

# **Untersuchungen zur Verwendbarkeit von Purinnukleotidgehalten als prognostische Marker bei humanen Mammacarzinomzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"  
im Fachbereich Biologie der  
Johannis Gutenberg – Universität in Mainz

Ines Wachsmuth  
geboren in Helmstedt

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	2
1 Zusammenfassung.....	6
2 Einleitung.....	8
3 Material und Methode .....	12
3.1 Zellkultur.....	12
3.1.1 Zelllinien.....	12
3.1.2 Wachstumskurven.....	13
3.1.4 Klonogenitätstest (Plating Efficiency).....	13
3.2 Chemotherapeutische Behandlung .....	14
3.2.1 Doxorubicin .....	14
3.2.2 Oligomycin .....	14
3.2.3 CR-6.....	14
3.3 WST – Tests an Monolayern.....	14
3.3.1 WST mit Doxorubicin.....	14
3.3.2 WST mit Doxorubicin und CR-6.....	15
3.4 Histologische Untersuchungen.....	15
3.4.1 Zellkultur und Färbungen von Monolayern auf Chamberslides .....	15
3.4.3 Histologische Untersuchungen an Gefrierschnitten von Sphäroiden.....	16
3.4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	16
3.5 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA Extrakten .....	17
3.5 Bestimmung der Purinnukleotide mit HPLC .....	17
3.5.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung.....	17
3.5.2 Versuche mit Monolayern .....	17
Vorbereitung der Experimente .....	17
Durchführung der Experimente .....	18
3.5.3 Versuche mit Sphäroiden .....	18
Vorbereitung der Versuche .....	18
Durchführung der Versuche .....	19
3.5.2 Messen an der HPLC .....	19

3.6	Biolumineszenzmessungen an Sphäroiden .....	20
3.6.1	Allgemeine Versuchsbeschreibung.....	20
3.6.2	Meßverfahren.....	21
3.7	NMR-Spektroskopie .....	22
3.8	Statistik.....	23
4	Ergebnisse .....	23
4.1	Wirkung von Doxorubicin auf die Vitalität und die Proliferation von humanen Mammacarcinomzellen .....	23
4.1.1	WST- Tests mit Monolayern .....	23
4.1.2	Histologische Untersuchungen an Monolayern auf Chamberslides .....	25
4.1.3	Wachstumskurven von behandelten Sphäroiden.....	32
4.1.4	Histologische Untersuchungen an Gefrierschnitten von Sphäroiden.....	33
4.1.5	Agarose-Gelelektrophorese mit DNA Extrakten.....	36
4.2	Wirkung von Doxorubicin auf den Nukleotidphosphatgehalt von humanen Mammacarcinomzellen .....	37
4.2.1	HPLC Messungen .....	37
4.2.1.1	Abhängigkeit des Nukleotidphosphatgehalts von der Kultivierungsdauer .....	37
4.2.1.2	Abhängigkeit des Nukleotidphosphatgehalts von der Behandlung mit Doxorubicin .....	38
a)	Absolutwerte von Monolayern .....	38
b)	Relativwerte von Monolayern.....	49
c)	Unbehandelte Sphäroide.....	54
d)	Behandelte T47D – Sphäroide.....	54
	Absolutwerte .....	54
e)	Behandelte MCF-7adr Sphäroide.....	58
	Absolutwerte .....	58
	Relativwerte von MCF-7adr Sphäroiden .....	60
a)	Monolayer .....	65
b)	Sphäroide.....	67
4.2.3	NMR-Messungen an Monolayern von MCF-7 und MCF-7adr Zellen und MCF- 7wildtyp Sphäroiden .....	69
4.3	Untersuchungen zu Mechanismen der doxorubicininduzierten Stoffwechseländerungen.....	71
4.3.1	Behandlung von T47D Monolayern mit Oligomycin und Doxorubicin (HPLC) .....	71
4.3.2	ATP- und Laktatmessungen an T47D Sphäroiden (Biolumineszenz).....	72
4.3.3	Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden .....	72

4.4	Abbildende Biolumineszenz an T47D Sphäroiden nach Behandlung mit 10 $\mu$ M Doxorubicin (bildgebende Darstellung) .....	73
4.5	Wirkung von CR-6 als Mono- oder Kombinationstherapie mit Doxorubicin .....	76
4.5.1	WST – Test mit T47D Monolayern.....	76
4.5.3	Wachstumskurven von MCF-7adr Sphäroiden .....	78
4.5.4	Purinnukleotidgehalte von mit CR-6 behandelten MCF-7adr Sphäroiden .....	79
5	Diskussion von Material und Methode.....	80
5.1	Zellkultur.....	80
5.2	WST –Tests .....	81
5.3	Histologische Untersuchungen.....	81
a)	TUNEL – Reaktion.....	81
b)	Chamberslides.....	82
5.4	Agarosegelelektrophorese .....	82
5.5	Wachstumskurven von Sphäroiden.....	82
5.6	Klonogenitätstests .....	83
5.7	HPLC.....	83
5.7.1	Allgemeine Probleme der HPLC - Messungen.....	83
5.7.2	Auswertung der HPLC – Messungen.....	84
a)	Experimente mit Monolayern .....	84
b)	Experimente mit Sphäroiden.....	85
c)	Vergleich der Ergebnisse von Monolayern und Sphäroiden.....	86
5.8	Abbildende Biolumineszenz .....	86
5.8.1	Statistische Auswertung .....	86
5.8.2	Bildgebende Darstellung .....	88
5.9	Vergleich der Meßmethoden (HPLC, Biolumineszenz und NMR) .....	88
6	Diskussion der Ergebnisse .....	89
6.1	Wirkung von Doxorubicin auf das Wachstum, die Vitalität und die Klonogenität der Zellen .....	89
6.2	Verwendbarkeit der Ergebnisse zur Entwicklung prognostischer Verfahren .....	92
6.3	Darstellung der Doxorubicinwirkung mit Hilfe bildgebender Verfahren.....	95

6.4	Mögliche Ursachen eines Anstiegs des Purinnukleosidphosphatpools nach der Behandlung mit Doxorubicin .....	96
6.5	Behandlung mit CR-6 .....	99
7	Tabellenverzeichnis .....	102
8	Abbildungsverzeichnis .....	103
9	Literaturverzeichnis .....	106

# 1 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren besteht ein zunehmendes Interesse der medizinischen Forschung an nichtinvasiven Methoden zur Krebsdiagnostik, zu denen die magnetische Kernspinresonanz-Technik (NMR) zählt. Die Beobachtung von Konzentrationsänderungen bestimmter Metabolite in Tumoren *in vivo* während einer chemotherapeutischen Behandlung kann Aussagen über den Behandlungserfolg ermöglichen. Die Entwicklung auf diesem Gebiet bedarf der Unterstützung und Validierung durch biochemische und histologische Methoden. So zeigten vorläufige Untersuchungen an Implantationstumoren mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, daß in therapieempfindlichen Tumoren nach einer Doxorubicinbehandlung ein vorübergehender Anstieg von ATP auftritt. Dieses Verhalten der energiereichen Phosphate sollte anhand von doxorubicinsensitiven und -resistenten Tumorzellen mit einem biochemischen Verfahren systematisch analysiert werden. Dabei handelt es sich um ein Gemeinschaftsprojekt des Weizmann-Instituts (Rehovot, Israel), des Fraunhofer-Instituts (St. Ingbert) und der Universität Mainz.

Die Untersuchungen erfolgten an den humanen Brustkrebszelllinien T47D und MCF-7, wobei von der MCF-7 Linie die drei Subklone MCF-7wildtyp, MCF-7adr (doxorubicinresistent) und MCF-7mdr (multidrug-resistent) verwendet wurden. Die Zellen wurden als Monolayer bzw. Sphäroidkulturen mit 10 oder 0,1 µM Doxorubicin für 24 oder 50 h inkubiert; dabei erfolgten Probenentnahmen im 1- bis 2stündigen Abstand. Wachstumskurven sowie Klonogenitäts- und Vitalitätstests gaben Aufschluß über die Cytotoxizität des Medikaments. Die morphologischen Veränderungen im Behandlungsverlauf konnten anhand von auf Objektträgern gewachsenen Monolayern und Gefrier- bzw. Paraffinschnitten von Sphäroiden beobachtet werden. Zum Nachweis von Apoptosen wurden außerdem elektronenmikroskopische Bilder angefertigt und DNA-Gelelektrophoresen durchgeführt. Die Messung der Purinnukleotide erfolgte aus Zellextrakten mit Hilfe der HPLC. Bei T47D Sphäroiden wurden die Ergebnisse der HPLC durch die Methode der abbildenden Biolumineszenz ergänzt, um die räumlichen Auflösung der Nukleotidveränderung zu erfassen. Eine zusätzliche Behandlung mit Oligomycin lieferte bei T47D Monolayern Hinweise auf die Mitochondrienaktivität während der Doxorubicininkubation. Außerdem wurden T47D und MCF-7adr Sphäroide mit einem  $\alpha$ -Tocopherol-Analogon (CR-6) separat und in Kombination mit Doxorubicin behandelt, um Wechselwirkungen beider Agenzien zu registrieren.

Bei sämtlichen Zelllinien wurden im Behandlungsverlauf vorübergehende Anstiege aller Purinnukleosidphosphate gemessen, wobei ATP aufgrund des höheren Gesamtgehaltes in Absolutwerten dargestellt am stärksten anstieg, GTP jedoch relativ zur unbehandelten Kontrolle höher stieg als ATP. Der Effekt stand in deutlichem Zusammenhang mit einem massiven Zellsterben, entsprechend war er dosisabhängig und bei den besonders doxorubicinsensiblen T47D Zellen größer als bei den weniger empfindlichen MCF-7 Zellen oder deren resistenten Subklonen. Die ATP Gehalte von T47D Monolayern stiegen im Behandlungsverlauf von 2 bis 10 h vorübergehend mit einem Maximum nach 6 h um ca. 2 fmol/Zelle, entsprechend ca. 30 % der unbehandelten Kontrolle, die GTP Werte waren um bis zu 80 % erhöht. Die Behandlung mit Oligomycin ergab, daß die Phosphorylierung von ATP (GTP) hauptsächlich über die

Atmungskette erfolgte. Bei T47D Sphäroiden wurde sowohl mit der HPLC als auch mit der abbildenden Biolumineszenz ein Anstieg von ATP um 0,6  $\mu\text{mol/g}$  beobachtet, parallel dazu kam es zu einem leichten Anstieg von Laktat, was auf eine Stimulation der Glycolyse bei den Zellaggregaten hinweist. Die Dosisabhängigkeit der Doxorubicinwirkung war bei Sphäroiden gegenüber Monolayern deutlich verringert. Allerdings war eine hochaufgelöste Darstellung von lokalen Steigerungen der Purinnukleotide im Vorfeld des apoptotischen oder nekrotischen Zelltodes mit der Biolumineszenz-Methode technisch nicht möglich. Die Behandlung mit CR-6 führte bei T47D und MCF-7adr Sphäroiden zu einer Verstärkung der Doxorubicinwirkung. Da der Anstieg der Metabolite mit dem Zellsterben korreliert war und alle Purinnukleosidphosphate betraf, wird vermutet, daß durch die Wirkung des Medikaments DNA Schäden entstehen, die dosisabhängig zu einer Freisetzung von Purinbasen führen, welche zur Resynthese von Nukleotiden über die *Salvage Pathways* dienen.

Der Effekt kann als Therapieantwort betrachtet werden. Da er jedoch nur bei einer sehr hohen Dosierung von Doxorubicin und auch dann nur bei besonders sensiblen Zellen deutlich erkennbar war ist fraglich, ob er für eine Einschätzung des Behandlungserfolges am Patienten mit Hilfe der NMR-Technik geeignet ist. Die verminderte Dosisabhängigkeit des Effektes bei Sphäroiden gegenüber Monolayern könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, daß Tumoren *in situ* möglicherweise auch auf eine geringe Dosierung des Medikaments mit einem relativ starken Anstieg der Nukleotide reagieren. Weiterführende NMR-Untersuchungen am Tiermodell könnten daher sinnvoll sein.

## 2 Einleitung

Einer der zahlreichsten malignen Tumoren in den Industrienationen ist der Brustkrebs, eine Erkrankung, an der in den USA jährlich ca. 9000 Frauen sterben. Die im Verlauf der chemotherapeutischen Behandlung oft rasch erworbenen Resistenzen der Tumorzellen gegen die eingesetzten Medikamente sind die häufigste Ursache für den Mißerfolg einer Therapie. Eines der erfolgreichsten Chemotherapeutika bei der Behandlung von Brustkrebs ist Doxorubicin (Adriamycin). Obwohl das Medikament seit ca. 30 Jahren gegen ein breites Spektrum von Neoplasien eingesetzt wird, ist seine Wirkweise nicht vollständig geklärt. Es gehört zu der chemischen Gruppe der Anthracycline, die in die DNA interkalieren und dort vermutlich den Komplex aus Topoisomerase II und DNA stabilisieren. Dabei wird ein Doppelstrangbruch durch das Enzym katalysiert, dessen Enden jedoch nicht wieder zusammengeführt werden, sondern mit dem Enzym verbunden bleiben (Liu et al. 1983, Liu 1989, Pommier 1995). Doxorubicin bildet in Gegenwart von reduzierenden Agenzien, wie z.B. Formaldehyd kovalente Addukte mit den Deoxyguanosinresten eines DNA-Strangs und gleichzeitig eine Vernetzung über Wasserstoffbrücken zu den Deoxyguanosinresten der gegenüberliegenden DNA Sequenz (Fenick et al. 1997, Taatjes et al. 1997) (Abb. 1a). Außerdem entstehen bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die eine cytotoxische und besonders auch cardiotoxische Wirkung entfalten (Lown et al. 1982, Doroshow 1995) (Abb. 1b).

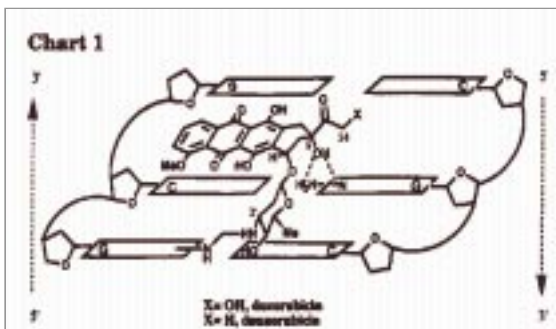


Abbildung 1a (Fenick et al. 1997)

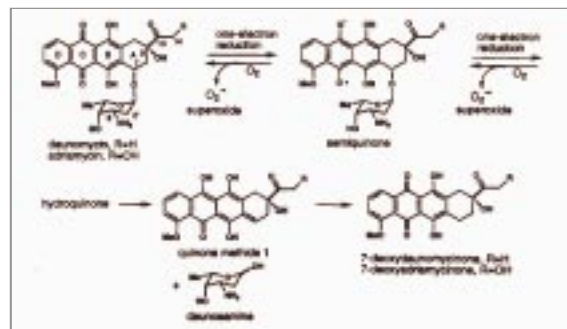


Abbildung 1b (Taatjes et al. 1997)

Abbildung 1: Wirkmechanismen von Doxorubicin; 1a: Interkalation von Doxorubicin oder Daunomycin in eine 5'-GpC-3' DNA-Sequenz. Es entsteht eine kovalente Bindung zwischen der 3'-Aminogruppe des Medikaments und der 2'-Aminogruppe des Deoxyguanosins. Außerdem werden Wasserstoffbrücken zwischen der 9-Hydroxylgruppe des Medikaments und den Stickstoffen an Position 1 und 2 eines gegenüberliegenden Deoxyguanosins gebildet; 1b: In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff kommt es zur Bildung von Superoxiden, ist kein molekularer Sauerstoff vorhanden, entsteht unter Abspaltung des Zuckers inaktives Deoxyglycon.



Die bislang erfolgreichste Strategie der Brustkrebsbekämpfung ist die Früherkennung. Leider sind die dafür verwendeten Methoden entweder invasiv (Biopsien) oder mit dem hohen Risiko einer Strahlenbelastung (Mammographie) verbunden. Neben der Sonographie gehört die bildgebende Kernspinresonanz (MRI) zu den nichtinvasiven Möglichkeiten der Früherkennung und Diagnostik. Eine weitere Anwendung der magnetischen Kernspinresonanz (NMR) neben der bildgebenden ist die Spektroskopie (MRS). Mit Hilfe dieser Technik können Konzentrationsänderungen bestimmter Metabolite im Gewebe *in vivo* beobachtet werden, beispielsweise im Verlauf einer chemotherapeutischen Behandlung. Diese *in vivo* Methoden müssen in der Entwicklungsphase durch histologische und biochemische Untersuchungen ergänzt werden.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Gemeinschaftsprojektes der Arbeitsgruppe um Prof. Degani am Weizmann-Institut in Rehovot (Israel), der NMR-Abteilung des Fraunhofer Instituts in St. Ingbert und der Arbeitsgruppe Müller-Klieser an der Universität Mainz und wurde gefördert von der German Israeli Foundation (GIF). Am Fraunhofer Institut St. Ingbert wurde im Rahmen einer Promotion (Breidt 1998) an der Verbesserung des Auflösungsvermögens der MRI gearbeitet. Die Entwicklung eines speziellen NMR-Probenkopfes ermöglichte erstmals die Beobachtung eines einzelnen Sphäroids *in vivo* über 40 h während einer chemotherapeutischen Behandlung. Die Arbeitsgruppe um Prof. Degani beschäftigt sich sowohl mit der bildgebenden als auch mit der spektralen magnetischen Kernspinresonanz. Ein Ziel des Arbeitskreises ist die Entwicklung der MRI als Ersatz der Mammographie. Außerdem führten u.a. Neeman und Dahan-Grobgeld innerhalb dieser Forschungsgruppe MRS Untersuchungen des Energiemetabolismus in humanen Brustkrebszellen durch, im Hinblick auf die Verwendbarkeit einzelner Metabolite als prognostische Marker.

In den letzten 15 Jahren wurden vielfältige Untersuchungen mit  $^{31}\text{P}$  MRS durchgeführt deren Ziel es ist, anhand der Spektren von Phosphaten wie ATP die Therapieantwort von Tumoren auf nichtinvasive Weise beurteilen zu können. Zahlreiche von verschiedenen Forschern durchgeführte Untersuchungen sowohl an kultivierten Zellen wie auch an Tumoren *in vivo* hatten eine Verminderung der Nukleotidphosphatsignale (NTP) infolge der Chemotherapie ergeben, die auf die Tumorregression zurückgeführt wurde (Okamoto und Ogura 1985, Mimnaugh et al. 1985, Pascoe et al. 1987, Szczepanska et al. 1988, Geetha et al. 1989, Vile et al. 1989, Smith et al. 1991). In anderen Fällen jedoch wurde ein paradoxer vorübergehender Anstieg der NTP Konzentrationen beobachtet, der zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Behandlungsbeginn auftrat und verschiedene Arten von Tumoren oder Zellkulturen sowie unterschiedliche Medikamente betraf (Cohen et al. 1987, Werhle et al. 1987, Steen 1989, Neeman et al. 1989, Berghmans et al. 1992, Dahan-Grobgeld 1997). Neeman et al. untersuchten die humane Mammacarzinomzelllinie T47D und fanden einen selektiven dosisabhängigen Anstieg von ATP und GTP infolge einer Behandlung mit Actinomycin und Anthracyclinen, während die Konzentrationen von CTP und UTP unverändert blieben. Aufbauend auf diese Arbeit untersuchte Dahan-Grobgeld Monolayer von T47D, MCF-7 und MCF-7adr Zellen, Sphäroide von T47D Zellen sowie Tumoren von MCF-7 Zellen *in vivo*. Sie fand einen ATP bzw. GTP Anstieg infolge der Behandlung mit Doxorubicin bei allen Zelllinien inklusive der Sphäroide und Tumoren.

Allerdings zeigen sowohl die Bilder als auch die Spektren magnetischer Kernspinresonanz an lebenden Geweben relativ große Unschärfen bzw. Streuungen. In der vorliegenden Arbeit sollte an Monolayern von T47D, MCF-7, MCF-7adr (erworbene Resistenz durch Selektion) und MCF-7mdr (primäre Resistenz durch Transfektion mit *mdr1*) und an multizellulären Sphäroiden aus von T47D- und MCF-7adr Zellen mit Hilfe der HPLC und der sogenannten abbildenden Biolumineszenz (Mueller-Klieser et al. 1988 und 1989) gezeigt werden, ob es bei den genannten Zelllinien tatsächlich eine Therapieantwort in Form eines vorübergehenden Anstiegs von Purinnukleotiden gibt und ob dieser in Abhängigkeit von der Sensibilität der Zellen gegenüber dem Medikament auftritt. Reagieren Zellen, die durch das Chemotherapeutikum stark geschädigt werden mit einem hohen Anstieg von Purinnukleotiden, könnten resistente Zellen dagegen möglicherweise ein wesentlich schwächeres Signal zeigen und auf diese Weise gegen die sensiblen Zellen abgegrenzt werden. Das Verfahren zielt einerseits darauf ab, zu Beginn einer Chemotherapie auf nichtinvasive Weise bestimmen zu können, ob die Tumorzellen auf die Behandlung ansprechen und andererseits Resistenzbildungen im Behandlungsverlauf beobachten zu können, um die Therapie entsprechend zu variieren.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die räumliche Verteilung dieses Anstiegs mit der abbildenden Biolumineszenz darstellbar ist. Mit Hilfe dieser Methode wäre es möglich in Biopsien behandelter Tumoren die Reaktion auf die Therapie zu beurteilen. Die Anwendung dieser Technik auf behandelte Sphäroide sollte Erkenntnisse über die metabolischen Vorgänge beim Zelltod liefern. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorgang der Apoptose (programmierter Zelltod) und dem Anstieg von ATP sollte untersucht werden, wobei der vorübergehende Anstieg von ATP ein Signal für oder eine Folge von Apoptosen sein könnte. Die gewonnenen Ergebnisse sollten auch in Hinblick auf die mögliche Herkunft der erhöhten Purinnukleotide diskutiert werden.

Die von Breidt *in vivo* beobachteten, durch die Behandlung mit Doxorubicin induzierten Veränderungen an Sphäroiden sollten mit Hilfe histologischer Methoden und der bildgebenden Biolumineszenz ergänzt werden. Alle drei beteiligten Arbeitsgruppen verwendeten für ihre Untersuchungen dieselben Zelllinien, die von der Arbeitsgruppe Degani zur Verfügung gestellt wurden.

In der Chemotherapie werden seit längerem Vitamine und ähnliche Stoffe eingesetzt, die vor allem für ihre antioxidative Wirkung bekannt sind und die unerwünschten Nebenwirkungen der Cytostatika und -toxika mildern sollen. Häufig vermindern sie die Toxizität der Medikamente, ein Effekt, der hauptsächlich auf den Schutz der Lipidmembranen, insbesondere der Mitochondrienmembranen, durch die Antioxidantien zurückgeführt wird und z.B. zu einer Abschwächung der Cardiotoxizität von Doxorubicin führen kann (Szczepanska et al. 1988, Pascoe 1987, Geetha 1989, Vile und Winterbourn 1989, Okamoto und Ogura 1985, Mimnaugh 1985). Einige Autoren beschreiben hingegen einen synergistischen oder additiven Effekt von Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol mit verschiedenen Chemotherapeutika, darunter Doxorubicin (Ripoll et al. 1986, Nesbitt et al. 1988, Thornton et al. 1995, Borovansky 1997, Makishima et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung eines  $\alpha$ -Tocopherolanalogons, des CR-6 (3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran), auf die Toxizität von Doxorubicin bei T47D und MCF-7adr Monolayern sowie MCF-7adr Sphäroiden beschrieben.

Außerdem wird auf einen möglichen Zusammenhang der Wirkung von CR-6 mit dem Anstieg der Purinnukleotide hingewiesen. CR-6 wurde bislang nur von Montoliu et. al. (1999) als schützende Substanz gegen Zellschäden durch Stickstoffmonoxyd (NO) beschrieben.

Die Abgrenzung der bei den genannten Zelllinien durch Doxorubicin verursachten Apoptosen gegen den nekrotischen Zelltod wurde teilweise in Zusammenarbeit mit Dunkern (1997) im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. Die dort angewandten Methoden und erzielten Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit nicht nochmals ausführlich beschrieben, gehen aber in die Diskussion mit ein. Die Apoptosen wurden durch histologische Verfahren wie H&E-, TUNEL- und DAPI-Färbungen sowie Elektronenmikroskopie und Gelelektrophorese nachgewiesen und quantifiziert. Die Cytotoxizität von Doxorubicin wurde mit Hilfe von Vitalitätstests (MTT, BrdU), Klonogenitätstests (Plating Efficiency) und Wachstumskurven untersucht. Da im Rahmen der Diplomarbeit von Dunkern die Zelllinie MCF-7mdr nicht verwendet, kein CR-6 eingesetzt und auch keine Klonogenitätstests mit Sphäroiden durchgeführt wurden, ergänzen Vitalitätsstudien mit Hilfe von WST-Tests sowie Klonogenitätstests mit MCF-7adr Sphäroiden in der vorliegenden Arbeit die in Zusammenarbeit mit Dunkern durchgeführten Untersuchungen. Die histologischen Untersuchungen (H&E-TUNEL- und DAPI-Färbungen) zielten zum einen auf ein generelles Verständnis der Wirkung von Doxorubicin auf die genannten Zelllinien ab, zum anderen dienten sie dem Vergleich mit den Ergebnissen der MRI-Messungen am einzelnen Sphäroid von Breidt (1998), sowie den Ergebnissen der abbildenden Biolumineszenz.

Eine Quantifizierung der Purinnukleosidphosphate erfolgte an Perchlorsäureextrakten aus Monolayern und Sphäroiden mit Hilfe der HPLC; das sog. abbildende Biolumineszenzverfahren diente der Messung des ATP- und Laktatgehaltes von T47D Sphäroiden. Für diese Experimente wurden die Zellen mit 10 und 0,1 µM Doxorubicin (evtl. zusätzlich 1,0 µM) und/oder 100, 10 und 1,0 µM CR-6 behandelt. Der Behandlungszeitraum betrug 24 oder 50 h, die Probenentnahme erfolgte im Zeitraum von 0 bis 10 h in 2stündigen Abständen. Die Ergebnisse wurden innerhalb einer Zelllinie auf die Dosisabhängigkeit überprüft und Monolayer und Sphäroide miteinander verglichen. Außerdem fand ein Vergleich der Meßergebnisse der verschiedenen Zelllinien miteinander statt. Im Rahmen eines Gastaufenthaltes am Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) erfolgten MRS-Messungen an MCF-7 Sphäroiden und Monolayern sowie MCF-7adr Monolayern. Alle Ergebnisse wurden mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Degani verglichen.

Eine Inhibition der zellulären Atmung durch Oligomycin sollte zusätzlich Erkenntnisse über die Art der Phosphorylierung der Nukleotidvorstufen erbringen. Auch Laktatmessungen mit Hilfe der abbildenden Biolumineszenz an T47D Sphäroiden lieferten Hinweise auf den Ort der Phosphorylierung.

Im Anschluß an die Darstellung der Ergebnisse werden die verwendeten Materialien und Methoden sowie die Ergebnisse diskutiert. Zum einen wird auf Verwendungsmöglichkeiten der Verfahren im Rahmen der Brustkrebstherapie eingegangen, zum anderen werden metabolische Vorgänge diskutiert, die zu einem vorübergehenden Anstieg von Purinnukleotiden im Verlauf einer Chemotherapie führen können.

## 3 Material und Methode

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit fanden die humanen Mammacarcinom-Zelllinien T47D, MCF-7, MCF-7adr und MCF-7mdr Verwendung. Sie wurden von der Arbeitsgruppe Degani am Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) zur Verfügung gestellt.

Die Etablierung der Epithelzelllinie T47D erfolgte aus dem Pleuraerguß eines Milchgang-Carcinoms der Brust einer 54jährigen Frau. Die Zellen tragen Rezeptoren für verschiedene Steroide und sind Östrogenrezeptor-negativ (ER -) und Progesteronrezeptor-positiv (PR +) (Rochefort et al. 1984). Ihr Wachstum ist insulinabhängig.

Die MCF-7-Linie wurde aus einem Pleuraerguß einer 69jährigen Kaukasierin etabliert und zeigt einige Eigenschaften von differenzierten Brustepithelzellen, inklusive Östradiolsynthese. Es können sich Viren vom B oder C Typ auf der Zelloberfläche befinden, daher sollten die Zellen nach Kategorie 2 (P2) behandelt werden. MCF-7 sind ER + und PR - (Brooks et al. 1973).

MCF-7adr ist ein durch Selektion etablierter adriamycin(doxorubicin)resistenter Subklon der MCF-7-Linie. Die Zellen zeigen eine erhöhte Aktivität des *mdr1*-Gens und damit eine Überexpression von P-Glycoprotein, welches den Efflux von Chemotherapeutika aus der Zelle über die Cytoplasmamembran beschleunigt. Es werden jedoch noch zusätzliche Mechanismen der erworbenen "multidrug resistance" diskutiert (Denis-Gay et al. 1998, Yuan et al. 1997, Budworth et al. 1997, Chen et al. 1996, Chen und Waxman 1995, Aftab et al. 1994, Mimnaugh et al. 1991).

Die MCF-7mdr-Linie wurde durch Transfektion mit *mdr1* etabliert. Es gibt sie in unterschiedlicher Ausprägung der Überexpression von P-Glycoprotein (Daschner et al. 1999, Molinari et al. 1994, Ziad et al. 1994).

Sowohl Monolayer als auch Sphäroide wurden im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> begast. Die Monolayer wurden in adhärenenten Petrischalen oder Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Sphäroidkultivierung wurden jeweils ca. 1 bis 2 x 10<sup>7</sup> Zellen in Spinnerflaschen (300 oder 100 ml) mit Magnetührstab eingesät.

Tabelle 1: Nährmedien und Zusätze

Zelllinie	Medium	Zusätze
T47D	RPMI	Insulin (0,2 U/ml) 10 % cosmic calf 1,0 % Penicillin / Streptomycin
MCF-7	DMEM 4,5 % Glucose	17 $\beta$ Estradiol (0,1 $\mu$ M / l) 10 % cosmic calf 1,0 % Penicillin / Streptomycin
MCF7adr	DMEM 4,5 % Glucose	10 % cosmic calf 1,0 % Penicillin / Streptomycin
MCF7mdr	DMEM 4,5 % Glucose	10 % cosmic calf 1,0 % Penicillin / Streptomycin

### 3.1.2 Wachstumskurven

Die Monolayer-Wachstumskurven von behandelten und unbehandelten Zellen aller verwendeten Zelllinien sowie Wachstumskurven von T47D und MCF-7adr Sphäroiden sind in Zusammenarbeit mit Dunkern entstanden und können bei Dunkern (1997) und bei Dunkern und Mueller-Klieser 1999 eingesehen werden. In der vorliegenden Arbeit werden zusätzliche Wachstumskurven von T47D und MCF-7adr Sphäroiden gezeigt, die der Beurteilung der Sensitivität der Zellen für Doxorubicin und/oder CR-6 dienen. Die Bestimmung der Sphäroidgrößen erfolgte mit Hilfe der Übertragung von invertmikroskopischen Aufnahmen über eine CCD Kamera an einen PC. Dort wurden die Flächen der Sphäroide unter Verwendung des Programms Optimas und einem speziellen Makro vermessen und die mittleren Sphäroiddurchmesser und -volumina bestimmt. Am Vortag der Behandlung (Tag -1) erfolgte eine Größenbestimmung aus der gesamten Population, am Behandlungstag (Tag 0) von jeder zu untersuchenden Population vor und 6 h nach der Behandlung. Im folgenden wurden die Sphäroidgrößen jeder separaten Population über den Beobachtungszeitraum hinweg täglich bestimmt, mit einer jeweiligen Anzahl von ca. 300 Sphäroiden.

### 3.1.4 Klonogenitätstest (Plating Efficiency)

Die behandelten Sphäroide wurden trypsinisiert und die Zellsuspension in Nährmedium verdünnt. Pro Petrischale wurden 100 Zellen eingesät und so lange bei 37°C und 0,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis die Kolonien deutlich erkennbar waren (ca. 10 Tage). Die Kolonien wurden mit Methylenblau gefärbt, die Zählung manuell durchgeführt. Als Ergebnis wird die Zahl der gebildeten Kolonien relativ zur Anzahl der ausgesäten Zellen angegeben.

## 3.2 Chemotherapeutische Behandlung

### 3.2.1 Doxorubicin

Nach der Lösung von Doxorubicin (D1515, Hydrochloride, App. 98 %, *Sigma, St. Louis, USA*) in sterilem Aqua dest. wurde die 4,31 mM Stammlösung mit sterilem Aqua dest. auf 1000 und 100  $\mu\text{M}$  zur weiteren Verwendung verdünnt. Für die meisten Messungen wurden Konzentrationen von 10 und 0,1  $\mu\text{M}$  (selten zusätzlich 1,0  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

### 3.2.2 Oligomycin

Das Oligomycin (*Sigma, St. Louis*) wurde den Monolayern in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Als Lösungsmittel diente DMSO.

### 3.2.3 CR-6

CR-6 (*Romero, F.J., School of Medicine & Dentistry, Valencia, Spanien*) ist ein  $\alpha$ -Tocopherol-Analogon mit der Summenformel:  $\text{C}_{12}\text{O}_3\text{H}_{16}$  (GFG 208,25) und der Bezeichnung (3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran). Für die Messungen wurden Konzentrationen von 1,0 sowie 10 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Lösungsmittel diente DMSO, da CR-6 nicht wasserlöslich ist.

## 3.3 WST – Tests an Monolayern

Der WST – Test ist ein Vitalitätstest, der auf der Reduktion von dem Tetrazoliumsalz WST-1 durch NADH zu einem farbigen Niederschlag beruht. Die Farbintensität ist der Menge des vorhandenen NADH proportional und damit ein Maß für die Stoffwechsel- und Mitochondrienaktivität der Zellen. Die Vitalität wird dargestellt als Änderung der photometrisch bestimmten Extinktion behandelte Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (in %). Die WST – Tests wurden mit dem *Cell Proliferation Reagent WST-1 Kit (Boehringer, Mannheim)* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Verdünnung der Doxorubicin-Stammlösung auf die in die Platten pipettierten Endkonzentrationen erfolgte mit Nährmedium.

### 3.3.1 WST mit Doxorubicin

Die Inkubationszeiten mit 0,1 oder 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin betragen 2, 4, 6, 8 und 10 h. Dieselben Zeiten wurden für die mit Hilfe der HPLC und der Biolumineszenz durchgeführten Experimente gewählt, hinzu kam bei diesen eine Messung nach 24stündiger und teilweise nach 50stündiger Inkubation. Für derartig lange Inkubationszeiten ist das WST – Reagenz nicht unbedingt geeignet, daher wurden die Experimente nach 10 h beendet. Am Vorabend des Versuchstages wurde ein Mediumwechsel in allen microwells (*Nunc, Wiesbaden*) durchgeführt. Am Versuchstag wurden die wells für die Leerwerte mit Nährmedium aufgefüllt und die Zellen, die am längsten dem Medikament exponiert werden sollten, sowie ihre korrespondierende unbehandelte Kontrolle, zuerst pipettiert. Die Behandlung wurde also mit der 10 h Inkubation begonnen und endete mit der 2 h bzw. 1 h Inkubation. Danach wurde das WST – Reagenz in alle wells gegeben und nach 2stündiger Inkubation gemessen. Die unbehandelten Kontrollen wurden

statistisch (T-Test) auf einen zeitlichen Gang untersucht und nur dann, wenn ein solcher mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\geq 95\%$  ( $p \leq 0,05$ ) nicht vorhanden war, als Ausgangswert für die Behandlung (0 h) gemittelt. Der T-Test wurde in derselben Weise auf die behandelten Zellen angewendet, um eine zeitabhängige Änderung der Zellvitalität zu erfassen. Die Meßwerte der behandelten Zellen wurden relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen sowie mit verschiedenen Zelllinien wurden anschliessend miteinander verglichen.

### 3.3.2 WST mit Doxorubicin und CR-6

Die Tests wurden mit T47D und MCF-7adr Zellen durchgeführt. Nach der Behandlung zum Zeitpunkt 0 h, inkubierten die Zellen für 6 bzw. 24 h. Die CR-6 Konzentrationen von 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  sowie die Kombinationen aus Doxorubicin und CR-6 wurden wie die Doxorubicinlösungen vor dem Experiment mit Medium angesetzt, temperiert und quasi als Mediumwechsel in die wells pipettiert.

## 3.4 Histologische Untersuchungen

### 3.4.1 Zellkultur und Färbungen von Monolayern auf Chamberslides

Chamberslides sind beschichtete Objektträger mit einem Kammeraufsatz, der in 2 bis 8 Kammern unterteilt ist. Nachdem die Monolayer auf dem Objektträger gewachsen und evtl. behandelt sind, kann der Kammeraufsatz entfernt und die Zellen fixiert und gefärbt werden. Für die Färbungen von Monolayern von T47D, MCF-7 und MCF-7adr Zellen wurden Chamberslides mit je 8 Kammern (*Nunc*) verwendet. Die Einsaat von T47D erfolgte mit jeweils 5000 Zellen / Kammer, von den MCF-7 Linien mit 3000 Zellen / Kammer. Die Nährmedien waren dieselben wie bei der Monolayerkultur in Petrischalen und wurden täglich gewechselt. Die Inkubationszeit der Zellen in Doxorubicin variierte zwischen 10 min und 8 h. Mindestens eine der Kammern wurde nicht mit Gift behandelt. Sobald die gewünschte Inkubationszeit erreicht war, wurde das Nährmedium abpipettiert und die Zellen trockneten an der Luft. Darauf folgte eine Fixierung in eiskaltem Aceton mit anschließender Färbung.

Es wurden H & E -, TUNEL – DAPI - und Ki 67 Färbungen angefertigt (siehe dazu auch Dunkern 1997). Die H & E – Färbung kann in Fachbüchern der Histologie nachgelesen werden und wird daher hier nicht ausführlich beschrieben. Hämalau (Hämatoxilin) färbt Zellkerne blau, Eosin färbt das Cytoplasma rot. Die Färbezeiten wurden bei jedem Färbegang mit Hilfe von Test-Objektträgern neu bestimmt.

Die TUNEL-Färbung (*Boehringer, Mannheim*) beruht auf einer Markierung von 3' OH DNA-Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Da solche Fragmente häufig bei der Apoptose gebildet werden, gilt die Färbung als Apoptosenachweis. Sie wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, dabei jedoch auf den Zwischenschritt des Proteinabbaus durch Proteinase K verzichtet (siehe auch Wachsmuth 1996 und Dunkern 1997). Sowohl das TUNEL-Enzym als auch das Labeling wurden mit TE-Puffer auf die halbe Konzentration verdünnt. Da die Eigenfluoreszenz des Doxorubicins störend bei der Beurteilung der TUNEL Fluoreszenz wirkte,

erfolgte teilweise im Anschluß an die Fluoreszenzfärbung noch eine Signalkonversion mit POD (Peroxidase), wodurch ein brauner Niederschlag anstelle der Fluoreszenz entsteht (detaillierte Beschreibung bei Wachsmuth 1996).

Die DAPI – Kernfärbung wurde mit 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI) (*Serva, Heidelberg*) an den TUNEL-gefärbten Zellen durchgeführt. Sie dient der Quantifizierung der insgesamt betrachteten Zellen, damit die Anzahl der TUNEL gefärbten Zellen relativ zur Gesamtzahl bestimmt werden kann. Außerdem können Veränderungen des Zellkerns während der Behandlung beobachtet werden.

Ki 67 (*Dianova, Hamburg*) ist ein monoklonaler Antikörper, der mit einem humanen Kernprotein reagiert, welches nur von proliferierenden Zellen exprimiert wird (Lelle et al. 1987). Nach der Actonfixierung und Trocknung der Zellen auf den Objektträgern folgte ein Waschschrift für 15 s in TBS mit 0,05 % Saponin bei Raumtemperatur. Danach wurden sie für 1 h mit dem Primäantikörper (MIB-1, *DIANOVA, Hamburg*), welcher 1:50 in Verdünnungspuffer (*BIOMEDA*) gelöst war, inkubiert und danach erneut in TBS-Saponin gewaschen. Die anschließende Behandlung mit DAKO-Envision (*DAKO, Carpinteria, USA*) dauerte 30 min. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBS-Saponin. Zuletzt wurden die Zellen mit DAB (*DAKO*) für 5 bis 8 min inkubiert und nach einer Spülung in Aqua Dest mit Meyers Hämalaun gegengefärbt.

#### 3.4.3 Histologische Untersuchungen an Gefrierschnitten von Sphäroiden

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Sphäroide wurden nach der Einbettung in Tissue-Teck (*Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan*) 5 - 15 µM dick mit einem Kryotom der Firma *Slee* (Mainz) geschnitten (detaillierte Beschreibung bei Dunkern, 1997) und anschließend luftgetrocknet und ohne Zwischenlagerung gefärbt.

#### 3.4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die für die elektronenmikroskopische Präparation vorgesehenen Sphäroide wurden für 2,5 h in Cacodylatpuffer (0,1 µM, pH 7,35) + 1,5 %igem Glutaraldehyd (*Sigma-Aldrige-Chemie GmbH, Steinheim*) + 1,5%igem PFA (*Merck KFAA, Darmstadt*) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in Cacodylatpuffer + 4 % Saccharose (*Merck*). Anschließend wurden die Proben erneut für 1,5 h in 2 % OsO<sub>4</sub>haltigem Cacodylatpuffer fixiert und danach 3 x für je 10 min mit Aqua Dest gewaschen. Zur besseren Handhabung der Sphäroide erfolgte eine Einbettung in 1,5 %igem flüssigen Agar. Sie wurden anschließend durch eine alkoholische Reihe von 50 % bis 100 % dehydriert und in 100 %iges Propylenoxid-Intermedium (*Serva, Heidelberg*) überführt (alle Schritte je 10 min). Über Nacht evaporierten sie unter dem Abzug, worauf eine 16stündige Inkubation in 100 %igem Araldit folgte. Die Polymerisierung des Araldits erfolgte entsprechenden Einbettröhrchen unter Zugabe eines Starters während einer 2tägigen Inkubation bei 60 °C. Nach der Aushärtung wurden Semidünnschnitte angefertigt und auf Formvar-beschichtete Kupfernetze (*Serva, Heidelberg*) übertragen. Nach einer Kontrastierung der Schnitte mit 0,8 %iger Uranylacetat-haltiger 50 %iger Methanollösung und nachfolgender



Inkubation in 2 %iger wässriger Bleicitratlösung (5 min) konnten die Präparate elektronenmikroskopisch betrachtet werden (*EM 900 Axiophot, Zeiss, Jena*).

### 3.5 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA Extrakten

Material und Methode der Agarose-Gelelektrophorese sind bei Wachsmuth (1996) sowie Dunkern (1997) detailliert beschrieben. Die Gelelektrophorese sollte dem Nachweis von DNA-Fragmenten definierter Länge dienen, die häufig bei dem Vorgang der Apoptose auftreten. Die Probenentnahme wurde vor der Inkubation mit Doxorubicin begonnen und erfolgte anschließend im 2stündigen Abstand bis zu 10 h nach Behandlungsbeginn; eine weitere Entnahme erfolgte jeweils 24 und 48 h nach Behandlungsbeginn. Die DNA wurde mit Phenol extrahiert oder mit der NP-40 Methode. Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung folgte eine Färbung der DNA mit Ethidiumbromid.

### 3.5 Bestimmung der Purinnukleotide mit HPLC

#### 3.5.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung

Die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin erfolgte zum Zeitpunkt 0 h, nach der Entnahme einer unbehandelten Probe. Die weiteren Probenentnahmen wurde über einen Zeitraum von 24 oder 50 h im Abstand von 2 h durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf der Konzentrationsänderung der Purinnukleotidphosphate während der Einwirkung des Medikaments zu verfolgen. Ebenso wurde parallel mit einer unbehandelten Kontrollreihe verfahren. Dadurch gelang es, versuchsbedingte Schwankungen und physiologische Streuungen, die nicht auf die Medikamentwirkung zurückzuführen waren, zu erfassen. Die Extraktion und Messung mit Hilfe der HPLC ist unten beschrieben. Die Auswertung erfolgte hauptsächlich mit MS Excel. Zum Vergleich mehrerer Experimente miteinander und zur Bildung von Mittelwerten wurden die Absolutwerte in % der jeweiligen unbehandelten Kontrollen dargestellt. Die Energycharge (EC) wurde nach der Formel  $(EC = ATP + 0,5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  aus den Absolutwerten berechnet. Innerhalb einer Zelllinie wurden die Meßergebnisse von verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen sowie von Monolayern und Sphäroiden miteinander verglichen. Außerdem wurden sensitive und resistente Zelllinien bei gleicher Doxorubicinkonzentration einander gegenübergestellt.

#### 3.5.2 Versuche mit Monolayern

##### Vorbereitung der Experimente

Die Vermehrung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen, bis ausreichend Zellmaterial zur Verfügung stand. Ca. 6 Tage vor Versuchsbeginn wurden  $4 - 6 \times 10^6$  Zellen / Petrischale (15 ml) eingesät, wobei auf exakt dieselbe Zellzahl in jeder Schale zu achten war, da bereits eine Differenz von  $2 \times 10^6$  Zellen zum Versuchszeitpunkt zu unterschiedlichen Meßergebnissen

führen konnte. Für jeden Behandlungszeitraum wurden je 3 Petrischalen mit derselben Doxorubicinkonzentration inkubiert, so daß insgesamt 3 Versuchsreihen parallel liefen. Gleichzeitig erfolgte bei jeder Probenaufbereitung die Extraktion eines unbehandelten Monolayers als Kontrolle. Es wurden also zu jedem Entnahmezeitpunkt (1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 und 50 h) 4 Petrischalen bearbeitet, außer zum Zeitpunkt 0, an dem nur 3 unbehandelte Populationen entnommen wurden. Jedes Experiment erforderte somit einen minimalen Einsatz von 27 Petrischalen, zu denen zusätzlich noch eine Sicherheitsreserve von 4 oder 5 Schalen angelegt, und aus denen am Versuchsvortag die Zellzahl bestimmt wurde (mindestens 2 Schalen), da die Zellen teilweise Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zeigten. Sobald eine Zellzahl von ca.  $15 \times 10^6$  erreicht war, konnte das Experiment durchgeführt werden.

#### Durchführung der Experimente

Die Monolayer wurden mit EDTA (*Merck, Darmstadt*) gewaschen und anschließend trypsinisiert (Trypsin, *Sigma, St. Louis*). Der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines elektronischen Zellzählgerätes (*CASY, Schärfe, Reutlingen*) folgte eine Zentrifugation (10 min., 500 g, 4°C) und die Aufnahme der Zellen in HBSS/ $\text{Ca}^{2+}$  zu einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen / 200  $\mu\text{l}$ . Pro Petrischale wurden jeweils 3 Proben zu je 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension entnommen und mit je 300  $\mu\text{l}$  kalter PCA (*Merck, Darmstadt*) (0,6 M) auf Eis  $3 \times 10$  s mit Ultraschall homogenisiert. Hierbei mußte die Zeit sehr korrekt eingehalten werden, da ATP säurelabil ist und bereits wenige Sekunden Differenz zu unterschiedlichen Meßergebnissen führten. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Reaktionsgefäße für 2 min bei 10 000 g und 4°C. 400  $\mu\text{l}$  des Überstands wurden mit 120  $\mu\text{l}$  KOH (*Roth, Karlsruhe*) (2 M) neutralisiert und damit das ATP stabilisiert. Die Proben wurden für 10 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei – 80 °C eingefroren. Da der Extraktionsvorgang bei einem Monolayer selbst bei großer Übung insgesamt ca. 20 min dauerte, mußte zügig gearbeitet werden. Die eingefrorenen Proben hielten sich lange, sollten für die Messungen jedoch nicht öfter als 2 x aufgetaut werden, da Verfälschungen der Ergebnisse durch mehrmaliges Auftauen nicht ausgeschlossen werden können.

#### 3.5.3 Versuche mit Sphäroiden

##### Vorbereitung der Versuche

Die Sphäroide wurden vor dem Versuch in eine Petrischale überführt und nach Größen sortiert, so daß eine relativ homogene Population mit 600 – 800  $\mu\text{m}$  Sphäroiddurchmesser entstand. Da eine Entnahme (s.o.) jeweils  $3 \times 10$  Sphäroide umfaßte, mußten sich mindestens 240 Zellaggregate in einer Flasche befinden; um Verluste beim Einfrieren auszugleichen wurde diese Zahl jedoch großzügig überschritten. Ein Experiment erforderte mindestens 2 Spinnerflaschen (300 ml), jeweils eine für eine behandelte Population und eine unbehandelte Kontrolle. 24 h vor Versuchsbeginn erfolgte ein Mediumwechsel. Dieser Zeitraum durfte nicht wesentlich über- oder unterschritten werden, da die Zuführung von frischem Medium erhebliche Differenzen im Meßergebnis zur Folge hatte.

Die Größenbestimmung erfolgte am Vorabend des Versuchs, entweder manuell mit dem Invertmikroskop oder durch Aufnahme mit einer Digitalkamera, wie bei den Wachstumskurven. Am Versuchstag wurden je 3 beschriftete Kryoröhrchen sowie 2 Skalpelle in einem Minidewar mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt.

### Durchführung der Versuche

Zu jedem der o.g. Zeitpunkte wurden pro Flasche 3 x 10 Sphäroide entnommen. Die Entnahme der Proben begann bei 0 h, als die Sphäroide noch unbehandelt waren, danach blieb eine Population unbehandelt, die anderen wurden mit Doxorubicin und/oder CR-6 inkubiert. Die Sphäroide konnten mit Hilfe einer Pipette mit großer Öffnung in eine nicht adhärente Petrischale überführt und sofort zu je 10 Stück pro Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dazu war eine leichte Schräglage der Schale erforderlich, die die Entnahme des jeweiligen Sphäroids mit Hilfe eines vorgekühlten Skalpells ermöglichte. Bei leichter Berührung des Zellaggregats durch das kalte Metall gefriert das Sphäroid sofort und haftet am Skalpell. Mit Hilfe des zweiten Messers wurde das Sphäroid von der Klinge in das Kryoröhrchen geschoben, wobei möglichst wenig Medium mit den Sphäroiden eingefroren werden sollte. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei  $-80\text{ °C}$  oder in flüssigem Stickstoff.

Jeweils 10 eingefrorene Sphäroide (600 – 800  $\mu\text{m}$ ) wurden mit 200  $\mu\text{l}$  PCA (0,6 M) auf Eis 3 x 10 s mit Ultraschall homogenisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Reagenzgefäße für 2 min bei 10 000 g und  $4\text{ °C}$ . 100  $\mu\text{l}$  des Überstands wurden mit 30  $\mu\text{l}$  KOH (2 M) neutralisiert. Die Proben wurden erneut für 10 min bei 10 000 g und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert und der Überstand sofort gemessen oder bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Die Proben sollten nicht mehrfach aufgetaut werden.

