

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Methoden

#### 4.1.1 Zellkultur

Für alle Versuche wurden die Nierenepithel-Zelllinien von Schwein LLC-PK1 (*porcine kidney epithelial cells*, ATCC 101) und LLC-MDR1 verwendet. LLC-MDR1 ging durch Transfektion von LLC-PK1 mit der DNA von humanem P-Glykoprotein hervor [Schinkel et al. 1995]. Beide Zelllinien stellen neben anderen ein etabliertes System zur Untersuchung von Transportvorgängen dar. LLC-PK1 Zellen wurden im Jahr 1976 von *Hull et al.* aus der Niere eines männlichen Schweins isoliert und in Kultur gebracht [Hull et al. 1976]. Als Nierenepithelzellen verfügen sie über ein breites Spektrum an Transportern, hauptsächlich aus der Familie der SLC-Transporter. Aber auch P-gp und MRP konnten nachgewiesen werden [Schlatter et al. 2006]. Im Verlauf der ersten Experimente mit LLC-PK1 Zellen zeigte sich, dass die Expression der ABC-Transporter durch Inkubation mit Vinblastin nicht erhöht werden konnte. Die Aktivität der Transporter erwies sich als sehr gering. Deshalb wurden die Versuche im Folgenden mit LLC-MDR1 Zellen durchgeführt. Diese wurden in den neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts am Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam durch Einbringen des Gens für humanes P-gp in LLC-PK1 gewonnen [Schinkel et al. 1995]. Im Gegensatz zu LLC-PK1 tolerieren sie hohe Zytostatikakonzentrationen im Medium, was den Schluss auf eine deutlich erhöhte Transportaktivität, bedingt durch die Expression des eingefügten P-Glykoproteins, zulässt. Dessen Vorkommen konnte im Laufe der Experimente mit Hilfe von Western Blot Analysen immer wieder bestätigt werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden nur Zellen zwischen den Passagen 10 und 50 verwendet, obwohl LLC-PK1 für bis zu 300 Passagen als stabil beschrieben wurden [Hull et al. 1976]. Die Zellen wurden in Medium 199 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zusätzlich erhielt das Medium für die LLC-MDR1 Zellen 640 nM Vincristinsulfat um die Expression von P-gp aufrecht zu erhalten. Die Zellkultivierung fand bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte statt. Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, die Passage der Zellen ein- bis zweimal wöchentlich. Die Zellen wuchsen in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen mit 12 ml Zellkulturmedium.

## **4.1.2 Western-Blot-Analyse**

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteine mit immunochemischen Methoden detektiert [Towbin et al. 1979]. Dazu werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt [Lämmli 1970]. Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

### **4.1.2.1 Probenvorbereitung**

Die Zellen wuchsen in 75 ml Flaschen bis zur Konfluenz. Zur Ernte wurde das Medium entfernt und Reste mit eiskaltem PBS abgespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Flasche gelöst und in eiskaltem PBS suspendiert. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C. Das Pellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und zum besseren Aufschluss der Zellmembranen mit dem Ultraschallstab für 5x5 Sekunden bei 60 % auf Eis behandelt. Anschließend wurden ungelöste Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Aus dem Überstand wurde der Gehalt an Protein nach der Methode von *Bradford* bestimmt [Bradford 1976]. Die Proben (40-200 µg Protein) wurden mit vierfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und zehn Minuten bei 95 °C denaturiert.

### **4.1.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von *Bradford* [Bradford 1976] mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad (München). Dabei bilden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau Komplexe, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Anschließend wird der Proteingehalt anhand einer Kalibriergeraden ermittelt. Diese wurde parallel mit Rinderserumalbumin (12,5-200 µg/ml) erstellt.

#### **4.1.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Diese binden an im Überschuss zugesetztes SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) und erhalten so eine negative Ladung. Da diese dem Molekulargewicht der Proteine proportional ist, können die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix ihrer Molmasse nach aufgetrennt werden [Sambrook et al. 1989].

Bei der verwendeten Methode nach *Lämmli* [Lämmli 1970] werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid konzentriert und danach in einem 7,5 % Trenngel aufgetrennt. Dafür wurde eine vertikale Minigel-Elektrophoresekammer verwendet. Die Proben wurden in Konzentrationen von 10-50 µg/ml aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V über zwei Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten und gekühlten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgröße.

