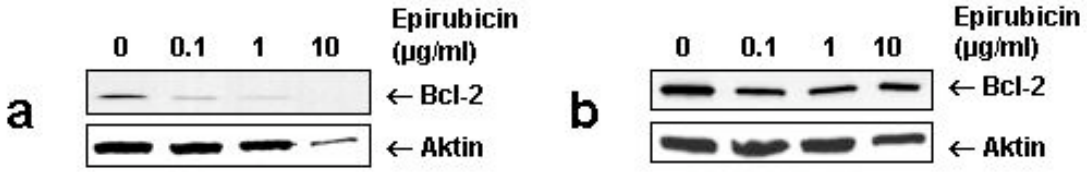


Abb. 15: Bcl-2 Expression nach Epirubicin-Behandlung
MT-1(a) und MT-1/Adr (b) Zellen wurden 72 h mit Epirubicin (0, 0.1, 1, 10 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western-Blot detektiert.

Ein wesentlicher Mechanismus während der Zytostatika-induzierten Apoptose stellt die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) dar. Deshalb wurde der Anteil an Superoxidradikalen mittels Färbung der Zellen mit Dihydroethidium (HE) nach Behandlung mit Epirubicin bzw. Etoposid am FACS im FL-3 Kanal gemessen. Als Nachweis für die Spezifität der Messung diente die Inhibition der Radikalbildung mit dem antioxidativen Reagenz N-Acetylcystein.

In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen analog zu den Apoptosemessungen ausplattiert und 48 h mit Epirubicin bzw. Etoposid inkubiert. Dabei wurden solche Zytostatika-konzentrationen ausgewählt, bei denen ein unterschiedliches Apoptoseverhalten zwischen resistenten und sensitiven Zellen gemessen wurde. In der Abbildung 16a und 16b sind repräsentative Histogramme der maternalen Zellinien MT-1 und MT-1/Adr dargestellt. Man sieht sowohl mit Epirubicin-Behandlung als auch mit Etoposid-Behandlung einen deutlichen Shift in der Fluoreszenz, der mit N-Acetylcystein im Falle von Etoposid-Inkubation vollständig, im Falle von Epirubicin-Inkubation nur zum Teil gehemmt werden konnte.

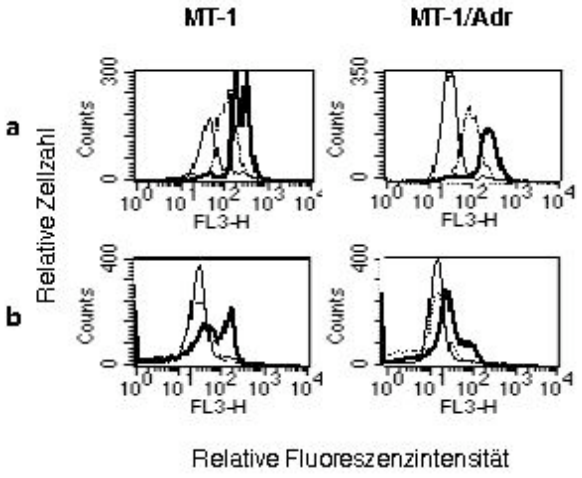


Abb.16: Messung der Sauerstoff-radikale bei Zytostatika-induzierter Apoptose
Die Zellen wurden 48 h mit 2.5 µg/ml Epirubicin (Abb. 16a) oder mit 50 µg/ml Etoposid (Abb.16b) bzw. mit diesen Zytostatika und N-Acetylcystein (15 mM) inkubiert. Dann wurden die Sauerstoffradikale durch Färbung von jeweils 1 x 10^5 Zellen mit Dihydro-ethidium (2µM) am FACS gemessen. Die durchgezogene Linie entspricht unbehandelten, die stärkere, durchgezogene Linie Zytostatika-behandelten und die unterbrochene Linie Zytostatika und N-Acetylcystein behandelten Zellen.

Die Abbildung 16a zeigt, daß durch Epirubicin-Inkubation in den sensitiven MT-1-Zellen in gleichem Umfang zytotoxische Sauerstoffradikale generiert werden wie in den resistenten MT-1/Adr-Zellen. Dagegen wird bei Etoposid-Behandlung (Abbildung 16b) deutlich, daß bei

den sensitiven MT-1 wesentlich mehr Zellen einen Fluoreszenzshift aufweisen als die resistenten MT-1/Adr-Zellen. Das bedeutet, in den gegenüber Etoposid sensitiven MT-1-Zellen wurden deutlich mehr Superoxidradikale gebildet als in den resistenten MT-1/Adr-Zellen.

5.1.2. Stabile Bak- und Bik/Nbk-Transfektanten

5.1.2.1. Vektorkonstruktion

Die bak-cDNA wurde aus humaner cDNA mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pGem-T-Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) insertiert und nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Not I und Apa I in die korrespondierenden Restriktionsstellen des pcDNA3-Expressionsvektors (Invitrogen, Groningen, Niederlande) umkloniert.

Die bik/nbk pcDNA3 Plasmid-DNA wurde aus einem mycNbk-Konstrukt (Arbeitsgruppe M.Strauss, Max Delbrück Zentrum, Berlin), das die N-terminal myc-getaggte „full length“ Nbk-cDNA enthält, generiert. Nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I wurde bik/nbk als 528 bp Fragment in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert.

Zur Kontrolle wurden zunächst die erhaltenen bak- und bik/nbk-Vektorkonstrukte verdaut und die erhaltenen DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Die korrekte Basenfolge der DNA wurde anschließend mittels Sequenzierung (Didesoxymethode) überprüft.

5.1.2.2. Generierung von bak- und bik/nbk-Transfektanten

Es wurden stabile Transfektanten der proapoptotischen Gene *bak* und *bik* in MT-1/Adr und MT-3/Adr-Zellen hergestellt, um zu untersuchen, ob deren Überexpression die Anthrazyklin-resistenz überwinden kann.

Der Expressionsvektor für Säugerzellen pcDNA3 enthält das Resistenzgen Neomycin, so daß die transfizierten Zellen mit G418 selektiert werden konnten. Zur Bestimmung der optimalen Selektionskonzentration wurden die Zellinien zunächst in Gegenwart unterschiedlicher G418 Konzentrationen kultiviert. Die Titrationskurve zeigte, daß eine G418 Konzentration von 500 μg/ml für die Selektion geeignet war, um nach 3 Tagen 100 % der nichttransfizierten Zellen abzutöten.

Um Kontrollklone herzustellen, wurden die maternalen Zellinien MT-1/Adr und MT-3/Adr mit dem Vektorplasmid pcDNA3 transfiziert. Zur Herstellung der Transgen-exprimierenden Transfektanten wurde diese beiden Zellinien mit den Plasmiden pcDNA3 bik/nbk bzw. pcDNA3 bak mittels Elektroporation transfiziert. Es wurde 24 h nach der Elektroporation mit der Selektion begonnen. Anschließend wurden jeweils mindestens 20 Transgenklone und 10 Kontrollklone generiert.

Transgen-exprimierende Klone wurden mittels RNA-Isolierung und anschließender RT-PCR überprüft. Die PCR-Reaktion wurde mit einem „Downstream"- Primer in der bak oder bik cDNA Sequenz und einem „Upstream"- Primer im CMV-Promotor des pcDNA3 Vektors durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel von MT-1/Adr- und MT-3/Adr-Transfektanten ist in der Abbildung 17 an jeweils einem Klon dargestellt.

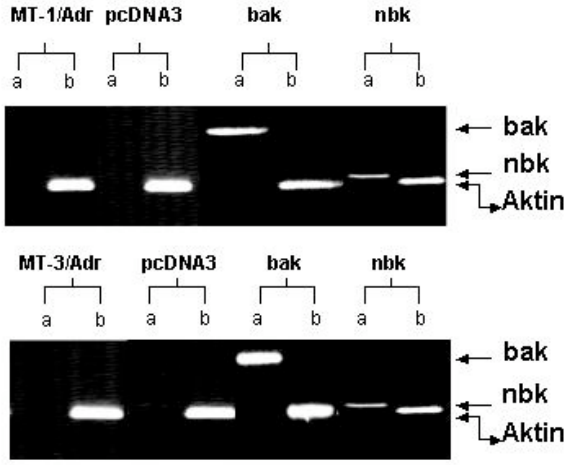


Abb. 17: Kontrolle der Transgenexpression mittels RT-PCR in MT-1/Adr und MT-3/Adr bak und nbk Transfektanten
Nach Isolierung der RNA aus Zellen wurde mittels RT-PCR-Reaktion die Expression von bak bzw. bik/nbk überprüft. Als Kontrolle wurde die Aktinexpression verwendet.
a) bak- bzw. bik/nbk-Expression
b) Aktin-Expression

Die Klone mit positivem PCR-Signal wurden mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinexpression getestet (Abb. 18).

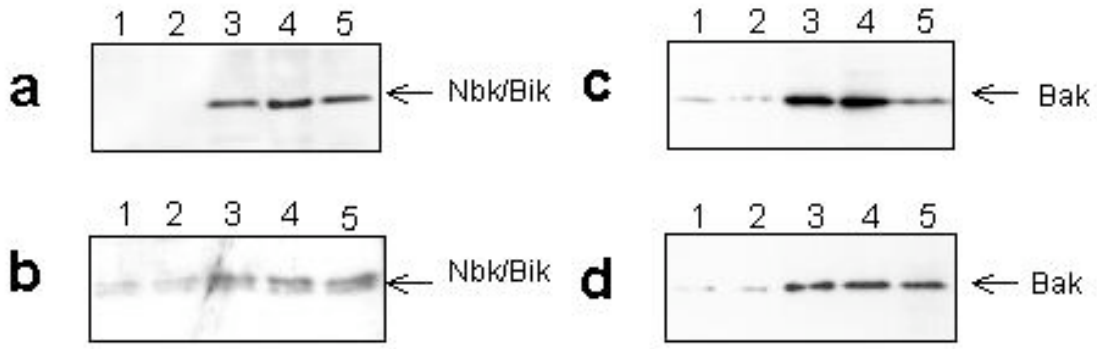


Abb.18: Western-Blot-Analyse der Expression von Bik/Nbk und Bak
Die Expression von Bik wurde mit dem polyklonalen Bik Antikörper (Ziege) nachgewiesen. Die Bak Expression wurde mit dem monoklonalen Bak Antikörper (Klon TC102) detektiert. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenz.