### 3.5.2 Messen an der HPLC

Die Proben wurden entweder direkt im Anschluß an die Extraktion oder nach einmaligem Auftauen gemessen. Dazu erfolgte eine 1 + 1 Verdünnung mit dem Elutionsmittel (je 40  $\mu\text{l}$ ) und die Positionierung im gekühlten Autosampler ( $4\text{ °C}$ ). Vor jedem Lauf (= alle Proben, die zu einem Versuch gehören) wurden Standards für die jeweiligen Purinnukleotidphosphate gemessen. Sie wurden genauso behandelt wie die Proben.

Die Standards zur Kalibrierung der Messung wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: AMP, ADP, IMP, GTP und GMP jeweils 10  $\mu\text{M}$ , ATP 30  $\mu\text{M}$ . Dazu wurden zunächst Stammlösungen von je 10 mg / 100 ml Reinstwasser angesetzt. Es empfiehlt sich ein Gemisch aller Standards, um Meßzeit zu sparen. Die Elution an der Säule geschieht in der Reihenfolge: Mono-, Di- und zuletzt Triphosphate. Erfahrungsgemäß überschneiden sich die Peaks von GMP und IMP, gelegentlich jedoch lag IMP auch unter AMP, so daß, bevor ein Standardgemisch verwendet wird, zunächst genau geklärt werden muß, in welcher Reihenfolge die Peaks aufgezeichnet werden.

Das Elutionsmittel (alles *Merck*) war wie folgt zusammengesetzt:

50	mM	NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	= 14,38 g / 2,5 l
10	mM	TBA (20 %ige Lösung)	= 32,43 ml / 2,5 l
11,5 %		Acetonitril	= 287,5 ml / 2,5 l

pH 6,3 – 6,4 einstellen mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder NH<sub>3</sub>OH

alles in Reinstwasser und an der Wasserstrahlpumpe gefiltert. Entgasen war nicht unbedingt notwendig, bietet jedoch zusätzliche Sicherheit.

Die verwendete Anlage (HPLC Model 5000T, *Biorad, Richmond, USA*) wurde isokratisch gefahren und vor bzw. nach Gebrauch mit einer Mischung aus Acetonitril / Reinstwasser (1 + 1) gespült. Sie war folgendermaßen ausgerüstet und eingestellt:

Säule:	Vertex Superspher 100 RP18 endc., ( <i>Knauer, Berlin</i> )
Vorsäule:	Superspher 100 RP18 endc., Korngröße 5µm, <i>Knauer</i>
Software:	Valuechrom, <i>Biorad</i>
Injektionsvolumen:	10 µl, overfill: 50 µl, filling speed: 0,5 ml / min, flush: 1 ml
Druck:	245 – 270 pa
Flussrate:	0,8 ml / min

Die Anlage war über ein Interface mit einem PC verbunden. Die Chromatogramme wurden von dem Programm Valuechrom (*Biorad*) aufgezeichnet. Die Integration der Peakflächen über die Zeit kann automatisiert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch interaktiv ausgeführt, da die Peaks teilweise sehr eng beieinander lagen und die Elutionszeiten häufig Abweichungen zeigten. Die Integrale wurden zur weiteren Bearbeitung in MS Excel Tabellen übertragen. Der Purinnukleotidgehalt der Zellen wurde für Monolayer in fmol / Zelle und in µmol / g angegeben, wobei die Masse sich auf das Frischgewicht bezieht. Für Sphäroide wurde der Gehalt in µmol / g berechnet, um die Daten mit den Ergebnissen der Biolumineszenz vergleichen zu können. Die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen verschoben sich im Verlauf einer Messung zu längeren Zeiten hin, was auf eine pH Wert Änderung des Elutionsmittels zurückgeführt werden kann.

## 3.6 Biolumineszenzmessungen an Sphäroiden

### 3.6.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung

Dieses in unserem Labor entwickelte Verfahren ermöglicht die Messung des Gehalts an ATP, Laktat oder Glucose in rasch tiefgefrorenen Geweben. In Gefrierschnitten von diesen Proben lässt sich die Metabolitenverteilung über mit Lichtreaktionen gekoppelten Enzymreaktionen (= Biolumineszenz) sichtbar machen (Mueller-Klieser et al. 1988, Walenta et al. 1993). Der Nachweis lokaler ATP-Gehalte beruht auf einer enzymatischen Reaktion der Luziferase amerikanischer Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) mit dem im Schnitt vorhandenen ATP. Das in den

Abdomen der Leuchtkäfer enthaltene Luziferin wird mit Hilfe von ATP zu Oxyluziferin,  $\text{CO}_2$  und Licht umgesetzt. Der lokale Laktatgehalt wird mit Hilfe der Laktat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Reaktion gemessen. Das bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat entstandene  $\text{NADH} + \text{H}^+$  geht in eine FMN-Oxidoreduktase- und eine Luziferasereaktion ein, die zur Aussendung von Licht führen.

Die Biolumineszenzmessungen von ATP zielten auf die Bestätigung unserer HPLC-Messungen sowie auf die Validierung der  $^{31}\text{P}$  NMR-Spektroskopie von Dahan-Grobgedl (1997). Außerdem sollten eventuelle Änderungen in der räumlichen Verteilung von ATP innerhalb der Sphäroide während der Behandlung beobachtet und mit den NMR-Diffusionsbildern von Breidt (1998) verglichen werden. Laktat, ein Endprodukt der Glykolyse, wurde gemessen, um die glykolytische Phosphorylierung der ATP-Vorstufen nachzuweisen.

Die Sphäroide für die Biolumineszenzmessungen wurden parallel zu den Proben für die HPLC entnommen. Es wurden zu jedem Entnahmezeitpunkt zehn Sphäroide auf die beschriebene Weise eingefroren. Von den Sphäroiden wurden Kryoschnitte angefertigt. Dazu wurden jeweils mehrere 20  $\mu\text{m}$  dicke Parallelschnitte aus der Sphäroidmitte für die Messungen von Laktat und ATP angefertigt. Zusätzlich wurden 10 oder 15  $\mu\text{m}$  dicke Parallelschnitte für die Histologie angefertigt. Die Schnitte wurden für die ATP Bestimmungen bei 100 °C für 10 min fixiert und danach bei -80 °C eingefroren oder für die Laktatmessungen sofort eingefroren.

### 3.6.2 Meßverfahren

Das allgemeine Meßverfahren ist von Mueller-Klieser et al. (1988 und 1989) sowie Walenta et al. (1993) detailliert beschrieben. Daher schließt sich hier lediglich eine Beschreibung des modifizierten Meßverfahrens für die Experimente dieser Arbeit an:

Für die ATP-Messungen wurde der "Enzymcocktail" aus den Glühwürmchenabdomen und Gelatine (Walenta 1993) in die Vertiefung eines speziellen Objektträgers pipettiert (ca. 50  $\mu\text{l}$ ) und in eine Messingschublade gelegt, die für die entsprechenden Maße angefertigt worden war. Diese wurde bei -20 °C für 2 min gekühlt, so daß sich die Gelatine verfestigte. Wenn nun der Kryoschnitt auf den Cocktail gegeben wurde, war die Enzymreaktion fast gänzlich inhibiert. Die ATP-Reaktion läuft so rasch ab, daß ohne die Vorkühlung das Maximum der Enzymaktivität beim Meßbeginn bereits überschritten ist, da mindestens 20 s für das Positionieren des Objektträgers und das Aktivieren des computergesteuerten Meßprogramms benötigt werden.

Außerdem wurde die Cocktailoberfläche so fest, daß kaum ATP seitlich abdiffundieren konnte, wodurch die räumliche Auflösung verbessert werden konnte. Während eine Metallschublade vorkühlte, wurde mit einer zweiten gemessen. Für die Laktatmessungen war keine Vorkühlung notwendig, da die Reaktion träger verläuft.

Die Zeit (Vorlaufzeit) vom ersten Kontakt zwischen Enzymen und Präparat bis zum Beginn der Photonenregistrierung mit der Kamera betrug 20 s. Die Schublade mit dem Objektträger wurde so rasch wie möglich in eine passende Messingbox geschoben, in welche das Objektiv des Mikroskops hineinragte. Diese ebenfalls speziell angefertigte Box wurde durch einen Wasserkreislauf temperiert (35 °C für ATP, 20 °C für Laktat). Damit konnte mit einem Minimum an Diffusionsverlust der Maximalbereich der Enzymreaktion erfaßt werden. Die Meßzeit betrug

60 s. Da die Gelatinesuspension sich bei geringeren Temperaturen verfestigte und dann nicht mehr pipettiert werden konnte, betrug die Raumtemperatur konstant 23 °C.

Die Vergrößerung für die Sphäroide wurden so gewählt, daß möglichst das gesamte Zellaggregat im Bild sichtbar war (50- oder 100fach). Zur Kalibrierung diente für jede Meßreihe eine neue Standardkurve von Gefrierschnitten aus ATPhaltigem Tissue Tek.

Die Messungen erfolgten an 2 verschiedenen Kamerasystemen der Firma Hamamatsu (*Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan*):

a) Argus 50: gekühlte CCD-Kamera, deren Steuereinheit PC-unterstützt ist und die über Programme für MS-Windows am Computer bedient wird. Sie bietet eine besonders gute Auflösung aber weniger Lichtempfindlichkeit.

b) Argus 100: CCD-Kamera mit vorgeschaltetem Photomultiplier, der eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit garantiert. Diese Kamera ist an einen speziellen Bildprozessor mit Monitor gekoppelt, mit dem die Bilder direkt aufgenommen werden. Danach werden sie im PC mit Hilfe eines Windowsprogramms (Argus 100) gespeichert und später mit Optimas oder einem anderen Bildverarbeitungsprogramm modifiziert und ausgewertet. Die Auflösung dieser Kamera ist etwas geringer als die von Argus 50, dafür ist das System wesentlich lichtempfindlicher.

Die beiden Kamerasysteme wurden auf ihre Leistungsfähigkeit für die Sphäroidmessungen getestet und verglichen. Das Argus 50 System erwies sich als zu unempfindlich und damit als ungeeignet. Die im weiteren dargestellten Befunde beziehen sich daher auf die Messungen mit Argus 100, während auf die Darstellung der Methode und Ergebnisse der Argus 50 Messungen verzichtet wird. Die Auswertung der Messungen erfolgte am PC mit dem Bildverarbeitungsprogramm Optimas und mit MS-Excel, sowie teilweise mit Graphikprogrammen.

### 3.7 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen fanden im Rahmen eines Gastaufenthaltes im Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) statt. Sie wurden unter Anleitung von Prof. H. Degani durchgeführt, in deren Veröffentlichung von 1994 auch die Prozedur des gesamten Experiments ausführlich beschrieben ist. Da die Methode unverändert blieb, wird sie hier nur im Überblick angeführt:

Die Monolayer wurden auf Agarose–Polyacrolein-Microcarriers (Beads) (*Biosilon InterMed Nunc, Roskilde, DK*) kultiviert. Diese wurden vor dem Experiment für 2 d bei 37 °C und 0,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Messung wurden die Beads aus 4 Petrischalen in ein 10 mm Standard-NMR-Röhrchen überführt, welches in den Probenkopf mit der Magnetspule (10 mm VSP 400 Multikern mit Breitbandentkopplung) eingeführt wurde. Während der Messung war eine kontinuierliche Perfusion der Zellen mit temperiertem Medium gewährleistet. Die Sphäroide wurden in Agarose-Beads eingebettet und ansonsten genauso wie die Monolayer behandelt (Degani et al., 1994) Die <sup>31</sup>P Spektren wurden aquiriert mit: Bruker Avance DMX 400 (*Bruker, Karlsruhe*), die Auswertung erfolgte mit xwin NMR 1.3. (*Bruker*). Die Aufnahme der Spektren erfolgte im 30 min Rhythmus über 2 d, pro Spektrum wurden 1000 Scans durchgeführt.

### 3.8 Statistik

Für die WST-Tests wurden pro Behandlungszeitpunkt jeweils 8 unbehandelte Kontrollen mit dem T-Test gegen 8 behandelte Monolayer zum Vergleich getestet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

Für die Statistik der HPLC Messungen wurde bei jedem Behandlungszeitpunkt der Mittelwert aus jeweils drei parallel entnommenen Proben derselben Petrischale bzw. Spinnerflasche gebildet. Innerhalb eines Experiments wurden die Mittelwerte behandelter Zellen mit dem T-Test gegen die Mittelwerte unbehandelter Kontrollen zum selben Zeitpunkt getestet. Es wurden 3 - 8 Experimente für jede Doxobubicindosis durchgeführt, die Mittelwerte aus den Experimenten wurden  $\pm$  SEM dargestellt.

Bei den Biolumineszenzmessungen wurden zunächst Mittelwerte aus mehreren Parallelschnitten von einem Sphäroid gebildet, so daß nur ein Wert pro Sphäroid verblieb. Für jeden Behandlungszeitpunkt wurden die Werte von 6 bis 12 behandelten Sphäroiden gegen den Anfangswert unbehandelter Sphäroide aus derselben Spinnerflasche mit dem T-Test getestet. Die Mittelwerte aus mehreren Sphäroiden pro Behandlungszeitpunkt wurden  $\pm$  SEM dargestellt.

Für die Sphäroidwachstumskurven wurden die Volumina und Durchmesser von 200 - 300 Sphäroiden pro Zeitpunkt und Spinnerflasche berechnet. Es wurde eine untere Schwelle für die Größenbestimmung festgelegt. Aus den Durchmessern wurde der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung gebildet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wirkung von Doxorubicin auf die Vitalität und die Proliferation von humanen Mammacarzinomzellen

#### 4.1.1 WST- Tests mit Monolayern

##### Behandlung mit 0,1 $\mu$ M Doxorubicin

Die T47D Zellen reagierten am empfindlichsten von allen untersuchten Zelllinien auf das Chemotherapeutikum. Die multidrug resistant MCF-7mdr Zellen zeigten eine stärkere Resistenz als die selektiv resistenten MCF-7adr Zellen.

Abb. 2 zeigt die im folgenden beschriebenen Ergebnisse, deren zugrundeliegende Daten in Tab. 1 zusammengefaßt sind: Nach Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Doxorubicin verminderte sich die Zellvitalität der T47D Zellen um bis zu 27 % nach 6 h. Eine längere Inkubation führte nicht zu

einer weiteren Abnahme der Vitalität. Der doxorubicinsensitive Wildtyp der MCF-7 Zelllinie zeigte eine Verminderung der Vitalität um 10 bis 20 %, mit einem Maximaleffekt nach 4 h. Die MCF-7 Zellen waren damit deutlich weniger sensibel für die Behandlung als die T47D Zellen. Die MCF-7adr Zellen reagierten auf die Inkubation von 2 bis 8 h mit einer Verminderung der Zellvitalität um ca. 10 %. Die transfizierten MCF-7mdr Zellen zeigten lediglich nach 1 h eine leichte Abnahme der Vitalität und im weiteren Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle.

Die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen (K) normiert. Die Zeit bezieht sich auf Stunden nach Behandlungsbeginn (0 h = unbehandelt = 100 %). Die rot und \* markierten Werte liegen statistisch signifikant unter bzw. über der unbehandelten Kontrolle (T-Test).

Tabelle 2: Vitalität der Zellen nach Behandlung mit 0,1 µM Doxorubicin in % der unbehandelten Kontrolle

Zeit (h)	MCF-7	MCF-7mdr	MCF-7adr	T47D
1	88.7***	93.5***	90.8**	-
2	89.4***	99.2	88.5*	94.4
4	80.8***	114.3	87.7***	84.2*
6	88.3**	95.3	96.8	73.2**
8	85.5***	92.8	81.9***	81.2*

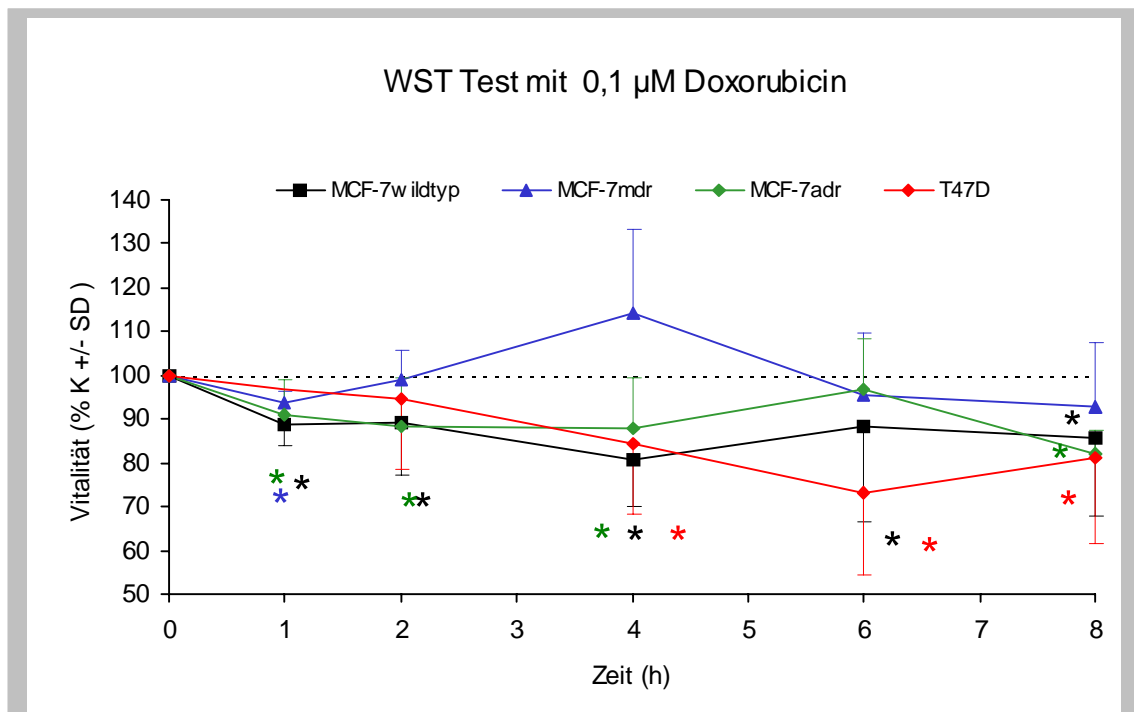


Abbildung 2: Vergleich der Ergebnisse von WST-Tests mit verschiedenen Zelllinien, nach Behandlung mit 0,1 µM Doxorubicin. Darstellung der Werte als % der Kontrolle ± SD (Die gegenüber der Kontrolle signifikant niedrigeren Werte sind aus Platzgründen jeweils nur mit einem Stern markiert)



## Behandlung mit 10 µM Doxorubicin

Die MCF-7 Zellen waren auch bei dieser hohen Dosierung des Medikaments wesentlich resistenter als T47D Zellen. Die MCF7adr Zellen zeigten nur eine schwache Resistenz, während bei den MCF-7mdr Zellen die Wirkung des Medikaments erst nach 8 h signifikant wurde.

Abb. 3 und Tab. 2 veranschaulichen folgende Ergebnisse: Bereits 2 h nach Behandlungsbeginn waren 40 % der T47D Zellen geschädigt, im weiteren Behandlungsverlauf verminderte sich die Vitalität um 66 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die MCF-7wildtyp Zellen zeigten eine geringere Verminderung der Vitalität um 15 – 20 %. Die MCF-7adr Zellen reagierten ähnlich wie der Wildtyp, jedoch setzte die Wirkung des Medikaments erst eine Stunde später ein. Die Werte der MCF-7mdr Zellen unterschieden sich bis zu 6 h nach Behandlungsbeginn nicht wesentlich von denen der unbehandelten Kontrolle, nach 8stündiger Behandlung wurde jedoch ein Zellsterben von ca. 30 % beobachtet.

Tabelle 3: Vitalität der Zellen nach Behandlung mit 10 µM Doxorubicin in % der unbehandelten Kontrolle

Zeit (h)	MCF-7wildtyp	MCF-7mdr	MCF-7adr	T47D
1	83.0***	107.1	100.8	-
2	85.1***	104.2	91.9**	61.6*
4	88.6***	92.4	84.4**	50.7***
6	77.4**	91.5	83.2***	36.1***
8	79.4***	69.7***	83.5***	33.4***

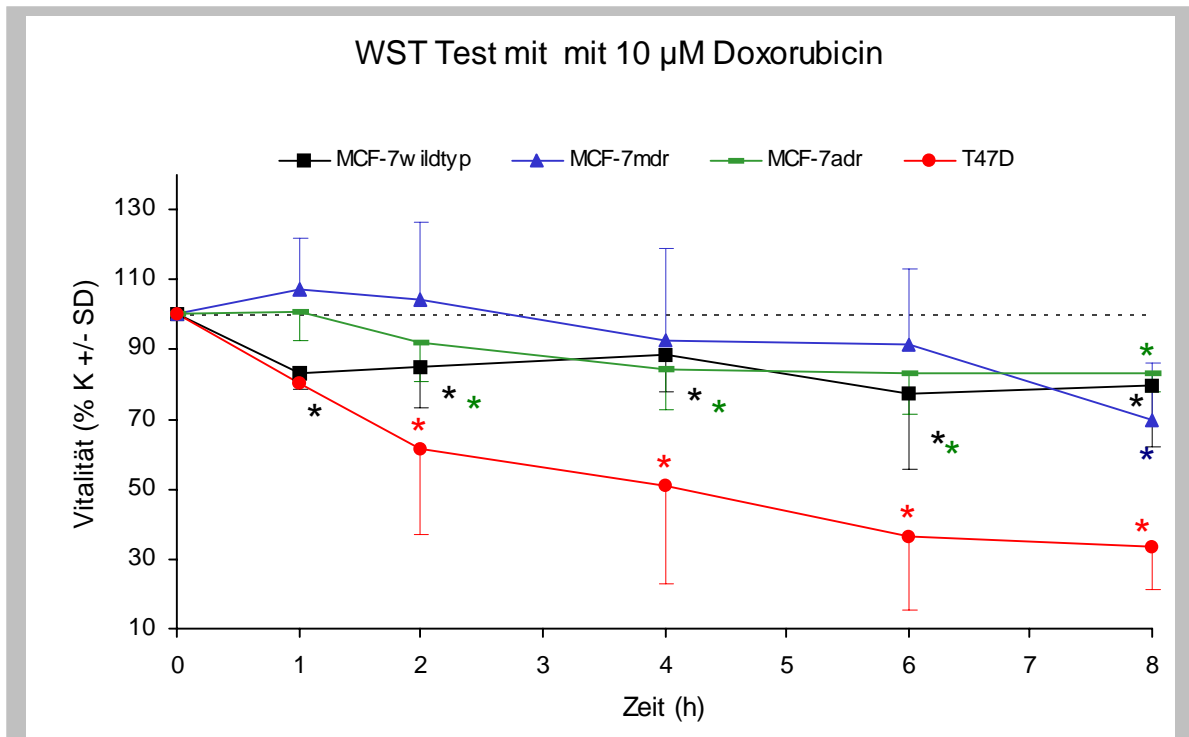


Abbildung 3: Vergleich der Ergebnisse von WST-Tests mit verschiedenen Zelllinien, nach Behandlung mit 10 µM Doxorubicin. Darstellung der Werte als % ± SD der Kontrolle.

#### a) T47D Zellen

Die unbehandelten T47D Zellen (Abb. 4a.) hatten einen mittleren Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$ , jedoch variierte die Zellgröße stark in Abhängigkeit von der Zellzahl/Fläche. Je dichter die Zellen aneinanderlagen, desto kleiner wurden sie. Große runde Zellkerne bestimmen das Bild, gelegentlich finden sich Lücken von ähnlichem Umriß im Zellverband. Auffällig sind einzelne stark vergrößerte Zellen, die über der Focusebene der Population liegen. Vermutlich handelt es sich um proliferierende Zellen, die sich zur Teilung abgerundet und aus dem Zellverband gelöst haben. Durch Abschwimmen dieser Zellen könnten die Lücken entstanden sein. Eine weitere Ursache dieser Lückenbildung ist möglicherweise die Ausbildung drüsenartiger Strukturen (Milchgänge), in deren Verlauf sich mehrere Zellen konzentrisch anordnen und zur Mitte hin die Zellkontakte auflösen, so daß die zentralen Zellen (eine oder mehrere) absterben. Die DAPI Kernfärbung zeigte bei unbehandelten Zellen häufige Meta- und Anaphasen, jedoch selten apoptotische Chromatinverlagerungen, ebenso war die TUNEL-Färbung fast durchgängig negativ (nicht abgebildet).

Die cytotoxische Wirkung des Doxorubicins setzte praktisch sofort ein. Spätestens eine Stunde nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  waren fortgeschrittene Apoptosestadien zu erkennen (kondensiertes Cytoplasma und Chromatin mit typischer Verlagerung an die Kernperipherie, Schrumpfung der Kerne, Lückenbildung im Zellverband). Einzelne Zellen stark vergrößerte Zellen lösten sich aus dem Zellverband und hinterließen große runde Lücken. Da sie aber nicht an anderer Stelle über dem Zellrasen schwimmend wiedergefunden wurden wie bei unbehandelten Zellen, teilten sich diese Zellen vermutlich nicht, sondern desintegrierten sofort auf nekrotischem Wege oder vollzogen Apoptosen (Abb. 4b). Die Mitosen wirkten merkwürdig "verklebt", die Chromatinspiralen stellten sich mikroskopisch nicht so sauber dar wie bei den unbehandelten Zellen (nicht abgebildet). Vier Stunden nach der Applikation des Doxorubicins waren alle Kerne leicht geschrumpft und fluoreszierten infolgedessen noch stärker oder erschienen dunkler im Durchlichtbild. Der interzelluläre Verbund löste sich auf, das Cytoplasma wirkte blasig. Einige Kerne waren deformiert oder spalteten winzige Kugeln (bodies) ab (Abb. 4c). Nach sieben Stunden waren die Zellkontakte vollständig aufgelöst, viele Zellen bereits lysiert, außerdem waren zahlreiche apoptotic bodies vorhanden. In relativ intakten Arealen der Population wirkten die Zellen sehr dunkel und kompakt (Abb. 4d). Die Effekte der Behandlung mit der niedrigeren Dosis schienen ähnlich wie bei der hohen Dosis zu sein, jedoch verzögert aufzutreten und insgesamt wesentlich weniger Zellen zu betreffen (nicht abgebildet).

Abb. 4e zeigt die für Apoptosen typische Chromatinverlagerung an die Kernperipherie. Die Interkalation des roten Fluoreszenzfarbstoffes erlaubte bereits nach 2 h keine sichere Trennung zwischen TUNEL- und Doxorubicin Färbung mehr. Von den morphologisch als apoptotisch eingestuft Zellen waren nur extrem wenige TUNEL positiv. Auch im weiteren Verlauf der toxischen Wirkung vermehrten sich die positiven TUNEL-Reaktionen nur unwesentlich, jedoch zeigten alle Kerne eine starke Doxorubicinfluoreszenz (Abb. 4f). Bei der Apoptose von T47D Zellen entstehen also vermutlich keine oder nur sehr wenige 3'OH Enden der DNA.

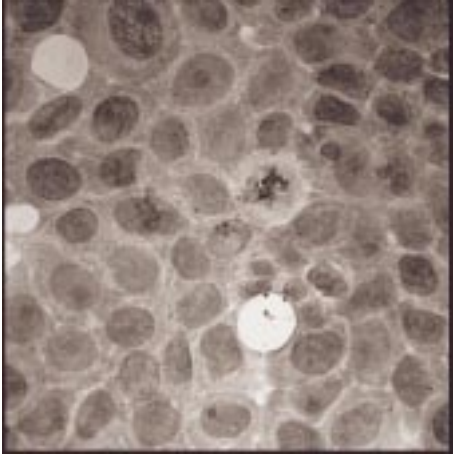


Abbildung 4 a

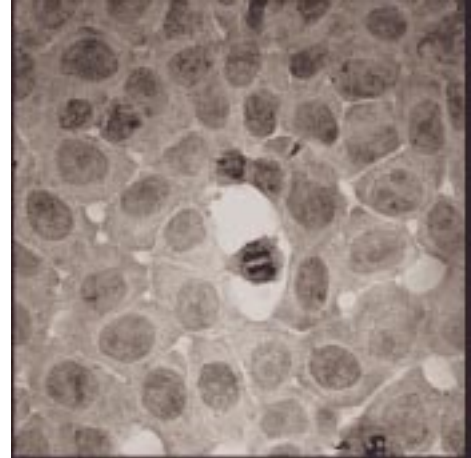


Abbildung 4 b

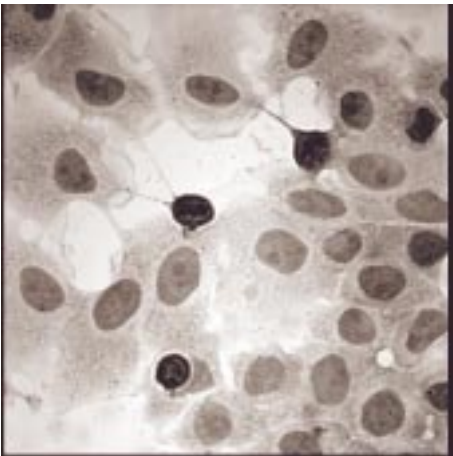


Abbildung 4 c

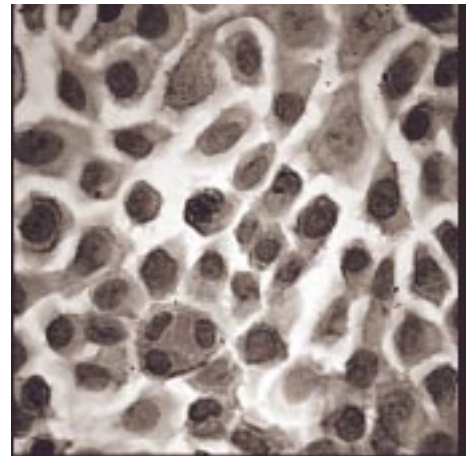


Abbildung 4 d

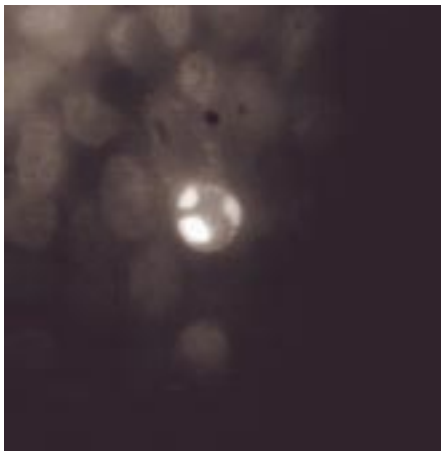


Abbildung 4 e

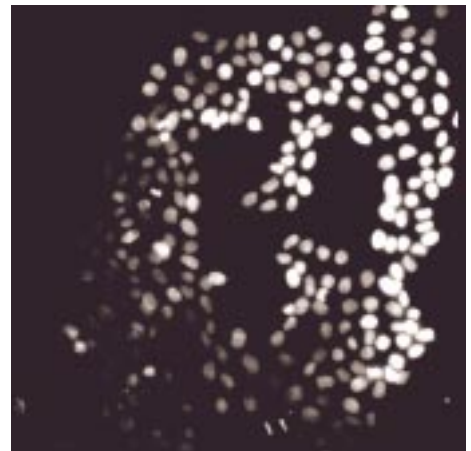


Abbildung 4 f

Abbildung 4: T47D Monolayer auf beschichteten Objektträgern (Chamberslides) gewachsen (400fache Vergrößerung) im Verlauf einer Behandlung mit 10  $\mu$ M Doxorubicin; 4a: unbehandelt; 4b: nach 2h; 4c: nach 4h; 4d: nach 7h; 4e: apoptotische Chromatinverlagerung bei einer T47D Zelle nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Doxorubicin, TUNEL-Färbung; 4f: TUNEL-Färbung nach 6stündiger Behandlung

## b) MCF-7 Zellen

Die Populationen der unbehandelten MCF-7 Monolayer zeigten ein anderes Erscheinungsbild als die der T47D Zellen. Der Zellverband war lockerer und ungeordneter, die Kerne waren ungleichmässiger geformt (Abb. 5a). Die Rate der Spontanapoptosen war hoch und die DNA reagierte zu einem größeren Teil positiv mit dem TUNEL-Reagenz (Abb. 5b). Insgesamt ergab die TUNEL-Färbung bei MCF-7 Zellen wesentlich deutlichere Ergebnisse als bei T47D Zellen. Fast alle morphologisch als apoptotisch erkennbare Zellen zeigten auch ein positives TUNEL Signal (Abb. 5 b + c).

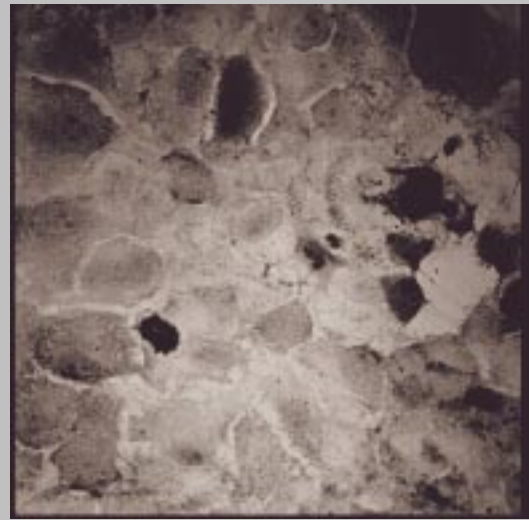


Abbildung 5a



Abbildung 5 b

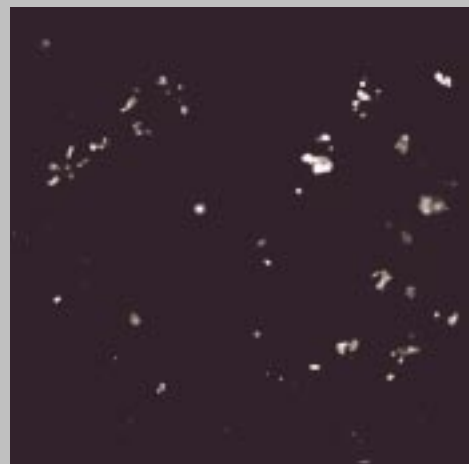


Abbildung 5 c

Abbildung 5: Behandelte und unbehandelte MCF-7 Monolayer (400fach), 5a: unbehandelte MCF-7 Zellen, H&E Färbung, 5b+c: TUNEL-Färbung, 5b: unbehandelte MCF-7 wildtyp Zellen, 5c: MCF-7 wildtyp Zellen nach 30minütiger Behandlung mit 1 µM Doxorubicin

Die Ki 67 Färbungen (Abb. 6) von mit 10 µM Doxorubicin behandelten auf Chamberslides gewachsenen MCF-7 Monolayern zeigt, daß durch die Behandlung nicht nur Apoptosen sondern auch Nekrosen induziert werden. Der durch diese hohe Dosierung

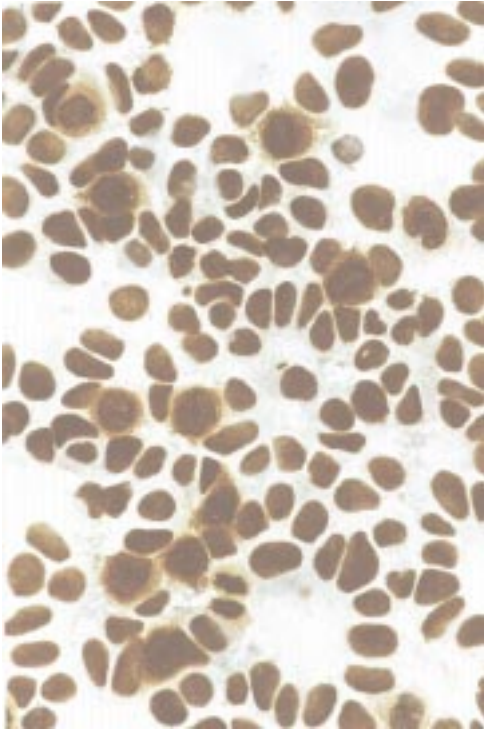


Abbildung 6a

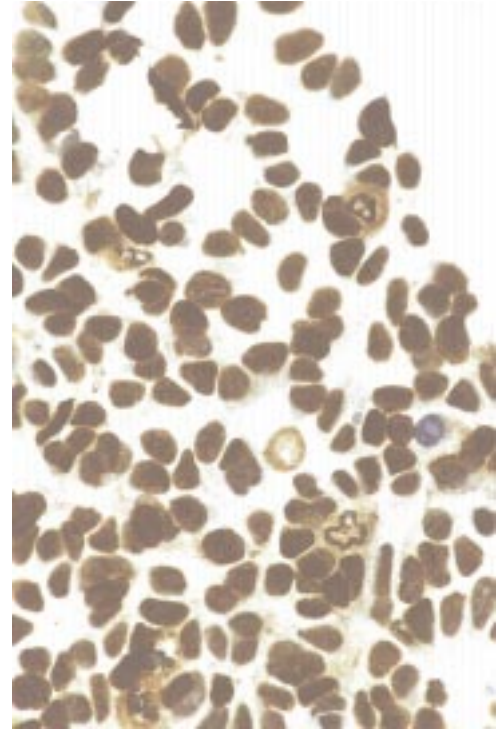


Abbildung 6b

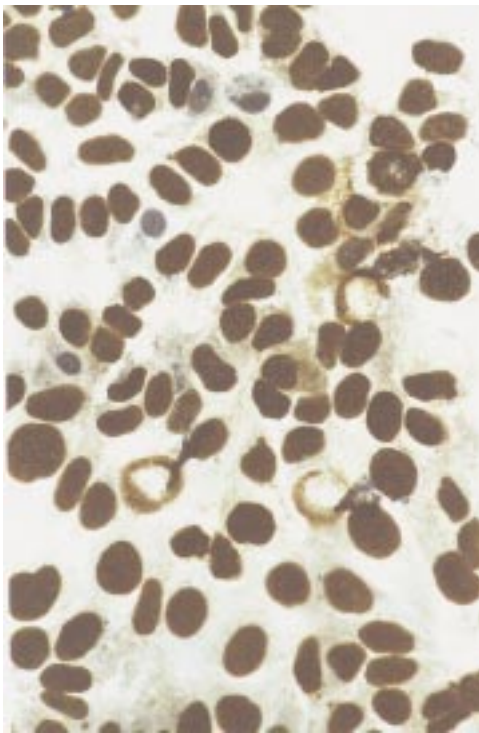


Abbildung 6c



Abbildung 6d

Abbildung 6: Ki67- und H&E-F&arbung mit auf Chamberslides gewachsenen MCF-7 wildtyp Monolayern, nach 10 bis 60min&uuml;tiger Behandlung mit 10  $\mu$ M Doxorubicin (400-1000fach); Abb. 6a+d: 10min&uuml;tige Behandlung, 6a: Mischformen von nekrotischem und apoptotischen Zelltod, 6d: Kernfragmentierung bei proliferierenden Zellen; 6b+c: fortschreitende Stadien der Zellsch&uuml;digung im Behandlungsverlauf, die Desintegration der vergr&ouml;serten abgerundeten Zellen und das Austreten von Kernmaterial deuten auf einen nekrotischen Zelltod hin, w&ahrend die geschrumpften blau gef&arbbten Kerne auf Apoptosen hinweisen.

verursachte Zelltod stellt also eine Mischform aus beiden Arten des Zellsterbens dar. Bereits 30 min nach Behandlungsbeginn sind kreisrunde Lücken im Zellverband erkennbar. Die großen runden Zellen durchlaufen einen nekrotischen Zelltod, während die Schrumpfungen anderer Zellen auf Apoptosen hinweisen. Fast alle Zellen proliferieren (Abb. 6a). In den abgerundeten Zellen sind Chromatinverlagerungen an die Kernperipherie erkennbar (Abb. 6b). Diese Strukturen reagierten oft positiv mit dem TUNEL-Reagenz und waren nicht mehr mit Ki67 markierbar. Gleichzeitig treten vermehrt geschrumpfte Kerne auf, die ebenfalls nicht Ki67 gefärbt sind (blaue Hämalaum-Färbung). In diesem Stadium der Zellschädigung proliferierten die Zellen also nicht mehr. Abb. 6c zeigt die Auflösung der Zellkerne und den Austritt von Kernmaterial aus der Zelle, während Reste der Zelle verbleiben. Die Desintegration der Zellen ist ein typisches Zeichen für den nekrotischen Zelltod, die apoptotischen Zellen hingegen sind als blaugefärbte geschrumpfte Kerne erkennbar, deren Cytoplasmamembran jedoch erhalten bleibt. Eine Fragmentierung der Kerne kann bereits während einer 10minütigen Inkubation beobachtet werden, obwohl die betroffenen Zellen noch proliferieren (Abb. 6d).

Bei den MCF-7adr Zellen schienen die meisten induzierten Apoptosen sehr früh, bis zu einer Stunde nach Behandlungsbeginn, stattzufinden, danach verminderte sich die Zahl der *apoptotic bodies* und der positiven TUNEL-Reaktionen (Abb. 7a). Später allerdings zeigten alle Kerne Schrumpfungen und die Zellkontakte lösten sich. Während der Apoptose blieben die Kerne weitgehend erhalten, viele waren jedoch deformiert, wobei Einschnürungen den Kern in 2 oder mehr kleinere Segmente unterteilten. Dieses Verhalten zeigten T47D Zellen nicht. Ob teilungsaktive Zellen bevorzugt apoptotisch wurden blieb unklar, die "Verklebungen" der Metaphasen und skelettartige Reste derselben weisen jedoch darauf hin (Abb. 7 b und c).

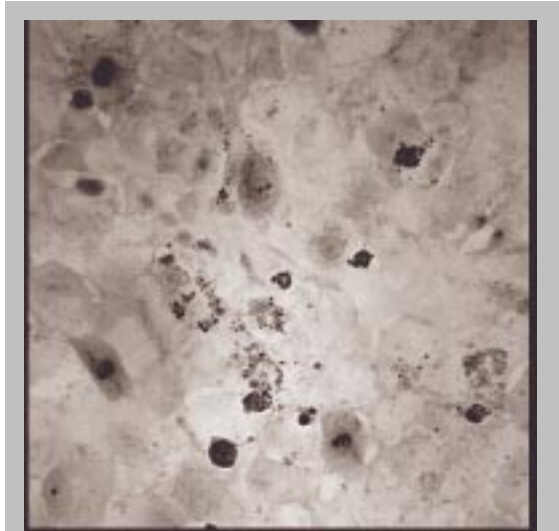


Abbildung 7 a

Nach 7stündiger Behandlung zeigten alle MCF-7adr Zellen Cytoplasmablasen, der Zellverband löste sich auf, es waren viele *apoptotic bodies* erkennbar, die aber nicht alle eine positive TUNEL Reaktion zeigten (Abb. 7 d). Die blasenartigen Strukturen des Cytoplasmas entstanden möglicherweise durch die Schrumpfung des Kernes. Ab 8 h nach Behandlungsbeginn lösten sich die Zellen auf, wobei jedoch der Kern weitgehend erhalten blieb (Abb. 7 e). Das Chromatin war zu kleinen Kügelchen kondensiert, das Cytoplasma war stark blasig mit großen Lücken. Wie beim MCF-7wildtyp wurden auch hier einige Zellen beobachtet, die einer eher nekrotischen Morphologie entsprachen.

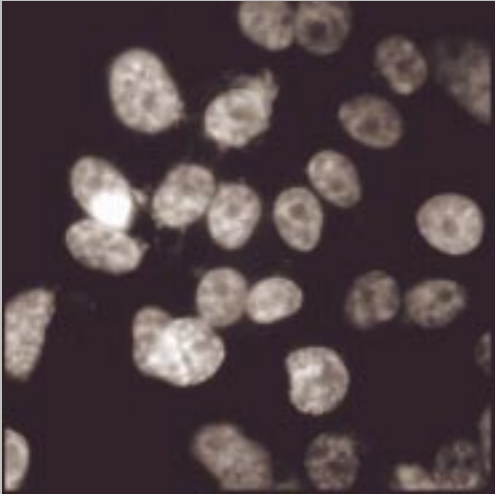


Abbildung 7 b

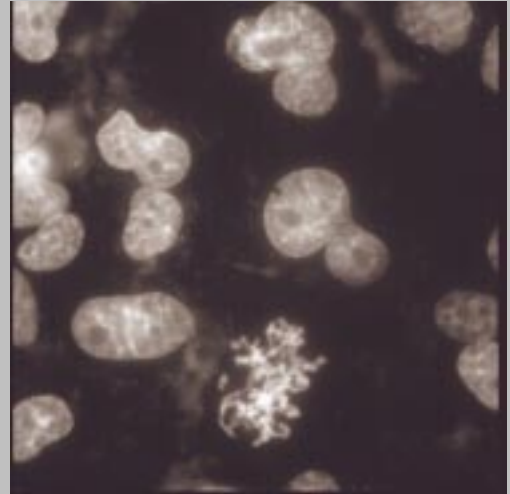


Abbildung 7 c

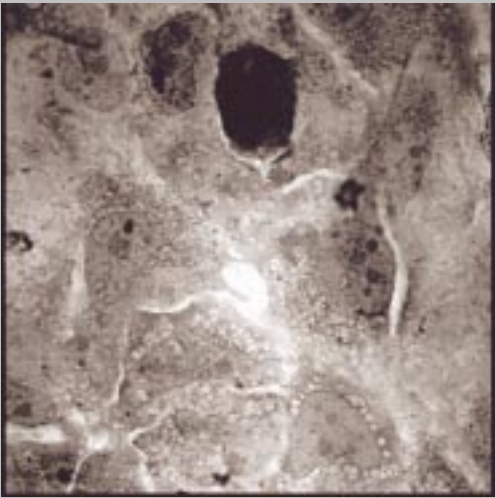


Abbildung 7 d

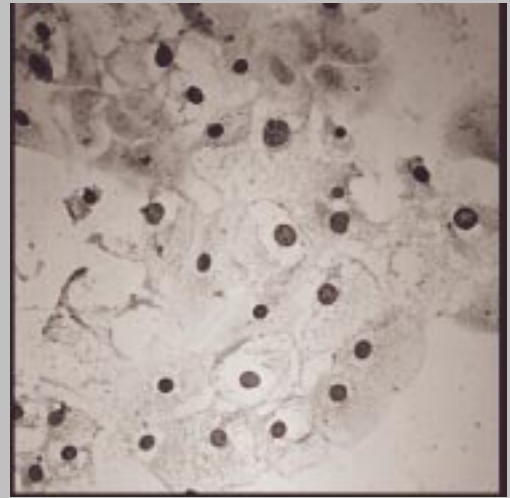


Abbildung 7 e

Abbildung 7: MCF-7adr Zellen, behandelt mit 10  $\mu$ M Doxorubicin (400fach), 7a: nach 1stündiger Behandlung, H&E-Färbung, 7b+c: DAPI Kernfärbung, 7b: unbehandelt, 7c: deformierte Kerne nach 2stündiger Behandlung, 7d+e: H&E Färbung, 7d: nach 6stündiger Behandlung, 7e: nach 8stündiger Behandlung

#### 4.1.3 Wachstumskurven von behandelten Sphäroiden

Volumenwachstumskurven von mit Doxorubicin behandelten T47D, MCF-7 und MCF-7adr Sphäroiden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit Dunkern angefertigt und sind detailliert beschrieben bei Dunkern und Mueller-Klieser 1999, sowie bei Dunkern 1997. Die Beobachtungen über einen Zeitraum von 20 Tagen hatten ergeben, daß die T47D Zellen besonders empfindlich auf die Behandlung reagierten. Das Wachstum der MCF-7wildtyp und MCF-7adr Sphäroide wurde wesentlich schwächer beeinflusst. Die Resistenz der MCF-7adr Zellen wurde durch die hohe Dosierung von 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin weitgehend aufgehoben, war jedoch bei geringeren Konzentrationen des Medikaments deutlich erkennbar. In der vorliegenden Arbeit wurden T47D und MCF-7adr Sphäroide für die Untersuchungen verwendet und das Volumenwachstum in einem Behandlungszeitraum von 5 Tagen verglichen. Nach der Behandlung mit 1,0  $\mu\text{M}$  Doxorubicin für 24 h war ein deutlicher Unterschied zwischen den doxorubicinsensitiven T47D und den resistenten MCF-7adr Zellen erkennbar. Das Wachstum der MCF-7adr Sphäroide wurde von dem Medikament nicht signifikant beeinflusst, der mittlere Durchmesser der T47D Sphäroide nahm dagegen relativ zur unbehandelten Kontrolle deutlich ab (Abb. 8a).

Die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin für 24 h führte sowohl bei sensitiven als auch bei resistenten Zellen zu einer drastischen Verminderung des Sphäroiddurchmessers (Abb. 8b). Die Resistenz der MCF-7adr Sphäroide wurde bei dieser hohen Dosierung erst ab dem 3. Tag nach der Behandlung deutlich, indem das mittlere Wachstum dieser Population nicht mehr als 50 % hinter der Kontrolle zurückblieb, während die T47D Sphäroide völlig desintegrierten. Die erheblich größere Standardabweichung der MCF-7adr Wachstumskurve ist auf die nachwachsende Tochtergeneration zurückzuführen. Während bei T47D Zellen alle Sphäroide rasch an Größe verloren und zerfielen, blieben bei den resistenten Zellen einige große Zellaggregate zurück, während die aus den abgelösten Zellen entstandenen kleinen Sphäroide nachwachsen. Resistent in dem Sinne, daß die Zellverbände erhalten blieben, waren nur sehr wenige Sphäroide.

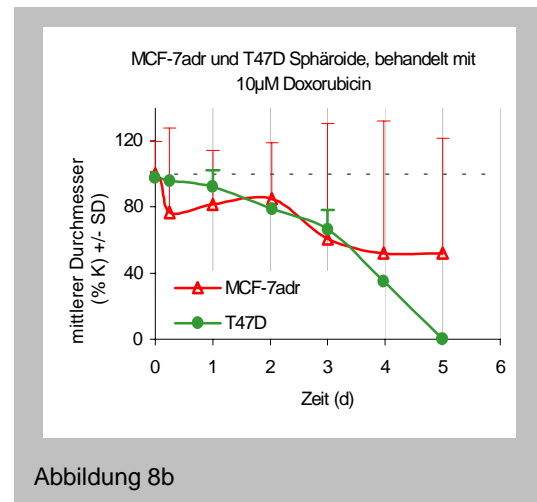
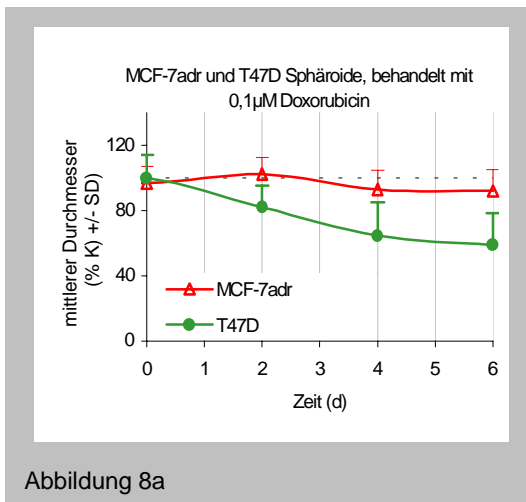


Abbildung 8: Wachstumskurven von T47D und MCF-7adr Sphäroiden, 8a: behandelt mit 1,0  $\mu\text{M}$  Doxorubicin, 8b: behandelt mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin



Die mit POD signalconvertierte TUNEL-Färbung mit anschließender H&E-Färbung an T47D Sphäroiden zeigt die Verteilung der durch hochdosiertes Doxorubicin induzierten Apoptosen im Sphäroidquerschnitt während einer 50-stündigen Behandlung. Abb. 9 zeigt die invertierte Fluoreszenzaufnahme einer TUNEL-Färbung an einem T47D Sphäroid nach 24stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin. Man sieht deutlich, daß die dunkel erscheinenden Apoptosen eher im äußeren Bereich des Zellaggregats auftreten als im inneren.