#### **4.1.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot**

Die Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens in einem horizontalen Puffertank (Eigenbau) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm<sup>2</sup> und 4 °C über zwei Stunden. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz [Sambrook et al. 1989]. Zur Kontrolle der Beladung wurden die Membranen mit Fast-Green<sup>®</sup> angefärbt und fotografiert.

#### **4.1.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern**

Zur Detektion mit spezifischen Antikörpern wurden die mit Fast-Green<sup>®</sup> gefärbten Membranen in 0,2 M NaOH entfärbt und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Roti<sup>®</sup>-Block inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C [Georges et al. 1990]. Diese sind murinen Ursprungs und richten sich gegen verschiedene Epitope des humanen P-Glykoproteins. C219 bindet an MDR1- und MDR3-Isoformen [Chan et al. 1990], C494 nur an die MDR1-Isoform [Georges et al. 1990].

Nach viermaligem Waschen der Membranen mit TBS-T folgte die einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Im Anschluss wurden die

Membranen viermal zehn Minuten mit TBS-T und viermal zehn Minuten mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

*Tabelle 4: Erstantikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
C-219	16 Stunden	1:2000 in Roti®-Block	Calbiochem®
C-494	16 Stunden	1:2000 in Roti®-Block	Calbiochem®

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde der ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma Amersham (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemolumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag zwischen einer und zehn Minuten.

#### **4.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für eine weitere Verwendung trypsiniert. Das Zellkulturmedium wurde dafür abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Nach dem erneuten Absaugen erfolgte über einen Zeitraum von 10 - 15 Minuten das Ablösen der Zellen mit Hilfe von Trypsin. Anschließend wurde auch das Trypsin entfernt und die Zellen durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche von deren Boden abgelöst. Nach Resuspendierung in frischem Zellkulturmedium erfolgte die Bestimmung der Zellzahl aus einem 100 µl Aliquot, das mit 10 ml CasyTon gemischt wurde, am Zellzählgerät Casy®-1. Entsprechend der benötigten Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt und weiterverwendet.

#### 4.1.4 Testung auf Zytotoxizität und P-gp modulatorische Wirkung

Die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen außerhalb eines Organismus wird als Zellkultur bezeichnet.

Im Jahr 1885 gelang es *Wilhelm Roux* in Breslau embryonale Hühnerzellen für mehrere Tage in einer Salzlösung am Leben zu erhalten. Knapp 30 Jahre später konnte gezeigt werden, dass Zellen unter aseptischen Bedingungen auch länger in Kultur wachsen können, wenn sie mit Nährstoffen versorgt werden.

In den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde erstmals eine menschliche Zelllinie etabliert, die die Fähigkeit zur Apoptose verloren hatte. Diese aus einem Cervixkarzinom gewonnenen Zellen sind heute unter dem Namen HeLa weit verbreitet.

Bis auf einige aus Tumoren gewonnene Zellen besitzen die meisten Zelllinien nur eine eingeschränkte Lebensdauer und können sich nicht unbegrenzt oft teilen.

Jedoch sind viele der heute verwendeten Zelllinien immortalisiert, was bedeutet, dass sie im Gegensatz zu normalen menschlichen Zellen in der Lage sind, sich unendlich oft zu teilen. Diese Fähigkeit kann, bei Tumorzellen zum Beispiel, durch zufällige Mutation erlangt werden oder durch künstliche Expression des Telomerase-Gens verliehen werden. Im Gegensatz zu diesen Dauerkulturen stehen die direkt aus dem Gewebe gewonnenen Primärkulturen, die nur über eine begrenzte Lebensdauer verfügen.

Zellkulturversuche sind heute in Forschung und Entwicklung weit verbreitet und werden zur Untersuchung von Grundlagen zellulärer Prozesse eingesetzt. Aber auch zur Untersuchung der Wirkung verschiedenster Substanzen auf die Signaltransduktion und Viabilität eignen sich Zellkultursysteme in besonderer Weise, da sie unter Vermeidung aufwändiger Tierversuche rasche Quantifizierung einer großen Anzahl von Proben zulassen.

Zur Bestimmung der modulatorischen Potenz und der Zytotoxizität der untersuchten Verbindungen wurden verschiedene Viabilitätstests durchgeführt. Diese beruhen entweder auf der Anfärbbarkeit von lebenden Zellen mit Farbstoffen oder auf der Messung ihrer mitochondrialen Aktivität.