(a) Überexpression von Bik in MT-1/Adr-Zellen.Spur 1: MT-1/Adr, Spur 2: MT-1/Adr pcDNA3 transfiziert, Spuren 3 bis 5: MT-1/Adr nbk/bik-Transfektanten
(b) Überexpression von Bik in MT-3/Adr-Zellen. Spur 1: MT-3/Adr, Spur 2: MT-3/Adr pcDNA3 transfiziert, Spuren 3 bis 5: MT-3/Adr nbk/bik-Transfektanten
(c) Überexpression von Bak in MT-1/Adr-Zellen. Spur 1: MT-1/Adr, Spur 2: MT-1/Adr pcDNA3 transfiziert, Spuren 3 bis 5: MT-1/Adr bak-Transfektanten
(d) Überexpression von Bak in MT-3/Adr-Zellen. Spur 1: MT-3/Adr, Spur 2: MT-3/Adr pcDNA3 transfiziert, Spuren 3 bis 5: MT-3/Adr bak-Transfektanten

Die Zytostatika-resistenten MT-1/Adr und MT-3/Adr sowie die Kontroll-Klone wiesen nur geringe endogene Bik/Nbk-Expression auf (Abb.18a, b). Es konnten ebenfalls niedrige Expressionslevel an endogenem Bak in diesen Zellen detektiert werden (Abb.18c, d). Die selektierten bak- und bik/nbk-Transfektanten zeigten eine deutliche Überexpression des Transgens (Abb.18a-d) und wurden im Folgenden für die zellbiologischen Untersuchungen verwendet.

5.1.2.3. MDR-1-Expression und Zytostatikaefflux

Um zu überprüfen, ob sich die Expression des vom *Mdr-1*-Gen codierten P-Glykoproteins durch die Transfektion von bak und bik verändert, wurde die MDR-1-Expression mittels Immunfluoreszenz durch Verwendung des monoklonalen MRK16-Antikörpers bestimmt.

MT-3-Zellen exprimieren nur geringe MDR-1 Level, dagegen zeigen die MT-3/Adr-Zellen und deren Transfektanten deutlich erhöhte Expression (Abb. 19). Die P-Glyko-proteinexpression wurde in den MT-3/Adr-Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollklonen und den nichttransfizierten MT-3/Adr-Zellen nicht verändert.

In den MT-1/Adr-Zellen, die wie auch die maternalen MT-1-Zellen kein MDR-1 exprimieren (Abb. 18), wurde in den Kontroll- oder Bak- und Bik-Transfektanten keine Induktion der MDR-1-Expression gemessen. In der Abbildung 19 sind die Histogramme repräsentativer Transfektanten gezeigt.

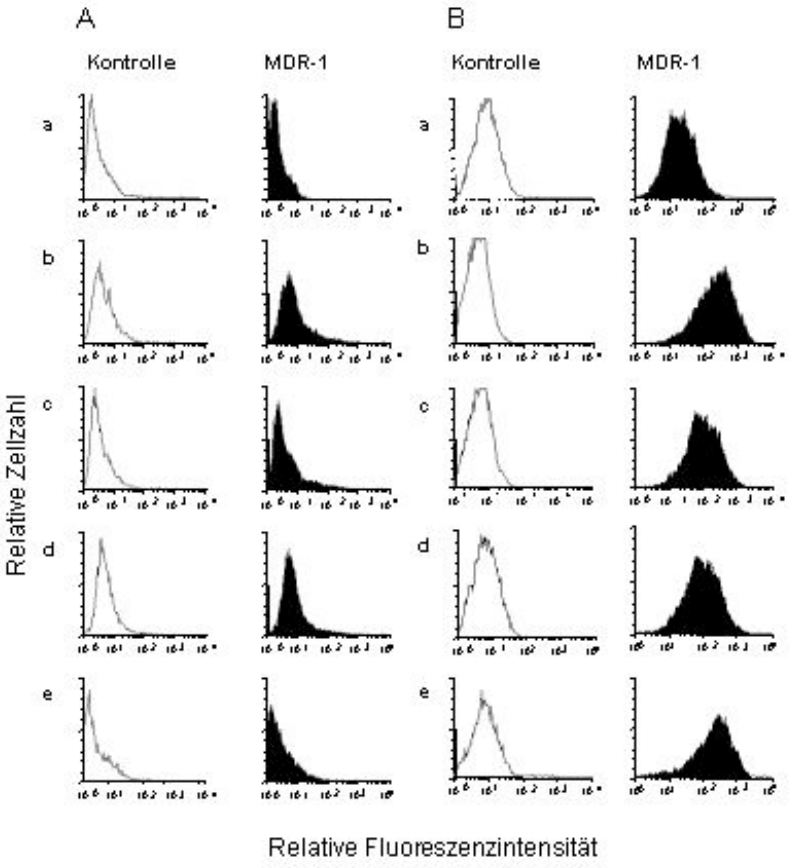


Abb.19: Nachweis der MDR-1-Expression in MT-1/Adr und MT-3/Adr-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression des P-Glykoproteins wurden die Zellen zuerst mit dem monoklonalen MRK16-Antikörper, gefolgt vom polyklonalen Sekundärantikörper-Konjugat gefärbt. Die Oberflächenfluoreszenz von 10 000 Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen, tote Zellen wurden durch Gegenfärbung mit Propidiumjodid ausgeschlossen. Es sind die Fluoreszenzdaten eines repräsentativen Experimentes gezeigt.

A: (a) maternale MT-1-Zellen, (b) MT-1/Adr-Zellen, (c) MT-1/Adr Kontroll-Transfektanten, (d) MT-1/Adr-Bak-Transfektanten, (e) MT-1/Adr-Bik-Transfektanten

B: (a) maternale MT-3-Zellen, (b) MT-3/Adr-Zellen, (c) MT-3/Adr-Kontroll-Transfektanten, (d) MT-3/Adr-Bak-Transfektanten, (e) MT-3/Adr-Bik-Transfektanten

Es ist bekannt, daß Mitglieder der Bcl-2-Familie in der Lage sind, die Porenbildung in der Mitochondrienmembran direkt zu aktivieren, und es wurde eine mögliche Pumpenfunktion während des „Permeability Transition“ der Mitochondrienmembran im Verlauf des Apoptoseprozesses diskutiert. Deshalb wurde untersucht, ob Überexpression von Bak oder Bik/Nbk den Zytostatika-Efflux in den MT-1/Adr und den MT-3/Adr-Zellen beeinflußt.

Zur Messung des Rhodamin-Efflux wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 30 μg/ml Rhodamin 123, einem Substrat der Mdr-1 Pumpe, inkubiert, gewaschen und anschließend der Rhodamin-Efflux der Zellen nach 2 h Inkubation bei 37°C mittels Fluoreszenzmessung auf Einzelzellniveau bei 650 nm gemessen. Es wurde kein Efflux in den MT-1- und MT-1/Adr-Zellen und deren Transfektanten gemessen (Abb. 20a bis e). Die maternalen MT-3-Zellen, die kein MDR-1 überexprimieren, zeigten nur marginalen Rhodamin-Efflux nach 2 h (Abb. 20f). Im Gegensatz dazu wurde in den MT-3/Adr-Zellen ein Rhodamin-Efflux von 80% gemessen, der durch die Transfektion mit bak und bik/nbk nicht herabgesetzt wurde (Abb. 20g-j).

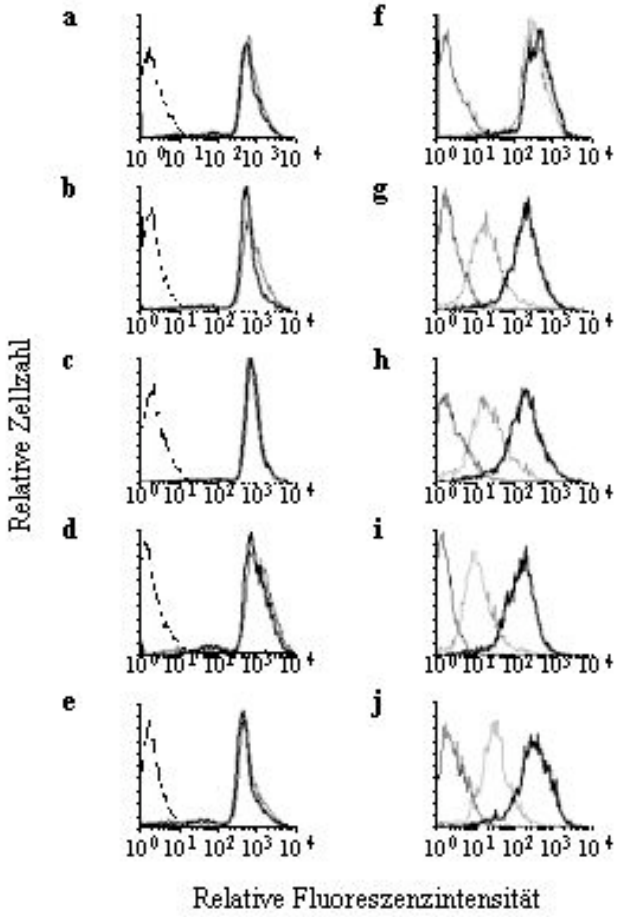


Abb. 20: Rhodamin-Efflux in MT-1/Adr- und MT-3/Adr-Zellen

Funktioneller Test der Mdr-1-Expression durch Messen des Rh-12- Effluxes.
1,5x10^5 Zellen wurden in 1 ml Medium für 30 min bei 37°C mit 30 µg/ml Rhodamin 123 beladen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen für weitere 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 650 nm durchflußzytometrisch gemessen.
Der linke Peak stellt die Autofluoreszenz der ungefärbten Zellen dar. Die Punktlinie zeigt die Fluoreszenz nach 2 h 37°C und die schwarze rechte Linie die für 30 min bei 37°C Rhodamin-gefärbten und anschließendfür 2h bei 4°C inkubierten Zellen.
Es sind die Fluoreszenzdaten eines repräsentativen Experimentes dargestellt.