Abbildung 9: T47D Sphäroid nach 24stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin, TUNEL-Färbung (invertiert)

In Abb. 10a ist ein unbehandeltes Sphäroid dargestellt. Man erkennt die beginnende Zentralnekrose anhand einer leichten Braunfärbung, welche auf eine unspezifische POD-Färbung strukturell geschädigter Zellen

zurückzuführen ist. Die unspezifische Färbung stellt sich unstrukturiert und heller dar als die spezifische Färbung von DNA-Fragmenten, die durch die Form der Zellkerne definiert ist. Ein Absterben der Zellen tritt hauptsächlich im zentralen Bereich des Sphäroids auf. Deutlich erkennbar sind einzelne braun gefärbte Kerne, in denen das dunklere Chromatin in für Apoptosen typischer Weise an der Kernperipherie kondensiert.

Eine 8stündige Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte nicht zu deutlichen histologischen Veränderungen. Das in Abb. 10b dargestellte Sphäroid hatte noch keine ausgeprägte Zentralnekrose entwickelt, die braun gefärbten Bereiche befanden sich ähnlich wie bei der Kontrolle hauptsächlich im Zentrum des Querschnittes. 24 h nach Inkubationsbeginn waren deutliche Auflösungserscheinungen und TUNEL-Signale zu sehen (Abb. 10c). Die Apoptosen und die Lückenbildung fanden über das gesamte Sphäroid verteilt statt. Besonders bei Sphäroiden ohne Zentralnekrose wurde deutlich, daß Doxorubicin nicht im Zentrum des Zellaggregats angreift, sondern eher in den äußeren Bereichen. Die Wirkung des Medikaments führte zu keiner deutlichen Vergrößerung einer bereits vorhandenen Zentralnekrose. Der Durchmesser der meisten Sphäroide war nach einer 24stündigen Behandlung vermindert, da sich Zellen aus dem äußeren Zellverband ablösten. Nach 50 h (Abb. 10d) wurden nur noch kleine Konglomerate beobachtet, deren Randbereiche eine starke unspezifische POD-Färbung aufwiesen (desintegriertes Zellmaterial) und zerfranst wirkten. Die Zellverbände waren durch große Lücken im gesamten Querschnitt unterbrochen, im zentralen Bereich des Zellaggregats waren noch einige intakte Zellen erkennbar.

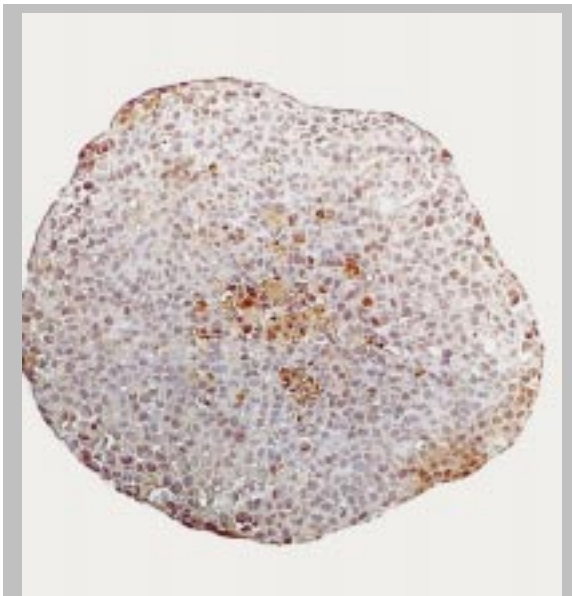


Abbildung 10 a

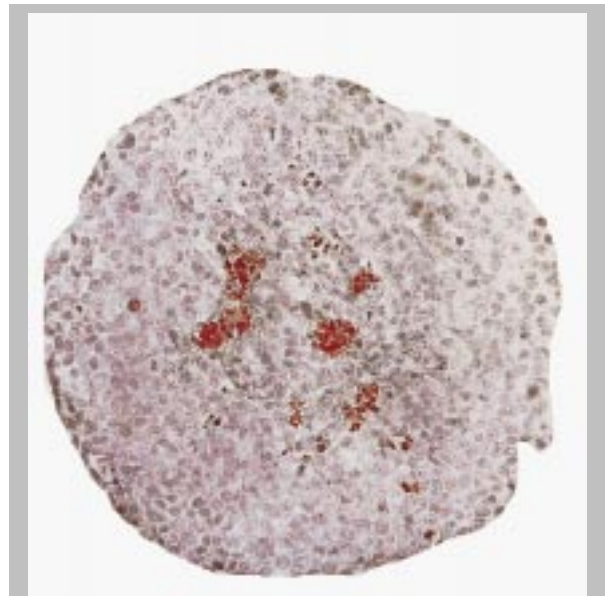


Abbildung 10 b



Abbildung 10 c



Abbildung 10 d

Abbildung 10: Gefrierschnitte von behandelten T47D Sphäroiden (ca. 600  $\mu$ M Durchmesser) mit H&E sowie TUNEL gefärbt, 400fach vergrößert

Bei höherer mikroskopischer Auflösung waren bald nach Behandlungsbeginn in fast allen Kernen dunkle Pünktchen erkennbar, die bei den Ki67gefärbten Monolayern als Chromatinkondensationen erkennbar waren (nicht abgebildet). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß sich innerhalb dieser Strukturen dichtere und weniger dichte Bereiche bilden. Sie ähneln den in der frühen G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus neugebildeten Nukleoli (Alberts et al. 1986). Diese Ähnlichkeit führt zu der Spekulation, daß es sich möglicherweise um

Fragmente des Nukleolus handelt, oder daß das Medikament die rRNA Synthese im Nukleolus stimuliert, so daß sich neue Nukleoli bilden.

Abb. 11 zeigt eine Sequenz von fortschreitenden Apoptosestadien im Behandlungsverlauf bei T47D Sphäroiden. In Abb. 11a ist eine Zelle nach 2stündiger Behandlung mit 10 µM Doxorubicin gezeigt. Deutlich erkennbar sind bereits die beschriebenen nukleoliartigen Strukturen im Kern, im übrigen ist die Zelle noch morphologisch unauffällig. Abb. 11b zeigt eine Sphäroidzelle nach 8stündiger Behandlung. Der Zellkern ist leicht deformiert, das Chromatin beginnt, sich an der Kernperipherie anzulagern und das Cytoplasma ist verdichtet und bildet Blasen. Im weiteren Behandlungsverlauf kommt es zur Schrumpfung des Kerns und damit einhergehend einer sehr starken Verdichtung des Chromatins, so daß der Kern im elektronenmikroskopischen Bild schwarz erscheint (Abb. 11c).

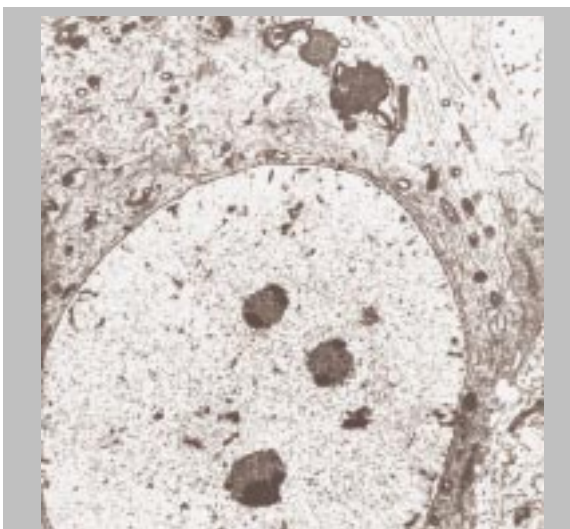


Abbildung 11a

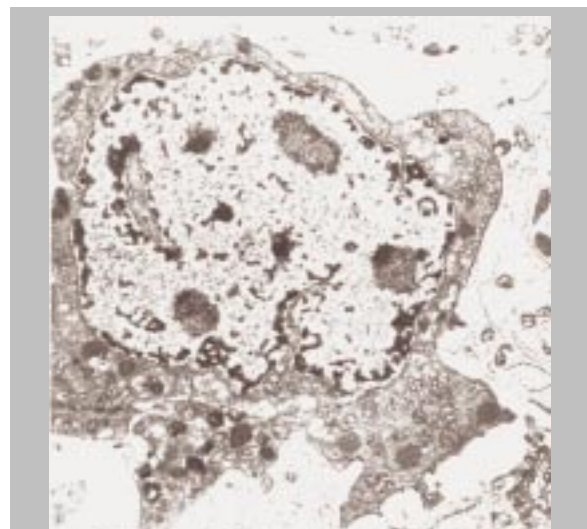


Abbildung 11b

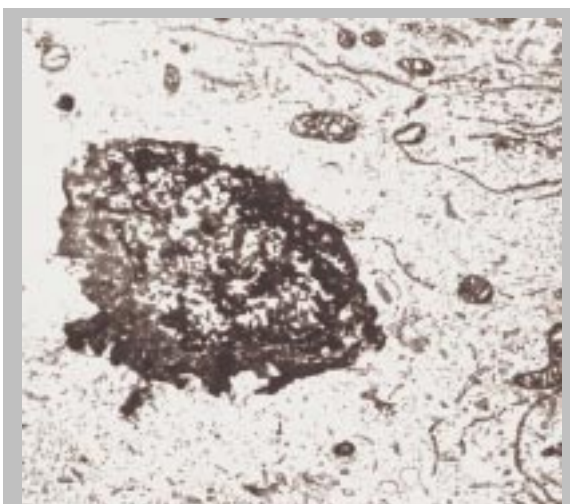
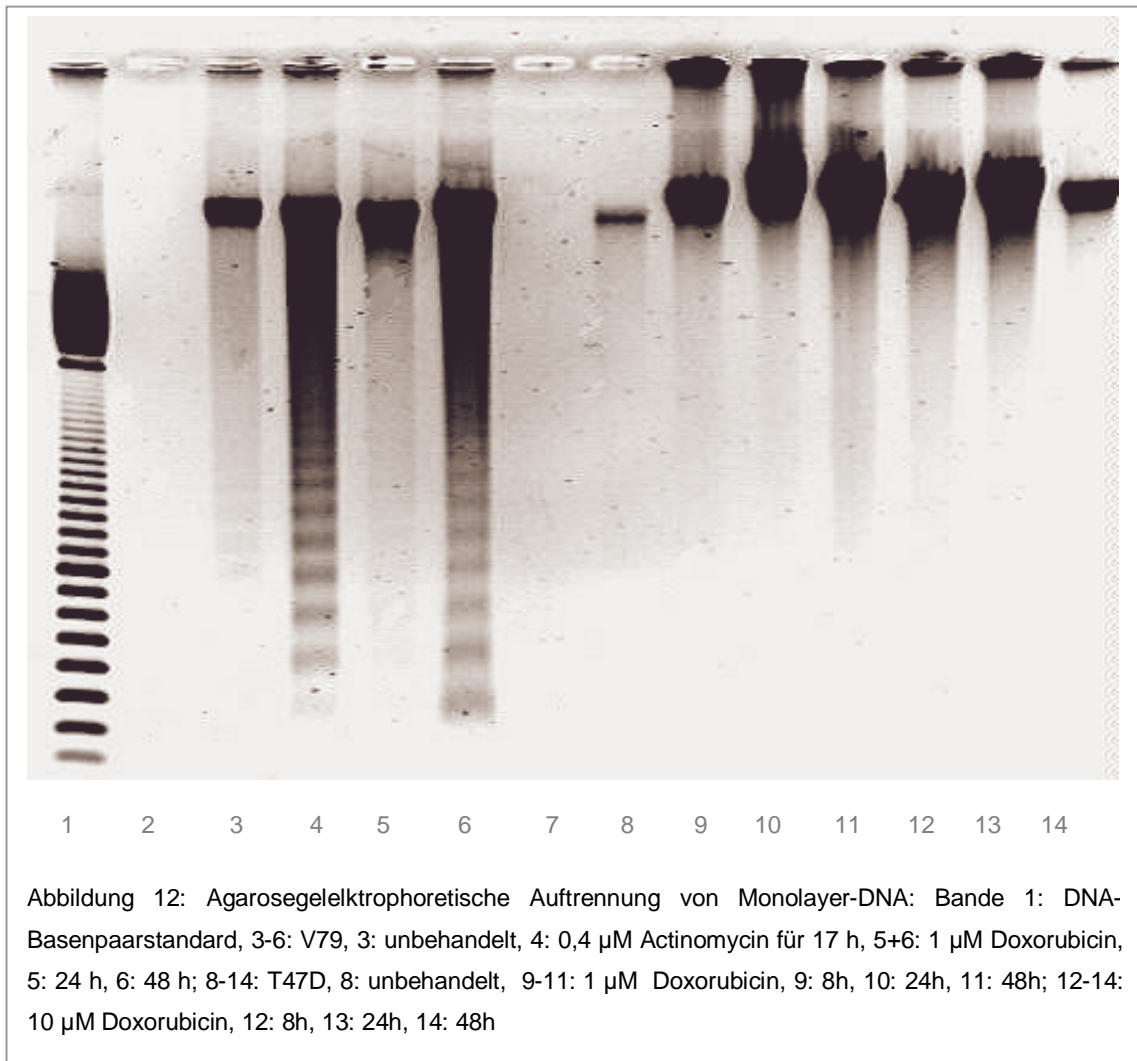


Abbildung 11c

Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Zellen aus behandelten T47D Sphäroiden, in der Reihenfolge 11a, b und c: nach 2, 8 und 24stündiger Behandlung mit 10 µM Doxorubicin

#### 4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA Extrakten

Die Gelelektrophoresen wurden in Zusammenarbeit mit Dunkern durchgeführt und die Ergebnisse sind bei Dunkern (1997) detailliert beschrieben. Die bei der Apoptose häufig beobachteten DNA-Fragmente definierter Länge können bei T47D und MCF-7 Zellen weder nach einer Behandlung mit Doxorubicin noch mit Actinomycin dargestellt werden. Als Positivkontrolle wurden V79 Hamsterlungenzellen analog den humanen Brustkrebszellen behandelt und auf dasselbe Gel aufgetragen (Abb. 12).



Die V79 Hamsterlungenzellen zeigen sowohl nach der Behandlung für 17 h mit Actinomycin (4), als auch für 48 h mit Doxorubicin (6) ein deutliche "DNA-Leitern". Die kürzere Inkubation mit Doxorubicin für 24 h (5) führte nicht zur Ausbildung des Leitermusters. Die T47D Zellen zeigten dagegen auch nach einer längeren oder höher dosierten Behandlung mit Doxorubicin keine DNA-Leitern (9-14). Auch bei MCF-7 Zellen wurde keine Ausbildung von Leitern beobachtet, eine Behandlung mit Actinomycin führte bei beiden Zelllinien zu dem gleichen Ergebnis (nicht abgebildet). Aus diesem Befund kann gefolgert werden, daß der Vorgang der

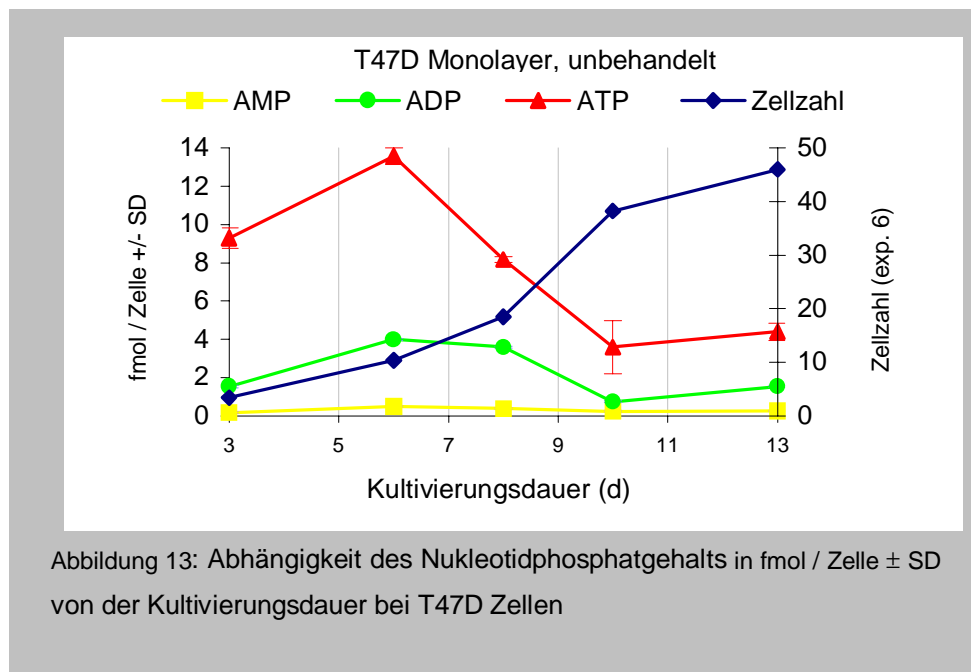
Apoptose bei den beiden humanen Brustkrebszelllinien nicht mit der Degradation der DNA in Basenpaare definierter Länge einhergeht.

## 4.2 Wirkung von Doxorubicin auf den Nukleotidphosphatgehalt von humanen Mammacarcinomzellen

### 4.2.1 HPLC Messungen

#### 4.2.1.1 Abhängigkeit des Nukleotidphosphatgehalts von der Kultivierungsdauer

Die Konzentrationen der Nukleotidphosphate / Zelle, besonders von ATP und GTP, nahmen mit zunehmender Zellzahl / Petrischale im Verlauf der Monolayerkultivierung drastisch ab. Dieses Verhalten wurde bei allen untersuchten Zelllinien mehr oder weniger ausgeprägt beobachtet. Parallel dazu kam es jedoch zu keiner meßbaren Verminderung des durchschnittlichen Zellvolumens aufgrund der erhöhten Wachstumsdichte. Bei T47D Zellen (Abb. 13) stiegen die ATP Werte im Bereich von 3 bis  $10 \times 10^6$  Zellen und sanken dann bis zu  $40 \times 10^6$  Zellen um ca. 10 fmol / Zelle steil ab. Bis zu ca.  $50 \times 10^6$  Zellen veränderten sich die intrazellulären ATP Werte nicht mehr wesentlich. Die MCF-7 Zellen zeigten ein etwas anderes Wachstumsverhalten. Nachdem eine Zellzahl von ca.  $23 \times 10^6$  / Petrischale erreicht war, erfolgte ein Wachstumsstillstand vom 7. bis zum 11. Kultivierungstag, innerhalb dessen die ATP-Konzentrationen relativ konstant blieben. Am 14. Tag hatte sich die Zellzahl auf ca.  $28 \times 10^6$  erhöht und die ATP Werte sanken (Daten nicht abgebildet).



#### 4.2.1.2 Abhängigkeit des Nukleotidphosphatgehalts von der Behandlung mit Doxorubicin

##### a) Absolutwerte von Monolayern

Die folgenden Abbildungen zeigen die Absolutwerte der Purinnukleotide der untersuchten Zelllinien. Es wurde jeweils ein Metabolit der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Zellen dargestellt. Die gemessenen Konzentrationen lassen erkennen, daß die Zellen im Versuchsverlauf keine unphysiologischen Verschiebungen innerhalb der Verhältnisse der Nucleosidphosphate zueinander aufwiesen. Die Werte der Monophosphate lagen durchgängig weit unterhalb derer der Triphosphate, während sich ADP im mittleren Bereich befand; die Absolutwerte der Nucleosidtriphosphate lagen bei T47D Zellen über denen der MCF-7 Zelllinien, die Konzentrationen der Mono- und Diphosphate waren bei allen untersuchten Zelllinien ähnlich, nur bei den MCF-7mdr lagen sie etwas höher. Die unbehandelten Kontrollen zeigten Schwankungen der ATP Werte im Versuchsverlauf um ca. 2 fmol / Zelle. Die "energy charge" der Zellen änderte sich im Versuchszeitraum bis zu 24 h nicht wesentlich (Abb. 14d), nach 50 h ohne Wechsel des Nährmediums zeigten jedoch auch die Kontrollen einen leichten Abwärtstrend dieses Parameters.

Der Gehalt an Nucleosiddi- und triphosphaten von T47D Monolayern, die mit 10 µM Doxorubicin behandelt worden waren, nahm innerhalb der ersten 8 h der Therapie zu, während bei unbehandelten Zellen oder niedrigeren Konzentrationen des Chemotherapeutikums keine derartigen Veränderungen auftraten (Abb. 14). Statistisch signifikant Anstiege erfolgten bei: ADP von 2 bis 6 h um ca. 0,5 fmol / Zelle, ATP zwischen 6 und 10 h mit einem Maximum von ca. 3 fmol / Zelle bei 8 h, GTP zwischen 2 und 10 h mit einem Maximum von ca. 2 fmol / Zelle, ebenfalls bei 8 h; infolge der Behandlung mit der niedrigen Dosis stieg GTP um 0,4 fmol / Zelle zwischen 4 und 6 h.

Bei den MCF-7wildtyp Zellen war ein schwächerer Anstieg der Werte von ATP und GTP erkennbar, (Abb. 15 ), wobei nur GTP stat. sign zunahm (4 – 6 h mit einem Maximum von 0,7 bzw. 0,4 fmol / Zelle bei 6 h infolge der hohen bzw. der niedrigen Dosis). Die selektiv doxorubicin-resistenten MCF-7adr Zellen zeigten eine ähnliches Verhalten wie der Wildtyp, wobei die Werte teilweise noch geringfügiger anstiegen (Abb. 16). Auch die transfizierten multidrug-resistent MCF-7mdr Zellen zeigten zunächst ähnliche Werte wie die anderen MCF-7 Klone, es erfolgte jedoch zusätzlich ein zweiter Anstieg nach 8 h. Außerdem stiegen die Adenosinnucleosidphosphate in Reaktion auf die niedrige Dosis wesentlich stärker an als nach Inkubation mit der hohen Dosis (Abb.17).

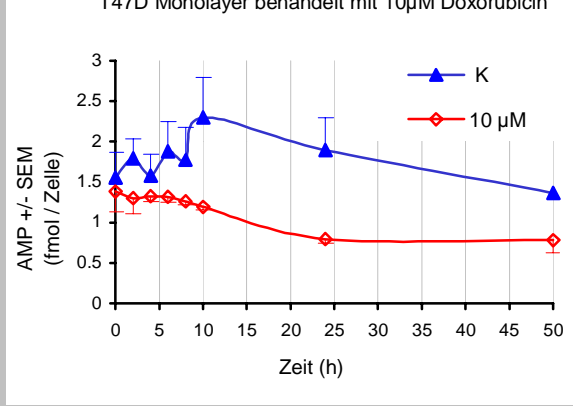


Abbildung 14 a

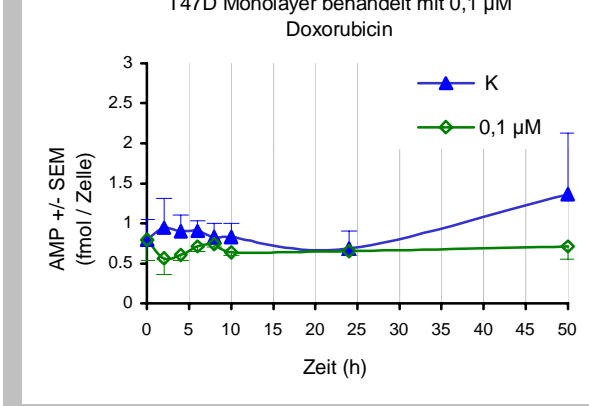


Abbildung 14 b

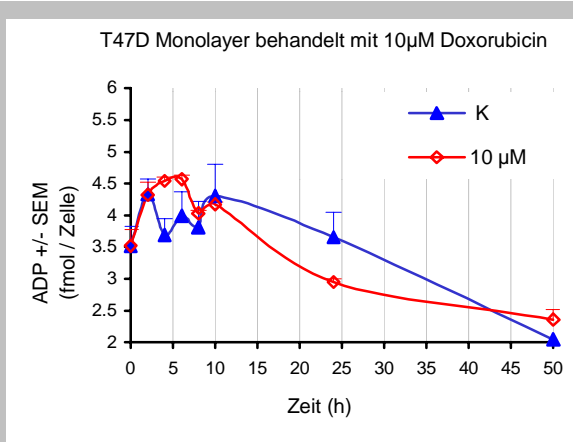


Abbildung 14 c

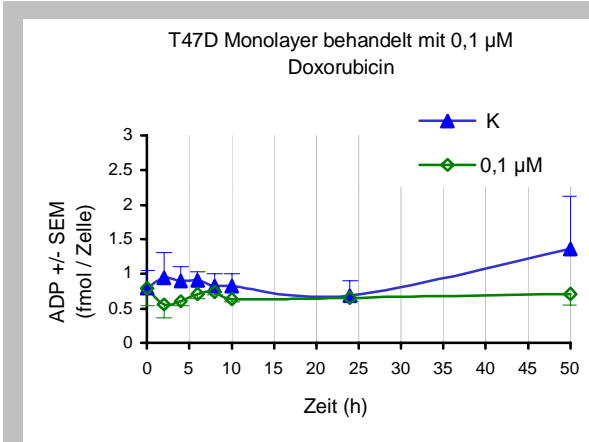


Abbildung 14 d

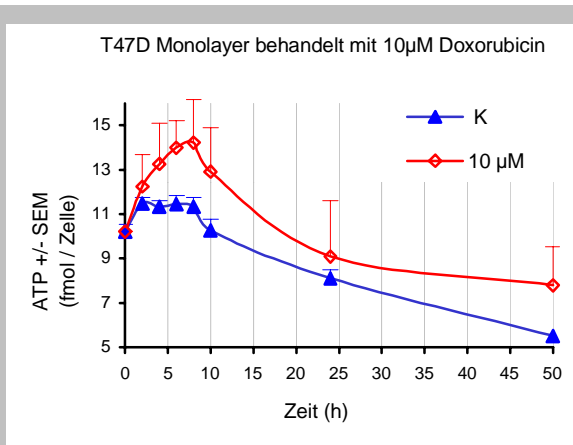


Abbildung 14 e

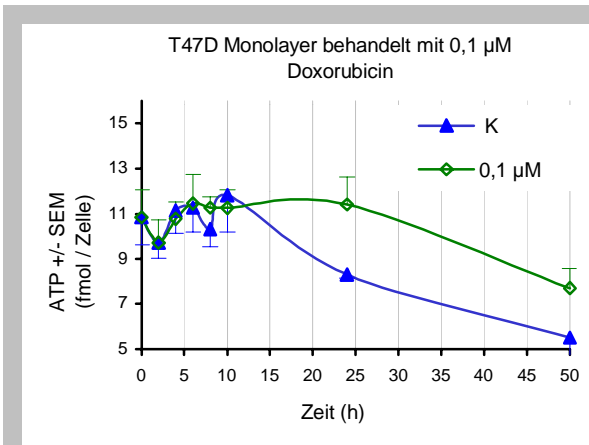


Abbildung 14 f

Abbildung 14: Absolutwerte der Adeninucleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten T47D Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 14a+b: AMP, 14c+d: ADP, 14e+f: ATP

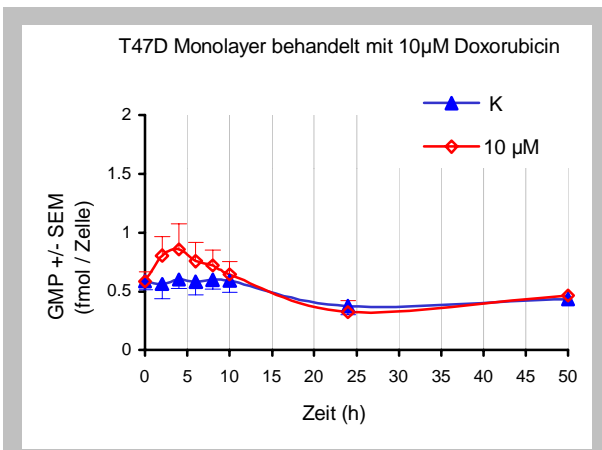


Abbildung 14 g

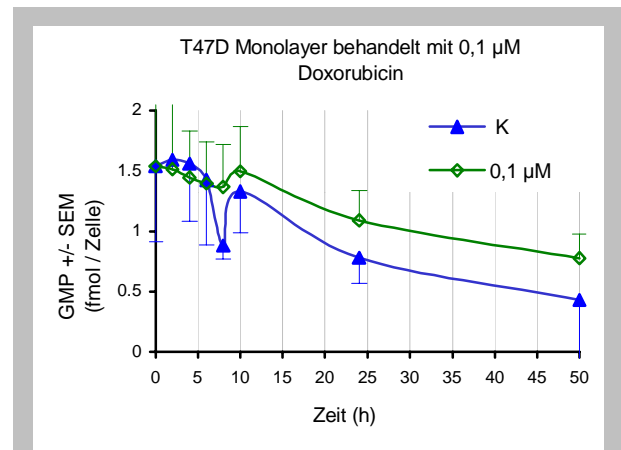


Abbildung 14 h

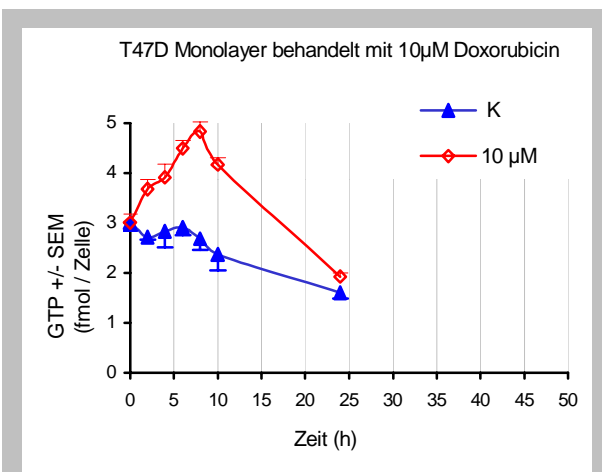


Abbildung 14 i

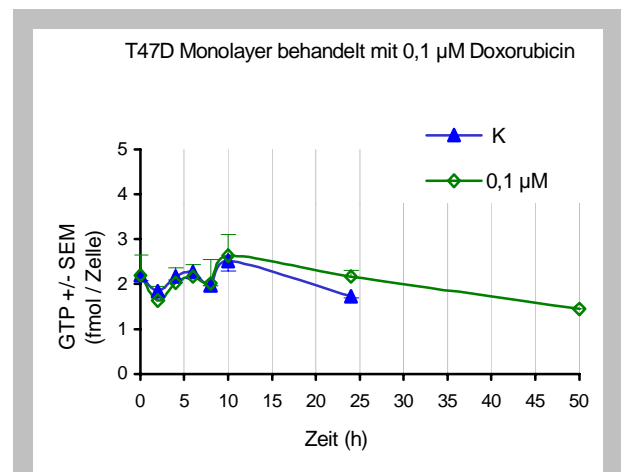


Abbildung 14 j

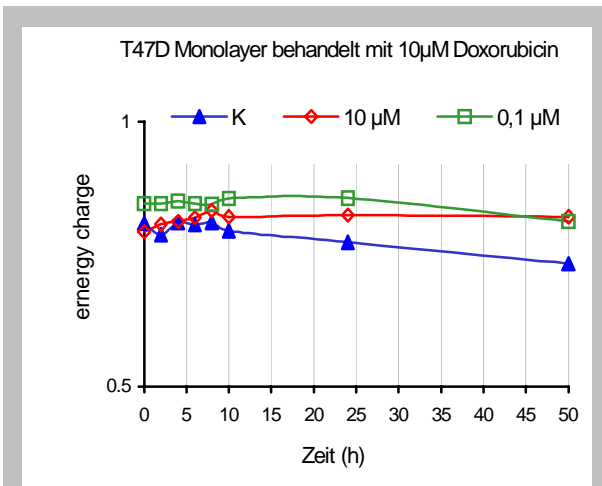


Abbildung 14 k

Abbildung 14 g-k: Absolutwerte der Guanosin-nukleosidphosphate (fmol/Zelle) sowie der "energy charge" von mit jeweils 10 und 0,1 μM Doxorubicin behandelten T47D Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 14g+h: GMP, 14i+j: GTP, 14k: "energy charge"



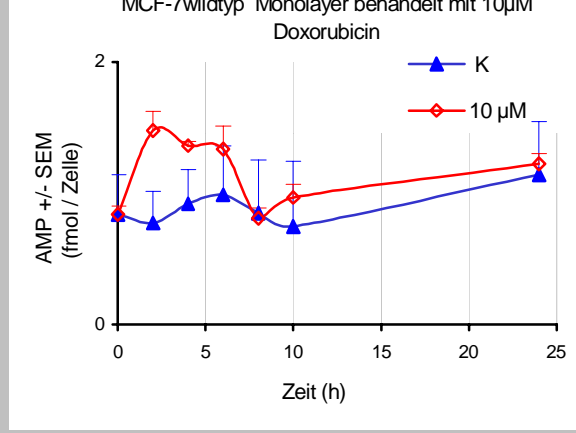


Abbildung 15 a

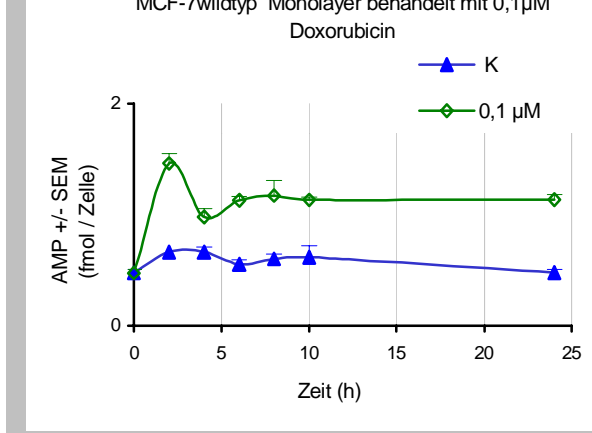


Abbildung 15 b

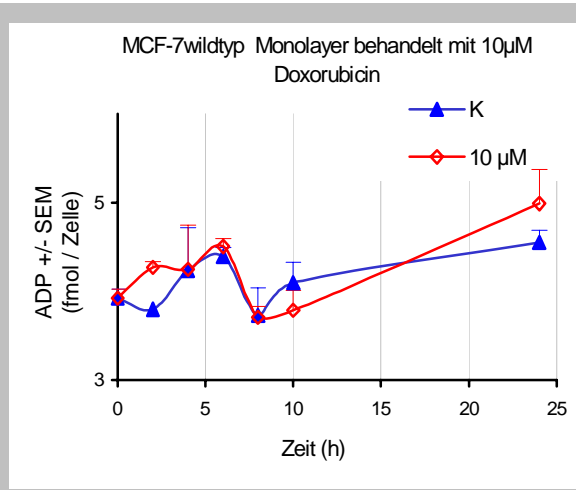


Abbildung 15 c

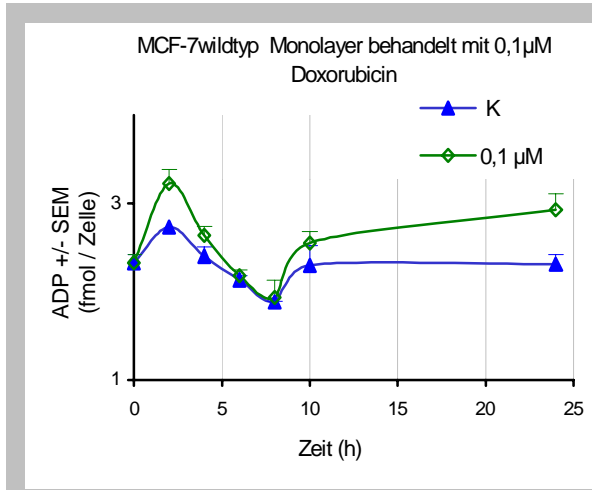


Abbildung 15 d

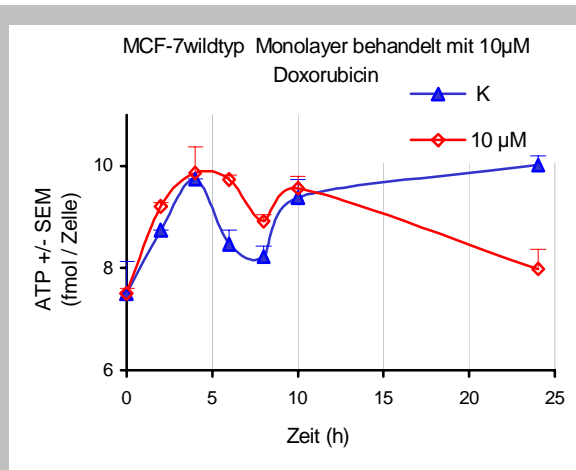


Abbildung 15 e

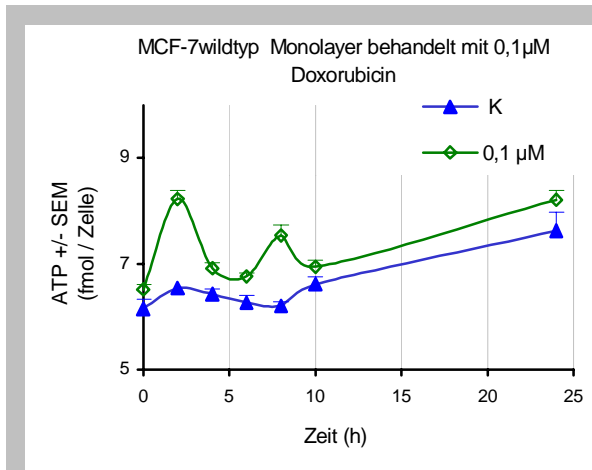


Abbildung 15 f

Abbildung 15: Absolutwerte der Adeninucleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten MCF-7wildtyp Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 15a+b: AMP, 15c+d: ADP, 15e+f: ATP

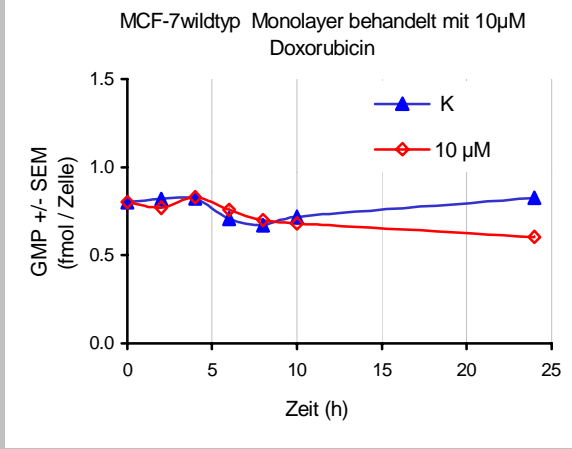


Abbildung 15 g

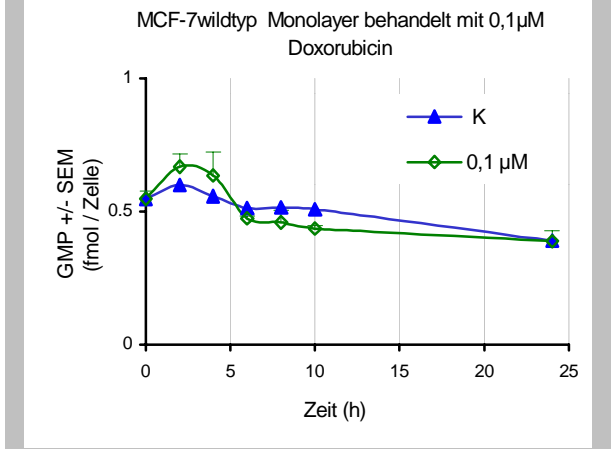


Abbildung 15 h

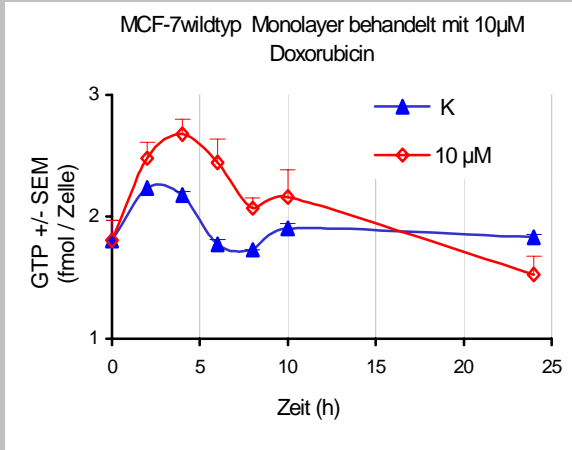


Abbildung 15 i

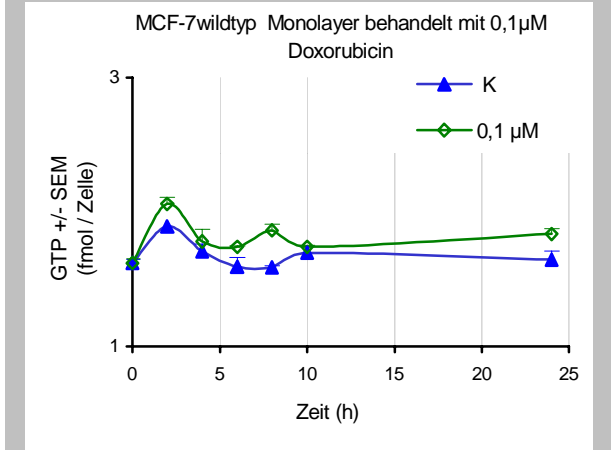


Abbildung 15 j

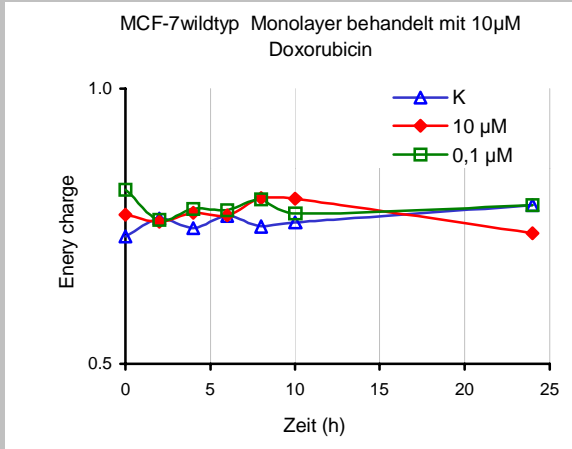


Abbildung 15 k

Abbildung 15 g-k: Absolutwerte der Guanosin-nukleosidphosphate (fmol/Zelle) sowie der "energy charge" von mit jeweils 10 und 0,1 μM Doxorubicin behandelten MCF-7wildtyp Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 15g+h: GMP, 15i+j: GTP, 15k: "energy charge"

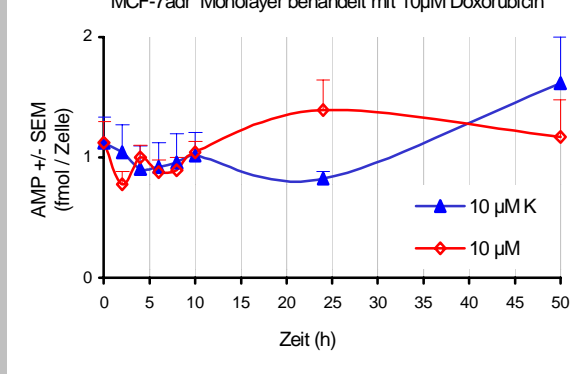


Abbildung 16 a

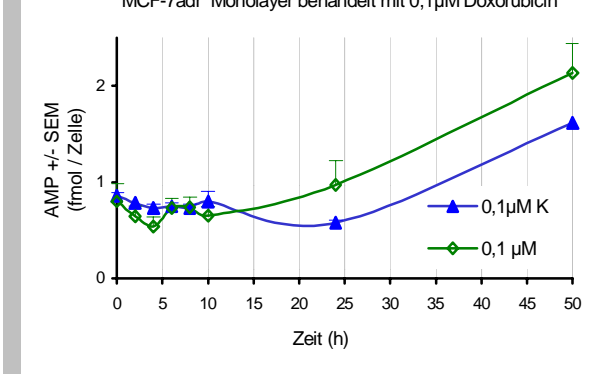


Abbildung 16 b

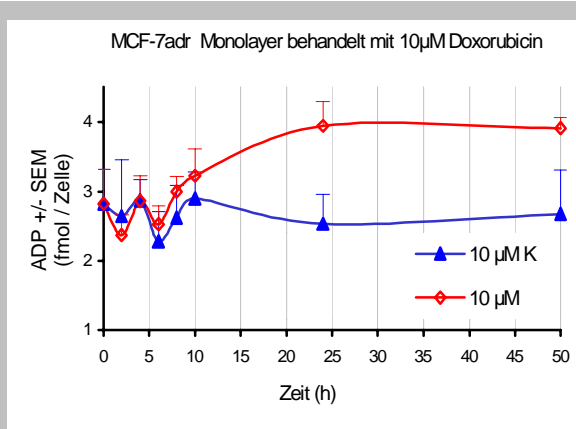


Abbildung 16 c

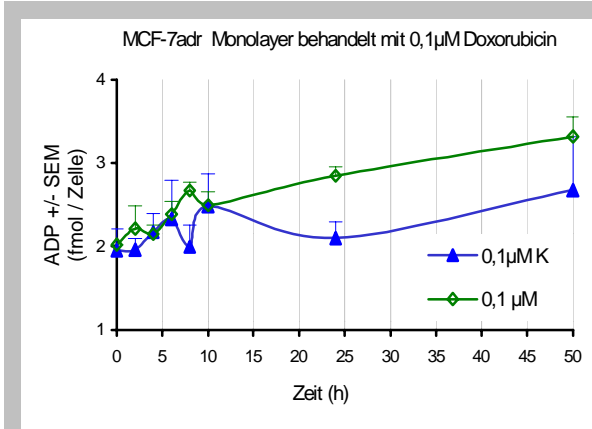


Abbildung 16 d

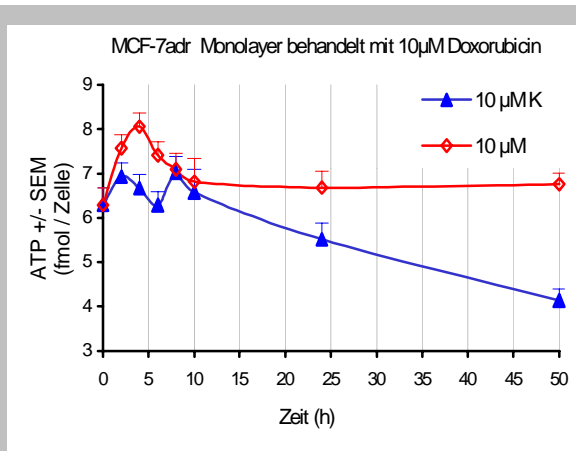


Abbildung 16 e

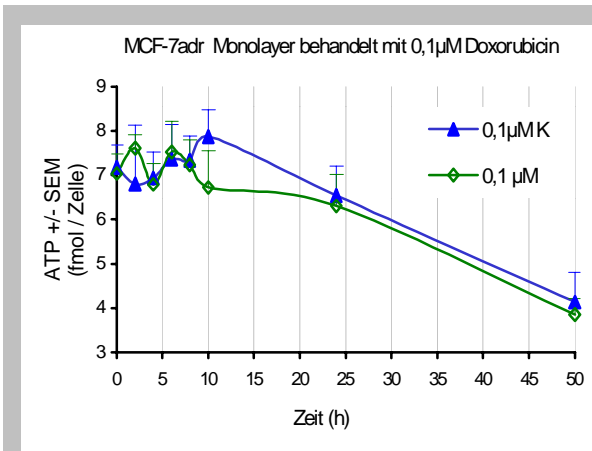


Abbildung 16 f

Abbildung 16: Absolutwerte der Adeninnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten MCF-7adr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 16a+b: AMP, 16c+d: ADP, 16e+f: ATP

