

**Überwindung der  
ABC-Transporter-vermittelten  
Chemoresistenz in  
Neuroblastomzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Florian Rothweiler  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2010  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Kreuter

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Cinatl

Datum der Disputation: 02.12.2010

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Professor Dr. J. Kreuter, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich auch beim Direktor des Institutes für Medizinische Virologie, Herr Professor Dr. H.W. Doerr, ausdrücklich bedanken, der mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und mir den Zugang zu allen benötigten Arbeitsmaterialien ermöglichte.

Desweiteren möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. J. Cinatl bedanken für die wissenschaftliche Ausarbeitung meines Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. M. Michaelis möchte ich mich ebenfalls bedanken für seine Betreuung im Laboralltag und die Anleitungen zum wissenschaftlichen Arbeiten. Er hatte immer ein offenes Ohr und ich verdanke ihm im Rahmen meiner Arbeit viele kluge Ratschläge.

Ein weiterer großer Dank geht an alle meine Kollegen im Labor. Da es so viele sind, sei stellvertretend für alle vor allem Marijke van Rikxoort genannt, mit der ich „unser“ Labor teilte. Dank der großartigen freundschaftlichen Atmosphäre hat das Arbeiten im Labor immer Spaß gemacht und dafür danke ich euch allen aus vollem Herzen.

Dem Verein “Hilfe für krebskranke Kinder, Frankfurt/Main e.V.” bzw. der “Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder der Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V.” gebührt mein Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren finanzielle Unterstützung weder mein Studium noch meine Promotion möglich gewesen wäre. Besonders in der Zeit des Schreibens waren sie immer für mich da und mir eine unschätzbare große Hilfe. Danke.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
I.1 Neuroblastom	7
I.2 Chemoresistenz	8
I.3 ABC-Transporter	9
I.4 Tumorsuppressor p53	14
I.5 Saquinavir/Saquinavir-NO	15
I.6 Nutlin-3	17
I.7 Zielsetzung der Arbeit	18
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
II.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
II.2 Chemikalien, Stoffe und andere Lösungen	20
II.2.1 Allgemeine Lösungen und Stoffe	20
II.2.2 Zellkultur	21
II.2.3 Viabilitätsassay (MTT-Test)	22
II.2.4 Quantitative Real-time PCR	22
II.2.5 Färbung der ABC-Transporter	23
II.2.6 Untersuchung des Effluxes von ABC-Transportern	24
II.2.7 ATPase-Assay	24
II.2.8 Transduktion mit lentiviralen Vektoren	25
II.2.9 Western Blot	26
II.3 Verwendete Zellen	28
II.4 Viabilitätsassay (MTT-Test)	32
II.5 Quantitative Real-Time PCR	33
II.5.1 Probenextraktion und RNA-Isolierung	33
II.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	34
II.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	35
II.5.4 Quantitative real-time PCR (RTq-PCR)	36
II.6 Färbung auf ABC-Transporter am Durchflusszytometer	38
II.6.1 Färbung auf MDR1	39
II.6.2 Färbung auf BCRP1	39

II.7 Untersuchung des Effluxes von ABC-Transporter-Substraten am Durchflusszytometer	40
II.7.1 Einfacher Assay	40
II.7.2 Kinetik (Wash Out)	41
II.7.3 Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes für MDR1	41
II.8 Bestimmung der ATPase-Aktivität von MDR1	42
II.9 Transduktion mit lentiviralen Vektoren	44
II.9.1 Herstellung der lentiviralen Partikel	45
II.9.2 Titration der lentiviralen Vektoren	47
II.9.3 Transduktion der Zielzellen	49
II.10 Fluoreszenzmikroskopie	49
II.11 Western Blot	49
II.11.1 Proteinextraktion und Messung des Proteingehaltes	50
II.11.2 Gelelektrophorese	51
II.11.3 Western Blot und Immunhistochemischer Proteinnachweis	52
II.12 Auftrennung des Racemats Nutlin-3 in seine Enantiomere	53
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
III.A Saquinavir und Saquinavir-NO	54
III.A.1 Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die Zellviabilität	54
III.A.2 Rolle von p53	55
III.A.3 Überwindung der MDR-1 vermittelten Chemoresistenz durch Saquinavir und Saquinavir-NO	58
III.A.4 Überprüfung des Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter MDR1 mit Hilfe der MDR1-transduzierten Zelllinie UKF-NB-3 <sup>MDR1</sup>	62
III.A.5 Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den MDR1 vermittelten Efflux von Rhodamin 123	67
III.A.6 Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von Saquinavir und Saquinavir-NO für den MDR1-vermittelten Efflux von R123	70
III.A.7 Saquinavir und Saquinavir-NO sind Substrate für MDR1	70
III.A.8 Überprüfung des Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter BCRP1 mit Hilfe der BCRP1-transduzierten Zelllinie UKF-NB-3 <sup>BCRP1</sup>	73

III.B Nutlin-3	78
III.B.1 Einfluss von Nutlin-3 auf die Zellviabilität	78
III.B.2 Induktion von p53-Zielgenen	79
III.B.3 Kombination von Nutlin-3 und Zytostatika	80
III.B.4 Einfluss von Nutlin-3 auf MDR1	83
III.B.5 Einfluss von Nutlin-3 auf den ABC-Transporter vermittelten Efflux von Fluoreszenzsubstraten	87
III.B.6 Nutlin-3 ist ein Substrat für MDR1	91
III.B.7 Einfluss der Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin 3b auf MDR1	93
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>96</b>
IV.A Saquinavir und Saquinavir-NO	96
IV.B Nutlin-3	102
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>121</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN</b>	<b>123</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>124</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>125</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>125</b>

## I. Einleitung

### I.1 Neuroblastom

Das Neuroblastom stellt mehr als 7 % aller bösartigen Tumore in Patienten unter 15 Jahren und ist für knapp 15 % aller tumorbedingten pädiatrischen Todesfälle verantwortlich (Maris et al, 2007). Es ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter und zeichnet sich vor allem durch seine große klinische Bandbreite aus (Peddinti et al, 2007).

Das Neuroblastom ist eine Krankheit des sympathiko-adrenalen Stranges der Neuralleiste. Daher kann ein Neuroblastom überall entlang des Sympathikusstranges entstehen (Maris et al, 2007). Im Embryo wandern unreife Nervenzellen (Neuroblasten) aus, lagern sich entlang des sympathischen Grenzstranges an und können im Kleinkindalter zur Ausbildung eines Neuroblastoms führen. Primäre Tumore finden sich dementsprechend vor allem im Abdomen, hier besonders im Nebennierenmark. Weitere Orte sind Hals, Brust- und Beckenraum (Brodeur und Maris, 2006). Die klinisch auffallenden Symptome sind abhängig von der Primärtumorlokalisation und somit sehr heterogen. Zum Teil wird ein Neuroblastom rein zufällig z.B. mittels Kernspintomographie oder Ultraschall diagnostiziert, während der Anlass für die Untersuchung eine andere Verdachtsdiagnose war (Maris et al, 2007).

Um die klinische Einstufung des diagnostizierten Neuroblastoms zu vereinheitlichen, wurde das „International Neuroblastoma Staging System (INSS)“ etabliert (Brodeur et al, 1993). Es findet vor allem in Europa und Nordamerika Anwendung. Dabei richtet sich die Einteilung sowohl nach histologischen als auch nach molekularbiologischen Aspekten.

Im INSS werden folgende Stadien unterschieden:

INSS Stadium 1: Lokalisierter Tumor auf Ursprungsort begrenzt.

INSS Stadium 2A: Lokalisierter Tumor infiltriert Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten, kein Lymphknotenbefall.

INSS Stadium 2B: Lokalisierter Tumor infiltriert Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten, homolateraler Lymphknotenbefall.

INSS Stadium 3: Tumor überschreitet Mittellinie, regionale Lymphknoten können beidseits befallen sein.

INSS Stadium 4: Hämatogene Fernmetastasen.

INSS Stadium 4-S: wie 1 oder 2, aber mit Fernmetastasen in Leber, Haut; darf dabei nur minimal auf das Knochenmark übergreifen; tritt nur im Säuglingsalter auf und kann sich spontan zurückbilden.

INSS Stadium 1-4 stellt den Fortgang der Tumorerkrankung dar, in deren Verlauf es zur Infiltration des umliegenden Gewebes kommt. Später kommen Lymphknotenbefall und im INSS Stadium 4 hämatogene Fernmetastasen dazu.

INSS Stadium 4S ist ein Sonderfall, der in ca. 5 % aller Fälle vorkommt und bei dem es oft zur Spontanremission kommen kann (Maris et al, 2007).

Die Hälfte aller Neuroblastompatienten wird erst im INSS Stadium 4 diagnostiziert (*high risk patients*). Hier ist die Krankheit am weitesten fortgeschritten. In diesem Stadium werden Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie oft kombiniert. Ebenfalls können autologe Knochenmarkstammzellen transplantiert werden (*autologous stem cell rescue*; ASCR). Bei Kombination der Knochenmarkstransplantation mit einer hochdosierten Chemotherapie (*high dose chemotherapy*; HDCT) spricht man von HDCT/ASCR (Suh et al, 2009).

Trotz dieser intensiven multimodalen Therapie ist der Therapieerfolg sehr beschränkt und die Überlebensrate liegt bei unter 40 % (Jadhav und Mohanam, 2006; Maris et al, 2007).

Während der Chemotherapie kann der Tumor eine Chemoresistenz erwerben. Die erworbene Chemoresistenz ist bei Neuroblastomen einer der häufigsten Gründe für ein Therapieversagen (Maris et al, 1999; Nobili et al, 2006). Bei Neuroblastoma entwickelt sich bei einem Großteil der Patienten mit einem INSS Stadium 4 Neuroblastom eine Chemoresistenz. Dies führt auch bei einem ursprünglich chemosensitiven Tumor zum Rückfall und eventuell zum kompletten Versagen der Therapie (Keshelava et al, 1998).

### **I.2 Chemoresistenz**

Über die Hälfte aller Krebspatienten werden mittels Chemotherapie behandelt. Dabei kommen abhängig von Tumor und Lokalisation verschiedene Zytostatika zum Einsatz. Der stärkste limitierende Faktor bei der Chemotherapie ist eine Zytostatikaresistenz, auch Chemoresistenz oder *drug resistance* genannt (Nobili et al, 2006). Manche Tumore weisen von sich aus schon vor Beginn der Therapie eine Chemoresistenz auf (intrinsische Chemoresistenz), während andere Tumore im Laufe der Therapie eine Chemoresistenz entwickeln (erworbene Chemoresistenz; Nobili et al, 2006). Dabei ist die erworbene Chemoresistenz besonders problematisch, da der Tumor nicht nur gegen das eingesetzte Zytostatikum resistent wird, sondern auch eine Kreuzresistenz gegen andere Zytostatika entwickeln kann, die sich sowohl in ihrer chemischen Struktur als auch in ihren Wirkmechanismen unterscheiden können. Dieses Phänomen wird als *multi drug resistance* (MDR) bezeichnet (Longley und Johnston, 2005; Nobili et al, 2006).



Die Mechanismen, die einer Chemoresistenz zu Grunde liegen, sind sehr vielfältig und komplex. Hier spielen Faktoren wie Pharmakokinetik, Mikrostruktur des umliegenden Tumorgewebes und andere Eigenschaften des jeweiligen Tumors eine Rolle (Longley and Johnston, 2005).

Es lassen sich jedoch zwei grundlegende Mechanismen unterscheiden: pharmakokinetische Veränderungen (Aufnahme, Metabolismus und Ausscheidung der Zytostatika; *drug delivery*) und Veränderungen/Mutationen in den Tumorzellen direkt (Gottesman et al, 2002).

Zytostatika werden oft systemisch verabreicht und Veränderungen in Absorption, ein erhöhter Metabolismus und eine erhöhte Ausscheidung führen zu einem geringeren Plasmalevel des jeweiligen Zytostatikums. Dadurch wird die Diffusion aus der Blutbahn in die Tumormasse erschwert. Zusätzlich kann der Tumor in Teilen des Körpers lokalisiert sein, die für Zytostatika generell schwer zugänglich sind (z.B. Blut-Hirn-Schranke) (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006).

In Tumorzellen kann eine auftretende Chemoresistenz durch unterschiedliche Mechanismen bedingt sein. Die Aufnahme (Influx) des jeweiligen Zytostatikums kann verringert bzw. der Austransport (Efflux) erhöht sein. Veränderungen im zellulären Metabolismus führen zu erhöhtem Abbau bzw. zu einer verminderten Aktivierung des Zytostatikums. Der Zielort des Zytostatikums kann verändert sein oder zelluläre Reparaturmechanismen werden überexprimiert (Nobili et al, 2006).

Im Rahmen der *multi drug resistance* spielt vor allem ein erhöhter Efflux und somit eine verringerte Akkumulation von Zytostatika in der Zelle eine entscheidende Rolle (Gottesman et al, 2002; Nobili et al, 2006; Wilson et al, 2006). Ein erhöhter Efflux wird oft durch Überexpression verschiedener ATP-abhängiger Transporter gewährleistet, die als ABC-Transporter bezeichnet werden (*ATP-binding cassette* (ABC) Transporter)(Gottesman et al, 2002; Nobili et al, 2006).

### I.3 ABC-Transporter

ABC-Transporter zeichnen sich durch ihre ATP-Bindungsdomäne aus (*ATP-binding cassette*) und transportieren unter ATP-Verbrauch unterschiedliche Substanzen durch die Zellmembran (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006; Wilson et al, 2006). Dazu gehören Aminosäuren, Lipide, anorganische Ionen, Peptide, Saccharide, Proteine und unterschiedliche Arzneistoffe (Zhou et al, 2008). ABC-Transporter spielen eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Detoxifikation der Zelle und werden in fast allen humanen Geweben exprimiert (Zhou et al, 2008).

Beim Menschen sind 49 verschiedene ABC-Transporter bekannt, die in 7 Subfamilien unterteilt werden (A-G). Die Subfamilien werden ABCA bis ABCG benannt. Die Bezeichnungen richten sich nach den Vorgaben der *Human Genome Organisation* (HUGO; <http://www.genenames.org/genefamily/abc.html>).

Die meisten ABC-Transporter bestehen aus 2 Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und 12 transmembralen Domänen (TMD) (Zhou et al, 2008). Die NBDs stellen die intrazellulären Bindestellen für ATP dar, während sich die Bindestellen für die transportierten Substrate in den TMDs befinden (Nobili et al, 2006). Manche Transporter liegen nur als „halbes Set“ vor, das heißt mit einer NBD und 6 TMDs, die bei Aktivierung zu einem „vollständigen“ Transporter dimerisieren (Szakács et al, 2006).

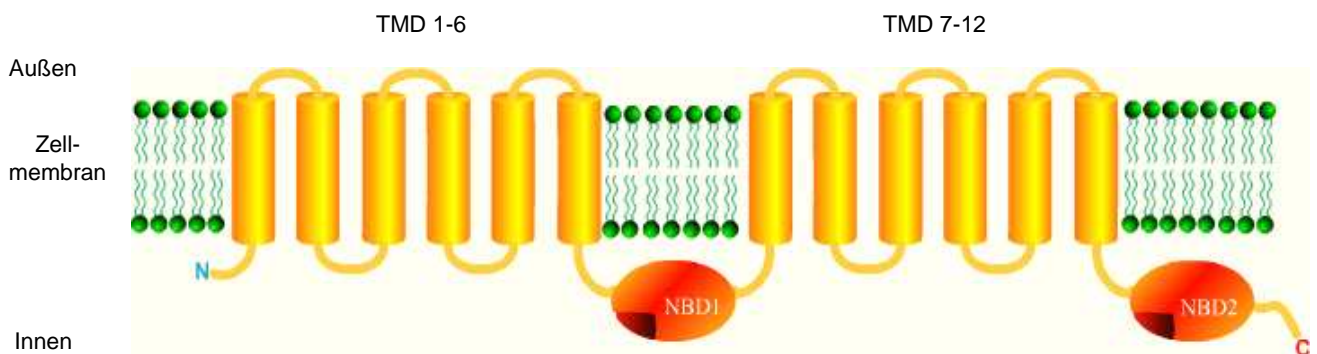


Abbildung I.3.1: Struktur des ABC-Transportes MDR1. TMD: transmembrale Domänen 1-6 und 7-12; NBD: Nukleotidbindungsdomäne 1 und 2; N: N-Terminus; C: C-Terminus (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

Der am besten untersuchte ABC-Transporter ist MDR1, auch als P-gp (P-glycoprotein) bezeichnet (Nobili et al, 2006). Nach HUGO gehört MDR1 zur ABCB-Subfamilie und wird als ABCB1 bezeichnet. MDR1 besteht aus 1280 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht von 170 kDa. MDR1 entspricht dem klassischen Modell eines ABC-Transporters. Er besteht aus 12 TMDs und 2 NBDs (siehe Abbildung I.3.1).

MDR1 war der erste beschriebene humane ABC-Transporter (Dano, 1973; Juliano und Ling, 1976) und wurde als erster humaner ATP-Transporter kloniert und vollständig charakterisiert (Chen et al, 1986). MDR1 transportiert vor allem hydrophobische Substanzen, die neutral oder positiv geladen sein können, aus der Zellmembran in den extrazellulären Raum. MDR1 ist im Intestinum, in Leber und Niere, in der Plazenta und in der Blut-Hirn-Schranke zu finden (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006).

Eine weitere wichtige Subfamilie innerhalb der ABC-Transporter ist die ABCC-Subfamilie. Diese Transporter werden auch als MRPs bezeichnet (*multidrug-resistance-associated protein*). Ihre Struktur ähnelt der von MDR1, allerdings besitzen manche MRPs am N-Terminus 5 weitere transmembrale Domänen, so dass sie insgesamt aus 17 TMDs bestehen (Gottesman et al, 2002). Ein wichtiger Vertreter dieser Subfamilie ist MRP1, der aus 17 TMDs besteht. In Abbildung I.3.2 ist die Struktur von MRP1 der Struktur von MDR1 gegenübergestellt.

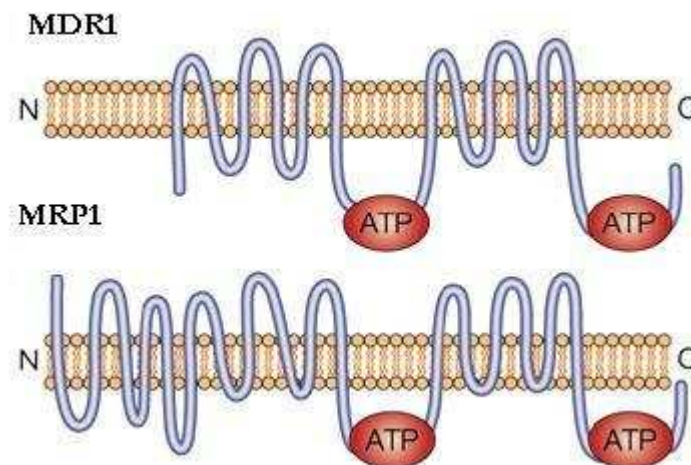


Abbildung I.3.2: Vergleich der Strukturen von MDR1 mit 12 transmembralen Domänen und 2 Nukleotidbindestellen und MRP1 mit 17 transmembralen Domänen und 2 Nukleotidbindestellen. ATP: Nukleotidbindestelle für ATP. N: N-Terminus. C: C-Terminus. (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

MRP1 wird nach HUGO auch als ABCC1 bezeichnet und wurde 1992 erstmals beschrieben (Cole et al, 1992). Der ABC-Transporter hat ein Molekulargewicht von 190kDa und besteht aus 1531 Aminosäuren (Borst et al, 2000). MRP1 wird in fast allen humanen Geweben exprimiert und transportiert ähnlich wie MDR1 neutrale hydrophobische Substanzen, allerdings auch negativ geladene hydrophobische Substrate (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006; Zhou et al, 2008).

Ein wichtiger ABC-Transporter, der als „halber Transporter“ vorliegt, ist BCRP1 (*breast cancer resistance protein*). Die Bezeichnung *breast cancer resistance protein* ist irreführend, da die Expression von BCRP1 weder auf Brustgewebe noch auf auch Tumorzellen beschränkt ist (Staud und Pavek, 2005). Nach HUGO wird BCRP1 als ABCG2 bezeichnet. BCRP1 ist vor allem durch seine

Fähigkeit, das Zytostatikum Mitoxantron zu transportieren, charakterisiert und wird deswegen auch als MXR bezeichnet (Gottesman et al, 2002; Miyake et al, 1999)

BCRP1 wurde erstmals 1998 beschrieben (Allikmets et al, 1998; Doyle et al, 1998). Der halbe Transporter besteht aus einer N-terminalen cytosolischen Nukleotidbindungsdomäne, gefolgt von 6 transmembralen Domänen (Staud und Pavek, 2005; siehe Abbildung I.3.3). BCRP1 besteht aus 655 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 72 kDa (Staud und Pavek, 2005).

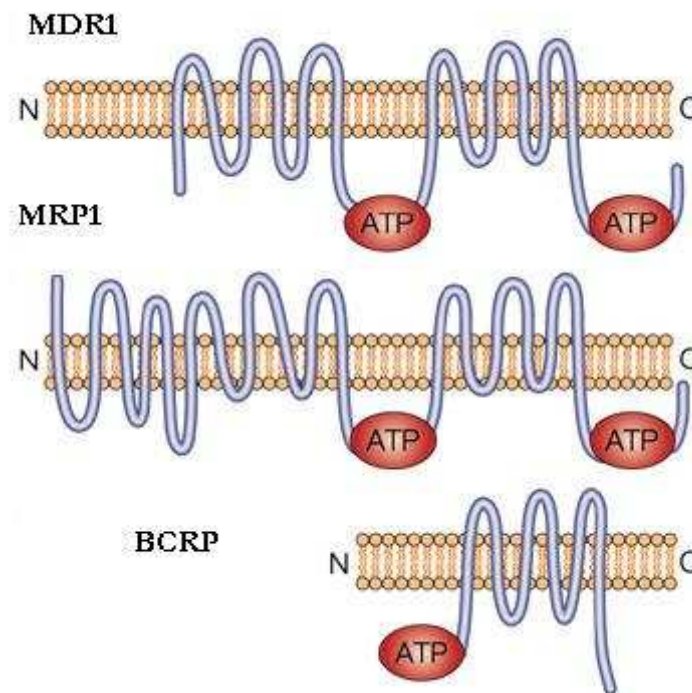


Abbildung I.3.3: Vergleich der ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP1. Im Unterschied zu MDR1 und MRP1 besteht BCRP1 nur aus 6 transmembralen Domänen und 1 Nukleotidbindestelle („halber Transporter“). ATP: Nukleotidbindestelle für ATP. N: N-Terminus. C: C-Terminus. (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

BCRP1 besitzt laut Literatur eine überlappende Substratspezifität mit MDR1 (Doyle und Ross, 2003; Litman et al, 2000; Staud und Pavek, 2005). BCRP1 wird vor allem in der Plazenta, in der Niere, im Intestinum und in der Leber exprimiert (Gupta et al, 2004; Staud und Pavek, 2005).

Eine erworbene Chemoresistenz ist wie schon unter I.2 erwähnt häufig eine Folge der Überexpression verschiedener ABC-Transporter. (Gottesman et al, 2002; Nobili et al, 2006; Wilson et al, 2006). Dabei kommt es zu einem stark erhöhten Efflux von Zytostatika. Im Rahmen der erworbenen Chemoresistenz nimmt MDR1 eine herausragende Stellung ein, da es

eine Vielzahl von Zytostatika aus der Zelle transportieren kann (Szakács et al, 2006). Die Zelle ist somit durch die Überexpression von MDR1 gegen eine Vielzahl von Zytostatika resistent (*multi-drug resistance*). Auch die ABC-Transporter MRP1 und BCRP1 spielen bei der erworbenen Chemoresistenz eine Rolle (Borst et al, 2000; Gottesmann et al, 2002; Staud und Pavék, 2005; Szakacs et al, 2006).

Für Neuroblastoma wurde beschrieben, dass eine erworbene Chemoresistenz oft mit der Überexpression der ABC-Transporter MDR1 und MRP1 in Zusammenhang steht (Bader et al, 1999; Bates et al 1991; Haber et al, 2000; Munoz et al, 2007; Norris et al, 1996, Pajic et al, 2005). So konnte gezeigt werden, dass MDR1 und MRP1 nach einer Chemotherapie stärker exprimiert werden als vor der Chemotherapie (Oue et al, 2009). Auch für Neuroblastoma im fortgeschrittenen Stadium konnte die Expression von MDR1 und MRP1 nachgewiesen werden (de Cremoux et al, 2007). Es wurde auch über eine Korrelation zwischen schlechtem Ausgang der Behandlung und hoher Expression von MRP1 berichtet (Haber et al, 2006). In einer aktuellen Studie wurde die Expression von MDR1, MRP1 und BCRP1 in primären Neuroblastoma nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der untersuchten Neuroblastoma mindestens 2 der untersuchten ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP1 exprimierten (Pituch-Noworolska et al, 2009).

Der Calciumkanalblocker Verapamil wurde als eine der ersten Substanzen beschrieben, die eine MDR1-vermittelte Chemoresistenz überwinden können (Tsuruo et al, 1981). Später wurde gezeigt, dass Verapamil direkt von MDR1 gebunden und transportiert wird (Yusa und Tsuruo, 1989). Im Laufe der Jahre wurden immer bessere und spezifischere ABC-Transporter-Inhibitoren entdeckt und entwickelt. Einige dieser ABC-Transporter-Inhibitoren zeigten in klinischen Studien auch klare Verbesserung der Therapieerfolge. Allerdings zeigten die meisten ABC-Transporter-Inhibitoren keine großen Erfolge oder die Studien mussten wegen zu starker Nebenwirkungen frühzeitig abgebrochen werden (für eine Auswahl siehe Szakács et al, 2006; Nobili et al, 2006). Mit Hilfe dieser Studien erhält man aber detailliertere Kenntnisse über Funktion, Bindungseigenschaften und Substratspezifität der einzelnen ABC-Transporter. Die weitere Erforschung von neuen ABC-Transporter-Inhibitoren wird dadurch stetig verbessert.

## I.4 Tumorsuppressor p53

p53 ist ein 53 kDa großer Transkriptionsfaktor, der als Tumorsuppressor fungiert. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ca. 30 min. ist p53 nur in geringen Mengen in der Zelle präsent (Tweddle et al, 2003). Im Zytosol liegt p53 gebunden an MDM2 (*murine double minute 2*) und MDM4 (*murine double minute 4*) vor. Zur Aktivierung von p53 müssen MDM2 und MDM4 abgebaut werden (Meek, 2009).

Bei fehlerhafter DNA-Replikation oder induzierten Schäden an der DNA werden MDM2 und MDM4 durch ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*) abgebaut und p53 liegt in aktiver Form vor (Meek, 2009). Im weiteren Verlauf transloziert p53 in den Zellkern und akkumuliert dort. In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor reguliert p53 anschließend die Expression diverser Gene und reguliert verschiedene Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose (programmierter Zelltod) und Differenzierung (Vogelstein et al, 2000). Zusätzlich induziert p53 die Expression von MDM2 und reguliert somit in einer negativen Rückkopplungsschleife seine eigene Funktionalität (Tweddle et al, 2003; van Maerken et al, 2006).

In fast allen humanen Tumoren ist p53 mutiert oder in seiner Funktion gestört (Meek, 2009). Im Neuroblastom findet man im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren nur in knapp 2 % der Fälle eine Mutation von p53. In einer vergleichenden Studie mit Neuroblastomzelllinien in unterschiedlichen INSS-Stadien wurde gezeigt, dass in therapienaiven Neuroblastomzelllinien p53 überwiegend im Kern lokalisiert und funktional ist (Chen et al, 2007).

Die Mehrheit von festgestellten p53-Mutationen wurde in fortgeschrittenen Neuroblastomen bzw. in Rezidiven festgestellt (Tweddle et al, 2003). Bei einem Vergleich von Gewebeproben aus einem Patienten vor und nach einer Chemotherapie wurde in den Proben nach Chemotherapie eine Mutation im p53-Gen festgestellt (Tweddle et al, 2001). In den meisten Fällen zeigen Neuroblastomzelllinien mit mutiertem p53 eine stärker ausgeprägte Chemoresistenz als Neuroblastomzelllinien mit Wildtyp-p53. (Keshelava et al, 2000). Auch der Funktionsverlust von p53 (*loss of function*) führt in Neuroblastomzellen zu einer Chemoresistenz (Keshelava et al, 2000). Für Neuroblastomzelllinien wurde auch eine Inaktivierung von p53 durch eine MDM2-Überexpression berichtet. Auch hier kommt es zum verstärkten Auftreten einer Chemoresistenz (Tweddle et al, 2003).

## I.5 Saquinavir/Saquinavir-NO

Saquinavir wurde 1993 als erster HIV-Protease-Inhibitor (HIV-PI) zugelassen und ermöglichte Kombinationstherapien in der Behandlung von HIV (la Porte, 2009). In Abbildung I.5.1 ist seine chemische Struktur dargestellt.

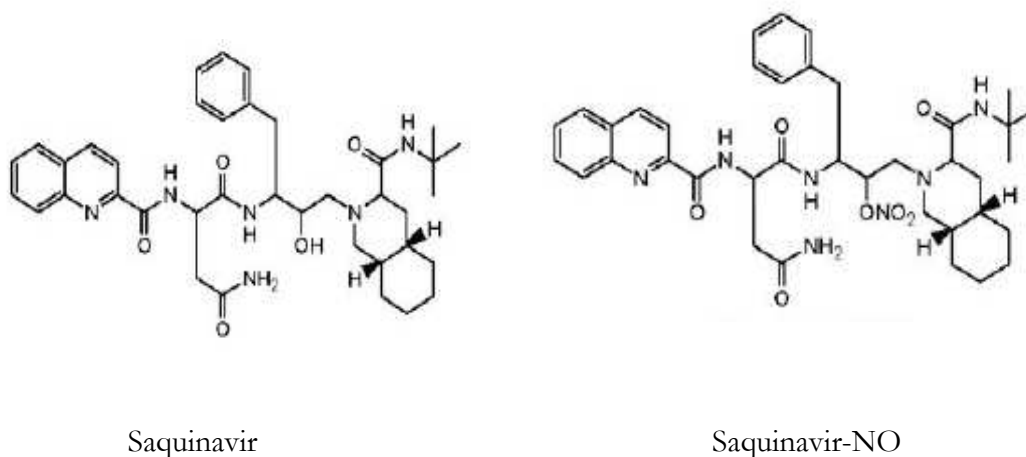


Abbildung I.5.1: Chemische Struktur von Saquinavir und Saquinavir-NO (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

Alle HIV-Protease-Inhibitoren (z.B. Nelfinavir, Indinavir, Ritonavir, Lopinavir) binden die katalytische Domäne der HIV-Aspartyl-Protease und verhindern so die Bildung von neuen infektiösen viralen Partikeln (Deeks et al, 1997). Da Proteasen aber auch an vielen Zellprozessen beteiligt sind, werden durch HIV-PIs auch andere physiologische Prozesse beeinträchtigt (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Für viele HIV-PIs, inklusive Saquinavir, wurden mehrfach antitumorale Effekte beschrieben (Chow et al, 2006; Gills et al, 2007; Ikezoe et al, 2000; Pajonk et al, 2002; Sgadari et al, 2003). HIV-PIs sensibilisieren Tumorzellen auf Bestrahlung (Cuneo et al, 2007; Gupta et al, 2005), verstärken die Wirkung von antitumoralen Substanzen (Ikezoe et al, 2004) und zeigen antiangiogenes Potential (Sgadari et al, 2002).

Zusätzlich wurde für viele HIV-PIs beschrieben, dass sie mit ABC-Transportern interagieren. Saquinavir wurde bereits als Substrat für MDR1 (Lee et al, 1998; Washington et al, 1998) und für MRP1 (Williams et al, 2002) beschrieben. Es wurde auch ein Einfluss von Saquinavir auf BCRP1 beschrieben (Weiss et al, 2007). Im Unterschied zu MDR1 fungiert Saquinavir als Inhibitor für BCRP1 (Gupta et al, 2004). Mehrere Studien zeigen, dass die Aufnahme von Saquinavir durch MDR1 (Eilers et al, 2008; Kim et al, 1998; Ronaldson et al, 2004; Usansky et al, 2008) und MRPs (Eilers et al, 2008; Usansky et al, 2008) beeinträchtigt wird.

Alle HIV-PIs weisen starke Nebenwirkungen auf, z.B. Hyper- und Hypolipidämie, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetis, Körperfettumverteilungen, Osteopenie und Osteoporose (Powderly, 2002). Dies nahm eine Arbeitsgruppe von der Universität Belgrad zum Anlass, bei Saquinavir eine Hydroxylgruppe durch eine Nitritoxidgruppe zu ersetzen (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Sie beriefen sich dabei auf andere Arbeiten, in denen über verbesserte pharmakologische Eigenschaften und geringere Toxizität durch Einführung einer Nitritoxidgruppe in bereits bekannte Wirkstoffe berichtet wurde (Rigas und Kashfi, 2004; Yeh et al, 2004).

Die neue Substanz Saquinavir-Nitritoxid (Saquinavir-NO; siehe Abbildung I.5.1) reduzierte die Viabilität von Tumorzellen stärker als die Ausgangssubstanz Saquinavir. Gleichzeitig zeigte Saquinavir-NO kaum Einfluss auf primäre Zellen (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Auch im Tierversuch bildeten sich unter Behandlung mit Saquinavir-NO deutlich weniger Tumore aus als bei Behandlung mit Saquinavir. Die Versuchstiere zeigten bei Behandlung mit Saquinavir Gewichtsverlust und z.T. starke Entzündungen. Bei Saquinavir-NO behandelten Mäusen konnten keine Anzeichen von Toxizität festgestellt werden (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Die Autoren schließen die Freisetzung von Nitritoxid als antitumoralen Mechanismus aus und vermuten, dass Saquinavir-NO stark zytostatisch wirkt (Maksimovic-Ivanic et al, 2009).

Zusätzlich wurde für Saquinavir und Saquinavir-NO eine Verstärkung der p53-Expression beschrieben (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Bei dem HIV-Protease-Inhibitor Nelfinavir wurde eine p53-Aktivierung in Zusammenhang mit der antitumoralen Aktivität von Nelfinavir gebracht (Yang et al, 2006). Für HIV-Protease-Inhibitoren wurden aber auch antitumorale Effekte an Tumorzellen beschrieben, die eine p53-Mutation aufweisen (Chow et al, 2009; Pajonk et al, 2002). Im Gegensatz zu Saquinavir ist bei Saquinvir-NO noch nicht bekannt, ob und wie weit es mit ABC-Transportern interagiert. Diese Arbeit wurde zum Anlass genommen, zum ersten Mal den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf ABC-Transporter am Model von chemoresistenten Neuroblastomzellen zu untersuchen und zu vergleichen. Saquinavir-NO wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Ferdinando Nicoletti, Abteilung Biomedizinische Wissenschaften der Universität Catania (Italien), zur Verfügung gestellt.



## I.6 Nutlin-3

Nutlin-3 gehört zu den cis-Imidazolin-analoga und wurde zum ersten Mal von Vassilev beschrieben (Vassilev et al, 2004). Die chemische Struktur ist in Abbildung I.6.1 dargestellt.

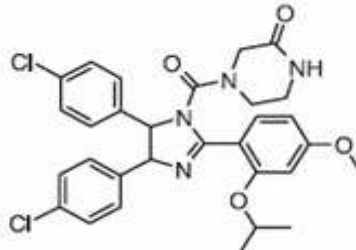


Abbildung I.6.1: Chemische Struktur von Nutlin-3 (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

Nutlin-3 wurde spezifisch als MDM2-Antagonist entwickelt und synthetisiert (Vassilev et al, 2004). Nutlin-3 greift in die Interaktion zwischen dem Tumorsupressorgen p53 und seinem physiologischen Inhibitor MDM2 ein. MDM2 bindet p53 mit hoher Affinität und inaktiviert es (siehe auch I.4). Nutlin-3 bindet in der p53-Bindetasche an MDM2. Dadurch kann MDM2 nicht mehr sein physiologisches Substrat p53 binden. Der p53-Signalweg ist wieder aktiviert und kann Apoptose und/oder Zellzyklusarrest induzieren (Shangary und Wang, 2009; Vassilev et al, 2004). Nutlin-3 befindet sich als nicht-toxischer Aktivator des p53 Signalweges in der präklinischen Phase I (Vassilev, 2007).

Nutlin-3 zeigte neben der beschriebenen antitumoralen Aktivität auch ein antiangiogenes Potential (Secchiero et al, 2007 a).

In chemosensitiven Neuroblastomzellen mit Wildtyp-p53 zeigte die Behandlung mit Nutlin-3 antiproliferative und zytotoxische Effekte (van Maerken et al, 2006). Zusätzlich erhöhte sich durch Nutlin-3 die Sensibilität gegenüber der zytostatikavermittelten Apoptose (Barbieri et al, 2006).

Dabei beschränkt sich die anti-tumorale Wirkung von Nutlin-3 nicht nur auf Zellen mit normalem p53 (Wildtyp). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Nutlin-3 auch in humanen p53-negativen und p53-mutierten Krebszellen in Kombination mit Zytostatika antitumorale Effekte aufweist (Ambrosini et al, 2007)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Nutlin-3 alleine und in Kombination mit Zytostatika an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen untersucht, die Unterschiede in der MDR1-Expression zeigen. Zusätzlich wurden Zellen mit einer p53-Mutation verwendet.