(a) MT-1,
(b) MT-1/Adr,
(c) MT-1/Adr-Kontroll-Transfektanten,
(d) MT-1/Adr-Bik-Transfektanten,
(e) MT-1/Adr-Bak-Transfektanten,
(f) MT-3,
(g) MT-3/Adr,
(h) MT-3/Adr-Kontroll-Transfektanten,
(i) MT-3/Adr-Bik-Transfektanten,
(j) MT-3/Adr-Bak-Transfektanten,

Weiterhin wurde der Efflux des auch für die Apoptosemessungen verwendeten Zytostatikums Epirubicin untersucht (Abb. 21). Die Zellen wurden 30 min bei 37°C mit Epirubicin beladen, gewaschen, weitere 4 h bei 37°C inkubiert und der relative Gehalt des Zytostatikums zu verschiedenen Zeitpunkten von t = 0 bis 4 h mittels Durchflußzytometrie bei 650 nm auf Einzelzellniveau gemessen. Es konnte bestätigt werden, daß die MT-3-Zellen nur geringen Zytostatikaefflux zeigen, wohingegen in den MT-3/Adr-Zellen und den Bak- und Bik/Nbk-Transfektanten der Epirubicin-Gehalt innerhalb der ersten 30 min stark abnimmt und nach 2 h das tiefste Niveau erreicht.

Man sieht jedoch deutlich, daß die MT-3/Adr-Zellen nicht den gesamten Gehalt an Epirubicin detoxifizieren, da die Fluoreszenzlevel nicht das Niveau der Autofluoreszenz der ungefärbten MT-3/Adr-Zellen erreichen (Abb. 21). Die MT-1-Zellen zeigten ähnliche Zytostatikabeladung verglichen mit den MT-3-Zellen. MT-1- und MT-1/Adr-Zellen behielten jedoch die hohen intrazellulären Zytostatikakonzentrationen, und es konnten keine Unterschiede zwischen den MT-1/Adr resistenten Zellen verglichen mit deren Transfektanten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

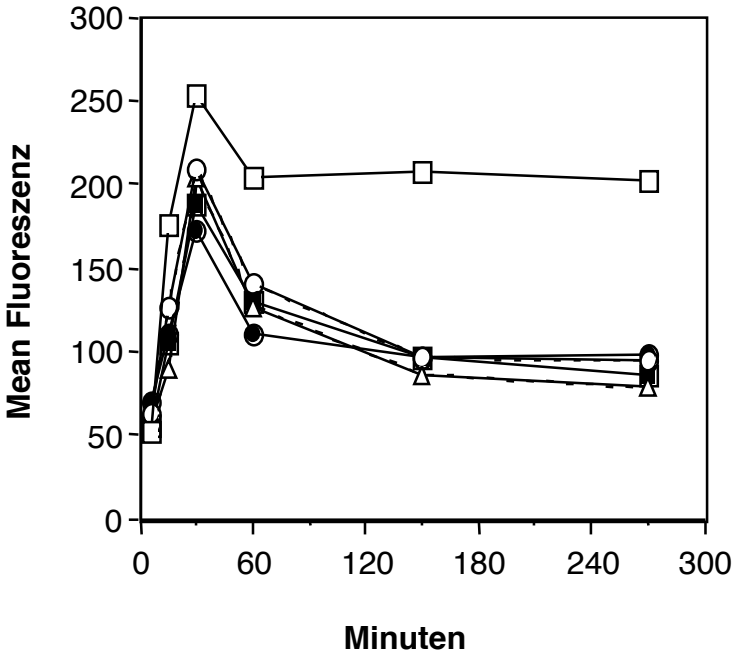


Abb. 21: Epirubicin-Aufnahme und -Efflux in MT-3/Adr-Zellen
Die Zellen wurden mit 25 µg/ml Epirubicin beladen und für 5 min, 15 min und 30 min bei 37°C inkubiert und der Epirubicinefflux nach 30 min, 60 min und 120 min bestimmt. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Standardabweichung war kleiner 10 %.
Offene Quadrate: MT-3, offene Kreise: MT-3/Adr, offene Dreiecke: MT-3/Adr pcDNA3, schwarze Kreise: MT-3/Adr bak, schwarze Quadrate: MT-3/Adr bik/nbk

5.1.2.4. Messung der Zytostatikasensitivität

Zur Bestimmung der Zytostatikasensitivität der bak- und bik/nbk-Transfektanten wurden die Zellen für 72 h mit Zytostatika inkubiert. Dann wurde der Zelltod auf Einzelzellniveau bzw. indirekt mittels des MTT-Tests bestimmt.

Die Zelltodmessung erfolgte wie schon im Kapitel Zelliniencharakterisierung beschrieben in den MT-1/Adr-Zellen auf Einzelzellniveau durch Anwendung einer modifizierten Zellzyklusanalyse, in den MT-3/Adr-Zellen durch Messung der Propidiumjodidaufnahme unfixierter Zellen.

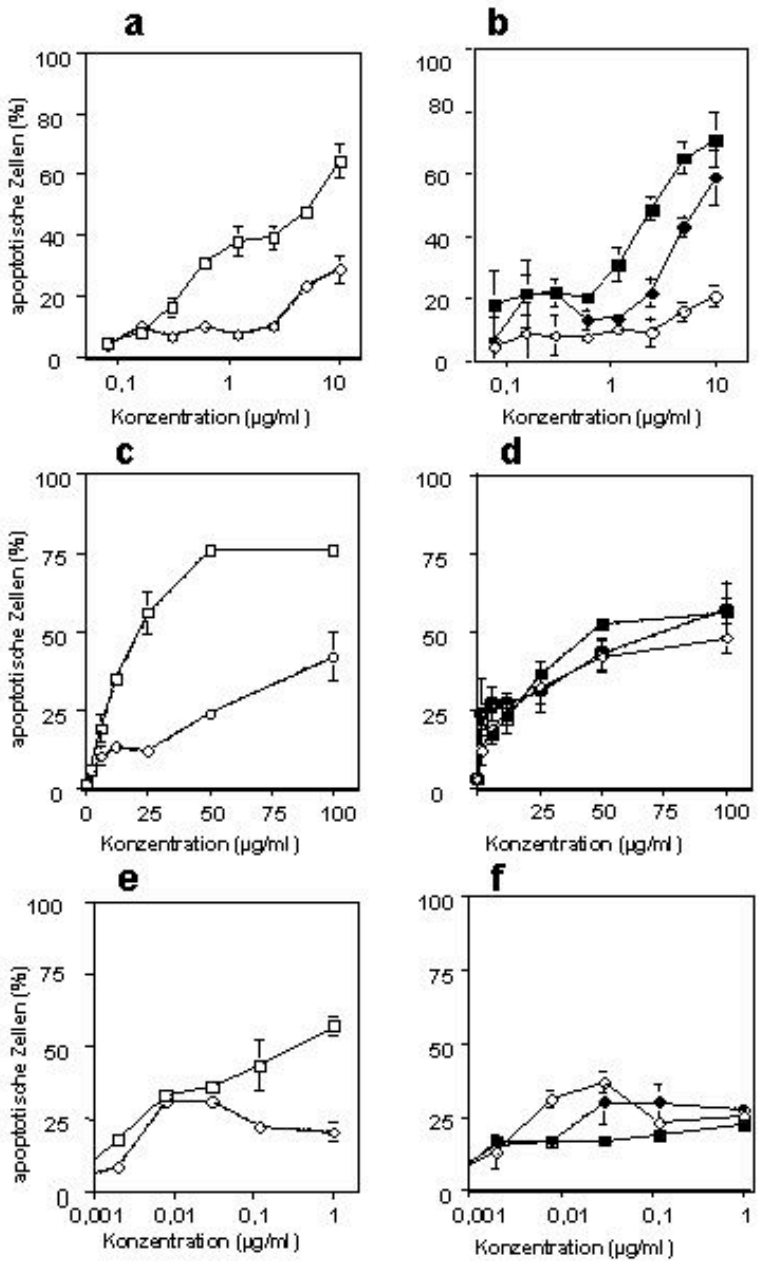


Abb. 22: Sensitivierung von MT-1/Adr-Zellen für Zytostatika-induzierten Zelltod

Die Zellen (1,5x10^5) wurden für 72 h mit Epirubicin (a, b), Etoposid (c, d) oder Taxol (e, f) inkubiert. Der Zelltod wurde auf Einzelzellniveau durch Messen des DNA-Gehaltes einzelner Zellen durchflußzytometrisch bestimmt.

a, c, e:
offene Quadrate: MT-1-Zellen, offene Kreise: MT-1/Adr;

b, d, f:
offene Kreise: MT-1/Adr-Kontroll- Transfektanten,
schwarze Kreise: MT-1/Adr-bik/nbk-Transfektanten,
schwarze Quadrate: MT-1/Adr-bak-Transfektanten.

Bei den Transfektanten sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 Klonen aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Für die MT-1- und MT-1/Adr-Zellen sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

In der Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Apoptoseinduktion mit Epirubicin (22a, b), Etoposid (22c, d) und Taxol (22e, f) in den MT-1/Adr Transfektanten (22b, d, f) im Vergleich zu den Mutterzellinien MT-1 und MT-1/Adr (22a, c, e) dargestellt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten und, im Falle der Transfektanten, von 3 Klonen ermittelt.

In Abbildung 22a ist die Induktion von Apoptose durch Epirubicin in sensitiven MT-1-Zellen im Vergleich zu resistenten MT-1/Adr-Zellen im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 μg/ml gezeigt. Die Überexpression von Bik/Nbk sensitiviert die MT-1/Adr-Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose und antagonisiert die Resistenz teilweise. Mit der Überexpression von Bak wurde eine vollständige Revertierung des resistenten Phänotyps der MT-1/Adr-Zellen ermittelt und die Sensitivität gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose war äquivalent zu der sensitiven Mutterzellinie (Abb. 22b). Die Kontroll-Transfektanten zeigten keine veränderte Zytostatika-Sensitivität im Vergleich zu den MT-1/Adr- Zellen.

Zur Beantwortung der Frage, ob die beiden Apoptoseförderer Bak und Bik auch die Resistenz gegenüber anderen Chemotherapeutika beeinflußt, wurde außerdem die Apoptosesensitivität der Zellklone nach Behandlung mit Etoposid und Taxol untersucht.

Die MT-1-Zellen waren im Bereich von 0 – 100 μg/ml Etoposid deutlich sensitiver als die resistenten MT-1/Adr-Zellen (Abb. 22c). Es wurden z.B. bei Behandlung der Zellen mit 50 μg/ml Etoposid 76% apoptotische MT-1-Zellen und 24% apoptotische MT-1/Adr-Zellen gemessen. Allerdings bewirkte weder die Bak- noch die Bik/Nbk-1-Überexpression eine Sensitivierung gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose im Vergleich zu den Kontrollklonen (Abb. 22d).