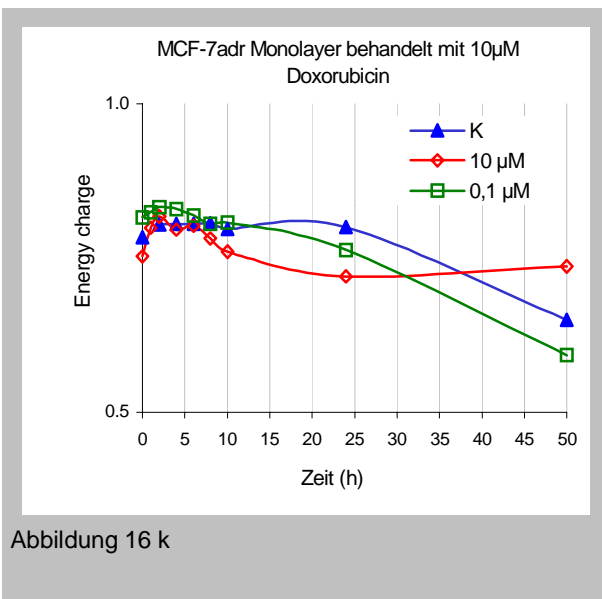
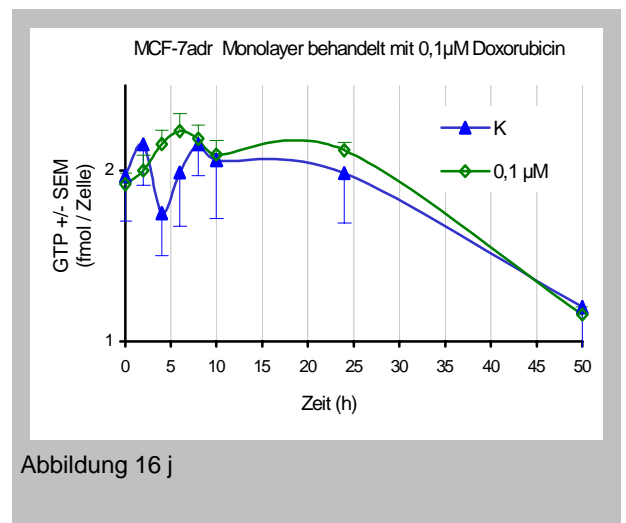
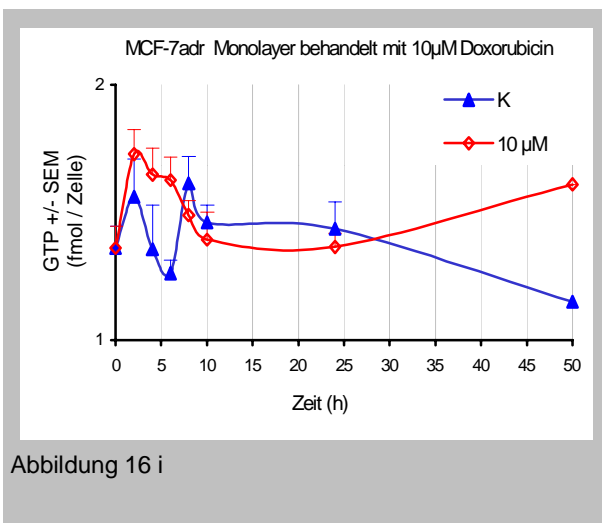
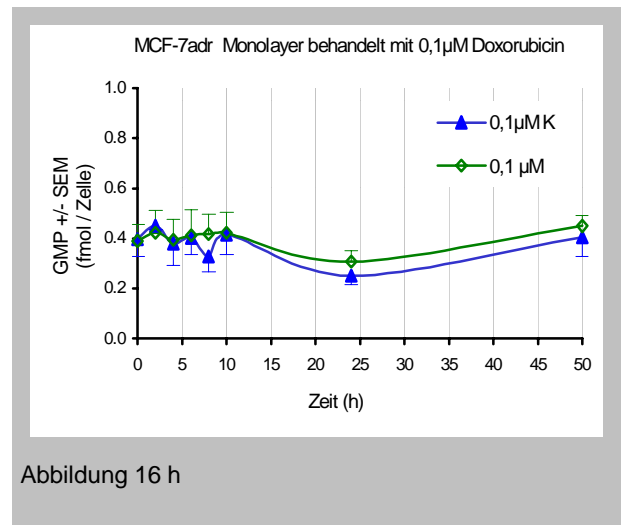
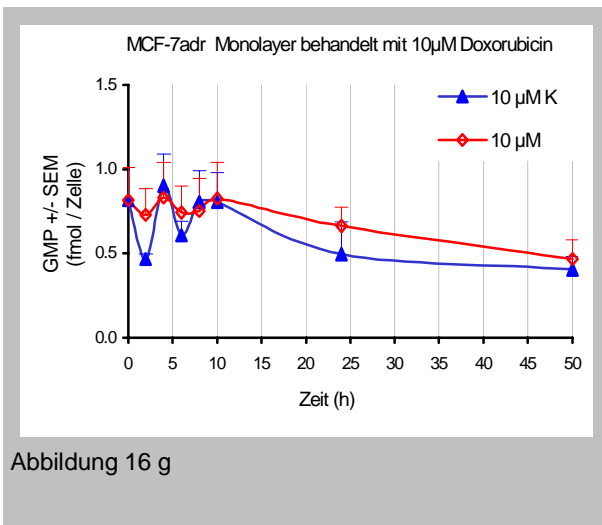


Abbildung 16 g-k: Absolutwerte der Guanosin-nukleosidphosphate (fmol/Zelle) sowie der "energy charge" von mit jeweils 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten MCF-7adr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 16g+h: GMP, 16i+j: GTP, 16k: "energy charge"

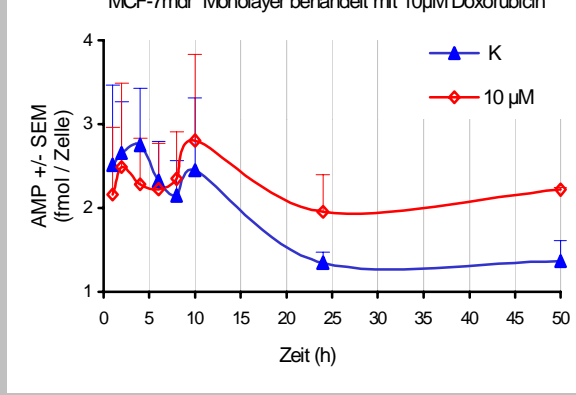


Abbildung 17 a

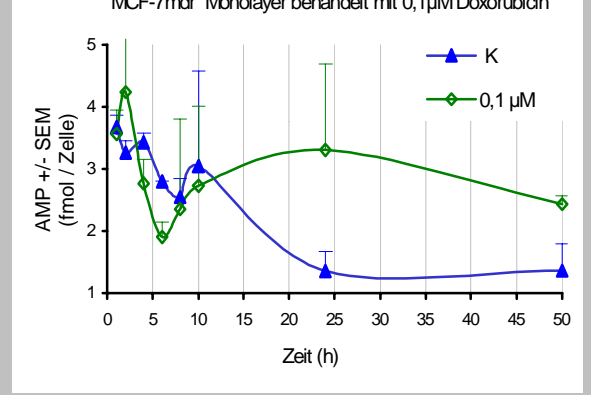


Abbildung 17 b

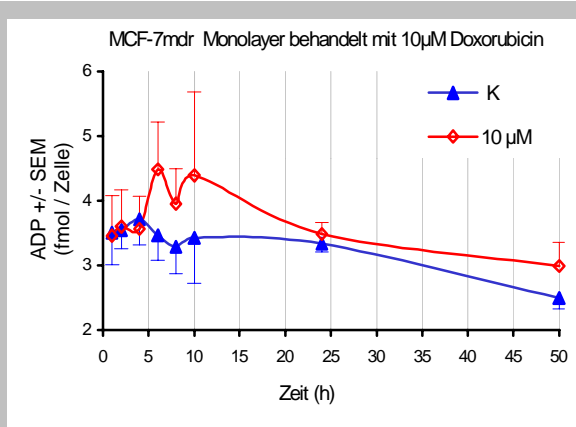


Abbildung 17 c

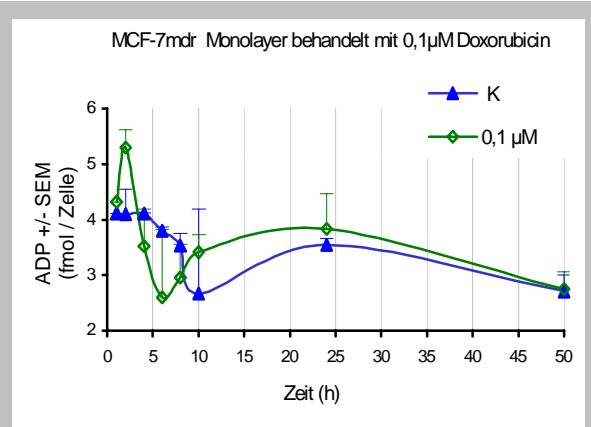


Abbildung 17 d

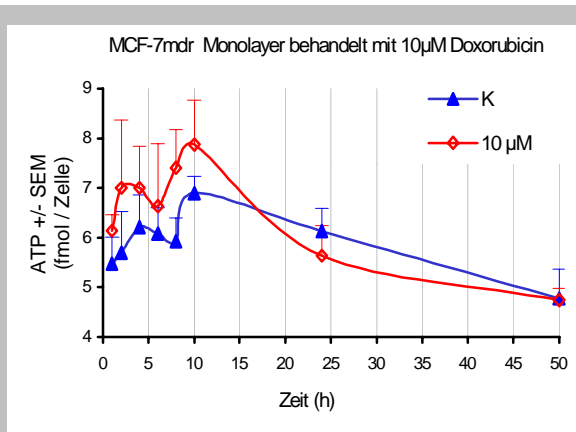


Abbildung 17 e

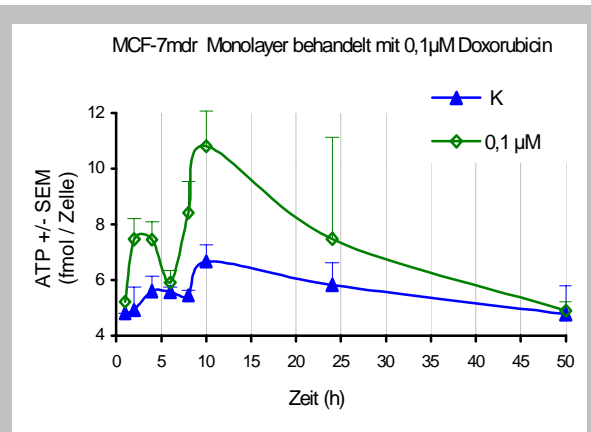


Abbildung. 17 f

Abbildung 17: Absolutwerte der Adeninnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 μM Doxorubicin behandelten MCF-7mdr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 17a+b: AMP, 17c+d: ADP, 17e+f: ATP

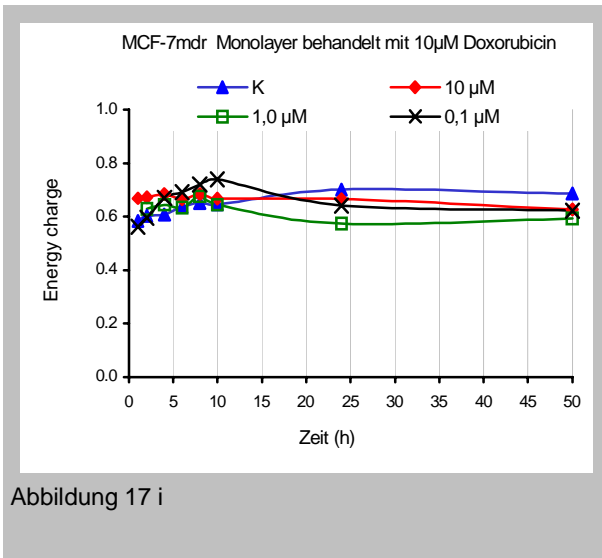
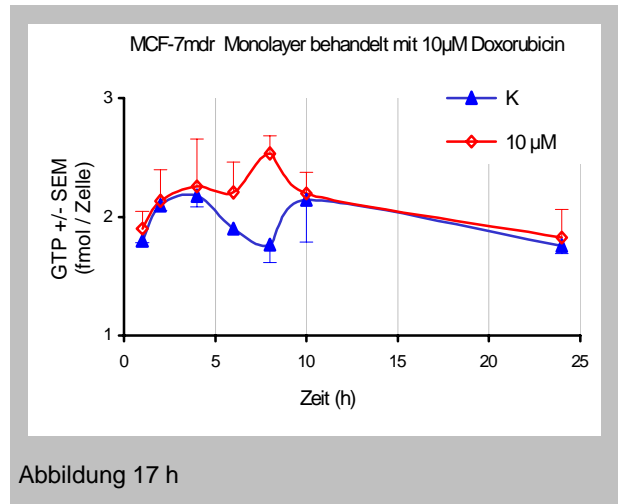
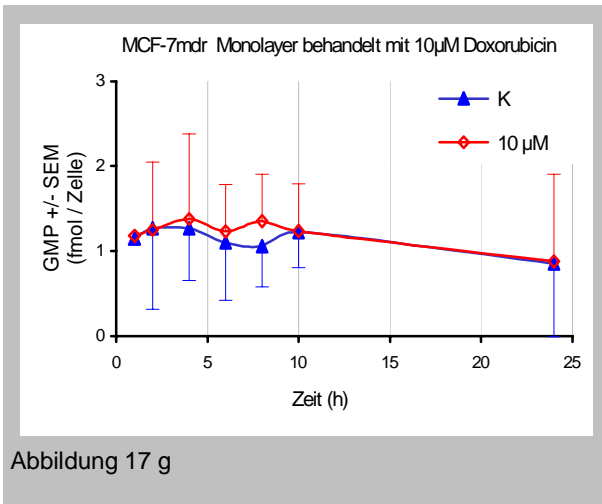


Abbildung 17 g-i: Absolutwerte der Guanosin-nukleosidphosphate (fmol/Zelle) sowie der "energy charge" von mit jeweils 10 bzw. 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten MCF-7mdr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen; K = unbehandelte Kontrolle, Dox = mit Doxorubicin behandelte Zellen, EC = Energycharge. Die Retentionszeiten von GMP und IMP überlappten, die gemessenen Konzentrationen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf GMP, die IMP Konzentrationen waren sehr gering; 17g: GMP, 17h: GTP, 17i: "energy charge"

Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der Maxima von Purinnukleosidphosphat – Konzentrationen in Absolutwerten nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin (fmol / Zelle bei Monolayern, µmol / g bei Sphäroiden), hinter den Werten steht jeweils die Zeit des/der Maximums/Maxima nach Behandlungsbeginn (h).

10 µM	AMP	ADP	ATP	GMP/IMP	GTP
T47D	-	0,5* 4h	2,9*** 6-10h	0,2 4h	2,2** 8-10h
MCF-7	0,5* 2-4h	0,5 2h	1,3 6h	-	0,7** 6h
MCF-7adr	-	0,1 8h	1,5* 4-6h	0,1 6h	0,4** 4-6h
MCF-7mdr	0,2 4h	0,5* 8-10h	1,5 + 1,9*** 4 + 8h	0,1 + 0,25* 4 + 8h	0,4 + 0,7*** 2 + 8h
T47D Sphäroide	0,3 4-6h	0,8 2-8h	0,6 6h	-	2,5 - 3*** 4 - 10h
MCF-7adr Sphäroide	-	0,3 2h	1,0 2-4h	0,1 2h	1,4*** 2h

Tabelle 4: Anstiege von Purinnukleotidphosphaten nach Behandlung mit 0,1 µM Doxorubicin (fmol / Zelle bei Monolayern, µmol / g bei Sphäroiden), hinter den Werten steht jeweils die Zeit des Maximums nach Behandlungsbeginn (h).

0,1 µM	AMP	ADP	ATP	GMP/IMP	GTP
T47D	-	-	1,0 8h	0,6 8h	0,4* 4-6h
MCF-7w	0,8 2-8h	0,5 2h	1,3** 8h	-	0,3*** 8h
MCF-7adr	-	0,3 2h	0,8 2h	-	0,4** 4h
MCF-7mdr	1,0 2h	1,5 2h	2,5 + 4 2h + 10h	-	-
T47D Sphäroide	0,1 2- 4h	0,4* 2-8h	0,4 6h	-	0,4* 6h
MCF-7adr Sphäroide	-	-	0,7** 2h	-	0,3* 1-2h

Die Anfangswerte (0 h) der einzelnen Versuchsansätze differierten teilweise stark und die Streuungen waren hoch (Abb.18 ). Diese Abweichungen entstanden durch leicht unterschiedliche Zellzahlen/Petrischale bei jedem Experiment. Es wurde zwar versucht, die Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zelllinien bei der Einsaat und Kultivierungsdauer der Zellen zu berücksichtigen, der Purinnukleotid-Gehalt reagierte jedoch so sensibel auf die Zelldichte, daß eine bessere Standardisierung nicht möglich war. Im Plateaubereich hoher Zellzahlen (bei T47D Zellen  $> 40 \times 10^6$  Zellen / Schale) konnten die Versuche ebenfalls nicht durchgeführt werden, da ein derartig dicht gewachsener Monolayer nicht 24 oder 50 h ohne Nährmediumwechsel inkubiert werden kann, ohne daß ein Nährstoffmangel auftritt, der die Ergebnisse verfälschen könnte. Innerhalb eines Experimentes mit jeweils 3 Kontrollen und 3 behandelten Populationen pro Entnahmezeitpunkt waren die Zellzahlen und damit die Werte sehr einheitlich (Abb. 18a Versuch 2a und b). Um das Verhalten unbehandelter Zellen im Versuchszeitraum miteinander vergleichen zu können, wurden die Meßwerte auf die Anfangswerte des jeweiligen Versuches normiert (Abb. 18b). Da der für die Untersuchungen interessante Zeitraum nicht über 24 h hinaus geht, wurde im folgenden auf die Ergebnisse der Extraktionen nach 50 h verzichtet.

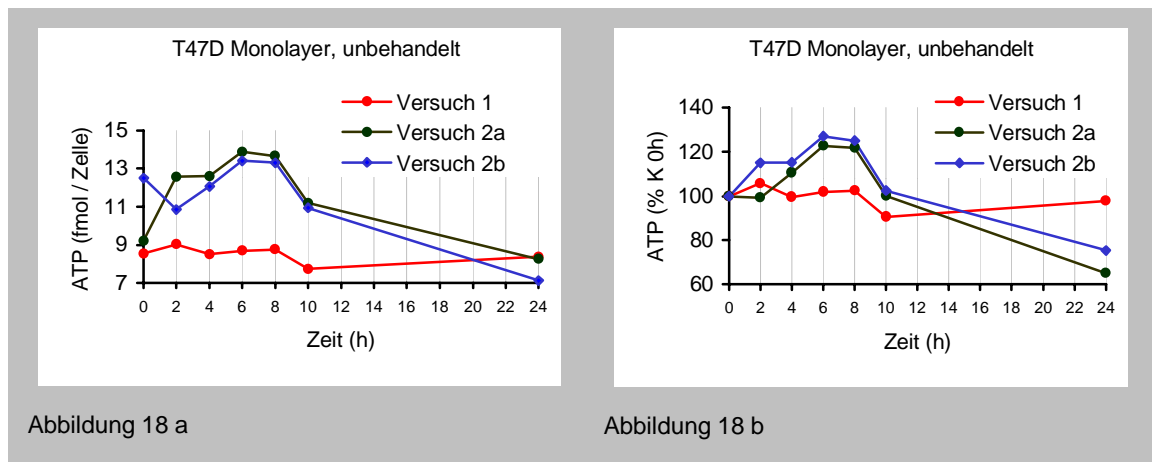


Abbildung 18: ATP Konzentrationen unbehandelter T47D Monolayer von verschiedenen Versuchen; 18a: Die Absolutwerte differieren stark zwischen den verschiedenen Experimenten (Versuch 1 und 2), innerhalb eines Experimentes sind mehrere Versuchsgruppen jedoch sehr ähnlich (Versuch 2a und b); 18b: Absolutwerte aus Fig. a auf den Anfangswert normiert. Die Werte liegen jetzt wesentlich dichter beieinander, es ist aber immernoch ein deutlicher Unterschied im zeitlichen Gang zwischen den einzelnen Versuchen erkennbar.

Durch die Normierung der Kontrollen auf ihren Startwert wurde deutlich, daß sie sehr unterschiedlichen Schwankungen im jeweiligen Versuchszeitraum unterworfen waren, die möglicherweise methodisch bedingt waren und im Durchschnitt 0 - 20 % Abweichung vom Startwert betragen. Der zeitliche Gang der behandelten Zellen verlief meistens parallel zu dem



der Kontrolle desselben Versuchs (Abb. 19a). Daher schien es sinnvoll, den jeweiligen Meßwert der behandelten Zellen auf die Kontrolle desselben Entnahmezeitpunktes innerhalb eines Experiments zu beziehen. Die Ergebnisse zeigen den reinen Behandlungseffekt (Abb. 19b). Auf gelegentlich vorkommende Koinzidenzen von sehr niedrigen und sehr hohen Werten der Kontrolle und der behandelten Zellen die vermutlich Artefakte waren und das Ergebnis stark verfälschen können, wird falls notwendig im einzelnen hingewiesen.

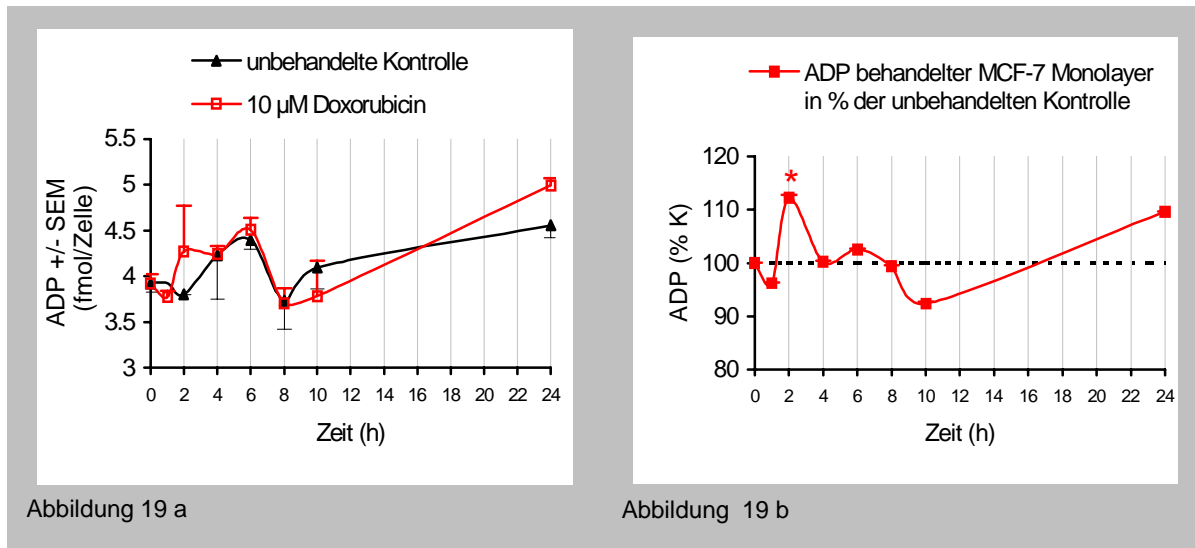


Abbildung 19: ADP Konzentrationen behandelter und unbehandelter MCF-7 Monolayer; 19a: Darstellung der Mittelwerte von je 3 Einzelerperimenten desselben Versuchstages für behandelte und unbehandelte Zellen, die Schwankungen der Kontrollen innerhalb eines Versuches betragen maximal ca. 20 %, der zeitliche Gang von Kontrolle und behandelten Zellen desselben Versuches verlief meistens parallel, sowohl die Kontrolle als auch die behandelten Zellen zeigen hier ein Maximum von 12 – 15 % bei 6 h; 19b: Gemittelte Meßwerte der behandelten Zellen jeder einzelnen Versuchsreihe der Experimente aus Abb. 18 a in % ihrer jeweiligen Kontrolle. Das Maximum bei 6 h in Abb. 18 a ist relativ zur Kontrolle nicht stat. sign. und daher kein relevanter Behandlungseffekt, bei 2 h hingegen kommt es zu einem stat. sign. Anstieg.

## b) Relativwerte von Monolayern

### T47D Zellen

Bei T47D Zellen wurde eine deutliche Dosisabhängigkeit der Nukleotidkonzentrationen beobachtet. Nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin kam es im Behandlungszeitraum bis zu 10 h zu vorübergehenden Anstiegen von ATP, ADP und AMP (Abb. 20a). statistisch signifikant waren jedoch nur die ATP Konzentrationen einem Maximum von 30 % gegenüber

der unbehandelten Kontrolle nach 8 h. Die Behandlung mit der niedrigen Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte zu geringfügigen bis keinen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (Abb. 20b). Nach 24- bzw. 50stündiger Inkubation mit der niedrigen Dosis sanken alle gemessenen ATP Werte unter den Ausgangswert ab, da jedoch die Werte der unbehandelten Zellen einen noch stärkeren Abwärtstrend zeigten, ergab sich ein relativer Anstieg gegenüber der Kontrolle. Es handelt sich hierbei also nicht um eine effektive Steigerung der Nucleosidphosphatgehalte.

Die Guanosinnucleosidphosphate verhielten sich ähnlich den Adenosinphosphaten, der relative Anstieg von GTP in Reaktion auf die hohe Dosis war jedoch wesentlich höher als der von ATP (Abb. 20c und d). Die Applikation der mittleren Dosis von 1,0  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte nicht zu statistisch signifikant Anstiegen der Nucleotide, jedoch zu etwas erhöhten Werten gegenüber der niedrigen Dosis (nicht gezeigt). Da auch die Mono- und Diphosphate anstiegen, kam es zu keiner deutlichen Änderung des zellulären "energy charge".

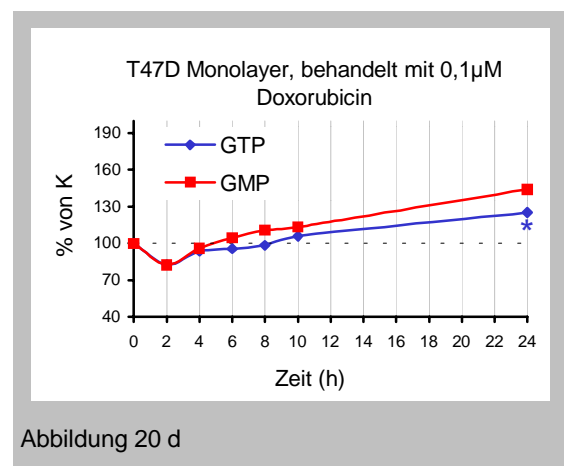
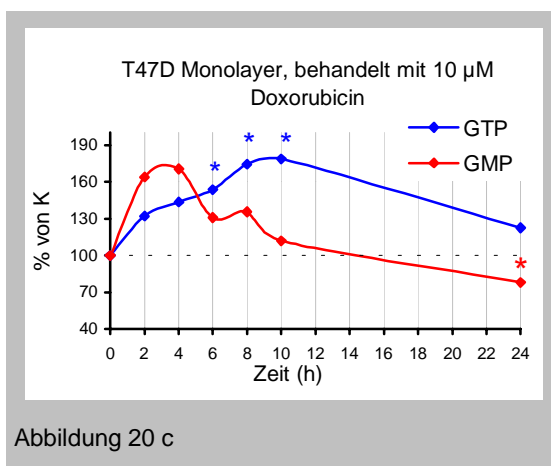
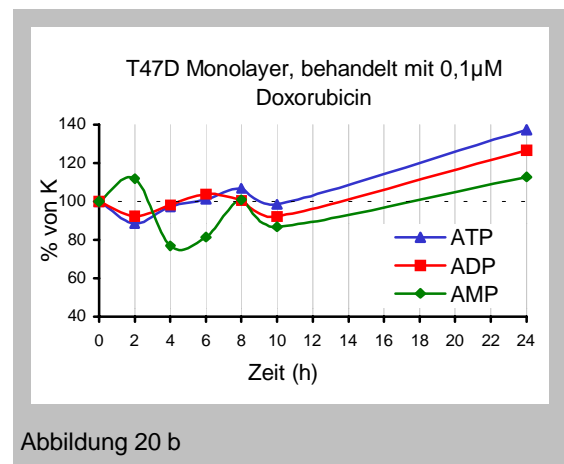
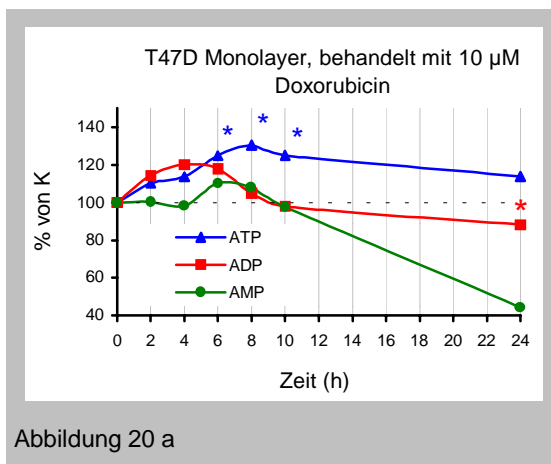


Abbildung 20: Nucleosidphosphate von behandelten T47D Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle; 20a+b: Adeninnucleosidphosphate, 20a: 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin, 20b: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 20c+d: Guanosinnucleosidphosphate, 20c: 10  $\mu\text{M}$ , 19d: 0,1  $\mu\text{M}$

Es wurde ein dosisabhängiger Anstieg von GTP nachgewiesen, ein statistisch signifikant Anstieg von ATP wurde hingegen nur nach Behandlung mit der niedrigen Dosis gemessen. Die ATP Werte der mit der niedrigen Dosis behandelten Zellen zeigten nach 1 und 2 h einen Anstieg um 26 % gegenüber der Kontrolle, die ADP Werte stiegen in ähnlicher Weise. Die Behandlung mit der hohen Dosis hatte keinen statistisch signifikant Anstieg von ATP oder ADP zur Folge, ATP war nach 6 h jedoch leicht erhöht. Besonders auffällig war ein Anstieg der AMP Konzentrationen in Reaktion auf beide Doxorubicinkonzentrationen von bis zu 70 - 170 %. Die Werte beider Gruppen erreichten das Maximum bereits nach 1 bis 2 h, in Reaktion auf die niedrige Dosis blieben sie im weiteren Versuchsverlauf stark erhöht, während sie bei der anderen Gruppe nach 6 h wieder absanken (Abb. 21a und b). Die GTP Werte der mit der hohen Dosis behandelten Zellen stiegen von 4 bis 6 h statistisch signifikant mit einem Maximum von 33 % nach 6 h, während die GMP Konzentrationen keine deutliche Reaktion zeigten (Abb. 21c). Die mit der niedrigen Dosis behandelten Zellen zeigten ebenfalls einen leichten Anstieg von GTP mit einem Maximum von 19 % nach 2 h, die GMP Werte stiegen in ähnlicher Weise (Abb.21d).

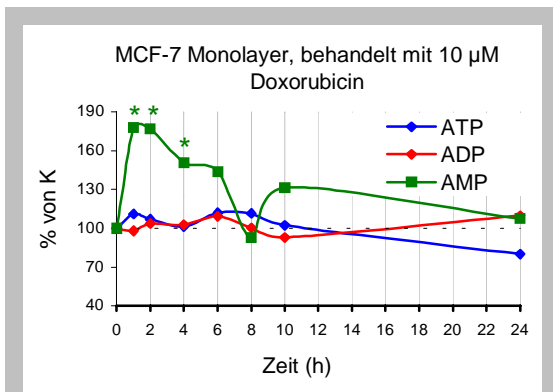


Abbildung 21 a

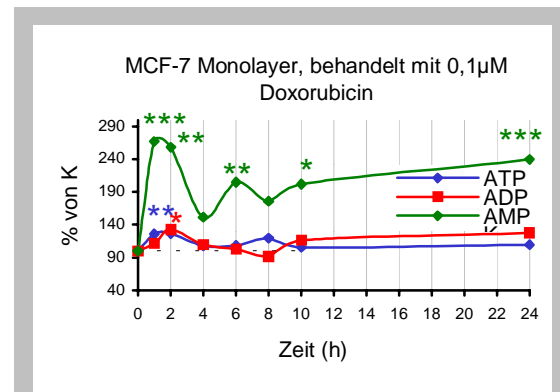


Abbildung 21 b

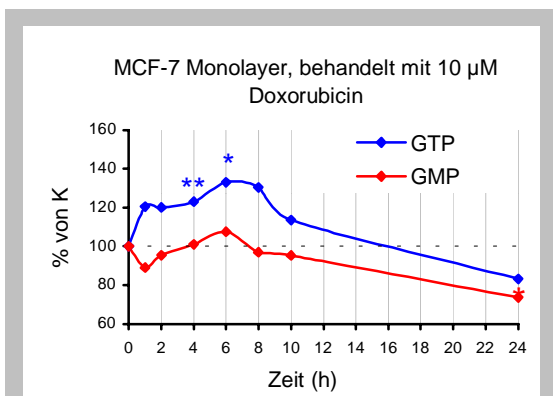


Abbildung 21 c

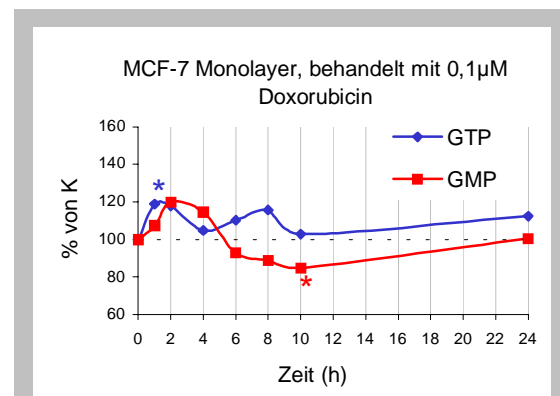


Abbildung 21 d

Abbildung 21 Nukleosidphosphate von behandelten MCF-7 wildtyp Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle; 20a+b: Adeninnukleosidphosphate, 21a: 10µM Doxorubicin, 21b: 0,1 µM; 21c+d: Guanosinnukleosidphosphate, 21c: 10 µM, 21d: 0,1 µM

## MCF-7adr Zellen

Es wurde ein schwacher Anstieg von ATP und GTP um 25 – 30 % nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin beobachtet, alle anderen gemessenen Metaboliten zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Reaktion auf die Behandlung mit 0,1 oder 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (Abb. 22a – d). Die Maxima wurden bereits nach 4h erreicht, ab 6 h fielen die Werte wieder ab. Die Behandlung mit der niedrigen Dosis führte zu keinem statistisch signifikant Anstieg der gemessenen Metaboliten. Nach 24 h waren die Werte der Nukleosidmono- und diphosphate und teilweise auch der –triphosphate relativ zur Kontrolle erhöht; wie bei den T47D Monolayern handelt es sich jedoch nicht um einen effektiven Anstieg, sondern die Werte der behandelten Zellen sanken zum Versuchsende hin weniger stark ab, als die der unbehandelten Kontrollen.

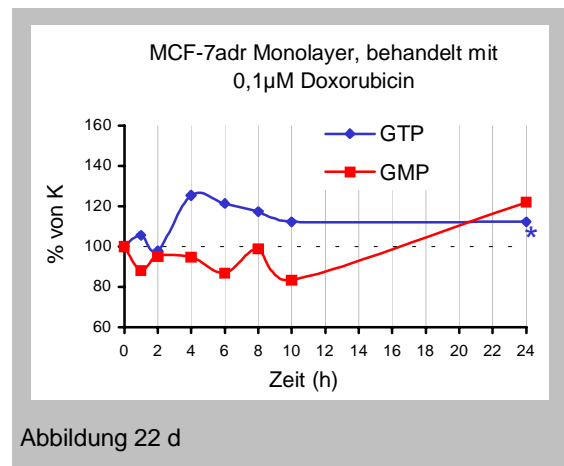
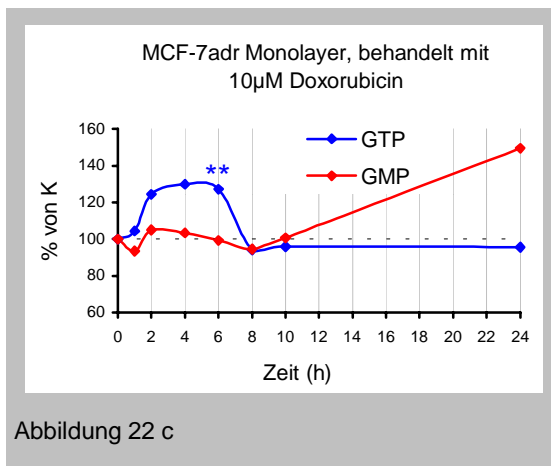
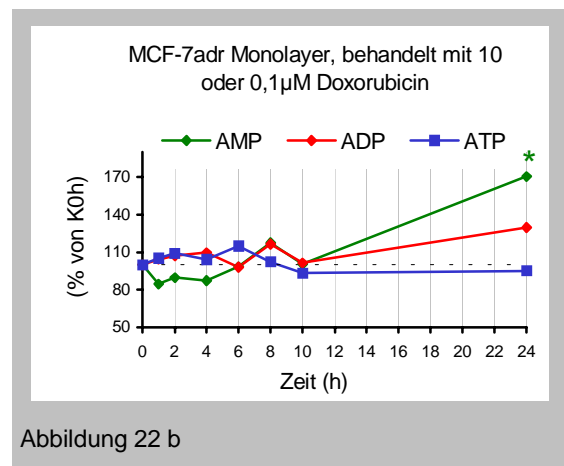
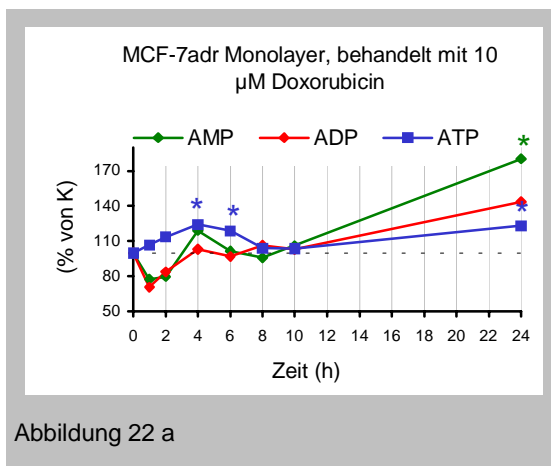


Abbildung 22: Nukleosidphosphate von behandelten MCF-7adr Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle; 22a+b: Adeninnukleosidphosphate, 22a: 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin, 22b: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 22c+d: Guanosinnukleosidphosphate, 22c: 10  $\mu\text{M}$ , 22d: 0,1  $\mu\text{M}$

Die MCF-7mdr Zellen wurden mit 10, 1 und 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelt. In Reaktion auf die niedrige Dosis stiegen alle drei Adenosidphosphate nach 2stündiger Inkubation um 30 bis 50 % der unbehandelten Kontrolle an. Ein zeitgleicher Anstieg um ca. 30 % der ADP und ATP Konzentrationen erfolgte nach Behandlung mit 1,0  $\mu\text{M}$ , während bei der Behandlung mit der hohen Dosis lediglich eine Steigerung der ATP Konzentrationen um 13 % gemessen wurde. Die erhöhten Werte sanken rasch wieder ab, es kam jedoch nach 6 bis 10 h zu einem erneuten Anstieg von ATP und teilweise von ADP. Dieser betrug in Reaktion auf die niedrige Dosis ca. 20 %, auf die mittlere ca. 30 % und auf die niedrige ca. 60 %. Dieser Doppelpeak der ATP Konzentrationen wurde bei allen Experimenten mit MCF-7mdr Zellen beobachtet (Abb. 23d). Bei allen drei Versuchsgruppen, besonders bei der niedrigen Dosis, stiegen die AMP Konzentrationen zum Versuchsende hin stark an (Abb. 23 a und b). Die GMP bzw. GTP Konzentrationen zeigten nach 8stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin statistisch signifikant Maxima um 28 bzw. 44 %, wobei der Anstieg nach Behandlung mit der hohen Dosis evtl. nur ca. 30 % betrug, weil zum selben Zeitpunkt die Kontrollen etwas absanken (Abb. 23 c).

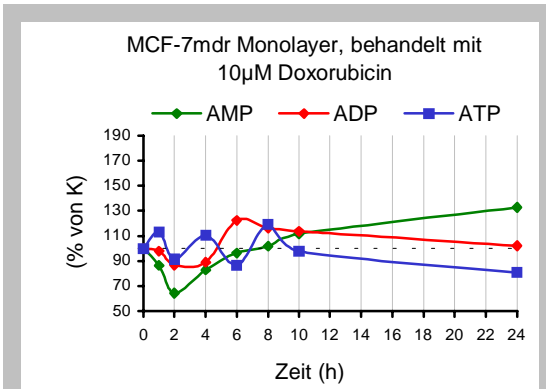


Abbildung 23 a

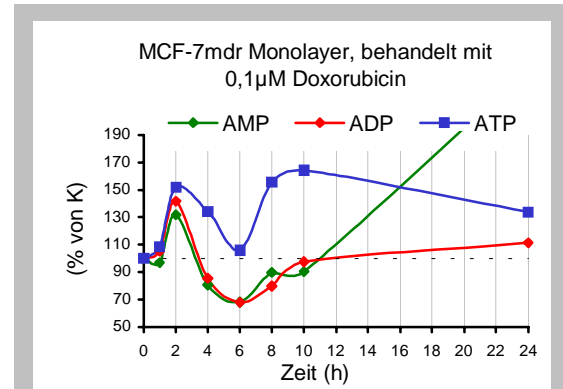


Abbildung 23 b

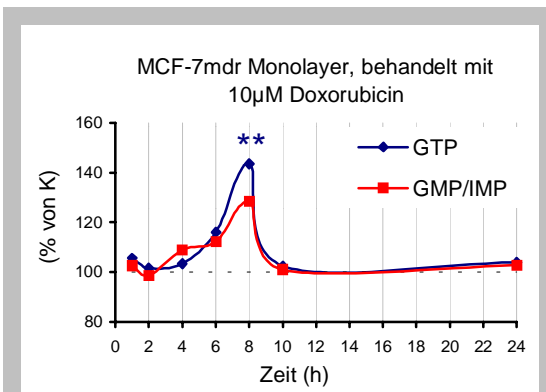


Abbildung 23 c

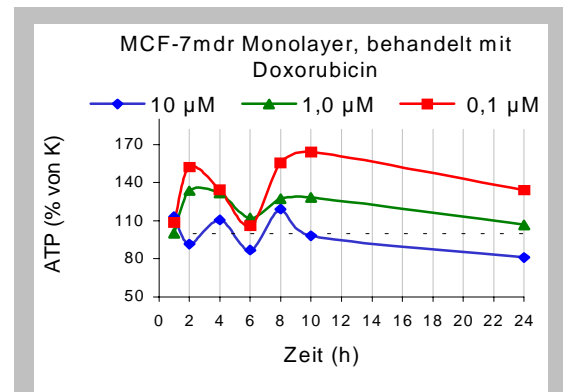


Abbildung 23 d

Abbildung 23 Nucleosidphosphate von behandelten MCF-7mdr Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle; 23a+b: Adeninnucleosidphosphate, 23a: 10 $\mu\text{M}$  Doxorubicin, 23b: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 23c: Guanosinnucleosidphosphate, 10  $\mu\text{M}$ ; 23d: ATP Konzentrationen während der Behandlung mit 10, 1,0 und 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin

### c) Unbehandelte Sphäroide

Die Nucleosidphosphat-Konzentrationen, besonders die Monophosphate unbehandelter Sphäroide stiegen innerhalb des Versuchszeitraums leicht an. Da jedoch auch die übrigen Adeninnucleosidphosphate erhöht waren, änderte sich die "energy charge" der Zellen im Versuchszeitraum nicht. Die Zunahme an Nucleosidphosphaten in Relation zum Sphäroidvolumen (Gewicht) ist vermutlich auf die Zellvermehrung im Versuchszeitraum zurückzuführen. Die durchschnittliche Sphäroidgröße wurde am Vortag des Versuchs bestimmt, während des Experiments war keine Größenbestimmung mehr möglich. Daher wurden alle Meßwerte auf dieselbe Sphäroidgröße bezogen, obwohl die Zellaggregate permanent weiterwuchsen. Die Werte der mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelten Sphäroide zeigten ein ähnliches Verhalten wie die unbehandelten Zellen. Bei der Behandlung mit der hohen Dosis verringerte sich das Volumen der Zellaggregate spätestens ab 10 h nach Behandlungsbeginn deutlich, daher war eine Abnahme der Nucleosidphosphat – Gehalte zu beobachten.

Bei den Sphäroiden waren die Streuungen der Absolutwerte größer als bei den Monolayern, da die Größen der Zellaggregate innerhalb einer Population leicht differierten. Außerdem waren die durchschnittlichen Anfangswerte bei Populationen in verschiedenen Spinnerflaschen unterschiedlich, auch wenn sie erst am Vortag des Versuchs aus einer gemeinsamen Flasche auf mehrere aufgeteilt worden waren. Weiterhin waren die durchschnittlichen Volumina der Sphäroidpopulationen zwischen den einzelnen Experimenten unterschiedlich, und da größere Sphäroide relativ geringere Konzentrationen an Adeninnucleotiden enthalten als kleinere, kam es zu weiteren Abweichungen.

### d) Behandelte T47D – Sphäroide

#### Absolutwerte

Ein deutlicher ATP Anstieg im Versuchszeitraum war bei keiner der beiden Behandlungsgruppen erkennbar. Zwar stiegen die Werte zwischen 4 und 8 h an, die Maxima lagen jedoch unter  $1\mu\text{mol} / \text{g}$  relativ zum Startwert (Abb.24 a+b). Die Werte waren im Vergleich zum Startwert statistisch signifikant, nicht jedoch im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Kontrolle. Die ADP und AMP Werte der mit der hohen Dosis behandelten Sphäroide zeigten höhere Startwerte als die Kontrollen, ähnlich wie die GMP / IMP Werte. Im Versuchsverlauf nahmen sie aufgrund der Wachstumsinhibition im Vergleich zur Kontrolle kontinuierlich ab. Die AMP und ADP Werte der mit der niedrigen Dosis behandelten Sphäroide lagen hingegen leicht über den Kontrollen und nahmen im Versuchszeitraum zu (Abb. 24 c bis f).

Wie bei den T47D Monolayern so stieg auch bei den Sphäroiden derselben Zelllinie GTP nach der Behandlung mit  $10\mu\text{M}$  Doxorubicin relativ zum Startwert und der Kontrolle am stärksten von allen Meßwerten an. Der Anstieg erfolgte 4 – 10 h nach Behandlungsbeginn und betrug maximal  $3\mu\text{mol} / \text{g}$  nach 8 h. Auch die Inkubation mit  $0,1\mu\text{M}$  führte zu einem leichten Anstieg

von GTP um 0,4  $\mu\text{mol/g}$  nach 6 h (Abb. 25 a+b). Die GMP / IMP - Absolutwerte der mit 10  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen lagen zwar über der Kontrolle, jedoch differierten die Startwerte von Kontrolle und behandelten Zellen stark, so daß der Unterschied vermutlich auf die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in verschiedenen Spinnerflaschen zurückzuführen ist. Relativ zum Startwert kam es nicht zu einem Anstieg von GMP / IMP (Abb. 25 c+d). Die "energy charge" blieb während des Experiments weitgehend unverändert (Abb. 25 e+f).