#### 4.1.4.1 Der Kristallviolett-Test

Der Kristallviolett-Test ist ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett (Gentianaviolett) beruht [Flick; Gifford 1984]. Ähnlich wie bei der Gramfärbung zur Unterscheidung von grampositiven und gramnegativen Bakterien macht man sich bei diesem Test zu Nutze, dass von den Zellen festgehaltener Farbstoff nicht mit Wasser abgelöst werden kann. Die Zellen werden gefärbt, mehrmals mit Wasser gespült und anschließend wird der festgehaltene Farbstoff mit Hilfe von Ethanol in Lösung gebracht. Die Konzentration des Farbstoffes wird gegen die klare Lösung als Blindwert am Spektrophotometer vermessen und kann als Maß für die Anzahl lebensfähiger Zellen angesehen werden. Dabei besteht zwischen der vermessenen Absorption bei 620 nm und der Anzahl der Zellen über einen großen Bereich ein linearer Zusammenhang.

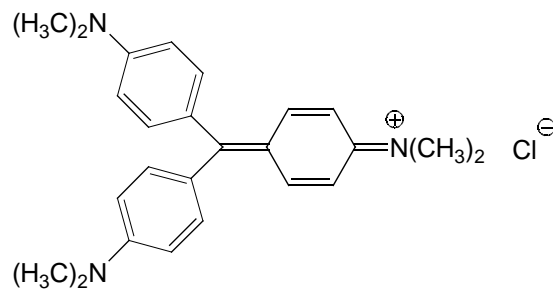


Abbildung 10: Kristallviolett

Die konfluenten Zellen werden trypsiniert und in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Wells) ausgesät (8000 Zellen in 120 µl Medium je Well). Dabei werden nur die 60 Wells im Inneren der Platte mit Zellen beschickt. Die Äußeren werden mit 280 µl destilliertem Wasser gefüllt. Bei ersten Experimenten zeigte sich, dass die Zellzahl in den äußeren Wells, bei gleicher Behandlung aller Proben, nach Beendigung eines Versuches deutlich niedriger lag als bei denen im Inneren der Platte. Deshalb wurden die äußeren Wells nicht für Versuche verwendet.

Vier Stunden nach der Aussaat erfolgte die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen. Dabei wurden 120 µl einer vierfach konzentrierten Modulator- oder Zytostatikallösung in fünf Vertiefungen der ersten Spalte pipettiert. Aus dieser jetzt doppelt konzentrierten Lösung wurden 120 µl in die nächste Spalte pipettiert. Diese Verdünnung setzte sich bis in die letzte Spalte fort. Anschließend wurden mit 120 µl Zellkulturmedium, Modulator- oder Zytostatikallösung die gewünschte Konzentration eingestellt. Eine Reihe der Zellen blieb dabei immer als Kontrolle

unbehandelt. Nach 68 Stunden wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Dazu wurde der Überstand mit den toten Zellen entfernt und die am Boden haftenden, noch lebenden Zellen wurden mit 100 µl absolutem Methanol für zehn Minuten denaturiert und fixiert. Nach mehrmaligem Waschen unter fließendem Leitungswasser folgte für zehn Minuten die Zellfärbung mit 100 µl einer 0,1 % wässrigen Kristallviolett-Lösung. Daran schlossen sich erneut mehrere Waschschrte an. Am Ende wurde der aufgenommene Farbstoff mit 0,1 M ethanolischer Natriumcitratlösung auf dem Schüttler aus den Zellen gelöst. Die Absorption bei 620 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer (POLARstar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg) vermessen.

#### 4.1.4.2 Der Neutralrot-Test

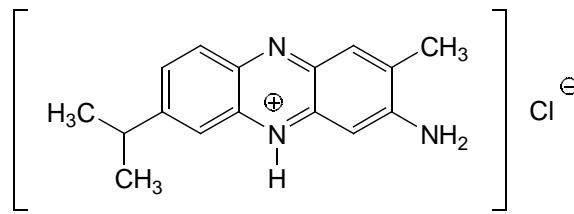


Abbildung 11: Neutralrot

Der Neutralrot-Test beruht wie der Kristallviolett-Test auf der Anfärbbarkeit von Zellen. Nur lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff Neutralrot in ihre Lysosomen aufzunehmen und dort zu halten. Die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs wird nach einer bestimmten Zeit vermessen und ist der Anzahl der lebenden Zellen proportional [Borenfreund et al. 1988]. Die Aussaat und Inkubation der Zellen erfolgte analog zum Kristallviolett-Test. Beim Neutralrot-Test wurde der Überstand am Ende des Experiments verworfen und die Zellen zweimal mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für drei weitere Stunden mit 50 µl Neutralrotlösung (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und es folgten zwei weitere Waschschrte mit warmem PBS. Daran schloss sich die Extraktion des Farbstoffs mit 100 µl einprozentiger Essigsäure über 15 Minuten am Schüttler an. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm am Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