Ebenso führte die Überexpression von Bak oder Bik nicht zur Verbesserung der Apoptoseinduktion durch Taxol im Konzentrationsbereich 0-1 μg/ml im Vergleich zu den maternalen MT-1/Adr-Zellen (Abb. 22e, f).

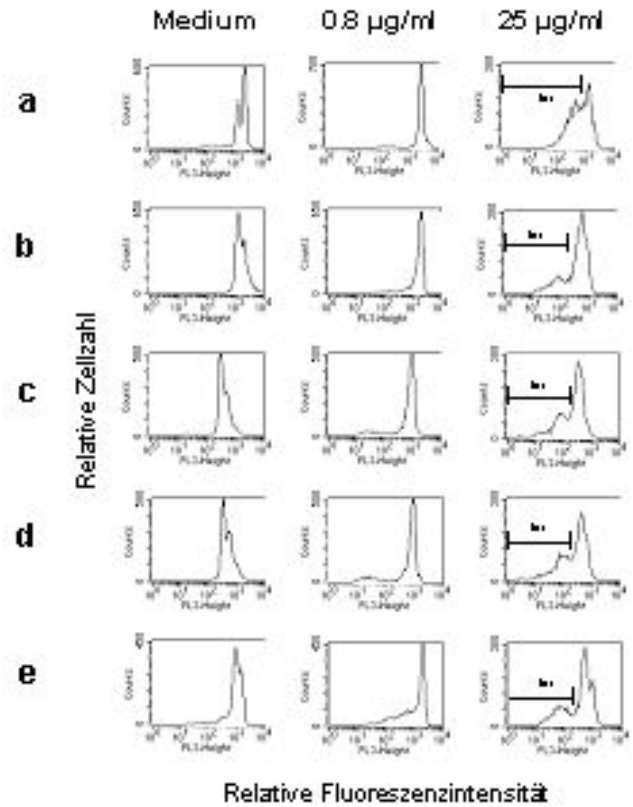


Abb.23: Apoptoseinduktion mit Etoposid in MT-1/Adr-Transfektanten
Die Zellen wurden 72h mit Etoposid inkubiert, anschließend fixiert und dann durchflußzytometrisch analysiert. Es sind repräsentative Histogramme der Mediumkontrollen und der mit 0.8 µg/ml bzw. 25 µg/ml Etoposid-behandelten Zellen dargestellt.
(k) MT-1 b) MT-1/Adr c) MT-1/Adr Kontrolle
(l) d) MT-1/Adr bak e) MT-1/Adr bik/nbk

Die in der Abbildung 23 dargestellten Histogramme zeigen den für Etoposid als Topoisomerase II-Inhibitor typischen G2/M-Arrest der Zellen, der bei diesem Experiment im Konzentrationsbereich von 0.2-0.8 µg/ml Etoposid erreicht wurde. Aus diesem Zellzyklusarrest heraus, gehen die Zellen in die Apoptose. Bei höheren Zytostatika-Konzentrationen (25 µg/ml) sieht man nach 72 h Inkubation den für apoptotische Zellen charakteristischen sub-G1 Peak des hypodiploiden DNA-Gehalts in Folge der Fragmentierung genomischer DNA.

Bei den Apoptosemessungen der Bak- und Bik/Nbk-MT-3/Adr-Transfektanten wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet wie im MT-1/Adr-Zellsystem. Die Abbildung 24a zeigt, daß die Überexpression von Bak und Bik/Nbk die Zytostatikasensitivität nach 72 h Inkubation mit 2,5 µg/ml Epirubicin in den MT-3/Adr-Zellen deutlich erhöhte im Vergleich zu MT-3/Adr-Zellen und MT-3/Adr Kontroll-Transfektanten. Es wurden bei den bak-Transfektanten 50% und bei den bik/nbk-Transfektanten 54% apoptotische Zellen im Gegensatz zu 22% apoptotischen MT-1/Adr-Zellen und 50% apoptotischen Zellen bei den Kontroll-Transfektanten gemessen.

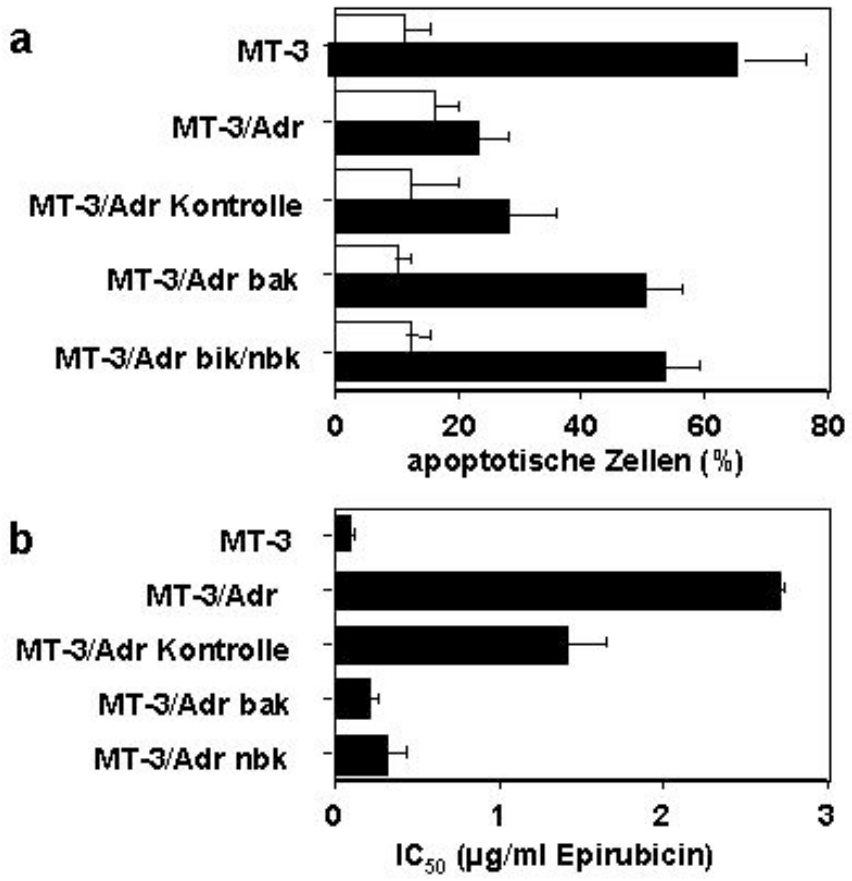


Abb. 24: Sensitivierung von MT-3/Adr-Zellen für Epirubicin induzierten Zelltod
Die MT-3/Adr-Zellen wurden 72h mit Epirubicin (2,5 µg/ml) inkubiert und anschließend die Apoptose der Zellen bestimmt (a) mittels Durchflußzytometrie als Veränderung in der Morphologie (i.e. Granularität mit dem Side Scatter gemessen) und Propidiumjodid Aufnahme. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten sind dargstellt. Die weißen Balken entsprechen den Mediumkontrollen, die schwarzen Balken den Epirubicin-behandelten Zellen. (b) Epirubicin-Konzentrationen für 50% Wachstumsinhibition durch MTT-Test gemessen.

In diesem System wurde außerdem der MTT-Test zur Bestimmung des IC_{50}-Wertes für Epirubicin in den MT-3/Adr-Zellen verglichen mit den Transfektanten angewendet. Der IC_{50}-Wert von 2,8 μg/ml Epirubicin der MT-3/Adr-Zellen wurde aufgrund der Überexpression von Bak auf 0,2 μg/ml und durch Bik/Nbk auf 0,3 μg/ml herabgesetzt (Abb.24b). Das bedeutet, daß wesentlich weniger Epirubicin notwendig war, um 50 % dieser Tumorzellen am Wachstum zu hindern. Im Vergleich mit dem IC_{50}-Wert der Ursprungslinie MT-3 von 0.1 μg/ml waren die IC_{50}-Werte der Bak-und Bik/Nbk-Transfektanten nur unwesentlich höher.

Dieser Test bestätigte, daß Bak und Bik/Nbk in gleichem Maße die Zytostatikaresistenz in den MT-3/Adr-Zellen partiell revertieren.

5.1.2.5. Änderung des mitochondrialen Membranpotentials

Neuere Ergebnisse zeigen, daß verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie z.B. Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, an der Regulation von mindestens zwei mitochondrialen Funktionen beteiligt sind, an dem Öffnen der mitochondrialen Permeability Transition Pore und an der Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien ins Cytosol. Aus diesem Grund wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen untersucht, ob die Aufhebung der Zytostatikasresistenz bzw. Sensitivierung durch die Überexpression von Bak und Bik aufgrund der Aktivierung der „permeability transition" Pore hervorgerufen wird.

Dazu wurden die Zellen 42 h mit 2,5 μg/ml Epirubicin behandelt, mit dem kationischen, sich in Mitochondrien anreichernden und bei inaktivem Membranpotential fluoreszierenden Fluorochrom JC-1 inkubiert und durchflußzytometrisch die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials bestimmt. In der Abbildung 25 sind repräsentative Histogramme der MT-1/Adr-Transfektanten im Vergleich zu den Mutterlinien dargestellt.