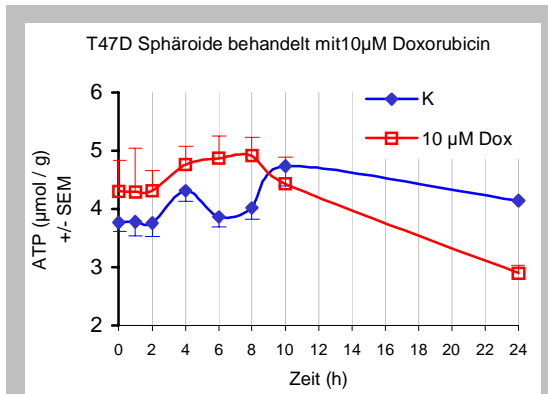


Abbildung 24 a

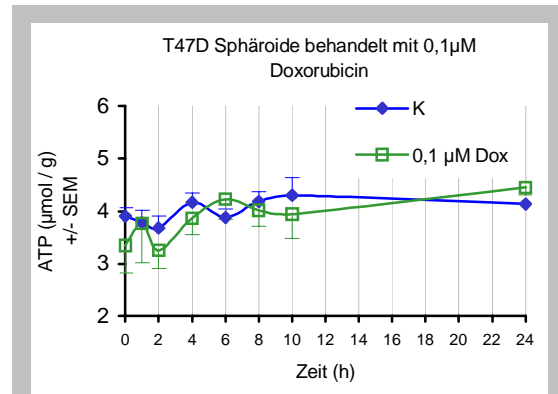


Abbildung 24 b

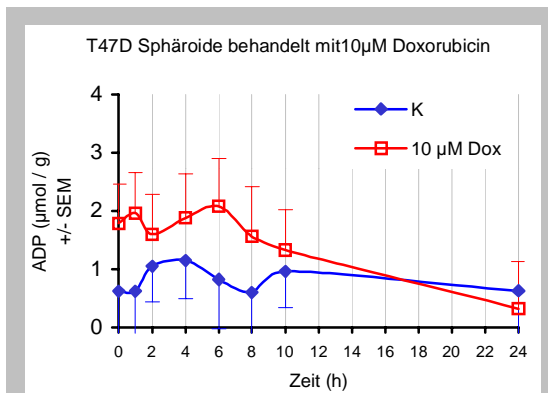


Abbildung 24 c

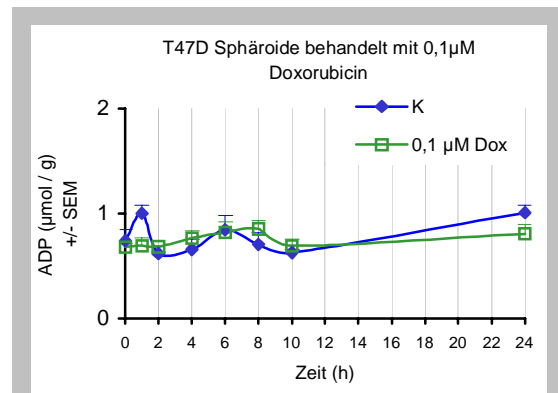


Abbildung 24 d

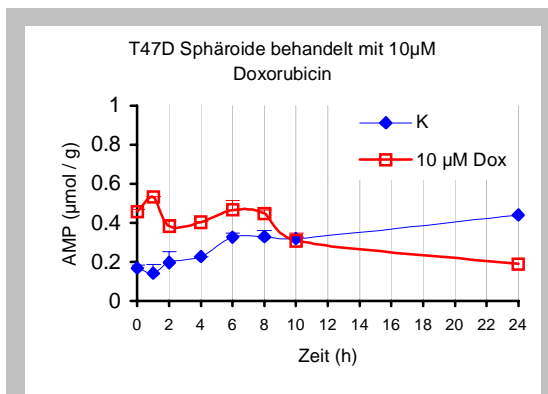


Abbildung 24 e

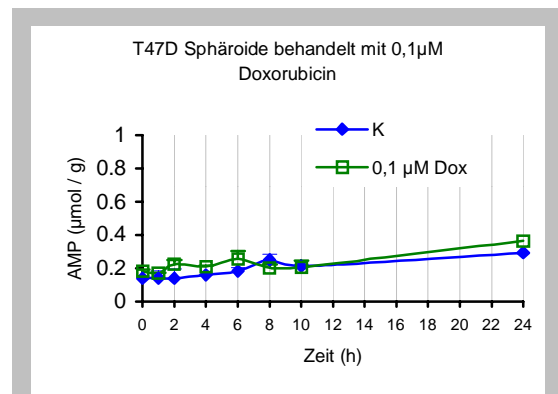


Abbildung 24 f

Abbildung 24: Adenosinnukleosidphosphate behandelter und unbehalteter T47D Sphäroide (jeweils 10 und 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin); 24a+b: ATP, 24c+d: ADP, 24e+f: AMP

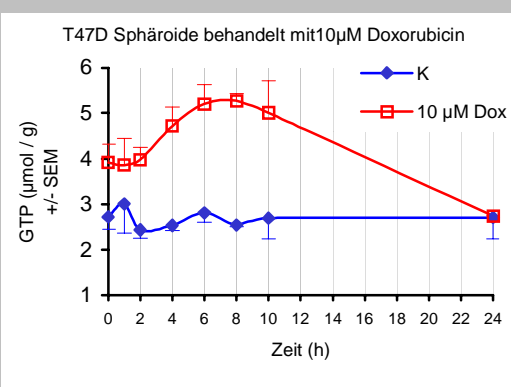


Abbildung 25 a

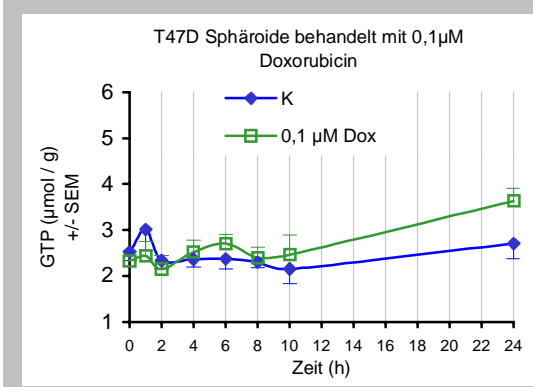


Abbildung 25 b

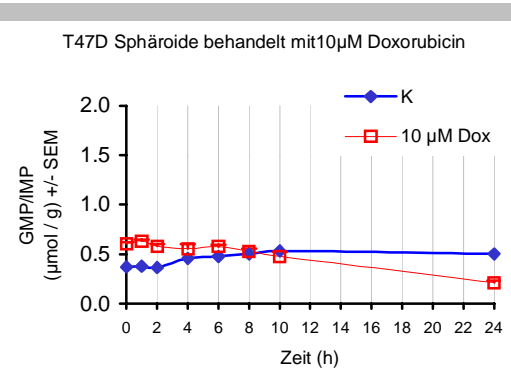


Abbildung 25 c

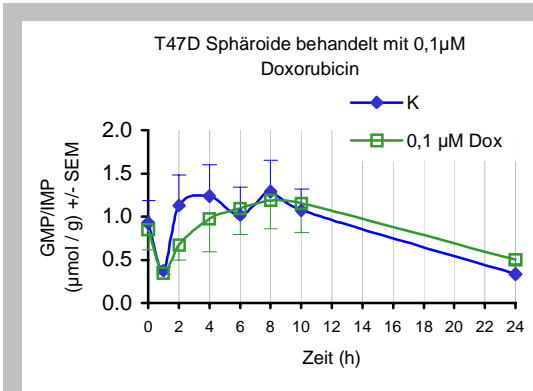


Abbildung 25 d

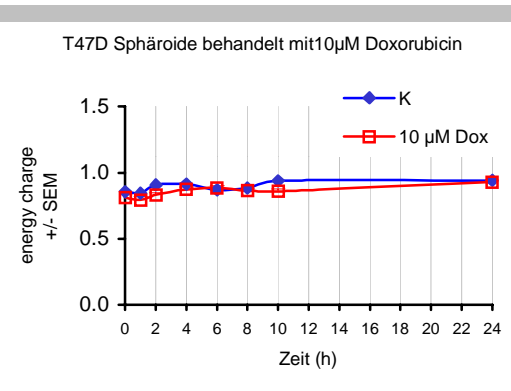


Abbildung 25 e

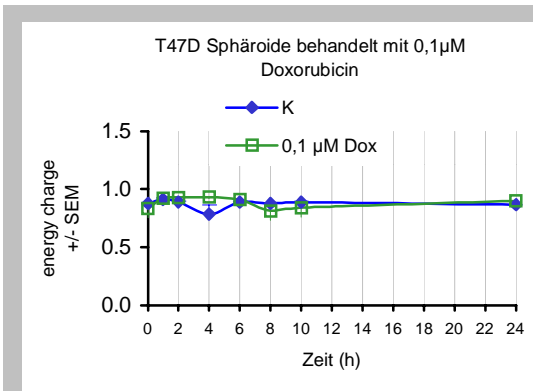


Abbildung 25 f

Abbildung 25: Guanosinnukleosidphosphate und "energy charges" behandelten und unbehandelten T47D Monolayern (jeweils 10 und 0,1 μM Doxorubicin); 25a+b: GTP, 25b+c: GMP/IMP, 25d+f: energy charge

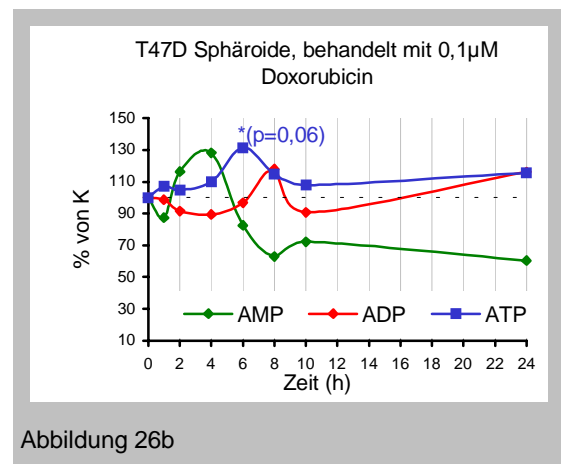
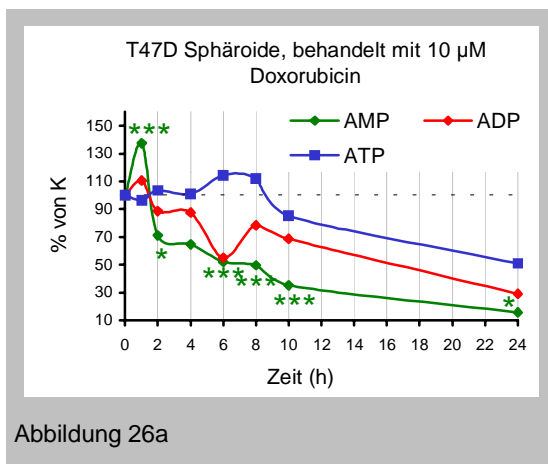


## Relativwerte von T47D - Sphäroiden

Um die beschriebenen Streuungen zu minimieren und den reinen Behandlungseffekt darzustellen, wurde bei den Sphäroiden in ähnlicher Weise wie bei den Monolayern verfahren. Da jedoch die gemessenen Konzentrationen unbehandelter Sphäroide zwischen den verschiedenen Spinnerflaschen und Populationen teilweise stark schwankten, wurden die Meßwerte zunächst auf ihren Startwert normiert, so daß Mittelwerte aus mehreren Versuchen gebildet werden konnten. Danach wurden die normierten Werte der Kontrollen und behandelten Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen.

Die AMP und ADP Werte zeigten zunächst 1 h nach Behandlungsbeginn mit 10 µM einen kurzen Anstieg (nicht statistisch signifikant) und fielen danach kontinuierlich drastisch ab, um bis zu 85 % bei 24 h (Abb. 26a). Die Behandlung mit der niedrigen Dosis führte zu einem weniger steilen Abfall der AMP Werte, nachdem auch hier ein kurzer Anstieg beobachtet wurde (Abb. 26b). Die ADP Werte reagierten auf die Behandlung mit der niedrigen Dosis mit Werten im Bereich der Kontrolle und einem leichten stat. sing. Anstieg um ca. 18 % bei 8 h.

Die GTP Konzentrationen zeigten einen dosisabhängigen statistisch signifikant Anstieg, der nach der Behandlung mit 10 µM zwischen 4 und 10 h lag, mit einem Maximum von 47 % nach 8 h. Die Behandlung mit der niedrigen Dosis führte zu einem Anstieg um 24 % bei 6 h (Abb. 26c). Die GMP Konzentrationen zeigten nach der Behandlung mit der hohen Dosis einen kontinuierlichen Rückgang von 6 bis 24 h um bis zu 75 %, die niedrige Dosis führte zu keiner statistisch signifikant Änderung gegenüber der Kontrolle. Die ATP Werte zeigten nach der Inkubation mit 10 µM Doxorubicin zwar einen leichten Anstieg um ca. 15 % nach 6 h relativ zum Startwert, im Vergleich zur Kontrolle wurde jedoch keine statistisch signifikant Änderung beobachtet. Die Behandlung mit der niedrigen Dosis führte zu erhöhten Werte zwischen 6 und 8 h, mit einem Maximum von 32 % gegenüber der Kontrolle bei 6 h, mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,06$  (Abb. 26d).



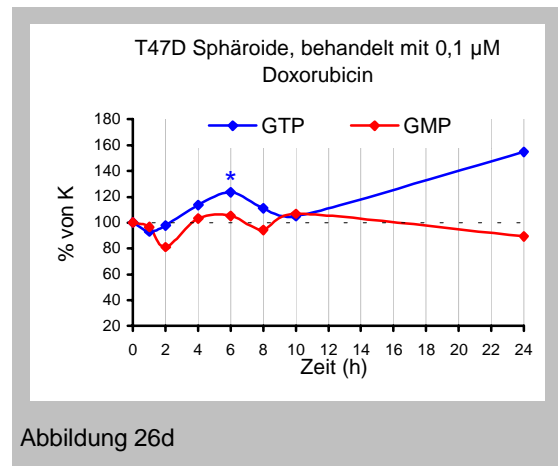
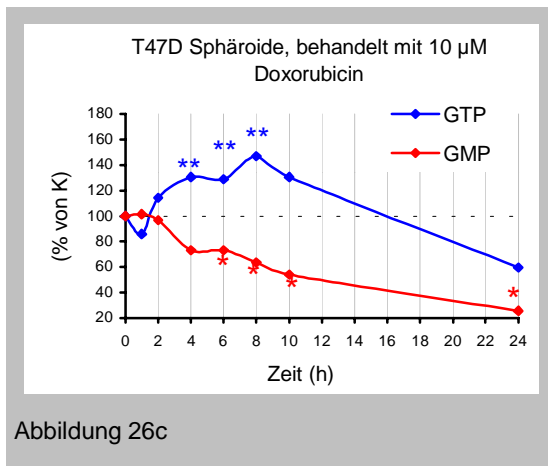


Abbildung 26: Nucleosidphosphate von mit 10 und 0,1 µM Doxorubicin behandelten T47D Sphäroiden in % von Kontrolle; 26a+b: Adenosinnucleosidphosphate; 26c+d: Guanosinnucleosidphosphate

#### e) Behandelte MCF-7adr Sphäroide

##### Absolutwerte

Bei beiden Versuchsgruppen wurde ein leichter Anstieg sowohl von ATP als auch von GMP/IMP sowie GTP gegenüber der Kontrolle beobachtet (Abb. 27). Die ATP Konzentrationen stiegen im Verlauf der Behandlung um 0,7 bis 1,0 µmol / g (Abb. 27a+b). Auch die ADP Konzentrationen zeigten zum selben Zeitpunkt Anstiege, diese betrug jedoch maximal nur 0,1 bis 0,3 µmol / g (Abb. 27c+d). Die AMP Konzentrationen der MCF-7adr Sphäroide waren so niedrig, teilweise unter 0,01 µmol / g, daß die Auflösungsgrenze der HPLC erreicht wurde (Daten nicht gezeigt). Die GTP Werte der mit 0,1 µM Doxorubicin behandelten Sphäroide überstiegen die Kontrollwerte um 0,3 µmol / g nach 1 h, auf die Inkubation mit 10 µM stiegen sie um ca. 1 µmol / g nach 2 h (Abb. 27e+f). Die GMP Konzentrationen zeigten keinen statistisch signifikant Anstieg (Abb. 27g+h). Die Energieladung der behandelten und unbehandelten MCF-7adr – Sphäroide änderte sich nicht wesentlich im Versuchszeitraum (Abb. 27i+j).

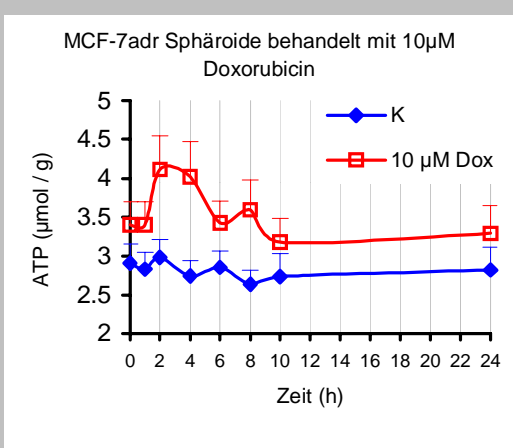


Abbildung 27a

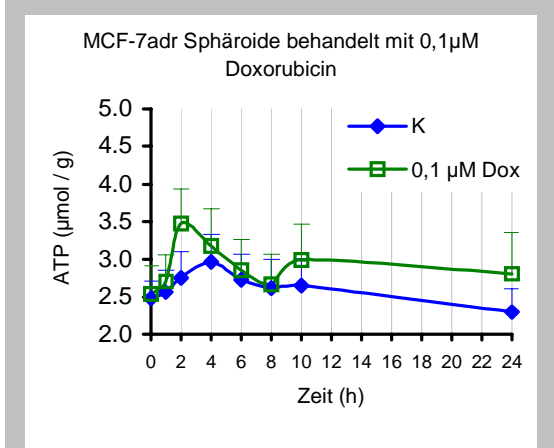


Abbildung 27b

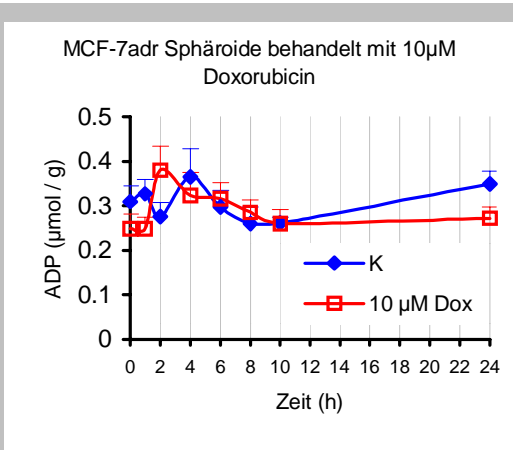


Abbildung 27c

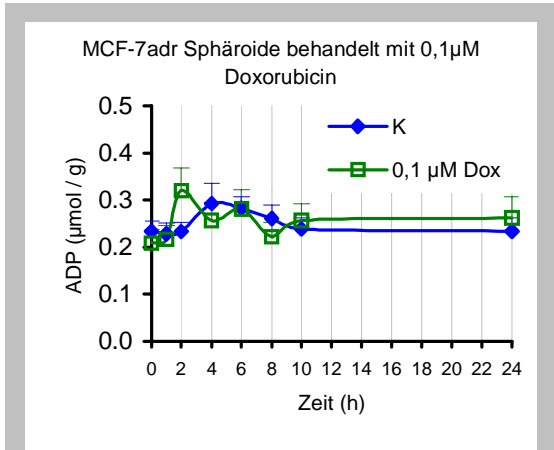


Abbildung 27d

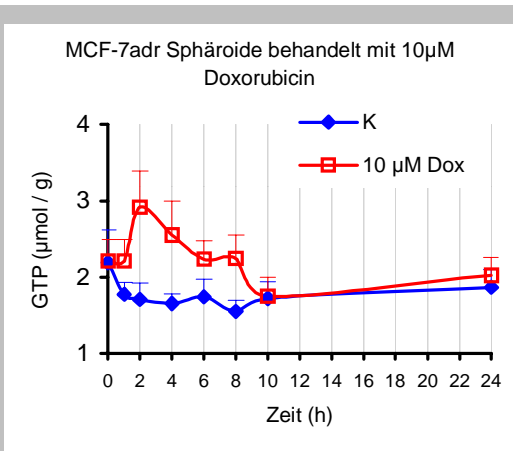


Abbildung 27e

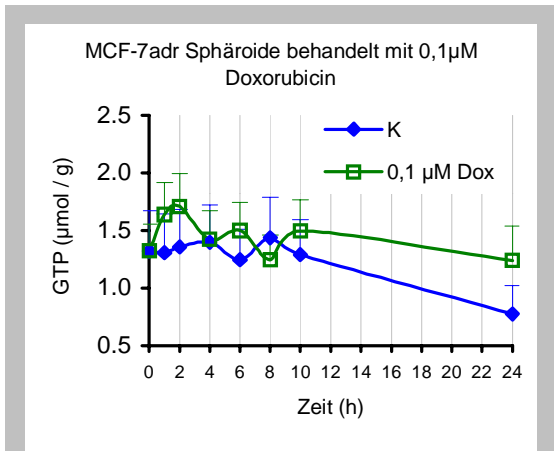


Abbildung 27f

Abbildung 27a-f: Absolutwerte ( $\mu\text{mol/g}$ ) der Nucleosidphosphatgehalte von MCF-7adr Sphäroiden, jeweils behandelt mit 10 bzw. 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin; 27a+b: ATP, 27c+d: ADP, 27e+f: GTP

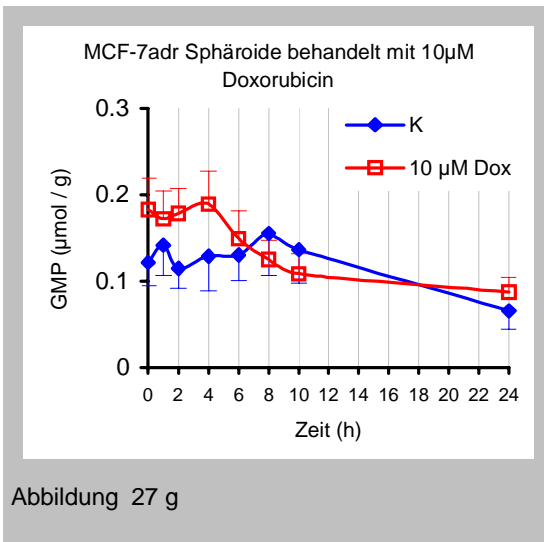


Abbildung 27 g

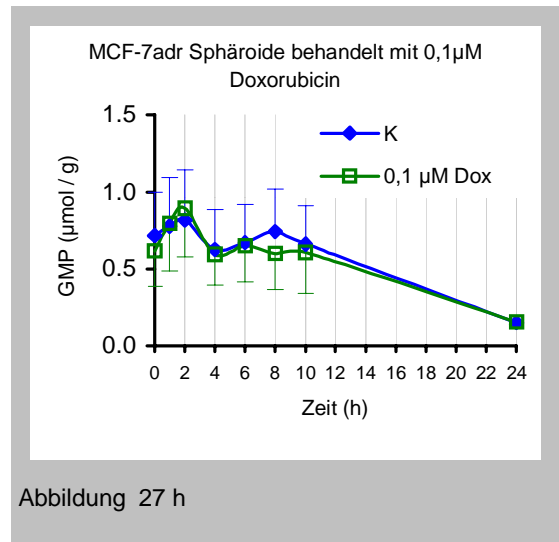


Abbildung 27 h

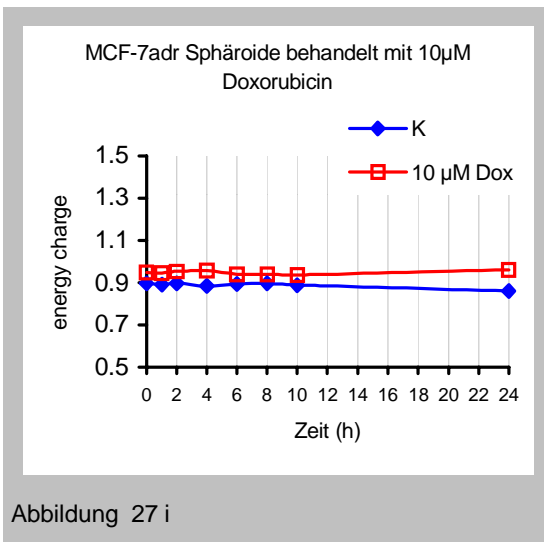


Abbildung 27 i

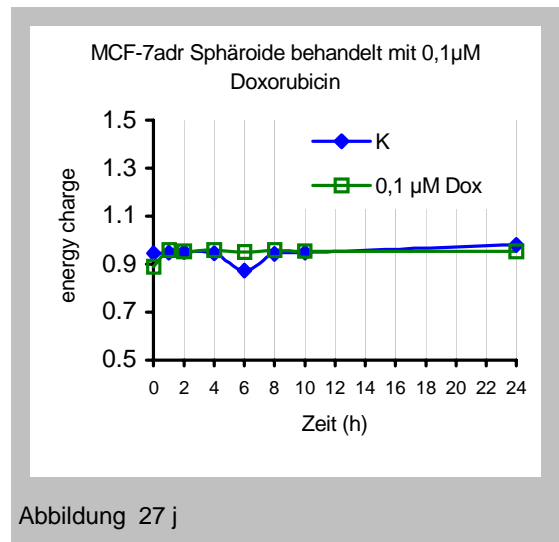


Abbildung 27 j

Abbildung 27 g-j: Absolutwerte ( $\mu$ mol / g) der Nukleosidphosphatgehalte von MCF-7adr Sphäroiden, jeweils behandelt mit 10 bzw. 0,1  $\mu$ M Doxorubicin; 27g+h: GMP, 27i+j: energy charge

### Relativwerte von MCF-7adr Sphäroiden

Nach 2stündiger Behandlung wurden erhöhte Gehalte an GMP, GTP sowie ADP und ATP beobachtet. Der Effekt war jedoch nicht deutlich dosisabhängig. Während die GTP Werte der mit der hohen Dosis behandelten Sphäroide über denen der anderen Versuchsgruppe lagen, war es bei den ATP Konzentrationen umgekehrt. Die ATP Werte zeigten im Verlauf der Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Doxorubicin leichte Anstiege um ca. 25 %, während ADP um 49 % anstieg, bei der Behandlung mit 10  $\mu$ M waren die Effekte etwas geringer (Abb. 28a+b). Die

AMP Werte sanken bei beiden Versuchsgruppen stark ab gegenüber ihren Kontrollen, waren aber wie bereits erwähnt nicht zuverlässig auswertbar.

Die Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte zu einem vorübergehenden Anstieg von GTP bereits 1 h nach Behandlungsbeginn um ca. 20 % gegenüber der Kontrolle, während GMP gleichzeitig um 45 % anstieg, nach 2stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  stiegen die GTP Werte um 34 %, die GMP / IMP Werte um 20 % (Abb. 28 c+d).

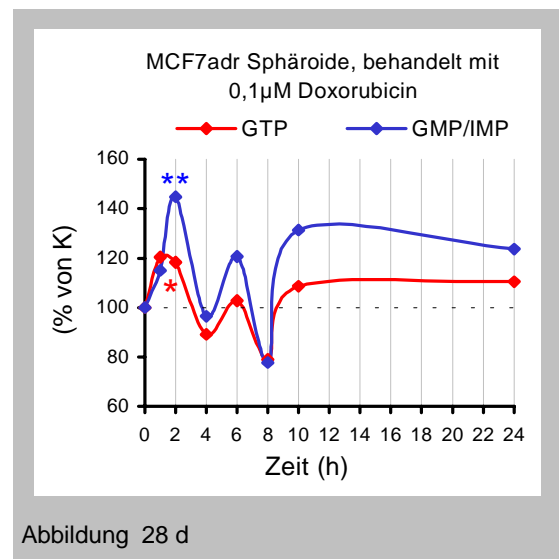
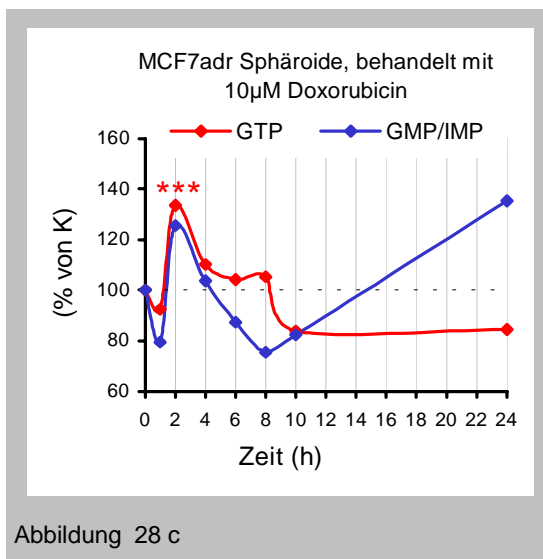
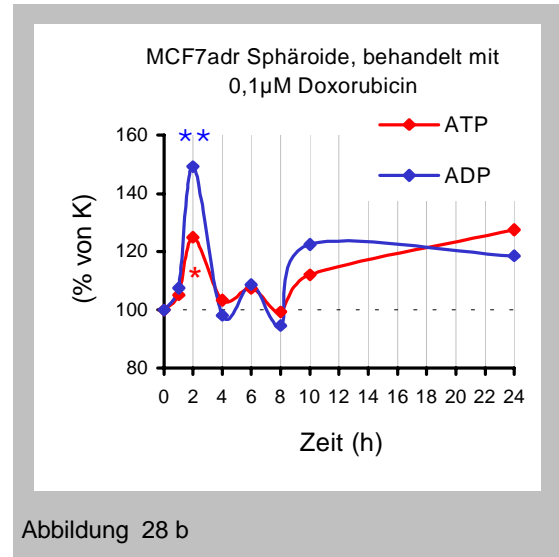
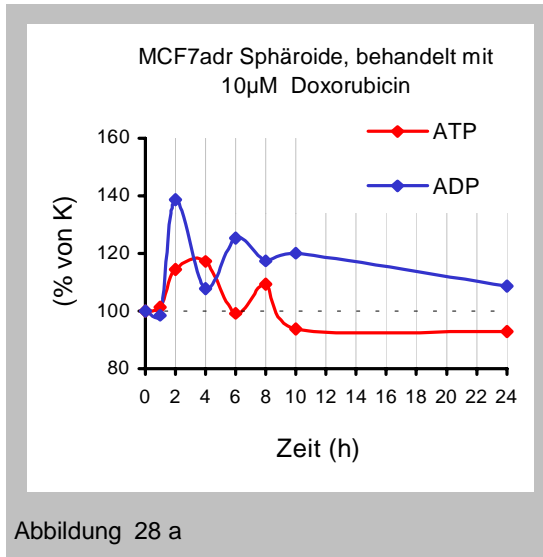


Abbildung 28: Nukleosidphosphatgehalte von mit 0,1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelten MCF-7adr Sphäroiden in % der unbehandelten Kontrollen; 28a+b: ATP und ADP, 28c+d: GTP und GMP

Während der mit Hilfe der HPLC gemessene Gehalt an ATP ( $\mu\text{mol} / \text{g}$ ) bei T47D Monolayern etwas höher war als bei Sphäroiden derselben Zelllinie, wurde bei MCF-7adr Zellen kein Unterschied beobachtet. Der GTP-Gehalt dagegen war bei beiden Zelllinien bei Monolayern etwas geringer als bei Sphäroiden. Bei T47D Zellen stiegen während der Behandlung mit der hohen Doxorubicindosis die GTP bzw. ATP Gehalte der Monolayer relativ zur unbehandelten Kontrolle deutlich stärker an, als bei den Sphäroiden (Abb. 29a). Bei der Inkubation mit der niedrigen Dosis war der Effekt eher umgekehrt: während hier die Monolayer fast keine Änderung zeigten, wurde bei den Sphäroiden ein vorübergehender Aufwärtstrend der GTP bzw. ATP Werte beobachtet (Abb. 29b). Die Unterschiede zwischen den Effekten bei Monolayern und Sphäroiden waren bei den MCF-7adr Zellen weniger stark ausgeprägt (Abb. 29c+d).

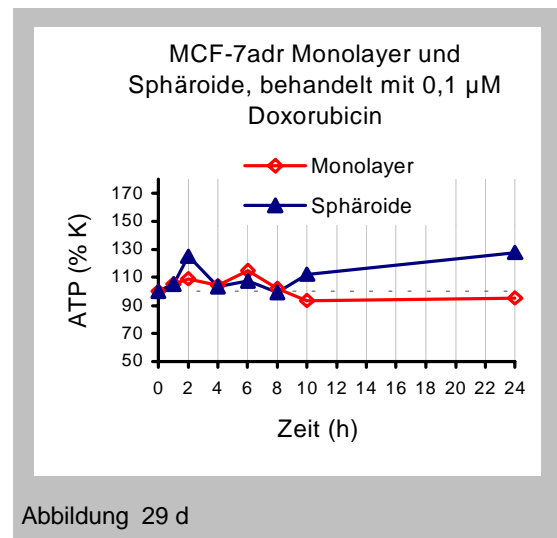
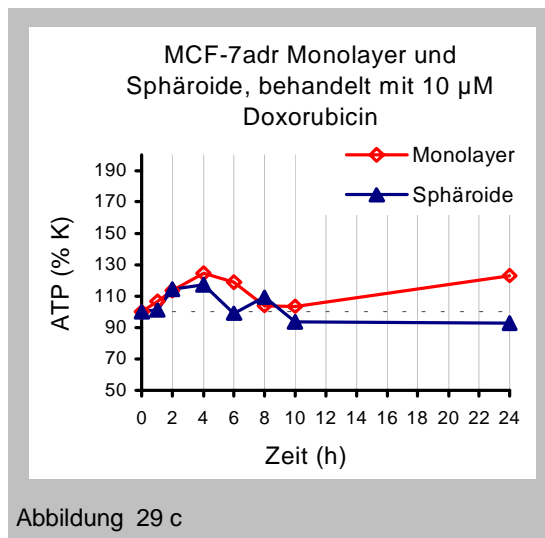
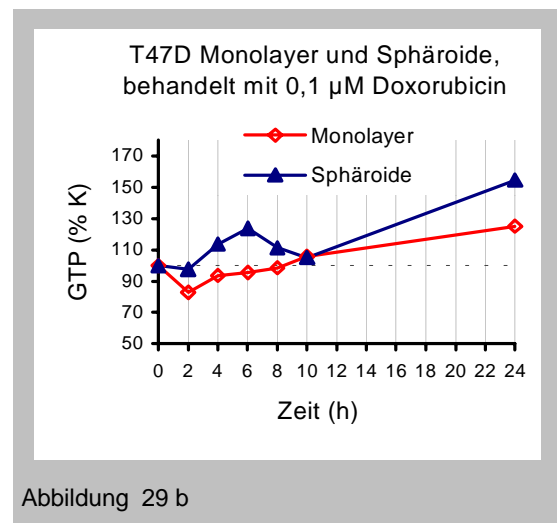
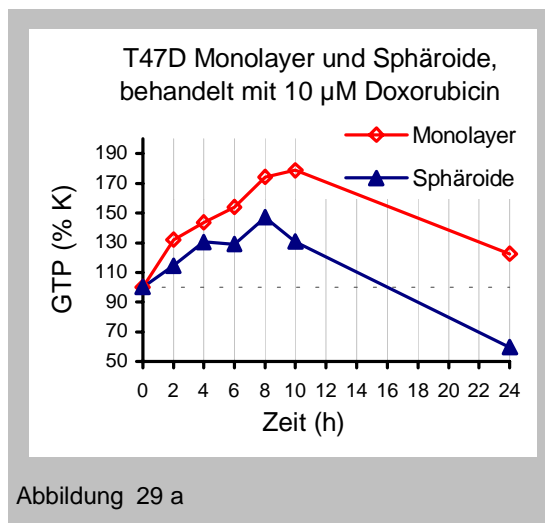


Abbildung 29: Unterschiedliche Effekte bei behandelten Monolayern und Sphäroiden von T47D bzw. MCF-7adr Zellen; 29a+b: T47D Zellen, 29c+d: MCF7adr Zellen

Um die unterschiedliche Dosisabhängigkeit von T47D Monolayern und Sphäroiden deutlicher darzustellen wurden die auf die jeweilige Kontrolle normierten Werte im Diagramm aufgetragen und eine lineare Trendlinie durch die Meßwerte gelegt (Abb. 30 a+b). Die Werte sind nur bis zum jeweiligen Maximum gezeigt. Sowohl bei den ATP als auch bei den GTP Werten ist gut erkennbar, daß die Monolayer wesentlich stärker dosisabhängig reagierten als die Sphäroide, bei denen für ATP keine und für GTP eine sehr schwache Dosisabhängigkeit zu beobachten ist. Die Reaktion auf die hohe Dosis war bei den Sphäroiden geringer als bei den Monolayern, bei der niedrigen Dosis war es umgekehrt.

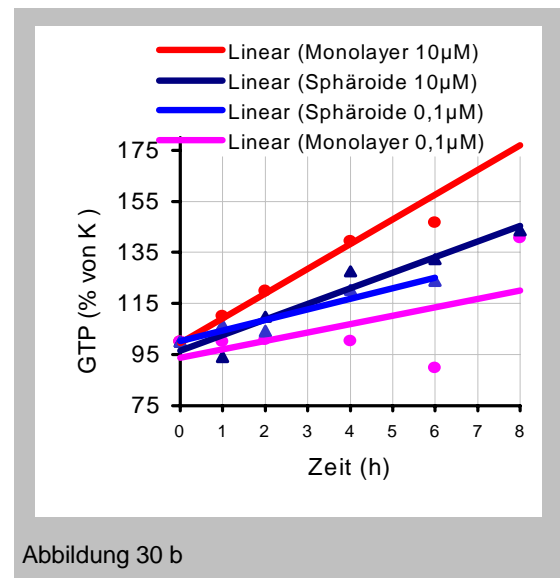
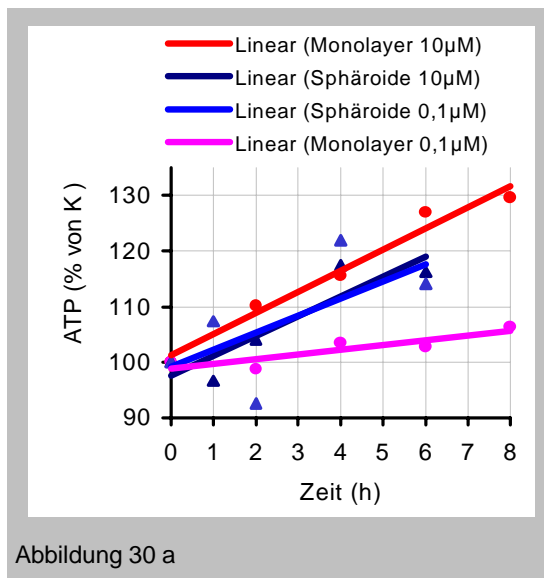


Abbildung 30: Dosisabhängigkeit des Nucleotidanstiegs bei T47D Monolayern und Sphäroiden während der Behandlung mit Doxorubicin; 30a: ATP, 30b: GTP

Tabelle 5 Tabellarische Auflistung der Maxima von Purinnukleosidphosphat – Konzentrationen in % von Kontrolle nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin. Hinter den Werten steht jeweils die Zeit des/der Maximums/Maxima nach Behandlungsbeginn (h).

<b>10 µM</b>	<b>AMP</b>	<b>ADP</b>	<b>ATP</b>	<b>GMP/IMP</b>	<b>GTP</b>
T47D	10 6h	20* 4h	30*** 6-10h	70 4h	32 - 78** 2 - 10h
MCF-7w	78* 1- 2h	-	12 6h	-	24** - 33* 4 - 6h
MCF-7adr	19 + 80 4 + 24h	43 24h	25* + 23* 4 + 24h	-	30** 4-6h
MCF-7mdr	33 24h	22* 6h	13 + 19 1 + 8h	28* 8h	30 - 44*** 8h
T47D Sphäroide	37 2h	10 2h	14 6h	-	30 - 47*** 4 - 10h
MCF-7adr Sphäroide	-	39 + 20 2 + 6-10h	15 - 17 2 - 4h	25 2h	34*** 2h

Tabelle 6 Anstiege von Purinnukleotidphosphaten nach Behandlung mit 0,1 µM Doxorubicin in % von Kontrolle. Hinter den Werten steht jeweils die Zeit des Maximums nach Behandlungsbeginn (h).

<b>0,1 µM</b>	<b>AMP</b>	<b>ADP</b>	<b>ATP</b>	<b>GMP/IMP</b>	<b>GTP</b>
T47D	12 + 13 2 + 24h	27 24h	38 24h	44 24h	25* 24h
MCF-7w	167 - 100 1 - 24h	33 2h	26 1-2h	20 2h	19*** 1h
MCF-7adr	70* 24h	30 24h	15 6h	30 8h	25 - 12* 4 - 24h
MCF-7mdr	32 + 128 2 + 24h	43 + 11 2+24h	52 + 64 2h + 10h	-	-
T47D Sphäroide	28 4h	18* 8h	32 6h	-	24* 6h
MCF-7adr Sphäroide	-	49** 2h	25** 2h	45* 2h	20* 1h



##### a) Monolayer

Die Konzentrationen der Nukleosidphosphate unbehandelter Zellen waren abhängig von der Zelldichte in den Petrischalen bzw. der Größe der Sphäroide und der jeweiligen Population. Dennoch lagen die durchschnittlichen Meßwerte der einzelnen Metaboliten bei den verschiedenen Zelllinien im allgemeinen nahe beieinander. Lediglich die Triphosphate der T47D Zellen und die Mono- und Diphosphate der MCF-7mdr Zellen waren gegenüber den anderen Zelllinien deutlich erhöht. Die Meßwerte aller Zelllinien streuten um bis zu ca. 20 % des Startwertes, für ATP waren das ca. 2 fmol / Zelle. Während der Behandlungszeit von 10 bis 24 h sanken die ADP, ATP und GTP Werte der T47D Zellen ab, was bei den anderen Zelllinien nicht oder nur sehr schwach zu beobachten war.

Der auffälligste Behandlungseffekt bei 10 µM war der starke, lang anhaltende Anstieg von GMP und GTP bei T47D Zellen, der bei den MCF-7 Zelllinien wesentlich geringer und von kürzerer Dauer war. Sensitive und resistente Klone innerhalb der MCF-7 Linie unterschieden sich dabei nicht deutlich (Abb. 31 a). Die Behandlung mit der niedrigen Dosis führte bei den MCF-7 Zelllinien zu etwas geringeren Anstiegen der GTP Werte, während die GMP / IMP Konzentrationen deutlich höher lagen. Auch bei dieser Dosis zeigten die resistenten und sensitiven Zelllinien ein ähnliches Verhalten. Bei den T47D Zellen wurde in Reaktion auf die niedrige Dosis kein Anstieg von GTP beobachtet (Abb. 31 b.). Der Dosiseffekt war bei der letztgenannten Zelllinie also wesentlich deutlicher ausgeprägt, als bei den MCF-7 Zelllinien.

Die ATP Konzentrationen aller untersuchten Zelllinien stiegen vorübergehend in Reaktion auf 10 µM Doxorubicin an, wobei T47D Zellen den höchsten und längsten Anstieg zeigten, der bis zum Ende des Versuches nach 24 h bestehen blieb (Abb. 31 c). Die Werte der MCF-7 Zelllinien waren nur geringfügig über 2 bis 4 h erhöht, wobei die MCF-7mdr Zellen jedoch ein zusätzliches höheres Maximum bei 8 h aufwiesen. Während die Adenosinnukleosidtriphosphate der T47D Zellen auf die niedrige Doxorubicindosis kaum reagierten, zeigten MCF-7wildtyp Zellen einen ähnlichen Anstieg wie nach Behandlung mit der hohen Dosis und MCF-7mdr Zellen wesentlich höhere Werte (Abb. 31 d). Wie nach der Inkubation mit 10 µM wurde auch nach Gabe der niedrigen Dosis ein doppelter Peak bei den MCF-7mdr Zellen beobachtet. Ein ähnliches Verhalten wurde mit geringeren Maxima auch bei MCF-7wildtyp Zellen beobachtet, und selbst bei der ausgesprochen schwachen Reaktion der MCF-7adr Zellen war der Kurvenverlauf ähnlich.

Auch die ADP Konzentrationen der T47D Zellen blieben länger erhöht, als die der MCF-7 Zelllinien, jedoch waren die Reaktionen dieses Metaboliten aller Zelllinien auf die hohe Dosis gering. Die niedrige Dosis führte bei MCF-7wildtyp und MCF-7mdr Zellen nach 2h vorübergehend zu höheren ADP Konzentrationen. Die AMP Konzentrationen waren nur bei MCF-7wildtyp Zellen, in Reaktion auf beiden Doxorubicinkonzentrationen in ähnlicher Weise, auffällig erhöht, die anderen Zelllinien zeigten geringe oder keine Abweichungen von der Kontrolle (nicht gezeigt).

Besonders nach Applikation der geringen Dosis wurden relative Anstiege der Meßwerte gegenüber der Kontrolle nach 24 h beobachtet. Dieser Effekt war bei T47D Zellen besonders ausgeprägt und trat hauptsächlich infolge der zum Versuchsende hin sinkenden Werte der Kontrollen auf. Anhand der Absolutwerte ist erkennbar, daß die Werte der behandelten Zellen teilweise weniger stark absanken, als die unbehandelten Kontrollen.

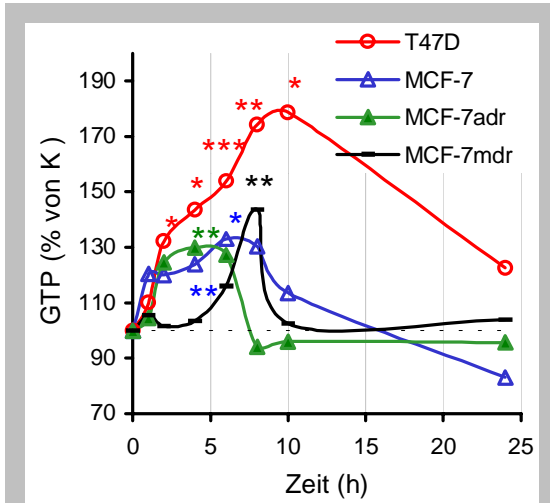


Abbildung 31 a

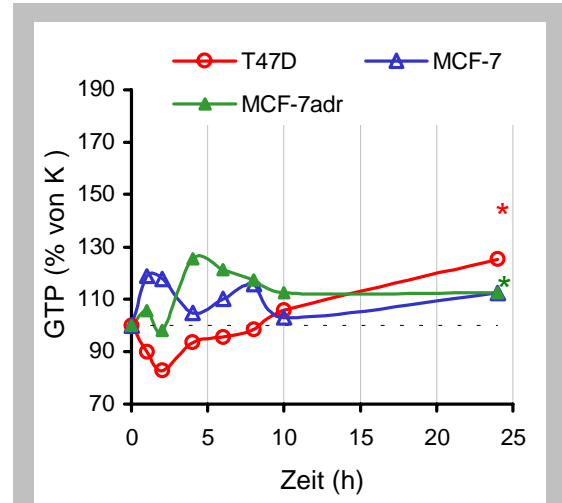


Abbildung 31 b

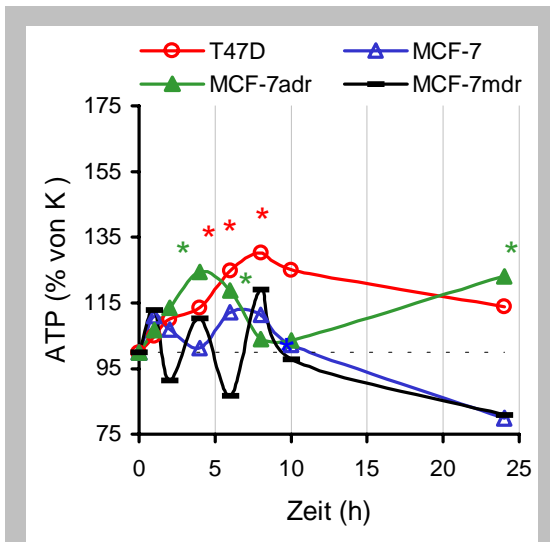


Abbildung 31 c

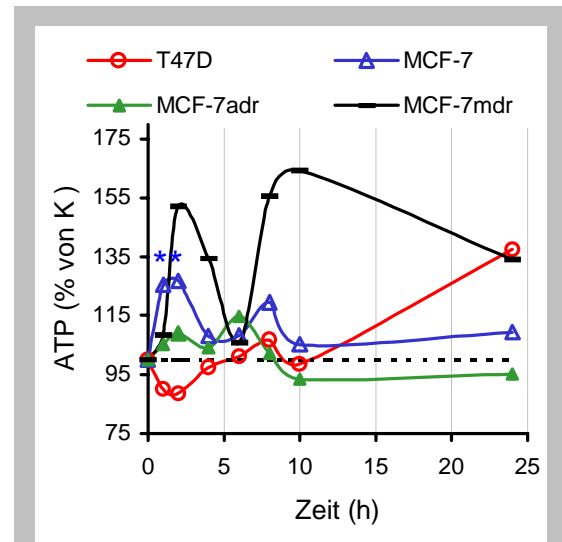


Abbildung 31 d

Abbildung 31: Purinnukleotidgehalte der verwendeten Zelllinien im Vergleich; 31a: GTP bei Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin; 31b: GTP bei Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$ ; 31c: ATP bei Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ ; 31d: ATP bei Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$

## b) Sphäroide

Wie bei den Monolayern, so war auch bei den Sphäroiden mit Streuungen um ca. 20 % des Startwertes im Versuchsverlauf zu rechnen, die nicht auf eine Behandlung zurückgeführt werden konnten. Zusätzlich wurden bei den Sphäroiden leichte Anstiege aller Nucleosidphosphate gemessen, die eine Folge des Zellwachstums darstellen. Es kam jedoch außerdem zu starken Anstiegen der Nucleosidmono- und diphosphate, wobei die Guanosinphosphate besonders bei den T47D Sphäroiden anstiegen, während die Adenosinphosphate bei T47D und ADR Zellen ähnliche Werte zeigten (Abb. 32a+b). Die Übereinstimmung der Ergebnisse von verschiedenen Experimenten und Zelllinien waren so deutlich, daß die physiologischen Bedingungen im Versuchszeitraum als Ursache dieser Effekte angesehen werden müssen. Die "energy charge" der Zellen änderte sich bis zu 24 h jedoch nicht wesentlich.

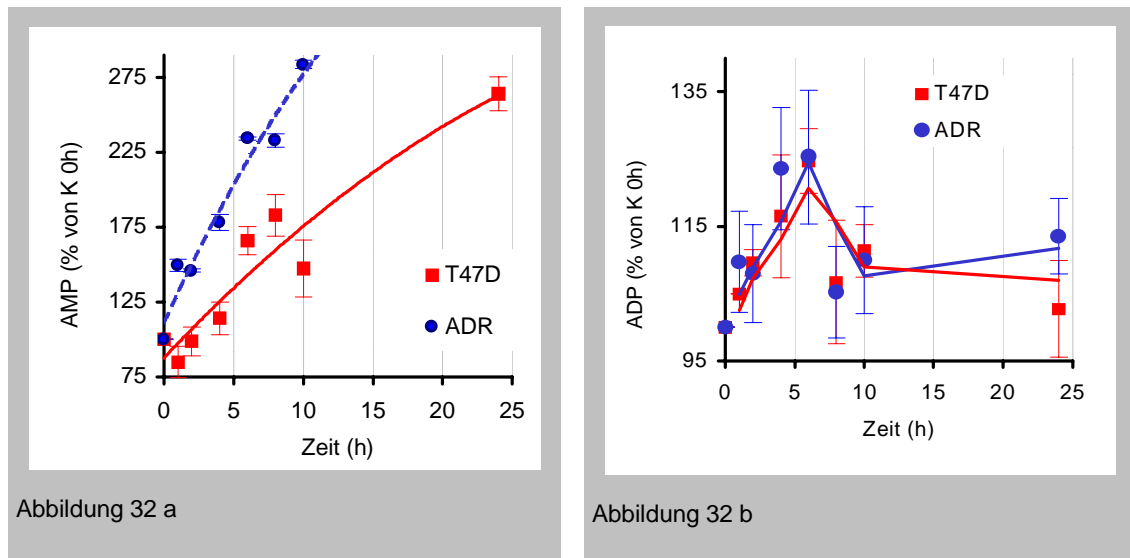


Abbildung 32: AMP und ADP Konzentrationen von unbehandelten T47D und MCF-7adr Sphäroiden; 32a: AMP Werte, 32 b: ADP Werte

Alle gemessenen Substanzen außer AMP stiegen bei den MCF-7adr Sphäroiden infolge der Behandlung nach 1 bis 2 h an, die Werte blieben ein bis zwei Stunden erhöht, dann fielen sie wieder ab. Bei den T47D Sphäroiden dagegen stiegen die Meßerte erst nach 6 bis 8 h etwas länger anhaltend an. Dem Anstieg der Adenosindi- und -triphosphate ging hier ein vorübergehender Anstieg der Monophosphate voraus, der bei MCF-7adr Zellen nicht beobachtet wurde. Die deutlichsten Effekte zeigten bei beiden Zelllinien die GTP Konzentrationen. Die Konzentrationen erhöhten sich bei MCF-7adr Zellen um ca. 20 – 35 %,

die T47D Zellen reagierten ähnlich auf die niedrige Dosis, jedoch wesentlich stärker und länger anhaltend auf die hohe. Ein Anstieg der GMP Werte wurde nur bei MCF-7adr Sphäroiden beobachtet. Bei beiden Zelllinien stiegen die ATP Werte infolge der Behandlung mit der niedrigen Dosis höher als nach Behandlung mit der hohen, während es bei den GTP Konzentrationen umgekehrt war (Abb. 33 a und b).