#### 4.1.4.3 Der Sulforhodamin B-Test

Der Sulforhodamin B-Test basiert wie die beiden vorher beschriebenen auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit einem Farbstoff. Es handelt sich dabei um eine empfindliche und einfach durchzuführende Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der untersuchten Zellen. Nach der sauren Fixierung der Zellen, werden diese mit Sulforhodamin B-Lösung inkubiert, gewaschen und der Farbstoff anschließend im Basischen extrahiert. Die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs ist proportional zur Anzahl der Zellen pro Well. Zwischen der Absorption bei 500 nm und der Zellzahl besteht über einen großen Bereich eine lineare Beziehung [Shekan et al. 1990]. Aussaat und Inkubation der Zellen erfolgte analog zum Kristallviolett-Test.

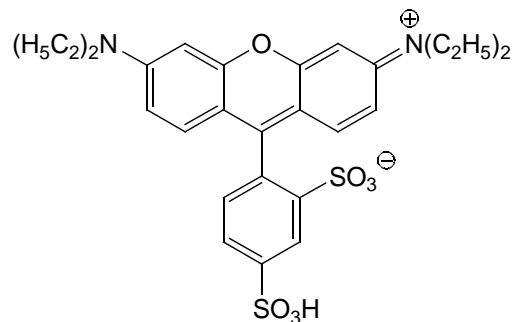


Abbildung 12: Sulforhodamin B

Insgesamt 72 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde der Überstand mit den abgestorbenen Zellen verworfen. Nach einmaligem Spülen mit PBS erfolgte die Zellfixierung mit Trichloressigsäure (TCA). Dazu wurde vorsichtig 60 µl 10 % TCA in jedes Well pipettiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten für eine Stunde bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde fünfmal mit demineralisiertem Wasser gespült und die Platten über Nacht an der Luft getrocknet. Die Färbung erfolgte mit 100 µl 0,4 % SRB-Lösung (in 1 % Essigsäure) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um freies SRB herauszuwaschen, wurde fünfmal mit 1 % Essigsäure gespült. Mit 200 µl 10 mM TRIS wurde der Farbstoff aus den Zellen gelöst. Nach 30 Minuten auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 490 nm am Mikrotiterplattenphotometer gemessen.



#### 4.1.4.4 Der MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um einen häufig eingesetzten Standardtest zur Bestimmung der Zytotoxizität. Dabei wird das Maß lebensfähiger Zellen indirekt über deren enzymatische Aktivität ermittelt [Mosmann 1983]. Das schwach gelbe MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid wird von den Zellen aufgenommen und von deren mitochondrialen Dehydrogenasen durch Spaltung des Tetrazoliumrings in ein lilafarbiges wasserunlösliches Formazan reduziert. Nach Lösung der entstandenen Kristalle kann die Absorption am Spektrophotometer bestimmt werden. Da nur lebende Zellen zu dieser Umwandlung in der Lage sind, ist auf diesem Weg eine rasche Quantifizierung von Zellschädigungen möglich. Bei abgestorbenen Zellen bleibt die gelbe Farbe der Ausgangssubstanz bestehen. Auch dieser Test hat wie die bereits

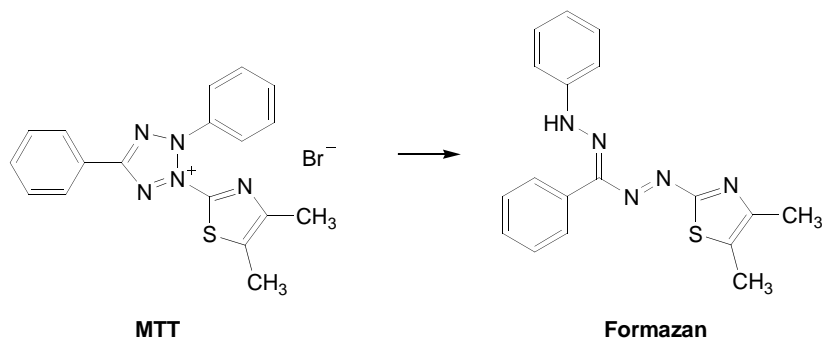


Abbildung 13: Umsetzung von MTT zum Formazan

erwähnten Anfärbetests den Vorteil, dass sich Zellwachstum und Überlebensrate und damit auch die Zytotoxizität schnell und mit großen Probenmengen ohne den Einsatz von radioaktiven Isotopen bestimmen lassen. Ein Problem, welches es bei der Anwendung des MTT-Tests zu berücksichtigen gilt, ist, dass die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen je nach Stärke der Noxen unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann.