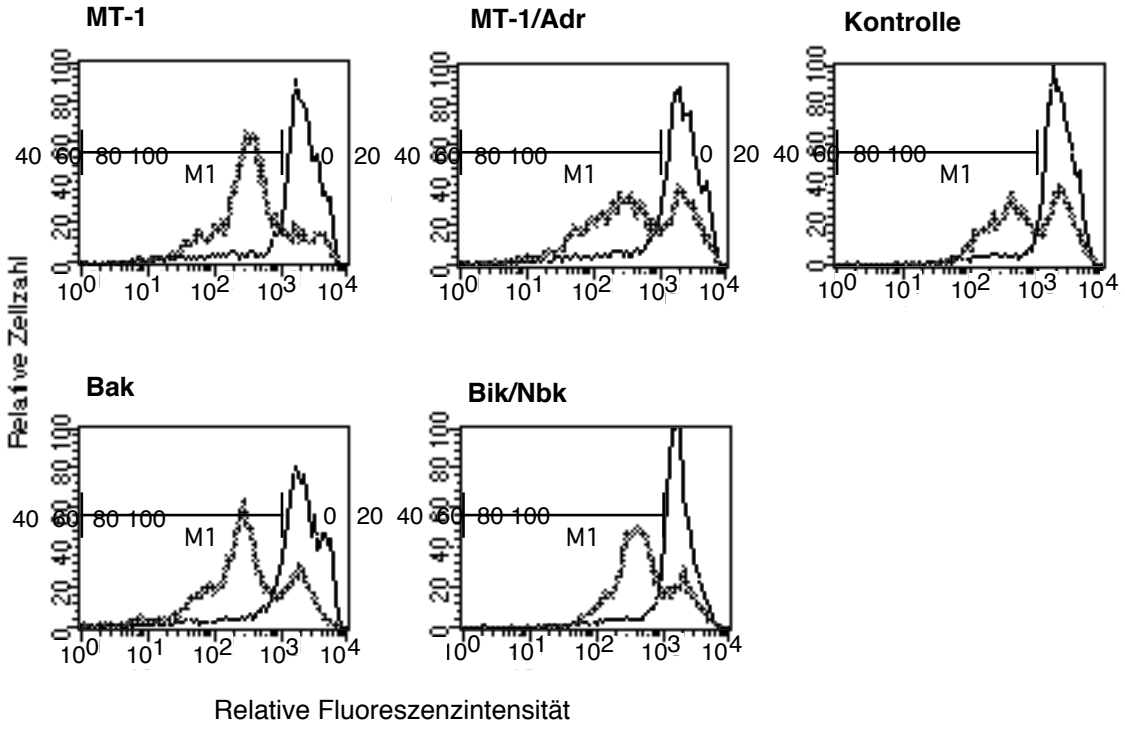


Abb. 25: Messung der mitochondrialen Permeabilitätsänderung während Epirubicin-induzierter Apoptose

Die Zellen (1,5x 10^5) wurden nach Apoptoseinduktion mit Epirubicin (2,5 µg/ml, 42h) 30 min mit dem Farbstoff JC-1 in 1 ml Medium bei 37°C inkubiert, anschließend einmal mit 1x PBS gewaschen und dann die mitochondriale Permeabilitätsänderung durchflußzytometrisch auf Einzelzellniveau bestimmt. Es wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen im FL-2-Kanal gemessen. Die durchgezogene Linie zeigt die JC-1 Fluoreszenz von Zytostatika-unbehandelten Zellen, die gezackte Linie die JC-1-Fluoreszenz nach Epirubicin-Inkubation.

Apoptosesignale bewirken eine Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials, d.h. bei der durchflußzytometrischen Messung lassen sich Zellen mit einer verminderten Fluoreszenz nachweisen. Der prozentuale Anteil dieses Signals im Vergleich zur Mediumkontrolle wurde für die quantitative Auswertung verwendet, deren Ergebnis in der Abbildung 26 gezeigt ist. Die Daten entsprechen Ergebnissen aus 3 unabhängigen Experimenten mit den selben Bak- und Bik-Klonen, die auch für die Zytostatika-Sensitivitätsmessungen verwendet wurden.

In den Zytostatika-sensitiven MT-1-Zellen wurde 78% Zellen mit verringertem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi$)gemessen. In den resistenten MT-1/Adr-Zellen und den Kontroll-Klonen hingegen zeigten nur 46 % der Zellen eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials. Die chemosensitivierten Bak- und Bik-Klone wiesen mit 71 % bzw. 72 % Zellen mit verringertem mitochondrialen Membranpotential einen deutlichen Unterschied zu den MT-1/Adr-Zellen und den Kontroll-Klonen auf und verhielten sich damit ähnlich wie die Zytostatika-sensitiven MT-1-Zellen (Abb. 26a).

Vergleichbare Effekte konnten im zweiten Zellsystem nachgewiesen werden. Die Bak- und Bik-überexprimierenden-MT-3/Adr-Klone zeigten mit 50% bzw. 58% der Zellen eine ähnlich starke Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials wie die sensitiven MT-3-Zellen (56%). Es wurde ein deutlicher Unterschied zu den Adriamycin-resistenten MT3-/Adr-Zellen und den Kontrollklonen ermittelt, bei denen nur 28% bzw. 26% der Zellen ein verringertes mitochondriales Membranpotential aufwiesen (Abb. 26b).

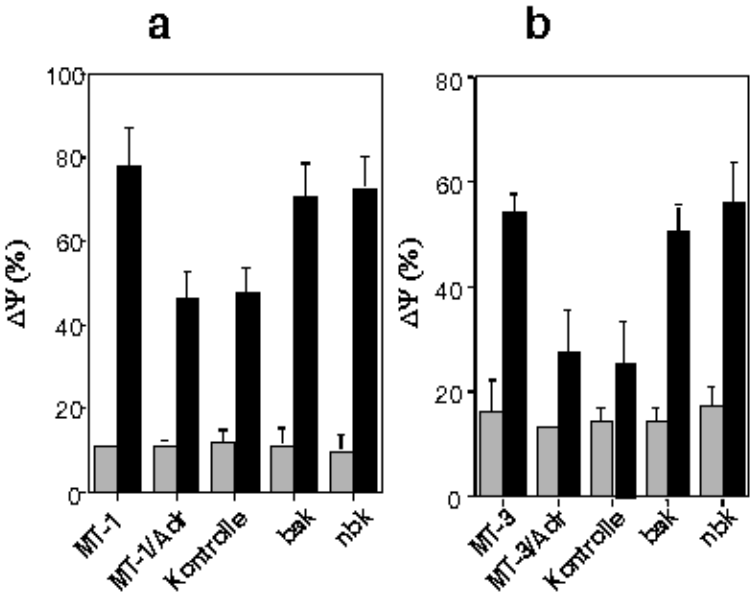


Abb. 26: Messung des mitochondrialen Membranpotentials (ΔΨ)
Es ist der prozentuale Anteil der JC-1-Fluoreszenz-„geshifteten“ Zellen in Folge der Epirubicin-Inkubation (2,5 µg/ml, 42 h) im Vergleich zu den Mediumkontrollen dargestellt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Graue Balken: prozentualer Anteil der Zytostatika-unbehandelten Zellen, schwarze Balken: prozentualer Anteil der Epirubicin-behandelten Zellen. a) MT-1/Adr-Transfektanten b) MT-3/Adr-Transfektanten

5.1.2.6. Caspase-3 Aktivität

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie üben bei der Freisetzung von verschiedenen pro-apoptotischen Faktoren ins Zytoplasma eine regulatorische Funktion aus. Das zu diesen Faktoren gehörende Cytochrom c bildet mit APAF-1, dATP und der Procaspase-9 einen Komplex. Daraus geht aktivierte Caspase-9 hervor, die wiederum weitere Effektorcaspasen wie die Caspase-3 aktiviert. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Überexpression von Bak und Bik eine verstärkte Aktivierung der Caspase-3 nach Zytostatikaexposition hervorruft.
Dazu wurden die Zellen 72 h mit 0, 1, 5 und 10 μg/ml Epirubicin behandelt. bei der Western-Blot-Analyse wurde sowohl das Proenzym (32 kDa) als auch die aktive Untereinheit der gespaltenen Caspase-3 (17 kDa) mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. Die Zytostatika-resistenten MT-3/Adr-Zellen zeigten nur geringe Caspase-3 Aktivierung bei 10 μg/ml Epirubicin im Vergleich zu den Mediumkontrollen, wogegen bei den Bak- und Bik-Klonen bei 5 μg/ml Epirubicin eine deutlich stärkere 17 kDa-Bande der aktiven Untereinheit sichtbar wurde. In der Abbildung 27 wurde jeweils der Immunoblot eines Klones der Transfektanten dargestellt.

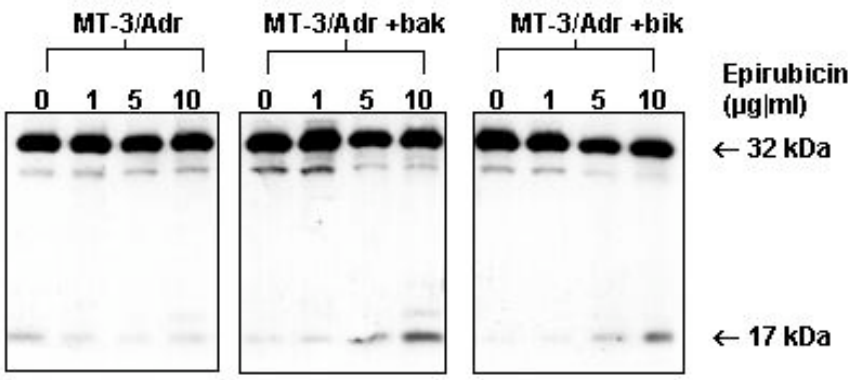


Abb. 27: Nachweis der Caspase-3 Prozessierung im Western-blot
Die Zellen wurden 72 h mit Epirubicin inkubiert und anschließend daraus die Proteine isoliert. Das Proenzym (32 kDa) und die aktive Untereinheit der Caspase-3 (17 kDa) wurden mit einem polyklonalen Antikörper detektiert.

Der funktionelle Nachweis der Zytostatika-induzierten Caspase-3-Aktivität in den MT-3/Adr-Transfektanten nach Zytostatikabehandlung wird in der Abbildung 28 gezeigt. Zellextrakte von 72 h mit Epirubicin-behandelten Zellen wurden mit dem Chromophor-gekoppelten Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-pNA versetzt. Anschließend wurde die enzymatische Umsetzung des Substrates colorimetrisch verfolgt. Die Absorption des Ansatzes wurde zu den Zeitpunkten t = 0 , 30, 60 und 90 min mit einem Plattenphotometer bei 405 nm gemessen.

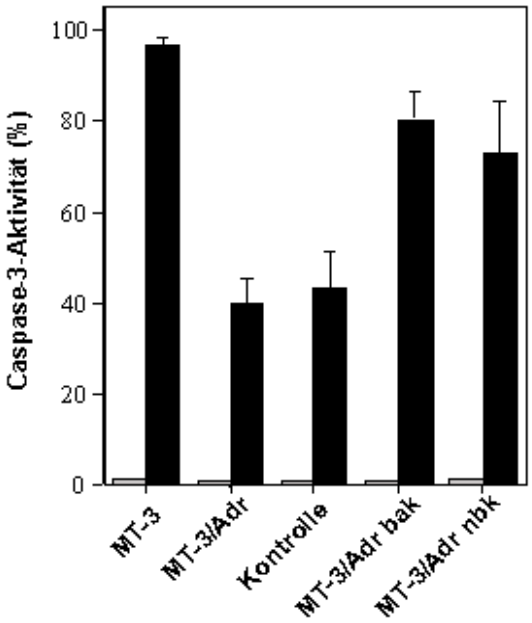


Abb. 28: Funktioneller Nachweis der Caspase-3 -Aktivität
Die Zellen wurden 72 h mit 10 µg/ml Epirubicin behandelt. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität colorimetrisch zu den Zeitpunkten t=0, 30, 60, 90 min durch Inkubieren der Zellextrakte mit dem Chromophor-gekoppelten Caspase-3 Substrat ermittelt. Die dargestellten Werte entsprechen der Caspase-3-Aktivität der Zytostatika-behandelten Zellen bezogen auf die Gesamtaktivität (100%). Schwarze Balken: Epirubicin-behandelte Zellen, graue Balken Mediumkontrollen.