## I.7 Zielsetzung der Arbeit

Eine erworbene Chemoresistenz ist der häufigste Grund für das Versagen einer Chemotherapie. Bei der Vermittlung einer Chemoresistenz spielt die Überexpression von ABC-Transporter eine wichtige Rolle. In Neuroblastoma wird die Überexpression der ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP1 mit einer auftretenden Chemoresistenz in Zusammenhang gebracht (siehe I.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Nutlin-3, Saquinavir und Saquinavir-NO auf chemosensitive und chemoresistente Neuroblastomzelllinien untersucht. Dabei stand vor allem die Frage im Vordergrund, ob die untersuchten Substanzen mit einem oder mehreren ABC-Transportern interagieren.

Die verwendeten Neuroblastomzelllinien sind nach den Kriterien des INSS alle Stadium IV. Die chemoresistenten Sublinien wurden durch Adaptation an diverse Zytostatika etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss des HIV-Protease-Inhibitors Saquinavir auf chemosensitive und chemoresistente Neuroblastomzelllinien untersucht. Hier stand der Einfluss auf die MDR1- und BCRP1-vermittelte Chemoresistenz im Vordergrund. Dazu wurden chemoresistente MDR1-überexprimierende Zelllinien und mit MDR1 transduzierte Zelllinien verwendet. Der Einfluss auf BCRP1 wurde in BCRP1-transduzierten Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Saquinavir auf p53 untersucht.

Eine Arbeitsgruppe aus Belgrad modifizierte 2009 Saquinavir, in dem sie eine Nitritoxidgruppe in das Molekül einführte. Die neue Substanz Saquinavir-NO wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen untersucht. Für Saquinavir-NO liegen noch keine Daten über Interaktionen mit ABC-Transportern vor. Die vorliegende Arbeit untersucht zum ersten Mal den Einfluss von Saquinavir-NO auf die MDR1 und BCRP1-vermittelte Chemoresistenz und vergleicht die Ergebnisse mit der Ausgangssubstanz Saquinavir. Auch für Saquinavir-NO wurde der Einfluss auf p53 mit Hilfe von Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status untersucht (Wildtyp-p53 und mutiertes p53).

Nutlin-3 ist ein MDM2-Antagonist und induziert in Tumorzelllinien mit Wildtyp-p53 starke zytotoxische Effekte bzw. verstärkt die antiproliferative Wirkung von Zytostatika (siehe I.6). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Nutlin-3 auf chemosensitive und chemoresistente Neuroblastomzelllinien untersucht und verglichen. Hier stand der Einfluss von Nutlin-3 auf die MDR1-vermittelte Chemoresistenz im Vordergrund. Dazu wurden adaptierte, chemoresistente MDR1-überexprimierende Zelllinien und mit MDR1 transduzierte Zelllinien verwendet. Zusätzlich wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status untersucht (Wildtyp-p53 und mutiertes p53).

## II. Material und Methoden

### II.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Brutschränke : ohne CO <sub>2</sub> mit CO <sub>2</sub>	Fa. Binder, Tuttlingen Fa. Heraeus, Hanau Fa. Labotect, Göttingen
Combitips	Fa. Eppendorf, Hamburg
Cryotubes	Fa. Nunc, Wiesbaden
Durchflusszytometer FACSCalibur	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine	Fa. Scotsman, Mailand, Italien
FACS-Röhrchen 5 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
Filterpapier (für Western Blot)	Fa. Bio - Rad GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Fa. Olympus, Hamburg
Gefrierschrank	Fa. Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank UF 80 – 450 S	Fa. Heraeus, Hanau
Generator (für Western Blot)	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Glasflaschen	Fa. Schott, Mainz Fa. Biochrom AG, Berlin
Hamilton-Pipette	Fa. Hamilton GmbH, Darmstadt
Handschuhe	Fa. Ansell GmbH, München
Hypercasette	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Hyperfilm ECL	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Kühlschränke	Fa. Bosch, Stuttgart Fa. Liebherr-Holding GmbH, Biberach
Magnetrührer	Fa. Janke und Kunkel KG, Staufen
Mikroskop	Fa. Carl Zeiss, Göttingen Fa. Olympus, Hamburg
Millipore H <sub>2</sub> O-Anlage	Fa. Millipore, Eschborn
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Petrischalen	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
pH-Meter	Fa. Schott, Mainz
Pipetten	Fa. Gilson/Abimed, Langenfeld Fa. Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Starlab, Ahrensburg
Pipettierhilfen	Fa. Integra Biosciences, Fernwald Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Platten	Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Falcon, Heidelberg
Plattenphotometer Tecan GENios	Fa. Tecan, Crailsheim
Reaktionsröhrchen	Fa. Eppendorf, Hamburg Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Sarstedt, Nümbrecht

## II. Material und Methoden

Serologische Pipetten	Fa. Corning Inc., New York, USA
Spektrophotometer (GeneQuant II)	Fa. Pharmacia Biotech via Amersham GmbH, Freiburg
Sterilfilter	Fa. Millipore, Eschborn Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Sterilwerkbänke	Fa. Flow Laboratories, Meckenheim Fa. Heraeus, Hanau
TaqMan Cyler PRISM 7900HT	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler (Mastercycler Gradient)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex	Fa. Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Fa. Mettler GmbH, Gießen
Zellkulturflaschen	Fa. Falcon, Heidelberg Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugen	Fa. Heraeus, Hanau Fa. Hettich, Tuttingen Fa. Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Fa. Falcon, Heidelberg

## II.2 Chemikalien, Stoffe und andere Lösungen

### II.2.1 Allgemeine Lösungen und Stoffe

Aqua ad iniectabilia	Fa. Braun, Melsungen
Aqua dest. (dH <sub>2</sub> O)	Fa. Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich, München
Doxorubixin	Fa. medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg
Nutlin-3	Fa. Merck Serono, Darmstadt Fa. Alexis Biochemicals via AXXORA Deutschland, Lörrach
Saquinavir	Fa. Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Saquinavir-NO	Mit freundlicher Genehmigung von Ferdinando Nicoletti, Universität Catania, Italien
Vincristin	Fa. GRY Pharma GmbH, Kirchzarten

## II.2.2 Zellkultur

### Supplementiertes IMDM:

1 % Penicillin/Streptomycin	1 Flasche 10 Mega Penicillin und 10 g Streptomycinsulfat mit Milliporewasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei - 20 °C lagern	Penicillin: Fa. Grünenthal, Stolberg Streptomycin: Fa. Sigma-Aldrich, München
2 % Glutamin	29,2 g L-Glutamin mit Milliporewasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei - 20 °C lagern	Fa. Sigma-Aldrich, München
4 % Natriumhydrogencarbonat	75 g Natriumhydrogencarbonat mit Milliporewasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 % FKS	Gebrauchsfertig erworben, bei -20 °C lagern	Fa. Sigma-Aldrich, München
IMDM ( <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> )	17,26 g IMDM mit Milliporewasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern	Fa. Biochrom AG, Berlin

Die einzelnen Lösungen werden in einer sterilen Glasflasche vorgelegt und mit IMDM zum gewünschten Volumen aufgefüllt.

### Weitere Lösungen für die Zellkultur

10x Phosphate buffered Saline (PBS)	95,5 g PBS mit Aqua ad iniectabilia auf 1 l auffüllen, autoklavieren, bei RT lagern.	Fa. Biochrom AG, Berlin
1x PBS	50 ml 10x PBS mit Aqua ad iniectabilia auf 500 ml auffüllen, bei RT lagern.	
Trypsin	2 g Trypsin und 0,6 g Titriplex III mit 1x PBS auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern.	Trypsin: Fa. Sigma-Aldrich, München Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat, EDTA-Na): Fa. Merck Serono, Darmstadt

### II.2.3 Viabilitätsassay (MTT-Test)

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)	1 g MTT-Reagenz auf 500 ml PBS, steril filtrieren, bei 4 °C lagern	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
20 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	400 g SDS auf 2 Liter (1:1 dH <sub>2</sub> O / Dimethylformamid), pH 4,7; bei RT lagern	SDS: Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt Dimethylformamid: Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte

### II.2.4 Quantitative Real-time PCR

#### RNA-Isolation

Chloroform	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Wasser, Molecular Biology Grade (DEPC)	Fa. Eppendorf, Hamburg
TRI® Reagent	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (EtOH) abs.	Fa. J.T.Baker, Stuttgart
Isopropanol	Fa. Riedel de Haen, Seelze

#### Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

DNA-Polymerization Mix 20 mM/dNTP (dNTP)	Fa. Pharmacia, Ratingen
GeneAmp® 10x PCR Buffer II & MgCl <sub>2</sub> Solution Pack	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
MuLV Reverse Transcriptase	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
RNase Inhibitor	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Random Hexamers	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Wasser, Molecular Biology Grade (DEPC)	Fa. Eppendorf, Hamburg

<u>Master Mix:</u>		<u>RT Mix (für eine Probe):</u>	
10x PCR Buffer II	100 µl	Master Mix	30 µl
DEPC Wasser	350 µl	Reverse Transkriptase	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	200 µl	RNase Inhibitor	2 µl
Random Hexamers	50 µl	RNA-Probe	6 µl
dNTP	50 µl		
Lagerung: -20°C			

<u>RT-PCR Ansatz (für eine Probe):</u>		<u>RTA Master Mix:</u>	
Master Mix	30 µl	dNTP	40 µl
Reverse Transkriptase	2 µl	Buffer II	400 µl
RNase Inhibitor	2 µl	MgCl <sub>2</sub>	800 µl
RNA-Probe	6 µl	DEPC Wasser	2760 µl
		Lagerung: 2-4°C	

Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR)

TaqMan® Gene Expression Master Mix	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR® Green PCR Master Mix	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt

Primer:

18s (Fa. Operon, Köln, Deutschland)  
 Sense: 5'-GTG AAA CTG CGA ATG GCT CAT-3'  
 anti-sense: 5'-CTG ACC GGG TTG GTT TTG AT-3'

MDM2 (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)  
 Sense 5'-TGT TGG TGC ACA AAA AGA CA-3'  
 anti-Sense 5'-CAC GCC AAA CAA ATC TCC TA-3'

p21 (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)  
 Sense 5'-GCC CGT GAG CGA TGG AA-3'  
 anti-Sense 5'-ACG CTC CCA GGC GAA GTC-3'

GADD45 (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)  
 Sense 5'-GCA CGC CGC GCT CTC T-3'  
 anti-Sense 5'-CTT ATC CAT CCT TTC GGT CTT CTG-3'

Sonden:

18s (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)  
 5'-(VIC) TGGTCGCTCCTCTCCCAC - (TAMRA)

MDM2, p21, GADD45  
 SYBR Green (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)

**II.2.5 Färbung der ABC-Transporter**

Anti-human BCRP1 (mouse IgG <sub>1</sub> )	Fa. Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA
Anti-human MDR1 (mouse IgG <sub>2a</sub> )	Fa. Alexis Biochemicals via AXXORA Deutschland, Lörrach
Anti-human MRP1 (mouse IgG <sub>2a</sub> )	Fa. Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA
Sekundärer Antikörper anti-mouse IgG markiert mit Phycoerythrin (PE)	Fa. R&D, Wiesbaden
Isotypenkontrolle mouse IgG <sub>1</sub> markiert mit Phycoerythrin (PE)	Fa. R&D, Wiesbaden
Isotypenkontrolle mouse IgG <sub>2a</sub> markiert mit Phycoerythrin (PE)	Fa. R&D, Wiesbaden
Fixationbuffer	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm-Buffer	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

### II.2.6 Untersuchung des Effluxes von ABC-Transportern

Calcein-AM	Fa. Merck Serono, Darmstadt
Mitoxantron	Fa. GRY Pharma GmbH, Kirchzarten
MK571	Fa. Merck Serono, Darmstadt
Rhodamin 123 (R123)	Fa. Merck Serono, Darmstadt
Verapamil	Fa. Sigma-Aldrich, München
WK-X-34	Mit freundlicher Genehmigung von Michael Wiese, Universität Bonn

### II.2.7 ATPase-Assay

Membran für BCRP1-ATPase-Assay	Fa. Solvo Biotechnology, Budapest, Ungarn
Membran für MDR1-ATPase Assay	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Sulfasalazin	Fa. Sigma-Aldrich, München
Verapamil	Fa. Sigma-Aldrich, München
Magnesium ATP	Fa. Sigma-Aldrich, München
Natrium-Orthovanadat	Fa. Sigma-Aldrich, München

### Phosphatstandards

0,5 M Kaliumphosphat, monobasisch ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Lösung 1)	Fa. Mallinckrodt Baker, Griesheim
0,5 M Kaliumphosphat, dibasisch ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Lösung 2)	Fa. Mallinckrodt Baker, Griesheim
0,5 M Kaliumphosphat ( $\text{KPO}_4$ ) pH 7,4 (Lösung 3); besteht aus 150 ml Lösung 1 und 700 ml Lösung 2	
0,1 M Kaliumphosphat pH 7,4 (Lösung 4) besteht aus 200 ml Lösung 3 und 800 ml $\text{dH}_2\text{O}$	

Mit Lösung 4 werden die Standards für die Platte erstellt (0; 0,05; 0,15; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mM Phosphat; verdünnt mit Tris-Mes-Puffer)

### Tris-Mes-Puffer pH 6,8

4,89 g Mes ((2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)-Hydrat)	Fa. Sigma-Aldrich, München
0,38 g EGTA (Ethylenglycol-bis(beta-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetrasäure)	Fa. Sigma-Aldrich, München
0,159 g DTT (DL-Dithiothreitol)	Fa. Sigma-Aldrich, München
1,86 g KCl (Kaliumchlorid)	Fa. Mallinckrodt Baker, Griesheim
In 350 ml $\text{dH}_2\text{O}$ lösen	
Mit Tris-Base (Fa. Mallinckrodt Baker, Griesheim) den pH-Wert auf 6,8 einstellen und auf 500 ml $\text{dH}_2\text{O}$ auffüllen	
0,163 g Natriumazid dazugeben (Fa. Sigma-Aldrich, München); steril filtrieren	



Stopplösung

10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Sigma-Aldrich, München
2-3 Tropfen Anti-Foam	Fa. Sigma-Aldrich, München

Nachweisreagenz

15 mM Zinkacetat (Lösung 1)	Fa. Sigma-Aldrich, München
35 mM Ammoniummolybdat in Lösung 1 (Lösung 2)	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 % Ascorbinsäure (Lösung 3)	Fa. Sigma-Aldrich, München

Das Nachweisreagenz setzt sich zusammen aus 20 ml Lösung 3 und 5 ml Lösung 2.

**II.2.8 Transduktion mit lentiviralen Vektoren**

Supplementiertes DMEM

100 IE/ml Penicillin	Fa. Grünenthal, Stolberg
100 mg/ml Streptomycin	Fa. Sigma-Aldrich, München
1 mM Natriumpyruvat	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
20 mM HEPES	Fa. Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
10 % FKS	Fa. Sigma-Aldrich, München
DMEM mit Glutamin und 4,5 g/l Glucose	Fa. Biochrom AG, Berlin

Die einzelnen Lösungen werden in einer sterilen Glasflasche vorgelegt und mit DMEM zum gewünschten Volumen aufgefüllt

2x HBS-Puffer

50 mM HEPES pH 7,0	Fa. Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
10 mM KCl (Kaliumchlorid)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
12 mM Dextrose	Fa. Sigma-Aldrich, München
280 mM NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München
1,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumhydrogenphosphat)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt

Chloroquine	Fa. Sigma-Aldrich, München
Polybrene (1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide)	Fa. Sigma-Aldrich, München
2 M CaCl (Calciumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München

### II.2.9 Western Blot

$\beta$ -Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich, München
Laemmlipuffer	Fa. Bio-Rad GmbH, München
DC Protein Assay	Fa. Bio-Rad GmbH, München
ECL Western Blotting Analyses System	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Isopropanol	Fa. Riedel-de-Haën GmbH, Seelze
Methanol	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Prestained Protein Marker ( Broad Range )	Fa. BioLabs GmbH, Frankfurt a. M.

#### Antikörper

Anti- $\beta$ -Aktin (mouse)	Fa. Sigma-Aldrich, München
Anti-p53 (mouse)	Fa. Alexis Biochemicals via AXXORA Deutschland, Lörrach
Sekundärer Antikörper anti-mouse markiert mit Meerrettichperoxidase	Fa. Calbiochem via Merck KGaA, Darmstadt

#### Lysispuffer I (Triton X-100 Lysispuffer)

20 mM Tris/HCl pH 7,5	Fa. Roth, Karlsruhe
150 mM NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 mM NaPPi (tetra-Natriumdiphosphat- decahydrat)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
20 mM NaF (Natriumfluorid)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
1 % Triton X-100	Fa. Roth, Karlsruhe

#### Lysispuffer II

Zu Lysispuffer I frisch dazugeben:

2 mM Orthovanadat		Fa. Sigma-Aldrich, München
10 nM Okadaicsäure		Fa. Sigma-Aldrich, München
400 nM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)		Fa. Sigma-Aldrich, München
1,2 % PIM (Protease- Inhibitor-Mix); Besteht aus	- Antipain: 1mg/ml HEPES (15 mM; pH 7,4) - Aprotinin: 1mg/ml HEPES (15 mM; pH 7,4) - Trypsin-Inhibitor : 1mg/ml HEPES (15 mM; pH 7,4) - Chymostatin : 1mg in 200 $\mu$ l DMSO und 800 $\mu$ l HEPES (15 mM; pH 7,4) - Leupeptin: 1mg in 200 $\mu$ l DMSO und 800 $\mu$ l HEPES (15 mM; pH 7,4) - Pepstatin A: 1mg in 200 $\mu$ l DMSO und 800 $\mu$ l HEPES (15 mM; pH 7,4)	Fa. Sigma-Aldrich, München Fa. Sigma-Aldrich, München Fa. Sigma-Aldrich, München Fa. Sigma-Aldrich, München Fa. Sigma-Aldrich, München Fa. Sigma-Aldrich, München

Für Gele:

dH <sub>2</sub> O	Fa. Braun, Melsungen
30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Fa. Roth, Karlsruhe
1 M Tris/HCl (pH 6,8/pH 8,8)	Fa. Roth, Karlsruhe
10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 % AMPS (Ammoniumperoxodisulfat)	Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Fa. Roth, Karlsruhe

10x Laufpuffer (für SDS-PAGE) auf 1 l

30 g Tris-Base	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
143 g Glycin	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
10 g SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Sigma-Aldrich, München

Bei 10x Konzentrat pH-Wert nicht einstellen

Bei 1x Ansatz pH-Wert auf 8,3 einstellen

10x Transferpuffer (für Western Blot) auf 1 l

30 g Tris-Base	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
143 g Glycin	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt

Bei 10x Konzentrat pH-Wert nicht einstellen

Bei 1x Konzentrat 20 % Methanol dazugeben und pH-Wert auf 8,3 einstellen

10x Waschpuffer auf 1 l

60,6 g Tris-Base	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
87,7 g NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München

Bei 10x Konzentrat pH-Wert auf 7,5 einstellen

Bei 1x Konzentrat keine pH-Wert-Einstellung; 0,3% Tween-20 (Fa. Merck-Schuchardt, Hoherbrunn) dazugeben

1x Blockpuffer auf 1 l

50 ml von 1 M Tris/HCl (pH-Wert 7,5)	Fa. Roth, Karlsruhe
11,68 g NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München
0,5 ml Tween-20	Fa. Merck-Schuchardt, Hoherbrunn
30 g BSA (bovines Serumalbumin)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe

### II.3 Verwendete Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von chemosensitiven und chemoresistenten Tumorzelllinien verwendet. Die chemoresistenten Sublinien wurden durch schrittweise Adaptation an das entsprechende Zytostatikum etabliert. Die Schreibweise der resistenten Sublinie richtet sich nach folgendem Schema: Nach dem Zellnamen zeigt ein hochgestelltes „r“, dass es sich um eine resistente Sublinie handelt. Es folgt die Abkürzung des verwendeten Zytostatikums. Die Zytostatikumkonzentration, an die die Zelle adaptiert wurde, wird in ng/ml angegeben und ist ebenfalls hochgestellt. So ist z.B. die Schreibweise für UKF-NB-3, die an 10 ng/ml Vincristin adaptiert wurde, UKF-NB-3<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup>.

In Tabelle II.3.1 sind alle verwendeten Zytostatika und ihre jeweiligen Wirkmechanismen aufgeführt.

Zytostatikum	Wirkmechanismus
Vincristin (VCR)	Vinkaalkaloid; interferiert mit Mikrotubuli; hemmt Aufbau des Spindelapparates
Doxorubicin (DOX)	Anthracyclin; hemmt Topoisomerase II und interkaliert in die DNA
Paclitaxel (PACLI)	Taxan; interferiert mit $\beta$ -Tubulin und hemmt den Abbau des Spindelapparates

Tabelle II.3.1: Zur Adaptation verwendete Zytostatika und ihre jeweiligen Wirkmechanismen.

Die verwendeten chemosensitiven und chemoresistenten Tumorzelllinien werden im Folgenden einzeln beschrieben.

Die parentale chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom INSS Stadium 4 isoliert (Kotchetkov et al, 2005). Die gewonnene Zelllinie weist N-myc-Amplifikation auf. Durch Adaptation wurden folgende chemoresistente Sublinien etabliert:

UKF-NB-3<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup> (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

UKF-NB-3<sup>r</sup>DOX<sup>20</sup> (resistent gegen 20 ng/ml Doxorubicin)

UKF-NB-3 weist keine MDR-1-Expression auf (Kotchetkov et al, 2005). Im Unterschied dazu zeigen die Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>DOX</sup><sup>20</sup> eine deutliche Überexpression von MDR-1 (Kotchetkov et al, 2005).

Die Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>DOX</sup><sup>20</sup> exprimieren Wildtyp-p53 (Kotchetkov et al, 2005). Im Gegensatz dazu tragen die Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> eine Mutation im p53-Gen (Kotchetkov et al, 2005).

Durch Transduktion der chemosensitiven Zelllinie UKF-NB-3 mit lentiviralen Vektoren wurde die MDR1-überexprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> und durch Transduktion mit dem Leervektor Cer2 die entsprechende Kontrollzelllinie UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> etabliert. Ebenso wurde durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren die BCRP1-überexprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> und durch Transduktion mit dem Leervektor iG2 die entsprechende Kontrollzelllinie UKF-NB-3<sup>iG2</sup> etabliert. Zusätzlich wurde in der Zelllinie UKF-NB-3 durch Transduktion die Expression von p53 herunterreguliert (UKF-NB-3<sup>p53</sup>). Auch hier wurde eine Kontrolle (scrambled (scr)) transduziert (UKF-NB-3<sup>scr</sup>).

Die parentale chemoresistente humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-4 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom INSS Stadium 4 gewonnen (Cinatl jr et al, 1999). Die gewonnene Zelllinie weist N-myc-Amplifikation auf. UKF-NB-4 zeigt Überexpression von MDR-1 (Cinatl jr et al, 1999) und trägt eine Mutation im p53-Gen (Michaelis et al, 2007).

Die parentale chemoresistente humane Neuroblastomezelllinie Be(2)c wurde bei ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) erworben. Be(2)c zeigt N-myc-Amplifikation und MDR-1-Überexpression (LaQuaglia et al, 1991) und trägt eine Mutation im p53-Gen (Tweddle et al, 2001).

Die parentale chemosensitive humane alveolare Rhabdomyosarkomzelllinie UKF-Rhb-1 wurde aus Knochenmarkmetastasen eines Patienten etabliert. UKF-Rhb-1 zeigt keine MDR-1-Expression und exprimiert Wildtyp-p53. Durch Adaptation an 10 ng/ml Vincristin wurde die chemoresistente Sublinie UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> etabliert. Die chemoresistente Sublinie exprimiert MDR-1 und trägt eine Mutation im p53-Gen.

Die parentale chemosensitive humane alveolare Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 wurde freundlicherweise von Dr. P.J. Houghton zur Verfügung gestellt (St. Jude's Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA). RH30 exprimiert kein MDR-1 und ist p53-mutiert (Hosoi

et al, 1999). Durch Adaptation an 10 ng/ml Vincristin wurde die chemoresistente Sublinie RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> etabliert. Die chemoresistente Sublinie exprimiert MDR-1 und trägt ebenfalls eine Mutation im p53-Gen. Durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurde die MDR1-überexprimierende Zelllinie RH30<sup>MDR1</sup> etabliert. Als Kontrolle wurde die Zelllinie RH30 auch mit dem Leervektor Cer2 transduziert (RH30<sup>Cer2</sup>).

Die parentale chemosensitive humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 ist p53-negativ, MDR1-negativ und exprimiert geringe Mengen an MRP1. PC3 wurde bei ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) erworben und an Wachstum in Gegenwart von 10 ng/ml Vincristin adaptiert. Die resultierende Zelllinie PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> zeigt keine MDR1-Expression, aber eine deutliche MRP1-Überexpression.

Die parentale chemosensitive humane Harnblasenkarzinomzelllinie RT112 wurde von ATCC bezogen. Die Zelllinie RT112 exprimiert kein MDR1 und trägt eine Mutation im p53-Gen (Warenius et al, 2000). Durch Adaptation an 20 ng/ml Paclitaxel wurde die chemoresistente Sublinie RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> etabliert. RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> zeigt eine deutliche MDR1-Expression.

Die canine Nierenepithelzelllinie MDCKII wurde mit MDR1 (MDCKII<sup>MDR1</sup>) und mit MRP1 (MDCKII<sup>MRP1</sup>) transfiziert (Bakos et al, 1998). Die transfizierten Zelllinien und die untransfizierte Kontrollzelllinie MDCKII wurden freundlicherweise von Dr. P. Borst, Dr.M. de Haas und Dr. A.H. Schinkel zur Verfügung gestellt (Nederlands Kranker Instituut, NKI, Amsterdam, Niederlande).

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zellen in supplementiertem IMDM (*Iscove's Modified Dulbeccos Medium*) bei 37 °C kultiviert (siehe II.2.2).

In Tabelle II.3.2 sind p53-Status und MDR1-Expression aller verwendeten Zelllinien zusammengefasst.

II. Material und Methoden

Zelllinie	p53 Mutation <sup>1</sup>	MDR1 <sup>2</sup>
UKF-NB-3	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+ (C135F)	+
UKF-NB-3 <sup>DOX</sup> <sup>20</sup>	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>Cer2</sup>	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>MDR1</sup>	Wt	+
UKF-NB-3 <sup>iG2</sup>	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>BCRP1</sup>	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>scr</sup>	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>p53</sup>	Suppr.	-
UKF-NB-4	+ (C175F)	+
Be(2)c	+ (C135F)	+
UKF-Rhb-1	Wt	-
UKF-Rhb-1 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+ (K291X)	+
RH30	+ (R273C)	-
RH30 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+ (R273C)	+
RH <sup>MDR1</sup>	+ (R273C)	+
RH30 <sup>Cer2</sup>	+ (R273C)	-
PC3	Neg.	-
PC3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	Neg.	-
RT112	+ (n.b.)	-
RT112 <sup>PACLI</sup> <sup>20</sup>	n.b.	+
MDCK II	Wt	-
MDCK II <sup>MDR1</sup>	Wt	+
MDCKII <sup>MRP1</sup>	Wt	-

Tabelle II.3.2: Alle verwendeten Zelllinien mit p53-Status und MDR1-Expression.

<sup>1</sup> p53: Wt = keine Mutation (Wildtyp); + = mutiertes p53 (Mutation aufgeführt); + (n.b.) = Mutation nicht näher bestimmt; Suppr.: supprimiertes p53 (*knock down*); Neg. : Negativ (keine p53-Expression); n.b.: nicht bestimmt

<sup>2</sup> MDR1 Expression: + = Überexpression, - = keine Überexpression

### II.4 Viabilitätsassay (MTT-Test)

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Testes überprüft. Dieser kolorimetrische Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazolimsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) zu violetten Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen (siehe Abbildung II.4.1) Da Dehydrogenasen nur in lebenden, proliferierenden Zellen aktiv sind, kann der Anteil an lebenden Zellen bestimmt werden (Mosmann, 1983).

Der zu testende Stoff wird auf einer 96-Lochplatte in 8 Verdünnungsschritten aufgetragen (jeweils 1 zu 2 verdünnt). Die entsprechenden Zellen werden in Suspension direkt dazugegeben. Die ersten beiden Spalten der Platte dienen als Zellkontrolle, die letzten beiden Spalten als Mediumskontrolle. Jeder Ansatz hat ein Volumen von 100 µl.

Bei der Testung von zwei Stoffen in Kombination wird zuerst die Verdünnungsreihe pipettiert. Anschließend gibt man in die obere Hälfte der Platte die Zellen direkt dazu. Für den unteren Teil der Platte versetzt man die Zellen zuerst mit dem zweiten Stoff und pipettiert die Zellen anschließend auf den unteren Teil der Platte. Auf diese Art wurden alle Platten angesetzt, bei denen die Überwindung der ABC-Transporter vermittelten Chemoresistenz getestet werden sollte. Dabei wurde das entsprechende Zytostatikum in einer Verdünnungsreihe pipettiert, der zu testende Stoff (in der vorliegenden Arbeit Nutlin-3, Saquinavir und Saquinavir-NO) wurde in einer festen Konzentration in den unteren Teil der Platte dazugegeben.



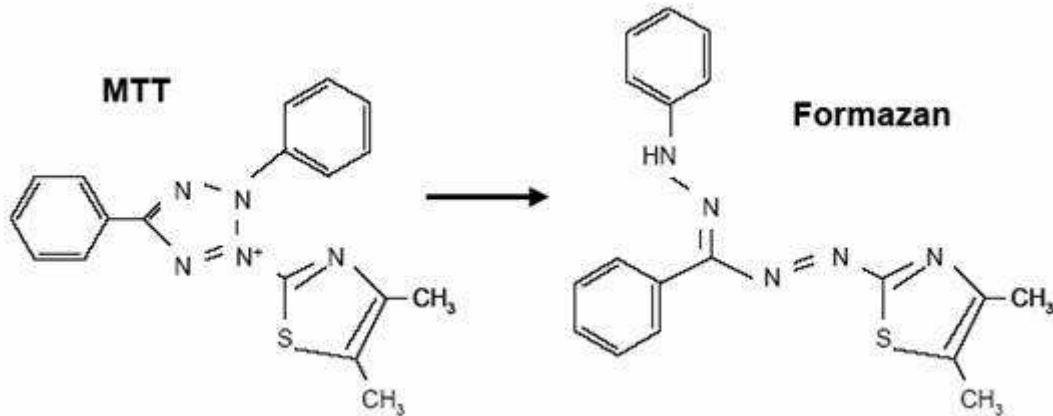


Abbildung II.4.1 Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird durch zelluläre Dehydrogenasen zu violetten Formazankristallen reduziert. (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

Die Platten inkubierten 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde in jedes Loch 25 µl MTT-Lösung pipettiert. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden jeweils 100 µl einer 20 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) dazupipettiert. SDS dient als Detergenz, es lysiert die Zellen und löst die ausgefallenen Formazankristalle auf. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die Platten in einem Plattenphotometer bei 560 nm zu 620 nm ausgelesen und die optische Dichte (OD) bestimmt werden. Dabei steht eine hohe OD für viele umgesetzte Formazankristalle und somit für einen hohen Anteil an lebenden, proliferierenden Zellen.

Mit Hilfe des Programms CalcuSyn wurde der IC<sub>50</sub>-Wert (*inhibitory concentration 50*) bestimmt. Der IC<sub>50</sub>-Wert gibt an, bei welcher Konzentration des untersuchten Stoffes 50 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind.

## II.5 Quantitative Real-Time PCR

### II.5.1 Probenextraktion und RNA-Isolierung

Die Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-Rhb-1 und UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> wurden für 8 h mit 20 µM Nutlin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml TRI-Reagent lysiert, mehrfach resuspendiert, in ein steriles Tube überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. TRI-Reagent denaturiert alle Proteine, wie z.B. auch RNAsen.

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Nukleinsäure in den Proben isoliert. Zu jeder Probe wurde 220 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt und für 3 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min. bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase (hier ist die RNA enthalten) möglichst vollständig abgenommen (ca. 500 µl) und in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA ausgefällt. Die Proben inkubierten weitere 10 min. bei RT und wurden anschließend erneut gut gemischt. Die Proben wurden für 10 min. bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die RNA ist nun als helles Pellet erkennbar. Dieses Pellet wurde mit 1 ml 70 % Etanol resuspendiert. Die Proben können hier bei -20 °C gelagert werden.

Die Proben wurden für 5 min. bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden erneut kurz zentrifugiert. Anschließend wurde der restliche Überstand abpipettiert. Die Tubes wurden mit offenem Deckel bei 55 °C stehen gelassen, damit das Pellet trocknet. Danach wurden je nach Größe des Pellets 20-60 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und weitere 5 min. bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben manuell gemischt und bei 55 °C weitere 5 min. inkubiert. Nach diesem Schritt können die Proben bei -80 °C gelagert werden.

### II.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Quantität und der Qualität der isolierten RNA wird die Optische Dichte (OD) der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Die Reinheit der Nukleinsäure lässt sich durch das Verhältnis der ODs von 260 nm zu 280 nm bestimmen. Die Ratio sollte zwischen 1,6 und 2 liegen. Die Proben wurden während der Messung auf Eis gelagert.

Am Gerät wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

RNA Faktor 40

Verdünnung 1:20

Messung bei OD 260 nm und 280 nm

Mit Hilfe einer Messküvette, die 100 µl DEPC-Wasser enthält, wurde der Nullwert (Blankwert) am Gerät eingestellt. Die zu messende Probe wurde 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt und mit Hilfe einer Messküvette gemessen. Die angezeigte Ratio und Konzentration an RNA (µg/ml) wurden notiert.

Die RNA-Konzentration wird auf 167 µg/ml eingestellt, um bei der folgenden RT-PCR 1 µg RNA umzuschreiben. Die Berechnung für die Verdünnung der Probe auf 167 µg/ml sieht wie folgt aus:

Restmenge Probe = Menge gelöstes Pellet (µl) – 5 µl für Messung

$$\mu\text{l H}_2\text{O} = \frac{\text{gemessene Konzentration (}\mu\text{g/ml)} * \text{Restmenge Probe (}\mu\text{l)}}{167 \mu\text{g/ml}} - \text{Restmenge Probe (}\mu\text{l)}$$

Die Proben wurden mit der berechneten Menge an DEPC-Wasser verdünnt und für 10 min. bei 70 °C denaturiert. Dadurch werden Sekundärstrukturen gelöst. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### II.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit der RT-PCR wird die RNA in cDNA (*complementaryRNA*) umgeschrieben. Dazu benötigt man eine gepufferte Lösung, bestehend aus RNA-abhängiger DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), Primer und dNTPs (Desoxyribonukleosid-Triphosphate). Zufällige Hexamere (7 bp große Oligonukleotide), die, statistisch gesehen, die gesamte Länge der komplementären Bereiche der RNA abdecken, wurden als Primer verwendet. Für eine RT-PCR wird 1 µg RNA benötigt, was 6 µl der eingestellten Probe entspricht. Alle Arbeiten müssen auf Eis durchgeführt werden, da die Reverse Transkriptase bereits bei Raumtemperatur aktiv ist.

Der RT-PCR Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

30 µl Master Mix

2 µl Reverse Transkriptase

2 µl RNase Inhibitor

6 µl RNA-Probe

Der RT-PCR Ansatz wurde im Thermocycler inkubiert. Das dabei verwendete Cycler-Programm sah wie folgt aus:

25 °C für 10 min.

42 °C für 15 min.

96 °C für 5 min.

4 °C für ∞ min.

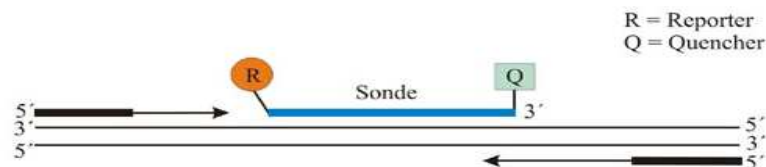
Nach dem Umschreiben wurden die Proben 1:5 mit RTA Mix verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### II.5.4 Quantitative real-time PCR (RTq-PCR)

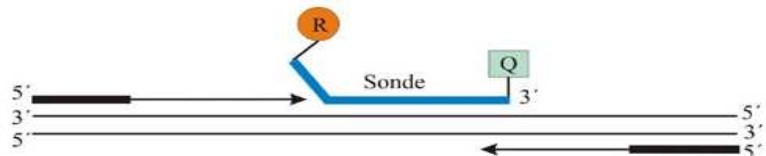
Um die Transkriptionsregulation von bestimmten Genen zu analysieren wird die Quantitative real-time PCR verwendet. Sie lässt sich in drei Reaktionsschritte unterteilen. Im ersten Schritt, der sogenannten Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (Annealing). Im letzten Schritt, der Elongation, vervollständigt die DNA-Polymerase mit Hilfe von Nukleotiden die Einzelstränge zu zwei neuen Doppelsträngen.

Um die entstehenden PCR-Produkte in „*real-time*“ zu messen, werden kurze DNA-Fragmente (Sonden, *probe*) verwendet, deren Sequenz so ausgesucht wurde, dass sie zwischen den Primern mit der DNA des PCR-Produktes hybridisieren. An die Enden der Sonde sind Fluoreszenzfarbstoffe gebunden, von denen einer Licht emittieren (*reporter*), der andere Licht absorbieren (*quencher*) kann (siehe Abbildung II.5.4.1).

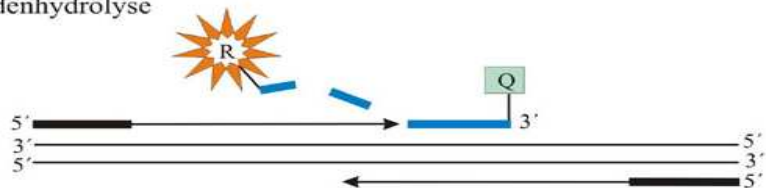
#### 1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer



#### 2. Primer-Extension und Sondenverdrängung



#### 3. Sondenhydrolyse



#### 4. Vollständige Synthese des PCR-Produktes und Trennung der Farbstoffe

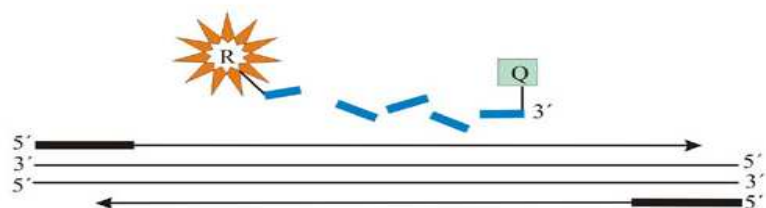


Abbildung II.5.4.1 Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips (Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis).