Die Aussaat und Inkubation erfolgte analog zum Kristallviolett-Test.

Zum Ende des Experiments, 68 Stunden nach der Aussaat, wurde das Medium in den Wells bis auf 100  $\mu$ l abpipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 9  $\mu$ l MTT-Lösung (50 mg/ml) und eine weitere Inkubation bei 37  $^{\circ}$ C und 5 % CO<sub>2</sub> von vier Stunden. Innerhalb dieser Spanne bildeten sich die Formazankristalle. Anschließend wurden in jedes Well 90  $\mu$ l MTT-Stopplösung gegeben und die Platten über Nacht im Brutschrank belassen, um die vollständige Auflösung der entstandenen Kristalle zu gewährleisten. Am nächsten Tag erfolgte nach 20 Minuten auf dem Schüttler die Messung der Absorption bei 570 nm am Mikrotiterplattenphotometer.

#### 4.1.4.5 Berechnung der Wirkwerte

##### 4.1.4.5.1 Der modulatorische Quotient

Um das modulatorische Potential der untersuchten Substanzen zu ermitteln, wurden verschiedene Wirkwerte bestimmt.

Die  $IC_{50_{TOX}}$  stellt die Konzentration einer Substanz dar, bei der die Viabilität der Zellen 50 % beträgt. Sie ist ein Maß für die Eigentoxizität der untersuchten Verbindung. Die  $IC_{50_{MOD}}$  dagegen gibt die Konzentration der Substanz wieder, bei der die Lebensfähigkeit der Zellen in Gegenwart einer fixen Konzentration an Zytostatikum 50 % beträgt. Bei den durchgeführten Experimenten handelte es sich dabei um 640 nM Vincristinsulfat, welches die LLC-MDR1-Zellen gut tolerierten. Mit dieser Konzentration wurden sie auch nach der Transfektion mit humanem P-gp selektiert und weiter kultiviert [Schinkel et al. 1995].

Der modulatorische Quotient, gebildet aus  $IC_{50_{MOD}}$  und  $IC_{50_{TOX}}$ , wird als Maß für die modulatorische Aktivität einer Substanz angesehen.

$$\text{Modulatorischer Quotient} = \frac{IC_{50_{tox}}}{IC_{50_{mod}}} = \frac{IC_{50_{Modulator}}}{IC_{50_{Modulator+Zytostatikum}}}$$

Der Ausgangspunkt für die Berechnung des modulatorischen Quotienten war die folgende Grundannahme. Wenn die Zellen die niedrige Konzentration Vincristinsulfat aufgrund der starken Expression des P-Glykoproteins gut tolerieren, dann führt eine Hemmung des Transporters durch Modulatoren zu einer Verstärkung der toxischen Wirkung des Zytostatikums und damit zur Abnahme der Viabilität der Zellen.

#### 4.1.4.5.2 Fold Reversal

Ein weiterer ermittelter Wirkwert ist die Fold Reversal. Sie wird aus dem Quotienten der IC50 eines Zytostatikums in Abwesenheit beziehungsweise Gegenwart einer relativ untoxischen Konzentration des untersuchten Modulators gebildet.

Im Fall dieser Arbeit war das Zytostatikum Vincristinsulfat, dessen IC50 für LLC-MDR1-Zellen mit  $2,49 \pm 0,64 \mu\text{M}$  bestimmt wurde. Als relativ untoxische Konzentration der untersuchten Verbindungen wurde deren IC10 gewählt [Wiese; Pajeva 2001]. Diese lagen typischerweise zwischen zwei und zehn  $\mu\text{M}$ .

$$\text{Fold Reversal} = \frac{IC50_{\text{Zytostatikum}}}{IC50_{\text{Zytostatikum} + \text{Modulator}}}$$

#### 4.1.4.5.3 Berechnung der IC50

Aus dem Inkubationsmuster der Zellen, ergab sich für die Auswertung der Messergebnisse bei halblogarithmischer Darstellung (x-Achse) des Graphen ein sigmoider Kurvenverlauf.