Um die Gesamtaktivität der Caspase-3 in den Zellen zu ermitteln, wurden die Zellextrakte *in vitro* mit Cytochrom c und dATP aktiviert. In der quantitativen Auswertung wurde die Absorption als Funktion der Substratumsetzung gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Die Caspase-3-Aktivität entspricht dem Anstieg dieser (nicht gezeigten) Kurve im linearen Bereich.

Die in der Abbildung 28 dargestellten prozentualen Werte der Caspase-3-Aktivität aus drei unabhängigen Experimenten entsprechen der *in vivo* induzierten Aktivität in den Zytostatika-behandelten Zellen bezogen auf die maximal induzierbare Gesamtaktivität nach *in vitro* Aktivierung der Extrakte mit Cytochrom c und dATP, die als 100 % definiert wurde. Die Unterschiede in der *in vitro* in Lysaten induzierbaren Gesamtaktivität der Zellinien und deren Transfektanten waren kleiner als 10 % (Daten nicht gezeigt). Nach 72 h Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml Epirubicin wurde in den MT-3-Zellen eine vollständige Aktivierung (100 %) der Caspase-3 erreicht, während in den resistenten MT-3/Adr-Zellen und den Kontrollklonen nur eine ungefähr 40 %ige Aktivierung gemessen wurde. Durch die Überexpression von bak und bik in dieser resistenten Zellinie konnte nach Epirubicinbehandlung eine Caspase-3-Aktivierung von 81% bzw. 73% erreicht werden.

5.1.2.7. Expression Apoptose-assoziierter Proteine nach Behandlung mit Epirubicin in MT-1/Adr-Transfektanten

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie können miteinander assoziieren, indem sie über ihre homologen Domänen Homo- und Heterodimere bilden. Sie sind u.a. mittels dieser Dimerisierungen in der Lage, die pro-oder anti-apoptotischen Signale zu regulieren. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die Überexpression der Apoptoseförderer Bak und Bik/Nbk die Expression anderer Homologen und damit die Zytostatikasensitivität der Zellen beeinflußt.

Mittels Western-Blot-Analyse wurde untersucht, inwiefern sich die Expression Apoptose-assoziierter Proteine der Bcl-2-Familie nach Apoptoseinduktion mit Epirubicin in den Bak-und Bik/Nbk-Transfektanten ändert. Dazu wurden die Zellen mit 0, 0.1, 1 und 10 µg/ml Epirubicin inkubiert und nach 72 h die Proteinexpression ermittelt. Die Western-Blots sind in der Abbildung 29 dargestellt und deren Ergebnisse in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Bestimmung der Aktin-Expression dient als Nachweis für den Probenauftrag und ermöglicht eine Aussage über die Expressionsregulation nach Inkubation mit unterschiedlichen Epirubicin-Konzentrationen.

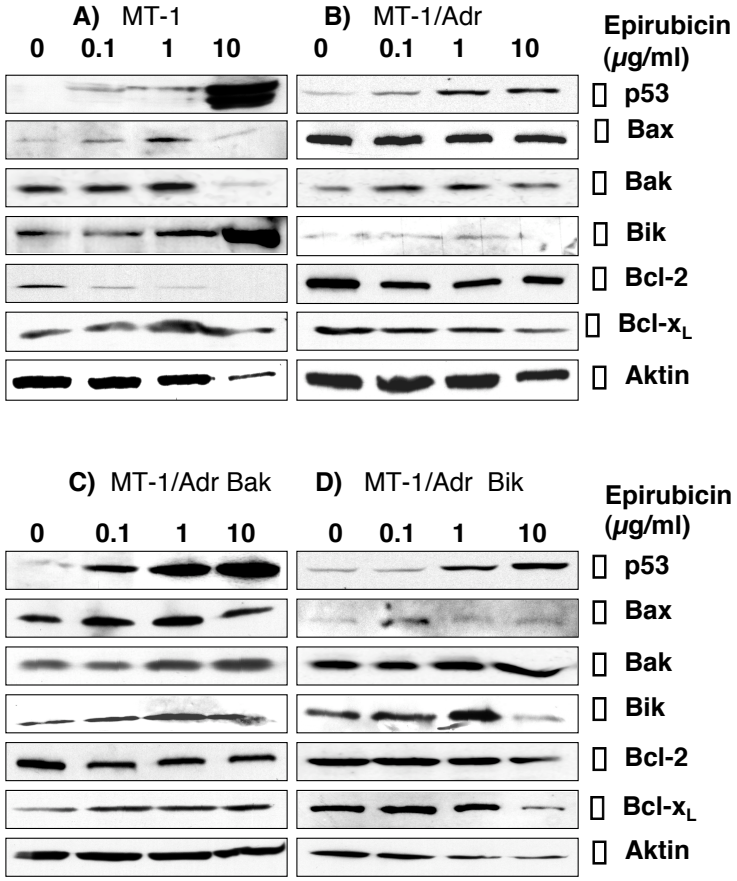


Abb. 29: Expression Apoptose-assoziierter Proteine nach Epirubicin-Behandlung
MT-1, MT-1/Adr, MT-1/Adr-bak- und MT-1/Adr-bik/nbk-Zellen wurden 72 h mit Epirubicin (0, 0.1, 1, 10 µg/ml) behandelt und anschließend die Proteinexpression mittels Western-Blot detektiert.

Die MT-1-Zellen zeigen ein geringeres Bcl-2 Expressionsniveau als die MT-1/Adr-Zellen und deren Transfektanten. In den Zytostaika-sensitiven MT-1-Zellen wird, im Gegensatz zu den resistenten MT-1/Adr-Zellen, mit steigender Epirubicin-Konzentration, die Expression der Zelltod-Förderer Bax und Bik induziert.

Im Vergleich mit den resistenten MT-1/Adr-Zellen wird in den Bak-Transfektanten die Bik-Expression und geringfügig die Bak-Expression, in den Bik-Transfektanten die Bik- und geringfügig die Bax- und Bak-Expression induziert. Der Vergleich mit den sensitiven MT-1-Zellen ergibt, daß in den Bak-und Bik-Transfektanten die Expression von Bcl-2 konstant, aber auf einem höheren Niveau bleibt und weniger Bax exprimiert wird. Die Bcl-2- und Bcl-x_L-Expression bleibt bei allen Zellen nach Apoptoseinduktion unverändert.

Alle Proben zeigen durch die Inkubation mit 1 und 10 μg/ml Epirubicin ein höheres p53-Expressionsniveau als in den unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ist in den MT-1-Zellen besonders ausgeprägt.

Tab. 3: Expression nach Epirubicinbehandlung

	MT-1	**MT-1/Adr**	**MT-1/Adr bak**	**MT-1/Adr bik**
p53	induziert	induziert	induziert	induziert
Bax	induziert	konstant	konstant	induziert
Bak	konstant	konstant	schwach induziert	schwach induziert
Bik	induziert	konstant	induziert	induziert
Bcl-2	konstant	konstant	konstant	konstant
Bcl-x_L	konstant	konstant	konstant	konstant

5.1.2.8. Messung von Sauerstoffradikalen im MT-1/Adr-Zellsystem

Bei den durchgeführten Apoptosemessungen wurden verschiedene Zytostatika verwendet, die unterschiedliche Wirkungsmechanismen aufweisen. In den eingesetzten Zellsystemen wurde die Resistenz von MT-1/Adr-Zellen gegenüber Epirubicin und Etoposid nachgewiesen. Mit der Überexpression von Bak und Bik konnte jedoch nur die Resistenz gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose überwunden werden. Deshalb wurde dem Problem nachgegangen, ob sich die Wirkungsmechanismen dieser beiden Chemotherapeutika und deren Beeinflussung durch Bak und Bik differenzieren lassen. Es ist bekannt, daß sowohl Etoposid als auch Anthrazykline wie Epirubicin ihre toxische

Wirkung neben der Inhibition der Topoisomerase II u. a. durch die Bildung DNA-schädigender Sauerstoffradikale ausüben. Daraufhin wurde der Anteil an Superoxid-radikalen mittels Färbung der Zellen mit Dihydroethidium (HE) nach Behandlung mit Epirubicin bzw. Etoposid am FACS im FL-3 Kanal gemessen. Als Nachweis für die Spezifität der Messung diente die Inhibition der Radikalbildung mit dem antioxidativen Reagenz N-Acetylcystein.

In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen analog zu den Apoptosemessungen ausplattiert und 48 h mit Epirubicin bzw. Etoposid inkubiert. Dabei wurden die Zytostatika-konzentrationen ausgewählt, bei denen ein unterschiedliches Apoptoseverhalten zwischen resistenten und sensitiven Zellen gemessen wurde. In der Abbildung 30a und b sind repräsentative Histogramme der MT-1/Adr-Transfektanten im Vergleich zu den maternalen Zellinien dargestellt. Man sieht sowohl mit Epirubicin als auch mit Etoposid einen deutlichen Shift in der Fluoreszenz, der im Falle von Epirubicin vollständig, im Falle von Etoposid teilweise gehemmt werden konnte.
Die Abbildung 30a zeigt, daß durch Epirubicininkubation in den sensitiven MT-1-Zellen und den Bak und Bik Transfektanten in gleichem Umfang zytotoxische Sauerstoffradikale generiert werden wie in den resistenten MT-1/Adr-Zellen und Kontroll-Klonen. Der oxidative Effekt während Epirubicin-induzierter Apoptose ist unabhängig von der Zytostatikasensitivität und der Expression von Bak und Bik/Nbk. Dagegen wird in der Abbildung 30b deutlich, daß bei den Etoposid-sensitiven MT-1 wesentlich mehr Zellen einen Fluoreszenzshift aufweisen als die gegenüber Etoposid resistenten MT-1/Adr-Zellen und deren Transfektanten.