Solange *quencher* und *reporter* in räumlicher Nähe zueinander stehen, wird kein emittiertes Licht gemessen, da das vom *reporter* emittierte Licht vom *quencher* absorbiert wird. Die Sonden binden wie die Primer bei jedem Annealing-Zyklus an die DNA-Einzelstränge. Bei der Elongation zerlegt die DNA-Polymerase auf Grund ihrer Nukleaseaktivität die Sonde in einzelne Nukleotide. Die beiden Sonden *reporter* und *quencher* werden räumlich voneinander getrennt. Nach Laseranregung kann die Fluoreszenzemission des *reporter* gemessen werden, da das vom *reporter* emittierte Licht nicht mehr vom *quencher* abgefangen wird. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenzemission ist das Maß für die Anzahl der Elongationsreaktionen und der Menge an gebildetem PCR-Produkt. In Abbildung II.5.4.1 ist das TaqMan-Prinzip schematisch dargestellt. Stehen keine Sonden für die PCR zur Verfügung kann der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Cyanin-Farbstoff) zum Nachweis der PCR-Produkte verwendet werden. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Laseranregung bei einer Wellenlänge von 521 nm. Je mehr PCR-Produkt (doppelsträngige DNA) gebildet wird, desto stärker ist demnach die Fluoreszenz.

Bei der quantitativen real-time PCR unterscheidet man zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung. Bei der in dieser Arbeit verwendeten relativen Quantifizierung wird das zahlenmäßige Verhältnis eines Zielgens zu einem Referenzgen bestimmt. Als Referenz wird ein Gen verwendet, dessen Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen unverändert bleibt (*House Keeping Gen*). In dieser Arbeit wurde die 18s-rRNA als Referenzgen verwendet. Das ermittelte Verhältnis aus Ziel- und Referenzgen kann mit dem entsprechenden Verhältnis aus anderen Proben verglichen werden und so die relative Änderung der Genexpression bestimmt werden.

Die real-time PCR Ansätze wurden im Dreifachansatz durchgeführt und sahen wie folgt aus:

### Ansatz für Primer ohne Sonde:

25 µl SYBR Green Master Mix  
0,3 µl Forward Primer  
0,3 µl Reverse Primer  
19,4 µl DEPC-Wasser  
5 µl Probe (cDNA)

### Ansatz für Primer mit Sonde:

25 µl Master Mix  
0,3 µl Forward Primer

0,3 µl Reverse Primer  
18,4 µl DEPC-Wasser  
1 µl Sonde  
5 µl Probe

Ansatz für TaqMan® Gene Expression Assays:

10 µl Master Mix  
4 µl DEPC-Wasser  
1 µl TaqMan® Assay  
5 µl Probe

Der *real time* PCR Ansatz wird im TaqMan® Cyclyer mit folgendem Programm inkubiert:

Stufe I:	Initialaktivierung des Enzyms:	95 °C	15 min.
Stufe II:	Annealing und Elongation:	60 °C	1 min.
	Denaturierung:	94 °C	15 sek.

Die Stufe II wird 40 Zyklen lang wiederholt.

Die relative Quantifizierung der untersuchten Proben wurde mit Hilfe der SDS2.1 Software (Fa. Applied Biosystems) nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Die Werte wurden mit der endogenen Kontrolle 18s-rRNA normalisiert. Innerhalb der untersuchten Zelllinien wurde jeweils die unbehandelte Kontrolle mit dem Nutlin-3 behandelten Ansatz verglichen. Die Unterschiede wurden als x-fache Änderung (fold change) dargestellt.

## II.6 Färbung auf ABC-Transporter am Durchflusszytometer

Die Expression der ABC-Transporter wurde am Durchflusszytometer mit Hilfe fluoreszierender Antikörper untersucht. Für jede gefärbte Probe wurden eine ungefärbte Kontrolle und eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Die ungefärbte Kontrolle wird zum Einstellen am Durchflusszytometer benötigt, da Zellen eine Eigenfluoreszenz besitzen. Die Isotypenkontrolle stellt die unspezifische Bindung nach, die durch die Immunglobulinklasse des verwendeten Erstantikörpers erfolgt, und wird nachher von der gefärbten Probe substrahiert. Dabei muss die Isotypenkontrolle mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sein wie der Zweitantikörper.

Die Zellen wurden mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in PBS resuspendiert und in entsprechende Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1.800 rpm für 5 min. abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Färbung der einzelnen ABC-Transporter wurde wie folgt durchgeführt:

### II.6.1 Färbung auf MDR1

Da der Antikörper gegen MDR1 ein extrazelluläres Epitop bindet, ist keine Permeabilisierung der Zellen nötig. Die Zellen wurden direkt für 30 min. bei 4 °C mit dem Erstantikörper gegen humanes MDR1 (1 µg/ml) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde für 30 min. bei 4 °C mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert und kann am Durchflusszytometer FACSCalibur im FL-2 Kanal gemessen werden. In diesem Schritt wurde auch die entsprechende Isotypenkontrolle gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert und die Proben am Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert.

### II.6.2 Färbung auf BCRP1

Der Antikörper gegen humanes BCRP1 bindet ein intrazelluläres Epitop. Die Zellen müssen vor der Färbung permeabilisiert und fixiert werden. Dazu wurden die Zellen für 10 min. bei 4 °C in 100 µl Fixationbuffer (enthält 4% Formaldehyd) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation (1800 rpm für 5 min.) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Buffer für 10 min. bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min. bei 4 °C mit den Erstantikörpern inkubiert (1 µg/ml). Nach einem Waschschrift mit PBS und Zentrifugation wurde das Pellet für 30 min. bei 4 °C mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert (siehe oben). In diesem Schritt wurde auch die entsprechende Isotypenkontrolle gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS und Zentrifugation wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und die Proben am Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert

## **II.7 Untersuchung des Effluxes von ABC-Transporter-Substraten am Durchflusszytometer**

ABC-Transporter transportieren diverse Substanzen aus der Zelle. Durch die Wahl verschiedener fluoreszierender Substrate kann der ABC-Transporter-vermittelte Efflux genauer untersucht werden. Exprimiert die untersuchte Zelle den entsprechenden ABC-Transporter, wird das verwendete Substrat austransportiert und es ist keine bzw. nur eine geringe Fluoreszenz messbar. Mit spezifischen Inhibitoren, die als Positivkontrollen dienen, wird der ABC-Transporter-vermittelte Efflux inhibiert, so dass es zu einer Akkumulation des fluoreszierenden Substrates in der Zelle kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben zum Nachweis der Fluoreszenz an einen Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert.

### **II.7.1 Einfacher Assay**

Um den Efflux verschiedener ABC-Transporter-Substrate durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden die zu untersuchenden Zelllinien für 30 min. mit unterschiedlichen Konzentrationen vom Nutlin-3 und seinen Enantiomeren bzw. Saquinavir und Saquinavir-NO vorinkubiert. Als Positivkontrolle für MDR1 wurde Verapamil verwendet, da es ein bekannter Inhibitor für den MDR1-vermittelten Efflux ist (Nobili et al, 2006). Zur Inhibierung des MRPs-vermittelten Effluxes wurde MK571 verwendet (Borst et al, 2000).

Anschließend wurde das fluoreszierende Substrat direkt dazugegeben und für 45 min. inkubiert. Für MDR1 und MRPs wurde Rhodamin 123 (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993), für MRPs wurde Calcein-AM benutzt (Essodaigui et al, 1998).

Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches supplementiertes Medium hinzugegeben. Bei den Ansätzen, die mit Inhibitoren vorinkubiert worden waren, wurde der Inhibitor wieder zugegeben. In den folgenden 60 min. konnten die ABC-Transporter die entsprechenden Substrate aus der Zelle transportieren (Efflux-Phase). Nach einer Stunde wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Rhodamin 123 wurde im FL1-Kanal gemessen, Calcein-AM im FL2-Kanal.



### II.7.2 Kinetik (Wash Out)

Um festzustellen ob die untersuchten Substanzen Substrate für den ABC-Transporter MDR1 darstellen oder als allosterische Inhibitoren fungieren, wurde der Efflux des Fluoreszenzsubstrates Rhodamin 123 über einen Zeitraum von 2 h am Durchflusszytometer untersucht. Allosterische ABC-Transporter-Inhibitoren zeigen eine lang anhaltende Aktivität, auch nachdem sie aus dem Medium entfernt wurden. ABC-Transporter-Substrate hingegen verlieren nach dem Auswaschen schnell an Aktivität (Ludwig et al, 2006; Newman et al, 2000).

Zur Untersuchung des MDR1-vermittelten Effluxes wurden die MDR1-exprimierenden Zellen UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, MDCKII<sup>MDR1</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> für 60 min. mit R123 alleine und in Kombination mit Nutlin-3 bzw. Saquinavir und Saquinavir-NO inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Verapamil verwendet. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen, so dass kein Substrat oder Inhibitor im Medium verbleibt. Alle Proben wurden mit Trypsin vom Substratboden abgelöst und in supplementiertem IMDM resuspendiert. Die R123-spezifische Fluoreszenz wurde nach 0, 5, 15, 30, 60, 120 min. im FL1-Kanal gemessen. Die Proben wurden über den Zeitraum der Messung bei 37 °C gelagert.

### II.7.3 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes für MDR1

Für Saquinavir und Saquinavir-NO wurde die Konzentration bestimmt, bei der der MDR1-vermittelte Efflux von R123 zu 50 % inhibiert ist (halbmaximale Konzentration; IC<sub>50</sub>-Wert). Die Untersuchungen wurden an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zellen durchgeführt.

Die Zelllinien wurden für 60 min. mit 1 µM R123 inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und am Durchflusszytometer analysiert (R123 im FL-1-Kanal). Der ermittelte Messwert ist die Fluoreszenz zum Zeitpunkt Null (t<sub>0</sub>). Anschließend wurden die Positivkontrolle Verapamil, Saquinavir und Saquinavir-NO zu den Proben zugegeben. Nach 15 min. wurden alle Ansätze erneut am Durchflusszytometer analysiert (t<sub>15</sub>). Der durch den Efflux niedrigere t<sub>15</sub>-Wert wurde für alle Ansätze vom t<sub>0</sub>-Wert substrahiert. Der Ansatz, in dem R123 ohne Inhibitor inkubiert wurde, stellt die maximale Differenz zwischen t<sub>0</sub> und t<sub>15</sub> und somit den maximalen Efflux dar. Diese maximale Differenz wurde auf 100 % gesetzt. Die Differenzen, die für alle anderen Proben ermittelt wurde, wurden auf diesen Wert prozentual umgerechnet. Mit den erhaltenen Werten konnte im Programm CalcuSyn (siehe auch II.4) der IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden.

Im Diagramm II.7.3.1 ist exemplarisch eine Messung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Saquinavir-NO an der Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> gezeigt.

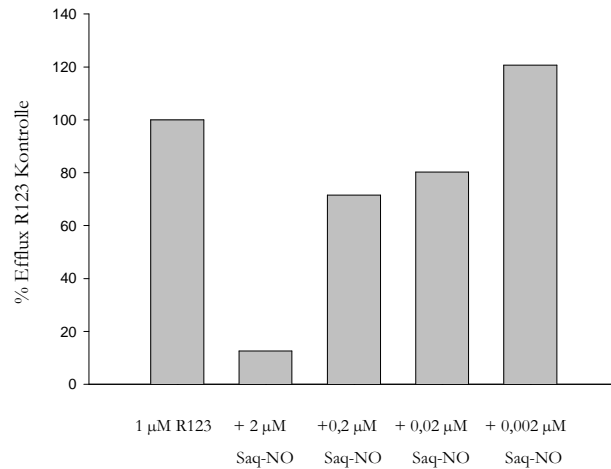


Diagramm II.7.3.1: Exemplarisches Beispiel einer IC50-Messung mit Saquinavir-NO an UKF-NB-3<sup>V</sup>CR<sup>10</sup>. R123: Rhodamin 123; Saq-NO: Saquinavir-NO.

## II.8 Bestimmung der ATPase-Aktivität von MDR1

Beim Austransport von Substanzen aus der Zelle setzen ABC-Transporter ATP um (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006; Wilson et al, 2006). Dabei wird anorganisches Phosphat frei (P<sub>i</sub>). Beim ATPase Assay wird das freigesetzte anorganische Phosphat kolorimetrisch gemessen. Mittels einer Standardkurve kann für jeden Ansatz der Anteil an freigesetztem anorganischem Phosphat bestimmt werden.

Der ATPase Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit für den ABC-Transporter MDR1 nach dem Protokoll der Firma Becton & Dickinson (BD, Heidelberg) durchgeführt. Alle benötigten Chemikalien und Lösungen wurden nach Protokoll erworben und hergestellt. Der Assay basiert auf Membranaufbereitungen, die hohe Mengen MDR1 exprimieren. Die Membranen werden durch Transfektion von Sf9-Zellen mit einem Baculovirussystem gewonnen.

Der Assay wurde in einer 96-Lochplatte durchgeführt, die sich wie folgt aufteilt (siehe auch Abbildung II.8.1):

in den ersten beiden Spalten wurde mit Hilfe einer Kaliumphosphatlösung nach Protokoll eine Standardreihe erstellt (jeweils 60 µl)

in der dritten Spalte wurde 20 µl Tris-Mes-Puffer vorgelegt

in der vierten Spalte wurde 20 µl der Positivkontrolle vorgelegt

in den folgenden Spalten wurden die zu testenden Substanzen vorbereitet und pro Loch 20 µl pipettiert.

Standardreihe		Puffer	Pos.Kontr.	Zu testende Substanzen			
Std. 1	Std. 1					t 0	ohne Orthovanadat
Std. 2	Std. 2					t 0	
Std. 3	Std. 3					t 20	
Std. 4	Std. 4					t 20	
Std. 5	Std. 5					t 0	mit Orthovanadat
Std. 6	Std. 6					t 0	
Std. 7	Std. 7					t 20	
Std. 8	Std. 8					t 20	
Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5-12			

Abbildung II.8.1: Aufbau der 96-Lochplatte für den ATPase-Aktivitäts-Assay.

Als Positivkontrolle wurde 5 µg/ml Verapamil verwendet. Verapamil stellt für MDR1 ein Substrat dar (Yusa und Tsururo, 1989) und führt somit zu einer erhöhten MDR1-ATPase-Aktivität.

Im Verlauf wurde die Platte weiter aufgeteilt. In den oberen Teil der Platte (Reihe A-D) wurden direkt 20 µl der entsprechenden Membranlösung pipettiert. Für den unteren Teil (Reihe E-H) wurde die Membranlösung erst mit Natriumorthovanadat versetzt (Endkonzentration 100 µM). Orthovanadat bindet freies ATP und vermindert somit die ATPase-Aktivität der Transporter. Die Platte wurde 5 min. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Anschließend wurde die Platte weiter unterteilt (siehe Abbildung II.8.2). Dabei wurden der obere und der untere Teil der Platte (Membran ohne und mit 100 µM Orthovanadat) jeweils in t<sub>0</sub> und t<sub>20</sub> aufgeteilt (jeweils im Doppelansatz). In den t<sub>20</sub>-Löchern lässt man die Reaktion 20 min. laufen, die t<sub>0</sub>-Löcher stellen die Grundaktivität der verwendeten Membran dar.

Die Reaktion startet durch Zugabe von 20 µl Magnesium-ATP (Endkonzentration 4 mM) zu den t<sub>20</sub>-Löchern. Die Platte wurde 20 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die ABC-Transporter können nun unter ATP-Verbrauch die jeweilige Substanz transportieren und P<sub>i</sub> wird frei. Durch Zugabe von 30 µl einer 10 % Natriumdodecylsulfatlösung wurde die Reaktion abgestoppt. Dabei wurden in alle Ansätze 30 µl pipettiert, auch in die Standardreihe und in die t<sub>0</sub>-Löcher. Anschließend gibt man jeweils 20 µl der ATP-Lösung in die t<sub>0</sub>-Löcher. So wird sichergestellt, dass in allen Ansätzen das gleiche Volumen und die gleiche Zusammensetzung an Reagenzien vorliegen.

Das kolorimetrische Nachweisreagenz setzt sich aus 5 ml einer 35 mM Ammoniummolybdatlösung und 20 ml einer frisch hergestellten 10 % Ascorbinsäurelösung zusammen. In jedes Loch wurden 200 µl des Nachweisreagenz pipettiert und die Platte weitere 20 min. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Das freie anorganische Phosphat P<sub>i</sub> bildet zusammen mit Molybdat einen Phosphomolybdatkomplex. Dieser Komplex wird von Ascorbinsäure in Anwesenheit von freien Zinkionen (Zn<sup>2+</sup>) reduziert. Der pH-Wert von 5,0 sichert die Stabilität des empfindlichen Phosphokomplexes (Saheki et al, 1985).

Die optische Dichte (OD) wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 800 nm bestimmt und alle Ansätze wurden jeweils gemittelt. Mit Hilfe der ermittelten Standardkurve kann für jeden Ansatz der Anteil an freiem anorganischem Phosphat in nmol bestimmt werden. Innerhalb der zwei Membranansätze (ohne und mit Orthovanadat) wurden jeweils die Werte für den t<sub>0</sub>-Ansatz von den Werten für den t<sub>20</sub>-Ansatz substrahiert. Man erhält die P<sub>i</sub>-Produktion, die in 20 min. stattgefunden hat. Anschließend wurde für jeden Ansatz der Wert mit Orthovanadat von dem Wert ohne Orthovanadat substrahiert. Man erhält die vanadatsensitive Aktivität der transporterspezifischen ATPase in nmol Pi. Zuletzt wurden die Werte durch den Anteil an verwendeter Membran in mg und Volumen in ml dividiert und mit der inkubierten Zeit in Minuten multipliziert. Man erhält die ATPase-Aktivität von MDR1 in nmol Pi/mg Membran pro min (nmol/mg min).

### II.9 Transduktion mit lentiviralen Vektoren

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transduktionen mit lentiviralen Vektoren stützen sich auf die Publikation Weber et al von 2008. In dieser Publikation wird die Entwicklung, Herstellung, Anzucht und Austestung von lentiviralen Vektoren zur Transduktion von cDNAs und shRNAs ausführlich dargestellt. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Publikation die Homepage <http://www.lentigo-vectors.de/index.htm> eingerichtet. Auf der Homepage sind alle Vektoren mit Sequenz, Zusammensetzung und Fluoreszenzmarkierung aufgeführt und erläutert. Es finden sich dort auch Protokolle zur Durchführung und andere weiterführenden Informationen. Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt nur die tatsächlich durchgeführten Transduktionen an der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 und der Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 dargestellt.

### II.9.1 Herstellung der lentiviralen Partikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 verschiedene lentivirale Vektoren verwendet (siehe Tabelle II.9.1.1). Um die Expression der ABC-Transporter MDR1 und BCRP1 in den Zielzelllinien UKF-NB-3 und RH30 zu erhöhen, wurde jeweils die cDNA des entsprechenden ABC-Transporters in die lentiviralen Vektoren inkloniert. Zur Verminderung der p53-Expression in der Zielzelllinie UKF-NB-3 wurde die entsprechende shRNA in den lentiviralen Vektor inkloniert. Als Kontrollen wurde der lentivirale Vektor ohne cDNA bzw. der lentivirale Vektor mit einer Kontroll-shRNA verwendet.

Der Vorteil transduzierter Zelllinien besteht darin, dass sie zusammen mit der untransduzierten Kontrollzelllinie ein isogenes Zellmodell bilden. Die verwendeten Zelllinien haben den gleichen genetischen Hintergrund und unterscheiden sich nur in einem einzigen (durch die Transduktion veränderten) Merkmal. Die Auswirkungen eines einzelnen veränderten Merkmals können in einem isogenen Zellmodell spezifisch untersucht werden.

Im Gegensatz zu transduzierten Zellen finden sich in adaptierten chemoresistenten Zellen meist mehrere Mutationen, deren Auswirkungen sich überschneiden können und somit zum Teil schwer voneinander zu trennen sind.

Die lentiviralen Vektoren enthalten ein Gen, das jeweils für ein bestimmtes Fluoreszenzprotein kodiert. Dies ermöglicht einen fluoreszenzmikroskopischen und/oder durchflusszytometrischen Nachweis der Transduktion.

Die Einklonierung der cDNA für MDR1 und BCRP1 bzw. der shRNA für p53 in die lentiviralen Vektoren waren nicht Bestandteil dieser Arbeit, sondern wurden schon zuvor in unserem Labor (Herrn Dr. Jürgen Otte) durchgeführt.

cDNA / shRNA	lentiviraler Vektor	Fluoreszenzmarker
cDNA für MDR1	LeGO-Cer2	Cerulean
cDNA für BCRP1	LeGO-iG2	eGFP
shRNA für p53	LeGO-C	mCherry

Tabelle II.9.1.1: Übersicht der verwendeten lentiviralen Vektore und den jeweiligen Fluoreszenzmarkern.

Die Anzüchtung der lentiviralen Vektoren wurde in 293T-Zellen durchgeführt. Die Zelllinie 293T ist ein Abkömmling der humanen Nierenepithelzelllinie 293, in die das temperatursensitive Gen für das SV40 (Simian Virus 40) T-Antigen inkloniert wurde. Die resultierende Zelllinie

293T weist sich durch eine hohe Transfektibilität aus und wurde von ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) bezogen. Die Zelllinie 293T wurde in supplementiertem DMEM kultiviert

Die Transduktion basiert auf lentiviralen Vektoren der dritten Generation. Diese Vektoren codieren selber für keine viralen Proteine. Um vollständige Viruspartikel zu erhalten, werden neben dem eigentlichen lentiviralen Vektorkonstrukt auch Hilfsplasmide für die viralen Gene für Gag/Pol, Env und Rev. kotransfiziert (Erklärung siehe Tabelle II.9.1.2). Die transduzierte Zelllinie bildet aus den einzelnen Bausteinen vollständige Viruspartikel und gibt die gebildeten Partikel in das umgebende Medium ab. Die Zelllinie, die zur Herstellung der Viruspartikel verwendet wird, wird als Verpackungszelllinie bezeichnet (Dull et al, 1998; Naldini et al, 1996).

Hilfsplasmid	Erklärung	Beschreibung
Gag/Pol	Gag: Polyprotein; gruppen-spezifisches Antigen (Matrix-, Capsid- und Nukleocapsid-proteine) Pol: Protease, reverse Transkriptase, Integrase	pMDLg/pRRE mit Gag/Pol und <i>Rev Responsive Element</i> (RRE) von HIV-1 unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus (hCMV)-Promotors und dem Polyadenylierungssignal des humanen $\beta$ -Globin-Gens
Env	Envelope (Hüllprotein)	phCMV-VSV-G pBluescript II KS(+) Derivat mit Promotor des humanen Cytomegalievirus (hCMV), $\beta$ -Globin Intron, $\beta$ -Globin Poly-A und VSV-G (vesikuläres Stomatitis Virus G)
Rev	akzessorisches Gen ( <i>regulator of expression of virion proteins</i> )	pRSV-Rev Rev-Element von HIV-1 unter Kontrolle des RSV ( <i>Rous Sarcoma Virus</i> )-Promotors und einem Polyadenylierungssignal

Tabelle II.9.1.2: Erklärung der Hilfsplasmide Gag/Pol, Env und Rev und Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Die Zelllinie 293T wurde mit  $5 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale (Durchmesser 10 cm) ausgesät. Zur Transduktion wurden folgende Plasmide verwendet:

Plasmid	Menge / Petrischale
lentivirales Vektorplasmid	10 – 20 $\mu\text{g}$ /Petrischale
Gag/Pol-Plasmid pMDLg/pRRE	10 $\mu\text{g}$ /Petrischale
Rev-Plasmid pRSV-rev	5 $\mu\text{g}$ /Petrischale
Envelope-Plasmid phCMV-VSV-G	2 $\mu\text{g}$ /Petrischale

Tabelle II.9.1.3: Menge der verwendeten Plasmide pro Petrischale in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Alle 4 Plasmide wurden gemeinsam in 437,5  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend kamen 62,5  $\mu\text{l}$  einer 2 M Calciumchloridlösung dazu. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 500  $\mu\text{l}$  des 2x HBS-Puffer vorgelegt und die Plasmid/Calciumchlorid-Mischung tropfenweise dazugegeben und anschließend für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Das verbrauchte Medium wurde von den 293T Zellen abgenommen und gegen 10 ml Medium mit 25  $\mu\text{M}$  Chloroquine ausgetauscht. Chloroquine wird standardmäßig zur Erhöhung der Transfektionseffizienz verwendet (Luthman und Magnusson, 1983). Die Plasmidlösung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben, die Platten wurden vorsichtig geschwenkt und für 6-12 h in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium in jeder Schale auf 10 ml aufgefüllt.

In den nächsten 48 h wurde zweimal der Zellüberstand, in dem sich die gebildeten Viruspartikel befinden, geerntet: einmal nach 24 h und einmal nach 48 h. Dabei wurde jedes Mal das Medium abgenommen und gegen 10 ml neues Medium ausgetauscht. Das abgenommene Medium wurde mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$  filtriert und in 2 ml Portionen aufgeteilt. 300  $\mu\text{l}$  wurden später zur Bestimmung des Titers verwendet. Alle Proben wurden bei -80 °C gelagert. Nach der zweiten Abnahme des Überstandes wurden die Zellen entsorgt.

## II.9.2 Titration der lentiviralen Vektoren

Die Titration der lentiviralen Vektoren wurde ebenfalls mit der Zelllinie 293T durchgeführt. Dazu wurden in einer 24-Lochplatte pro Loch  $5 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  ausgesät. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen wurde Polybrene in einer Endkonzentration von 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugegeben. Polybrene ist ein kationisches Polymer und wird zur Erhöhung der

Transduktionseffizienz verwendet (Davis et al, 2004). Anschließend wurden die gewonnenen Zellüberstände, die die gebildeten Viruspartikel enthalten, dazugegeben. Um später den Titer sicher berechnen zu können, wurde 0,1 µl, 1 µl, 10 µl und 100 µl der Zellüberstände pro Loch dazupipettiert. Die Platten wurden für 1 h bei 1.000 g und 24 °C zentrifugiert und anschließend in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei allen Löchern das Medium gewechselt. Das frische Medium enthält kein Polybrene. Nach 48 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in entsprechende Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil an transfektierten Zellen wurde in % bestimmt. Am Durchflusszytometer lassen sich alle bei den lentiviralen Vektoren verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe messen. Die zu messende Fluoreszenz richtet sich dabei nach dem zuvor gewählten Vektorkonstrukt (siehe Tabelle II.9.2.1).

Lentiviraler Vektor	Fluoreszenzmarker	Wellenlänge
LeGO-Cer2 (für MDR1)	Cerulean	Exzitation 433 nm/ Emmission 475 nm
LeGO-iG2 (für BCRP1)	eGFP	Exzitation 484 nm/ Emmission 507 nm
LeGO-C (für p53)	mCherry	Exzitation 587 nm/ Emmission 610 nm

Tabelle II.9.2.1: Lentivirale Vektoren, jeweiliger Fluoreszenzfarbstoff und entsprechende Wellenlängen.

Der Titer wird mit folgender Formel berechnet:

$$T = N \cdot P / V$$

Dabei ist T = Titer

N= Anzahl ausgesäter Zellen (50.000)

P= prozentualer Anteil an leuchtenden (transduzierten) zellen

V= verwendetes Volumen des Überstandes

Beispiel:

1 µl des Überstandes führte bei 50.000 Zellen zu 12 % gefärbter (transduzierter) Zellen. Die Rechnung sieht dann wie folgt aus:

$$T = 50.000 \cdot 0,12 / 0,001 \text{ml} = 6 \times 10^6 / \text{ml}$$

Somit liegt der Titer in diesem Beispiel bei  $6 \times 10^6$  Viruspartikel pro ml.



### II.9.3 Transduktion der Zielzellen

Als Zielzelllinien wurden für die Untersuchung von Nutlin-3 die Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 benutzt, für die Untersuchung von Saquinavir und Saquinavir-NO wurde die chemosensitive Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 benutzt. Für die Transduktion wurden auf einer 24 Lochplatte pro Loch  $1 \times 10^5$  /ml Zellen ausgesät.

In Anwesenheit von 8 µg/ml Polybrene wurden die Zellen in entsprechenden MOIs (*multiplicity of infection*) mit den lentiviralen Vektoren transduziert. Eine MOI von 1 gibt an, dass auf jede Zelle ein Viruspartikel kommt. Die hier verwendeten MOIs lagen zwischen 5 und 200.

Die Transduktion der Zelllinie RH30 mit cDNA für MDR1 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Der Erfolg der Transduktion der Zielzelle UKF-NB-3 wurde für die Transduktion mit cDNA für MDR1 bzw. BCRP1 jeweils am Fluoreszenzmikroskop und am Durchflusszytometer bestätigt. Die Transduktion mit shRNA gegen p53 wurde am Fluoreszenzmikroskop und im Western Blot überprüft.

Anschließend wurden die Zellen in supplementiertem IMDM kultiviert und für die beschriebenen Versuche verwendet.

### II.10 Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein IX71 Fluoreszenzmikroskop verwendet. Dabei wurde die Zellkultur erst im Modus „inverse Lichtmikroskopie“ fotografiert und anschließend vom gleichen Ausschnitt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Der Fluoreszenzfarbstoff Cerulean wurde bei einer Wellenlänge von 433 nm Exzitation/475 nm Emission, der Farbstoff eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) bei einer Wellenlänge von 484 nm Exzitation/507 nm Emission und der Farbstoff mCherry bei einer Wellenlänge von 587 nm Exzitation/610 nm Emission angeregt und fotografiert.

### II.11 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine zuerst in einem elektrophoretischen Verfahren aufgetrennt. Hier hat sich die SDS-PAGE (Natriumdocylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) als Standardmethode etabliert. Die Diskontinuier-

liche Gelelektrophorese stellt eine Weiterentwicklung dar, indem dem Trenngel ein anders zusammengesetztes Sammelgel vorangestellt wird. Durch das Sammelgel werden die Proben gestaucht und verdichtet. Nach der Auftrennung im Trenngel werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Western Blot) und anschließend mit spezifischen Antikörpern immunohistochemisch nachgewiesen.

### II.11.1 Proteinextraktion und Messung des Proteingehaltes

In den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>scr</sup> und UKF-NB-3<sup>p53</sup> wurde die p53-Expression überprüft. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit jeweils 1 ml Lysispuffer II für 15 min. auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von Boden gelöst und in ein vorgekühltes Tube überführt. Die Proben wurden für 10 min. bei 600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die extrahierten Proteine befinden, wurde in ein neues Tube überführt (ca. 300-400 µl).

Die Proteinmenge wurde mit Hilfe des DC (Detergent Compatible) Protein Assay bestimmt, der aus Reagenz A, B und S besteht. Der Assay stellt eine Weiterentwicklung der Methode nach Lowry dar (Lowry et al, 1951).

Zur Erstellung einer Standardreihe wurden Lösungen mit unterschiedlichem Proteingehalt verwendet (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/ml Rinderserumalbumin in Lysispuffer I)

Auf einer Mikrotiterplatte wurden von jeder Probe und Standard 5 µl pipettiert (jeweils im Dreifachansatz). Zu jeder Probe wurden 25 µl einer Mischung aus Reagenz A und Reagenz S (50:1) pipettiert und für 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Reagenz B hinzugegeben. Nach weiteren 5 min. wurde die optische Dichte (OD) in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

Aus den Mittelwerten der Standards wurde eine Eichkurve erstellt. Mit ihrer Hilfe wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt. Die Proben wurden mit Lysispuffer I auf den gleichen Proteingehalt eingestellt. Anschließend wurde jeweils 50-100 µl der Proben in neue Reaktionsgefäße überführt und 1:1 mit Laemmlipuffer verdünnt. Der verwendete Laemmlipuffer wurde vor Gebrauch noch mit β-Mercaptoethanol im Verhältnis 20:1 gemischt. Die Proben wurden für 5 min. bei 95 °C im Thermomixer denaturiert. Die Proben können bei -80 °C gelagert werden.

### II.11.2 Gelelektrophorese

Die verwendeten Gele sind Polyacrylamidgele, die aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehen. In einer von AMPS und TEMED katalysierten Polymerisationsreaktion polymerisieren Acrylamid und Bisacrylamid zu einem festen Gel.

Es wurde ein 5 % Sammelgel und ein 8 % Trenngel verwendet (siehe Tabelle II.11.2.1)

	Sammelgel 5 %	Trenngel 8 %
Aqua dest.	2,48 ml	4,3 ml
Acrylamidlg. 30 %	0,58 ml	3,2 ml
Tris/HCl pH 6,8	0,44 ml	/
Tris/HCl pH 8,8	/	4,5 ml
SDS 10%	35 µl	120 µl
AMPS 10 %	24 µl	90 µl
TEMED	4,5 µl	15 µl

Tabelle II.11.2.1 Zusammensetzung des Sammelgels und des Trenngels (Angaben reichen jeweils für zwei Gele).

Zum Gießen der Gele wurden Glasplatten mit 70 % Ethanol und Aqua dest. gesäubert und anschließend mit den Platzhaltern (Spacer) in die entsprechende Halterung eingeklemmt. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Nach 10 min. wurde das Trenngel mit Isopropanol beschichtet. Dies sorgt für eine gleichmäßige und gerade Oberfläche. Sobald das Gel fest war, wurde das Isopropanol entfernt, die Gele wurden zweimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel angesetzt und auf das Trenngel pipettiert. Die Kämme, die die späteren Taschen zum Einbringen der Proben erzeugen, wurden ebenfalls eingesetzt. Nach ca. 45 min. ist das Gel auspolymerisiert. Es kann über Nacht bei 4 ° C aufbewahrt werden.

Die mit Laemmlipuffer versetzten, eingestellten Proben wurden zusammen mit einem Aliquot des Standardproteines (Richtlinie für die Molekularmassen; Marker) und einem Aliquot des Laemmlipuffers für 5 min. bei 95 °C aufgeköcht. Die Gele wurden in die Halterung für die Elektrophorese eingespannt und in die dazugehörigen Kammern gesetzt. Die Kammern wurden

mit 1x Laufpuffer gefüllt. Mit einer Hamiltonpipette wurden die Proben (ca. 20-30  $\mu$ l) in die Taschen pipettiert. Vom Marker wurden 10  $\mu$ l verwendet.

Im ersten Schritt in der Gelelektrophorese wurde eine Stromstärke von 30 mA für 30 min. angelegt. Die Proben werden dabei im Sammelgel zusammengestaucht. Anschließend wurde im zweiten Schritt die Stromstärke auf 60 mA erhöht. Die Proteine werden im kleinmaschigeren Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dieser Prozeß dauerte 2-2,5 h.

### II.11.3 Western Blot und Immunhistochemischer Proteinnachweis

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Transfer). Auf dieser Membran werden die Proteine später immunohistochemisch nachgewiesen.

Ein Gel wurde jeweils gemeinsam mit einer Nitrocellulosemembran zwischen 2 Filterpapiere und 2 Schwämme (Fiberpad) gespannt und in die Vorrichtung für den Blot eingehängt. Die Kammern wurden mit 1x Blotpuffer aufgefüllt. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von 250 mA für 1,5 h eingestellt. Um die dabei entstandene Wärme zu kompensieren, wurden die Vorrichtungen mit Eis bedeckt.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembranen in ein flaches Plastikschälchen mit Aqua dest. überführt. Die Membranen wurden dreimal für jeweils 5 min. mit 1x Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min. mit 1x Blockingpuffer inkubiert. Der Blockingpuffer sättigt dabei alle unspezifischen Bindestellen ab. Danach wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht mit den jeweiligen Erstantikörpern inkubiert (anti- $\beta$  Aktin und anti-p53).  $\beta$ -Aktin ist ein sogenanntes *House Keeping Gen*, das unabhängig von der Behandlung in seiner Expression nicht verändert wird, und wurde als Ladekontrolle benutzt.

Am nächsten Tag wurde die Erstantikörperlösung entfernt und die Membranen dreimal für jeweils 5 min. mit Waschpuffer gewaschen. Optional können die Membranen erneut für 30 min. mit Blockingpuffer inkubiert werden. Anschließend wurde der Zweitantikörper für 1 h bei 4 °C hinzugeben. Der Zweitantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert, die später die Chemolumineszenzreaktion katalysiert (siehe unten).

Abschließend wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 min. mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteine wurde das „ECL Western Blotting Analyses System“ benutzt. ECL steht dabei für *enhanced chemoluminescence*. Bei diesem Verfahren wird Luminol durch das Enzym Meerrettichperoxidase oxidiert und emittiert Photonen (Lichtemission). Durch Phenol wird dieser Vorgang beschleunigt. Die Membranen wurden für 1-2 min. mit jeweils 2 ml der ECL-Lösung inkubiert. Danach wurden die Membranen in einer Filmkassette mit einem

speziellen ECL-Film bedeckt, der durch die abgegebenen Photonen belichtet wird. Die Belichtungszeit ist dabei abhängig von der Expression des nachzuweisenden Proteins und von der Spezifität des Antikörpers. Der belichtete Film wurde abschließend nach Standardmethoden entwickelt, getrocknet und digitalisiert.