Daraus wurden mit Hilfe von Graph Pad Prism 3.0 die IC50 nach folgender Formel berechnet:

$$y = y_0 + \frac{a - y_0}{1 + 10^{(\log IC50 - x) \cdot b}}$$

$y_0$  Absorption bei minimaler Substanzkonzentration

$a$  Absorption bei maximaler Substanzkonzentration

$b$  Hillkoeffizient

$x$  Logarithmus der Konzentration

Alle Experimente wurden dreimal an jeweils verschiedenen Tagen durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet.

#### 4.1.4.6 Durchflusszytometrische Bestimmungen

Bei der Durchflusszytometrie mit Hilfe des Fluorescence Activated Cell Sorters (FACS) senden Zellen bei der Passage eines Laserstrahls optische Signale aus, anhand derer man unterschiedliche Eigenschaften der Zellen ableiten kann [Herzenberg et al. 1976]. Zur Verstärkung und Erweiterung der Signale können Zellen zusätzlich mit Antikörpern oder Fluorophoren beladen sein. Die wichtigsten Parameter bei der Einteilung und Auftrennung der Zellen sind das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns). Die an die vermessenen Partikel gebundenen oder wie in dieser Arbeit in die Zellen aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Laserlicht entsprechender Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht abgeleitet und vermessen.

Der Fluoreszenz-Aufnahme-Test mit Rhodamin 123 als fluoreszierendem P-gp Substrat ist eine etablierte Methode, um die P-Glykoprotein abhängige Sekretion von Substanzen an P-gp exprimierenden Zelllinien zu untersuchen. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die eventuelle inhibitorische Aktivität von Testsubstanzen ziehen [Lee et al. 1994].

Für den Test wurden LLC-PK1- bzw. LLC-MDR1-Zellen trypsinisiert und anschließend in Krebs-Hepes-Puffer (KHP) suspendiert. Danach erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 300 g für zwei Minuten. Die abgesetzten Zellen wurden dabei immer in KHP aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde die Zellzahl bestimmt und auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Anschließend wurden davon je 0,5 ml in Eppendorfgefäße pipettiert und mit 55  $\mu$ l der zu untersuchenden Substanzlösung bzw. KHP versetzt. Die Endkonzentrationen der fertigen Proben betragen 10, 5 bzw. 1  $\mu$ M. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden zu jeder Probe 30  $\mu$ l einer 15  $\mu$ M Rhodamin 123-Lösung pipettiert. Die Probe für die Eigenfluoreszenz erhielt nur KHP. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Proben in BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Tubes überführt, für zwei Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Lagerung der Proben erfolgte ab jetzt auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml eiskalter Modulatorlösung der untersuchten Konzentration resuspendiert. Die Zentrifugation und das Spülen wiederholten sich zweimal, um alles nicht aufgenommene Rhodamin 123 von den Zellen zu entfernen. Zum Schluss wurden 5  $\mu$ l Propidiumiodid (50  $\mu$ g/ml) in jedes Röhrchen pipettiert. Dieses dient zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da es nur durch die beschädigte Zellmembran in die Zelle

aufgenommen wird. Während der Messung gibt Propidiumiodid bei allen geschädigten Zellen ein Fluoreszenzsignal. Danach erfolgte die Messung am FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg).

Als Maß für die modulatorische Aktivität der untersuchten Substanzen diente das Fluoreszenz-Aktivitätsverhältnis. Für dessen Bestimmung ist der in den Zellen akkumulierte Anteil Rhodamin 123 ausschlaggebend. Je nach Affinität und Stärke der Bindung der Testsubstanzen an P-gp kann Rhodamin 123 mehr oder weniger stark in den Extrazellulärraum gelangen. Blicke der Transporter ungehemmt, würde kaum oder gar kein Rhodamin 123 in der Zelle verbleiben.