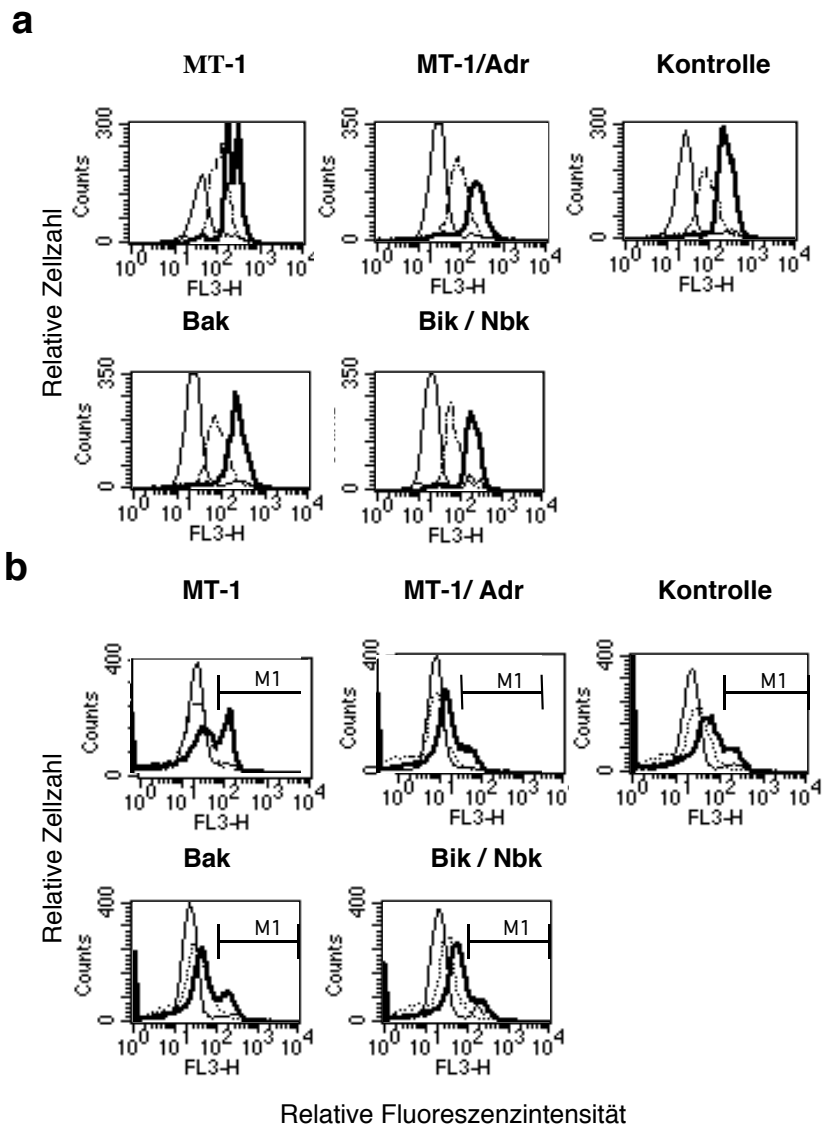


Abb.30: Messung reaktiver Sauerstoffspezies in MT-1/Adr-Zellen

Die Zellen wurden 48 h mit 2.5 µg/ml Epirubicin (a) oder mit 50 µg/ml Etoposid (b) bzw. mit diesen Zytostatika und N-Acetylcystein (15 mM) inkubiert. Dann wurden die Sauerstoffradikale durch Färbung von jeweils 1x10^5 Zellen mit Dihydroethidium (2 µM) am FACS gemessen. Die linke durchgezogene dünne Linie entspricht unbehandelten, die rechte dicke durchgezogene Linie Zytostatika-behandelten und die unterbrochene Linie Zytostatika und N-Acetylcystein behandelten Zellen. Die nur mit dem Vektor transfizierten Zellen wurden als Kontrolle bezeichnet.

5.2. Revertierung von Thermoresistenz

Für die Behandlung von Tumoren ist von besonderem Interesse, daß durch die Kombination von Hyperthermie mit Zytostatika bzw. ionisierender Strahlung verstärkt Apoptose ausgelöst werden kann (Gabai, et. Al., 1995). Unbekannt ist jedoch, warum Hyperthermie die Empfindlichkeit für Apoptoseinduktion steigern kann und in welchem Umfang die *bcl-2* Genfamilie durch die hypertherme Behandlung beeinflußt wird.
Deshalb wurde untersucht, ob die Überexpression des Zelltod-fördernden Bcl-2-Homologen Bak, die Sensitivität gegenüber Hyperthermie-induziertem Zelltod im Zellinienmodell erhöhen kann. Dazu stand das Magen-Karzinom-Zelliniensystem aus thermosensitiven EPG 85/257 (Wildtyp; wt) Zellen und der thermoresistenten Sublinie, die im Folgenden als EPG 85/257 wt/T bezeichnet wird, zur Verfügung.

5.2.1. Zelliniencharakterisierung

Mit dem MTT-Test wurde zunächst der Temperatur- und Zeitbereich ermittelt, in dem die Thermoresistenz des Zellsystems meßbar war. Dazu wurden die Zellen im Wasserbad einer Temperatur von 42°C bzw. 43°C ausgesetzt und anschließend 24 h, 48 h und 72 h unter den für diese Zellen üblichen Normalbedingungen von 38,4°C kultiviert.

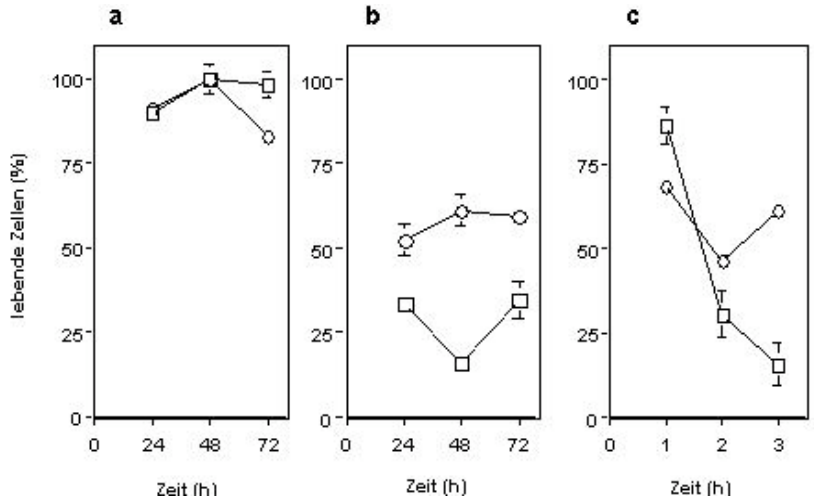


Abb. 31a-c: Vitalitätsbestimmung nach Hyperthermie mittels MTT-Test
Offene Quadrate: EPG 257/85 Wildtyp, offene Kreise: EPG 257/85-T (thermoresistent) Wildtyp,
(a) Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 42°C und 24 h, 48 h, 72 h inkubieren bei 38,4°C (b) Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 43°C und 24 h, 48 h, 72 h inkubieren bei 38,4°C (c) Hyperthermie der Zellen für 1 h, 2 h oder 3 h bei 43°C und 48 h inkubieren bei 38,4°C. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 8 Einzelwerten dargestellt.

In den Diagrammen der Abbildung 31 ist der prozentuale Anteil lebender Zellen (%) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 38,4°C nach der Hyperthermie (Abb. 31a und b) bzw. in Abhängigkeit von der Zeit der Hyperthermie (Abb. 31c) dargestellt. Man sieht, daß bei Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 42°C sowohl für die thermoresistenten als auch für die thermosensitiven Zellen nach 24 h Inkubieren bei 38,4°C noch 87 % der Zellen und nach 48 h noch 99 % der Zellen vital sind. Inkubieren der Zellen bei 38,4°C für 72 h nach Hyperthmie für 3 h bei 42°C ergab 98 % lebende Wildtyp Zellen und 80 % lebende thermoresistente Zellen (Abb. 31a).

Erst bei 43°C Hyperthermie wird der Unterschied zwischen thermoresistenten und thermosensitiven Zellen deutlich (Abb.31b, c). Nach Hyperthermie von 3 h bei 43°C lebten noch 61% der resistenten Zellen, dagegen nur noch 16 % Wildtyp-Zellen, während zwischen den beiden Zellinien nach 1 h bzw. nach 2 h Hyperthermie bei 43°C lediglich eine Differenz im Zelltod von 16 % bestand (Abb. 31c).

Nach 48 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C im Anschluß an die hypertherme Behandlung bei 43°C kristallisierte sich eine klare Differenz von 45 % zwischen sensitiven Wildtyp Zellen einerseits und thermoresistenter Sublinie andererseits heraus. Es wurden 16% lebende Wildtyp Zellen und 61% lebende resistente Zellen gemessen. Im Gegensatz dazu wurde nach 72 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C nur eine Differenz von 25 % bzw. nach 24 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C eine Differenz von 19 % ermittelt (Abb. 31b).

Für die weiteren Experimente mit dem vorliegenden Zellsystem aus Hyperthermie-sensitiven und -resistenten Magenkarzinom-Zellen wurden 3 h 43°C Wasserbad-Hyperthermie und anschließendes Inkubieren der Zellen bei 38,4°C für 48 h als Versuchsbedingungen eingesetzt.

5.2.2. Stabile Bak-Transfektanten einer thermoresistenten Zellinie

Es wurde die Temperatur-resistente Variante des Zellsystems wt/T mit dem Apoptose-förderer Bak mittels Elektroporation transfiziert. Analog zu den Mammakarzinom-Zellinien wurden stabile Transfektanten selektiert und die erhaltenen Klone mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinexpression getestet (Abb.32). In den thermosensitiven und -resistenten Ursprungszellinien wt und wt/T war kaum endogene Bak-Expression detektierbar. Es konnte eine deutliche Überexpression von Bak in den Klonen 6, 11, 12 und 14 im Vergleich zum Kontrollklon (pcDNA3 transfiziert) nachgewiesen werden.

Drei Bak überexprimierende Klone und ein Kontroll-Klon wurden für die zellbiologischen Untersuchungen eingesetzt.