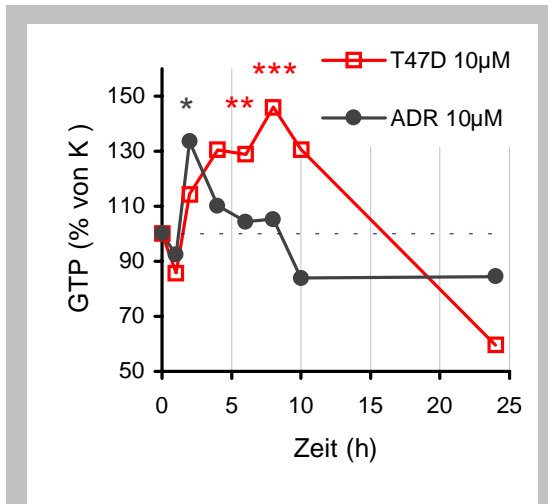


Abbildung 33 a

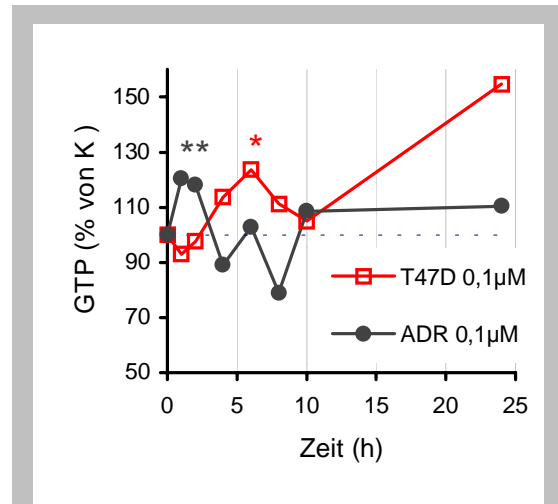


Abbildung 33 b

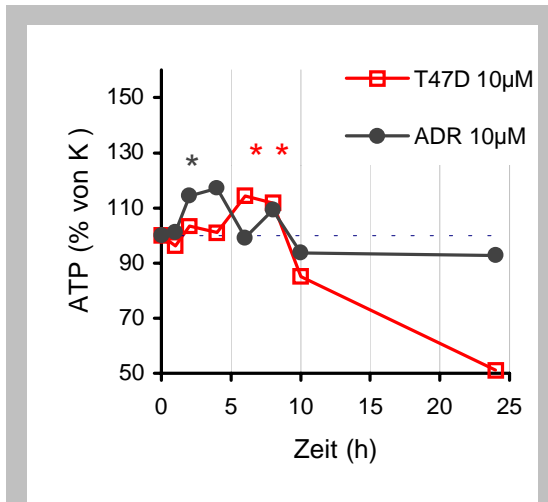


Abbildung 33 c

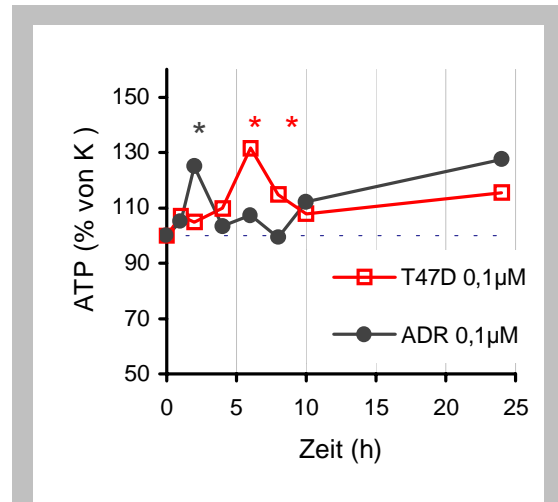


Abbildung 33 d

Abbildung 33: Vergleich der Nukleotidgehalte von T47D und MCF-7adr Sphäroiden (% K) im Verlauf einer 24stündigen Behandlung mit jeweils 10 oder 0,1 µM Doxorubicin; 33a+b: GTP; 33c+d: ATP

Durch die Untersuchungen mit Hilfe der Biolumineszenz sollte mit einer weiteren Methode der Anstieg von ATP bei T47D Zellen als Reaktion auf die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin dargestellt werden. Die Biolumineszenz bietet den Vorteil, daß keine oder nur äußerst geringe Verluste des zu untersuchenden Metaboliten während der Experimente entstehen. Dennoch zeigt Abb. 34 daß die mit Hilfe der Biolumineszenz gemessenen Absolutwerte von T47D Sphäroiden viel niedriger waren, als die Ergebnisse der HPLC – Messungen, was auf die Messung in unterschiedlichen Gewebekompartimenten bei beiden Methoden zurückgeführt werden kann. Der gemessene Anstieg von ATP von 0 bis 6 h beträgt jedoch bei beiden Methoden übereinstimmend maximal 0,6  $\mu\text{mol} / \text{g}$ .

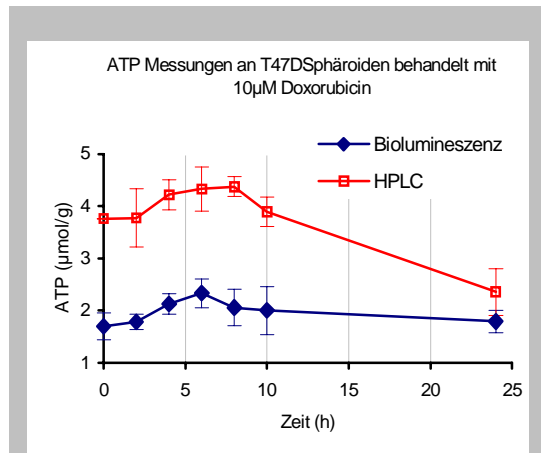


Abbildung 34: Vergleich der ATP Konzentrationen ( $\mu\text{mol} / \text{g}$ ) in behandelten T47D Sphäroiden gemessen mit HPLC und Biolumineszenz

#### 4.2.3 NMR-Messungen an Monolayern von MCF-7 und MCF-7adr Zellen und MCF-7wildtyp Sphäroiden

Die von Neeman (1990) und Dahan-Grobgeld (1997) durchgeführten Versuche mit auf Microbeads gewachsenen Monolayern und mit Sphäroiden wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Degani in Israel fortgeführt. Es wurden MCF-7wildtyp und MCF-7adr Monolayer sowie MCF-7wildtyp Sphäroide für die Experimente verwendet. Abb. 35a zeigt gamma-NTP Intensitäten (Nukleosiddi- und triphosphate) von MCF-7wildtyp Monolayern, die 3 h nach Beginn der Messungen mit 1,0  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelt wurden. Es wurde kein deutlicher Anstieg von NTP nach der Applikation des Medikaments beobachtet. Die Steigung der Geraden durch die Meßwerte im Zeitraum vor der Behandlung war wesentlich größer (7,98) als in den folgenden 4 oder 7 h (4,3 bzw. 4,9). Deutlich erkennbar war das Ansteigen der Intensitäten aufgrund der Zellvermehrung innerhalb der ersten 10 h, danach folgte eine kurze Plateauphase mit anschließendem leichten Abfall der Werte. Die in Abb. 35b dargestellten Werte von MCF-7adr Monolayern zeigten ebenfalls keine erhöhten NTP-Intensitäten während der Behandlung ab 7 h nach Beginn der Datenaquisition. Die Steigung der Geraden durch die Meßwerte vor der Behandlung betrug 1,95, während sie 4 oder 7 h nach der Zugabe von Doxorubicin auf 0,49 bzw. 0,47 vermindert war. Die Resistenz der MCF-7adr Zellen zeigte sich darin, daß kein Abfall der Intensitäten nach der Behandlung erkennbar war. Bei den MCF-7wildtyp Sphäroiden wurde das Medikament in der Dosierung von 10  $\mu\text{M}$  erst 24 h nach Beginn der Messungen appliziert, um in der Plateauphase der wachstumsbedingten Steigerung der Signale zu messen und so

Änderungen deutlicher zu erkennen (Abb. 35c). Im Verlauf einer 10stündigen Inkubation war ein leichter Aufwärtstrend der Signalstärke zu erkennen, der vermutlich auf die Behandlung zurückgeführt werden kann. Im weiteren Behandlungsverlauf sanken die Werte aufgrund des Zellsterbens deutlich ab.

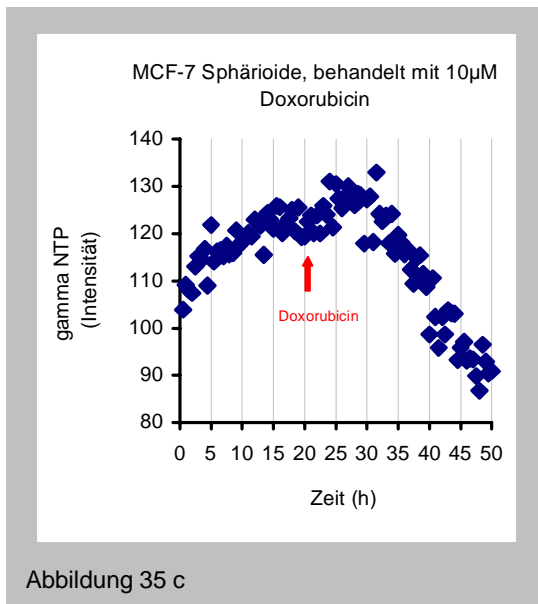
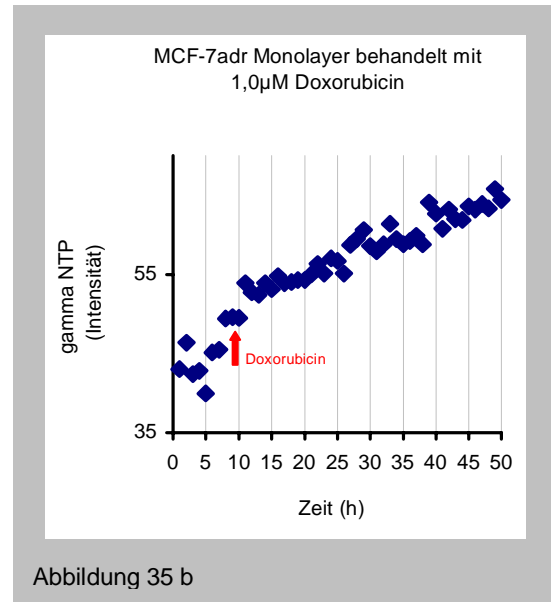
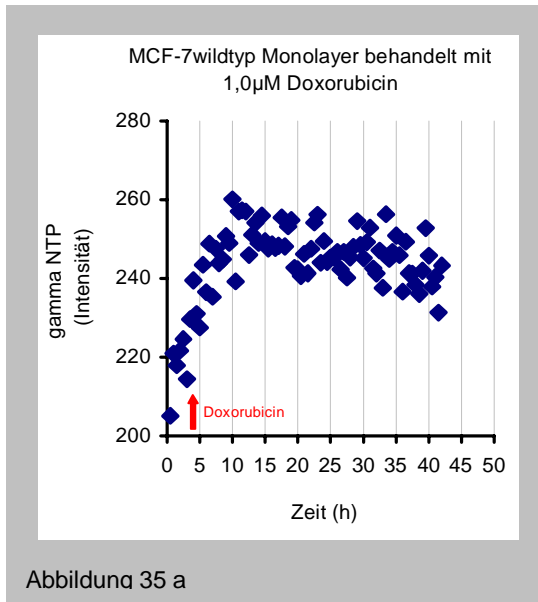


Abbildung 35: NMR Messungen an MCF-7 Monolayern und Sphäroiden, dargestellt sind die Intensitäten der gamma-NTP Signale im Zeitverlauf. Die Zellen wurden mit 10 bzw. 1,0 μM Doxorubicin behandelt; 34a+b: MCF-7 Monolayer behandelt mit 1,0 μM Doxorubicin, 35a: MCF-7wildtyp, 35b: MCF-7adr; 35c: MCF-7wildtyp Sphäroide behandelt mit 10 μM Doxorubicin

### 4.3 Untersuchungen zu Mechanismen der doxorubicininduzierten Stoffwechseländerungen

#### 4.3.1 Behandlung von T47D Monolayern mit Oligomycin und Doxorubicin (HPLC)

Die Behandlung mit Oligomycin bewirkt eine Inhibition der mitochondrialen ATPase und damit eine Entkopplung der Atmungskette (Wilson et al. 1986), d.h. die Elektronen der Reduktionsäquivalente können nicht mehr für die oxidative Phosphorylierung von ATP genutzt werden. Das nach der Behandlung noch synthetisierte ATP stammt höchstwahrscheinlich aus der Glykolyse.

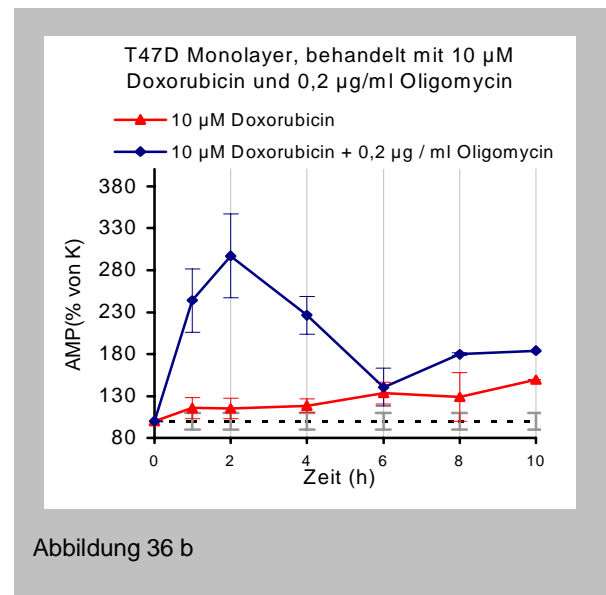
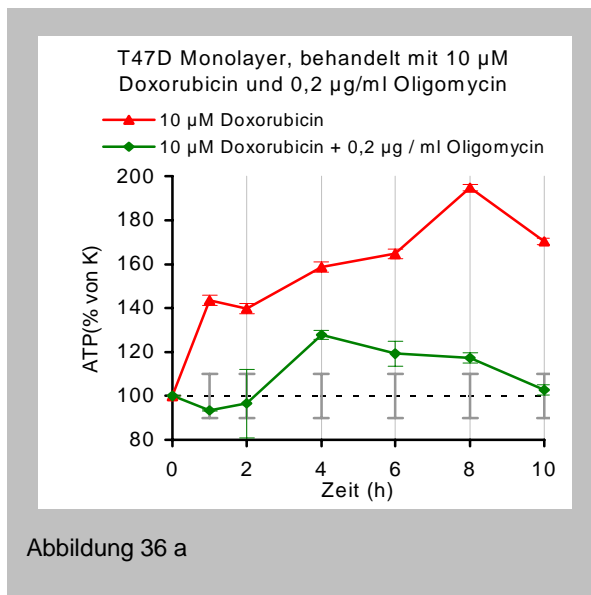


Abbildung 36: Adenosinnukleosidphosphatgehalte von T47D Monolayern, die für 10 h mit 10 µM Doxorubicin allein oder zusätzlich mit 0,2 µg/ml Oligomycin behandelt wurden; 36a: ATP, 36b: AMP

Nach der zusätzlichen Behandlung von T47D Monolayern mit 0,2 µg / ml Oligomycin und 10 µM Doxorubicin konnte der für die Behandlung mit Doxorubicin gezeigte ATP oder GTP Anstieg nicht mehr nachgewiesen werden, die Meßwerte lagen leicht unter den Werten der unbehandelten Kontrolle (Abb. 36a). Die Konzentrationen von ADP und AMP hingegen stiegen vorübergehend weit über die Werte der Kontrolle und der mit Doxorubicin behandelten Zellen an (Abb. 36b). Die Ergebnisse zeigen, daß die Energie für die stimulierte Phosphorylierung der Nucleotidtriphosphate hauptsächlich auf oxidativem Wege gewonnen wird. Daraus folgt auch, daß Doxorubicin selbst die Atmung bei diesen Zellen nicht oder zumindest nicht vollständig entkoppelt. Außerdem kam es durch die Behandlung mit Oligomycin zu einem massiven Anstieg der Adenosinnukleosidmono- und diphosphate, die aufgrund der inhibierten Atmung

nicht phosphoryliert werden konnten. Vermutlich waren sie die Vorstufen der stark erhöhten ATP Konzentrationen, die auf die Behandlung mit reinem Doxorubicin folgten.

#### 4.3.2 ATP- und Laktatmessungen an T47D Sphäroiden (Biolumineszenz)

Die Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen zeigen, daß ATP und Laktat gleichzeitig vorübergehend anstiegen (Abb. 37). Dies könnte eine Stimulation der Glykolyse unter diesen Bedingungen widerspiegeln. Für die Messung wurden Parallelschnitte derselben Sphäroide jeweils für ATP und Laktatbestimmungen verwendet. Die Absolutwerte von ATP lagen zwischen 1 und 1,9  $\mu\text{mol/g}$ , die Laktatwerte zwischen 0,5 und 1,3  $\mu\text{mol/g}$ . Der vorübergehende Anstieg der Meßwerte mit einem Maximum nach 8stündiger Inkubation betrug für ATP ca. 0,7  $\mu\text{mol/g}$  und für Laktat ca. 0,3  $\mu\text{mol/g}$ . Relativ zu den Werten unbehandelter Sphäroide zum Versuchsbeginn stieg der Laktatgehalt wesentlich stärker an, als der Gehalt an ATP.

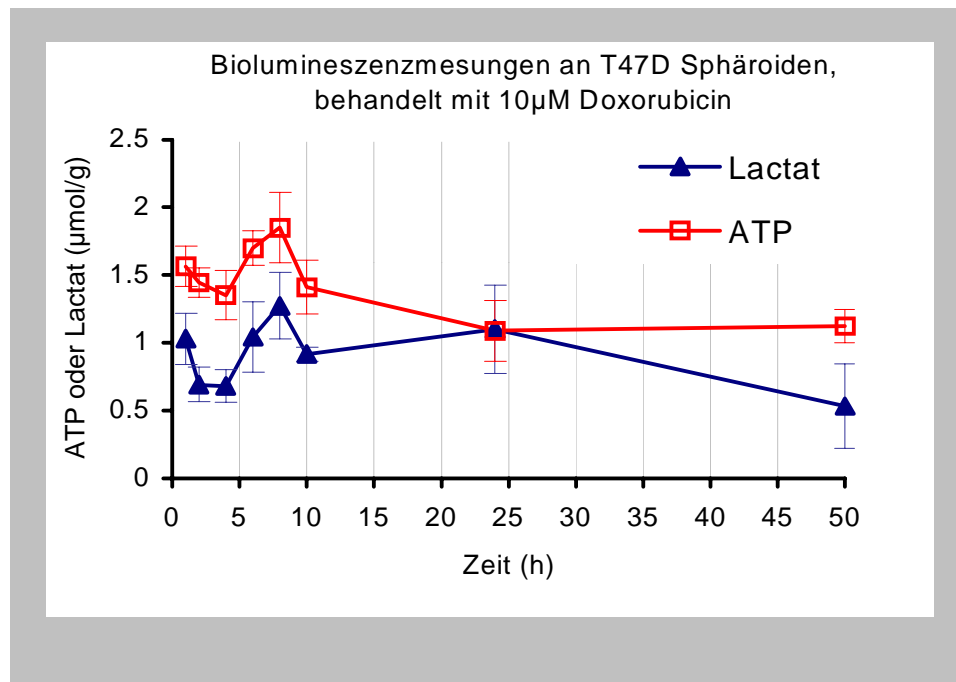


Abbildung 37: ATP und Laktatgehalte von mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelten T47D Sphäroiden im Verlauf einer 50stündigen Behandlung

#### 4.3.3 Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden

Der deutliche Anstieg von ATP nach der Behandlung von T47D Zellen mit hochdosiertem Doxorubicin kann einerseits auf der Phosphorylierung bereits vorhandener Vorstufen beruhen,



andererseits besteht die Möglichkeit, daß auch die Vorstufen AMP und ADP vermehrt auftreten, sei es durch eine *de novo* Synthese oder durch ein Recycling über die "Salvage Pathways". Die unveränderte "energy charge" im Behandlungszeitraum und der massive Anstieg von AMP nach der zusätzlichen Behandlung mit Oligomycin weisen im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen auf einen Anstieg aller Adeninnukleotide hin. Abb 38. zeigt zusammenfassend die auf die jeweiligen Kontrollen bezogenen Ergebnisse der AMP, ADP und ATP Konzentrationen aller Experimente mit T47D Zellen nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin. Alle gemessenen Adeninnukleotide stiegen innerhalb der ersten 6 h nach Behandlungsbeginn. ADP sank dann langsam wieder ab, während AMP und ATP noch länger erhöht blieben. Nach 8 h nahmen auch die AMP Konzentrationen ab, ATP blieb bis zu 24 h gegenüber der Kontrolle erhöht. Gegenüber dem Startwert nahmen jedoch alle drei Konzentrationen nach 10 h ab, die Werte der Kontrolle sanken dabei stärker als die der behandelten Zellen. Die Steigerung der GTP Werte ging bei Monolayern ebenfalls mit einer Erhöhung der GMP Konzentrationen einher (s. Kapitel 4.2.1.2 b).

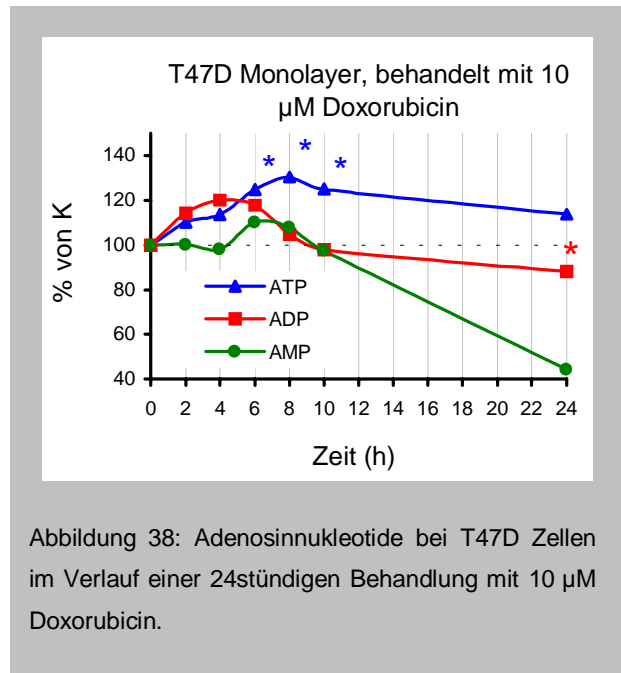


Abbildung 38: Adenosinnukleotide bei T47D Zellen im Verlauf einer 24stündigen Behandlung mit 10 µM Doxorubicin.

#### 4.4 Abbildende Biolumineszenz an T47D Sphäroiden nach Behandlung mit 10 µM Doxorubicin (bildgebende Darstellung)

Biolumineszenzmessungen können die räumliche Verteilung von ATP und Laktatkonzentrationen im Gefrierschnitt darstellen, wobei ATPfreie oder -arme Bereiche auf Nekrosen hinweisen. Die Untersuchungen zielten auf eine Darstellung lokaler Anstiege der Laktat- und ATP Konzentrationen mit nachfolgender Zellschädigung innerhalb eines Sphäroids während der Behandlung mit Doxorubicin. Sollte das Medikament beispielsweise bevorzugt auf den zentralen Bereich des Zellaggregats wirken, in dem bei größeren Sphäroiden auch die natürliche Nekrose entsteht, könnte der vorübergehende Anstieg der Metabolite in diesem Bereich mit Hilfe der Biolumineszenz gegenüber den Nachbarregionen dargestellt werden, sofern der beobachtete Effekt in Zusammenhang mit dem Zelltod steht. Außerdem könnte im weiteren Inkubationszeitraum die Ausdehnung der zentralen Nekrose anhand der ATP Verteilungen verfolgt werden. In ähnlicher Weise könnte die Wirkung des Chemotherapeutikums auf die Tumorzellen dargestellt werden, wenn sie bevorzugt in den

äußeren Randbereichen einsetzt und das Sphäroid äquivalent einer Tumorregression im Behandlungsverlauf kleiner wird.

Abb. 39 zeigt H&E- sowie TUNEL-gefärbte Gefrierschnitte von T47D Sphäroiden ohne Zentralnekrose mit einem Durchmesser von ca. 500  $\mu\text{M}$  in 100facher Vergrößerung, im Verlauf einer 50stündigen Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin. Parallel dazu sind Biolumineszenzbilder von ATP Verteilungen der jeweiligen Behandlungszeitpunkte dargestellt. Die weiße Umrandung entspricht dem Umfang des untersuchten Gefrierschnittes unmittelbar vor der Messung. Das unbehandelte Sphäroid in Abb. 39a hat einen ATP-Gehalt von 1,2 bis ca. 3 mM (Abb. 39b). Nach 8stündiger Behandlung ist der ATP-Gehalt auf 1,5 bis >4 gestiegen (Abb. 39c), während das histologische Bild erste Lücken in den äußeren Randregionen des Sphäroids zeigt. Zum Vergleich der Biolumineszenzbilder wurde für alle Abbildungen dieselbe Farbskalierung gewählt. Eine individuelle Auswertung der Bilder führt zu einer besser aufgelösten Darstellung der ATP-Verteilungen, da die hohen Werte differenzierter dargestellt werden können. Der ATP-Anstieg erfolgte jedoch nicht auf einzelne Sphäroidareale begrenzt, sondern über den gesamten Querschnitt relativ gleichmäßig verteilt. Es wurde kein Gradient zu den äußeren Bereichen des Zellaggregats hin beobachtet, in denen die Zellschäden zuerst erkennbar waren. Im weiteren Inkubationszeitraum bis zu 24 h bildeten sich infolge der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin Lücken im Zellverband über den Sphäroidquerschnitt verteilt, die im Versuchsverlauf größer und häufiger wurden (Abb. 39e) und letztendlich, nach 48stündiger Inkubation zur Auflösung des Zellaggregats führten (Abb. 39g). In Abb. 39e sind die dunkelbraun bis schwarz erscheinenden TUNEL-Färbungen und Verteilungen von Apoptosen gut erkennbar; meistens sind einzelne oder wenige benachbarte Zellen betroffen. Wie bereits in Kap. 4.1.4 beschrieben gab es keinen Hinweis auf ein massives Auftreten von Apoptosen im äußeren Randbereich der Sphäroide oder eine Induktion bzw. Vergrößerung der Zentralnekrose. Der ATP-Gehalt sank nach 24stündiger Behandlung wieder auf die Werte un behandelter Sphäroide ab (Abb. 39f) und nahm kontinuierlich weiter ab. Nach 48stündiger Behandlung wurden noch ATP-Restgehalte von maximal 1,6 mM vorwiegend im Zentrum des Zellaggregats beobachtet.

Da die über den Querschnitt der Zellaggregate verteilt auftretenden Apoptosen jeweils nur einzelne oder sehr wenige Zellen betrafen, folgte ein dem Zelltod vorausgehender Anstieg von ATP oder Laktat demselben Verteilungsmuster. Die räumliche Auflösung einzelner Zellen ist jedoch mit dem für die Biolumineszenzmessungen verwendeten Kamerasystem Argus 100 nicht möglich. Die erhöhten ATP oder Laktatkonzentrationen erschienen daher in gleichmäßiger Verteilung über den gesamten Sphäroidquerschnitt. Sobald histologisch größere Lücken im Zellverband erkennbar waren, konnten diese teilweise mit Hilfe der Biolumineszenz dargestellt werden, fortgeschrittene Stadien der Desintegration waren deutlich erkennbar. Die Laktatverteilungen in den behandelten Sphäroiden stellte sich räumlich ähnlich wie die ATP Verteilungen dar. Auch hier gab es keine systematischen lokalen Verteilungsmuster, die auf die Einwirkung von Doxorubicin zurückgeführt werden könnten. Es wird daher auf die Abbildung der Laktatverteilungen verzichtet.

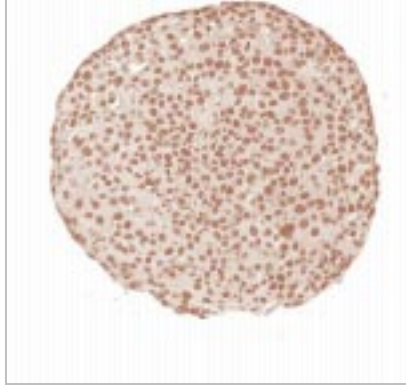


Abb. 39a

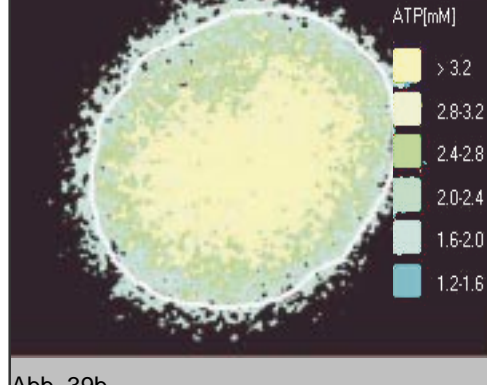


Abb. 39b

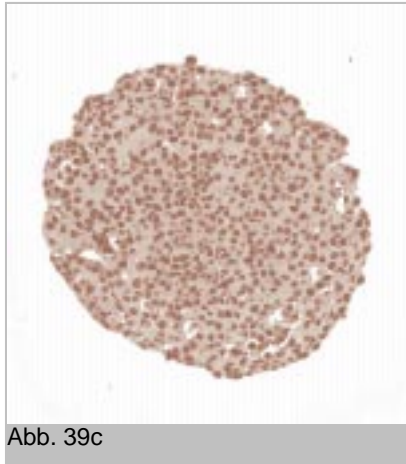


Abb. 39c

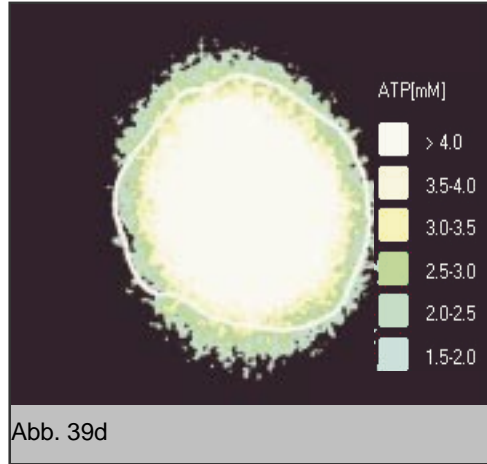


Abb. 39d

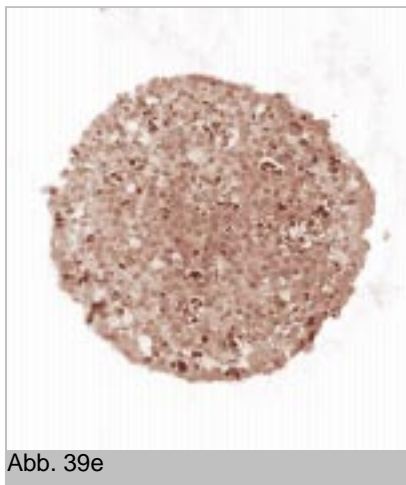


Abb. 39e

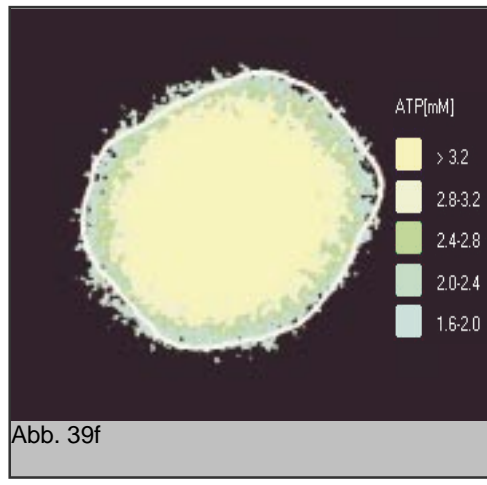


Abb. 39f

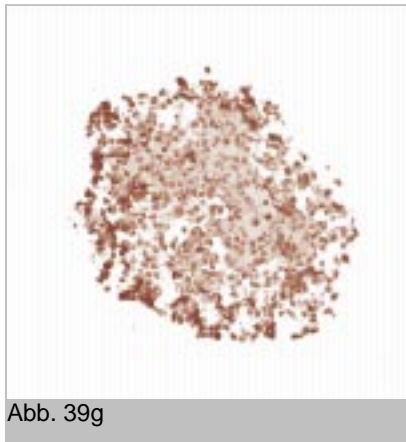


Abb. 39g

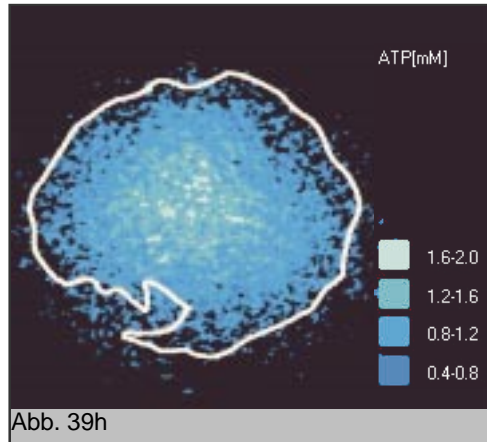


Abb. 39h

Abbildung 39: T47D Sphäroide (Durchmesser ca. 500 $\mu$ m) im Verlauf einer 50stündigen Behandlung mit 10  $\mu$ m Doxorubicin; H&E- sowie TUNEL-Färbung und ATP-Verteilung in Gefrierschnitten zu je einem Behandlungszeitpunkt dargestellt; 39a+b: unbehandelte Kontrolle, 39c+d: nach 8 h, 39e+f: nach 24 h, 39g+h: nach 50 h

## 4.5 Wirkung von CR-6 als Mono- oder Kombinationstherapie mit Doxorubicin

### 4.5.1 WST – Test mit T47D Monolayern

Die WST-Tests mit CR-6 wurden analog den Tests mit Doxorubicin durchgeführt. Relativ zur unbehandelten Kontrolle führten alle Behandlungen mit Ausnahme der beiden niedrigen CR-6 Konzentrationen als Einzelgabe zu einer signifikanten Verminderung der Zellvitalität. Die hohe Dosis von 100  $\mu\text{M}$  CR-6 wirkte toxischer auf die Zellen, als das Doxorubicin. Die kombinierte Therapie führte jedoch nur mit der Dosis von 1,0  $\mu\text{M}$  CR-6 zu einer Verminderung der Vitalität gegenüber der Behandlung mit reinem Doxorubicin, die Kombinationen mit höher dosiertem CR-6 dagegen zeigten keinen statistisch signifikant Unterschied zu der Behandlung mit Doxorubicin als Einzelgabe (Tab. 7 und Abb. 40).

Tabelle 7: WST Tests mit T47D Monolayern, die Zellen wurden für 6 h mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin bzw. 1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$  CR-6 behandelt. Außerdem wurde eine Kombinationstherapie mit beiden Substanzen der jeweiligen Konzentrationen durchgeführt; (Dox = Doxorubicin, D+C = Kombination aus Doxorubicin und CR6)

Dox	CR-6	D+C	CR-6	D+C	CR-6	D+C
10 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{M}$	10+1,0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10+10 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10+100 $\mu\text{M}$
55,9***	92,0	35,7***	93,5	47,9***	35,5***	51,7***

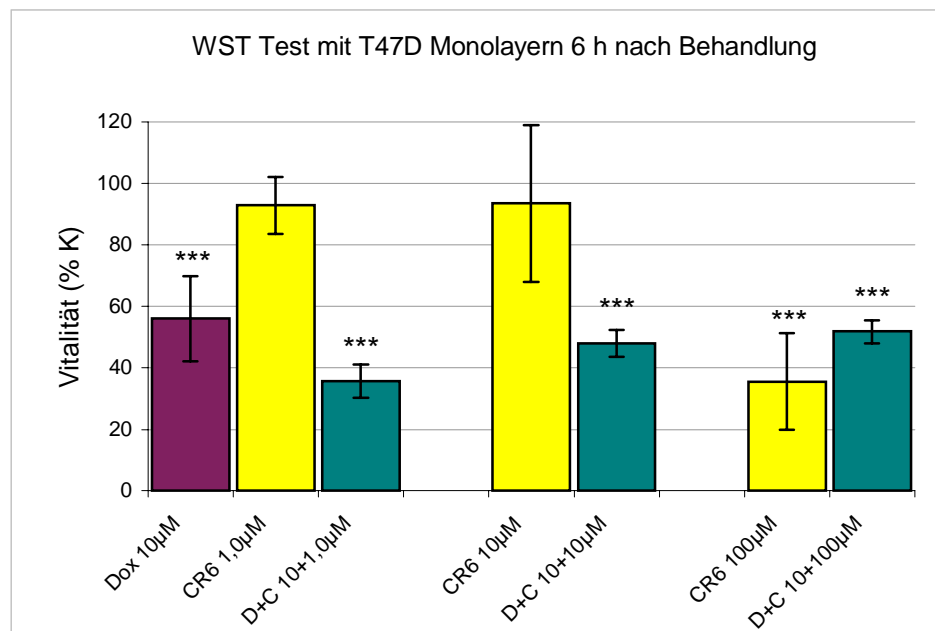


Abbildung 40 WST-Test mit T47D Zellen nach 6stündiger Behandlung mit Doxorubicin (Dox), CR-6 oder Doxorubicin und CR-6 (D+C) in % der unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf die Kontrolle.

Weder Doxorubicin noch CR-6 als Einzelgabe führten im Behandlungszeitraum von 6 h zu einer signifikanten Verminderung der Zellvitalität. Anders als bei den T47D Zellen wirkte hochdosiertes CR-6 also nicht toxisch auf die MCF-7adr Zellen. Alle Kombinationsgaben führten sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber reinem Doxorubicin oder CR-6 zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität. Die Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  CR-6 führte zu einer Abnahme der Zellvitalität gegenüber reinem Doxorubicin von ca. 30 %, die geringer dosierten CR-6 Gaben zu einer Abnahme von ca. 13 %. Die Toxizität der kombinierten Gabe war daher abhängig von der CR-6 Dosis (Tab. 8 und Abb. 41).

Tabelle 8: WST Tests mit MCF-7adr Monolayern, die Zellen wurden für 6 h mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin bzw. 1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$  CR-6 behandelt. Außerdem wurde eine Kombinationstherapie mit beiden Substanzen der jeweiligen Konzentrationen durchgeführt; (Dox = Doxorubicin, D+C = Kombination aus Doxorubicin und CR-6)

Dox	CR-6	D+C	CR-6	D+C	CR-6	D+C
10 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{M}$	10+1,0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10+10 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10+100 $\mu\text{M}$
101.14	106.42	87.65 ***	103.15	88.03*	93.30	71.50**

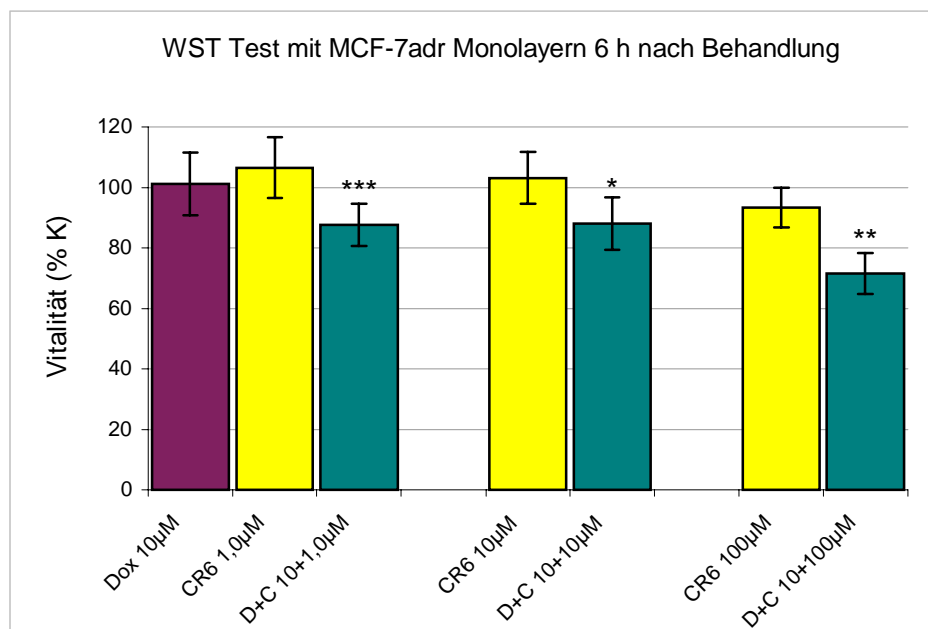


Abbildung 41: WST-Test mit ADR Zellen nach 6stündiger Behandlung mit Doxorubicin (Dox), CR-6 oder Doxorubicin und CR-6 (D+C).

Da die WST-Tests der Kombinationstherapie von CR-6 und Doxorubicin auf eine Verminderung der Resistenz von MCF-7adr Zellen gegenüber Doxorubicin hingewiesen hatten, wurden zur weiteren Untersuchung dieses Effekts Klonogenitätstests und Wachstumskurven mit behandelten MCF-7adr Sphäroiden durchgeführt. Die Tests an Sphäroiden sind insofern interessanter als an Monolayern, als sie ein realistischeres Tumormodell darstellen.

Reines CR-6 wirkte innerhalb eines Behandlungszeitraumes von 24 h nicht toxisch auf die MCF-7adr Sphäroide (Abb. 42). Die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin dagegen führte zu einem Verlust der Klonogenität um 23 % bereits nach 1 h und um 50 bis 60 % nach 6 bis 24 h. Die Kombinationstherapie mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und 100  $\mu\text{M}$  CR-6 hatte eine Abnahme der Klonogenität zunächst um 24 % nach 1 h und um 33 bis 39 % nach 6 und 24 h zur Folge. Nach 1stündiger Behandlung verminderte die Kombinationstherapie die Klonogenität der MCF-7adr Zellen leicht gegenüber der reinen Doxorubicingabe, im späteren Versuchsverlauf scheint CR-6 jedoch die zytostatische Wirkung von Doxorubicin zu inhibieren, nach 24 h war die Klonogenität der mit der Kombination behandelten Zellen um ca. 30 % höher als die der Zellen, die ausschließlich mit Doxorubicin behandelt worden waren.

Die Behandlung von MCF-7adr Sphäroiden mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin hatte nach 1 und 6 h keine Änderung der Klonogenität gegenüber der unbehandelten Kontrolle zur Folge, nach 24 h kam es allerdings zu einem Anstieg um ca. 20 %. Die Applikation der Kombinationstherapie aus 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und 100  $\mu\text{M}$  CR-6 führte vorübergehend nach 1 h zu einer Verminderung der Klonogenität um 27 %. Im weiteren Versuchsverlauf wurde jedoch kein Unterschied zur Kontrolle mehr beobachtet (nicht gezeigt).

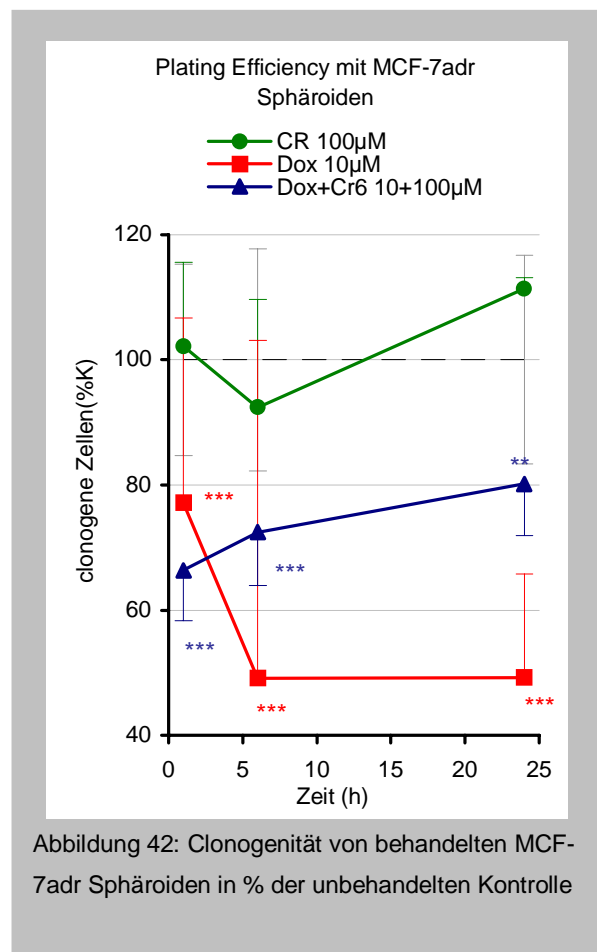


Abbildung 42: Clonogenität von behandelten MCF-7adr Sphäroiden in % der unbehandelten Kontrolle

#### 4.5.3 Wachstumskurven von MCF-7adr Sphäroiden

Die Wachstumskurven in Abb. 43 a zeigen, daß eine 24stündige Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  CR-6 das Sphäroidvolumen um ca. 10 % im Vergleich zur Kontrolle verminderte (0 d = Tag der

Doxorubicin) bei weiterer Kultivierung mit täglichem Mediumwechsel kam es nicht zu einer weiteren Abnahme des Sphäroiddurchmessers. Die Inkubation in 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte nach 4 d zu einer Abnahme des Sphäroiddurchmessers um ca. 50 % vom Wert der Kontrolle während durch die zusätzliche Gabe von 100  $\mu\text{M}$  CR-6 in Kombination mit der hohen Doxorubicindosis bereits nach 3 d eine Verminderung des Sphäroiddurchmessers um ca. 60 % erreicht wurde. Die Wirkungen beider Substanzen waren bei dieser Dosierung synergistisch. Die niedrige Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin hatte keine signifikante Abweichung des Sphäroidwachstums von der Kontrolle zur Folge (Abb. 43 b). In Kombination mit CR-6 führte die Behandlung am 3. Tag zu einer deutlichen Abnahme des Sphäroidvolumens gegenüber der Kontrolle um ca. 40 %. Das Ergebnis weist auch bei dieser Dosierung auf eine synergistische Wirkung von Doxorubicin und CR-6 bei einem Behandlungszeitraum über mehrere Tage hin.

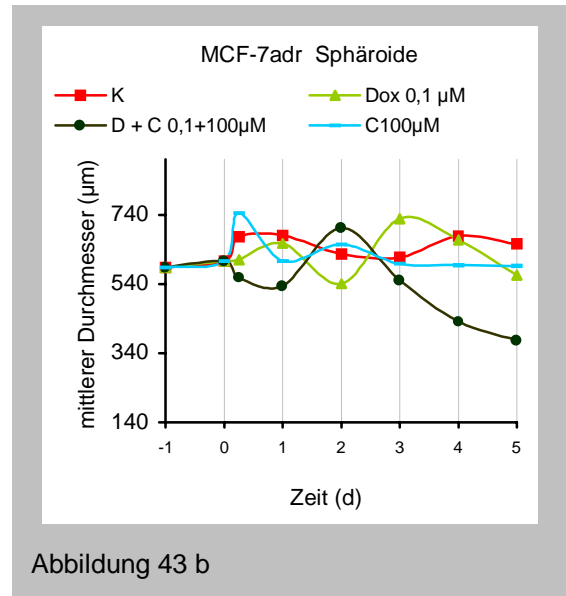
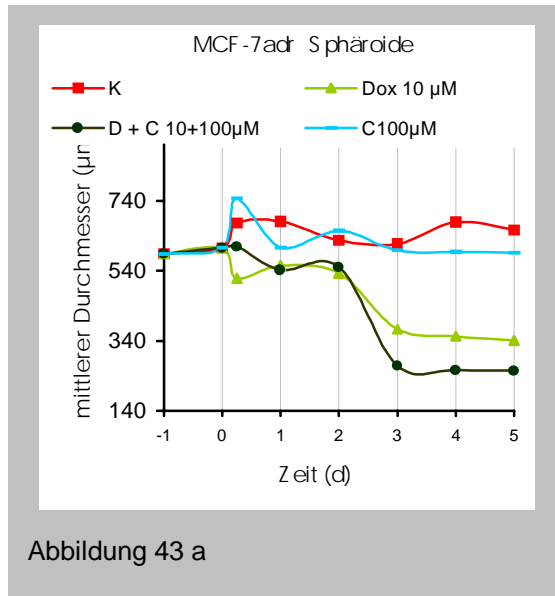


Abbildung 43: Wachstumskurven von MCF-7adr Sphäroiden während einer Behandlung mit Doxorubicin, 100  $\mu\text{M}$  CR-6 bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen. Das Wachstum ist als mittlerer Durchmesser der Sphäroide dargestellt ( $\mu\text{m}$ ). Die Darstellung beginnt am Vortag der Behandlung, die am Tag 0 begann; 43a: Kombination mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin; 43b: Kombination mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin

#### 4.5.4 Purinnukleotidgehalte von mit CR-6 behandelten MCF-7adr Sphäroiden

Abb. 44 a zeigt ATP Konzentrationen von behandelten MCF-7adr Sphäroiden. Der für diese Zellen typische sehr frühe und kurzzeitige ATP Anstieg während einer Doxorubicinbehandlung ist deutlich erkennbar. Bei der Behandlung mit CR-6 allein und auch in Kombination mit Doxorubicin wurde kein Peak beobachtet. Auffallend war jedoch, daß bei allen durchgeführten Versuchen die ATP Werte der mit CR-6 behandelten Zellen von vornherein um ca. 40 % höher lagen als die der Kontrollen oder der allein mit Doxorubicin behandelten Zellen. Die ATP Werte nahmen im Versuchsverlauf kontinuierlich ab, die Behandlung mit Doxorubicin allein oder in

Kombination führte zu einem Rückgang der ATP Konzentrationen auf die Werte der Kontrolle, während infolge der alleinigen Gabe von CR-6 auch nach 24 h noch eine leichte Erhöhung gegenüber der Kontrolle erkennbar war. Die Übereinstimmung bei allen Experimenten deutet auf einen tatsächlichen Behandlungseffekt hin.

Die GTP Werte verhielten sich analog den ATP Werten, stiegen jedoch relativ zur Kontrolle etwas höher an (Abb. 44 b), was vermutlich auf die Wirkung des Doxorubicins zurückzuführen ist.

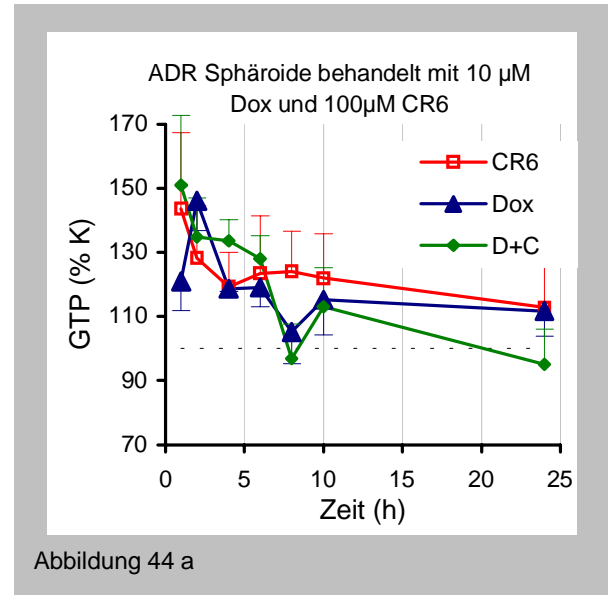
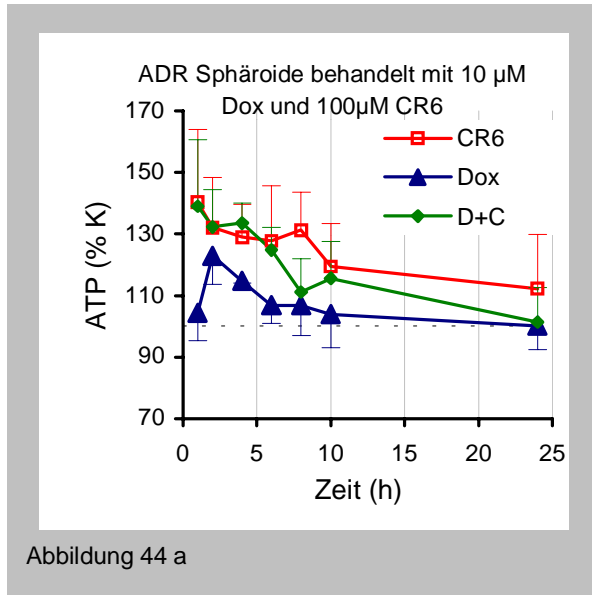


Abbildung 44: Purinnukleotidkonzentrationen (% von Kontrolle) von MCF-7adr Sphäroiden während einer 24stündigen Behandlung mit 10 µM Doxorubicin, 100 µM CR-6 oder einer Kombination aus beiden Substanzen; 44a: ATP; 44b: GTP

## 5 Diskussion von Material und Methode

### 5.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Monolayern bereitete bei keiner der 4 Zelllinien Schwierigkeiten, die Gewinnung von Sphäroiden hingegen gelang nur bei T47D und MCF-7adr Zellen befriedigend. Der MCF-7wildtyp entwickelte Sphäroide bis zu einer Grösse von ca. 250 µm, danach zerfielen die Zellaggregate. MCF-7mdr Zellen bildeten fast gar keine Sphäroide. Es wurden verschiedene Nährmedien ausprobiert, die Konzentration von zugegebenem  $\beta$ -Estradiol verändert sowie ein Stripping des Kälberserums über Aktivkohle angewandt, jedoch führte keine dieser Maßnahmen zum gewünschten Erfolg. Doxorubicinrückstände in der Siliconbeschichtung der Spinnerflaschen sind als Ursache für die mangelhafte Sphäroidbildung sehr unwahrscheinlich,



da T47D Zellen sehr sensibel auf das Gift reagieren und trotzdem Sphäroide bildeten. Demgegenüber sind MCF-7mdr Zellen für das Gift relativ unempfindlich, aggregierten aber dennoch nicht. Aus diesen Gründen wurden nur Sphäroide der Zelllinien T47D und MCF-7adr untersucht.