### **II.12 Auftrennung des Racemats Nutlin-3 in seine Enantiomere**

Das Racemat Nutlin-3 wurde von Dr. Bernd Kammerer vom Institut für Pharmakologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mittels chiraler Umkehrphasenchromatographie in seine Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin-3b aufgetrennt.

### III. Ergebnisse

#### III.A Saquinavir und Saquinavir-NO

##### III.A.1 Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde wie unter II.5 beschrieben mit Hilfe des MTT-Assays überprüft. In Tabelle III.A.1.1 sind die IC<sub>50</sub>-Werte für alle untersuchten Zellen nach 5 d Inkubation mit Saquinavir und Saquinavir-NO (jeweils in µM) aufgeführt. Für jede Zelle ist zusätzlich der Status von p53 und Expression der ABC-Transporter MDR1 und BCRP1 angegeben.

Zelllinie	Saquinavir IC <sub>50</sub> (µM)	Saquinavir-NO IC <sub>50</sub> (µM)	p53 Mutation <sup>1</sup>	MDR1 <sup>2</sup>	BCRP1 <sup>3</sup>
UKF-NB-3	23,22 ± 6,66	9,40 ± 1,99	Wt	-	-
UKF-NB3 <sup>†</sup> VCR <sup>10</sup>	18,93 ± 4,48	6,62 ± 1,50	+ (C135F)	+	-
RH30	18,67 ± 3,04	8,37 ± 3,79	+ (R273C)	-	-
RH30 <sup>†</sup> VCR <sup>10</sup>	26,67 ± 3,47	12,70 ± 1,85	+ (R273C)	+	-
RT112	26,25 ± 2,32	9,09 ± 1,56	+ (n.b.)	-	-
RT112 <sup>†</sup> PACLI <sup>20</sup>	17,98 ± 2,34	8,77 ± 1,47	n.b.	+	-

Tabelle III.A.1.1: IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO in µM nach 5 d Inkubation.

<sup>1</sup> p53: Wt = keine Mutation (Wildtyp); + = mutiertes p53 (Mutation aufgeführt); + (n.b.) = Mutation nicht näher bestimmt; n.b.: nicht bestimmt

<sup>2</sup> MDR1: + = Überexpression; - = keine Überexpression

<sup>3</sup> BCRP1: + = Überexpression; - = keine Überexpression

Saquinavir-NO zeigte an allen gestesteten Zellen nach 5 d Inkubation geringere IC<sub>50</sub>-Werte (6,62 µM bis 12,70 µM) als Saquinavir (17,98 µM bis 26,67 µM). Dieser Effekt scheint unabhängig von MDR1-Expression und p53-Status der untersuchten Zelllinien zu sein.

### III.A.2 Rolle von p53

Um die Bedeutung von p53 bei der Vermittlung des zytotoxischen Effektes von Saquinavir und Saquinavir-NO näher zu untersuchen, wurden die p53-Wildtyp-Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe des lentiviralen Vektors LeGO-C mit shRNA für p53 transduziert, um die Expression von p53 zu unterdrücken (UKF-NB-3<sup>p53</sup>). Als Kontrolle wurden UKF-NB-3-Zellen mit Hilfe des lentiviralen Vektors LeGO-C mit scrambled-shRNA transduziert (UKF-NB-3<sup>scr</sup>). Der Vorteil des transduzierten Zellmodells liegt darin, dass die untersuchten Zelllinien den gleichen genetischen Hintergrund haben (isogenes Zellmodell). Die Auswirkung einer einzigen Veränderung (im folgenden Abschnitt die verminderte Expression von p53) lässt sich somit spezifisch untersuchen. Im Gegensatz zu transduzierten Zellen finden sich in adaptierten chemoresistenten Zellen meist mehrere Mutationen, deren Auswirkungen sich überschneiden können und somit zum Teil schwer voneinander zu trennen sind.

Die hier verwendeten shRNAs wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff mCherry markiert, so dass eine Überprüfung der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop möglich war.

In Abbildung III.A.2.1 sind lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D und F) von UKF-NB-3<sup>p53</sup> und UKF-NB-3<sup>scr</sup> Zellen einander gegenübergestellt. Als Vergleich wurde auch die untransduzierte Zelllinie UKF-NB-3 fotografiert.

Bei UKF-NB-3 sind keine fluoreszierenden Zellen zu erkennen (B). Im Gegensatz dazu fluoreszieren die transduzierten Zellen UKF-NB-3<sup>p53</sup> und UKF-NB-3<sup>scr</sup> deutlich (D und F), was auf eine erfolgreiche Transduktion schließen lässt (siehe Abbildung III.A.2.1)

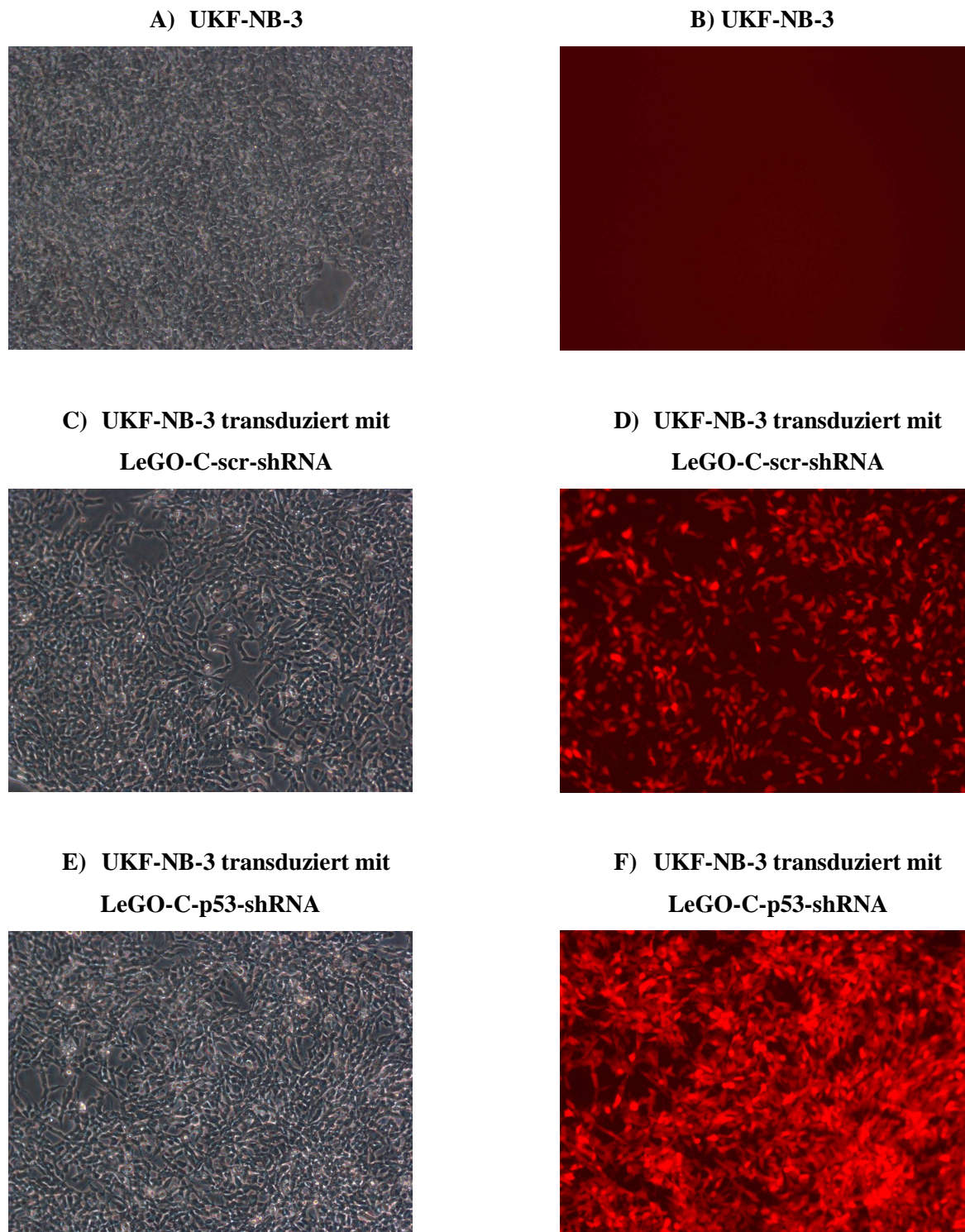


Abbildung III.A.2.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D, und F) von untransduzierten UKF-NB-3-Zellen (A und B), mit lentiviralem Vektor LeGO-C mit scrambled-shRNA transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>scr</sup>; C und D) und mit lentiviralem Vektor LeGO-C für p53-shRNA transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>p53</sup>; E und F).



Im Western Blot wurde überprüft, ob die Transduktion auch zu einer verminderten Expression des Proteins p53 führt (siehe Abbildung III.A.2.2). Als Kontrolle wurde zusätzlich  $\beta$ -Aktin nachgewiesen, um sicherzustellen dass gleiche Mengen an Zelllysate verwendet wurden.

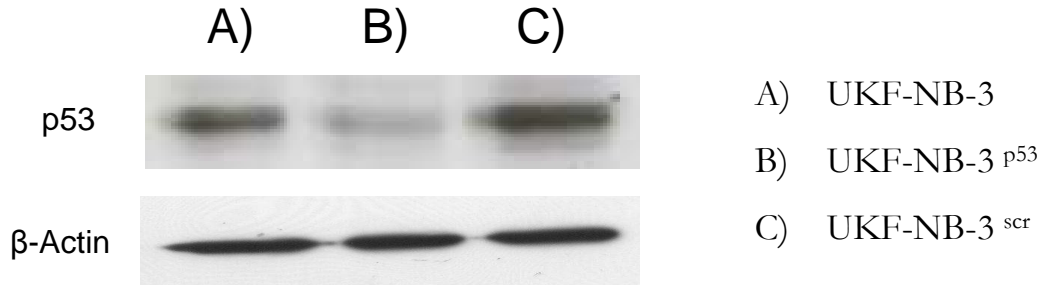


Abbildung III.A.2.2.: Western Blot für p53 mit UKF-NB-3 (A), UKF-NB-3<sup>p53</sup> (B) und UKF-NB-3<sup>scr</sup> (C) Zellen. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

Beim Western Blot ist zu erkennen, dass UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>scr</sup>-Zellen eine deutliche p53-Expression aufweisen (A und C). In UKF-NB-3<sup>p53</sup>-Zellen ist dagegen die p53-Expression deutlich geringer (B). Die Transduktion führt demnach zur deutlichen Abnahme der p53-Expression.

Für die transduzierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>scr</sup> und UKF-NB-3<sup>p53</sup> wurden im MTT-Assay die IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO ermittelt und mit den IC<sub>50</sub>-Werten der Kontrollzelllinie UKF-NB-3 verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.A.2.3 zusammengefasst.

Zelllinie	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir (μM)	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir-NO (μM)
UKF-NB-3	23,22 ± 6,66	9,40 ± 1,99
UKF-NB-3 <sup>scr</sup>	21,28 ± 2,11	9,27 ± 1,74
UKF-NB-3 <sup>p53</sup>	20,24 ± 4,26	9,69 ± 1,27

Tabelle III.A.2.3: IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>p53</sup> und UKF-NB-3<sup>scr</sup>.

Auch hier zeigt Saquinavir-NO geringere  $IC_{50}$ -Werte als Saquinavir (9,27 bis 9,69  $\mu\text{M}$  für Saquinavir-NO gegenüber 20,24 bis 23,22  $\mu\text{M}$  für Saquinavir). Die Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>p53</sup> und UKF-NB-3<sup>scr</sup> zeigen keine Unterschiede in den  $IC_{50}$ -Werten für Saquinavir. Auch bei den  $IC_{50}$ -Werten für Saquinavir-NO ließen sich keine Unterschiede feststellen. Die verminderte Expression von p53 in der Zelllinie UKF-NB-3<sup>p53</sup> hat keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO.

### III.A.3 Überwindung der MDR-1 vermittelten Chemoresistenz durch Saquinavir und Saquinavir-NO

Um den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf chemoresistente MDR1-exprimierende Zelllinien näher zu untersuchen, wurden mehrere Zelllinien mit Zytostatika in Kombination mit Saquinavir oder Saquinavir-NO behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Assay ermittelt.

Die verwendeten chemoresistenten Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> (Neuroblastom), RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> (Rhabdomyosarkom) und RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> (Blasenkarzinom) zeigen jeweils eine deutliche Überexpression von MDR1. Als Kontrolle dienten jeweils die parentalen chemosensitiven MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB-3, RH30 und RT112. Als Substrate für MDR1 wurden die Zytostatika Vincristin, Paclitaxel und Actinomycin D verwendet (Nobili et al, 2006).

Um toxische Effekte auszuschließen zu können, wurden Saquinavir und Saquinavir-NO in gering- bzw. nicht-toxischen Konzentrationen verwendet (Zellviabilität über 75 % der unbehandelten Kontrolle). Diese Konzentrationen wurde für jede Zelllinie ermittelt (siehe Tabelle III.A.3.1).

Zelllinie	Saquinavir ( $\mu\text{M}$ )	Zellviabilität (% Kontrolle)	Saquinavir-NO ( $\mu\text{M}$ )	Zellviabilität (% Kontrolle)
UKF-NB-3	10	86,3 $\pm$ 16,5	5	73,7 $\pm$ 13,9
UKF-NB3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	10	93,9 $\pm$ 5,7	5	77,9 $\pm$ 9,6
RH30	10	96,3 $\pm$ 3,1	2,5	87,1 $\pm$ 15,4
RH30 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	10	96,7 $\pm$ 8,2	5	90,0 $\pm$ 5,2
RT112	10	80,8 $\pm$ 9,9	2,5	81,3 $\pm$ 7,9
RT112 <sup>PACLI</sup> <sup>20</sup>	10	102,6 $\pm$ 9,2	5	78,9 $\pm$ 13,4

Tabelle III.A.3.1: Verwendete Saquinavir- und Saquinavir-NO-Konzentrationen ausgesucht nach Zellviabilität.

An der chemosensitiven MDR1-negativen Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 zeigten sich durch die Kombination mit 10  $\mu\text{M}$  Saquinavir bzw. 5  $\mu\text{M}$  Saquinavir-NO keine bedeutenden Änderungen in den  $\text{IC}_{50}$ -Werten für die einzelnen Zytostatika (1,06 bis 2-fache Absenkung; siehe Tabelle III.A.3.2).

Zytostatikum	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml)	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 10 $\mu\text{M}$ Saquinavir	Verringerung des $\text{IC}_{50}$ - Wertes <sup>1</sup>	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 5 $\mu\text{M}$ Saquinavir- NO	Verringerung des $\text{IC}_{50}$ - Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	0,20 $\pm$ 0,08	0,14 $\pm$ 0,12	1,43	0,10 $\pm$ 0,04	2
Actinomycin D	0,19 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,06	1,06	0,16 $\pm$ 0,05	1,19
Paclitaxel	1,12 $\pm$ 0,35	0,79 $\pm$ 0,35	1,42	0,88 $\pm$ 0,20	1,27

Tabelle III.A.3.2.: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf  $\text{IC}_{50}$ -Werte für einzelne Zytostatika an UKF-NB-3. <sup>1</sup> Quotient aus  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) /  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 10  $\mu\text{M}$  Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) /  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 5  $\mu\text{M}$  Saquinavir-NO.

Im Gegensatz dazu führten die Kombinationen mit 10  $\mu\text{M}$  Saquinavir bzw. 5  $\mu\text{M}$  Saquinavir-NO an der chemoresistenten MDR1-exprimierenden Sublinie UKF-NB3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> bei allen getesteten Zytostatika zu einer Absenkung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte (siehe Tabelle III.A.3.3). Saquinavir-NO verringerte die  $\text{IC}_{50}$ -Werte stärker (13,39 bis 129,97-fache Absenkung) als Saquinavir (3,33 bis 11,75-fache Absenkung).

Zytostatikum	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml)	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 10 $\mu\text{M}$ Saquinavir	Verringerung des $\text{IC}_{50}$ - Wertes <sup>1</sup>	$\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 5 $\mu\text{M}$ Saquinavir- NO	Verringerung des $\text{IC}_{50}$ - Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	40,29 $\pm$ 5,07	3,43 $\pm$ 0,93	11,75	0,31 $\pm$ 0,04	129,97
Actinomycin D	6,58 $\pm$ 1,43	3,18 $\pm$ 1,15	2,1	0,22 $\pm$ 0,02	29,91
Paclitaxel	40,86 $\pm$ 7,48	12,26 $\pm$ 2,23	3,33	3,05 $\pm$ 0,34	13,39

Tabelle III.A.3.3: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf  $\text{IC}_{50}$ -Werte für einzelne Zytostatika an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>. <sup>1</sup> Quotient aus  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) /  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 10  $\mu\text{M}$  Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) /  $\text{IC}_{50}$ -Wert (ng/ml) mit 5  $\mu\text{M}$  Saquinavir-NO.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die chemosensitive Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 und die chemoresistente Sublinie RH30<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup> erzielt. An MDR1-negativen RH30 Zellen führten die Kombinationen mit 10 µM Saquinavir bzw. 2,5 µM Saquinavir-NO zu keinen großen Veränderungen der IC<sub>50</sub>-Werte (1,14 bis 1,75-fache Absenkung, siehe Tabelle III.A.3.4).

Zytostatikum	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir	Verringerung des IC <sub>50</sub> - Wertes <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 2,5 µM Saquinavir- NO	Verringerung des IC <sub>50</sub> - Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	0,56 ± 0,15	0,32 ± 0,07	1,75	0,39 ± 0,13	1,44
Actinomycin D	0,32 ± 0,10	0,28 ± 0,03	1,14	0,23 ± 0,07	1,39
Paclitaxel	4,48 ± 0,51	3,62 ± 0,65	1,24	3,73 ± 0,64	1,20

Tabelle III.A.3.4: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für einzelne Zytostatika an RH30. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 2,5 µM Saquinavir-NO.

An der chemoresistenten MDR1-exprimierenden Sublinie RH30<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup> führten die Kombinationen mit 10 µM Saquinavir bzw. 5 µM Saquinavir-NO dagegen zu einer deutlichen Absenkung der IC<sub>50</sub>-Werte (siehe Tabelle III.A.3.5). Dabei senkte Saquinavir-NO die IC<sub>50</sub>-Werte stärker ab als Saquinavir (8,62 bis 177,19-fache Absenkung bei Saquinavir-NO gegen 1,36 bis 2,14-fache Absenkung bei Saquinavir).

Zytostatikum	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir	Verringerung des IC <sub>50</sub> - Wertes <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 5 µM Saquinavir- NO	Verringerung des IC <sub>50</sub> - Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	37,21 ± 6,89	17,36 ± 3,41	2,14	0,21 ± 0,09	177,19
Actinomycin D	12,85 ± 2,75	4,81 ± 1,39	2,67	1,49 ± 0,17	8,62
Paclitaxel	90,74 ± 10,91	36,93 ± 7,18	2,45	6,77 ± 1,19	13,4

Tabelle III.A.3.5: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für einzelne Zytostatika an RH30<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup>. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 5 µM Saquinavir-NO.

An der Harnblasenkarzinomzelllinie RT112 zeigte sich ein ähnliches Bild. An der chemosensitiven MDR1-negativen RT112 Zelle führten die Kombinationen mit 10 µM Saquinavir bzw. 2,5 µM Saquinavir-NO nur zu geringen Änderungen in den IC<sub>50</sub>-Werten (0,86 bis 1,86-fache Absenkung, siehe Tabelle III.A.3.6).

Im Gegensatz dazu führte die Kombination mit 10 µM Saquinavir an der chemoresistenten MDR1-exprimierenden Sublinie RT112<sup>f</sup>PACLI<sup>20</sup> zu einer 3,79 bis 30,81-fachen Absenkung der IC<sub>50</sub>-Werte, die Kombination mit 5 µM Saquinavir-NO sogar zu einer 4,18 bis 51,43-fachen Absenkung (siehe Tabelle III.A.3.7).

Zytostatikum	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir	Verringerung des IC <sub>50</sub> -Wertes <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 2,5 µM Saquinavir-NO	Verringerung des IC <sub>50</sub> -Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	3,06 ± 0,31	1,70 ± 0,11	1,86	1,93 ± 0,09	1,59
Actinomycin D	1,81 ± 0,14	2,11 ± 0,11	0,86	1,99 ± 0,07	0,91
Paclitaxel	6,76 ± 1,51	6,59 ± 1,37	1,03	6,79 ± 1,41	0,99

Tabelle III.A.3.6: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für einzelne Zytostatika an RT112. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 2,5 µM Saquinavir-NO.

Zytostatikum	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir	Verringerung des IC <sub>50</sub> -Wertes <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert (ng/ml) mit 5 µM Saquinavir-NO	Verringerung des IC <sub>50</sub> -Wertes <sup>2</sup>
Vincristin	62,23 ± 3,18	2,02 ± 0,34	30,81	1,21 ± 0,25	51,43
Actinomycin D	7,65 ± 2,13	1,25 ± 0,11	6,12	1,83 ± 0,55	4,18
Paclitaxel	47,48 ± 6,97	12,53 ± 2,45	3,79	8,07 ± 1,41	5,88

Tabelle III.A.3.7: Einfluss von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für einzelne Zytostatika an RT112<sup>f</sup>PACLI<sup>20</sup>. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 10 µM Saquinavir. <sup>2</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) / IC<sub>50</sub>-Wert (ng/ml) mit 5 µM Saquinavir-NO.

#### III.A.4 Überprüfung des Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter MDR1 mit Hilfe der MDR1-transduzierten Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>

Um den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter MDR1 in einem weiteren Zellmodell zu untersuchen, wurde die Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe des lentiviralen Vektors LeGO-iCer2b mit cDNA für MDR1 transduziert (UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>). Als Kontrolle wurde der lentivirale Vektor Cer2 verwendet (UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>). Wie schon bei der Transduktion von UKF-NB-3 mit lentiviralen Vektoren mit shRNA gegen p53 (siehe III.A.2) liegt der Vorteil des transduzierten Zellmodells darin, dass die transduzierte Zelllinie gemeinsam mit der Kontrollzelllinie ein isogenes Zellmodell darstellen (gleicher genetischer Hintergrund). Die Auswirkung einer einzigen Veränderung (im folgenden Abschnitt die Überexpression von MDR1) lässt sich somit spezifisch untersuchen.

Die hier verwendeten Vektoren waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cerulean gekoppelt, so dass eine Überprüfung der Transduktion im Fluoreszenzmikroskop möglich war.

In Abbildung III.A.4.1 sind lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D und F) von UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> Zellen einander gegenübergestellt. Als Vergleich wurde auch die untransduzierte Zelllinie UKF-NB-3 fotografiert.

Bei UKF-NB-3 sind keine fluoreszierenden Zellen zu erkennen (B). Im Gegensatz dazu fluoreszieren die transduzierten Zellen UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> deutlich (D und F), was auf eine erfolgreiche Transduktion schließen lässt.

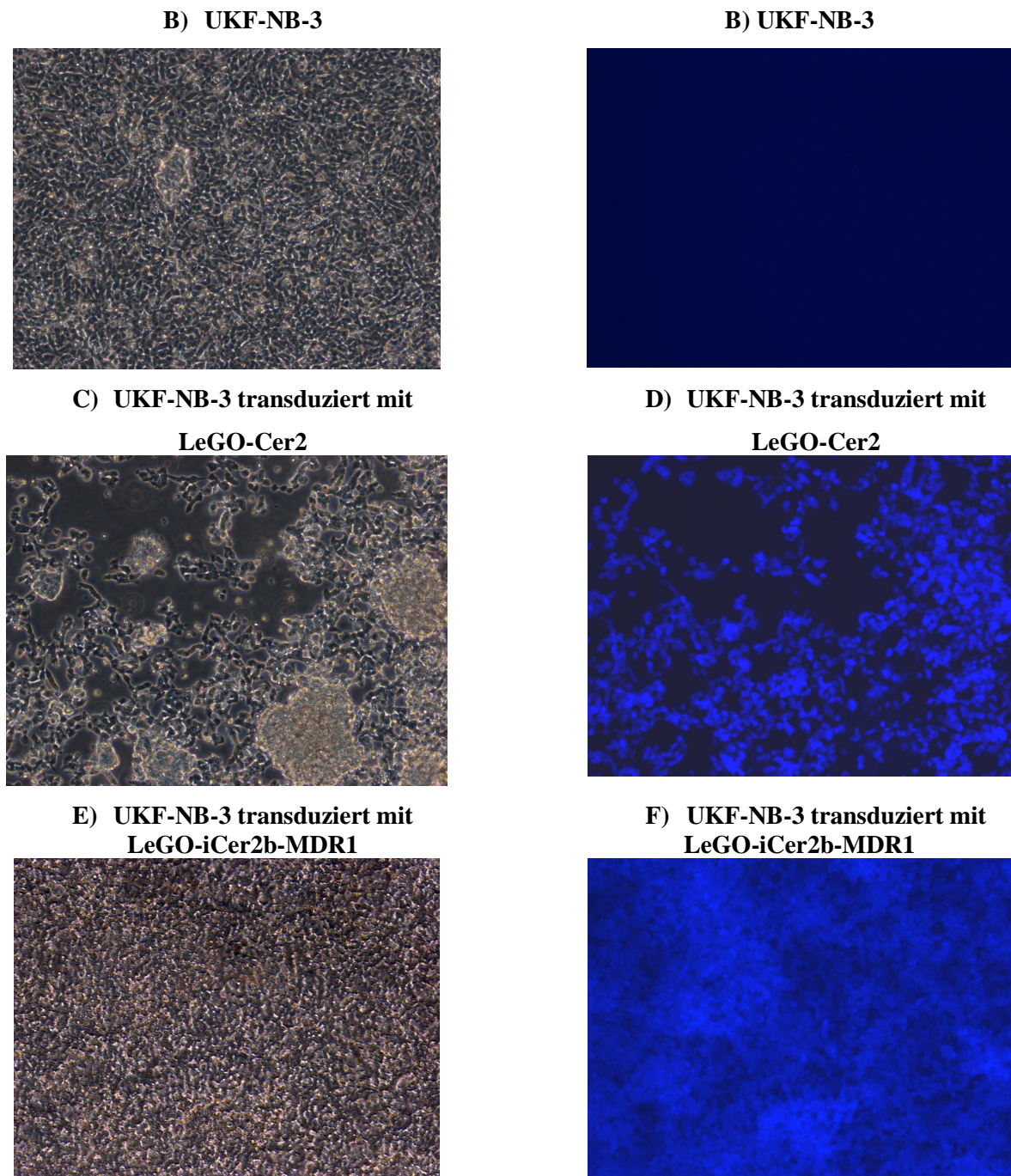


Abbildung III.A.4.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D, und F) von untransduzierten UKF-NB-3-Zellen (A und B), mit lentiviralem Vektor LeGO-Cer2 transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>; C und D) und mit lentiviralem Vektor LeGO-iCer2b mit cDNA für MDR1 transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>; E und F).

Am Durchflusszytometer wurde anschließend die Expression von MDR1 überprüft. Dabei wurde die chemoresistente MDR1-exprimierende Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> als Positivkontrolle verwendet (siehe Abbildung III.A.4.2).

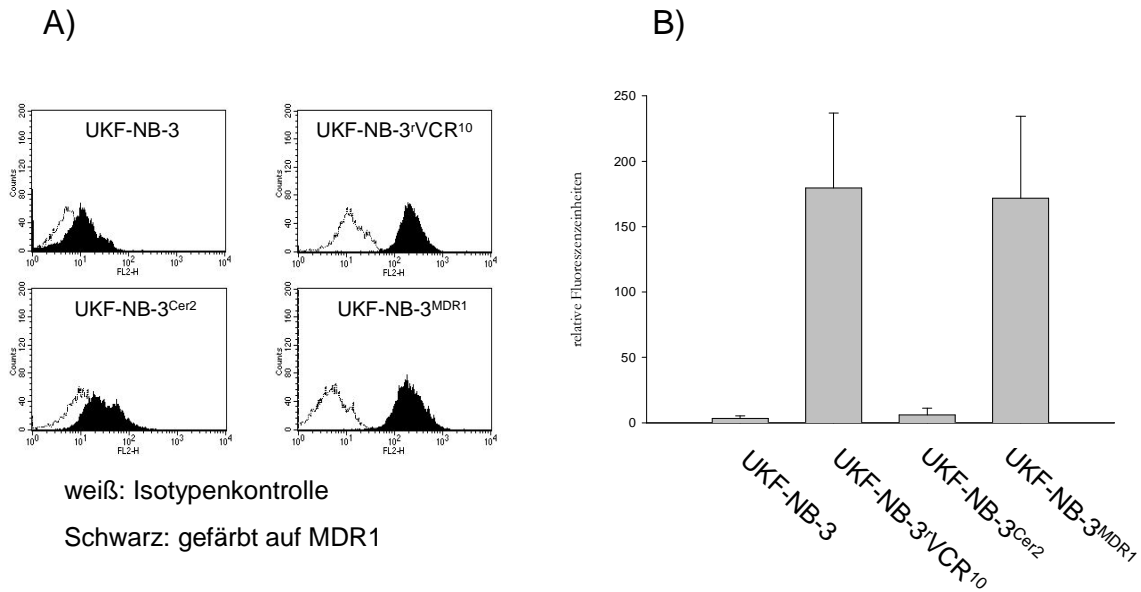


Abbildung III.A.4.2: MDR1-Expression von UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> am Durchflusszytometer. A) Histogramme der 4 Zelllinien. B) Graphische Aufbereitung der Messdaten.

Abbildung III.A.4.2 ist zu entnehmen, dass sowohl die chemoresistente Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> als auch die transduzierte Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> eine deutliche Überexpression von MDR1 zeigen. In A) zeigen beide Zellen im Histogramm eine deutliche Färbung, entsprechend in B) hohe Fluoreszenzwerte.

Im Gegensatz dazu weist die chemosensitive Zelllinie UKF-NB-3 und die mit dem Leervektor transduzierte Zelllinie UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> keine Expression von MDR1 auf. Die Transduktion der cDNA für MDR1 führte demnach in der Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> zu einem spezifischen signifikanten Anstieg der MDR1-Expression. Die MDR1-Expression in der Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> liegt auf gleichem Niveau wie die MDR1-Expression in der chemoresistenten Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>.

Anschließend wurden im MTT-Assay die IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> ermittelt (siehe Tabelle III.A.4.3). Die IC<sub>50</sub>-Werte für Vincristin wurden ebenfalls bestimmt, da Vincristin ein Substrat für MDR1 ist (Nobili et al, 2006).



Zelllinie	IC <sub>50</sub> -Wert Vincristin (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir- NO ( $\mu$ M)
UKF-NB-3	0,20 $\pm$ 0,08	23,22 $\pm$ 6,66	9,40 $\pm$ 1,99
UKF-NB-3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	40,29 $\pm$ 5,07	18,93 $\pm$ 4,48	6,62 $\pm$ 1,50
UKF-NB-3 <sup>Cer2</sup>	0,28 $\pm$ 0,002	21,04 $\pm$ 1,35	10,33 $\pm$ 2,40
UKF-NB-3 <sup>MDR1</sup>	13,17 $\pm$ 1,35	27,77 $\pm$ 5,34	13,45 $\pm$ 2,27

Tabelle III.A.4.3: IC<sub>50</sub>-Werte für Vincristin, Saquinavir und Saquinavir-NO an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>.

Tabelle III.A.4.3 ist zu entnehmen, dass die beiden MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> deutlich höhere IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber Vincristin aufweisen als die MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>.

Die transduzierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> zeigen ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO wie die untransduzierte Kontrollzelllinie UKF-NB-3.

Um auszuschließen, dass sich die Inkubation mit Saquinavir und Saquinavir-NO auf die Expression von MDR1 auswirkt, wurden die Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> mit 10  $\mu$ M Saquinavir bzw. Saquinavir-NO für 5 d inkubiert und anschließend die MDR1-Expression am Durchflusszytometer überprüft (siehe Diagramm III.A.4.4).

Hier wurden keine Unterschiede in der MDR1-Expression nach Inkubation mit Saquinavir bzw. Saquinavir-NO festgestellt.

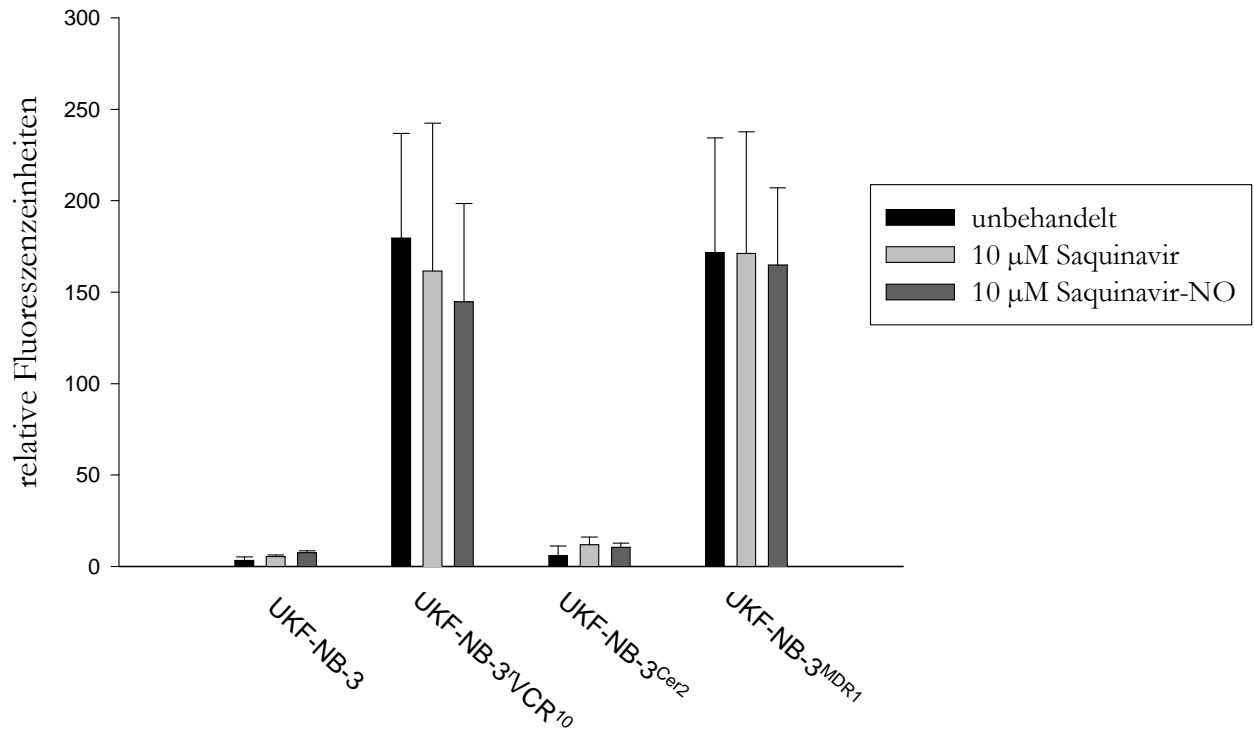


Diagramm III.A.4.4: Expression von MDR1 nach Inkubation mit 10 µM Saquinavir bzw. Saquinavir-NO in den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR<sup>10</sup></sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>.

Mit Hilfe der transduzierten Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> wurde der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die MDR-1 vermittelte Chemoresistenz noch einmal überprüft. Dabei wurde Vincristin als Zytostatikum verwendet. Verapamil ist als Inhibitor des MDR1-vermittelten Effluxes beschrieben (Nobili et al, 2006) und diente als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.A.4.5 zusammengefasst.

Um toxische Effekte ausschließen zu können, wurde für jede verwendete Konzentration von Saquinavir und Saquinavir die Zellviabilität (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) mit angegeben.

Die Positivkontrolle 10 µM Verapamil zeigte eine deutliche Absenkung des IC<sub>50</sub>-Wertes für Vincristin (188-fache Absenkung). Sowohl bei Saquinavir als auch bei Saquinavir-NO war eine konzentrationsabhängige Wirkung zu beobachten. Allerdings zeigte Saquinavir-NO bei allen verwendeten Konzentrationen (10 µM, 5 µM und 2,5 µM) jeweils deutlich stärkere Effekte als Saquinavir. So wurde der IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin durch Saquinavir um das 1,39 bis 4,10-fache abgesenkt. Bei Saquinavir-NO war dagegen eine 3,93 bis 119,73-fache Absenkung zu beobachten.

	Zellviabilität (% Kontrolle)	IC <sub>50</sub> -Werte Vincristin (ng/ml)	Verringerung IC <sub>50</sub> - Werte Vincristin <sup>1</sup>
Vincristin		13,17 ± 1,35	
+ 5 µg/ml Verapamil	88,49 ± 6,22	0,07 ± 0,0036	188,14
+ 10 µM Saquinavir	77,92 ± 6,87	3,21 ± 0,71	4,10
+ 5 µM Saquinavir	89,06 ± 7,03	6,66 ± 1,72	1,98
+ 2,5 µM Saquinavir	101,82 ± 6,21	9,41 ± 2,22	1,39
+ 10 µM Saquinavir-NO	55,88 ± 3,38	0,11 ± 0,0115	119,73
+ 5 µM Saquinavir-NO	75,09 ± 4,48	0,85 ± 0,15	15,49
+ 2,5 µM Saquinavir-NO	95,52 ± 3,78	3,35 ± 0,93	3,93

Tabelle III.A.4.5 Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für Vincristin an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>.

<sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin allein / IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin in jeweiliger Kombination mit Verapamil, Saquinavir bzw. Saquinavir-NO.

### III.A.5 Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den MDR1 vermittelten Efflux von Rhodamin 123

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den MDR1-vermittelten Efflux wurden die Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> mit 1 µM Rhodamin 123 (R123) alleine und in Kombination mit Saquinavir oder Saquinavir-NO inkubiert und die R123-spezifische Fluoreszenz wurde am Durchflusszytometer bestimmt. R123 besitzt eine Eigenfluoreszenz und stellt ein Substrat für MDR1 dar (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993). Auch hier diente Verapamil als Positivkontrolle (Nobili et al, 2006).