Das Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnis lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$FAR = \frac{MDRI_{(behandelt)} / MDRI_{(unbehandelt)}}{Wildtyp_{(behandelt)} / Wildtyp_{(unbehandelt)}}$$

Das Verhältnis aus Wildtyp (LLC-PK1-Zellen) behandelt und Wildtyp unbehandelte Kontrolle war annähernd eins. Bei jeder Messung wurde die Eigenfluoreszenz der Zellen bestimmt (unbehandelte Zellen in KHP). Des weiteren wurden LLC-MDR1-Zellen nur mit Rhodamin 123 inkubiert, als Maß für den ungehemmten Transport durch P-Glykoprotein. Außerdem dienten bei jeder Messung Verapamil und Trifluperazin als Vergleichssubstanzen.

Pro Probe wurden  $10^4$  Zellen vermessen und anhand der Parameter SSC und FSC nur die gut erhaltenen Zellen erfasst.

Für die Auswertung wurde von jedem Messwert die Eigenfluoreszenz abgezogen.

## 4.2 Materialien

### 4.2.1 Chemikalien

American Type Culture Collection (ATCC)	LLC-PK1 (ATCC CL 101)
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	ECL Western Blotting Reagent RPN2132, Hyperfilm ECL, NA931 Anti-Mouse IgG
BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland	Bradford Reagenz
Calbiochem <sup>®</sup> , Darmstadt, Deutschland	Anti-P-Glycoprotein mouse mAb (C219) Anti-P-Glycoprotein mouse mAb (C494)
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Bromphenolblau, Mercaptoethanol, Polyacrylamid, Rotiphorese <sup>®</sup> , Roti <sup>®</sup> Block, Tris, Triton X-100, Tween 20
Gry-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland	Vincristinsulfat-GRY <sup>®</sup> 5 Injektionslösung
Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland	Doxorubicin 10 Hexal <sup>®</sup> Injektionslösung, Vinblastin 10 Hexal <sup>®</sup> Injektionslösung
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	BenchMark <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder, PBS, Rinderserumalbumin, Trypsin/EDTA
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Essigsäure, Ethanol, Isopropanol, Methanol, Natriumhydroxid, Propidiumiodid, Salzsäure
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Fast Green FCF
Schärfe System, Reutlingen, Deutschland	CasyTon <sup>®</sup> , Puffer zur Zellzahlbestimmung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen, Deutschland

cis-(Z)-Flupentixol-2HCl, D-Glucose-H<sub>2</sub>O,  
DMSO, Glycin, HEPES, Kaliumchlorid,  
Kaliumdihydrogenphosphat, Kristallviolett,  
MTT, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natrium-  
hydrogencarbonat, Neutralrot, PMSF,  
Probenecid, Propafenon, Reserpin,  
Rhodamin 123, Trichloressigsäure,  
Sulforhodamin B, Trifluperazin-HCl, Tris-HCl,  
Verapamil-HCl

#### 4.2.2 Zellkulturmedium, Supplements

Invitrogen GmbH, Karlsruhe,  
Deutschland

fötale Kälberserum (Kat.-Nr. 10270-106)  
Glutamin 200 mM (Kat.-Nr. 25030-024)  
Medium 199 (Kat.-Nr. 31150-030)  
Penicillin/Streptomycin (Kat.-Nr. 15140-122)

Zusammensetzung Zellkulturmedium: 500 ml Medium 199  
56 ml fötale Kälberserum  
5 ml Glutamin 200 mM  
5 ml Penicillin/Streptomycin  
*zusätzlich für LLC-MDR1:* 340 µl Vincristinsulfat 1 g/ml

Zusammensetzung Einfriermedium: Zellkulturmedium  
+ 10 % DMSO  
+ 10 % fötale Kälberserum

### 4.2.3 Lösungen

Die bei den Versuchen verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Krebs-HEPES-Puffer :	0,35 g Kaliumchlorid, 0,21 g Kaliumdihydrogenphosphat, 6,93 g Natriumchlorid, 0,35g Natriumhydrogencarbonat, 2,31 g Glucose Monohydrat und 2,38 g HEPES wurden in 500 ml demineralisiertem Wasser gelöst; pH 7,4
Ladepuffer für SDS-PAGE (4x):	0,6 M Tris-HCl, 20 % Glycerol, 20 % SDS, 10% Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE:	50 mM Tris-HCl, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,8
Lysispuffer zur Proteinisolation:	25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF; pH 7,5
Puffer für Western-Blot:	Blotting Puffer1: 20 % Methanol, 0,3 M Tris; pH 10,4 Blotting Puffer2: 20 % Methanol, 25 mM Tris; pH 10,4 Blotting Puffer3: 20 % Methanol, 25 mM Tris, 40 mM $\gamma$ -Aminocapronsäure, 0,01% SDS; pH 10,4
TBS-T:	25 mM Tris, 0,05 % Tween 20; pH 7,4
Essigsäure (1 %):	1 ml Eisessig wurde mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml verdünnt.
Fast Green-Lösung:	50 mg Fast Green wurden in 60 ml Eisessig gelöst mit 250ml Methanol versetzt und mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Kristallviolett (0,1 %):	0,5 g Kristallviolett wurden in 5 ml absolutem Ethanol gelöst und mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Natriumcitratlösung (0,1 M):	14,5 g Natriumcitrat wurden in 250 ml demineralisiertem Wasser gelöst und mit 250 ml absolutem Ethanol aufgefüllt.
Natriumhydroxidlg. (0,2 M):	8 g Natriumhydroxid wurden in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst.



