

Biochemische und
pharmakologische
Untersuchungen

4 Biochemische und pharmakologische Untersuchungen

Um die relative Rezeptoraffinität, die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften, sowie die Antitumorwirkung einer großen Anzahl von Substanzen effektiv bestimmen zu können, sind effiziente pharmakologische Testsysteme notwendig. Durch die Einführung eines Luciferase-Assays^[206, 207] an humanen Mammakarzinomzellen ist es möglich, detaillierte Kenntnisse über die agonistische und antagonistische Wirkung von Substanzen auf molekularer Ebene *in vitro* zu erhalten. Der früher häufig durchgeführte Uterusgewichtstest an juvenilen NMRI-Mäusen kann somit für das Screening umgangen werden, wodurch viele Tierversuche vermieden werden. Ein Problem des *in vitro*-Tests ist allerdings, dass durch ihn keine Prodrugs erkannt werden und nur Aussagen auf molekularer Ebene möglich sind. Die Evaluierung von antineoplastischen Wirkstoffen mit Hilfe der Zellkulturtechnik wird durch die hohe genetische Variabilität der Tumorzellen erschwert. Durch das häufige Passagieren der Zellen wird ein Selektionsdruck ausgeübt, der schon nach wenigen Passagen zur Veränderung der Zelllinie führt. Um dennoch auf identisches Zellmaterial zurückgreifen zu können, wird eine Tumorbank nach dem *seed stock* Prinzip nach Hay^[208] angelegt. Dabei wird eine möglichst frühe Passage einer Zelllinie eingefroren, auf die bei Veränderung der jeweiligen Zelllinie zurückgegriffen werden kann^[209].

Nachfolgend werden die für diese Arbeit relevanten Testsysteme kurz beschrieben.

4.1 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum ER (RBA-Wert)

Eine ausreichend hohe Affinität zum ER wird als Voraussetzung für die endokrine Wirkung einer Verbindung angesehen. Zur Quantifizierung derselben wird die Bindungsaffinität von Substanzen zum ER in einem *in vitro*-Assay bestimmt.

Da keine radioaktiv markierten Verbindungen vorliegen, über die direkt eine Bindung zum ER gemessen werden kann, wird die relative Bindungsaffinität (RBA-Wert) in einem Konkurrenzexperiment ermittelt. Hierzu bedient man sich des von der European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC) vorgeschla-

genen Dextran Coated Charcoal Verfahrens^[210, 211]. Der Test basiert auf der kompetitiven Verdrängung eines radioaktiv markierten, möglichst spezifischen Liganden durch einen zu testenden Wirkstoff vom Rezeptor in einer rezeptorhaltigen Lösung. Als radioaktiv markierter Ligand dient [³H]-Estradiol, welches stets in der gleichen Konzentration eingesetzt wird. Die Testsubstanzen oder nicht radioaktiv markiertes E2 werden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Nichtgebundene Anteile an [³H]-Estradiol und Kompetitor werden zu Ende des Tests an dextranbeschichtete Aktivkohle gebunden und aus dem Testansatz entfernt. Die Menge des verbliebenen, an den ER gebundenen, radioaktiven E2 wird über seine β -Strahlung gemessen. Aus den Messdaten wird der RBA-Wert der Testsubstanzen berechnet (vgl. 8.3.1.2, S. 199).

Im verwendeten Assay wird ER-haltiges Zytosol aus den Uteri frisch geschlachteter Kälber eingesetzt (vgl. 8.3.1.1., S. 199). Die damit ermittelten Werte sind mit den unter Anwendung von Zytosolen anderer Tierspezies (z. B. Ratte, Maus, Kaninchen, Lamm)^[212] erhaltenen Werte vergleichbar.

Naturgemäß kann aus den Ergebnissen dieses Tests nicht zwischen Agonisten und Antagonisten unterschieden werden. Auch läßt sich der Einfluss und die Auswirkung einer Metabolisierung der Wirkstoffe nicht bestimmen.

4.2 Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung auf molekularer Ebene im Luciferase-Assay

4.2.1 Allgemeines

Mit Hilfe des Luciferase-Assays ist es möglich, eine Aussage über die estrogenen bzw. antiestrogenen Potenz einer Substanz auf molekularer Ebene zu treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ER-positive humane MCF-7-Brustkrebs-Zellen, die stabil mit dem Plasmid ERE_{wtc}luc transfiziert wurden, (MCF-7-2a-Zellen) verwendet^[206], so dass auf die aufwändigen Schritte der Transfektion verzichtet werden konnte. Das Plasmid (ein DNA-Segment) enthält Fragmente mit Enhancer bzw. Promoteraktivität sowie ein Reporterogen. Das Reporterogen codiert für Luciferase, deren Aktivität gemessen wird. Im angewandten Testsystem wird dieses Protein in Abhängigkeit von der estrogenen Wirkung einer Substanz exprimiert. Das in der Arbeits-

gruppe Gust verwendete Plasmid $ERE_{wtc}luc$ wurde von Meyer ^[213] kloniert (Abbildung 4.1).