In Diagramm III.A.5.1 sind die Ergebnisse für die Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, in Diagramm III.A.5.2 für UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> dargestellt.

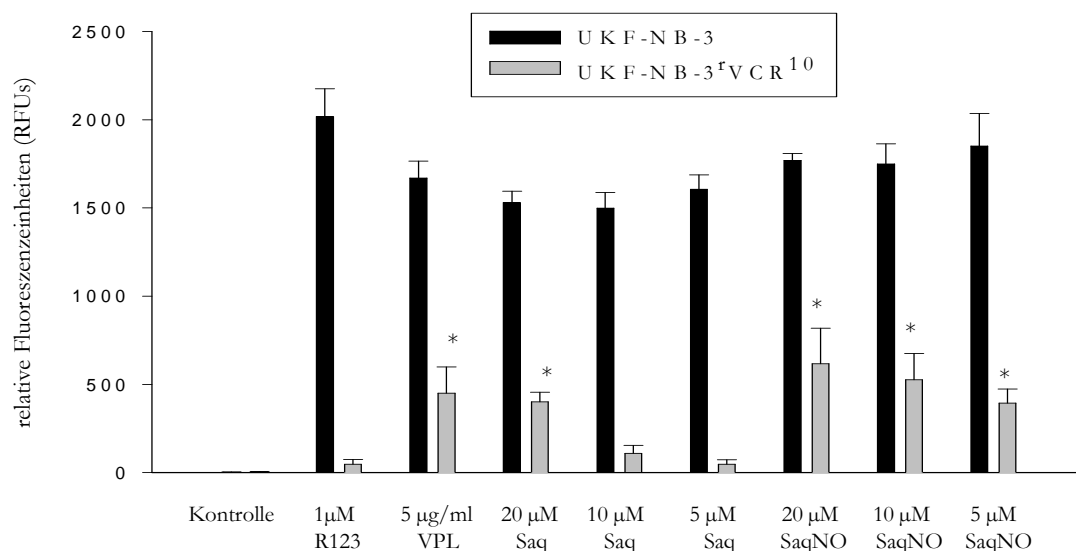


Diagramm III.A.5.1: R123-Assay mit UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>rVCR</sup><sup>10</sup>. R123: Rhodamin 123; VPL: Verapamil; Saq: Saquinavir; Saq-NO: Saquinavir-NO. \* p < 0,01 im Vergleich zur R123-Kontrolle.

In Diagramm III.A.5.1 ist zu erkennen, dass in der MDR1-negativen Zelle UKF-NB-3 eine deutliche Akkumulierung von R123 nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu zeigt die MDR1-exprimierende Zelle UKF-NB-3<sup>rVCR</sup><sup>10</sup> nur eine sehr geringe Fluoreszenz.

In der Zelllinie UKF-NB-3 führte weder die Behandlung mit der Positivkontrolle Verapamil noch die Behandlung mit Saquinavir und Saquinavir-NO zu einer signifikanten Änderung der Fluoreszenz.

An UKF-NB-3<sup>rVCR</sup><sup>10</sup> Zellen dagegen zeigte Verapamil eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz. 20 µM Saquinavir führten ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. Die beiden anderen verwendeten Konzentrationen (10 µM und 5 µM Saquinavir) zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Im Gegensatz dazu führten in UKF-NB-3<sup>rVCR</sup><sup>10</sup>-Zellen alle drei verwendeten Konzentrationen von Saquinavir-NO (20 µM, 10 µM und 5 µM) zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. Die Wirkung von Saquinavir-NO ist somit klar konzentrationsabhängig.

An den Zelllinien UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (siehe Diagramm III.A.5.2). In der MDR1-negativen Zelllinie UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> wurde eine hohe R123-spezifische Fluoreszenz gemessen.

Im Gegensatz dazu zeigte die MDR1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> nur eine sehr geringe Fluoreszenz.

An UKF-NB-3<sup>ppCer2</sup> führte weder die Positivkontrolle Verapamil noch Saquinavir bzw. Saquinavir-NO zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz.

In der MDR1-exprimierenden Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> dagegen führte Verapamil zu einem signifikanten Fluoreszenzanstieg. Auch 20  $\mu$ M Saquinavir erhöhten die R123-spezifische Fluoreszenz signifikant. Bei 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Saquinavir war dagegen nur eine sehr geringe Fluoreszenz detektierbar. Saquinavir-NO erhöhte an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>-Zellen in allen drei verwendeten Konzentrationen (20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) signifikant die Fluoreszenz. Saquinavir-NO zeigt dabei deutlich ein konzentrationsabhängiges Verhalten. Bei Saquinavir lässt sich diesbezüglich an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>-Zellen keine Aussage treffen, da 20  $\mu$ M Saquinavir zwar eine deutliche Wirkung zeigt, bei 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M ist dagegen keine Wirkung mehr nachzuweisen.

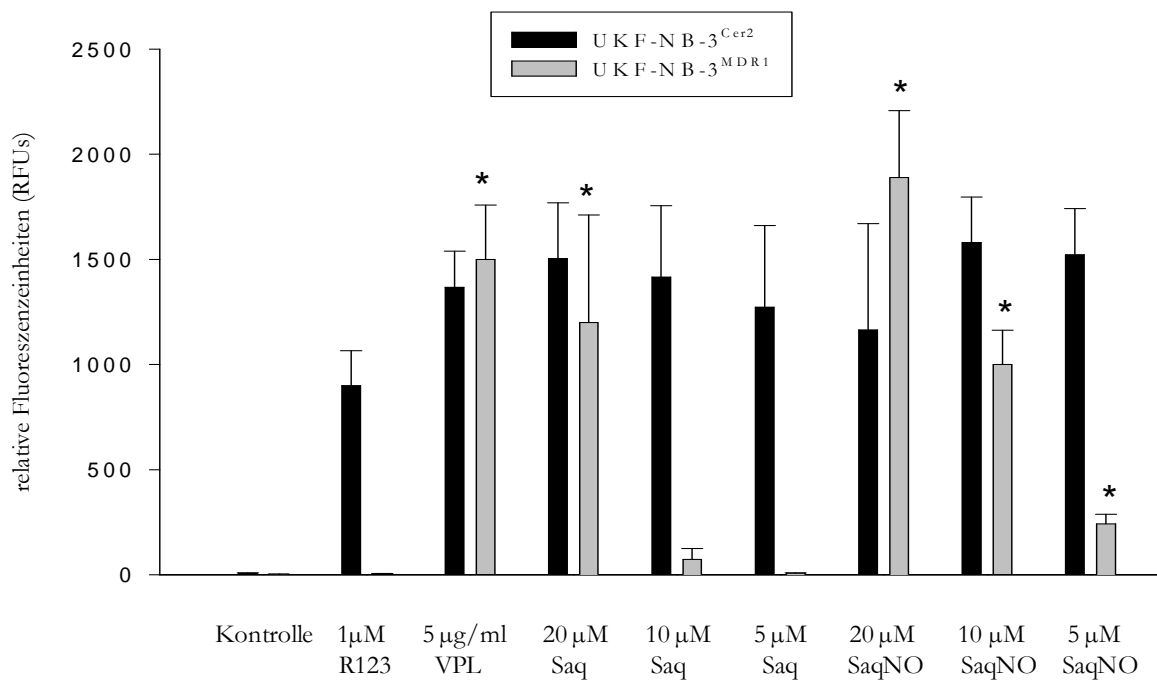


Diagramm III.A.5.2: R123-Assay mit UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>. R123: Rhodamin 123; VPL: Verapamil; Saq: Saquinavir; Saq-NO: Saquinavir-NO. \*  $p < 0,01$  im Vergleich zur R123-Kontrolle.

### III.A.6 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Saquinavir und Saquinavir-NO für den MDR1-vermittelten Efflux von R123

Um die im MTT-Assay und im R123-Assay beobachteten Unterschiede in der Wirksamkeit von Saquinavir und Saquinavir-NO näher zu bestimmen, wurde für beide Substanzen der IC<sub>50</sub>-Wert für den MDR1-vermittelten Efflux von R123 bestimmt (siehe Tabelle III.A.6.1). Der IC<sub>50</sub>-Wert gibt die Konzentration an, bei der im Vergleich zu einer unbehandelten R123-Kontrolle 50 % des MDR1-vermittelten Effluxes von R123 inhibiert sind. Der Versuch wurde an den MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> durchgeführt.

	UKF-NB-3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	UKF-NB-3 <sup>MDR1</sup>
Saquinavir (μM)	9,39 ± 2,81	2,45 ± 0,03
Saquinavir-NO (μM)	0,70 ± 0,14	0,053 ± 0,021

Tabelle III.A.6.1: IC<sub>50</sub>-Werte von Saquinavir und Saquinavir-NO für den MDR1-vermittelten Efflux von R123 an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>.

Saquinavir-NO zeigte an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zellen jeweils deutlich niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte als Saquinavir. Die im MTT-Assay und im R123-Assay beobachteten Unterschiede in der Wirksamkeit von Saquinavir und Saquinavir wurden hier bestätigt.

### III.A.7 Saquinavir und Saquinavir-NO sind Substrate für MDR1

Um zu klären, ob Saquinavir bzw. Saquinavir-NO als allosterische Inhibitoren für MDR1 fungieren oder selber Substrate für MDR1 darstellen, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurde der MDR1-vermittelte Efflux von R123 über einen Zeitraum von 2 h am Durchflusszytometer untersucht (Kinetik). Allosterische ABC-Transporter-Inhibitoren zeigen normalerweise eine lang anhaltende Aktivität, auch nachdem sie aus dem Medium entfernt worden sind. ABC-Transporter-Substrate verlieren dagegen nach dem Auswaschen schnell an Aktivität (Ludwig et al, 2006; Newmann et al, 2000).

Die MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> wurden für 1 h mit

1  $\mu\text{M}$  R123 alleine und in Kombination mit jeweils 10  $\mu\text{M}$  Saquinavir bzw. Saquinavir-NO inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 5  $\mu\text{g/ml}$  Verapamil verwendet. Die R123-spezifische Fluoreszenz wurde nach 0, 5, 15, 30, 60 und 120 min. gemessen. Die Ergebnisse für die Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> sind in Diagramm III.A.7.1 dargestellt, für die UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zelle in Diagramm III.A.7.2.

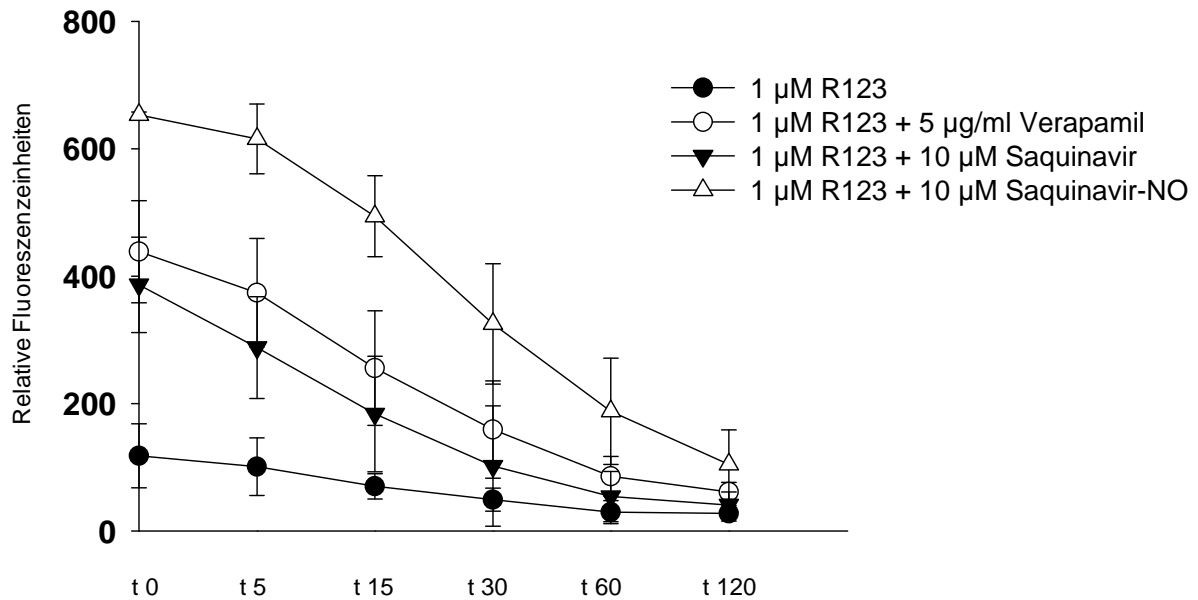


Diagramm III.A.7.1: Kinetik des R123-Effluxes an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>.

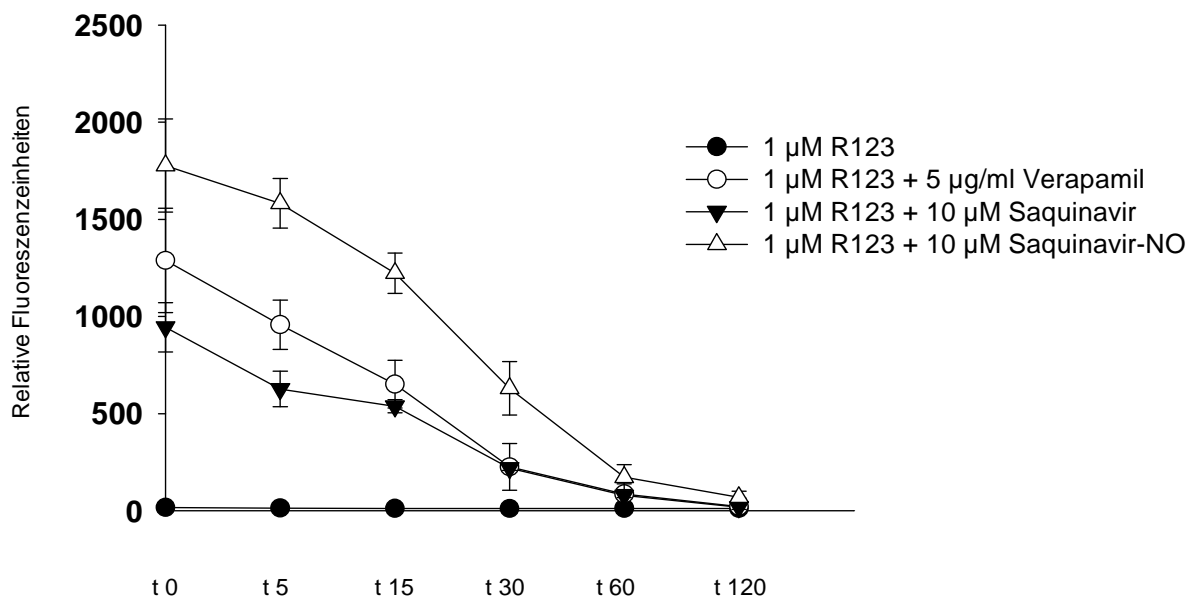


Diagramm III.A.7.2: Kinetik des R123-Effluxes an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>.

Die Positivkontrolle Verapamil führte initial (Zeitpunkt  $t_0$ ) sowohl in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen als auch in UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der R123-Fluoreszenz. Dieser Effekt ließ allerdings über den Verlauf des Versuches nach.

10  $\mu$ M Saquinavir führte sowohl an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> als auch an UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zellen ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der R123-spezifischen Fluoreszenz. Der Effekt von Saquinavir war in beiden Zellen etwas schwächer ausgeprägt als der Effekt von Verapamil. Im Laufe des Versuches ließ auch die Wirkung von Saquinavir nach.

Im Gegensatz dazu führte 10  $\mu$ M Saquinavir-NO sowohl an den UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> als auch an den UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> Zellen zu einem extremen Anstieg der Fluoreszenz. Der Effekt von Saquinavir-NO war in beiden Zellen jeweils deutlich stärker ausgeprägt als der Effekt von Verapamil und Saquinavir. Auch bei Saquinavir-NO ließ in beiden Zellen der inhibierenden Effekt über den Messverlauf hin nach.

Im zweiten Ansatz wurde mit Hilfe des ATPase-Assays die Aktivität der MDR1-ATPase unter Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO bestimmt. Die ATPase-Aktivität wird durch den Transport von Substraten stimuliert. Auch hier diente 5  $\mu$ g/ml Verapamil als Positivkontrolle. Der unbehandelte Versuchspuffer wurde als Kontrolle und als Bezugsgröße verwendet (siehe Diagramm III.A.7.3).

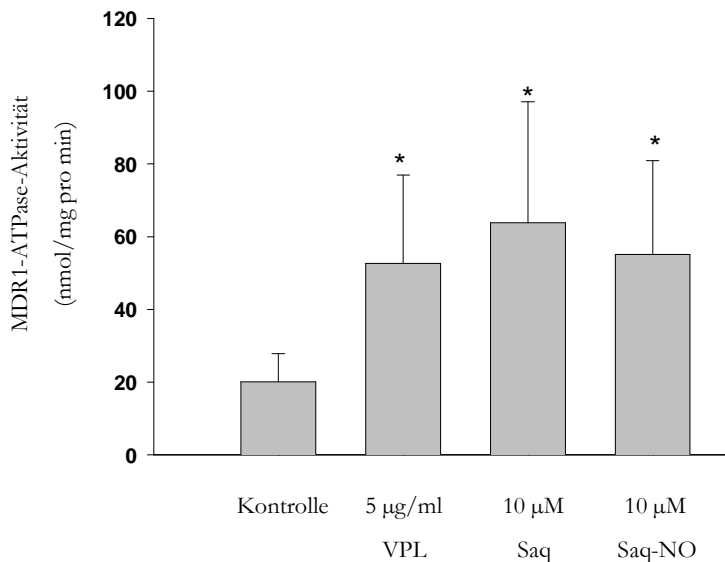


Diagramm III.A.7.3: MDR1-ATPase-Assay. VPL: Verapamil; Saq: Saquinavir; Saq-NO: Saquinavir-NO. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



Saquinavir und Saquinavir-NO wurden jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet und führten genauso zu einem signifikanten Anstieg der MDR1-ATPase-Aktivität wie die Positivkontrolle Verapamil.

Die Daten aus beiden hier vorgestellten Ansätzen lassen den Schluss zu, dass sowohl Saquinavir als auch Saquinavir-NO jeweils ein Substrat für MDR1 darstellen.

### **III.A.8 Überprüfung des Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter BCRP1 mit Hilfe der BCRP1-transduzierten Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>**

Um den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter BCRP1 zu untersuchen, wurde die chemosensitive parentale Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe des lentiviralen Vektors LeGO-iG2 mit cDNA für BCRP1 transduziert (UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>). Als Kontrolle wurde der lentivirale Vektor iG2 verwendet (UKF-NB-3<sup>iG2</sup>).

Wie schon unter III.A.2 und III.A.4 erläutert, liegt der Vorteil des transduzierten Zellmodells darin, dass die untersuchten Zelllinien ein isogenes Zellmodell darstellen (gleicher genetischer Hintergrund). Die Auswirkung einer einzigen Veränderung (im folgenden Abschnitt die Überexpression von BCRP1) lässt sich somit spezifisch untersuchen.

Die hier verwendeten Vektoren waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) gekoppelt, so dass eine Überprüfung der Transduktion im Fluoreszenzmikroskop möglich war.

In Abbildung III.A.8.1 sind lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D und F) von UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> und UKF-NB-3<sup>iG2</sup> Zellen einander gegenübergestellt. Als Vergleich wurde auch die untransduzierte Zelllinie UKF-NB-3 fotografiert.

Bei UKF-NB-3 sind keine fluoreszierenden Zellen zu erkennen (B). Im Gegensatz dazu fluoreszieren die transduzierten Zellen UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> deutlich (D und F), was auf eine erfolgreiche Transduktion schließen lässt.

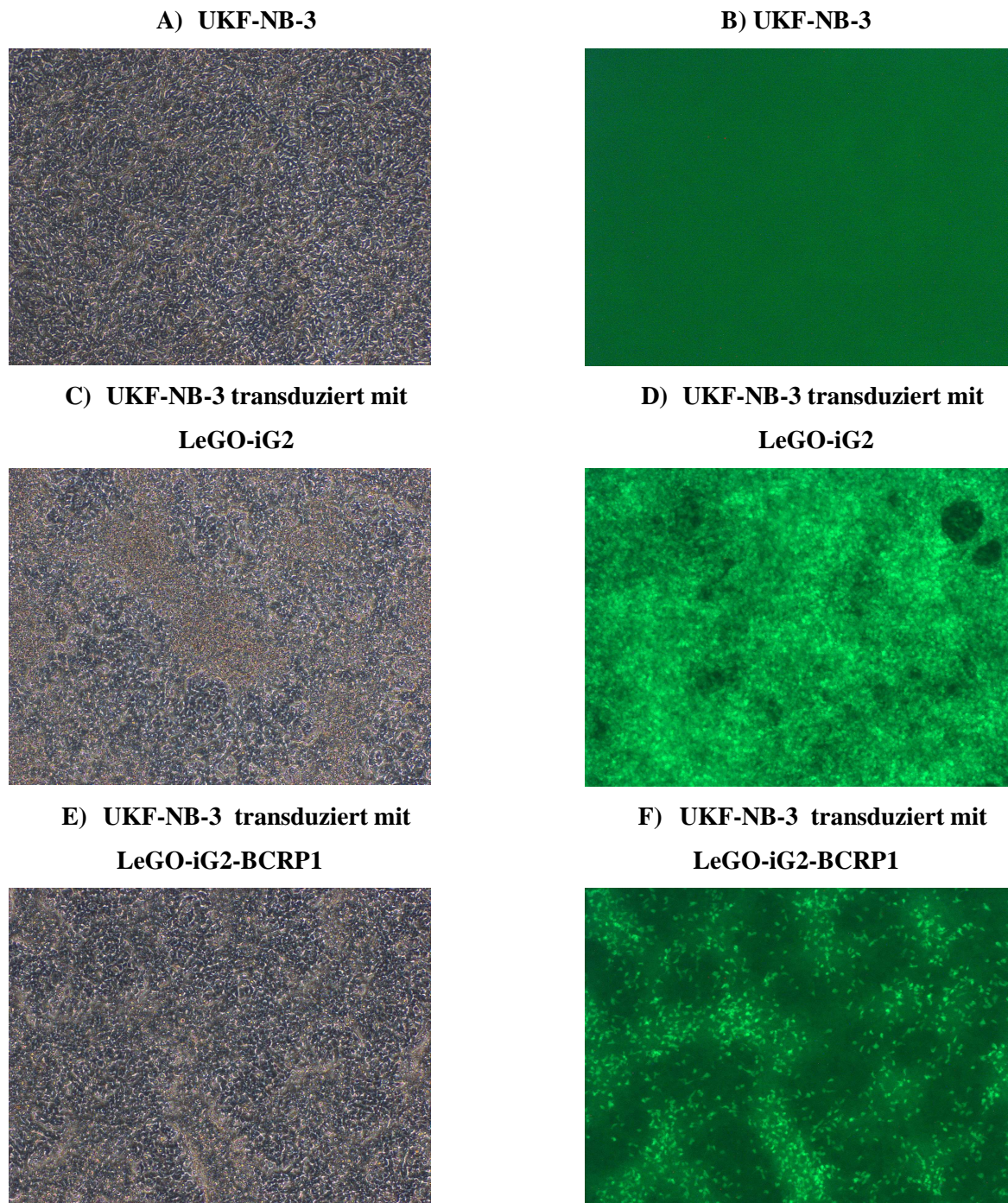


Abbildung III.A.8.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen (A, C und E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D, und F) von untransduzierten UKF-NB-3-Zellen (A und B), mit lentiviralem Vektor LeGO-iG2 transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>iG2</sup>; C und D) und mit lentiviralem Vektor LeGO-iG2 mit cDNA für BCRP1 transduzierten UKF-NB-3-Zellen (UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>; E und F).

Am Durchflusszytometer wurde anschließend die Expression von BCRP1 überprüft (siehe Abbildung III.A.8.2).

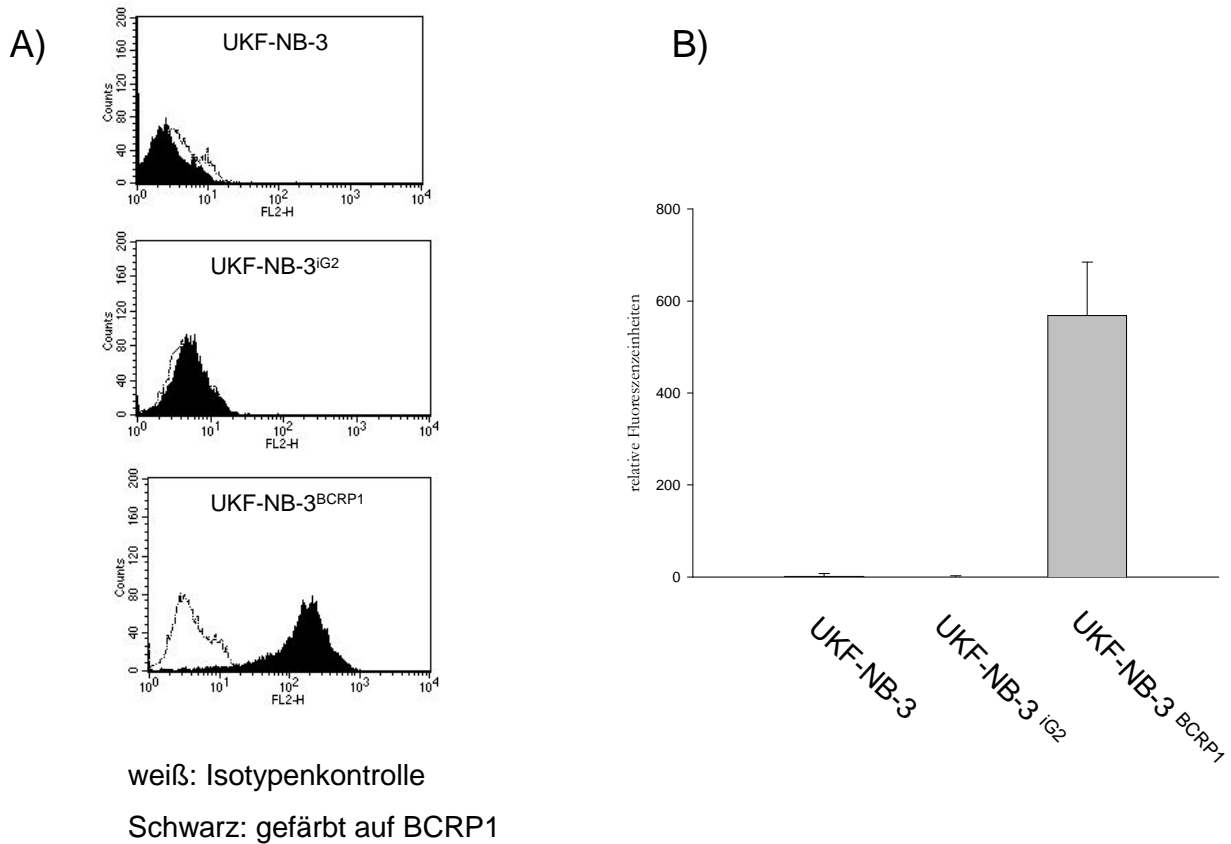


Abbildung III.A.8.2: BCRP1-Expression von UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> am Durchflusszytometer. A) Histogramme der 3 Zelllinien. B) Graphische Aufbereitung der Messdaten.

Abbildung III.A.8.2 ist zu entnehmen, dass die transduzierte Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> eine deutliche Überexpression von BCRP1 zeigt. In A) zeigt die Zelle im Histogramm eine deutliche Färbung, entsprechend in B) hohe Fluoreszenzwerte.

Im Gegensatz dazu weist die chemosensitive Zelllinie UKF-NB-3 und die mit dem Leervektor LeGO-iG2 transduzierte Zelllinie UKF-NB-3<sup>iG2</sup> keine Expression von BCRP1 auf. Die Transduktion mit lentiviralen Vektoren mit cDNA für BCRP1 führte demnach in der Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> zu einem spezifischen signifikanten Anstieg der BCRP1-Expression.

Anschließend wurden im MTT-Assay die IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> ermittelt (siehe Tabelle III.A.8.3). Die IC<sub>50</sub>-Werte für Mitoxantron wurden ebenfalls bestimmt, da Mitoxantron ein Substrat für BCRP1 darstellt (Nobili et al, 2006).

Zelllinie	IC <sub>50</sub> -Wert Mitoxantron (ng/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir (μM)	IC <sub>50</sub> -Wert Saquinavir- NO (μM)
UKF-NB-3	0,018 ± 0,0084	23,22 ± 6,66	9,40 ± 1,99
UKF-NB-3 <sup>iG2</sup>	0,021 ± 0,0056	20,44 ± 3,63	10,05 ± 0,91
UKF-NB-3 <sup>BCRP1</sup>	45,87 ± 7,97	27,50 ± 4,95	11,46 ± 1,23

Tabelle III.A.8.3: IC<sub>50</sub>-Werte für Mitoxantron, Saquinavir und Saquinavir-NO an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>.

Die BCRP1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> zeigt einen deutlich höheren IC<sub>50</sub>-Wert für Mitoxantron als die BCRP1-negativen Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>iG2</sup>.

Die transduzierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> und UKF-NB-3<sup>iG2</sup> zeigen ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte für Saquinavir und Saquinavir-NO wie die untransduzierte Kontrollzelllinie UKF-NB-3.

Um auszuschließen, dass sich die Inkubation mit Saquinavir und Saquinavir-NO auf die BCRP1-Expression auswirkt, wurden die Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> mit 10 μM Saquinavir bzw. Saquinavir-NO für 5 d inkubiert und anschließend die BCRP1-Expression am Durchflusszytometer überprüft (siehe Diagramm III.A.8.4).

Hier wurden keine Unterschiede in der BCRP1-Expression nach Inkubation mit Saquinavir bzw. Saquinavir-NO festgestellt.

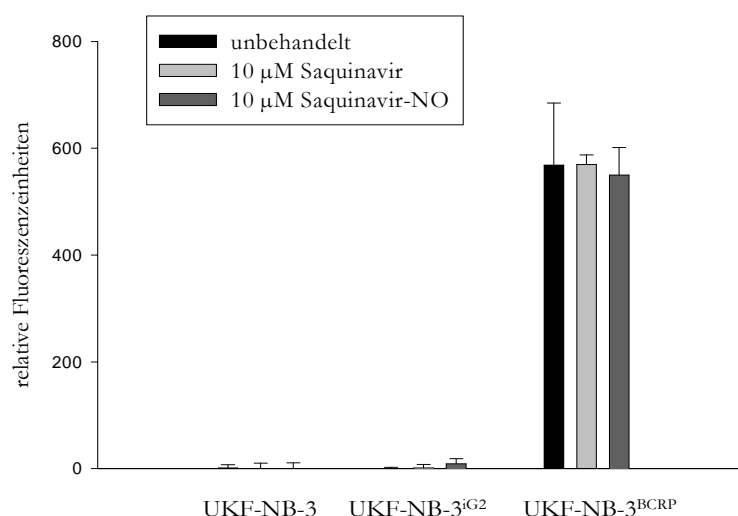


Diagramm III.A.8.4: Expression von BCRP1 nach Inkubation mit 10 μM Saquinavir bzw. Saquinavir-NO in den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>.

An der Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> wurde der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die BCRP1-vermittelte Chemosensitivität überprüft. Dabei wurde Mitoxantron als Zytostatikum verwendet, das ein Substrat für BCRP1 darstellt (Nobili et al, 2006). Als Positivkontrolle wurde WK-X-34 verwendet, das bereits als BCRP1-Inhibitor charakterisiert wurde (Jekerle et al, 2006). Die Ergebnisse sind in Tabelle III.A.8.5 zusammengefasst.

	Zellviabilität (% Kontrolle)	IC <sub>50</sub> -Wert Mitoxantron (ng/ml)	Verringerung IC <sub>50</sub> -Wert Mitoxantron <sup>1</sup>
Mitoxantron		45,87 ± 7,97	
+ 1 µM WK-X-34	89,79 ± 4,92	0,17 ± 0,04	269,82
+ 10 µM Saquinavir	73,55 ± 6,02	12,54 ± 1,88	3,65
+ 5 µM Saquinavir	91,04 ± 11,55	34,77 ± 10,04	1,32
+ 2,5 µM Saquinavir	99,87 ± 8,73	39,66 ± 10,44	1,16
+ 10 µM Saquinavir-NO	52,37 ± 6,98	9,62 ± 3,24	4,77
+ 5 µM Saquinavir-NO	71,68 ± 7,71	19,73 ± 3,64	2,32
+ 2,5 µM Saquinavir-NO	93,44 ± 10,93	37,73 ± 14,21	1,22

Tabelle III.A.8.5: Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf IC<sub>50</sub>-Werte für Mitoxantron an UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert für Mitoxantron allein / IC<sub>50</sub>-Wert für Mitoxantron in jeweiliger Kombination mit WK-X-34, Saquinavir bzw. Saquinavir-NO.

Um toxische Effekte ausschließen zu können, wurde für jede verwendete Konzentration von Saquinavir und Saquinavir die Zellviabilität (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) mit angegeben.

Die Positivkontrolle WK-X-34 zeigt an der Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> eine deutliche Absenkung des IC<sub>50</sub>-Wertes für Mitoxantron (270-fache Absenkung). Saquinavir und Saquinavir-NO zeigen beide jeweils nur eine schwache Wirkung. Bei den 3 verwendeten Konzentrationen 10 µM, 5 µM und 2,5 µM zeigt Saquinavir eine 3,65 bis 1,16-fache Absenkung des IC<sub>50</sub>-Wertes für Mitoxantron. Bei Saquinavir-NO sind die Effekte mit einer 4,77-fachen bis 1,22-fachen Absenkung der IC<sub>50</sub>-Werte geringfügig stärker ausgeprägt als bei Saquinavir.

Da der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf BCRP1 deutlich geringer ausgeprägt ist als der Einfluss auf MDR1, wurden für BCRP1 keine weiterführenden Versuche durchgeführt.

### III.B Nutlin-3

#### III.B.1 Einfluss von Nutlin-3 auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde wie unter II.5 beschrieben überprüft. In Tabelle III.B.1 sind die IC<sub>50</sub>-Werte für alle untersuchten Zellen nach 5 d Inkubation mit Nutlin-3 (µM) aufgeführt. Für jede Zelle ist zusätzlich der Status von p53 und Expression des ABC-Transporters MDR1 angegeben.

Zelllinie	Nutlin-3 IC <sub>50</sub> (µM)	p53 <sup>1</sup> Mutation	MDR1 <sup>2</sup>
UKF-NB-3	1,16 ± 0,23	Wt	-
UKF-NB-3 <sup>r</sup> VCR <sup>10</sup>	> 20	+ (C135F)	+
UKF-NB-3 <sup>r</sup> DOX <sup>20</sup>	2,78 ± 0,51	Wt	+
UKF-NB-4	19,69 ± 0,70	+ (C175F)	+
Be(2)-C	> 20	+ (C135F)	+
UKF-Rhb-1	0,97 ± 0,11	Wt	-
UKF-Rhb-1 <sup>r</sup> VCR <sup>10</sup>	17,63 ± 2,24	+ (K291X)	+
RH30	> 20	+ (R273C)	-
RH30 <sup>r</sup> VCR <sup>10</sup>	> 20	+ (R273C)	+
PC3	> 20	Neg.	-
PC3 <sup>r</sup> VCR <sup>10</sup>	> 20	Neg.	-

Tabelle III.B.1: IC<sub>50</sub>-Werte für Nutlin-3 in µM nach 5 d Inkubation.

<sup>1</sup> p53: Wt = keine Mutation (Wildtyp); + = mutiertes p53 (Mutation aufgeführt); Neg.: Negativ (keine p53-Expression)

<sup>2</sup> MDR1: + = Überexpression; - = keine Überexpression

Zwischen p53-Wildtyp-Zellen und Zellen mit mutiertem p53 zeigten sich nach 5 d Inkubation deutliche Unterschiede in der Sensibilität gegenüber Nutlin-3 (Tabelle III.B.1). So zeigten die drei Zelllinien, die keine p53-Mutation tragen (UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>r</sup>DOX<sup>20</sup> und UKF-Rhb-1)

IC<sub>50</sub>-Werte unter 3 µM Nutlin-3. Alle anderen Zelllinien tragen eine p53-Mutation und zeigen deutlich höhere IC<sub>50</sub>-Werte, zum Teil über 20 µM Nutlin-3. Auch die p53-negativen Zelllinien PC3 und PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> weisen IC<sub>50</sub>-Werte von größer 20 µM Nutlin-3 auf.

Die Expression von MDR-1 scheint dagegen nicht von Bedeutung zu sein.

### III.B.2 Induktion von p53-Zielgenen

UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> wurden nach 8 h Behandlung mit 20 µM Nutlin-3 mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR auf die Expression verschiedener p53-Zielgene (p21, MDM2, GADD45) untersucht.