## 5.2 WST – Tests

Die Tests wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Da das Nährmedium und Doxorubicin Licht absorbieren, wurden Leerwerte mit dem entsprechenden Medikamentkonzentrationen in Nährmedium von den Werten der Monolayer abgezogen.

## 5.3 Histologische Untersuchungen

### a) TUNEL – Reaktion

Die H & E – Färbung ließ bei vielen geschädigten Zellen eine "klassische" apoptotische Morphologie erkennen, mit Kern- und Cytoplasmaschrumpfung, Membranblebbing, und typischer peripherer Chromatinverlagerung im Kern. Viele dieser Zellen von der Linie T47D zeigten keine positive TUNEL – Reaktion. Ein deutliches Signal gaben fast nur solche Kerne, die bereits extrem geschrumpft waren oder schon in Fragmente zerfallen waren (*apoptotic bodies*). Selbst wenn die Chromosomen infolge der durch Doxorubicin induzierten Apoptosen aufgrund des oxidativen Angriffs auf die DNA möglicherweise Bruchstücke undefinierter Länge bilden, sollten doch die Spontanapoptosen ein positives TUNEL Signal zeigen. Bei T47D Zellen wird die DNA bei der Apoptose offenbar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in 3'OH – Enden gespalten. Bei der MCF-7 Zelllinie hingegen zeigten die meisten der morphologisch apoptotischen Zellen auch ein positives TUNEL – Signal. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß den Apoptosen der Zelllinien T47D und MCF-7 unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrundeliegen.

Ein weiteres Problem der TUNEL – Färbung stellte die Eigenfluoreszenz des Doxorubicins dar, denn spätestens 6 h nach Behandlungsbeginn leuchteten alle Zellen so stark, daß man Apoptosen auch im Fluoreszenzmikroskop nur noch anhand der Morphologie zuordnen konnte. Ähnliche Beobachtungen hat auch T. Dunkern in seiner Diplomarbeit geschildert (Dunkern 1997). Da er die Quantifizierung der Apoptosen an *Cytospins* vorgenommen hat, sind außerdem vermutlich größere Verluste von *apoptotic bodies* aufgetreten, die beim Waschen der trypsinisierten Zellen abschwimmen können. Außerdem ist nach der Trypsinisierung nicht mehr zu erkennen, ob die TUNEL – positiven *bodies* von einer oder mehreren Zellen stammen. Es ist also wahrscheinlich, daß effektiv wesentlich mehr Apoptosen vorhanden waren, als die gezählten.

## b) Chambersslides

Trotz der geschilderten Probleme können Apoptosen auch bei T47D Zellen anhand der typischen Morphologie und verstärkter Eosinfärbung relativ leicht erkannt werden. Um ein Abschwimmen von toten Zellen oder *apoptotic bodies* zumindest teilweise zu verhindern, ist die Verwendung von beschichteten Objektträgern auf denen die Zellen wachsen können für histologische Untersuchungen sinnvoll, da diese ohne weitere Manipulation an den Zellen mit Aceton fixiert und getrocknet werden können, so daß der ursprüngliche Zellverband weitgehend erhalten bleibt. Außerdem ist die Verwendung von Chambersslides von Vorteil für die Inkubation mit Chemmotherapeutika, da sie eine vollständige Homogenität der Population bei den verschiedenen Behandlungen in den einzelnen Kammern sichern. Ob die Intensität der Doxorubicinwirkung auf die Monolayer auf Objektträgern dieselbe ist wie in Petrischalen wurde nicht untersucht, da ein Vergleich allenfalls per Augenmaß durchgeführt werden kann.

## 5.4 Agarosegelelektrophorese

Die verwendeten Methoden der Gelelektrophorese sind bereits detailliert bei Wachsmuth (1996) und bei Dunkern (1997) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Brutkrebszellen zeigte keine "Leitermuster" infolge der Behandlung mit Doxorubicin oder Actinomycin. Da die Phenolextraktion der DNA bei den bestrahlten oder chemotherapeutisch behandelten V79 Hamsterlungenzellen zu einer zeit- und dosisabhängigen Ausbildung von "Apoptoseleitern" führte, kann ein methodischer Fehler ausgeschlossen werden. Beim durch Doxorubicin induzierten Zelltod fragmentiert die DNA der Zelllinien T47D und MCF-7 nicht zu Basenpaaren definierter Länge (siehe auch Dunkern T. and Müller-Klieser W. 1999). Da das Medikament bevorzugt an G-C Squeuzen der DNA bindet (Taatzjes et al. 1997, Taatzjes et al. 1996) erfolgt die Spaltung des Moleküls möglicherweise ebenfalls an diesen Stellen, wodurch Fragmente unterschiedlicher Längen entstünden.

## 5.5 Wachstumskurven von Sphäroiden

Sphäroide stellen als dreidimensionale Zellkultur ein Tumormodell dar, dessen Eigenschaften denjenigen solider Tumoren wesentlich ähnlicher sind als die Merkmale von Monolayern. Besonders das Vorhandensein einer extrazellulären Matrix, zellulärer Heterogenität sowie eines Proliferationsgradienten macht die Sphäroide zu einem validen Modell früher, avaskulärer Tumorstadien, Mikrometastasen oder interkapillären Tumormikroregionen (Mueller-Klieser 1987 und 1997). Das Volumenwachstum der Zellaggregate kann mathematisch mit der "Gompertz-Funktion" beschrieben werden und zeigt einen typischen Verlauf mit einer exponentiellen Wachstumsphase, die in eine Sättigung, eine "Plateauphase", übergeht. Mit Hilfe dieser Funktion kann die Volumenverdopplungszeit von Sphäroiden und deren obere Wachstumsgrenze bestimmt werden. Die Zellaggregate bilden mit zunehmender Größe und

Kultivierungsdauer einen Proliferationsgradienten mit "quieszenten" Zellen in den inneren Regionen und proliferierenden in den äußeren Bereichen, wobei in späteren Wachstumsphasen eine zentrale Nekrose entsteht, ähnlich den gefäßfernen nekrotischen Regionen im soliden Tumor.

Das Wachstum der T47D und MCF-7adr Sphäroide wurde in der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet. Die mit hochdosiertem Doxorubicin behandelten Sphäroide verloren zunächst stark an Volumen. Besonders die T47D Sphäroide zerfielen bereits nach 50stündiger Behandlung fast vollständig. Die MCF-7adr Sphäroide zeigten zwar teilweise ebenfalls Auflösungserscheinungen, jedoch schienen einige Zellaggregate von der Giftwirkung nicht beeinträchtigt zu werden, während andere rapide kleiner wurden. Aus den Sphäroidfragmenten und suspendierten Zellen wuchs rasch eine Tochtergeneration heran. Sobald diese eine willkürlich festgesetzte Mindestgröße überschritten hatte, wurde sie Teil der Wertemenge der Wachstumskurven. Dadurch wurden ab einem Zeitraum von 3 bis 4 Tagen nach der Behandlung sowohl sehr große, als auch die nachwachsenden sehr kleinen Sphäroide gemessen und die Streuungen wurden extrem groß.

## 5.6 Klonogenitätstests

Eine Fehlerquelle bei der standardisierten Bestimmung der Plating Efficiency stellt die Migration von Zellen dar. Diese Fähigkeit war besonders bei der MCF-7 Zelllinie ausgeprägt. Es war in diesem Fall sinnvoll, möglichst wenige Zellen / Petrischale einzusäen und bei der manuellen Auswertung besonders genau auf die Größe der Kolonien zu achten.

## 5.7 HPLC

### 5.7.1 Allgemeine Probleme der HPLC - Messungen

Die hohe Meßempfindlichkeit der HPLC ist mit einigen methodischen Problemen verknüpft. Da jeweils 3 Proben/Petrischale und 6 Petrischalen/Entnahmezeitpunkt bearbeitet wurden, hatte eine Monolayermeßreihe eines Experiments einen Umfang von 140 bis 180 Proben, entsprechend einem Meßzeitraum von 7 bis 10 Tagen. Im Verlauf der Messungen kam es zu einer Verlängerung der Retentionszeiten durch die Oxidation des Elutionsmittels. Wenn die Meßzeit für eine Probe 90 min überschritt, wurde das Elutionsmittel erneuert, da die gesamte Messung sonst viel zu lange gedauert hätte und die für die Statistik notwendige Anzahl an Versuchen den Zeitrahmen einer Promotion geprengt hätte. Nach dem Wechsel des Elutionsmittels wurden die Messungen neu kalibriert. Ebenso erfolgte eine Kalibrierung nach jedem Wechsel der Vorsäule. Trotz der Kalibrierungen traten jedoch durch diese Eingriffe geringfügige Schwankungen der Meßwerte auf, die bei einem untersuchten Effekt von lediglich 2 fmol/Zelle in biologischem Material bereits sehr störend wirken konnten. Unter Umständen mußte die gesamte Messung wiederholt werden, wodurch die Auswertung verzögert wurde. Außerdem konnten die Chromatogramme aufgrund der verschobenen Retentionszeiten nicht automatisch ausgewertet werden, sondern mußten zeitaufwendig interaktiv bearbeitet werden.

Die Methode war daher insgesamt sehr zeitintensiv und die Entwicklung entsprechend langsam.

### 5.7.2 Auswertung der HPLC – Messungen

Um eine Vorstellung von der Größenordnung der Nukleotidkonzentrationen zu vermitteln, wurden die Absolutwerte in fmol/Zelle oder  $\mu\text{mol/g}$  angegeben. Eine Angabe in Absolutwerten zum Vergleich verschiedener Behandlungen war jedoch nicht sinnvoll, da die Ergebnisse der einzelnen Experimente in Abhängigkeit von der Zellzahl/Petrischale bzw. der Sphäroidgröße stark differierten, wobei jedoch Mehrfachbestimmungen desselben Versuchstages bzw. derselben Zellpopulation weitgehend übereinstimmten. Zur Beurteilung des Verhaltens unbehandelter Kontrollen wurden die Ergebnisse von den Behandlungszeitpunkten jeweils eines Versuchs auf ihren Anfangswert normiert und die Relativwerte mehrerer Experimente gemittelt. Der reine Behandlungseffekt konnte durch den Vergleich der unbehandelten Kontrollen mit den dazugehörigen behandelten Zellen innerhalb eines Versuchs dargestellt werden. Diese Relativwerte (% von Kontrolle) mehrerer Versuche wurden gemittelt. Waren Mehrfachbestimmungen der unbehandelten Kontrollen zum Zeitpunkt 0 h vorhanden, wurden die Werte der im weiteren Versuchsverlauf entnommenen Proben je einer Testreihe auf jeden der Anfangswerte normiert und dann gemittelt. Auf diese Weise konnten die Streuungen der Mittelwerte realistischer berücksichtigt werden. Die energy charge wurde für jeden Versuch einzeln berechnet und die Ergebnisse gemittelt.

#### a) Experimente mit Monolayern

Die Ergebnisse in Kap. 4.2.1.1 verdeutlichen die Abhängigkeit der durchschnittlichen ATP Konzentration unbehandelter Zellen von der Gesamtzellzahl/Petrischale bzw. der Wachstumsphase, insbesondere bei T47D Zellen. Leider konnte weder im Plateaubereich bis zu  $10^7$  Zellen gemessen werden, da diese Zellzahl für die Versuche nicht ausreichend war, noch im späteren Plateau ab  $3,5 \times 10^7$  Zellen, da ein so dicht gewachsener Monolayer keine 24 h ohne Mediumwechsel überlebt hätte und auch schon bei kürzeren Versuchszeiten größere Abweichungen aufgetreten wären. Die Versuche wurden mit Zellzahlen von  $1,6$  bis  $2,5 \times 10^7$ /Petrischale durchgeführt. In diesem Bereich führte bereits ein Unterschied von  $2 \times 10^6$  Zellen/Schale zu ATP - Abweichungen im Bereich von 2 fmol/Zelle. Die Effekte, auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert, lagen aber bei Konzentrationen in dieser Größenordnung. Da die Zellen nach der Einsaat bis zum Versuchstag je 2 bis 3 Teilungen durchmachen und die Zellzykluszeiten der Populationen nicht synchronisiert sind, war es selbst bei absolut korrekt eingesäten Zellzahlen kaum möglich am Versuchstag völlig identische Zellzahlen/Petrischale zu gewährleisten. Pro Versuch wurden ca. 30 Schalen eingesetzt, unter denen sich immer einige mit abweichenden Zellzahlen befanden. Durch 3fach Bestimmungen (je 3 Schalen pro Entnahmezeitpunkt) konnte der Fehler des Mittelwertes vermindert und durch mehrfache Wiederholung der Versuche konnten statistische Signifikanzen erreicht werden. Der Energiezustand unbehandelter Zellen blieb im Versuchszeitraum relativ konstant. Jedoch

zeigten besonders die Mono- und Diphosphate, aber auch ATP, einen leichten Anstieg bis zu 10 h nach Versuchsbeginn. Diese Beobachtung konnte nicht, wie bei den Sphäroiden, auf das Zellwachstum zurückgeführt werden, da bei den Monolayerexperimenten stets eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  zur Extraktion verwendet wurde. Die Ursache dieses Verhaltens müssen daher andere physiologische Vorgänge sein. Ab 24 h nach Versuchsbeginn sanken die Konzentrationen aller gemessenen Substanzen, was auf einen Vitalitätsverlust eines Teils der Zellen schließen läßt. Es wurden zwar stets Zellen von derselben durchschnittlichen Größe extrahiert, jedoch können die Stoffwechselvorgänge bereits reduziert sein, bevor die betroffene Zelle ihr Volumen verändert. Da das Nährmedium während des 24stündigen Experiments nicht gewechselt wurde, kam es zweifellos zu einer Änderung des pH Werts und einem Nährstoffmangel. Durch die Auswertung der Meßergebnisse relativ zur jeweiligen Kontrolle konnte der Behandlungseffekt unter Ausschluß der methodisch bedingten Änderungen der gemessenen Konzentrationen dargestellt werden.

## b) Experimente mit Sphäroiden

Die den Experimenten zugrundeliegenden physiologischen Bedingungen waren gut standardisiert, wie die übereinstimmenden Ergebnisse unbehandelter T47D und MCF-7adr Sphäroide belegen. Im Versuchszeitraum stiegen alle Meßwerte aufgrund des Zellwachstums leicht an, da jedoch die Werte der behandelten Sphäroide auf ihre jeweiligen Kontrollen bezogen wurden, hatte dieser Effekt keinen Einfluß auf die Ergebnisse. Die Konzentrationen der Purinnukleosidmonophosphate nahmen im Versuchsverlauf deutlich zu, vermutlich lag ein zunehmender Nahrungsmangel zugrunde. Der letzte Mediumwechsel mußte jedoch mindestens 8 h vor Behandlungsbeginn durchgeführt werden, da das frische Medium einen sehr starken Einfluß auf die Nukleotidphosphatkonzentrationen ausübte (nicht gezeigt).

Ein gewisses Problem stellten die unterschiedlichen Sphäroidgrößen dar. Die gemessenen Konzentrationen der Nukleotidphosphate wurden stets auf die Masse der Sphäroide (in g Frischgewicht) bezogen. Da jegliche Manipulation an den Spinnerflaschen, den Brutschränken oder den Sphäroiden selbst zu Schwankungen der Meßwerte führte, konnten die Größen der einzelnen Sphäroide während der Probenentnahme nicht bestimmt werden. Hierzu wäre eine Zwischenlagerung in Petrischalen mit Nährmedium erforderlich gewesen, was zu einem drastischen Abfall der ATP Konzentrationen geführt hätte. Die wurde durch sofortiges rasches Einfrieren in flüssigen Stickstoff vermieden. Aus diesem Grund wurden die Sphäroidgrößen am Vortag des Versuchs vor dem letzten Mediumwechsel bestimmt. Es wurde versucht, für das Experiment möglichst homogene Sphäroidgrößen durch Auslese zu erreichen. Bereits bei der Anzucht der Sphäroide wurden die Populationen mehrmals in Petrischalen überführt und nach Größenklassen mit einer Durchmesserbreite von  $200 \mu\text{M}$  sortiert. Bei der Verteilung der Populationen auf die letztlich im Experiment verwendeten Spinnerflaschen (möglichst kurz vor dem Versuch, da auch die unterschiedlichen Flaschen einen Einfluß auf die Meßergebnisse hatten), wurden sie noch einmal sortiert. Auf diese Weise gelang es, die Streuungen der Meßwerte gering zu halten. Im Versuchsverlauf verminderte sich jedoch die Größe der mit hochdosiertem Doxorubicin behandelten Sphäroide teilweise drastisch. Es ist daher möglich,

daß die wahren Anstiege der GTP- und ATP- Werte nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin noch etwas höher waren als gemessen, da die Verminderung der Sphäroidgröße zu geringeren Meßwerten führen konnte.

### c) Vergleich der Ergebnisse von Monolayern und Sphäroiden

Die Versuchsbedingungen von Monolayer- und Sphäroidexperimenten waren sehr unterschiedlich, daher ist ein Vergleich nur bedingt sinnvoll. Die Sphäroide wurden als vollständiges Zellaggregat mit allen Bestandteilen der extrazellulären Matrix extrahiert, während die Monolayer als gewaschene Zellsuspension verwendet wurden. Außerdem mußte bei den Sphäroidversuchen jede Population auf ihren eigenen Anfangswert bezogen werden, da die Absolutwerte bei verschiedenen Spinnerflaschen teilweise stark variierten. Bei den Monolayern dagegen konnten alle Populationen als gleichwertig behandelt werden und die Anfangswerte aus drei Petrischalen gemittelt werden. Insgesamt waren sowohl die Monolayer- als auch die Sphäroidexperimente aufgrund ihrer Komplexität fehleranfällig. Um eine von Streuungen und Fehlern weitgehend bereinigte Statistik zu erreichen, war eine häufige Wiederholung der Versuche notwendig. Beide Methoden sind daher sehr zeitaufwendig und nur in Bezug auf die Messung mehrerer Metabolite innerhalb eines Experiments sinnvoll. Für eine serienmäßige Anwendung sollte die Etablierung eines ELISA Testverfahrens für die Bestimmung von GTP- oder ATP- Konzentrationen erwogen werden, wobei GTP vorzuziehen wäre, da es bei allen Zelllinien am empfindlichsten auf die Behandlung reagierte.

## 5.8 Abbildende Biolumineszenz

### 5.8.1 Statistische Auswertung

Im Rahmen unserer Untersuchungen stellte sich die Frage, ob der mit der HPLC nachgewiesene Anstieg der Purinnukleotide auch mit Hilfe dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten abbildenden Biolumineszenzverfahren dargestellt werden kann. Die Methode bietet die Möglichkeit, lokale ATP, Laktat und Glukoseverteilungen innerhalb einer Gewebeprobe abzubilden und zu quantifizieren. Für unsere Untersuchungen war besonders der ATP-Gehalt der Proben von Interesse. Die mit Hilfe dieses Verfahrens angefertigte Statistik der ATP-Gehalte von mit 10 µM Doxorubicin über 24 h behandelte T47D Sphäroide bestätigte die unter Verwendung der HPLC gewonnenen Ergebnisse. Beide Methoden ergaben innerhalb eines Experiments einen Anstieg von ATP um ca. 0,6 µmol/g nach 6stündiger Behandlung. Die Absolutwerte lagen bei den HPLC-Messungen allerdings erheblich über denen der Biolumineszenz, was auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Dadurch ergaben sich relativ zur unbehandelten Kontrolle unterschiedliche Werte: bei den niedrigeren Absolutwerten der Bioluminszenzmessungen betrug der Anstieg relativ zur Kontrolle ca. 37 %, während derselbe absolute Wert bei den HPLC-Untersuchungen nur einen Anstieg von ca. 15 % ergab. Wie bereits in Kap. 5.7.2 b beschrieben, war das Sphäroidvolumen

ein sensibler Parameter bei der Berechnung der Nukleotidgehalte. Sollten also die Sphäroide zum Entnahmezeitpunkt etwas größer gewesen sein als dokumentiert, könnten die Absolutwerte insgesamt etwas niedriger und damit der relative Anstieg der Werte höher gewesen sein.

Die Erstellung einer Statistik mit Hilfe der Biolumineszenz im hier vorliegenden Umfang war innerhalb eines angemessenen Zeitraums durchführbar und die Ergebnisse stimmten bei mehreren Testreihen gut überein und zeigten, daß der beobachtete Effekt mit verschiedenen Methoden dargestellt werden kann. Die statistische Auswertung der beschriebenen Experimente für mehrere Medikamentkonzentrationen und verschiedene Zelllinien wäre jedoch ausgesprochen zeit- und kostenintensiv. Für ein umfangreiches "Screening" von Chemotherapeutika wäre ein ELISA Testverfahren sinnvoll (s.o.).

Aufgrund der Größeninhomogenität der Sphäroidpopulationen ergaben sich relativ große Streuungen der Meßergebnisse. Größere Sphäroide mit zentraler Nekrose enthalten bezogen auf ihr Frischgewicht weniger ATP als solche ohne nekrotische Bereiche (Mueller-Klieser et al. 1988 und 1989). Entsprechend beeinflußt auch die Ausdehnung der Zentralnekrose den ATP Gehalt/g. Da der zu untersuchende Effekt sehr gering war, konnten derartige Unterschiede sehr störend wirken. Beim Biolumineszenzverfahren besteht die Option, den Meßbereich innerhalb des untersuchten Objekts zu definieren. Es wäre also möglich gewesen, die nekrotischen Areale von der Messung auszuschließen. Bei sehr kleinen Objekten wie den Sphäroiden ist es jedoch problematisch die Bereiche so abzugrenzen, daß Artefakte wie Diffusionseffekte, die an den Rändern der Nekrose auftreten, nicht erfaßt werden. Außerdem sollten bei der vorliegenden Arbeit parallel zu der statistischen Auswertung die lokalen Verteilungen von ATP und Laktat innerhalb der Sphäroide untersucht werden. Hierbei wären durch natürlich entstandene Nekrosen bedingte Unterschiede im ATP oder Laktatgehalt besonders störend gewesen. Für die Messungen wurden daher möglichst Sphäroide ohne Zentralnekrose ausgewählt, wobei es allerdings nicht immer möglich war, bereits absinkende ATP-Konzentrationen innerhalb eines morphologisch noch unauffälligen Zentralbereichs eines Zellaggregats zu vermeiden.

Um die genannten Diffusionseffekte an den Rändern der Objekte zu minimieren, wurde die Viskosität des Enzymcocktails erhöht. Dadurch schien jedoch die Intensität des Kontakts zwischen der Oberfläche der Reaktionslösung und dem Gefrierschnitt bei verschiedenen Schnitten zu variieren. Das Ergebnis war zwar ein gutes Biolumineszenzbild, mit dem relative Änderungen der ATP Konzentrationen innerhalb eines Schnittes bestimmt werden konnten, die absolute Konzentration über den gesamten Sphäroiddurchmesser streute zwischen den Parallelschnitten eines Sphäroids jedoch teilweise um mehrere  $\mu\text{mol/g}$ . Da die zu untersuchenden Effekte sehr gering waren konnten solche Messungen nicht in die statistische Auswertung eingehen. Es scheint daher für weitere Anwendungen dieser Art sinnvoll, die statistische Methode von der bildgebenden zu trennen.

## 5.8.2 Bildgebende Darstellung

Mit dem verwendeten Kamerasystem Argus 100 war es nicht möglich, einzelne Bereiche gesteigerter ATP Konzentrationen innerhalb eines Sphäroidschnittes zum Behandlungszeitpunkt des statistisch nachgewiesenen ATP Anstiegs zu beobachten. Zwar konnte die räumliche Auflösung der Biolumineszenzaufnahmen erhöht werden, indem die Temperaturen vor und während der Messung so variiert wurden, daß eine maximale Enzymaktivität bei hoher Viskosität des Enzymcocktails erreicht wurde und das Meßfenster auch in diesem Bereich gesetzt werden konnte. Die Randbereiche der Sphäroide zeigten jedoch trotzdem einen ATP Gradienten, der möglicherweise in der optischen Auflösung begründet ist. Eine bevorzugte Wirkung von Doxorubicin in den äußeren Arealen der Zellaggregate konnte daher nicht dargestellt werden. Ein ähnliches Problem wäre bei einer doxorubicininduzierten Ausweitung einer bereits vorhandenen Zentralnekrose aufgetreten. Dieser Effekt konnte anhand der histologischen Untersuchungen jedoch ausgeschlossen werden. Da die Zellschäden nicht massiv in definierten Bereichen der Sphäroide auftraten, sondern einzelne oder nur wenige benachbarte Zellen betreffend über den Schnitt verteilt waren, konnte aufgrund der Auflösungsgrenze des Systems weder ein in diesen Zellen erfolgter ATP Anstieg, noch die zunächst entstehenden kleinen Lücken mit der abbildenden Biolumineszenz dargestellt werden. Ab 24 h nach Inkubationsbeginn mit der hohen Doxorubicindosis traten größere Lücken im Zellverband auf, die mit Hilfe der Biolumineszenz abgebildet werden konnten. Außerdem kam es zu einer anhand der ATP Verteilungen deutlich sichtbaren Verkleinerung der Zellaggregate, wobei die ATP-Konzentrationen im äußeren Bereich stark abnahmen, während sie im Zentrum noch die höchsten Werte aufwiesen.

Weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema sollten berücksichtigen, daß, falls tatsächlich dieselben Zellen einen Anstieg der ATP Konzentrationen vor oder während ihrer Desintegration zeigen, eine Einzelzellauflösung erreicht werden müßte und zum anderen die Doxorubicindosis so abzustimmen wäre, daß nur wenige benachbarte Zellen absterben, damit die Signale sich nicht überschneiden. Um vergleichbare Parallelschnitte eines Sphäroids anzufertigen, müßte außerdem die Schnittdicke erheblich vermindert werden, da bei einem Zelldurchmesser von 15 – 17 µM kaum eine Zelle in mehreren Schnitten erfaßt werden kann. Eine bevorzugte Untersuchung der äußeren Randbereiche oder der Ränder der Zentralnekrose scheint nicht sinnvoll, da die Lateraldiffusion von Enzymen und Substrat während der Biolumineszenzmessungen den Effekt überdecken würden.

## 5.9 Vergleich der Meßmethoden (HPLC, Biolumineszenz und NMR)

Alle drei Methoden waren für die statistische Erfassung von Änderungen der Konzentrationen von Purinnukleotidphosphaten in Monolayern bzw. Sphäroiden geeignet. Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit keine deutlichen Abweichungen der Gamma NTP-Signalintensitäten mit der NMR-Spektroskopie gemessen werden, jedoch hat Dahan – Grobeld entsprechende



Ergebnisse von T47D Zellen vorgelegt (Dahan–Grobgedl 1997). Für diese Anwendung scheint derzeit die HPLC die Methode der Wahl zu sein, da die Biolumineszenz wesentlich konsten- und zeitintensiver ist und die NMR-Spektroskopie großen Streuungen unterliegt.

Die Beobachtung der Doxorubicinwirkung auf ein einzelnes Sphäroid *in vivo* gelang Breidt mit Hilfe diffusionsgewichteter NMR Bilder (Breidt, J. 1998). Allerdings lieferte auch diese Methode erst nach 24stündiger Inkubation von T47D Sphäroiden mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin deutliche Ergebnisse. Die Darstellung morphologischer Veränderungen zu früheren Behandlungszeitpunkten waren nicht möglich. Ob mit der Biolumineszenz solche Untersuchungen möglich sind, liegt wohl letztendlich an der Leistungsfähigkeit des lichtoptischen Vergrößerungssystems.

## 6 Diskussion der Ergebnisse

### 6.1 Wirkung von Doxorubicin auf das Wachstum, die Vitalität und die Klonogenität der Zellen

Die Wachstumskurven von Monolayern hatten ebenso wie die Volumenwachstumskurven von Sphäroiden gezeigt, daß bei den T47D, MCF-7wildtyp und MCF-7adr Zellen eine deutliche dosisabhängige Reduzierung der Zellzahl von Monolayern bzw. des mittleren Sphäroidvolumens durch die mehrtägige Inkubation mit Doxorubicin hervorgerufen wurde (Dunkern und Mueller-Klieser 1999). Dabei führte die hohe Dosierung von 10  $\mu\text{M}$  bei allen drei Zelllinien zu drastischen Effekten, während die Dosierung von 1,0 oder 0,1  $\mu\text{M}$  auf die doxorubicinresistenten MCF-7adr Zellen kaum eine Wirkung ausübten (Abb. 46). Insgesamt erwies sich die T47D Linie als besonders empfindlich gegenüber dem Medikament. Die hohe Dosis führte hier zur völligen Zerstörung der Monolayer bzw. zur Desintegration der Zellaggregate, während es bei den MCF-7 Zellen zwar ebenfalls zu deutlichen Zellschäden kam, die stark verkleinerten Sphäroide jedoch eine nachwachsende Tochtergeneration bildeten.

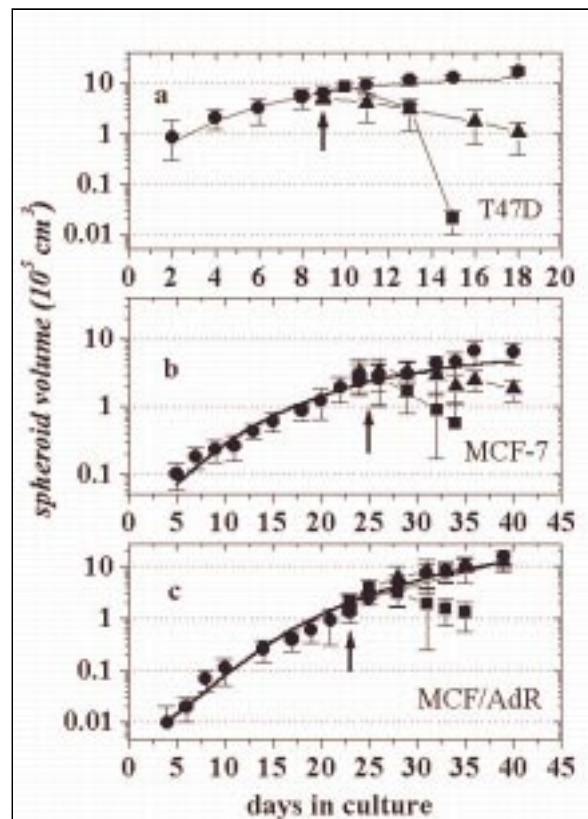


Abbildung 45: Volumenwachstumskurven von T47D, MCF-7 und MCF-7adr Sphäroiden im Verlauf einer 20 bzw. 45tägigen Behandlung mit 10 bzw. 1,0 oder 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin ( $\uparrow$  = Behandlungsbeginn) (Dunkern und Mueller-Klieser 1999).

Die Klonogenität der T47D Zellen nahm im Verlauf der Behandlung mit Doxorubicin in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Wachstumskurven ab. Infolge einer 8stündigen Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  betrug die Klonogenität noch 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und sank im weiteren Behandlungsverlauf bis zu 48 h auf 7 % ab. Die mittlere Dosisierung von 1,0  $\mu\text{M}$  führte bereits nach 8stündiger Inkubation zu einer verbleibenden Klonogenität von < 1 %; während der Behandlung mit der hohen Dosis von 10  $\mu\text{M}$  wurde nach 8 h bereits keine Koloniebildung mehr beobachtet (Neeman 1989, Dunkern 1997, Breidt 1998, Dunkern und Mueller-Klieser 1999).

Bei den resistenten MCF-7adr Zellen wurde die Klonogenität im Verlauf der Inkubation mit der niedrigen Dosis um bis zu 40 % vermindert, bei der mittleren Dosis um bis zu 70 % (Dunkern 1997, Dunkern und Mueller-Klieser 1999). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Plating Efficiencies mit MCF-7adr Sphäroiden ergaben bereits nach 1stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin eine Reduktion der Koloniebildung um 23 %, mit einer weiteren Abnahme im Behandlungsverlauf von 24 h um bis zu 60 %. Weder bei den Monolayern noch bei den Sphäroiden dieser Zelllinie wurde eine sofortige deutliche Wachstumsreduktion nach der Zugabe des Medikaments beobachtet. Die Ergebnisse weisen auf eine deutlich cytotoxische Wirkung von Doxorubicin auf T47D Zellen hin, während das Medikament auf die MCF-7 Linie besonders bei niedriger Dosisierung eine eher cytostatische Wirkung entfaltet.

Die Untersuchungen zur Zellvitalität aller vier in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien bestätigen dieses Ergebnis. Die MCF-7wildtyp- und MCF-7adr Zellen reagierten im Verlauf der 8stündigen Inkubation mit Doxorubicin in ähnlicher Weise sowohl auf die hohe als auch auf die niedrige Dosis mit einer relativ schwachen Abnahme der Vitalität um maximal 30 %. Erst längerfristige Behandlungen über mehrere Tage führten zu deutlichen Unterschieden zwischen den beiden Klonen. Die MCF-7mdr Zellen wurden innerhalb der 8stündigen Inkubation von keiner der beiden Dosisierungen signifikant beeinträchtigt und erwiesen sich damit als die resistenteste Zelllinie. Deutlich empfindlicher zeigten sich dagegen die T47D Zellen. Die hohe Dosis führte bei dieser Zelllinie sofort zu einem massiven Zellsterben, nach 8stündiger Inkubation waren nur noch ca. 30 % der Zellen vital. Entsprechend der Klonogenität von 80 % nach einer Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin für 8 h sank die Vitalität der Zellen in diesem Zeitraum auch nur um 20–30 %, was den Schluß zuläßt, daß das Chemotherapeutikum im Hinblick auf die Koloniebildung und die Wachstumskurven in dieser Dosisierung seine volle Wirkung erst zu einem späteren Zeitpunkt entfaltet.

Die histologischen Untersuchungen deuten sowohl bei T47D als auch bei MCF-7 Zellen auf eine Mischform des Zelltodes aus Nekrosen und Apoptosen hin. Die hohe Dosisierung des Medikaments führte bei den T47D Zellen praktisch sofort zu massiven Zellschäden, während in Übereinstimmung mit den Vitalitäts- und Klonogenitätstests die Wirkung bei der niedrigen Dosisierung verzögert eintrat. Auf diese Weise lassen sich möglicherweise die Ergebnisse von Dunkern und Mueller-Klieser (1999) begründen, die während der Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin nur sehr wenige TUNEL-positive Zellen fanden. Zum Zeitpunkt der ersten Bestimmung, nach 8stündiger Behandlung, waren vermutlich die meisten Zellen bereits vollständig desintegriert.

Bei MCF-7 Sphäroiden hatte Dunkern 1997 wesentlich höhere Apoptoseraten beobachtet, als bei den Monolayern. Die histologischen Untersuchungen mit Hilfe der Ki67 Färbung zeigen besonders bei dieser Zelllinie deutlich parallel verlaufende Nekrosen und Apoptosen, wobei der Anteil der Nekrosen eher höher zu sein schien, als der der Apoptosen. Dies könnte die Ursache für sehr geringe Zahlen von TUNEL-positiven Zellen bei behandelten Monolayern sein (Dunkern 1997). Der nekrotische Zelltod ist häufig die Folge einer massiven Einwirkung von Giften, Strahlen oder mechanischen Kräften. Die Monolayer sind der Wirkung des Doxorubicins im Vergleich zu Sphäroiden relativ schutzlos ausgesetzt, da sich im dreidimensionalen Zellverband häufig eine Resistenz gegenüber schädigenden Agenzien entwickelt (Olive and Durand 1994). Außerdem erhöht eine gesteigerte Expression des P-Glycoproteins durch das Gen MDR1 die Resistenz der "quieszenten" Zellen, die in Sphäroiden zahlreich vorkommen können, gegen Chemotherapeutika (Kolchinsky and Roninson 1997). D'Arpa und Liu (1989) beobachteten außerdem in "quieszenten" Zellen sehr geringe Gehalte an Topoisomerase II. Durch den Mangel an diesem Zielenzym von Doxorubicin zeigen die Zellen eine geringere Sensibilität gegenüber dem Medikament als proliferierende Zellen. Es ist daher möglich, daß die etwas moderatere Einwirkung des Medikaments auf die Sphäroide dort mehr Apoptosen induziert, während die Monolayer hauptsächlich den nekrotischen Zelltod erleiden und damit keine TUNEL-Reaktion stattfindet. Ähnliches gilt für die Behandlung mit der niedrigen Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$ . Diese führt im Gegensatz zur hohen Dosis vermutlich eher zu Apoptosen als zu Nekrosen. Daß die Wirkung von Doxorubicin und anderen Chemotherapeutika je nach Zelllinie unterschiedlichen Mechanismen folgen kann, zeigen nicht nur die TUNEL-Färbungen an T47D Zellen, bei denen im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen häufig keine TUNEL-Fluoreszenz auftrat, obwohl die Zellen eine apoptotische Morphologie zeigten; vielmehr lassen dies auch die Gelelektrophoresen erkennen, welche die DNA von V79 Hamsterlungenzellen mit der von humanen Brustkrebszellen bei gleicher Behandlung vergleichend analysieren (Kap. 4.1.5). Anhand der Ergebnisse wird deutlich, daß Doxorubicin bei V79 Zellen zu einer Fragmentierung der DNA in definierte Längen von Basenpaaren führte, während bei den Brustkrebszellen keine derartigen Muster auftraten und der Zelltod daher über andere Wege eingetreten sein muß. Es ist wahrscheinlich, daß bei den beiden Zelllinien T47D und MCF-7 ebenfalls unterschiedliche Stoffwechselwege in den Zelltod führen. Auch ist nicht auszuschließen, daß ähnliches für die Unterschiede zwischen den MCF-7 Mutanten gilt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß hochdosiertes Doxorubicin bei T47D Monolayern zu einem sofortigen massiven Zelltod hauptsächlich in Form von Nekrosen führt. Bei den Sphäroiden und den MCF-7 Zelllinien ist die Wirkung des Medikaments moderater, führt jedoch in der hohen Dosierung von 10  $\mu\text{M}$  ebenfalls zu starken Zellschäden, die als Mischform aus Nekrosen und Apoptosen auftreten. Der Anteil der Apoptosen ist bei den Sphäroiden höher als bei den Monolayern. Die niedrige Dosierung von 0,1  $\mu\text{M}$  führt bei allen untersuchten Zellsystemen zu einer verzögert einsetzenden moderateren Wirkung, die eher den apoptotischen als den nekrotischen Zelltod induziert.

## 6.2 Verwendbarkeit der Ergebnisse zur Entwicklung prognostischer Verfahren

Mit Hilfe der HPLC und der Biolumineszenzmessungen wurde gezeigt, daß eine Behandlung mit Doxorubicin bei den humanen Mammacarcinomzelllinien T47D und MCF-7 in der vorliegenden Untersuchung zu einem vorübergehenden Anstieg der Purinnukleosidphosphate führte. Die Messungen ergaben, daß besonders die Nukleosidtriphosphate statistisch signifikant anstiegen und von diesen GTP relativ zur unbehandelten Kontrolle stärker stieg als ATP. Parallel zu den Purinnukleotiden stiegen auch die Nukleosiddi- und -monophosphate an, daher kam es nicht zu einer wesentlichen Änderung der zellulären Energieladung. Der Effekt war bei den doxorubicinsensitiven T47D Zellen stark dosisabhängig. Während die hohe Dosis von 10  $\mu\text{M}$  zu einem wesentlich stärkeren und länger andauernden Anstieg der Purinnukleotide als bei der MCF-7 Zelllinie führte, wurde keine deutliche Reaktion von T47D Zellen auf die Behandlung mit der niedrigen Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$  beobachtet. Die MCF-7 Zelllinien zeigten dagegen eine schwächere Dosisabhängigkeit. MCF-7wildtyp und MCF-7adr Zellen reagierten in ähnlicher Weise auf die Behandlung, bei den MCF-7mdr Zellen war der Anstieg von ATP in Reaktion auf die niedrige Dosis sogar ausgeprägter als auf die hohe. Die 10stündige Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin führte bei den MCF-7 Zellen zu einem Doppelpeak mit einem lokalen Minimum bei ca. 5 h nach Behandlungsbeginn, der bei der MCF-7mdr Mutante besonders deutlich war. Die AMP Konzentrationen der MCF-7wildtyp Zellen stiegen dosisunabhängig nach 2 h drastisch an, ein Verhalten, daß bei keiner anderen Zelllinie beobachtet wurde. Bei Sphäroiden war der Effekt insgesamt schwächer ausgeprägt als bei Monolayern. Die Sphäroide der Zelllinien T47D und MCF-7adr unterschieden sich weniger in der Höhe des gemessenen ATP- oder GTP-Anstiegs, als vielmehr im zeitlichen Gang des Effekts. Der mäßige aber statistisch signifikante Anstieg von 20 bis 30 % von ATP und GTP erfolgte bei MCF-7adr Sphäroiden bereits nach 1 bis 2stündiger Behandlung, während er bei T47D Sphäroiden erst nach 6-8 h erfolgte. Die Werte blieben jeweils für 2-4 h erhöht.

Die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen z.T. die Untersuchungen von Dahan-Grobgeld (1997) und von Neeman et al. (1990). NMR-Spektroskopie *in vivo* hatte einen ca. 45%igen Anstieg der alpha, beta und gamma NTP-Signale bei T47D und MCF-7 Monolayern sowie einen ca. 30 %igen Anstieg bei MCF-7adr Monolayern nach ca. 6stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin ergeben. In T47D Sphäroiden fand Dahan-Grobgeld (1997) ein ähnliches Verhalten. Neeman hatte beschrieben, daß es sich bei dem Effekt hauptsächlich um einen Anstieg von ATP und GTP handelt, während UTP und CTP unverändert blieben oder eher abnahmen.

Unsere Untersuchungen bestätigen, daß GTP relativ zur unbehandelten Kontrolle am stärksten ansteigt. Da die absoluten Konzentrationen jedoch unter denen von ATP liegen ist unsicher, ob es auch als Hauptträger des mit der NMR gemessenen Anstiegs der Nukleosidtriphosphate gelten kann. Weiterhin zeigten unsere Ergebnisse, daß T47D Zellen wesentlich stärker auf das hochdosierte Chemotherapeutikum reagierten als MCF-7 Zellen, der Anstieg von ATP war bei T47D Zellen um mindestens 10 % und der von GTP um mindestens 30 % höher, als bei der

anderen Zelllinie. Die von Neeman beschriebene Dosisabhängigkeit konnte hier ebenfalls zumindest für Monolayer bestätigt werden, Sphäroide hingegen zeigten keine ausgeprägte Dosisabhängigkeit. In ihrer Arbeit berichtet Neeman von einem Anstieg von NTP bei T47D Zellen um ca. 25 % in Reaktion auf eine 6stündige Behandlung mit der niedrigen Dosis von 0,1  $\mu\text{M}$ , der unseren Beobachtungen zufolge jedoch nur bei Sphäroiden auftritt, während die Monolayer nicht oder nur ausgesprochen schwach mit Anstiegen der Purinnukleotide auf diese Dosis reagierten. Ein wie bei Dahan-Grobgeld (1997) beschriebener Anstieg der Purinnukleosidphosphate von MCF-7 Zellen nach 24- oder 50stündiger Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin wurde bei den HPLC Messungen nicht beobachtet, sondern die Adenosinnukleosidphosphate stiegen bei dieser Zelllinie bereits nach 1-2stündiger Behandlung vorübergehend an, um nach 8 h einen weiteren leichten Anstieg zu zeigen. Die Werte blieben dann teilweise erhöht oder sanken zum Versuchsende weniger stark ab als bei der Kontrolle, so daß es zwar einen relativen Anstieg gab, der jedoch eher auf methodische Bedingungen zurückzuführen ist.

Die im Rahmen unserer Arbeit durchgeführten MRS-Messungen zeigten jedoch keinen Anstieg der NTP-Signale bei MCF-7 Monolayern nach der Behandlung mit 1,0  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und nur einen sehr undeutlichen bei Sphäroiden derselben Zelllinie nach der Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$ . Die Behandlung mit der hohen Dosis hatte ein starkes Zellsterben ab ca. 10 h nach Behandlungsbeginn zur Folge, die Signalintensität nahm stark ab. Dieser Effekt wurde während der Behandlung mit der niedrigen Dosis nicht beobachtet; die Signale stiegen zwar beim MCF-7wildtyp nicht weiter an, wie bei den resistenten Zellen, erreichten aber ca. 7 h nach der Behandlung ein Plateau mit einem sehr geringen Abwärtstrend. Möglicherweise wirkte hier ein leichter wachstumsbedingter Anstieg der NTP-Signale der Signalabschwächung durch das moderate Zellsterben bei dieser Dosis entgegen.

Die für eine klinische Relevanz des Effektes wichtigste Frage ist, ob der Anstieg der Purinnukleotide tatsächlich in Zusammenhang mit dem Zelltod oder zumindest der Cytostase steht. Wie im vorherigen Kapitel (6.1) beschrieben reagierte die T47D Zelllinie in Aspekten wie Vitalität, Zellwachstum, Klonogenität und DNA Synthese am empfindlichsten von den hier vorgestellten Zelllinien auf das Doxorubicin, was sowohl für die hohe wie auch die mittlere und niedrige Konzentrationen von Doxorubicin zutrifft. Nur die hohe Dosis von 10  $\mu\text{M}$  führte jedoch zu einem massiven Zelltod innerhalb der ersten 8 Behandlungsstunden. Parallel hierzu wurde ein drastischer Anstieg von ATP und GTP, sowie etwas geringere Anstiege von AMP, ADP und GMP beobachtet. Die gleiche Behandlung der anderen Zelllinien oder eine niedrigere Dosierung des Medikaments hatte einen geringeren Verlust an Vitalität und dabei einen deutlich schwächeren Anstieg dieser Metabolite zur Folge. Der Effekt ist also in Zusammenhang mit dem Zelltod zu sehen und kann als Therapieantwort gelten; er ist jedoch an ein massives, eher nekrotisches Zellsterben gekoppelt und kann nicht als ein Signal für oder als Folge von apoptotischen Vorgängen bewertet werden. Auch unsere MRS-Untersuchungen bestätigten, daß der Effekt nur einem umfangreichen Zellsterben vorausgeht, bei geringeren Zellschäden jedoch nicht auftritt. Da besonders deutlich bei den MCF-7 Zelllinien beide Arten des Zelltodes parallel abliefen und diese Zellen mit einem relativ schwachen Anstieg der Purinnukleotide auf

die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin reagierten, besteht die Möglichkeit, daß tatsächlich nur die Nekrosen zu dem Effekt beitragen und der Gesamtanstieg in Relation zur Verminderung der mittleren Zellvitalität durch die gleichzeitig auftretenden Apoptosen sogar vermindert wird.

Für wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirkung von Chemotherapeutika kann die Anwendung derart hoher Dosierungen von Nutzen sein. Der Effekt ist bei den T47D Zellen sehr deutlich und sollte problemlos mit MRS Methoden an Zellkulturen nachgewiesen werden können. Er deutet auf eine ausgeprägte Empfindlichkeit einer Zelllinie auf eine Behandlung hin und wird in abgeschwächter Form auftreten, wenn die Zellen Resistenzen entwickeln. Sofern die Zellen jedoch von vornherein weniger empfindlich sind oder das Medikament seine Wirkung erst über längere Zeiträume hinweg oder auf cytotatischem Wege entfaltet, ist es unwahrscheinlich, daß der Effekt mit Hilfe der NMR beobachtet werden kann.

Die Konzentrationen von Doxorubicin im Tierversuch oder bei Patienten sind jedoch wesentlich geringer als alle hier verwendeten ( $50\text{mg}/\text{m}^2$  (Amadori et al., 1996) entspricht grob geschätzt 0,5 nM). Infolge einer solchen Behandlung ist ein moderates Zellsterben und die Induktion von Apoptosen zu erwarten, wobei im Verlauf einer fraktionierten Behandlung über einen längeren Zeitraum hinweg eine Tumorrogression erreicht wird. Die vorgelegten Ergebnisse von Monolayerkulturen lassen die Einschätzung zu, daß der Effekt in diesem Fall kaum meßbar sein wird. Da bei Sphäroiden jedoch keine ausgeprägte Dosisabhängigkeit beobachtet wurde und die Nukleotidveränderungen bei T47D- und MCF-7adr Sphäroiden unterschiedlich stark waren, könnte auch bei Tumoren die Therapieantwort relativ unabhängig von der Dosis sein, da das dreidimensionale Tumormodell der Situation *in vivo* wesentlich ähnlicher ist als die Monolayer. Leider wurden bislang keine entsprechenden NMR-Untersuchungen an Tumoren dieser Zelllinien durchgeführt.

Dahan-Grobgeld beobachtete jedoch MCF-7 Tumoren in Nacktmäusen bei Konzentrationen von ca. 0,05 bis 0,1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin von 16–24 h. Die Messungen ergaben im Verlauf der Behandlung eine Verdopplung des NTP/Pi Quotienten. Dieses Ergebnis beruhte allerdings teilweise auf einem starken Abfall der Pi Konzentrationen, dessen Ursache nicht geklärt werden konnte. Um zu klären, ob bei Tumoren der MCF-7 Zelllinie tatsächlich eine Therapieantwort meßbar ist, bleibt damit ungeklärt.