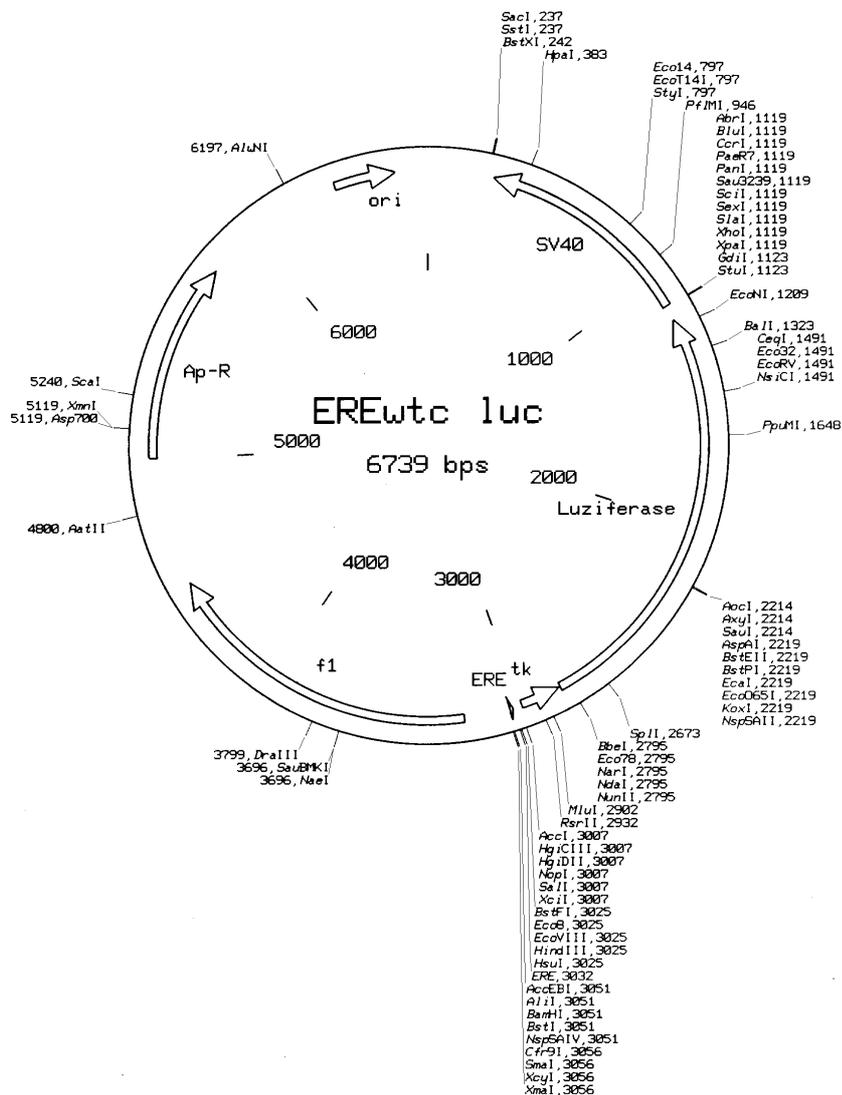


Abbildung 4.1 Plasmidkarte des $ERE_{wtc}luc$

Ap-R: β -Lactamase-Gen (codiert für die Ampicillin-Resistenz, für die Vermehrung in *E. coli* notwendig); **ori:** Replikationsursprung; **SV40:** Polyadenylierungssignal, wichtig für die Stabilität der m-RNA; **tk:** Promoter des Thymidin-Kinase-Gens aus *Herpes simplex*; **ERE:** estrogen response element; **f1:** Fragment aus den Phagen F1, ermöglicht eine Einzelstrang-Expression des Plasmids; **Luciferase:** Luciferasegen aus *Photinus pyralis*

Es besteht aus insgesamt 6739 Basenpaaren und beinhaltet als Enhancersequenz das ERE; das Reporter-gen (*luc*) stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und codiert für das Enzym Luciferase. Die Expression dieses Proteins ist abhängig von der estrogenen Wirkung einer Substanz. Es ist anderen Reporterproteinen, wie z. B.

der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT), weit überlegen, da sich die Detektion schneller (einige Stunden gegenüber mehreren Tagen beim CAT-Assay), empfindlicher und weniger aufwändig (es ist kein radioaktives Arbeiten notwendig) durchführen lässt. Das Maximum der Luciferase-Expression ist bei der stabil transfizierten Zelllinie ab der 42. Stunde der Inkubation erreicht ^[214], wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist.