Nutlin-3 induzierte in den p53-Wildtyp-Zellen UKF-NB-3 signifikant die p53-Zielgene p21, MDM2 und GADD. In den p53-mutierten Zellen UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> hingegen blieb eine Induktion dieser Gene durch Nutlin-3 aus (siehe Diagramm III.B.2.1)

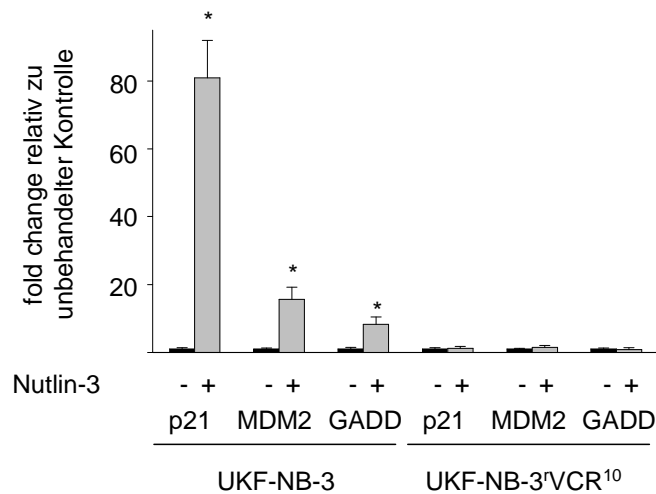


Diagramm. III.B.2.1: Induktion der p53-Zielgene p21, MDM2 und GADD in p53-Wildtyp-Zellen UKF-NB-3 und p53-mutierten Zellen UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> nach 8 h Inkubation mit 20 µM Nutlin-3. \* p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Gleiche Ergebnisse wurden mit den p53-Wildtyp-Zellen UKF-Rhb-1 und den p53-mutierten Zellen UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> nach 8 h Behandlung mit 20 µM Nutlin-3 erzielt (siehe Diagramm III.B.2.2)

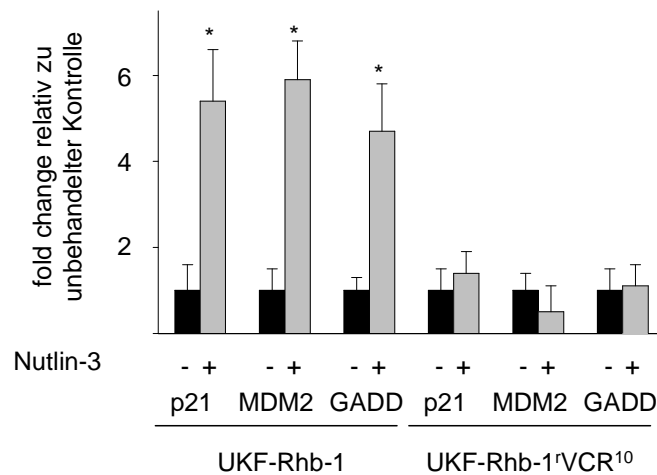


Diagramm. III.B.2.2: Induktion der p53-Zielgene p21, MDM2 und GADD in p53-Wildtyp-Zellen UKF-Rhb-1 und p53-mutierten Zellen UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup>10 nach 8 h Inkubation mit 20  $\mu$ M Nutlin-3. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Auch hier konnte bei den p53-Wildtyp-Zellen UKF-Rhb-1 eine signifikante Induktion der Gene p21, MDM2 und GADD durch Nutlin-3 beobachtet werden. Bei den p53-mutierten Zellen UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup>10 wurde keine signifikante Induktion gemessen.

### III.B.3 Kombination von Nutlin-3 und Zytostatika

Es ist bereits bekannt, dass Nutlin-3 die Wirksamkeit von Zytostatika erhöht (Vassilev et al, 2007). Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup>10 jeweils einzeln mit Vincristin, Nutlin-3 und der Kombination inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach 5 d mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Diagramm III.B.3.1 dargestellt.



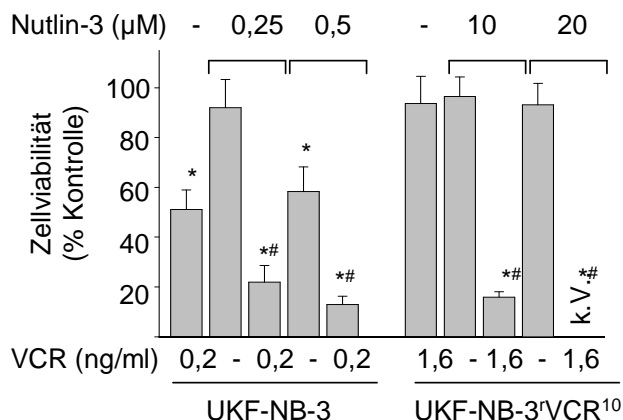


Diagramm III.B.3.1: Viabilität nach 5 d Inkubation mit Vincristin, Nutlin-3 und der Kombination an UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup>10. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich mit beiden Einzelansätzen (gilt nur für die Kombinationsansätze); k.V.: keine Viabilität nachweisbar.

Für die p53-Wildtyp, MDR1-negative Zelle UKF-NB-3 wurden 0,2 ng/ml Vincristin und 0,25 μM bzw. 0,5 μM Nutlin-3 verwendet. Vincristin alleine reduzierte die Zellviabilität signifikant, genauso 0,5 μM Nutlin. Die Kombinationen zeigten im Vergleich mit beiden Einzelansätzen eine signifikante Reduktion der Viabilität. Da aber schon die Einzelansätze eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zur Folge hatten, handelt es sich bei den Kombinationen um additive Effekte.

In scharfem Kontrast dazu stehen die Ergebnisse, die an der p53-mutierten, MDR1-exprimierenden Zelle UKF-NB-3<sup>VCR</sup>10 erhalten wurden (Diagramm III.B.3.1) Hier wurden 1,6 ng/ml Vincristin und 10 μM bzw. 20 μM Nutlin-3 verwendet. Alle Einzelansätze zeigten keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Die Kombinationen aus Nutlin-3 und Vincristin zeigten dagegen sowohl zur unbehandelten Kontrolle als auch im Vergleich mit den Einzelansätzen eine signifikante Reduktion der Viabilität. Bei der Kombination von 1,6 ng/ml Vincristin und 20 μM Nutlin-3, die alleine jeweils keinen Effekt zeigten, konnten keine viablen Zellen mehr nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim Vergleich zwischen der p53-Wildtyp, MDR1-negativen Zelle UKF-Rhb-1 und der p53-mutierten, MDR1-exprimierenden Zelle UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup>10 erhalten (Diagramm III.B.3.2). Bei UKF-Rhb-1 zeigten Vincristin alleine (0,3 ng/ml) und die höhere Nutlin-3-Konzentration (0,5 μM) jeweils signifikante Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Kombinationen waren nur mit der höheren Nutlin-3-Konzentration (0,5 μM) signifikant im Vergleich zu beiden Einzelansätzen.

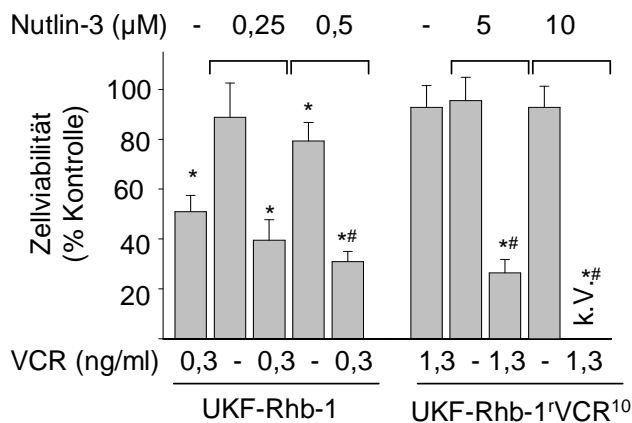


Diagramm III.B.3.2: Viabilität nach 5 d Inkubation mit Vincristin, Nutlin-3 und den Kombinationen an UKF-Rhb-1 und UKF-Rhb-1+VCR<sup>10</sup>. \* p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; # p < 0,05 im Vergleich mit beiden Einzelansätzen (gilt nur für die Kombinationsansätze); k.V.: keine Viabilität nachweisbar.

Bei UKF-Rhb-1+VCR<sup>10</sup> zeigten sowohl Vincristin (1,3 ng/ml) und beide Nutlin-3-Konzentrationen (10 µM und 20 µM) alleine keine Effekte. Die Kombinationen reduzierten hingegen sowohl im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle als auch im Vergleich mit den Einzelansätzen signifikant die Zellviabilität. Auch hier konnten bei der Kombination mit der höheren Nutlin-3-Konzentration (20 µM) keine viablen Zellen mehr nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob der sensitivierende Effekt von Nutlin-3 auch bei anderen Zytostatika außer Vincristin auftritt, wurde die p53-mutierte und MDR1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3+VCR<sup>10</sup> mit 20 µM Nutlin-3 in Kombination mit verschiedenen Zytostatika behandelt (siehe Tabelle III.B.3.3).

Zytostatika	IC <sub>50</sub> -Wert (allein)	IC <sub>50</sub> -Wert mit 20 µM Nutlin-3	Verringerung des IC <sub>50</sub> -Wertes <sup>1</sup>
Doxorubicin (ng/ml)	110 ± 13	9 ± 1	12,1
Paclitaxel (ng/ml)	51 ± 5	1,5 ± 0,2	33,6
Etoposid (ng/ml)	320 ± 47	16 ± 2	19,9
Mitomycin D (ng/ml)	34 ± 3	4,6 ± 0,7	7,5
Actinomycin D (ng/ml)	22,3 ± 2,1	0,34 ± 0,03	65,7
Cisplatin (ng/ml)	178 ± 24	145 ± 22	1,2

Tabelle III.B.3.3: IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Zytostatika an UKF-NB-3+VCR<sup>10</sup> alleine und in Kombination mit 20 µM Nutlin. <sup>1</sup> Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert (allein) / IC<sub>50</sub>-Wert mit 20 µM Nutlin-3.

20  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 zeigte keinerlei Einfluss auf die Zellviabilität von UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> ( $96 \pm 8\%$  Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle). Die gewählten Zytostatika sind mit Vincristin nicht strukturverwandt und weisen einen anderen Wirkmechanismus auf. UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> zeigte aufgrund der MDR1-Überexpression zu den MDR1-Substraten Doxorubicin, Paclitaxel, Etoposide, Mitomycin C und Actinomycin D eine Kreuzresistenz. In der Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 wurde UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> gegen alle MDR1-Substrate stark resensitiviert (Tabelle III.B.3.3). So kam es bei den  $\text{IC}_{50}$ -Werten für die einzelnen Zytostatika in Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 zu einer 7,5-fachen bis 65-fachen Absenkung. Bei Cisplatin, das kein MDR1-Substrat ist, wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

### III.B.4 Einfluss von Nutlin-3 auf MDR1

Um zu überprüfen, ob der an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> beobachtete sensibilisierende Effekt von Nutlin-3 mit der Expression des ABC-Transporters MDR1 zusammenhängt, wurden weitere Neuroblastomzellen in die Untersuchungen einbezogen (siehe Tabelle III.B.4.1). Dabei wurden sowohl MDR1-exprimierende, p53-Wildtyp-Zellen (UKF-NB-3<sup>DOX</sup><sup>20</sup>) als auch MDR1-exprimierende, p53-mutierte Zellen (UKF-NB-4, Be(2)c) verwendet. Zusätzlich wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 verwendet, die kein MDR1 exprimiert und eine p53-Mutation trägt, und die chemoresistente Sublinie RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, die MDR1 exprimiert und ebenfalls eine p53-Mutation trägt.

Die Untersuchungen ergaben, dass nichttoxische bzw. nur moderat toxische Konzentrationen von Nutlin-3 in den p53-Wildtyp, MDR1-negativen Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und UKF-Rhb-1 den  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Vincristin nur leicht absenkte (1,67-fach bzw. 1,61-fach; siehe Tabelle III.B.4.1). Dagegen wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Vincristin in den p53-mutierten, MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-4 und Be(2)c durch Nutlin-3 stark herabgesenkt (92-fach bis 3434-fach; siehe Tabelle III.B.4.1). Auch bei der MDR1-exprimierenden, p53-Wildtyp-Zelle UKF-NB-3<sup>DOX</sup><sup>20</sup> wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Vincristin durch Nutlin-3 gesenkt (28,9-fache Absenkung).

Bei den untersuchten Rhabdomyosarkomzellen zeigten sich ähnliche Effekte. In der p53-mutierten, MDR1-negativen Zelllinie RH30 führten 10  $\mu\text{M}$  Nutlin nur zu einem 3-fach geringeren  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Vincristin, in der p53-mutierten, MDR1-exprimierenden, chemoresistenten Sublinie RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> dagegen zu einer 721-fachen Senkung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes (siehe Tabelle III.B.4.1).

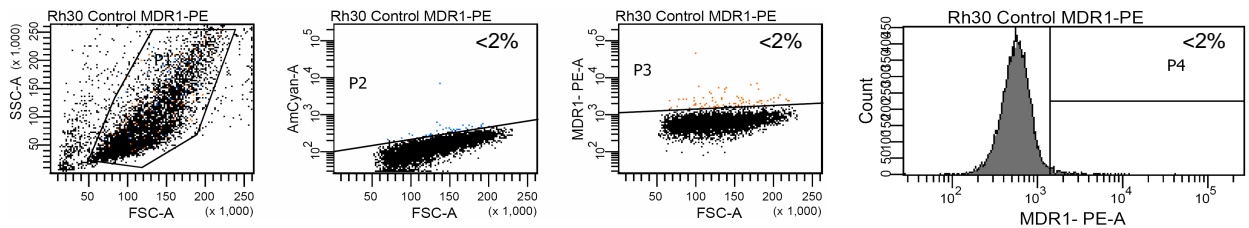
Zelllinie	MDR1 <sup>1</sup>	p53 Mutation <sup>2</sup>	Vincristin IC <sub>50</sub> (ng/ml) <sup>3</sup>	Einfluss von Nutlin-3 auf IC <sub>50</sub> -Wert für Vincristin			
				Nutlin-3 ( $\mu$ M) <sup>4</sup>	Zellviabilität Nutlin-3 (% Kontrolle)	IC <sub>50</sub> Vincristin (ng/ml) mit Nutlin-3	Verringerung IC <sub>50</sub> Vincristin <sup>5</sup>
UKF-NB-3	-	Wt	0.25 $\pm$ 0.03	0.25	92.05 $\pm$ 8.79	0.15 $\pm$ 0.02	1.67
UKF-NB-3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+	+ (C135F)	72.25 $\pm$ 16.88	20	93.17 $\pm$ 11.23	0.17 $\pm$ 0.02	425
UKF-NB-3 <sup>DOX</sup> <sup>20</sup>	+	Wt	198.52 $\pm$ 23.65	1	95.82 $\pm$ 13.51	6.87 $\pm$ 1.71	28.90
UKF-NB-4	+	+ (C175F)	41.57 $\pm$ 8.32	5	100.14 $\pm$ 4.89	0.45 $\pm$ 0.10	92.38
Be(2)c	+	+ (C135F)	37.77 $\pm$ 6.73	20	98.56 $\pm$ 6.42	0.011 $\pm$ 0.002	3434
UKF-Rhb-1	-	Wt	0.37 $\pm$ 0.05	0.5	79.29 $\pm$ 12.61	0.23 $\pm$ 0.03	1.61
UKF-Rhb-1 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+	+ (K291X)	42.67 $\pm$ 7.11	10	85.17 $\pm$ 9.88	0.26 $\pm$ 0.02	164
RH30	-	+ (R273C)	0.30 $\pm$ 0.05	10	72.41 $\pm$ 11.69	0.09 $\pm$ 0.01	3.33
RH30 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup>	+	+ (R273C)	108.21 $\pm$ 16.42	10	71.04 $\pm$ 9.91	0.15 $\pm$ 0.03	721

Tabelle III.B.4.1: Einfluss von Nutlin-3 auf IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin. <sup>1</sup> MDR1: + = Überexpression, - = keine Überexpression; <sup>2</sup> p53-Mutation: Wt = keine Mutation (Wildtyp), + = mutiertes p53 (Mutation aufgeführt); <sup>3</sup> IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin alleine; <sup>4</sup> gewählte Nutlin-3-Konzentration für die Kombinationsansätze mit Vincristin. <sup>5</sup> Quotient IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin / IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin mit Nutlin-3.

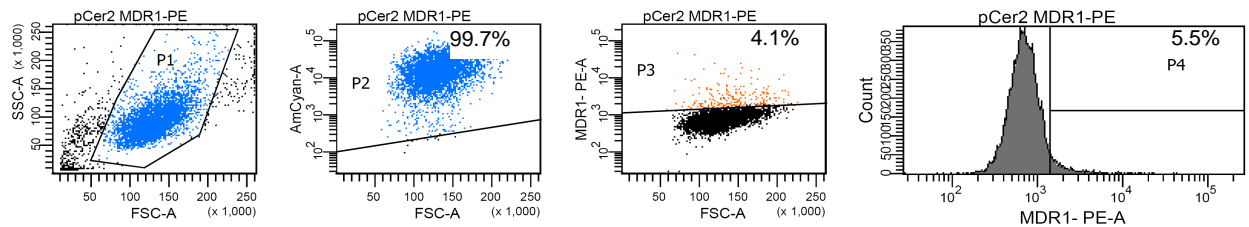
Um den Einfluss von Nutlin-3 an MDR1-exprimierenden und MDR1-negativen Zellen mit dem gleichen p53-Status zu untersuchen, wurden p53-mutierte, MDR1-negative RH30 Zellen mit Hilfe des lentiviralen Vektors LeGO-iCer2b mit cDNA für MDR1 transduziert (RH30<sup>MDR1</sup>). Als Transduktionskontrolle wurden RH30 Zellen mit dem lentiviralen Vektor LeGO-Cer2 transduziert (RH30<sup>Cer2</sup>). Die parentale untransduzierte Zelllinie RH30 wurde als weitere Kontrolle in allen Versuchen mitgeführt. Der Vorteil bei diesem isogenen Zellmodell liegt darin, dass die verwendeten Zelllinien den gleichen genetischen Hintergrund besitzen. So kann die Auswirkung einer einzelnen Veränderung (im folgenden Abschnitt die Überexpression von MDR1) spezifisch untersucht werden (siehe auch III.A.2, III.A.4 und III.A.8).

Am Durchflusszytometer wurde die Transfektion überprüft und gleichzeitig wurden die Zelllinien auf MDR1-Expression untersucht. In Abbildung III.B.4.2 sind die Ergebnisse dargestellt.

**RH30 untransduziert**



**RH30 transduziert mit Cer2 (RH30<sup>Cer2</sup>)**



**RH30 transduziert mit MDR1 (RH30<sup>MDR1</sup>)**

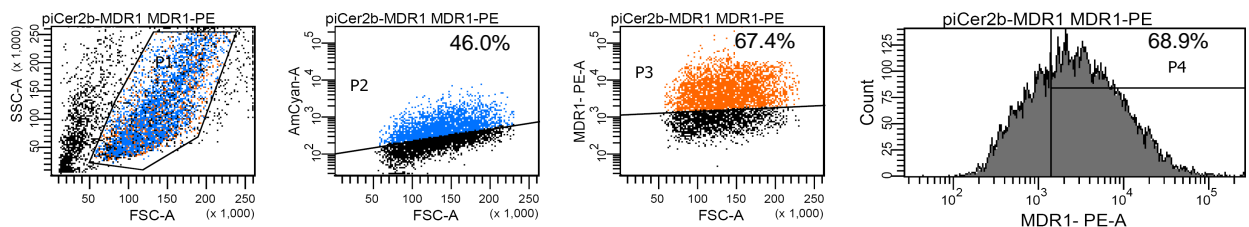


Abbildung III.B.4.2: Überprüfung der Transfektion und Färbung auf MDR1-Expression am Durchflusszytometer FACSCanto II mit RH30, RH30<sup>MDR1</sup> und RH30<sup>Cer2</sup>. Die Transduktionseffizienz ist jeweils im zweiten Bild von links dargestellt (Y-Achse: AmCyan); die Färbung auf MDR1-Expression ist jeweils im rechten Bild zu erkennen.

Der in die lentiviralen Vektoren eingebaute Farbstoff Cerulean wurde an einem Durchflusszytometer FACSCanto II im Kanal für den Farbstoff AmCyan detektiert (in Abbildung III.B.4.2 jeweils zweites Bild von links). Dabei ergab sich für die Zelllinie RH30<sup>Cer2</sup> eine Transduktionseffizienz von über 99 %, für die Zelllinie RH30<sup>MDR1</sup> eine Transduktionseffizienz von nur knapp 50 %. Die Zelllinie RH30<sup>MDR1</sup> zeigt aber im Vergleich mit den Kontrollzelllinien RH30 und RH30<sup>Cer2</sup> eine deutliche MDR1-Expression (in Abbildung III.B.4.2 jeweils rechtes Bild).

In Tabelle III.B.4.3 ist zu erkennen, dass die transduzierten Zelllinien RH30<sup>Cer2</sup> und RH30<sup>MDR1</sup> gleiche IC<sub>50</sub>-Werte für Nutlin-3 aufweisen wie die Kontrollzelllinie RH30. Alle drei Zelllinien zeigen einen IC<sub>50</sub>-Wert von über 20 µM Nutlin-3. RH30<sup>MDR1</sup> zeigte im Vergleich zu den Kontrollzelllinien RH30 und RH30<sup>Cer2</sup> dagegen einen deutlich höheren IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin.

Zelllinie	MDR1 <sup>1</sup>	p53 <sup>2</sup> Mutation	Nutlin-3 IC <sub>50</sub> (µM)	Vincristin IC <sub>50</sub> (ng/ml)
RH30	-	+ (R273C)	> 20	0,30 ± 0,05
RH30 <sup>MDR1</sup>	+	+ (R273C)	> 20	15,43 ± 2,35
RH30 <sup>Cer2</sup>	-	+ (R273C)	> 20	0,42 ± 0,15

Tabelle III.B.4.3: IC<sub>50</sub>-Werte für Nutlin-3 und Vincristin an RH30, RH30<sup>Cer2</sup> und RH30<sup>MDR1</sup>.

<sup>1</sup> MDR1: + = Überexpression, - = keine Überexpression

<sup>2</sup> p53: + = mutiertes p53 (Mutation aufgeführt)

Bei der Kombination von Nutlin-3 mit Vincristin zeigte sich bei RH30<sup>MDR1</sup> Zellen, dass mit der nichttoxischen Konzentration 10 µM Nutlin-3 der IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin um das 110-fache abgesenkt wurde und im Bereich der Kontrollzelllinie RH30 lag (siehe Tabelle III.B.4.4). Bei den Kontrollzelllinien RH30 und RH30<sup>Cer2</sup> hatte die Kombination mit Nutlin-3 jeweils keinen Einfluss auf den IC<sub>50</sub>-Wert gegenüber Vincristin (3,33-fache bzw. 3,50-fache Absenkung).

Zelllinie	Vincristin IC <sub>50</sub> (ng/ml) <sup>1</sup>	Nutlin-3 ( $\mu$ M) <sup>2</sup>	Zellviabilität Nutlin-3 (% Kontrolle)	IC <sub>50</sub> Vincristin (ng/ml) mit Nutlin-3	Verringerung IC <sub>50</sub> Vincristin <sup>3</sup>
RH30	0,30 $\pm$ 0,05	10	72,41 $\pm$ 11,69	0,09 $\pm$ 0,01	3,33
RH30 <sup>MDR1</sup>	15,43 $\pm$ 2,35	10	85,42 $\pm$ 9,28	0,14 $\pm$ 0,02	110
RH30 <sup>Cer2</sup>	0,42 $\pm$ 0,15	10	82,36 $\pm$ 13,11	0,12 $\pm$ 0,03	3,50

Tabelle III.B.4.4 Einfluss von Nutlin-3 auf IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin an RH30, RH30<sup>Cer2</sup> und RH30<sup>MDR1</sup>. <sup>1</sup> IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin alleine; <sup>2</sup> gewählte Nutlin-3-Konzentration für die Kombinationsansätze mit Vincristin. <sup>3</sup> Quotient IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin / IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin mit Nutlin-3.

### III.B.5 Einfluss von Nutlin-3 auf den ABC-Transporter vermittelten Efflux von Fluoreszenzsubstraten

Zur Untersuchung des Einflusses von Nutlin-3 auf den MDR1-vermittelten Efflux wurde das fluoreszierende MDR1-Substrat Rhodamin 123 (R123) verwendet (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5  $\mu$ g/ml Verapamil inkubiert (Nobili et al, 2006).

Nach 1 h Behandlung mit 0,1  $\mu$ M R123 konnte eine R123-spezifische Fluoreszenz in MDR1-negativen UKF-NB-3 Zellen nachgewiesen werden, nicht aber in MDR1-überexprimierenden UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen (Diagramm III.B.5.1).

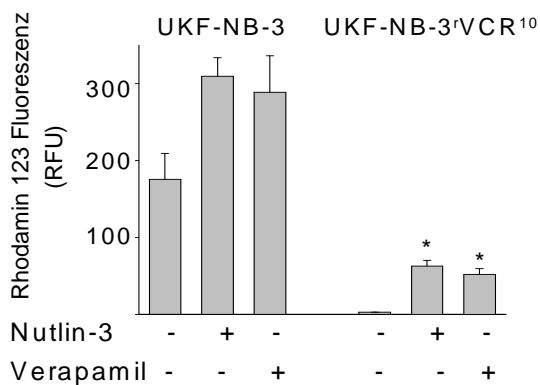


Diagramm III.B.5.1: Rhodamin 123-Akkumulation in UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>. Nutlin-3: 20  $\mu$ M; Verapamil: 5  $\mu$ g/ml. \* p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bei Verwendung von 5 µg/ml Verapamil wurde in den MDR1-exprimierenden UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen ein signifikanter Anstieg in der Akkumulation von R123 gemessen, nicht aber in MDR1-negativen UKF-NB-3 Zellen. Die Behandlung mit 20 µM Nutlin-3 führte in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen ebenfalls zu einer signifikanten Akkumulation von R123. Bei der Zelllinie UKF-NB-3 hatte Nutlin-3 keinen Einfluss auf die R123-Akkumulation.

Zusätzlich wurden die Zelllinien UKF-NB3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> nach Inkubation mit R123 alleine und in Kombination mit 20 µM Nutlin-3 im Fluoreszenzmikroskop fotografiert (siehe Abbildung III.B.5.2). Dabei wurde R123 bei einer Wellenlänge von 488/535 nm (Emission/Exzitation) sichtbar gemacht. Den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Graphen der Durchflusszytometrie gegenübergestellt. Bei den MDR1-negativen UKF-NB-3 Zellen wurde in beiden R123-Ansätzen (mit und ohne 20 µM Nutlin-3) eine Fluoreszenz gemessen. Bei der MDR1-exprimierenden Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> konnte dagegen nur im R123-Ansatz mit 20 µM Nutlin-3 eine R123-spezifische Fluoreszenz detektiert werden. Beim Kontrollansatz R123 alleine war in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen keine Fluoreszenz nachweisbar.

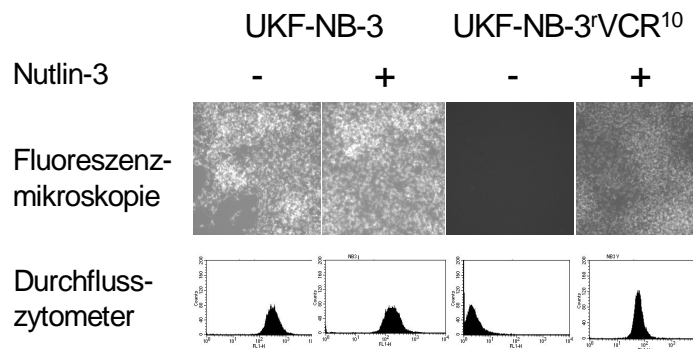


Abbildung III.B.5.2: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen und Graphen von der Durchflusszytometrie von UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> nach Inkubation mit 0,1 µM R123 und 20 µM Nutlin-3.

Des Weiteren wurde die MDR1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> mit 0,1 µM R123 und steigenden Konzentrationen von Nutlin-3 behandelt und am Durchflusszytometer analysiert (Diagramm III.B.5.3). Hier zeigte sich eine durch Nutlin-3 vermittelte konzentrationsabhängige Akkumulierung von R123, die ab 5 µM Nutlin-3 signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war.



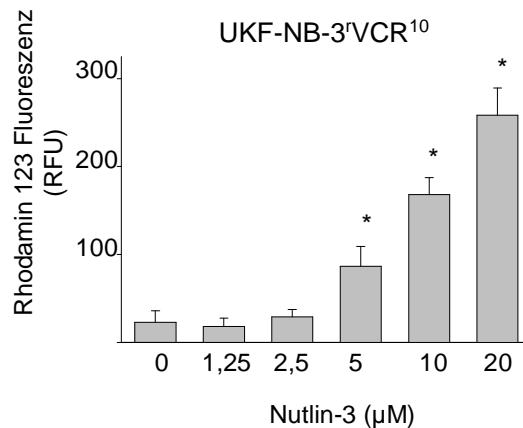


Diagramm III.B.5.3: R123-Akkumulation in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> bei steigenden Nutlin-3 Konzentrationen. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

MRP1 ist ein weiterer ABC-Transporter, der laut Literatur eine Rolle bei der Vermittlung der Chemoresistenz spielt (Calgano et al, 2007; Szakács et al, 2006). Bei UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen ist im Vergleich zu UKF-NB-3 Zellen allerdings MDR1 der am stärksten exprimierte ABC-Transporter. MRP1 zeigt zwischen den Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> keinen signifikanten Unterschied.

Um den Einfluss von Nutlin-3 auf dem ABC-Transporter MRP1 zu untersuchen, wurde die canine Nierenepithelzelllinie MDCKII verwendet, die entweder stabil mit MDR1 (MDCKII<sup>MDR1</sup>) oder mit MRP1 (MDCKII<sup>MRP1</sup>) transfiziert war. Die untransfizierte MDCKII-Zelllinie diente als Vergleichskontrolle. Auch hier liegt der Vorteil des isogenen Zellmodellss darin, dass die Auswirkung einer einzelnen Veränderung (im folgenden Abschnitt die Überexpression von MDR1 bzw. die Überexpression von MRP1) spezifisch untersucht werden kann (siehe auch III.A.2, III.A.4, III.A.8 und III.B.4).

Als Substrat wurde R123 verwendet, da es sowohl von MDR1 als auch von MRP1 transportiert werden kann (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993).

Nach Inkubation mit 2 μM R123 wurde am Durchflusszytometer in beiden transfizierten Zelllinien eine im Vergleich zur Kontrollzelllinie geringere Akkumulation von R123 gemessen, vor allem in MDCKII<sup>MDR1</sup> (siehe Diagramm III.B.5.4)

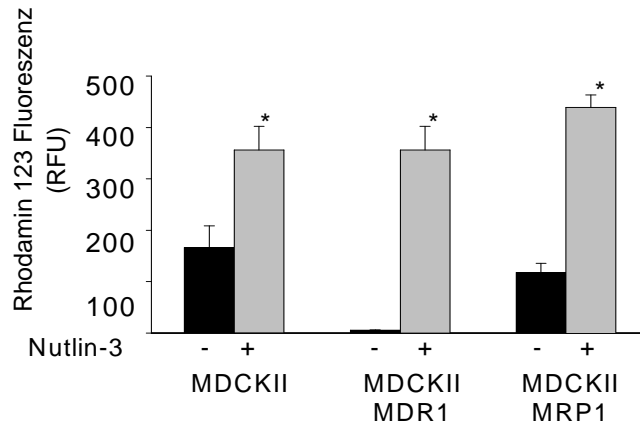


Diagramm III.B.5.4: R123-Akkumulation (2  $\mu$ M) in MDCKII, MDCKII<sup>MDR1</sup> und MDCKII<sup>MRP1</sup> mit und ohne 20  $\mu$ M Nutlin. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Behandlung mit 20  $\mu$ M Nutlin-3 führte in der Kontrollzelllinie MDCKII und in den transfizierten Zelllinien MDCKII<sup>MDR1</sup> und MDCKII<sup>MRP1</sup> zu einer signifikant erhöhten R123-spezifischen Fluoreszenz. In den transfizierten Zelllinien waren die Unterschiede zwischen dem behandelten und unbehandelten Ansatz stärker ausgeprägt als in der untransfizierten Kontrollzelllinie.

Der Effekt von 20  $\mu$ M Nutlin-3 an MDCKII<sup>MDR1</sup> war vergleichbar mit dem Effekt von 5  $\mu$ g/ml Verapamil (siehe Diagramm III.B.5.5).

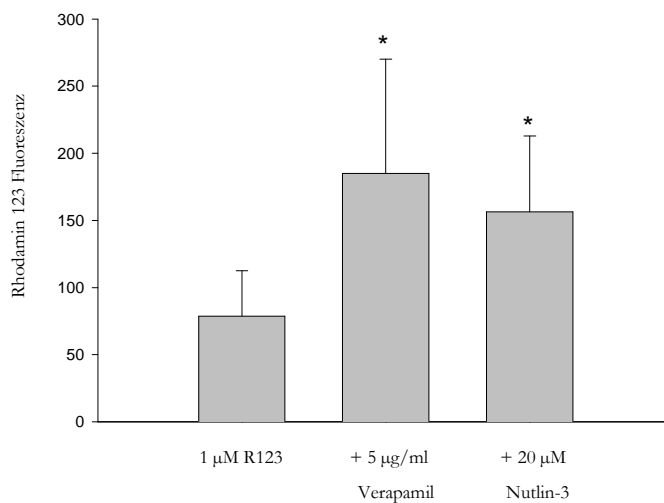


Diagramm III.B.5.5: Vergleich des Einflusses von 5  $\mu$ g/ml Verapamil und 20  $\mu$ M Nutlin-3 auf die R123-Akkumulation in MDCKII<sup>MDR1</sup>-Zellen. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur R123-Kontrolle.

Um den Einfluss von Nutlin-3 auf MRP1 in einem weiteren Model zu untersuchen, wurden die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und die chemoresistente Sublinie PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> verwendet. Beide Zellen sind p53-negativ und zeigen keine MDR1-Expression. PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> exprimiert im Unterschied zu PC3 den ABC-Transporter MRP1.

Der IC<sub>50</sub>-Wert für Nutlin-3 lag für beide Zelllinien bei über 20 µM (siehe Tabelle III.B.1).

Der IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin konnte an PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> durch 20 µM Nutlin-3 von 45,78 ± 3,87 ng/ml auf 15,45 ± 2,21 ng/ml gesenkt werden. Durch den MRP-Inhibitor MK571 (20 µM) wurde der IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin auf 11,57 ± 0,45 ng/ml gesenkt.

Diagramm III.B.5.6 zeigt, dass die Behandlung mit 20 µM Nutlin-3 auch in der MRP1-exprimierenden Zelllinie PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> zu einer Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein-AM führte, der ein Substrat für MRP1 darstellt (Essodaigui et al, 1998). Der Effekt von Nutlin-3 war mit dem Effekt des MRP-Inhibitors MK571 (20 µM) vergleichbar (Borst et al, 2000).

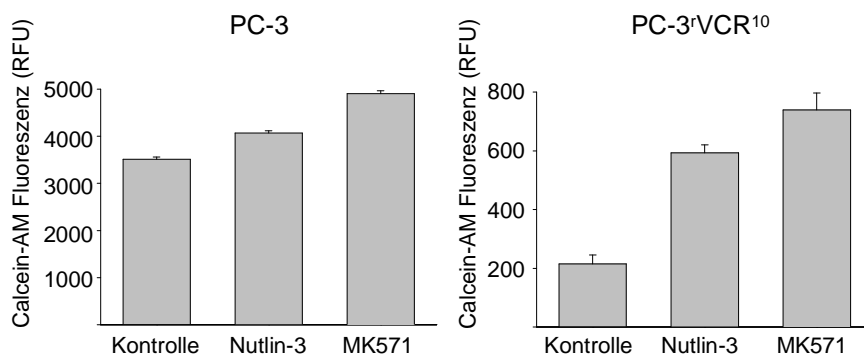


Diagramm III.B.5.6: Akkumulation von Calcein-AM in PC3 (p53- MDR1- und MRP1 negativ) und PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> (p53-, MDR1-negativ, MRP1-Überexpression). Nutlin-3: 20 µM; MK571: 20 µM.

### III.B.6 Nutlin-3 ist ein Substrat für MDR1

Um die Frage zu klären, ob Nutlin-3 als allosterischer Inhibitor für MDR1 fungiert oder ein Substrat für MDR1 darstellt, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt.

Im ersten Ansatz wurde der MDR1-vermittelte Efflux von R123 über einen längeren Zeitraum hinweg untersucht (Kinetik). Allosterische ABC-Transporter-Inhibitoren zeigen eine lang anhaltende Aktivität, auch nachdem sie aus dem Medium entfernt wurden. ABC-Transporter -

Substrate hingegen verlieren nach dem Auswaschen schnell an Aktivität (Ludwig et al, 2006; Newman et al, 2000).

Die MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und MDCKII<sup>MDR1</sup> wurden für 60 min. mit R123 (0,1  $\mu$ M für UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und 2  $\mu$ M für MDCKII<sup>MDR1</sup>) alleine und in Kombination mit 5  $\mu$ g/ml Verapamil bzw. 20  $\mu$ M Nutlin-3 inkubiert. Die R123-spezifische Fluoreszenz wurde nach 0, 15, 30, 60 und 120 min. gemessen. Die Ergebnisse sind in Diagramm III.B.6.1 dargestellt.

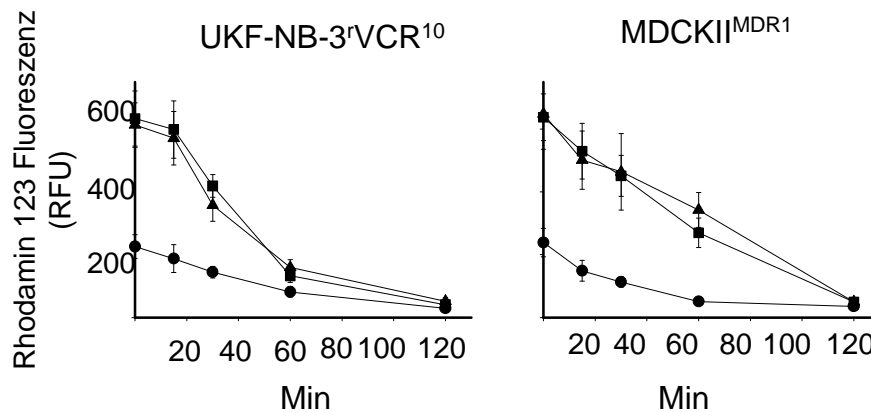


Diagramm III.B.6.1: Kinetik des R123-Auswaschens für UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und MDCKII<sup>MDR1</sup> (●) Rhodamin 123 (UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> 0,1  $\mu$ M; MDCKII<sup>MDR1</sup> 2  $\mu$ M; (■) Rhodamin 123 und 20  $\mu$ M Nutlin-3; (▲) Rhodamin 123 und 5  $\mu$ g/ml Verapamil. Min: Minuten.