Neutralrot (50 µg/ml):	0,5 ml Stammlösung (5 mg/ml in DMSO) wurden in 49,5 ml Zellkulturmedium verdünnt.
MTT-Lösung (5 mg/ml):	50 mg MTT wurden in 10 ml PBS gelöst.
MTT-Stopplösung:	50 g SDS wurden in 500 ml einer Mischung aus $\frac{3}{4}$ DMSO und $\frac{1}{4}$ Eisessig gelöst.
Propidiumiodid (5 %)	5 mg Propidiumiodid wurden in 100 ml PBS gelöst.
Rhodamin 123 (15 µM)	15 µl Rhodaminstammlösung (2 mM in DMSO) wurden in 1985 µl KHP gelöst.
Sulforhodamin B (0,4 %):	2 g Sulforhodamin B wurden in 500 ml 1 % Essigsäure gelöst.
Trichloressigsäure (10 %):	5 g Trichloressigsäure wurden vorsichtig in 45 ml demineralisiertem Wasser gelöst.

Zum Einstellen der pH-Werte diente 0,2 M Salzsäure bzw. 0,2 M Natriumhydroxid.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und als Stammlösungen (100 mM) bei -20 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden sie soweit mit Zellkulturmedium oder Krebs-HEPES-Puffer verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO auf den Zellen 0,5 % nicht überstieg.

#### 4.2.4 Geräte

Analysenwaage	Typ MC5-0CE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	GVA 460, Fritz Gössner GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Tube	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Begasungsbrutschrank	WTB Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CASY®-1 Zellzählgerät	Modell TT, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cellstar® Pipetten (15 ml, 25 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zellkultur Multiwell Platten für adhärenente Zellkulturen (96 Well)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mighty Small SE 260, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Eppendorf Research®Pro Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epTIPS pipette tips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Filter Top Zellkultur Flaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gasbrenner	GasProfi 1 <sup>SCS</sup> IUL Instruments GmbH, Königswinter, Deutschland

---

Kühlzentrifuge	Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Variomag Elektronikrührer Monotherm, H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer	POLARstar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Axiovert 25, Carl Zeiss Jena, Jena Deutschland
Nitrocellulosemembran	Protran <sup>®</sup> , Schleicher & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
pH Meter	inoLab pH Level 1, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Accujet <sup>®</sup> , Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage	BP 2215, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Titramax 1000, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG., Kelheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Hera Safe KS, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sterilfilter, CA-Membran, 0,2µM	Schleicher & Schuell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic T 660/H, Elma GmbH & Co. KG, Singen, Deutschland
Ultraschallstab	UW 70, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	TL 100, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Vakuumpumpe (Zellkultur)	Typ 120 00 02 VEB Reglerwerk Dresden, Dresden Deutschland

Vortexer	MS2 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington,USA
Wasserbad	GFL® Typ 1092, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Western-Blot-Apparatur	Eigenbau
Zellschaber	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Hettich Universal 30 F Typ 1400, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

#### 4.2.5 Statistik

Alle Messdaten sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens  $n = 3$  unabhängigen Experimenten angegeben. Alle Experimente wurden an Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede von Gruppen wurden eine Varianzanalyse (Anova) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $P$  von  $\alpha \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

#### 4.2.6 Software

CellQuest™ Software Version 3.1	1997 Becton Dickinson & Co.
FLUOstar Galaxy Version 4.02	1999 BMG Labtechnologies
GraphPad Prism® 3	1994-2000 GraphPad Software
Microsoft® Office 2000	1983-1999 Microsoft Corporation
WinMDI Version 2.8	1993-1998 Joseph Trotter