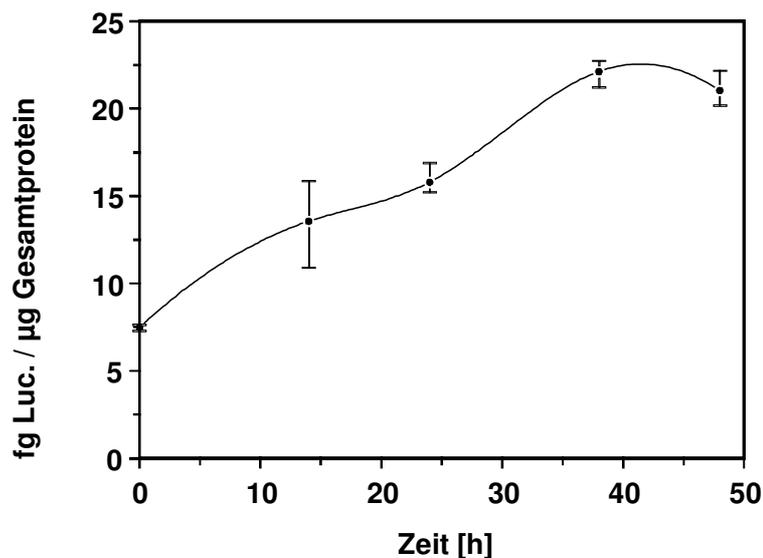
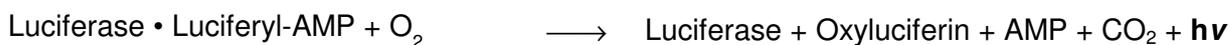
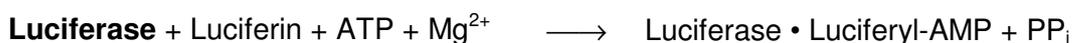


Abbildung 4.2 Kinetik der Luciferase-Expression in MCF-7-2a-Zellen nach Hafner ^[214]

Die gebildete Luciferase katalysiert die folgenden Schritte einer Chemilumineszenz-Reaktion ^[215]:



Die resultierende Lichtemission kann mit einem Luminometer quantifiziert werden. Sie setzt unmittelbar nach Substratzugabe ein und klingt sehr schnell wieder ab. Schon nach einer Minute verbleiben nur noch etwa 10% der Spitzenaktivität. Im Substrat enthaltenes Coenzym A steigert die Gesamlichtausbeute um ein Vielfaches ^[215]. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts erstreckt sich von 490 - 630 nm ^[216]. Die Messung der relativen Lichtausbeute (Einheit: relative light units: RLU) erfolgt über den gesamten Empfindlichkeitsbereich des Luminometers (390 - 520 nm) über einen Zeitraum von 10 s.

Die durch E2 hervorgerufene Aktivierung der Luciferase-Expression ist konzentrationsabhängig und erreicht ihr Maximum in einer Konzentration von 10^{-8} M, wie aus der Abbildung 4.3 hervorgeht.

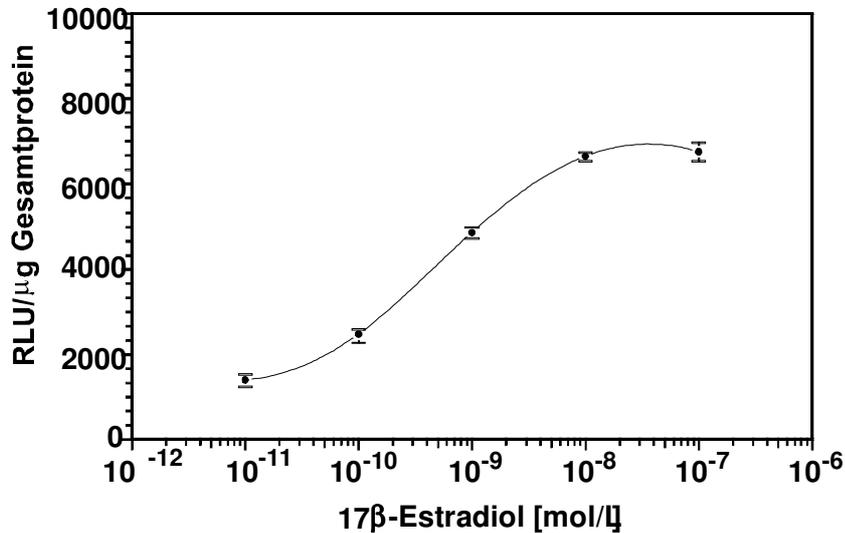


Abbildung 4.3 Konzentrationsabhängigkeit der E2-vermittelten Luciferase-Aktivierung