Die Behandlung mit 20  $\mu$ M Nutlin-3 und 5  $\mu$ g/ml Verapamil führte in beiden Zelllinien zu einer starken Akkumulation von R123 ( $t_0$  und  $t_{20}$ ). Im weiteren Verlauf nahm die R123-Fluoreszenz für die Ansätze mit Verapamil bzw. Nutlin-3 in beiden Zelllinien jedoch schnell ab.

Nutlin-3 zeigt hier in beiden Zelllinien vergleichbare Eigenschaften wie Verapamil, das als MDR1-Substrat bekannt ist.

Im zweiten Ansatz wurde mit Hilfe des ATPase-Assays die Aktivität der MDR1-ATPase bestimmt. Die ATPase-Aktivität von MDR1 wird durch den Transport von Substraten stimuliert. Auch hier diente Verapamil als Positivkontrolle (5  $\mu$ g/ml).

In Diagramm III.B.6.2 ist zu erkennen, dass 20  $\mu$ M Nutlin die ATPase-Aktivität in gleichem Maße signifikant stimuliert wie die Positivkontrolle 5  $\mu$ g/ml Verapamil.

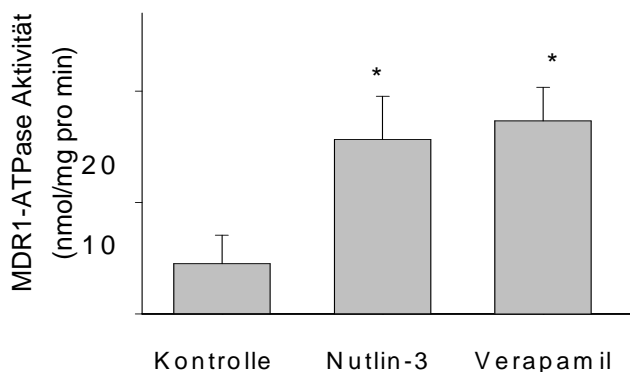


Diagramm III.B.6.2: MDR1-ATPase-Assay. Nutlin-3: 20  $\mu$ M. Verapamil: 5  $\mu$ g/ml. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Aus den Daten der beiden hier vorgestellten Ansätze kann man schließen, dass Nutlin-3 ein Substrat für MDR1 darstellt.

### III.B.7 Einfluss der Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin 3b auf MDR1

Nutlin-3 ist ein Racemat und wurde für spezifischere Untersuchungen in seine beiden Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin-3b aufgetrennt

Beide Enantiomere wurden an der Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> auf den Einfluss auf Zellviabilität (alleine und in Kombination mit Vincristin) und auf den Einfluss auf den MDR1-vermittelten Efflux von R123 untersucht. Abschließend wurde der Einfluss der Enantiomere auf die MDR1-ATPase-Aktivität untersucht.

Bei der Überprüfung der Zellviabilität zeigte sich, dass die Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin-3b bei 10  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Zellviabilität haben (siehe Tabelle III.B.7.1). Der  $IC_{50}$ -Wert für Vincristin wurde durch die Behandlung mit den Enantiomeren in gleichem Maße gesenkt wie durch Behandlung mit dem Racemat Nutlin-3. Nutlin-3a senkte den  $IC_{50}$ -Wert für Vincristin um das 307-fache, Nutlin-3b um das 241-fache ab. Das Racemat Nutlin-3 senkte den  $IC_{50}$ -Wert für Vincristin um das 281-fache (siehe Tabelle III.B.7.1).

	Zellviabilität Nutlin-3 (allein) % Kontrolle	IC <sub>50</sub> Vincristin (ng/ml)	Verringerung IC <sub>50</sub> Vincristin <sup>1</sup>
Ohne Nutlin-3		67.44 ± 13.83	
+ Nutlin-3 (10 µM Racemat)	98.67 ± 13.75	0.24 ± 0.04	281
+ Nutlin-3a (10 µM)	92.14 ± 10.23	0.22 ± 0.04	307
+ Nutlin-3b (10 µM)	103.71 ± 12.63	0.28 ± 0.02	241

Tabelle III.B.7.1: Einfluss der Racemate Nutlin-3a und Nutlin-3b auf Zellviabilität und IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>. 1: Quotient aus IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin ohne Nutlin / IC<sub>50</sub>-Wert Vincristin mit 10 µM Nutlin.

Die Untersuchungen am Durchflusszytometer zeigten, dass die Behandlung der Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> mit den Enantiomeren Nutlin-3a und Nutlin-3b zu einer signifikanten Akkumulation von Rhodamin 123 führte (siehe Diagramm III.B.7.2). Beide Enantiomere zeigten dabei gleich starke Effekte wie das Racemat Nutlin-3.

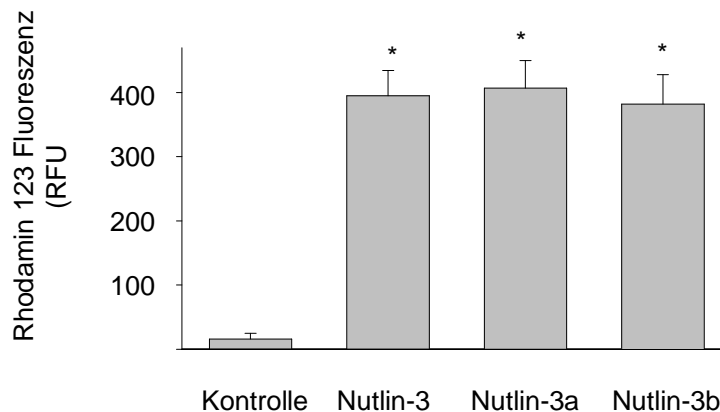


Diagramm III.B.7.2: R123-Akkumulation mit 20 µM Nutlin-3, 20 µM Nutlin-3a und 20 µM Nutlin-3b an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>. \* p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Im MDR1-ATPase-Assay führten beide Enantiomere zu einer signifikanten Aktivierung der MDR1-ATPase (Diagramm III.B.7.3) und zeigten keinen Unterschied zum Racemat Nutlin-3.

### III. Ergebnisse – Nutlin-3

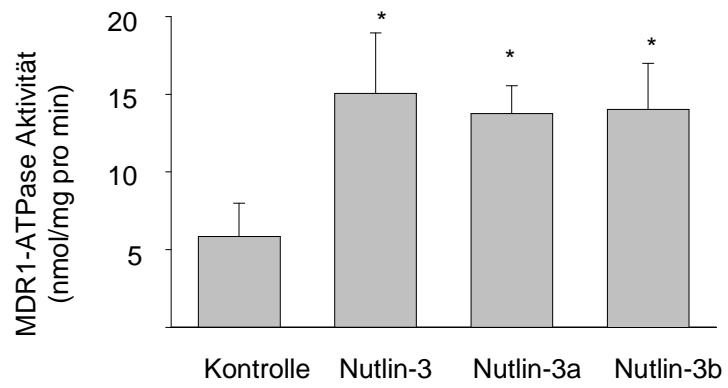


Diagramm III.B.7.3: MDR1-ATPase-Aktivität mit 20  $\mu$ M Nutlin, 20  $\mu$ M Nutlin-3a und 20  $\mu$ M Nutlin-3b. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

## IV. Diskussion

### IV.A Saquinavir und Saquinavir-NO

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf chemosensitive und chemoresistente Neuroblastomzelllinien untersucht. Dabei stand vor allem der Einfluss auf die durch die ABC-Transporter MDR1 und BCRP1 vermittelte Chemoresistenz im Vordergrund. Für Saquinavir wurde schon mehrfach ein Einfluss sowohl auf MDR1 (Lee et al, 1998; Washington et al, 1998) als auch auf BCRP1 (Gupta et al, 2004; Weiss et al, 2007) beschrieben. Für Saquinavir-NO, ein Nitrit-oxid-modifizierter Abkömmling von Saquinavir (Maksimovic-Ivanic et al, 2009), liegen diesbezüglich noch keine Daten vor. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Saquinavir-NO auf MDR1 und BCRP1 untersucht und direkt mit Saquinavir verglichen.

Saquinavir und Saquinavir-NO reduzierten in chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzelllinien (UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>), Rhabdomyosarkomzelllinien (RH30, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup>) und Harnblasenkarzinomzelllinien (RT112, RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup>) die Zellviabilität um 50 % in den Bereichen von 17  $\mu$ M bis 26  $\mu$ M (Saquinavir) bzw. von 6  $\mu$ M bis 12  $\mu$ M (Saquinavir-NO). Dabei zeigte Saquinavir-NO an allen Zelllinien stärkere Effekte als Saquinavir. Dies deckt sich mit der Originalarbeit über Saquinavir-NO, in der für Saquinavir-NO stärkere antitumorale Effekte beschrieben wurden als für Saquinavir (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Dabei spielt die Freisetzung von Nitritoxid (NO) bei der beobachteten Zytotoxizität keine Rolle. Die Autoren der Originalarbeit über Saquinavir-NO vermuten, dass der durch Saquinavir-NO vermittelte Zellzyklusarrest essentiell für die antitumorale Wirkung von Saquinavir-NO ist (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Die genauen Mechanismen, über die Saquinavir-NO seine antitumorale Wirkung vermittelt, sind noch nicht geklärt und waren auch nicht Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit. Zur Klärung dieser Effekte sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die Expression von MDR1 in den untersuchten chemoresistenten Zelllinien spielte bei der antiproliferativen Wirkung von Saquinavir bzw. Saquinavir-NO keine Rolle. So zeigten beide Substanzen an MDR1-negativen Zelllinien (UKF-NB-3, RH30, RT112) jeweils gleiche Effekte wie an MDR1-exprimierenden Zelllinien (UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup>).

Auch die Expression von p53 hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von Saquinavir und Saquinavir-NO. So wurden an Zelllinien mit Wildtyp-p53 (UKF-NB-3) ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte für



Saquinavir und Saquinavir-NO ermittelt wie an Zelllinien mit mutiertem p53 (UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RH30, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup>).

Um den Einfluss von p53 eingehender zu untersuchen, wurde die chemosensitive, p53-Wildtyp-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe lentiviraler Vektoren mit shRNA gegen p53 transduziert (UKF-NB-3<sup>p53</sup>). Als Kontrolle wurden UKF-NB-3 Zellen mit einer scrambled-shRNA (scr-shRNA) transduziert (UKF-NB-3<sup>scr</sup>).

Die Verwendung von transduzierten Zellen bietet den Vorteil, dass die transduzierten Zellen den gleichen genetischen Hintergrund haben wie die untransduzierte Kontrollzelllinie. Dieses Zellmodell wird deshalb als isogen bezeichnet. Die Auswirkung einer einzelnen Veränderung lässt sich in einem isogenen Zellmodell spezifischer als an chemoresistenten Zelllinien untersuchen. Bei der Adaption von Tumorzellen an Zytostatika können im Laufe der Adaption mehrere Mutationen in den Tumorzellen auftreten. Die etablierte chemoresistente Tumorzelllinie weist am Ende unterschiedliche Mutationen und Resistenzmechanismen auf, deren Auswirkungen sich zum Teil überschneiden können und somit schwer voneinander zu unterscheiden sind. Die chemoresistente Tumorzelllinie ähnelt dafür mehr dem klinischen Bild eines Tumors, der während einer Chemotherapie eine Resistenz entwickelt. So haben sowohl das isogene als auch das chemoresistente Zellmodell gewisse Vorteile und die Verwendung von beiden Zellmodellen kann unterschiedliche Fragestellungen klären.

Am Fluoreszenzmikroskop wurde die Transduktion der Zelllinien UKF-NB-3<sup>scr</sup> und UKF-NB-3<sup>p53</sup> bestätigt. Im Western Blot konnte die spezifisch verminderte Expression von p53 in der Zelllinie UKF-NB-3<sup>p53</sup> nachgewiesen werden.

Für die p53-negative Zelllinie UKF-NB-3<sup>p53</sup> und die Kontrollzelllinie UKF-NB-3<sup>scr</sup> wurden für Saquinavir bzw. Saquinavir-NO die gleichen IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt wie für die Zelllinien UKF-NB-3 (p53-Wildtyp) und UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> (mutiertes p53). Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt somit bei der Vermittlung des antiproliferativen Effektes von Saquinavir und Saquinavir-NO keine Rolle.

An chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzelllinien (UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>), Rhabdomyosarkomzelllinien (RH30, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup>) und Harnblasenkarzinomzelllinien (RT112, RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup>) wurde anschließend der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die MDR1-vermittelte Chemoresistenz untersucht. Die chemoresistenten Zelllinien zeigen im Unterschied zu ihren jeweiligen chemosensitiven parentalen Zelllinien eine deutliche MDR1-Überexpression.

Für drei Zytostatika (Vincristin, Paclitaxel und Actimycin D) wurden an allen Zelllinien die IC<sub>50</sub>-Werte alleine und in Kombination mit Saquinavir oder Saquinavir-NO bestimmt. Die

verwendeten Zytostatika sind Substrate für MDR1 (Nobili et al, 2006). Saquinavir und Saquinavir-NO wurden in nicht-toxischen bzw. nur moderat toxischen Konzentrationen eingesetzt.

An den chemosensitiven, MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB3, RH30 und RT112 zeigten sich für die drei getesteten Zytostatika durch Kombination mit Saquinavir bzw. Saquinavir-NO keine bedeutenden Änderungen in den  $IC_{50}$ -Werten im Vergleich mit den  $IC_{50}$ -Werten für das jeweilige Zytostatikum alleine. Dagegen wurden die  $IC_{50}$ -Werte der einzelnen Zytostatika an den chemoresistenten MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> durch die Kombination mit Saquinavir bzw. Saquinavir-NO deutlich abgesenkt. Dabei zeigte Saquinavir-NO in allen chemoresistenten Zelllinien eine stärkere Absenkung der  $IC_{50}$ -Werte als Saquinavir.

Um den Einfluss auf die MDR1-vermittelte Chemoresistenz noch in einem anderen Model zu untersuchen, wurde die chemosensitive parentale Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe von lentiviralen Vektoren mit cDNA für MDR1 transduziert (UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>). Als Kontrolle wurde UKF-NB-3 mit dem Leervektor Cer2 transduziert (UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>). Auch hier liegt der Vorteil des transduzierten Zellmodells darin, dass es sich um ein isogenes Zellmodell handelt (gleicher genetischer Hintergrund), die Auswirkung einer Veränderung lassen sich also spezifisch untersuchen (siehe oben).

Am Fluoreszenzmikroskop wurde die Transduktion bestätigt. Am Durchflusszytometer wurde die spezifisch induzierte Überexpression von MDR1 in der Zelllinie UKF-NB-3MDR1 nachgewiesen. Dabei exprimiert die transduzierte Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> gleiche Mengen an MDR1 wie die chemoresistente Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>. Nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Saquinavir bzw. 10  $\mu$ M Saquinavir-NO für 5 d zeigten sich an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> keine Änderungen in der MDR1-Expression.

Die MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> zeigten im Gegensatz zu den MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> einen deutlich erhöhten  $IC_{50}$ -Wert gegen das MDR1-Substrat Vincristin.

Die beiden transduzierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> zeigten für Saquinavir bzw. Saquinavir-NO gleiche  $IC_{50}$ -Werte wie die untransduzierte Kontrollzelllinie UKF-NB-3.

Bei den  $IC_{50}$ -Werten für Vincristin alleine und in Kombination mit Saquinavir oder Saquinavir-NO zeigte sich an der Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> für beide Substanzen eine konzentrationsabhängige Überwindung der MDR1-vermittelten Chemoresistenz. Wie schon an den chemoresistenten Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> war auch an der transduzierten Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> der Effekt von Saquinavir-NO sehr viel stärker ausgeprägt als der Effekt von Saquinavir.

Am Durchflusszytometer wurde der MDR1-vermittelte Efflux des Fluoreszenzfarbstoffes R123 in den MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> zwar durch 20  $\mu\text{M}$  Saquinavir signifikant inhibiert, aber nicht durch 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Saquinavir. Bei Saquinavir-NO dagegen zeigten alle getesteten Konzentrationen (20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Inhibierung des MDR1-vermittelten R123-Effluxes. Für Saquinavir-NO konnte hier eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden.

In den MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup> führte weder Saquinavir noch Saquinavir-NO zu einer signifikanten Erhöhung der R123-spezifischen Fluoreszenz.

Zur genaueren Bestimmung des beobachteten Unterschiedes in der Wirksamkeit von Saquinavir und Saquinavir-NO wurden in den MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für den MDR1-vermittelten R123-Efflux am Durchflusszytometer bestimmt. Dabei ergaben sich für Saquinavir-NO jeweils deutlich geringere  $\text{IC}_{50}$ -Werte als für Saquinavir (0,7 bzw. 0,053  $\mu\text{M}$  für Saquinavir-NO und 9,39 bzw. 2,35  $\mu\text{M}$  für Saquinavir). Die Daten bestätigen, dass Saquinavir-NO den MDR1-vermittelten Efflux deutlich stärker inhibiert als Saquinavir.

Um die Frage zu erklären, ob Saquinavir bzw Saquinavir-NO den MDR1-vermittelten Efflux als allosterische Inhibitoren oder als Substrate inhibieren, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde der MDR1-vermittelte Efflux von R123 über einen Zeitraum von 2 h am Durchflusszytometer untersucht. Hier war entscheidend, dass nach der Inkubation das Medium getauscht wurde. Allosterische Inhibitoren sind auch nach Entfernung aus dem Medium noch aktiv, während die Wirkung von Substraten nach einem Mediumswechsel deutlich nachlässt (Ludwig et al, 2006; Newman et al, 2000).

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sowohl Saquinavir als auch Saquinavir-NO als Substrate für MDR1 fungieren. Bei beiden Substanzen ließ der inhibierende Effekt auf MDR1 im Verlauf der Messung deutlich nach. Auch hier zeigte sich, dass Saquinavir-NO deutlich stärker als Saquinavir den Austransport von R123 inhibiert. Beide Substanzen zeigten gleiche Eigenschaften wie Verapamil, das bereits als Substrat für MDR1 beschrieben wurde (Nobili et al, 2006; Yusa und Tsuruo, 1989).

Im zweiten Ansatz wurde die Eigenschaft von ABC-Transportern genutzt, unter ATP-Verbrauch Zellen durch die Membran zu pumpen. Das dabei entstehende freie anorganische Phosphat  $\text{P}_i$  kann kolorimetrisch bestimmt werden. Hier führten Saquinavir und Saquinavir-NO genauso zu einer signifikanten Erhöhung der MDR1-ATPase-Aktivität wie die Positivkontrolle Verapamil.

Saquinavir und Saquinavir-NO interagieren demnach als Substrate mit MDR1. Für Saquinavir deckt sich dieser Befund mit vorhandener Literatur (Lee et al, 1998; Washigton et al, 1998). Für Saquinavir-NO ist dieser Befund neu. Saquinavir-NO überwindet die MDR1-vermittelte

Chemoresistenz effektiver als die Ausgangssubstanz Saquinavir. Wie genau die Einführung einer Nitritoxidgruppe die Bindungseigenschaften an MDR1 verändert, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Hier wären weitere Untersuchungen nötig.

Um den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die BCRP1-vermittelte Chemoresistenz zu untersuchen, wurde die parentale chemosensitive Zelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe von lentiviralen Vektoren mit cDNA für BCRP1 transduziert (UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>). Als Kontrolle wurde die Zelllinie UKF-NB-3 mit dem Leervektor iG2 transduziert (UKF-NB-3<sup>iG2</sup>). Auch hier ist wie bei der Transduktion mit MDR1 von Vorteil, dass mit Hilfe eines isogenen Zellmodells (gleicher genetischer Hintergrund) der Einfluss einer Veränderung/Mutation spezifisch untersucht werden kann (siehe oben). Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen konnte für beide Zelllinien die Transfektion am Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. Die Untersuchung am Durchflusszytometer zeigte für UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> eine deutliche Überexpression für BCRP1, während UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>iG2</sup> keine BCRP1-Expression aufwiesen. Nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Saquinavir bzw. Saquinavir-NO für 5 d zeigten sich an den Zelllinien UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> keine Änderungen in der BCRP1-Expression.

Die BCRP1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> zeigte im Gegensatz zu den BCRP1-negativen Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>iG2</sup> einen deutlich erhöhten IC<sub>50</sub>-Wert gegen das BCRP1-Substrat Mitoxantron.

Die beiden transduzierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> zeigten für Saquinavir bzw. Saquinavir-NO gleiche IC<sub>50</sub>-Werte wie die untransduzierte Kontrollzelllinie UKF-NB-3.

An der Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für Mitoxantron alleine und in Kombination mit Saquinavir bzw. Saquinavir-NO ermittelt. Die Positivkontrolle WK-X-34 (1  $\mu$ M) führte zu einer starken Abnahme des IC<sub>50</sub>-Wertes (270-fache Absenkung). Im Unterschied dazu führte Saquinavir zu einer 1,2-fachen bis 3,7-fachen Absenkung, Saquinavir-NO zu einer 1,2-fachen bis 4,8-fachen Absenkung des IC<sub>50</sub>-Wertes für Mitoxantron. Saquinavir-NO zeigte hier nur geringfügig stärkere Effekte als Saquinavir.

Der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf BCRP1 war deutlich schwächer ausgeprägt als auf MDR1. Auch zeigten sich an BCRP1 im Unterschied zu MDR1 keine Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Substanzen. Deshalb wurden für BCRP1 keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt.

Saquinavir wurde bereits als Inhibitor für BCRP1 beschrieben (Gupta et al, 2004). Die MTT-Daten bestätigen den inhibierenden Einfluss von Saquinavir auf BCRP1. Saquinavir-NO zeigte an BCRP1 gleiche inhibitorische Eigenschaften wie Saquinavir.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Saquinavir-NO auf die ABC-Transporter vermittelte Chemoresistenz untersucht und direkt mit der Ausgangssubstanz Saquinavir verglichen. Gleichzeitig wurde der Einfluss beider Substanzen auf die ABC-Transporter MDR1 und BCRP1 mit denselben Methoden untersucht und direkt verglichen.

Für Saquinavir-NO wurden bereits stärkere antitumorale Effekte als für Saquinavir beschrieben (Maksimovic-Ivanic et al, 2009). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit an unterschiedlichen Tumorentitäten bestätigt werden. Dabei spielte die Expression von p53, MDR1 und BCRP1 keine Rolle. Dies ist von großem Interesse, da p53-Mutationen bei einer Vielzahl von Tumoren auftreten (Meek et al, 2009). Die Expression der ABC-Transporter MDR1 bzw. BCRP1 wird in Zusammenhang mit einer auftretenden Chemoresistenz gebracht (Gottesman et al, 2002; Nobili et al, 2006; Szakács et al, 2006; Wilson et al, 2006). Saquinavir-NO stellt somit bei der Behandlung von chemoresistenten Tumoren und/oder bei Tumoren mit einer p53-Mutation eine vielversprechende Substanz dar.

Die präsentierten Daten zeigen deutlich, dass sowohl Saquinavir als auch der Nitritoxid-modifizierte Abkömmling Saquinavir-NO die MDR1-vermittelte Chemoresistenz überwinden. Saquinavir und Saquinavir-NO fungieren dabei als Substrate für MDR1. Saquinavir-NO erwies sich als das effektivere Substrat, da es in niedrigeren Konzentrationen als Saquinavir die MDR1-vermittelte Chemoresistenz noch deutlich überwindet. Dieser Effekt wurde in chemoresistenten Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten als auch an einer transduzierten Zelllinie (isogenes Zellmodell) bestätigt.

Die Substanz Saquinavir-NO ist aufgrund seiner beschriebenen Eigenschaften von großem medizinischem und pharmakologischem Interesse und könnte als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer MDR1-Inhibitoren dienen.

Saquinavir fungiert als Substrat für MDR1. Im Gegensatz dazu wurde Saquinavir als Inhibitor von BCRP1 beschrieben (Gupta et al, 2004). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Saquinavir-NO zeigt dabei gleiche inhibitorische Eigenschaften wie Saquinavir. Im direkten Vergleich mit MDR1 fällt der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die BCRP1-vermittelte Chemoresistenz allerdings gering aus. Auch gab es zwischen den beiden Substanzen keine Unterschiede bei der Überwindung der BCRP1-vermittelten Chemoresistenz.

## IV.B Nutlin-3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der MDM-2 Antagonist Nutlin-3 an einer Auswahl von chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomzellen alleine und in Kombination mit Zytostatika untersucht.

Nutlin-3 führte in Neuroblastomzelllinien mit p53-Wildtyp zu einer stark verringerten Viabilität ( $IC_{50}$ -Wert  $< 3 \mu\text{M}$  Nutlin-3). In Neuroblastomzelllinien, die eine p53-Mutation aufweisen, lag der  $IC_{50}$ -Wert dagegen über  $19 \mu\text{M}$  Nutlin-3. In früheren Arbeiten wurde schon berichtet, dass Nutlin-3 in p53-Wildtyp-Neuroblastomzelllinien Apoptose induziert und somit die Zellviabilität verringert. Die Autoren erklären diesen Effekt dadurch, dass Nutlin-3 den physiologischen p53-Inhibitor MDM2 bindet, p53 wird dadurch stabilisiert und kann die Apoptose einleiten (van Maerken et al, 2006).

Auch in der p53-Wildtyp-Rhabdomyosarkomzelllinie führte Nutlin-3 zu einer stark verringerten Zellviabilität ( $IC_{50}$ -Wert  $< 1 \mu\text{M}$  Nutlin-3). In Rhabdomyosarkomzelllinien, die eine p53-Mutation tragen, lag der  $IC_{50}$ -Wert dagegen über  $17 \mu\text{M}$  Nutlin-3.

Ein Vergleich zwischen den p53-Wildtyp-Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, der Rhabdomyosarkomzelllinie UKF-Rhb-1 und den jeweiligen vincristinresistenten, p53-mutierten Sublinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> bzw. UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> zeigte, dass Nutlin-3 in beiden p53-Wildtyp-Zellen verschiedene Zielgene von p53 signifikant induzierte (p21, MDM2, GADD). Bei den p53-mutierten Sublinien konnte keine signifikante Induktion der untersuchten Zielgene detektiert werden.

Neben der p53-induzierten Apoptose kann Nutlin-3 auch über p53-unabhängige Mechanismen den Zelltod induzieren, zum Beispiel über p73 (Zheng et al, 2010). Nutlin-3 kann auch zur Ausdifferenzierung (van Maerken et al, 2006) oder zur Reifung von Zellen führen (Secchiero et al, 2007 b).

Andere Arbeiten berichteten, dass Nutlin-3 p53-Wildtyp-Neuroblastomzellen auch für zytostatikainduzierten Zelltot sensitiviert (Barbieri et al, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht toxische Konzentrationen von Nutlin-3 den  $IC_{50}$ -Wert für Vincristin an den vincristinresistenten, MDR1-exprimierenden und p53-mutierten Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-Rhb-1<sup>VCR</sup><sup>10</sup> stark herabsenkte. Dieser Effekt war allerdings an den MDR1-negativen und Wildtyp-p53 Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-Rhb-1 nicht zu beobachten.

UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> wurde zusätzlich mit Nutlin-3 und unterschiedlichen Zytostatika inkubiert. Die gewählten Zytostatika sind strukturell nicht mit Vincristin verwandt und weisen unterschiedliche Wirkmechanismen auf. Bei allen Zytostatika, die ein MDR1-Substrat darstellen,

fürte die Kombination mit Nutlin-3 zu einer deutlichen Erniedrigung des  $IC_{50}$ -Wertes im Vergleich zum reinen Zytostatikaansatz. Bei Cisplatin, das kein MDR1-Substrat darstellt, konnte dieser Effekt für Nutlin-3 nicht beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass nicht toxische oder nur moderat toxische Konzentrationen von Nutlin-3 (5-20  $\mu$ M) bei allen untersuchten MDR1-exprimierenden, p53-mutierten Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomzelllinien den  $IC_{50}$ -Wert für Vincristin drastisch absenkten (164-fache bis 3434-fache Absenkung). Der für die MDR1-exprimierende Zelllinie UKF-NB-3<sup>f</sup>DOX<sup>20</sup> beobachtete vergleichsweise geringe Effekt (Verringerung des  $IC_{50}$ -Wertes für Vincristin um das 28,9-fache) mag an den geringeren verwendeten Nutlin-3 Konzentrationen liegen (1  $\mu$ M), da UKF-NB-3<sup>f</sup>Doxo<sup>20</sup> eine p53-Wildtypzelle ist und somit keine hohen Konzentrationen an Nutlin-3 verträgt.

An MDR1-negativen Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomzelllinien konnte durch Nutlin-3 nur eine 1,61-fache bis 3,33-fache Absenkung des  $IC_{50}$ -Wertes für Vincristin beobachtet werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob die verwendeten Zellen eine p53-Mutation aufweisen oder p53-Wildtyp exprimieren.

Um den Effekt von Nutlin-3 auf MDR1 unabhängig vom p53-Status zu untersuchen, wurde die p53-mutierte Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 mit Hilfe von lentiviralen Vektoren mit MDR1 transduziert (RH30<sup>MDR1</sup>). Als Kontrolle diente die Transduktion mit dem lentiviralen Vektor Cer2 (RH30<sup>Cer2</sup>). Der Vorteil des transduzierten Zellmodells liegt darin, dass es ein isogenes Zellmodell darstellt und der Einfluss einer einzelnen Veränderung spezifisch untersucht werden kann (siehe auch IV.A).

Die transduzierten Zelllinien RH30<sup>Cer2</sup> und RH30<sup>MDR1</sup> zeigten die gleichen  $IC_{50}$ -Werte gegenüber Nutlin-3 wie die untransduzierte Kontrollzelllinie RH30.

RH30<sup>MDR1</sup> zeigte im Vergleich mit RH30 und RH30<sup>Cer2</sup> den höchsten  $IC_{50}$ -Wert gegenüber Vincristin. Die Transfektion war somit erfolgreich und MDR1 wurde als funktionelles Protein exprimiert. Die Behandlung mit Nutlin-3 führte demnach nur in RH30<sup>MDR1</sup> zu einer deutlichen Absenkung des  $IC_{50}$ -Wertes gegenüber Vincristin. Dies ist ein klarer Hinweis, dass die Interaktion von Nutlin-3 mit MDR1 unabhängig vom p53-Status der Zelle ist und hier somit für Nutlin-3 zwei getrennte Mechanismen vorliegen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf den MDR1-vermittelten Transport von Fluoreszenzsubstraten am Durchflusszytometer untersucht. Bei der MDR1-exprimierenden UKF-NB-3<sup>f</sup>VCR<sup>10</sup>-Zelle konnte nach Inkubation mit R123 nur eine sehr geringe Fluoreszenz gemessen werden. R123 ist ein MDR1-Substrat und wird aus der Zelle ausgeschleust, so dass kein

Farbstoff mehr in der Zelle verbleibt (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993). Die Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 führte zu einer deutlichen Akkumulation von R123. Die durch Nutlin-3 vermittelte R123-Akkumulation entsprach dem Effekt von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Verapamil, das als MDR1-Substrat beschrieben ist und an der Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> ebenfalls zur Akkumulation von R123 führt (Nobili et al, 2006).

Dagegen zeigte die UKF-NB-3-Zelle, die kein MDR1 exprimiert, in allen Ansätzen eine hohe R123-Fluoreszenz, da bei dieser Zelle der Farbstoff aufgrund fehlender MDR1-Expression in der Zelle verbleibt.

Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop bestätigten die Daten vom Durchflusszytometer.

Zusätzlich zeigte Nutlin-3 an UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Effluxes von R123, die ab 5  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war.

Als ein weiteres Zellmodell wurden MDR1-transfizierte MDCKII-Zellen (MDCKII<sup>MDR1</sup>) verwendet. Auch bei diesem isogenen Zellmodell liegt der Vorteil in der spezifischen Untersuchung einer einzelnen Veränderung/Mutation. In den MDR1-negativen, untransfizierten MDCKII-Zellen ließ sich eine deutliche R123-Akkumulierung nachweisen, in den MDCKII<sup>MDR1</sup>-Zellen dagegen nicht. Die Behandlung mit Nutlin-3 führte zwar in beiden Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der R123-Fluoreszenz, der Unterschied zwischen unbehandelter und Nutlin-3 behandelter Probe war bei den transfizierten MDCKII<sup>MDR1</sup>-Zellen allerdings deutlich stärker ausgeprägt. Wie schon an der chemoresistenten Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> war der Effekt von Nutlin-3 an den MDCKII<sup>MDR1</sup>-Zellen mit dem von Verapamil vergleichbar.

Bei der ABC-Transporter-vermittelten Chemoresistenz spielt neben MDR1 auch MRP1 eine Rolle (Calgano et al, 2007; Szakács et al, 2006). Da UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen im Vergleich mit UKF-NB-3-Zellen keine signifikant höhere MRP1-Expression zeigen, wurde mit zwei anderen Zellmodellen gearbeitet.

Zum einen wurden MDCKII Zellen verwendet, die mit MRP1 (MDCKII<sup>MRP1</sup>) transfiziert waren. R123, das sowohl ein Substrat für MDR1 als auch für MRP1 ist (Chaudhary et al, 1992; Egudina et al, 1993), akkumulierte in den MDCKII<sup>MRP1</sup>-Zellen weniger als in der untransfizierten Kontrolle. Die Behandlung mit Nutlin-3 führte auch hier in beiden Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der R123-Fluoreszenz, der Unterschied zwischen unbehandelter und Nutlin-3 behandelter Probe war bei den MDCKII<sup>MRP1</sup>-Zellen allerdings stärker ausgeprägt.

Im zweiten Modell wurde die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und die chemoresistente Sublinie PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> verwendet. PC3-Zellen sind p53-, MDR1- und MRP1-negativ, PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen



sind ebenfalls p53- und MDR1-negativ, zeigen aber im Unterschied zu PC3-Zellen eine starke MRP1-Überexpression und stellen somit ein gutes Zellmodell für die Untersuchung des ABC-Transporters MRP1 dar.

Das MRP1-Substrat Calcein-AM (Essodaigui et al, 1998) akkumulierte in PC3-Zellen deutlich stärker als in PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen. PC3-Zellen besitzen keinerlei ABC-Transporter, die Calcein-AM aus der Zelle befördern.

Nutlin-3 führte in PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen zu einer deutlichen Akkumulation des MRP1-Substrates Calcein-AM, allerdings nicht in der Zelllinie PC3. Dabei war der Effekt von Nutlin-3 in PC3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen vergleichbar mit dem schon beschriebenen MRP-Inhibitor MK571.

Beide Ansätze führen zu dem Schluss, dass Nutlin-3 auch mit MRP1 interagiert. Da aber der ABC-Transporter MDR1 in der vorliegenden Arbeit im Fokus stand, wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf MDR1 weiter untersucht.

Substanzen, die mit ABC-Transportern interagieren, können entweder allosterische Inhibitoren sein oder sie stellen selber Substrate für den jeweiligen ABC-Transporter dar. Um zu klären, ob Nutlin-3 ein allosterischer Inhibitor von MDR1 ist oder selber ein Substrat für MDR1 darstellt, wurden zwei Ansätze verfolgt.

Im ersten Ansatz wurde der Efflux von R123 an den Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und MDCKII<sup>MDR1</sup> über einen Zeitraum von 2 h am Durchflusszytometer analysiert. Substanzen, die als allosterische Inhibitoren von ABC-Transportern fungieren, verlieren auch nach längerem Zeitraum ihre Wirkung nicht, während Substrate ihre kompetitive Wirkung schnell verlieren, nachdem sie aus dem Medium entfernt wurden (Ludwig et al, 2006; Newmann et al, 2000).

Bei beiden Zelllinien zeigte sich, dass die Nutlin-3 vermittelte Akkumulation von R123 mit der Zeit deutlich abnahm.

Im zweiten Ansatz wurde in einem ATPase-Membran-Assay der Einfluss von Nutlin-3 auf die ATPase-Aktivität von MDR1 untersucht. Substrate werden von ABC-Transportern unter ATP-Verbrauch aus der Zelle ausgeschleust (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006; Wilson et al, 2006) und führen somit zu einer Erhöhung der ATPase-Aktivität. Nutlin-3 führte wie die Positivkontrolle Verapamil zu einem signifikanten Anstieg der ATPase-Aktivität. Beide Methoden lassen den Schluss zu, dass Nutlin-3 ein Substrat für MDR1 darstellt und nicht als allosterischer Inhibitor fungiert.

Nutlin-3 wurde in allen Versuchen als Racemat verwendet. Es besteht aus den zwei Enantiomeren Nutlin-3a und Nutlin-3b. Nutlin-3a ist dabei vor allem für die Inhibierung von MDM2 verantwortlich (Vassilev et al, 2007).

Zum Abschluss der Arbeit wurde untersucht, ob der Effekt von Nutlin-3 auf MDR1 von einem Enantiomer verübt wird oder ob beide Enantiomere gleichermaßen daran beteiligt sind. Dazu wurde Nutlin-3 mittels chiraler Umkehrphasenchromatographie in seine beiden Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin-3b aufgetrennt. Anschließend wurde ein Teil der durchgeführten Untersuchungen mit beiden Enantiomeren wiederholt.