Um eine mögliche Relevanz des beobachteten Effekts für die Entwicklung prognostischer Verfahren zu evaluieren, sollten zunächst weitere MRS-Untersuchungen an Sphäroiden durchgeführt werden. Interessant sind dabei besonders niedrige Dosierungen des Chemotherapeutikums, die einer Tumorbehandlung *in vivo* ähnlich sein sollten. Für die Durchführung der Experimente ist die Wahl des zeitlichen Meßfensters entscheidend. Vor der Behandlung sollten die Zellaggregate eine Plateauphase des Volumenwachstums erreicht haben, damit natürliche Wachstumsschübe ausgeschlossen werden können. Die Messung sollte über den längstmöglichen Zeitraum laufen, also bis ein deutlicher Signalabfall einsetzt, da nicht sicher ist, zu welchem Zeitpunkt ein Anstieg der Nukleotide bei einer sehr niedrigen Konzentration zu erwarten ist. Sinnvoll scheint zunächst die ausschließliche Verwendung von T47D Sphäroiden, da sie in den beschriebenen Versuchen den deutlichsten Effekt zeigten. Bevor weitere Zelllinien eingesetzt werden, sollten *in vivo* Experimente mit implantierten T47D Tumoren durchgeführt werden. Es ist ausgesprochen unwahrscheinlich, daß bei anderen

Zelllinien Effekte gemessen werden, wenn sie unter gleichen Bedingungen bei T47D Zellen nicht zu beobachten sind.

Sollte es gelingen aufgrund einer verminderten Dosisabhängigkeit bei dreidimensionalen Zellkulturen oder Tumoren *in vivo* den beschriebenen Effekt reproduzierbar und deutlich zu messen, wäre es auch möglich, bei demselben Tumor Resistenzbildungen im Behandlungsverlauf zu beobachten. Eine Prognose der Sensitivität bzw. Resistenz eines Tumors gegenüber einem Chemotherapeutikum anhand eines besonders schwachen Signals ist allerdings fragwürdig, da viele Medikamente eher cytostatisch und dennoch recht erfolgreich wirken, jedoch nicht zu einem Anstieg der Nukleotide führen würden.

### 6.3 Darstellung der Doxorubicinwirkung mit Hilfe bildgebender Verfahren

Der Vergleich der statistischen Auswertung von ATP-Gehalten von T47D Sphäroiden, die für 24 h mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelt wurden, ergab übereinstimmende Ergebnisse der HPLC und der abbildenden Biolumineszenz. Der vorübergehende Anstieg von ATP während der Inkubation konnte auf diese Weise mit Hilfe einer zusätzlichen Methode nachgewiesen werden. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode der abbildenden Biolumineszenz (Mueller-Klieser and Walenta 1993 (*Review*)) bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit, die lokalen Verteilungen der Metabolite ATP, Laktat und Glukose innerhalb einer Gewebeprobe abzubilden. Die der Zelldesintegration vorausgehenden Anstiege von ATP innerhalb eines Sphäroids wären möglicherweise darstellbar gewesen, sofern sie massiv und auf ein Areal des Zellaggregats begrenzt aufgetreten wären. Da jedoch die einzige beobachtete Häufung von Zellschäden im äußeren Randbereich der Sphäroide auftrat (siehe auch Wartenberg et al. 1998) und dort die in Kap. 5.8.1 und 5.8.2 beschriebenen Gradienten durch optische Effekte und laterale Diffusion entstehen, war es mit der derzeit verwendeten Methode nicht möglich, den vorübergehenden ATP-Anstieg innerhalb eines Sphäroidquerschnittes zu lokalisieren. Die für solche Untersuchungen empfohlenen Änderungen des Systems sind in Kap. 5.8.2. aufgeführt.

Die Beobachtung von ausgedehnten Zellschäden und der Verkleinerung der Sphäroide als Modell der Tumorregression war mit Hilfe der Darstellung von ATP-Verteilungen dagegen möglich. Ab 24 h nach Behandlungsbeginn wurden bei den mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin inkubierten T47D Sphäroiden größere Lücken im Zellverband sichtbar, die teilweise mit Hilfe der Biolumineszenz abgebildet werden konnten. Spätestens zu diesem Behandlungszeitpunkt sollte es mit einer größeren optischen Auflösung, die nur einen Teilbereich des Gefrierschnittes erfaßt möglich sein, die Zellschädigung anhand der ATP-Verteilungen darzustellen. Unsere Untersuchungen zeigten besonders nach 48 bzw. 50stündiger Behandlung, daß die ATP-Gehalte im Sphäroidzentrum länger erhalten bleiben als in den äußeren Randbereichen. Dieses Ergebnis wurde durch die histologischen Untersuchungen bestätigt, in denen deutlich intakte Zellen im zentralen Bereich des Zellaggregats erkennbar waren, während es nach außen hin zerfiel, wodurch auch das Sphäroidvolumen stark abnahm. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den TUNEL-Färbungen an Sphäroiden, die gezeigt hatten, daß die induzierten Apoptosen zumindest anfänglich bevorzugt in den äußeren Bereichen auftraten.

Die von Breidt (1998) im Rahmen unseres Projektes durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe der NMR-Diffusionsbildgebung haben gezeigt, daß es möglich ist, ein einzelnes Sphäroid *in vivo* über die Dauer von 40 h zu beobachten und die Wirkung von Cytotoxika auf das Zellaggregat zu verfolgen. Während nach 7stündiger Inkubation mit HEMA eine Ausweitung der Zentralnekrose eines T47D Sphäroids erkennbar war, konnte eine deutliche Wirkung von Doxorubicin erst nach 24 h beobachtet werden und erst nach 40 h waren Schäden im Zellverbandes sichtbar. Nach 16stündiger Inkubation mit 10 µM Doxorubicin erschien der gesamte Sphäroidbereich aufgrund erleichterter Diffusion etwas heller; vermutlich aufgrund einer Auflockerung des Zellverbandes, die histologisch bereits nach 8stündiger Behandlung durch häufigere Zellschäden und teilweise Lückenbildung im Zellverband erkennbar war. Mit Hilfe der Biolumineszenz konnten diese ersten Anzeichen der Desintegration nicht aufgelöst werden. Nach 24stündiger Behandlung war der nekrotische Bereich im NMR-Diffusionsbild deutlich heller als vor der Applikation des Chemotherapeutikums und auch die Dicke der vitalen Randschicht war teilweise vermindert. Die histologische Struktur von T47D Sphäroiden nach gleicher Behandlungsdauer (Kap. 4.1.4 Abb. 10c und Kap. 4.4 Abb. 39e) zeigten deutliche Lücken im Zellverband, eine Vergrößerung oder Induktion der Zentralnekrose wurde jedoch weder histologisch noch mit Hilfe der bildgebenden Biolumineszenz beobachtet. Da die Sphäroide individuell unterschiedlich auf das Medikament reagierten, hat der von Breidt an einem Sphäroid beobachtete Effekt nicht unbedingt allgemeine Gültigkeit. Außerdem war das Sphäroid während der Behandlung im NMR Röhrchen im Gegensatz zu den Exemplaren in den Spinnerflaschen keiner Bewegung und damit auch keinen Scherkräften ausgesetzt. Möglicherweise tragen die unterschiedlichen Meßmethoden zu differierenderen Ergebnissen bei. Die Auflösungserscheinungen des Zellaggregats nach 50stündiger Einwirkung von Doxorubicin (Kap. 4.1.4 Abb. 10d und Kap. 4.4 Abb. 39g) konnten im Diffusionsbild verfolgt werden, der dichte Bereich vitaler Zellen wirkte deformiert. Wie Breidt bereits in seiner Arbeit erwähnt ist die NMR-Bildgebung bislang kein Ersatz für histologische oder biochemische Methoden, dennoch konnte gezeigt werden, daß selbst sehr kleine Objekte und geringe Effekte *in vivo* beobachtet werden können.

#### 6.4 Mögliche Ursachen eines Anstiegs des Purinnukleosidphosphatpools nach der Behandlung mit Doxorubicin

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß parallel zu den Nukleosidtriphosphaten auch die Mono- und Diphosphate anstiegen. Die Energieladung der Zellen veränderte sich im Versuchszeitraum nicht wesentlich. Außerdem war der Effekt deutlich abhängig von dem Ausmaß der Zellschädigung. Damit entfallen einige von verschiedenen Autoren (Cohen et al. 1987, Werhle et al. 1987, Steen 1989, Berghmans et al. 1992, Neeman et al. 1989, Boddie et al. 1998) angesprochene Möglichkeiten, den Anstieg der Nukleotide zu erklären, wie beispielsweise die von Neeman et al. (1989) und Boddie et al. (1998) diskutierte Übertragung einer Phosphatgruppe auf ADP durch Phosphocreatin; in diesem Fall würden weder AMP noch GMP ansteigen. Auch die Möglichkeit, daß während der Behandlung intrazelluläre



Nukleotidpools aktiviert werden, die mit der MRS nicht erfaßbar sind (Neeman et al. 1989), trifft für die hier angewandten Extraktionen nicht zu, da auch gebundene Nukleosidphosphate extrahiert werden, sofern die Bindung nicht kovalent ist. Ein verminderter Energieverbrauch durch die metabolische Inhibition infolge der Doxorubicinbehandlung wie Sanchez-Alcazar et al. (1997) sie für ActinomycinD vorschlagen, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da in einem solchen Fall Regulationsmechanismen den Nukleosidphosphatpool konstant halten würden. Auch der von Steen (1989) vorgeschlagene Anstieg der zellulären Energieladung aufgrund eines erhöhten Nährstoffangebotes durch die Verminderung der Gesamtzellzahl ist für unsere Ergebnisse nicht relevant. Ein Zusammenhang mit dem Zellzyklus wurde von Neeman ausgeschlossen, da Actinomycin-D und Doxorubicin unterschiedliche Einflüsse auf den Zellzyklus zeigten (siehe auch Dunkern 1997), aber denselben Effekt auf den Anstieg der Purinnukleotide hatten. In einem *in vitro* System von Monolayern oder Sphäroiden verbleiben somit nur die folgenden beiden Möglichkeiten:

a) de novo Synthese

b) Recycling von freien Basen über die Salvage Pathways

Beide Wege werden von Dahan-Grobgeld und Neeman bezweifelt:

Die de novo Synthese von Purinnukleotiden wurde von Dahan-Grobgeld (1997) verworfen. Da die <sup>13</sup>C-Spektren von markierten Adenosinnukleotiden von Zellen in <sup>13</sup>C-adeninhaltigem Medium und die gleichen Spektren von Zellen in Medium ohne Adeninmarkierung nach der Behandlung mit Doxorubicin jeweils <sup>13</sup>C-ATP Anstiege derselben Höhe zeigten, schloß sie einen Beitrag von externem Adenin zu dem Anstieg aus. Außerdem folgerte sie, daß eine verstärkte ATP Synthese aus Vorstufen durch dieses Ergebnis widerlegt sei. Das Experiment basierte zwar auf kalkulierten Werten, da NMR-Technik nicht ausschließlich ATP detektiert, sondern immer auch ADP und AMP oder den gesamten NTP Gehalt erfaßt. Dennoch sprechen die Befunde eher gegen eine Aufnahme von externem Adenin durch die Zellen zur Steigerung ihres Nukleosidphosphatgehaltes; die Ergebnisse widerlegen jedoch nicht die ATP-Synthese aus Vorstufen, denn die <sup>13</sup>C-Markierung betrifft alle adeninhaltigen Substanzen. Die de novo Synthese dient normalerweise zur Aufrechterhaltung des Nucleotidpools und ist energieaufwendig. Sie ist kaum dafür geeignet, den Pool insgesamt zu erhöhen, was physiologisch gesehen auch gar keinen Sinn ergibt. Selbst wenn der intrazelluläre Energiebedarf ansteigen würde (Boddie et al. 1998) oder der Energieverbrauch vermindert wäre (Sanchez-Alcazar et. al. 1997), hätte das keine Vergrößerung des Nucleotidpools zur Folge, sondern die Syntheserate würde beschleunigt oder verlangsamt, um das Gleichgewicht aufrecht zu erhalten.

Neeman et al. (1989) fanden mit Hilfe von HPLC-Messungen einen selektiven Anstieg von ATP und GTP, wohingegen die Konzentrationen von CTP und UTP während der Behandlung unverändert blieben oder sogar leicht absanken. Daraus folgerten sie, daß der Anstieg der Nucleotide nicht aus einer Freisetzung von Basen aus geschädigter RNA oder DNA stammen könne. Beim Recycling über die Salvage Pathways (Stryer 1990) werden jedoch nur Purinbasen und Thymidin in den Nucleotidpool geschleust. Es entstehen Purinribonucleotide (AMP, GMP und IMP), die nur dann zur Bildung von Pyrimidinnucleotiden beitragen, wenn eine

äquivalente Menge an UMP bereitsteht. Da TTP von Neeman nicht gemessen wurde, besteht die Möglichkeit, daß über diesen Weg tatsächlich erheblich mehr Purin-, als Pyrimidinnukleotide gebildet werden. Außerdem befinden sich die Nukleosidphosphate in ständigem Umbau, und die Gleichgewichte können je nach Bedarf verschoben werden. Daher wäre eine selektive Phosphorylierung in Richtung Purinnukleotide durchaus denkbar (z.B. ATP aus UDP und ADP), beispielsweise aufgrund eines hohen Bedarfs an Energie und Proteinsynthese. Sollte der Citratcyclus durch Doxorubicin tatsächlich leicht inhibiert werden (Neeman et al. 1989), dann wäre auch eine Verminderung der Aminierung von UTP zu CTP denkbar, für die Glutamin notwendig ist (über Ketoglutarat aus dem Citratcyclus). Ein Auftreten unphysiologisch hoher Mengen an Purinbasen würde den Anstieg aller Purinnukleotide erklären.

Ein Aspekt, der von keinem der genannten Autoren angesprochen wird, ist die selektive Interkalation von Doxorubicin ebenso wie Daunomycin und Actinomycin-D in die DNA bei der Basensequenz GpC (Stryer 1990, Taatjes et al. 1996 und 1997, Fenick 1997). Dadurch schiebt sich das Medikament zwischen zwei Guanosinreste der gegenüberliegenden DNA-Stänge, mit denen es Wasserstoffbrücken und kovalente Addukte bildet (siehe Kap. 2, Einleitung). Es ist wahrscheinlich, daß am Ort der Bindung von Doxorubicin an die DNA auch die Topoisomerase-induzierten Strangbrüche entstehen und damit letztendlich Guanosinbasen frei werden.

Die drei genannten Medikamente verursachten bei den Untersuchungen von Neeman et al. (1989) äquivalente Anstiege von Purinnukleotiden, die Behandlung mit anderen Medikamenten wie *cis*-Platin, Ara-C und Tamoxifen hingegen führte nicht zu ähnlichen Effekten. Die Ergebnisse verschiedener Autoren sind diesbezüglich allerdings widersprüchlich: Berghmans et al. (1992) beispielsweise fanden einen Anstieg von ATP bei resistenten und sensitiven humanen Ovarialcarcinomzellen sowie Rattenlymphomzellen nach Behandlung mit *cis*-Platin.

Einen interessanten Ansatz zur Erklärung des Phänomens liefern Sanchez-Alcazar et al. (1997), die einen Zusammenhang zwischen dem vorübergehenden Anstieg von ATP und dem Kopplungsgrad der Atmungskette zeigten. Eine Kombinationstherapie aus Actinomycin-D und TNF- $\alpha$  hatte hier keinen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch einer murinen Fibrosarcomlinie sowie einer humanen Hepatomlinie, jedoch fand in den ersten 3 h der Inkubation eine Steigerung des Kopplungsgrades von Elektronentransport und ATPase statt. Nach 4 h wurde eine starke Entkopplung gemessen, die nach 6 h wieder von einem Anstieg des Kopplungsgrades gefolgt war. Parallel zu diesen Ereignissen fand jeweils ein Anstieg bzw. Abfall von ATP statt, so daß eine Art Doppelpeak zu beobachten war, ähnlich dem, den die MCF-7mdr Zellen und etwas schwächer ausgeprägt auch der MCF-7wildtyp in der vorliegenden Arbeit in Reaktion auf drei verschiedene Doxorubicinkonzentrationen zeigten. Sanchez-Alcazar et al. definierten für ihre Experimente die oligomycin-sensitive Atmung, die durch Zugabe von TNF- $\alpha$  stark anstieg, als gekoppelte Atmung. Die ausschließliche Behandlung mit Actinomycin-D führte allerdings bei diesen Untersuchungen eher zu einer leichten Entkopplung der Atmung, wobei die Forscher den gleichzeitig gemessenen ATP Anstieg auf die verminderte Aktivität von energieintensiven Reaktionen wie Gentranscription und Proteinsynthesen zurückführten. Möglicherweise reagieren zumindest die MCF-7mdr Zellen dennoch mit einer Kopplungs – Entkopplungs – Sequenz auf die alleinige Behandlung mit Doxorubicin. Bei T47D Zellen hingegen konnte gezeigt werden, daß der ATP-GTP-Anstieg hauptsächlich aus der

oligomycinsensitiven Atmung stammt. Bei dieser Zelllinie scheint Doxorubicin daher die Atmung nicht oder nur in geringem Maße zu entkoppeln (Gorskaia et al. 1987, Nicolay 1984, Zbinden 1978). Infolge der Oligomycinbehandlung kam es zu einem massiven Anstieg von AMP, welches möglicherweise aufgrund des unphysiologischen Basenüberschusses bei gleichzeitig inhibierter Phosphorylierung entstand. Die Glykolyse war bei T47D Sphäroiden parallel zum ATP-Anstieg leicht stimuliert, so daß hier ein geringer Teil des ATPs auch aus der Glykolyse stammte. Obwohl bereits vielfach beschrieben wurde, daß die Mitochondrien im Verlauf der Apoptose relativ lange intakt bleiben (Kroemer et al. 1995, Studzinski 1995, Lizard et al. 1995, Petit et al. 1995, Zamzami et al. 1995), erstaunt doch der hohe Grad der Zellschädigung, bei dem immer noch große Mengen an Nukleosiden phosphoryliert werden können.

Über die möglichen physiologischen Auswirkungen eines Anstiegs von Purinnukleotiden nach einer Behandlung mit Chemotherapeutika wurde mannigfaltig spekuliert. Die Notwendigkeit eines die Mitochondrienmembran schützenden Mechanismus wurde besonders von Boddie (1998) angesprochen. Dazu gehört u.a. die Aktivierung des P-Glycoproteins (Endicott und Ling 1989), die Synthese von Sauerstoffradikalfängern wie Glutathion (GSH) (Meister and Anderson (1983) und die Synthese von bcl-2 (Lam et al. 1994, Lithgow 1994, Richter et al. 1996, Kluck et al. 1997, Yang et al. 1997, Smets et al. 1994). Außerdem benötigen die Zellen Reparaturenzyme für die geschädigte DNA und RNA, sowie Endonucleasen und weitere Enzyme, wenn sie letztendlich in die Apoptose eingehen. Die Bereitstellung von Energie in Form von ATP und für die Proteinsynthese als GTP sind also in jedem Fall unabdingbar. Eine Verschiebung der Phosphorylierung von Nukleosiden in Richtung der Purinnukleoside wäre daher sinnvoll. Möglicherweise setzt sich der Effekt aus einer Kombination aus einem unphysiologisch erhöhten Basenangebot, und einer Bedarfsregulation zusammen, wobei der Bedarf je nach Art der Zelle unterschiedlich ist.

## 6.5 Behandlung mit CR-6

Die Wirkung von Antioxidantien, darunter  $\alpha$ -Tocopherol, im Zusammenhang mit Doxorubicin wird umfangreich und oft widersprüchlich diskutiert. Doxorubicin und andere Chemotherapeutika gelten als Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche Lipidmembranen peroxidieren. In einigen Studien wurde die protektive Wirkung von Antioxidantien gegen verschiedene durch Chemotherapeutika verursachte Zellschäden und insbesondere gegen die Lipidperoxidation der Mitochondrienmembran beschrieben (Szczepanska et al. 1988, Pascoe 1987, Geetha 1989, Vile und Winterbourn 1989, Okamoto und Ogura 1985, Mimnaugh 1985). Die oxidative Schädigung der Mitochondrien wird in manchen Geweben noch verstärkt, indem es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Elektronenfluß von NADH zum Sauerstoff kommt, der zur Bildung von Superoxidradikalen ( $\text{O}_2^-$ ) führt, d.h. die angegriffenen Mitochondrien produzieren ihrerseits zusätzliche Sauerstoffradikale (Sokolove 1994, Richter 1995, Richter 1997, Hall und Wiley 1998, Lemasters 1998, Kowaltowski 1999). Die zelluläre Abwehr von ROS versagt teilweise, nicht nur weil neben einem gesteigerten Verbrauch von Antioxidantien auch die Proteinsynthese und damit der Nachschub an

Abwehrstoffen inhibiert ist, sondern auch weil z. B. Doxorubicin direkt an Tocopherol bindet (Nwankwoala 1986).

Andere Autoren hingegen beschreiben, daß Tocopherylquinone in niedriger Konzentration antioxidativ wirken, in hoher Konzentration jedoch prooxidativ und eine dosisabhängige Cytotoxizität zeigen (Thornton et al. 1995). Ein Ester aus Retinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol wirkte cytostatisch und differenzierend auf Leukämiezellen (Makishima et al. 1998), Melanome konnten mit Antioxidantien wie Tocopherolderivaten erfolgreich therapiert werden (Borovansky 1997) und Tocopherol sowie Tocopherolacetat verkürzten das Überleben bei doxorubicinbehandelten Mäusen signifikant, wobei die Konzentrationen von Aglykon, dem Hauptmetaboliten von Doxorubicin, in den Lebermitochondrien drastisch erhöht waren (Shinozawa et al. 1988). Auch bei Prostata Adenocarcinomen von Ratten (Nesbitt et al. 1988) und humanen Prostatacarzinonzellen *in vitro* (Ripoll et al. 1986) verstärkte Tocopherol den cytostatischen Effekt von Doxorubicin signifikant, es wurden sowohl additive als auch synergistische Effekte in Abhängigkeit von der Tocopherolkonzentration beobachtet.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Substanz CR-6 (3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran) wurde von Montoliu et al. (1999) als NO-Fänger beschrieben und reduzierte die glutamatinduzierte Bildung von cGMP. Es handelt sich bei dem Stoff um ein Tocopherolanalogon, dessen Eigenschaften in Bezug auf die Wirkung von Doxorubicin und die Resistenz von MCF-7adr Zellen in der vorliegenden Arbeit am Sphäroidmodell untersucht wurden.

Die an Monolayern durchgeführten WST Tests mit T47D Zellen zeigten eine hohe Cytotoxizität von CR-6 in der Konzentration von 100  $\mu$ M, die um 20 % über der von hochdosiertem Doxorubicin lag, während niedrigere CR-6 Konzentrationen keine toxische Wirkung hatten. Außerdem zeigte die Kombination von 10  $\mu$ M Doxorubicin und 1  $\mu$ M CR-6 ebenfalls eine gegenüber reinem Doxorubicin erhöhte Wirkung, die etwa derjenigen von 100  $\mu$ M CR-6 entsprach. Auf die MCF-7adr Zellen wirkte reines CR-6 nicht toxisch, wobei dieses Ergebnis nicht unbedingt mit der Doxorubicinresistenz dieser Zellen zusammenhängen muß, es können auch andere Unterschiede im Stoffwechselgeschehen zwischen den beiden Zelllinien die Ursache sein. Die Kombinationstherapie aus CR-6 und Doxorubicin verstärkte jedoch auch bei dieser Zelllinie in Abhängigkeit von der CR-6-Dosis die toxische Wirkung von Doxorubicin. Dieses Ergebnis weist auf eine CR-6 induzierte Verminderung der Resistenz von MCF-7adr Zellen gegenüber Doxorubicin hin. Die Wachstumskurven von MCF-7adr Sphäroiden bestätigten das Ergebnis. Die Klonogenität von MCF-7adr Sphäroiden wurde durch die alleinige Gabe von CR-6 nicht beeinträchtigt. Auch reines Doxorubicin in der Dosierung von 0,1  $\mu$ M zeigte während der ersten 8 Inkubationsstunden keine Wirkung, nach 24 h jedoch nahm die Klonogenität um ca. 20 % gegenüber der Kontrolle ab. Die hohe Doxorubicindosis zeigte eine ähnliche Wirkung bereits nach 1 bis 3stündiger Inkubation, ab 6 h sank die Klonogenität um ca. 50 % und blieb bis zu 24 h unverändert. Die Kombinationstherapie aus CR-6 und Doxorubicin zeigte sowohl bei der hohen als auch bei der niedrigen Doxorubicindosis eine Verminderung der Klonogenität nach 1 bis 3stündiger Inkubation um ca. 30 % gegenüber der Kontrolle. In diesem Zeitraum zeigten beide Substanzen also eine synergistische Wirkung. Im weiteren

Inkubationsverlauf kam es jedoch zu einer deutlichen Erholung der kombiniert therapierten Zellen gegenüber der Wirkung von reinem Doxorubicin. Dennoch wurde eine stärkere Reduktion des Sphäroidvolumens bei mehrtägiger Kombinationstherapie gegenüber der alleinigen Doxorubicinbehandlung beobachtet. Die Ergebnisse zeigen eine deutlich verstärkte Therapiewirkung durch die Kombination von CR-6 und Doxorubicin gegenüber reinem Doxorubicin bei resistenten Zellen.

Die ATP und GTP Konzentrationen der mit CR-6 oder der Kombination aus CR-6 und Doxorubicin behandelten MCF-7adr Sphäroide lagen ca. 40 % über denen der mit reinem Doxorubicin inkubierten Zellen; der für diese Sphäroide typische frühe, kurze ATP bzw. GTP-Anstieg wurde in Verbindung mit CR-6 jedoch nicht beobachtet. Mit Bezug auf unsere in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist davon auszugehen, daß dieser Effekt einem vermehrten Zellsterben durch die Kombinationstherapie gegenüber der Einzelgabe von Doxorubicin vorausgeht.

Die kovalente Adduktbildung von Doxorubicin mit 5'-GpC-3' Sequenzen wird durch reduzierende Agenzien verstärkt. Besonders Formaldehyd führt zu langlebigen Bindungen des Medikaments an Desoxyguanosinnukleotide (Zhang et al. 1993, Gao et al. 1991, Taatjes et al. 1997). Bartoszek und Wolf (1992) beobachteten diesen Effekt bei der Behandlung von MCF-7 Zellen mit Doxorubicin nach Zugabe von NADPH und Cytochrom P450 Reduktase. Auch bei *in vivo* Experimenten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Averbusch et al. 1985). Es ist daher durchaus möglich, daß CR-6 ebenfalls die Adduktbildung von Doxorubicin mit der DNA begünstigt und auf diese Weise zur Steigerung der toxischen Wirkung beiträgt. CR-6 wurde bislang kaum untersucht; es sollte aufgrund seiner vielversprechenden Eigenschaften unbedingt weiter erforscht und möglicherweise zur Therapie eingesetzt werden.

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nährmedien und Zusätze.....	8
Tabelle 2: Vitalität der Zellen nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin in % der unbehandelten Kontrolle.....	19
Tabelle 3: Vitalität der Zellen nach Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin in % der unbehandelten Kontrolle.....	20
Tabelle 4: Anstiege von Purinnukleotidphosphaten nach Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin. Hinter den Absolutwerten steht jeweils die Zeit des/der Maximums/Maxima nach Behandlungsbeginn (h).....	42
Tabelle 5: Anstiege von Purinnukleotidphosphaten nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin. Hinter den Absolutwerten steht jeweils die Zeit des Maximums nach Behandlungsbeginn (h).....	42
Tabelle 6: Anstiege von Purinnukleotidphosphaten in % von K nach Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin. Hinter den Prozentangaben steht jeweils die Zeit des Maximums nach Behandlungsbeginn (h).....	59
Tabelle 7: Anstiege von Purinnukleotidphosphaten in % von K nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin. Hinter den Prozentangaben steht jeweils die Zeit des Maximums nach Behandlungsbeginn (h).....	59
Tabelle 8: Ergebnisse der WST Tests mit T47D Monolayern.....	71
Tabelle 9 : Ergebnisse der WST Tests mit MCF-7adr Monolayern.....	72

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkmechanismen von Doxorubicin.....	3
Abbildung 2: Vergleich der Ergebnisse von WST-Tests mit verschiedenen Zelllinien, nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin.....	19
Abbildung 3: Vergleich der Ergebnisse von WST-Tests mit verschiedenen Zelllinien, nach Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin.....	20
Abbildung 4: T47D Monolayer auf beschichteten Objektträgern (Chamberslides) gewachsen.....	22
Abbildung 5: MCF-7 Monolayer auf beschichteten Objektträgern (Chamberslides) gewachsen.....	23
Abbildung 6: Ki67 Färbung mit auf Chamberslides gewachsenen MCF-7wildtyp Monolayern, nach 10 bis 60minütiger Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin.....	24
Abbildung 7: MCF-7adr Monolayer auf beschichteten Objektträgern (Chamberslides) gewachsen.....	25/26
Abbildung 8: Wachstumskurve von MCF-7adr und T47D Sphäroiden nach Behandlung mit Doxorubicin.....	27
Abbildung 9: T47D Sphäroid nach 24stündiger Behandlung mit 10 $\mu\text{M}$ Doxorubicin, TUNEL-Färbung (invertiert).....	28
Abbildung 10: Gefrierschnitte von behandelten T47D Sphäroiden mit H&E sowie TUNEL gefärbt.....	29
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Zellen aus behandelten T47D Sphäroiden.....	30
Abbildung 12: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von Monolayer-DNA.....	31
Abbildung 13: Abhängigkeit des Nukleotidphosphatgehalts in fmol / Zelle $\pm$ SD von der Kultivierungsdauer bei T47D Zellen.....	32
Abbildung 14: Absolutwerte der Purinnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin behandelten T47D Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen... ..	34/35
Abbildung 15: Absolutwerte der Purinnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin behandelten MCF-7 Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen... ..	36/37
Abbildung 16: Absolutwerte der Purinnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin behandelten MCF-7adr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen... ..	38/39
Abbildung 17: Absolutwerte der Purinnukleosidphosphate (fmol/Zelle) von mit jeweils 10 und 0,1 $\mu\text{M}$ Doxorubicin behandelten MCF-7mdr Monolayern und ihren unbehandelten Kontrollen... ..	40/41
Abbildung 18: ATP Konzentrationen unbehauelter T47D Monolayer von verschiedenen Versuchen.....	43

Abbildung 19: ADP Konzentrationen behandelter und unbehandelter MCF-7 Monolayer, Darstellung des reinen Behandlungseffekts.....	44
Abbildung 20: Nukleosidphosphate von behandelten T47D Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle.....	45
Abbildung 21: Nukleosidphosphate von behandelten MCF-7 Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle.....	46
Abbildung 22: Nukleosidphosphate von behandelten MCF-7adr Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle.....	47
Abbildung 23: Nukleosidphosphate von behandelten MCF-7mdr Monolayern in % der unbehandelten Kontrolle.....	48
Abbildung 24: Adeninnukleosidphosphatgehalte von T47D Sphäroiden (Absolutwerte).....	50
Abbildung 25: Guanosinnukleosidphosphatgehalte von T47D Sphäroiden (Absolutwerte).....	51
Abbildung 26: Purinnukleosidphosphatgehalte von T47D Sphäroiden in % der unbehandelten Kontrolle.....	53
Abbildung 27: Purinnukleosidphosphatgehalte von MCF7adr Sphäroiden( Absolutwerte)....	58/59
Abbildung 28: Purinnukleosidphosphatgehalte von MCF7adr Sphäroiden in % der unbehandelten Kontrolle.....	56
Abbildung 29: Purinnukleosidphosphatgehalte von behandelten T47D Monolayern und Sphäroiden im Vergleich.....	57
Abbildung 30: Dosisabhängigkeit des Nukleotidanstiegs bei T47D Monolayern und Sphäroiden während der Behandlung mit Doxorubicin.....	58
Abbildung 31: Purinnukleotidgehalte der verwendeten Zelllinien im Vergleich.....	61
Abbildung 32: AMP und ADP Konzentrationen von unbehandelten T47D und MCF-7adr Sphäroiden.....	62
Abbildung 33: Purinnukleosidphosphatgehalte von behandelten T47D und MCF-7adr Sphäroiden.....	63
Abbildung 34: Vergleich der absoluten ATP Konzentrationen in T47D Sphäroiden gemessen mit HPLC und Biolumineszenz.....	64
Abbildung 35: NMR-Messungen an MCF-7wildtyp und MCF-7adr Monolayern.....	65
Abbildung 36: Adenosinnukleosidphosphate von T47D Monolayern nach Behandlung mit Doxorubicin und Oligomycin.....	66
Abbildung 37: ATP und Laktatmessungen an behandelten T47D Sphäroiden mit Hilfe der Biolumineszenz.....	67
Abbildung 38: Gesamtgehalt an Adenosinnukleotiden bei T47D Zellen nach der Behandlung mit 10 µM Doxorubicin.....	68
Abbildung 39: Durchlicht – Mikroskopie und lokale ATP Verteilung von T47D Sphäroiden nach Behandlung mit 10µM Doxorubicin.....	70
Abbildung 40: Purinnukleosidphosphatgehalte von T47D Zellen, behandelt mit Doxorubicin und CR6.....	71
Abbildung 41: Purinnukleosidphosphatgehalte von MCF-7adr Zellen, behandelt	



mit Doxorubicin und CR6.....	72
Abbildung 42: Klonogenität von behandelten MCF-7adr Sphäroiden in % der unbehandelten Kontrolle.....	73
Abbildung 43: Wachstumskurven von MCF-7adr Sphäroiden während einer Behandlung mit Doxorubicin, 100 $\mu$ M CR-6 bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen....	74
Abbildung 44: Purinnukleotidkonzentrationen (% von Kontrolle) von MCF-7adr Sphäroiden während einer 24stündigen Behandlung mit 10 $\mu$ M Doxorubicin, 100 $\mu$ M CR-6 oder einer Kombination aus beiden Substanzen.....	75
Abbildung 45: Volumenwachstumskurven von T47D, MCF-7 und MCF-7adr Sphäroiden im Verlauf einer 20 bzw. 45tägigen Behandlung mit 10 bzw. 1,0 oder 0,1 $\mu$ M Doxorubicin (Dunkern und Mueller-Klieser 1999).....	84

- Aftab DT, Yang-JM, Hait-WN "Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-Glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells" *Oncol-Res* 6(2): 59-70 1994
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD "Molekularbiologie der Zelle" *VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim* 1986
- Amadori D, Frassinete G, Zoli, C, Tienghi, A, Ravaioli, A, Gentile, A, Salzano, E "A phase ½ study of sequential Doxorubicin and Paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer" *Seminars in Oncology* Vol 23, No 5, Suppl 11 (October), 16 – 22, 1996
- Berghmans K, Ruiz-Cabello J, Simkins H, Andrews PA, Cohen JS "Increase in the ATP signal after treatment with cisplatin in two different cell lines studied by 31P NMR spectroscopy" *Biochim Biophys Res Commun* 183: 114-120 1992
- Boddie AW, Constantinou A, Williams C, Reed A "Nitrogen mustard up-regulates Bcl-2 and GSH and increases NTP and PCr in HT-29 colon cancer cells" *British Journal of Cancer*, 00 (0): 000-000 1998
- Borovansky J "Experimental chemotherapy of murine melanomas: is there a discrepancy compared to clinical experience?" *Neoplasma*, 44(5): 277-81 1997
- Breidt J "Charakterisierung des Zelltodes an Mammakarzinom – Monolayern und – Sphäroiden mittels Diffusions – NMR - Bildgebung und NMR – Spektroskopie sowie cytotoxischer Testverfahren" Dissertation (nicht publiziert), *Fraunhofer - Institut für Biomedizinische Technik St Ingbert, Deutschland*, 1998
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma" *J-Biol-Chem* Sep 10, 248(17): 6251-3 1973
- Budworth J, Gant TW, Gescher A "Co-ordinate loss of protein kinase C and multidrug resistance gene expression in revertant MCF-7/Adr breast carcinoma cells" *Br-J-Cancer* 75(9): 1330-5 1997
- Chen G, Teicher BA, "Differential interactions of Pgp inhibitor thaliblastine with adriamycin, etoposide, taxol and anthrapyrazole CI941 in sensitive and multidrug-resistant human MCF-7 breast cancer cells" *Anticancer-Res* 1996 Nov-Dec, 16(6B): 3499-505 1996
- Chen G, Waxman DJ "Complete reversal by thaliblastine of 490-fold adriamycin resistance in multidrug-resistant (MDR) human breast cancer cells Evidence that multiple biochemical changes in MDR cells need not correspond to multiple functional determinants for drug resistance" *J-Pharmacol-Exp-Ther* Sep, 274(3): 1271-7 1995
- Cohen JS, Lyon RC, Chen C, Faustino PJ, Batist G, Shoemaker M, Rubalcabo E, Cowen KH "Differences in phosphate metabolic levels in drug sensitive and resistant human breast cancer cell lines determined by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy" *Cancer Res* 47: 3396-3401 1987

- Dahan-Grobgeld E "Metabolic alterations and cell death induced by DNA damaging drugs"  
Dissertation (nicht publiziert), *Weizman Institute of Science, Rehovot, Israel*, 1997
- D'Arpa P, Liu-LF "Topoisomerase-targeting antitumor drugs" *Biochim-Biophys-Acta* Dec 17, 1989(2): 163-77 1989
- Daschner PJ, Ciolino HP, Plouzek CA, Yeh GC "Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells" *Breast-Cancer-Res-Treat* 1999 Feb, 53(3): 229-40 1999
- Degani H, Ronen SM, and Furman E "Breast Cancer: spectroscopy and imaging of cells and tumors" *NMR in Physiology and Biomedicine*: 329-351, 1994
- Denis-Gay M, Petit JM, Mazat JP, Ratinaud MH "Modifications of oxido-reductase activities in adriamycin-resistant leukaemia K562 cells" *Biochem-Pharmacol* Aug 15, 56(4): 451-7 1998
- Doroshov J H "Role of reactive-oxygen metabolism in cardiac toxicity of anthracycline antiviatics In Anthracycline Antibiotics: New Analogues, Methods of Delivery and Mechanisms of Action" Priebe, W, Ed, ACS Symposium Series 574, *American Chemical Society: Washington DC* 259-276 1995
- Dunkern T "Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika in humanen Mammakarzinomsphäroiden" Diplomarbeit, *Inst Phys & Pathophys, Universität Mainz, Deutschland*, 1997
- Dunkern T and Mueller-Klieser W "Quantification of Apoptosis Induction by Doxorubicin in Three Types of Human Mammary Carcinoma Spheroids" *Anticancer Research* 19:3141-3146, 1999
- Endicott JA and Ling V "The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance" *Annu Rev Biochem* 58: 137-171 1989
- Fenick D J, Taatjes D J, Koch T H "Doxorform and Daunofom: Anthracycline-Formaldehyde Conjugates Toxic to Resistant Tumor Cells" *Journal of Medical Chemistry*, Vol 40, 16: 2452-2461 1997
- Gao Y G, Liaw Y C, Li Y K, van der Marel G, van Boom J H, Wang A H J "Facile formation of a crosslinked adduct by formaldehyde: molecular structure of the MAR70-d(CGT-nACG) covalent adduct" *ProcNatlAcadSci USA*, 88: 4845-4849 1991
- Geetha A, Catherine J, Shyamala-Devi-CS "Effect of alpha-tocopherol on the microsomal lipid peroxidation induced by doxorubicin: influence of ascorbic acid" *Indian-J-Physiol-Pharmacol* Jan-Mar, 33(1): 53-8 1989
- Gorskaia IA, Suslova AI, Kotel'nikova AV "Effect of rubomycin, carminomycin and adriamycin on respiration in liver mitochondria in various metabolic states, respiratory control and ADP/O ratio" *Biokhimiia* Jan, 52(1): 53-7 1987
- Hall KE, Wiley JW "Neural injury, repair and adaptation in the GI tract I New insights into neuronal injury: a cautionary tale" *Am-J-Physiol* Jun, 274(6 Pt 1): G978-83 1998
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis" *Science* 1997 Feb 21, 275(5303): 1132-6 1997

- Kolchinsky A, Roninson-IB "Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines" *Anticancer-Res* Sep-Oct, 17(5A): 3321-7 1997
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE "Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress" *Free-Radic-Biol-Med* Feb, 26(3-4): 463-71 1999
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B "The biochemistry of programmed cell death" *The FASEB Journal* 9: 1277-1287 (1995)
- Lam M, DUBYAK G, Muncz G, Mircsfeld R, DieCW "Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmatic reticulum associated Ca<sup>2+</sup> fluxes" *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6569-6573 1994
- Lelle RJ, Heidenreich W, Stauch G, Gerdes J "The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma" *Cancer* Jan 1, 59(1): 83-8 1987
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio-WE, Bradham-CA, Brenner-DA, Herman-B "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy" *Biochim-Biophys-Acta* Aug 10, 1366(1-2): 177-96 1998
- Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A "The protein product of the bcl-2 oncogene is a component of the nuclear envelope, the endoplasmatic reticulum and the outer mitochondrial membrane" *Cell Growth Diff* 5: 431-437 1994
- Liu L F "DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs" *Annu Rev Biochem* 58, 351-375 1989
- Liu-LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL "Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II" *J-Biol-Chem* Dec 25, 258(24): 15365-70 1983
- Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP "Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis" *Cytometry* 21: 275-283 1995
- Lown W J, Chen J A, Plambeck J A, Acton E M "Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclones and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects" *Biochem Pharmacol* 31, 575-581 1982
- Makishima M, Umesono K, Shudo K, Naoe T, Kishi K, Honma Y "Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells by 9-cis retinoic acid alpha-tocopherol ester (9-cis tretinoin tocoferil)" *Blood* Jun 15, 91(12): 4715-26 1998
- Meister A, Anderson ME "Glutathione" *Annu Rev Biochem* 52: 711-760 1983
- Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L "Apoptosis in murine tumors treated with chemotherapy agents" *Anti-Cancer Drugs* 6: 443-450 1995
- Mimnaugh EG, Fairchild CR, Fruehauf JP, Sinha BK "Biochemical and pharmacological characterization of MCF-7 drug-sensitive and AdrR multidrug-resistant human breast tumor xenografts in athymic nude mice" *Biochem-Pharmacol* Jul 5, 42(2): 391-402 1991
- Mimnaugh EG, Trush MA, Bhatnagar M, Gram TE "Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin" *Biochem-Pharmacol* Mar 15, 34(6): 847-56 1985

- Molinari A, Cianfriglia M, Meschini S, Calcabrini A, Arancia G "P-Glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells" *Int-J-Cancer* Dec 15, 59(6): 789-95 1994
- Montoliu C, Llansola M, Saez R, Yenes S, Messeguer A, Felipe V "Prevention of glutamate neurotoxicity in cultured neurons by 3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6), a scavenger of nitric oxide" *Biochem-Pharmacol* Jul 15, 58(2): 255-61 1999
- Mueller-Klieser W "Multicellular spheroids: a review on cellular aggregates in cancer research" *J Cancer Res Clin Oncol* 113: 101-122 1987
- Mueller-Klieser W, Walenta S, Paschen W, Kallinowski F, Vaupel P "Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting" *J-Natl-Cancer-Inst* Aug 3, 80(11): 842-8 1988
- Mueller-Klieser W, Walenta-S, Paschen-W, Kallinowski-F, Vaupel-P "Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting" *J-Natl-Cancer-Inst* Aug 3, 80(11): 842-8 1988
- Mueller-Klieser W, Walenta-S, Kallinowski-F, Vaupel-P, Fortmeyer-HP "Metabolic imaging in human tumor xenografts in rnu/rnu-rats using bioluminescence" *Strahlenther-Onkol* Jul, 165(7): 506-7 1989
- Mueller-Klieser W, Walenta S "Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging" *Histochem-J*, Jun 25(6): 407-20 1993
- Mueller-Klieser W "Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications" *American Physiological Society*: C1109-C1123 1997
- Neeman M, Eldar H, Rushkin E and Degani H "chemotherapy-induced changes in the energetics of human breast cancer cells, 31P- and 13C-NMR studies" *Biochim Biophys Acta* 1052: 255-263 1990
- Nesbitt JA, Smith J, McDowell G, Drag -JR "Adriamycin-vitamin E combination therapy for treatment of prostate adenocarcinoma in the Nb rat model" *J-Surg-Oncol* Aug, 38(4): 283-4 1988
- Nicolay K, Timmers RJ, Spoelstra E, Van-der-Neut R, Fok JJ, Huigen YM, Verkleij AJ, De-Kruijff B " The interaction of adriamycin with cardiolipin in model and rat liver mitochondrial membranes" *Biochim-Biophys-Acta* Dec 5 778(2): 359-71 1984
- Nwankwoala RN, West WL "Calmodulin and alpha tocopherol as additional binding sites for doxorubicin" *Cancer-Chemother-Pharmacol* 16(2): 133-8 1986
- Okamoto K, Ogura R "Effects of vitamins on lipid peroxidation and suppression of DNA synthesis induced by adriamycin in Ehrlich cells" *J-Nutr-Sci-Vitaminol-Tokyo* Apr, 31(2): 129-37 1985
- Olive PL, Durand-RE "Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics" *Cancer-Metastasis-Rev* Jun, 13(2): 121-38 1994
- Pascoe GA, Olafsdottir K, Reed DJ "Vitamin E protection against chemical-induced cell injury I Maintenance of cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism" *Arch-Biochem-Biophys* Jul, 256(1): 150-8 1987

- Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mingotte B: "Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis" *J Cell Biolog* 130: 157-167 1995
- Pommier Y "DNA topoisomerases and their inhibition by anthracyclines" In Anthracycline Antibiotics: "New Analogues, Methods of Delivery and Mechanisms of Action" Priebe, W, Ed, ACS Symposium Series 574, American Chemical Society: Washington DC 183-203 1995
- Ramachandra S and Studzinski G "Morphological and biochemical criteria of apoptosis" book, *technical approach* (7):119-142, 1996
- Richter C "Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis and respiration" *Biosci-Rep* Feb, 17(1): 53-66 1997
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer-M, Suter-M, Walter-P, Yaffee-M "Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases" *Biochim-Biophys-Acta* May 24, 1271(1): 67-74 1995
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C "Control of apoptosis by the cellular ATP level" *FEBS-Lett* Jan 8, 378(2): 107-110 1996
- Ripoll EA, Rama BN, Webber MM "Vitamin E enhances the chemotherapeutic effects of adriamycin on human prostatic carcinoma cells in vitro" *J-Urol* Aug, 136(2): 529-31, 1986
- Rocheffort H, Bardon S, Chalbos D, Vignon F "Steroidal and nonsteroidal antiestrogens in breast cancer cells in culture" *J-Steroid-Biochem* Jan, 20(1): 105-110 1984
- Sanchez-Alcazar JA, Ruiz Cabello J, Hernandez-Munoz-I, Pobre-PS, de-la-Torre-P, Siles-Rivas-E, Garcia-I, Kaplan-O, Munoz-Yague-MT, Solis-Herruzo-JA "Tumor necrosis factor-alpha increases ATP content in metabolically inhibited L929 cells preceding cell death" *J-Biol-Chem* Nov 28, 272(48): 30167-77 1997
- Shinozawa S, Gomita Y, Araki Y "Effect of high dose alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate pretreatment on adriamycin (doxorubicin) induced toxicity and tissue distribution" *Physiol-Chem-Phys-Med-NMR*, 20(4):329-35 1988
- Smets LA, van-den-Berg JD " Bcl-2 expression and glucocorticoid-induced apoptosis of leukemic and lymphoma cells" *Leuk-Lymphoma* Jan, 20(3-4): 199-205 1996
- Smith SR, Martin PA, Malwards RHT "Tumor pH and response to chemotherapy: in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy study in non-Hodgkin's lymphoma" *Br J Radiol* 64: 923-928 1991
- Sokolove PM "Interactions of adriamycin aglycones with mitochondria may mediate adriamycin cardiotoxicity" *Int-J-Biochem* Dec, 26(12): 1341-50 1994
- Steen RG "Response of solid tumors to chemotherapy monitored by *in vivo* 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy: a review" *Cancer-Res* Aug 1, 49(15): 4075-85 1989
- Stryer L "Biochemie" book, *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg*: 632 1990
- Studzinski GP: "Cell Growth and Apoptosis, a practical approach" *IRL Press at Oxford University Press* 1995

- Szczepanska I, Kopec-Szlezak, J Malec J "Inhibition of leucocyte migration by cancer chemotherapeutic agents and its prevention by free radical scavengers and thiols" *Eur-J-Haematol* Jan, 40(1): 69-74 1988
- Taatjes DJ, Gaudiano G, Resing K, Koch TH "redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs Adriamycin and Daunomycin" *Journal of Medicinal Chemistry* Vol 40, No 8, 1276-1286 1997
- Taatjes DJ, Gaudiano G, Resing K, Koch TH "alkylation of DNA by the anthracycline antitumor drugs adriamycin and daunomycin" *Journal of Medicinal Chemistry* 39(21):4135-4138, 1996
- Thornton DE, Jones KH, Jiang Z, Zhang H, Liu G, Cornwell DG "Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells" *Free-Radic-Biol-Med* Jun, 18(6): 963-76 1995
- Vile GF, Winterbourn CC "Microsomal lipid peroxidation induced by adriamycin, epirubicin, daunorubicin and mitoxantrone: a comparative study" *Cancer-Chemother-Pharmacol*, 24(2): 105-8 1989
- Wachsmuth I "Apoptosenachweis an unbestrahlten und bestrahlten V79-Sphäroiden" Diplomarbeit, *Inst Phys & Pathophys, Universität Mainz, Deutschland*, 1996
- Wartenberg M, Hescheler J, Acker H, Diederhagen H, Sauer H "Doxorubicin distribution in multicellular prostate cancer spheroids evaluated by confocal laser scanning microscopy and the "optical probe technique"" *Cytometry* Feb 1, 31(2): 137-45 1998
- Werhle JP, Rajan SS, Steen RG, Glickson JD "31P and 1H NMR spectroscopy of tumors *in vivo*, untreated, growth and response to chemotherapy" *Ann NY Acad Sci* 508: 200-215 1987
- Wilson JS, Korsten MA, Leo MA, Lieber CS "New technique for the isolation of functional rat pancreatic mitochondria and its application to models of pancreatic injury" *J-Lab-Clin-Med* Jan, 107(1): 51-8 1986
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked" *Science* Feb 21, 275(5303): 1129-32 1997
- Yuan Y, Zhang J, Zhou D "The reversion of multidrug resistance in tumour cell line MCF-7/Adr by ribozyme " *Chung-Hua-I-Hsueh-Tsa-Chih* Jul, 77(7): 494-6 1997
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch R, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Krämer G "Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death" *J Exp Med* 182: 367-377 1995
- Zbinden G, Bachmann E, Holderegger C "Model systems for cardiotoxic effects of anthracyclines" *Antibiot-Chemother* 23: 255-70 1978
- Zhang H, Gao Y G, van der Marel G, van Boom J H, Wang A H J "Simultaneous incorporations of two anticancer drugs into DNA The structures of formaldehyde-cross-linked adducts of daunorubicin-d(CG/araC)GCG) and doxorubicin-d(DA(araC)GTG) complexes at high resolution" *J Biol Chem*, 286: 10095-10101 1993

Zyad A, Benard J, Tursz T, Clarken R, Chouaib S "Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression" *Cancer-Res* Feb 1, 54(3): 825-31 1994