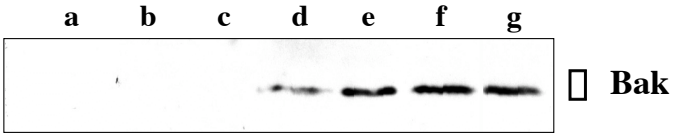


Abb. 32: Western-Blot-Analyse der Expression von Bak in thermoresistenten EPG 257/85 Magen-Karzinom-Transfektanten
Die Expression von Bak wurde mit dem monoklonalen Bak Antikörper (Klon TC 102) nachgewiesen.
(a) EPG 257/85 Wildtyp, (b) EPG 257/85-T (thermoresistent) Wildtyp, (c) EPG 257/85-T Kontroll-Klon 19, (d) EPG 257/85-T bak Klon 11, (e) EPG 257/85-T bak Klon 6, (f) EPG 257/85-T bak Klon 12, (g) EPG 257/85-T bak Klon 14

5.2.2.1. Viabilitätsbestimmung nach Hyperthermie

Die Transfektanten wurden mit dem bereits im Kapitel 5.2.1. beschriebenen MTT-Test charakterisiert, in dem zunächst die Versuchsbedingungen des Zellsystems optimiert wurden. Dazu wurden die Zellen für 1, 2 und 3 h einer Temperatur von 42°C bzw. 43°C ausgesetzt und anschließend 24 h, 48 h und 72 h unter den für diese Zellen üblichen Normalbedingungen von 38,4°C kultiviert.

In den Diagrammen der Abbildung 33a-c wurde der jeweils ermittelte Anteil lebender Zellen (%) dargestellt.

Man sieht, daß bei Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 42°C sowohl für die bak-überexprimierenden Zellen als auch für den Kontrollklon nach 24 h Inkubieren bei 38,4°C noch 98 % lebende Zellen ermittelt wurden. Inkubieren der Zellen bei 38,4°C für 48 h nach Hyperthmie für 3 h bei 42°C ergab 100 % lebende Zellen für den Kontrollklon und 85 % lebende Zellen für den Bak-Klon (Abb. 33a).

Erst bei 43°C Hyperthermie und 48 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen thermoresistenten und thermosensitiven Zellen. Der Kontrollklon verhielt sich ähnlich der resistenten Wildtyplinie mit 43 % lebender Zellen nach 2 h Hyperthermie und 51% nach 3 h 43°C Hyperthermie (Abb.33b). Dagegen reagierte der Bak Klon deutlich sensitiver auf Hyperthermie als die thermosensitive Wildtyp-Zellinie. Es lebten nach nur 1 h 43°C Hyperthermie nur noch 36 % Zellen, nach 2 h Hyperthermie 7 % Zellen. Dieser Wert blieb dann nach 3 h Hyperthermie mit 10 % lebender Zellen annähernd konstant.

Nach 48 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C im Anschluß an die Hyperthermie kristallisierte sich eine klare Differenz zwischen thermoresistenter Mutterlinie und

Kontrollklon einerseits und sensitiven Wildtyp Zellen und Bak-Transfektanten andererseits heraus. Für den Bak Klon wurden nur noch 10 % lebende Zellen im Vergleich zu 51 % lebenden Zellen beim Kontrollklon ermittelt (Abb. 33c). Die dargestellten Daten entsprechen Mittelwerten aus jeweils 8 Einzelmeßwerten.

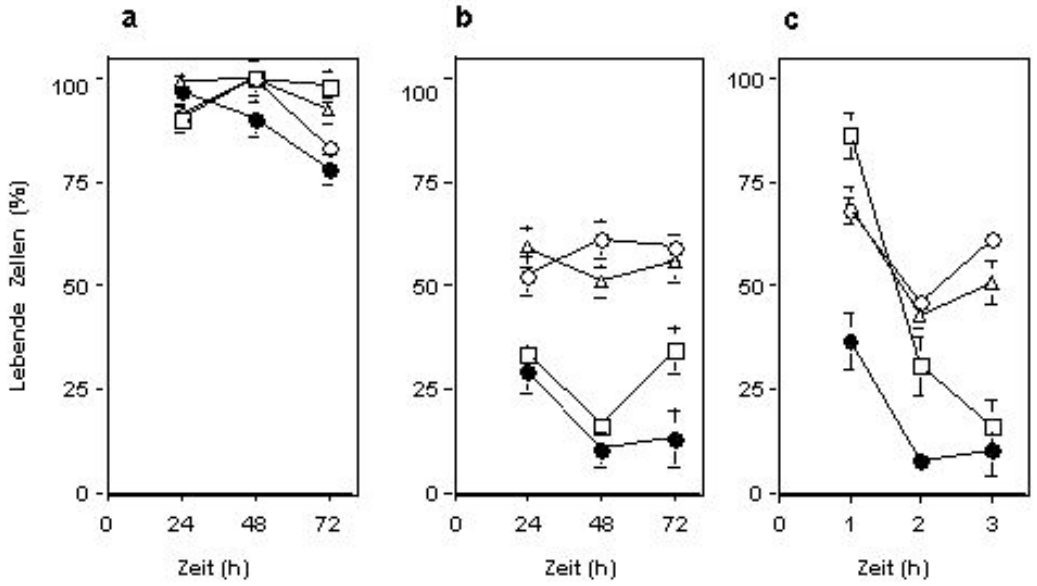


Abb. 33a-c: Viabilitätsbestimmung nach Hyperthermie mittels MTT-Test
Es entsprechen offene Quadrate: EPG 257/85 Wildtyp, offene Kreise: EPG 257/85-T (thermoresistent) Wildtyp, offene Dreiecke: EPG 257/85-T Kontrolle , schwarze Kreise: EPG 257/85-T Bak
(a) Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 42°C und 24 h, 48 h, 72 h inkubieren bei 38,4°C (b) Hyperthermie der Zellen für 3 h bei 43°C und 24 h, 48 h, 72 h inkubieren bei 38,4°C (c) Hyperthermie der Zellen für 1 h, 2 h oder 3 h bei 43°C und 48 h inkubieren bei 38,4°C. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 8 Einzelwerten dargestellt.

5.2.2.2. Messung von Hyperthermie-induzierter Apoptose

Es war zunächst unklar, ob der Prozeß der Apoptose oder Nekrose die Ursache für den gemessenen Effekt war. Als Merkmal der Apoptose wurde daher der Anteil fragmentierter DNA mittels der modifizierten Zellzyklusanalyse auf Einzelzellniveau gemessen. Die Abbildung 34 zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen nach 3 h Hyperthermie bei 43°C und Fixierung der Zellen nach weiteren 24 h Inkubieren der Zellen bei 38,4°C. Die Apoptose der unbehandelten Zellen lag unter 5 %. Bei den resistenten Zellen wurden 18 % bzw. 12 % Apoptose in den Kontrollzellen ermittelt. Dagegen reagierten die Bak-Transfektanten wesentlich sensitiver. Es wurden 35 % hypodiploide Zellen gemessen.

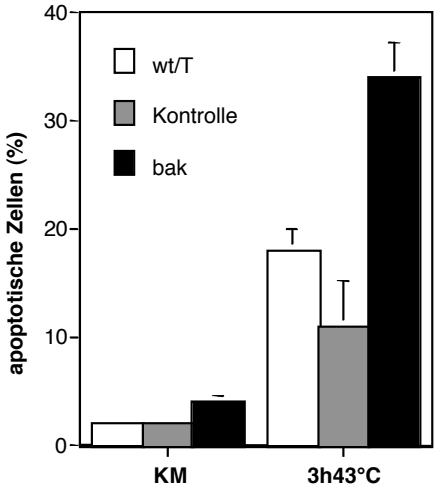
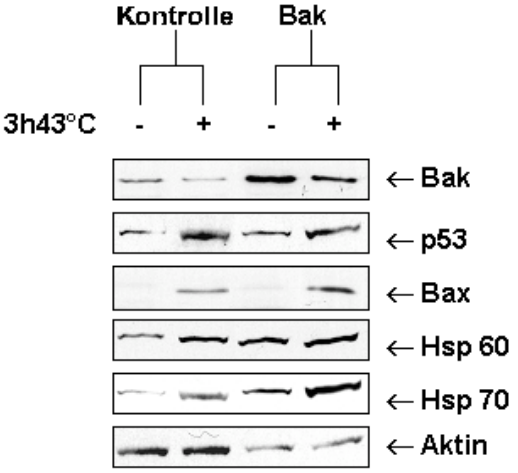


Abb. 34: Apoptosemessung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse nach Hitzeschock
Es entsprechen wt/T: EPG 257/85-T (thermoresistent) Wildtyp, Kontrolle: EPG 257/85-T Kontrolle, bak: EPG 257/85-T Bak.
Die Zellen wurden 3 h 43°C inkubiert, nach 24 h Zellkultur fixiert und der Anteil apoptotischer Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

5.2.2.3. Expression Hyperthermie- und Apoptose-assoziierter Proteine

Um festzustellen, ob Hyperthermie- und Apoptose-assoziierte Proteine aufgrund der Überexpression von Bak beeinflußt werden, wurden die Zellen eines Kontroll-Klons und eines Bak-Klons für 3 h einer Temperatur von 43°C ausgesetzt und nach 48 h die Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse ermittelt (Abb. 35).

Abb. 35: Western-Blot-Analyse Hitzeschock-assoziierter Proteine
Die Zellen der EPG 257/85-T-Kontroll- und Bak-Transfektanten wurden einem Hitzeschock von 3 h 43°C ausgestetzt, 48 h kultiviert und anschließend die Proteinexpression von Bak, p53, Bax,, Hsp 60, Hsp 70 und Aktin mittels Western-Blot bestimmt.



Der Nachweis der Aktin-Expression ermöglicht den Vergleich von behandelten mit unbehandelten Zellen. Die unbehandelten Bak-Transfektanten zeigen starke Überexpression von Bak gegenüber dem Kontrollklon. Nach Hyperthermie wird die Bak-Expression herunterreguliert, aber es existiert ein effektiv höheres Expressionsniveau des pro-apoptotischen Proteins Bak im Bak-Klon im Vergleich zum Kontroll-Klon. Die Expression von Bax und p53 als transkriptionellem Transaktivator von Bax wird in den Zellen in

gleichem Maße induziert. Die Hitzeschockproteine Hsp60 und Hsp70 werden sowohl in den thermoresistenten Kontrollzellen als auch in den thermosensitiven Bak-Zellen nach Hyperthermie von 43°C für 3 h induziert. Allerdings existiert in den unbehandelten Bak-überexprimierenden Klonen ein höheres Expressionsniveau von Hsp60 und Hsp70, verglichen mit dem Kontrollklon.

.