Beim Einfluss auf die Zellviabilität von UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen zeigten sich keine Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten zwischen dem Racemat und den Enantiomeren. Beide Enantiomere führten zu einer ähnlichen Resensibilisierung von chemoresistenten UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen gegenüber Vincristin wie das Racemat. Beide Enantiomere führten zu einer signifikanten Akkumulation von R123 in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen und zeigten keine Unterschiede zum Racemat. Ebenso führten beide Enantiomere signifikant zur Aktivierung der MDR1-ATPase wie das Racemat. Der Effekt von Nutlin-3 auf MDR1 wird somit nicht von einem Enantiomer vermittelt, sondern von beiden Enantiomeren zu gleichen Teilen. Dies steht im Kontrast zur Inhibierung von MDM2, die ausschließlich von Nutlin-3a vermittelt wird (Vassilev et al, 2007). Der Einfluss auf MDR1 stellt demnach einen völlig neuen Wirkmechanismus für Nutlin-3 dar, der Enantiomer-unabhängig vermittelt wird.

Zusammengefasst zeigen die vorgelegten Daten, dass Nutlin-3 mit MDR1 und MRP1 interagiert. Nutlin-3 überwindet die MDR1-vermittelte Chemoresistenz in chemoresistenten Tumorzellen verschiedener Entitäten und in transduzierten Zellen (isogenes Zellmodell). Der MDR1-vermittelte Efflux von R123 wird durch Nutlin-3 in gleichem Maße inhibiert wie durch den bereits beschriebenen MDR1-Inhibitor Verapamil. Auch dieser Effekt konnte in chemoresistenten und transfizierten Zellen gezeigt werden. Dabei stellt Nutlin-3 ein Substrat für MDR1 dar. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die hier aufgezeigte Interaktion von Nutlin-3 mit MRP1 näher zu charakterisieren.

Die Überwindung der MDR1-vermittelten Chemoresistenz ist ein für Nutlin-3 bisher unbekannter antitumoraler Wirkmechanismus. Nutlin-3 stellt eine neue Substanzklasse dar, die mit MDR1 und MRP1 interagiert. Diese neu entdeckte Aktivität sollte bei der Weiterentwicklung von Nutlin-3 berücksichtigt werden. Des Weiteren müssten frühere Arbeiten über das Zusammenspiel von Nutlin-3 und Zytostatika (Barbieri et al, 2006) im Hinblick auf die hier beschriebene Interaktion von Nutlin-3 mit MDR1 erneut ausgewertet werden.

## V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Saquinavir, der Einfluss des nitrolysierten Saquinavir-Derivates Saquinavir-NO und der Einfluss von Nutlin-3 auf die ABC-Transporter-vermittelte Chemoresistenz in Neuroblastomzelllinien untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden der HIV-Protease-Inhibitor Saquinavir und sein Derivat Saquinavir-NO untersucht. Saquinavir-NO zeigte in drei verschiedenen Tumorentitäten (Neuroblastom, Rhabdomyosarkom und Blasenkarzinom) kleinere  $IC_{50}$ -Werte (*inhibitory concentration 50*; Konzentration die die Zellviabilität um 50 % reduziert) als Saquinavir. Für Saquinavir lagen die  $IC_{50}$ -Werte zwischen 18 und 26  $\mu\text{M}$ , für Saquinavir-NO dagegen zwischen 6 und 12  $\mu\text{M}$ . Weder die Expression der ABC-Transporter MDR1 oder BCRP1 noch der zelluläre p53-Status hatten einen Einfluss auf die Zellsensitivität.

Die Rolle von p53 bei der Vermittlung des zytotoxischen Effektes von Saquinavir und Saquinavir-NO wurde in einem weiteren Zellmodell überprüft. Dazu wurde die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe lentiviraler Vektoren mit shRNA gegen p53 transduziert (UKF-NB-3<sup>p53</sup>). Die verminderte Expression von p53 wurde im Western Blot nachgewiesen. UKF-NB-3<sup>p53</sup> Zellen zeigten für Saquinavir und Saquinavir-NO die gleichen  $IC_{50}$ -Werte wie UKF-NB-3. Die beobachteten zytotoxischen Effekte von Saquinavir und Saquinavir-NO sind somit p53-unabhängig.

An 3 verschiedenen Tumorzelllinien wurde der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter MDR1 überprüft. Dabei kamen chemosensitive, MDR1-negative Zelllinien und die jeweiligen chemoresistenten, MDR1-exprimierenden Sublinien zum Einsatz. Es wurden 3 verschiedene Zytostatika (Vincristin, Paclitaxel, Actinomycin D) getestet, die sich in ihren Wirkmechanismen unterscheiden, aber alle jeweils ein Substrat für MDR1 darstellen.

Die chemosensitiven, MDR1-negativen Zelllinien UKF-NB-3, RH30 und RT112 zeigten für alle Zytostatika sehr geringe  $IC_{50}$ -Werte (zwischen 0,2 und 6 ng/ml). Die Kombinationen mit nicht-toxischen Konzentrationen von Saquinavir und Saquinavir-NO beeinflussten die  $IC_{50}$ -Werte nicht signifikant.

Die chemoresistenten, MDR1-exprimierenden Linien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>, RH30<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und RT112<sup>PACLI</sup><sup>20</sup> zeigten für alle Zytostatika deutlich höhere  $IC_{50}$ -Werte (zwischen 6 und 90 ng/ml) als die entsprechenden chemosensitiven Zelllinien. Die Kombinationen mit nicht-toxischen Konzentrationen von Saquinavir und Saquinavir-NO führten an allen drei getesteten chemoresistenten Zelllinien zu einer drastischen Absenkung der  $IC_{50}$ -Werte. Saquinavir-NO erhöhte die Empfindlichkeit der MDR1-exprimierenden Zelllinien zu den MDR1-Substraten dabei stärker (4-fach bis 177-fach) als Saquinavir (2-fach bis 30-fach).

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Saquinavir und Saquinavir-NO auf MDR1 wurde die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe lentiviraler Vektoren mit cDNA für MDR1 transduziert (UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>). Die erfolgreiche Transduktion wurde im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Expression von MDR1 am Durchflusszytometer bestätigt. Die Inkubation mit 10 µM Saquinavir bzw. 10 µM Saquinavir-NO hatte keinen Einfluss auf den Expressionsstatus von MDR1. Die Zelllinie UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> wies für das MDR1-Substrat Vincristin einen höheren IC<sub>50</sub>-Wert auf (13 ng/ml) als UKF-NB-3 (0,2 ng/ml). Auch in UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>-Zellen wurden die Vincristin-IC<sub>50</sub>-Werte stärker durch 10 µM Saquinavir-NO (120-fach) als durch 10 µM Saquinavir (4-fach) abgesenkt.

Am Durchflusszytometer wurde der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die intrazelluläre Akkumulation des fluoreszierenden MDR1-Substrates Rhodamin 123 (R123) untersucht. In den MDR1-exprimierenden Zellen UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> führte sowohl Saquinavir als auch Saquinavir-NO zu einer Akkumulation von R123. Allerdings war der Effekt bei Saquinavir-NO konzentrationsabhängig und deutlich stärker ausgeprägt als bei Saquinavir. Dieser Unterschied zeigte sich auch in den IC<sub>50</sub>-Werten für den MDR1-vermittelten Efflux von R123. Saquinavir-NO zeigte an den MDR1-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> sehr viel geringere IC<sub>50</sub>-Werte (0,7 µM bzw. 0,052 µM) als Saquinavir (9,4 µM bzw. 2,45 µM).

Um die Frage zu klären, ob Saquinavir und Saquinavir-NO als Substrate oder als allosterische Inhibitoren für MDR1 fungieren, wurden zwei Assays durchgeführt. Am Durchflusszytometer wurde über einen Zeitraum von 2 h der Wash Out des fluoreszierenden MDR1-Substrates R123 analysiert. Substrate verlieren nach dem Auswaschen schnell ihren modulierenden Effekt, während der inhibierende Effekt von allosterischen Inhibitoren auch nach dem Auswaschen lange anhält. Zusätzlich wurde der Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf die MDR1-ATPase-Aktivität untersucht. Die MDR1-ATPase wird durch Substrate stimuliert, durch allosterische Inhibitoren dagegen inhibiert. Die Ergebnisse beider Assays lassen den Schluss zu, dass sowohl Saquinavir als auch Saquinavir-NO jeweils ein Substrat für MDR1 darstellen.

Um den Einfluss von Saquinavir und Saquinavir-NO auf den ABC-Transporter BCRP1 zu untersuchen, wurde die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 mit Hilfe lentiviraler Vektoren mit cDNA für BCRP1 transduziert (UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>). Die erfolgreiche Transduktion wurde im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Expression von BCRP1 am Durchflusszytometer bestätigt. Die Inkubation mit 10 µM Saquinavir bzw. 10 µM Saquinavir-NO hatte keinen Einfluss auf den Expressionsstatus von BCRP1. Die Zelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup> wies für das BCRP1-Substrat Mitoxantron einen höheren IC<sub>50</sub>-Wert (46 ng/ml) auf als UKF-NB-3 (0,02 ng/ml).

Saquinavir und Saquinavir-NO sensibilisierten UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>-Zellen in vergleichbarem Ausmaß zu dem BCRP1-Substrat Mitoxantron.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Saquinavir auf chemoresistente Neuroblastomzellen untersucht und direkt mit dem Einfluss von Saquinavir-NO verglichen. Dabei erwies sich Saquinavir-NO im Vergleich zu Saquinavir als der deutlich potentere MDR1-Inhibitor, während beide Substanzen gleichermaßen BCRP1 beeinflussten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des MDM2-Inhibitors Nutlin-3 auf die MDR1-vermittelte Chemoresistenz in Neuroblastomzellen untersucht.

Nutlin-3 zeigte aufgrund seiner Funktion als MDM2-Inhibitor an Zellen mit Wildtyp-p53 sehr geringe IC<sub>50</sub>-Werte (0,9 bis 2,8 µM). An Zellen mit einer p53-Mutation oder an Zellen, die p53-negativ sind, lagen die IC<sub>50</sub>-Werte für Nutlin-3 deutlich höher (17 µM bis über 20 µM).

Die Behandlung mit Nutlin-3 führte in p53-Wildtypzellen zur Induktion diverser p53-Zielgene (p21, MDM2, GADD). In Zellen mit mutiertem p53 blieb diese Induktion nach Nutlin-3-Behandlung aus.

An der chemoresistenten, MDR1-exprimierenden Zelllinie UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf die IC<sub>50</sub>-Werte gegen verschiedene Zytostatika untersucht. Dabei kamen Zytostatika zum Einsatz, die nicht strukturverwandt sind und verschiedene Wirkmechanismen aufweisen. Bei Zytostatika, die ein Substrat für MDR1 darstellen, führte die Kombination mit Nutlin-3 zu einer starken Abnahme der IC<sub>50</sub>-Werte (7,5-fach bis 65-fach). Bei Zytostatika, die kein Substrat für MDR1 darstellen, wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Dieser Befund konnte an mehreren chemoresistenten, MDR1-exprimierenden Neuroblastomzellen und Rhabdomyosarkomzellen bestätigt werden.

Um den Einfluss von Nutlin-3 auf den ABC-Transporter MDR1 eingehender zu untersuchen, wurde die chemosensitive, p53-mutierte (Nutlin-3-insensitive) und MDR1-negative Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 mit Hilfe lentiviraler Vektoren mit cDNA für MDR1 transduziert (RH30<sup>MDR1</sup>). Die erfolgreiche Transduktion und die Expression von MDR1 wurden am Durchflusszytometer bestätigt.

Die Zelllinie RH30<sup>MDR1</sup> wies für das MDR1-Substrat Vincristin einen höheren IC<sub>50</sub>-Wert (15 ng/ml) auf als RH30 (0,3 ng/ml). Durch Kombination mit Nutlin-3 wurde der IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin in RH30<sup>MDR1</sup>-Zellen stark herabgesetzt (110-fach), jedoch nicht RH30-Zellen (3-fach).

Des Weiteren wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf die intrazelluläre Akkumulation des fluoreszierenden MDR1-Substrates R123 untersucht. Die Inkubation mit Nutlin-3 zeigte an der MDR1-negativen Zelllinie UKF-NB-3 keine Unterschiede in der R123-Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dagegen führte Nutlin-3 in der MDR1-exprimierenden Zelllinie

UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> zu einem signifikanten Anstieg der R123-Fluoreszenz. Dieser Effekt war in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> konzentrationsabhängig und ab 5  $\mu$ M Nutlin-3 signifikant.

Um die Frage zu klären, ob Nutlin-3 als Substrat oder als allosterischer Inhibitor für MDR1 fungiert, wurden zwei Assays durchgeführt. Am Durchflusszytometer wurde über einen Zeitraum von 2 h der Wash Out des fluoreszierenden MDR1-Substrates R123 analysiert. Substrate verlieren nach dem Auswaschen schnell ihren modulierenden Effekt, während der inhibierende Effekt von allosterischen Inhibitoren auch nach dem Auswaschen lange anhält. Zusätzlich wurde der Einfluss von Nutlin-3 auf die MDR1-ATPase-Aktivität untersucht. Die MDR1-ATPase wird durch Substrate stimuliert, durch allosterische Inhibitoren dagegen inhibiert. Die Ergebnisse beider Assays lassen den Schluss zu, dass Nutlin-3 ein Substrat für MDR1 darstellt.

Nutlin-3 ist ein Racemat und wurde in allen Versuchen als solches verwendet. Das Enantiomer Nutlin-3a hemmt die MDM2-p53-Interaktion als aktives Enantiomer ca. 150-fach stärker als Nutlin-3b. Im letzten Schritt der vorliegenden Arbeit wurde Nutlin-3 in seine Enantiomere Nutlin-3a und Nutlin-3b aufgetrennt und beide Enantiomere wurden im Hinblick auf ihre Wirkung auf MDR1 untersucht. Nutlin-3a und Nutlin-3b verringerten in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen den IC<sub>50</sub>-Wert für Vincristin in gleichem Maße. Beide Enantiomere führten zu einer signifikanten intrazellulären Akkumulation des fluoreszierenden MDR1-Substrates R123 in UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup>-Zellen und im ATPase-Assay zu einer signifikanten Erhöhung der MDR1-ATPase-Aktivität. Beide Enantiomere interferieren demnach zu gleichen Teilen mit MDR1.

Um den Einfluss von Nutlin-3 auf den ABC-Transporter MRP1 zu untersuchen, wurde zum einen mit MRP1 transfizierten MDCKII-Zellen gearbeitet. Zum anderen wurden die Zelllinien PC3 (MDR1- und MRP1-negativ) und PC3<sup>VCR</sup><sup>20</sup> (MDR1-negativ, MRP1-Expression) verwendet. In beiden Zellmodellen zeigte sich, dass Nutlin-3 auch den MRP1-vermittelten Efflux von R123 und Calcein-AM inhibiert.

Der Befund, dass Nutlin-3 mit der MDR1- und MRP1 vermittelten Chemoresistenz interferiert, ist neu und eine wichtige Information für die Bewertung der beginnenden klinischen Studien zur Untersuchung von Nutlin-3 als antitumorale Substanz.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> Gramm)
µl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
µm	Mikrometer (10 <sup>-6</sup> Meter)
µM	Mikromol (10 <sup>-6</sup> Mol)
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette</i> -Transporter
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ASCR	<i>autologous stem cell rescue</i> (autologe Stammzelltransplantation)
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad3-related</i>
BCRP1	<i>breast cancer resistance protein 1</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag/e
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Early Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DOX	Doxorubicin
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Env	<i>envelope</i> (Hüllprotein)
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GADD	<i>Growth Arrest and DNA Damage Gene</i>
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
h	Stunde
HDCT	<i>high dose chemotherapy</i> (hoch dosierte Chemotherapie)
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HIV-PI	HIV-Protease-Inhibitoren
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (halbmaximale Konzentration)
IE	Internationale Einheiten

Abkürzungsverzeichnis

IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbeccos Medium</i>
INSS	<i>Internatinal Neuroblastoma Staging System</i>
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LeGO	<i>Lentiviral Gene Ontology</i>
M	Mol
mA	Milliampère ( $10^{-3}$ Ampère)
MDM2/4	<i>Murin double minute 2/4</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistance</i>
MDR1	<i>Multidrug-Resistance Gen 1</i>
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ Gramm)
min	Minute
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ Liter)
mM	Millimol ( $10^{-3}$ Mol)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRP1	<i>Multidrug-resistance-associated protein 1</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
MXR	weitere Bezeichnung für BCRP1 da BCRP1 Mitoxantron (MXR) transportiert
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ Gramm)
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ Meter)
nM	Nanomol ( $10^{-9}$ Mol)
NO	Nitritoxid
OD	Optische Dichte
p53	Transkriptionsfaktor p53; Tumorsuppresorgen
PACLI	Paclitaxel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
P-gp	P-glycoprotein (weitere Bezeichnung für MDR1)
pH	<i>per Hydronium</i>
P <sub>i</sub>	freies anorganisches Phopshat
Pol	Polymerase; Integrase; reverse Transkriptase
R123	Rhodamin 123
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RFU	<i>Relative Fluorescenc Units</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
rRNA	ribosomale RNA
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTq-PCR	quantitative real-time PCR
Saq	Saquinavir
Saq-NO	Saquinavir-Nitritoxid
Scr-shRNA	<i>scrambled short-hairpin RNA</i> (Kontroll-shRNA)
SDS	Natriumdodecylsulfat



## Abkürzungsverzeichnis

sek	Sekunden
shRNA	<i>short-hairpin RNA</i>
SV 40	Simian Virus 40
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrale Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid
VCR	Vincristin
VPL	Verapamil
VSV-G	vesikuläres Stomatitis Virus G
z.B.	zum Beispiel

**Literaturverzeichnis**

- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5337-9.
- Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 2007; 26: 3473-81.
- Bader P, Schilling F, Schlaud M, Girgert R, Handgretinger R, Klingebiel T, Treuner J, Liu C, Niethammer D, Beck JF. Expression analysis of multidrug resistance associated genes in neuroblastomas. *Oncol. Rep.* 1999; 6: 1143-1146.
- Bakos E, Evers R, Szakács G, Tusnády GE, Welker E, Szabó K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Váradi A, Sarkadi B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 32167-75.
- Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S, Shohet JM.. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 2358-65.
- Bates SE, Shieh CY, Tsokos M. Expression of mdr-1/P-glycoprotein in human neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 1991; 139: 305-15.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J.. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16;92(16):1295-302. Review.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al.. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 1466-77.
- Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. *Principles and practice of pediatric oncology*, 5<sup>th</sup> edn. Philadelphia: J B Lippincott Company, 2006: 933-970.
- Calcagno AM, Kim IW, Wu CP, Shukla S, Ambudkar SIV. ABC drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions. *Curr. Drug. DelIII.* 2007; 4: 324-33.
- Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood.* 1992 Dec 1;80(11):2735-9.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* 1986 Nov 7;47(3):381-9.
- Chen L, Malcolm AJ, Wood KM, Cole M, Variend S, Cullinane C, Pearson AD, Lunec J, Tweddle DA. p53 is nuclear and functional in both undifferentiated and differentiated neuroblastoma. *Cell Cycle.* 2007 Nov 1;6(21):2685-96.
- Chow WA, Guo S, Valdes-Albini F. Nelfinavir induces liposarcoma apoptosis and cell cycle arrest by upregulating sterol regulatory element binding protein-1. *Anticancer Drugs.* 2006 Sep;17(8):891-903.

- Chow WA, Jiang C, Guan M. Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? *Lancet Oncol.* 2009 Jan;10(1):61-71.
- Cinatl Jr. J, Cinatl J, Kotchetkov R, Vogel J-U, Woodcock BG, Matousek J, Pouckova P, Kornhuber B. Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.* 1999; 15: 1001-1009.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992 Dec 4;258(5088):1650-4.
- Cuneo KC, Tu T, Geng L, Fu A, Hallahan DE, Willey CD. HIV protease inhibitors enhance the efficacy of irradiation. *Cancer Res.* 2007 May 15;67(10):4886-93.
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Oct 25;323(3):466-83
- Davis HE, Rosinski M, Morgan, JR, Yarmush, ML. Charged Polymers Modulate Retrovirus Transduction via Membrane Charge Neutralization and Virus Aggregation. *Biophysical Journal* 2004; 86(2):1234-42.
- de Cremoux P, Jourdan-Da-Silva N, Couturier J, Tran-Perennou C, Schleiermacher G, Fehlbaum P, Doz F, Mosseri V, Delattre O, Klijanienko J, Vielh P, Michon J. Role of chemotherapy resistance genes in outcome of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Mar;48(3):311-7.
- Deeks SG, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA.* 1997 Jan 8;277(2):145-53.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15665-70.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP1 (ABCG2). *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7340-58. Review.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):8463-71.
- Egudina SV, Stromskaya TP, Frolova EA, Stavrovskaya AA. Early steps of the P-glycoprotein expression in cell cultures studied with vital fluorochrome. *FEBS Lett.* 1993 Aug 23;329(1-2):63-6.
- Eilers M, Roy U, Mondal D. MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008 Sep;233(9):1149-60.
- Essodaigui M, Broxterman HJ, Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry.* 1998 Feb 24;37(8):2243-50.
- Gills JJ, Lopiccolo J, Tsurutani J, Shoemaker RH, Best CJ, Abu-Asab MS, Borojerdi J, Warfel NA, Gardner ER, Danish M, Hollander MC, Kawabata S, Tsokos M, Figg WD, Steeg PS, Dennis PA. Nelfinavir, a lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5183-94.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 48-58.

- Gupta A, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jul;310(1):334-41.
- Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, McKenna WG, Muschel RJ. HIV protease inhibitors block Akt signaling and radiosensitize tumor cells both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2005 Sep 15;65(18):8256-65.
- Haber M, Kavallaris M. Multidrug resistance genes in neuroblastoma. In: Brodeur GN, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA, eds. *Neuroblastoma*. Amsterdam: Elsevier Science B.IV., 2000: 207-15.
- Haber M, Smith J, Bordow SB, Flemming C, Cohn SL, London WB, Marshall GM, Norris MD. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2006 Apr 1;24(10):1546-53.
- Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):886-94.
- Ikezoe T, Daar ES, Hisatake J, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitors decrease proliferation and induce differentiation of human myelocytic leukemia cells. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3553-9.
- Ikezoe T, Hisatake Y, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Yang Y, Said JW, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7426-31.
- Jadhav U, Mohanam S. Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: Modulation of *in vitro* invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells. *Int. J. Oncol.* 2006; 29: 1525-1531.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov 11;455(1):152-62.
- Keshelava N, Seeger RC, Groshen S, Reynolds CP. Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. *Cancer Res.* 1998; 58: 5396-5405.
- Keshelava N, Zuo JJ, Waidyaratne NS, Triche TJ, Reynolds CP. p53 mutations and loss of p53 function confer multidrug resistance in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Dec;35(6):563-8.
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, Wilkinson GR. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):289-94.
- Kotchetkov R, Hernáiz Driever P, Cinatl J, Michaelis M, Karaskova J, Blaheta RA, Squire JA, von Deimling A, Moog J, Cinatl jr. J. Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression. *Int. J. Oncol.* 2005; 27: 1029-1037.
- la Porte CJ. Saquinavir, the pioneer antiretroviral protease inhibitor. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 Oct;5(10):1313-22.
- LaQuaglia MP, Kopp EB, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL. Multidrug resistance in human neuroblastoma cells. *J. Pediatr. Surg.* 1991; 26: 1107-1112.

- Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, Pastan I, Dey S. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*. 1998 Mar 17;37(11):3594-601.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci*. 2000 Jun; 113 ( Pt 11):2011-21.
- Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol*. 2005; 205: 275-92.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A., L., Randall R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193: 265-275.
- Ludwig JA, Szakács G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN, Gottesman MM. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res*. 2006; 66: 4808-15.
- Luthman H, Magnusson G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res*. 1983 Mar 11;11(5):1295-308.
- Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Miljkovic D, Harhaji-Trajkovic L, Timotijevic G, Mojic M, Dabideen D, Cheng KF, McCubrey JA, Mangano K, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol Cancer Ther*. 2009 May 5.
- Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol* 1999; 17: 2264-79.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007; 369: 2106- 2020.
- Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):714-23. Epub 2009 Sep 4. Review.
- Michaelis M, Cinatl J, Anand P, Rothweiler F, Kotchetkov R, von Deimling A, Doerr HW, Shogen K, Cinatl J Jr. Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 2007 May 18;250(1):107-16.
- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):8-13.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth*. 1983; 65: 55-63.
- Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007 Dec;59(12):752-7
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):263-7.
- Newman MJ, Rodarte JC, Benbatoul KD, Romano SJ, Zhang C, Krane S, Moran EJ, Uyeda RT, Dixon R, Guns ES, Mayer LD. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*. 2000; 60: 2964-72.
- Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr. Drug Targets*. 2006; 7: 861-79.

- Norris MD, Bordow SB, Marshall GM; Haber PS, Cohn SL, Haber M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 231-238.
- Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg.* 2009 Feb;44(2):377-80.
- Pajic M, Norris MD, Cohn SL, Haber M. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer Lett.* 2005 Oct 18;228(1-2):241-6.
- Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res.* 2002 Sep 15;62(18):5230-5.
- Peddinti R, Zeine R, Luca D, Seshadri R, Chlenski A, Cole K, Pawel B, Salwen HR, Maris JM, Cohn SL. Prominent microvascular proliferation in clinically aggressive neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 3499-506.
- Pituch-Noworolska A, Zaremba M, Wieczorek A. Expression of proteins associated with therapy resistance in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma tumour cells. *Pol J Pathol.* 2009;60(4):168-73.
- Powderly WG. Long-term exposure to lifelong therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Feb 1;29 Suppl 1:S28-40.
- Rigas B, Kashfi K. Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention. *Trends Mol Med.* 2004 Jul;10(7):324-30.
- Ronaldson PT, Lee G, Dallas S, Bendayan R. Involvement of P-glycoprotein in the transport of saquinavir and indinavir in rat brain microvessel endothelial and microglia cell lines. *Pharm Res.* 2004 May;21(5):811-8
- Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal. Biochem.* 1985; 148: 277-81.
- Secchiero P, Corallini F, Gonelli A, Dell'Eva R, Vitale M, Capitani S, Albin A, Zauli G. Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ. Res.* 2007 a; 100: 61-9.
- Secchiero P, Zerbinati C, Melloni E, Milani D, Campioni D, Fadda R, Tiribelli M, Zauli G. The MDM-2 antagonist nutlin-3 promotes the maturation of acute myeloid leukemic blasts. *Neoplasia.* 2007 b; 9(10):853-61.
- Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. *Nat Med.* 2002 Mar;8(3):225-32.
- Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.* 2003 Sep;4(9):537-47.
- Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu. ReIV. Pharmacol. Toxicol.* 2009; 49: 223-41.
- Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):720-5. Review.

- Suh JM, Yoo KH, Sung KW, Kim JY, Cho EJ, Koo HH, Lee SK, Kim J, Lim do H, Suh YL, Kim DW. High-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue in patients with high-risk stage 3 neuroblastoma: 10-year experience at a single center. *J Korean Med Sci.* 2009 Aug;24(4):660-7. Epub 2009 Jul 29
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5: 219-34.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 1981 May;41(5):1967-72.
- Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 2001; 61: 8-13.
- Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, Lunec J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003; 197: 93-98.
- Usansky HH, Hu P, Sinko PJ. Differential roles of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 2, and CYP3A on saquinavir oral absorption in Sprague-Dawley rats. *Drug Metab Dispos.* 2008 May;36(5):863-9.
- van Maerken T, Speleman F, Vermeulen J, Lambertz I, De Clercq S, De Smet E, Yigit N, Coppens V, Philippé J, De Paepe A, Marine JC, Vandesompele J. Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 9646-55.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303: 844-8.
- Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 2007; 13: 23-31.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408 (6810):307-10.
- Warenius HM, Jones M, Gorman T, McLeish R, Seabra L, Barraclough R, Rudland P. Combined RAF1 protein expression and p53 mutational status provides a strong predictor of cellular radiosensitivity. *Br J Cancer.* 2000 Oct;83(8):1084-95.
- Washington CB, Duran GE, Man MC, Sikic BI, Blaschke TF. Interaction of anti-HIV protease inhibitors with the multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) in human cultured cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Nov 1;19(3):203-9.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther* 2008; 16: 698-706.
- Weiss J, Rose J, Storch CH, Ketabi-Kiyanvash N, Sauer A, Haefeli WE, Efferth T. Modulation of human BCRP1 (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Feb;59(2):238-45.
- Williams GC, Liu A, Knipp G, Sinko PJ. Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Nov;46(11):3456-6
- Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Annals of Oncology* 2006; 17: 315- 32.
- Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C, Bandobashi K, Takeuchi T, Adachi Y, Kobayashi M, Takeuchi S, Koeffler HP, Taguchi H. NFV, an HIV-1 protease inhibitor, induces growth arrest, reduced Akt signalling, apoptosis and docetaxel sensitisation in NSCLC cell lines. *Br J Cancer.* 2006 Dec 18;95(12):1653-62.

- Yeh RK, Chen J, Williams JL, Baluch M, Hundley TR, Rosenbaum RE, Kalala S, Traganos F, Benardini F, del Soldato P, Kashfi K, Rigas B. NO-donating nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) inhibit colon cancer cell growth more potently than traditional NSAIDs: a general pharmacological property? *Biochem Pharmacol.* 2004 Jun 15;67(12):2197-205.
- Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res.* 1989 Sep 15;49(18):5002-6.
- Zheng T, Wang J, Chen X, Meng X, Song X, Lu Z, Jiang H, Liu L. Disruption of p73-MDM2 binding synergizes with gemcitabine to induce apoptosis in HuCCT1 cholangiocarcinoma cell line with p53 mutation. *Tumour Biol.* 2010 Apr 27
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15: 1981-2039.



## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung I.3.1:** Struktur des ABC-Transporters MDR1. Quelle: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/8/bc/transport/bilder/glycoprot02.jpg>

**Abbildung I.3.2:** Vergleich der Strukturen der ABC-Transporter MDR1 und MRP1. Quelle: [http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig\\_tab/nrc706\\_F2.html#figure-title](http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig_tab/nrc706_F2.html#figure-title) (Gottesman et al, 2002).

**Abbildung I.3.3:** Vergleich der Strukturen der ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP1. Quelle: [http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig\\_tab/nrc706\\_F2.html#figure-title](http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig_tab/nrc706_F2.html#figure-title) (Gottesman et al, 2002).

**Abbildung I.5.1:** Chemische Struktur von Saquinavir und Saquinavir-NO. Quelle: [http://mct.aacrjournals.org/content/suppl/2009/04/29/1535-7163.MCT-08-0998.DC1/MCT-08-0998--Suppl\\_Fig\\_1.pdf](http://mct.aacrjournals.org/content/suppl/2009/04/29/1535-7163.MCT-08-0998.DC1/MCT-08-0998--Suppl_Fig_1.pdf) (Maksimovic-Ivanic et al, 2009).

**Abbildung I.6.1:** Chemische Struktur von Nutlin-3. Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nutlin>

**Abbildung II.4.1** MTT wird zu violetten Formazankristallen reduziert. Quelle: [http://images.google.de/imgres?imgurl=http://famepharma.com/images/scientific\\_biocrush\\_clip\\_image002.jpg&imgrefurl=http://famepharma.com/scientific\\_biocrush.htm&usq=\\_\\_hlfqujZhWS2Dx7LD3QDI7Azsg=&h=242&w=552&sz=10&hl=de&start=15&um=1&tbnid=W64AVyQAldzrJM:&tbnh=58&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DMTT%2Bzu%2Bformazan%26hl%3Dde%26client%3Dfirefox%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:de-DE:official%26sa%3DG%26um%3D1](http://images.google.de/imgres?imgurl=http://famepharma.com/images/scientific_biocrush_clip_image002.jpg&imgrefurl=http://famepharma.com/scientific_biocrush.htm&usq=__hlfqujZhWS2Dx7LD3QDI7Azsg=&h=242&w=552&sz=10&hl=de&start=15&um=1&tbnid=W64AVyQAldzrJM:&tbnh=58&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DMTT%2Bzu%2Bformazan%26hl%3Dde%26client%3Dfirefox%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:de-DE:official%26sa%3DG%26um%3D1)

**Abbildung II.5.4.1:** Prinzip des TaqMan mit *quencher* und *reporter*. Quelle: [http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/jacob\\_html\\_m30da979.jpg](http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/jacob_html_m30da979.jpg).

**Abbildung II.8.1:** Aufteilung der 96-Lochplatte für ATPase-Aktivitäts-Assay. Erstellte Excelltabelle

**Abbildung III.A.2.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von UKF-NB-3, UKF-NB-3 transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-C mit shRNA gegen p53 (UKF-NB-3<sup>p53</sup>) und transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-C mit Kontroll-shRNA (UKF-NB-3<sup>scr</sup>). Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.A.2.2:** Western Blot zum Nachweis der p53-Expression in UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>p53</sup> und UKF-NB-3<sup>scr</sup>. Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.A.4.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von UKF-NB-3, UKF-NB-3 transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-iCer2b mit cDNA für MDR1 (UKF-NB-3<sup>MDR1</sup>) und transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-Cer2 (UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>). Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.A.4.2:** Durchflusszytometrische Messung des MDR1-Status an UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>VCR<sup>10</sup></sup>, UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> und UKF-NB-3<sup>Cer2</sup>. Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.A.8.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von UKF-NB-3, UKF-NB-3 transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-iG2 mit cDNA für BCRP1 (UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>) und transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-iG2 (UKF-NB-3<sup>iG2</sup>). Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.A.8.2:** Durchflusszytometrische Messung des BCRP1-Status an UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>iG2</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP1</sup>. Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.B.4.2:** Durchflusszytometrische Überprüfung der Transduktionseffizienz und Messung des MDR1-Status an RH30, RH30 transduziert mit lentiviralem Vektor LeGO-iCer2b mit cDNA für MDR1 (RH30<sup>MDR1</sup>) und transduziert mit lentiviralem Kontrollvektor LeGO-Cer2 (RH30<sup>Cer2</sup>). Eigene Aufnahmen.

**Abbildung III.B.5.2:** Gegenüberstellung von fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Aufnahmen von UKF-NB-3 und UKF-NB-3<sup>VCR<sup>10</sup></sup> inkubiert mit 1  $\mu$ M R123 und 20  $\mu$ M Nutlin-3. Eigene Aufnahmen.

## Wissenschaftliche Publikationen

**Rothweiler F**, Michaelis M, Brauer P, Otte J, Weber K, Fehse B, Doerr HW, Wiese M, Kreuter J, Al-Abed Y, Nicoletti F, Cinatl J Jr. Anti-cancer effects of the nitric oxide-modified saquinavir derivative saquinavir-NO against multi-drug resistant cancer cells. *Neoplasia*. 2010; 12 (12).

Wagner S, **Rothweiler F**, Anhorn MG, Sauer D, Riemann I, Weiss EC, Katsen-Globa A, Michaelis M, Cinatl J Jr, Schwartz D, Kreuter J, von Briesen H, Langer K. Enhanced drug targeting by attachment of an anti alphav integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(8):2388-98.

Michaelis M, Kleinschmidt MC, Barth S, **Rothweiler F**, Geiler J, Breitling R, Mayer B, Deubzer H, Witt O, Kreuter J, Doerr HW, Cinatl J, Cinatl J Jr. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 2010 ;79: 130-6.

Michaelis M, **Rothweiler F**, Klassert D, von Deimling A, Weber K, Fehse B, Kammerer B, Doerr HW, Cinatl J Jr. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res.* 2009; 69: 416-21.

Michaelis M, Bliss J, Arnold SC, Hinsch N, **Rothweiler F**, Deubzer HE, Witt O, Langer K, Doerr HW, Wels WS, Cinatl J Jr. Cisplatin-resistant neuroblastoma cells express enhanced levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and are sensitive to treatment with EGFR-specific toxins. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 6531-7.

Dreis S, **Rothweiler F**, Michaelis M, Cinatl J Jr, Kreuter J, Langer K. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2007; 341: 207-14.

Michaelis M, Cinatl J, Anand P, **Rothweiler F**, Kotchetkov R, von Deimling A, Doerr HW, Shogen K, Cinatl J Jr. Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 2007; 250: 107-16.

Michaelis M, Fichtner I, Behrens D, Haider W, **Rothweiler F**, Mack A, Cinatl J, Doerr HW, Cinatl J Jr. Anti-cancer effects of bortezomib against chemoresistant neuroblastoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2006; 28: 439-4 6.

Michaelis M, Suhan T, Michaelis UR, Beek K, **Rothweiler F**, Tausch L, Werz O, Eikel D, Zörnig M, Nau H, Fleming I, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells. *Cell Death. Differ.* 2006 ;13: 446-53.

## Lebenslauf

Name, Vorname	Rothweiler, Florian
Anschrift	Schöffenstrasse 1-3 65933 Frankfurt 069 / 65 60 94 12
Geburtsdatum	18.01.1978
Geburtsort	Frankfurt-Höchst
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Winfried Rothweiler Margot Rothweiler, geb. Imhoff
Geschwister	Stefan, 03.02.1973 Sebastian, 23.10.1984
Ausbildung	1984 bis 1988 Grundschule, Hofheim am Taunus  1988 bis 1997 Main-Taunus-Schule, Hofheim am Taunus  13.06 1997 Abitur (Note 2,0)  01.09.1997 bis 30.09.1998 Zivildienst bei „Drehpunkt e.V.Hofheim“  ab Wintersemester 1998/1999 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  25.09.2000 Vordiplom (Note 1,6)  ab Wintersemester 2000/2001 Biologiehauptstudium  28.10.2003 Diplom (Note 1,1)  30.03.2004 bis 31.08.2004 bei „People. Agentur für Zeitpersonal GmbH“  seit 01.11.2004 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikum Frankfurt am Main

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Unterschrift)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

### **Überwindung der ABC-Transporter-vermittelten Chemoresistenz in Neuroblastomzellen**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Unterschrift)