4.2.2 Ermittlung der agonistischen Wirkung im Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der estrogenen Eigenschaften einer Substanz wird die Stimulierung einer substanzbedingten Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt. Hierfür werden MCF-7-2a-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Des weiteren werden Zellen unter Zusatz des reinen Lösungsmittels (Background) und unter Zugabe von 10^{-8} M E2, (vgl. Abbildung 4.3, max. Luciferase-Expression durch E2) als Kontrolle inkubiert. Nach Beendigung des Versuchs wird die Luciferase-Aktivität (RLU) bestimmt und mit der Gesamtproteinmenge korreliert. Abbildung 4.4 zeigt den schematischen Ablauf eines Luciferase-Assays.

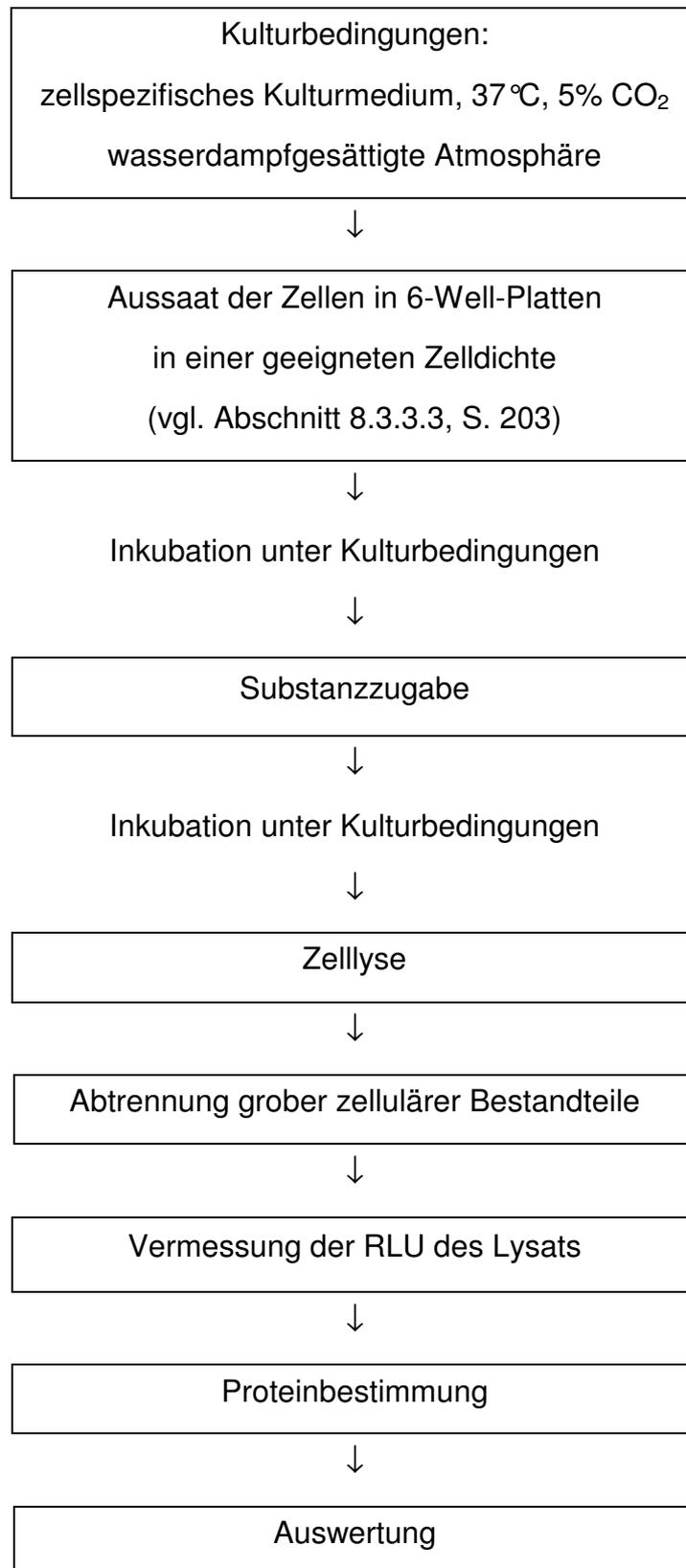


Abbildung 4.4 Flussdiagramm für den Testablauf des Luciferase-Assays

Die Berechnung der gebildeten Luciferasemenge aus den ermittelten RLU-Werten, erfolgt unter Zuhilfenahme einer Kalibriergerade nach Meyer^[213], in der die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Luciferasemenge aufgetragen wird.

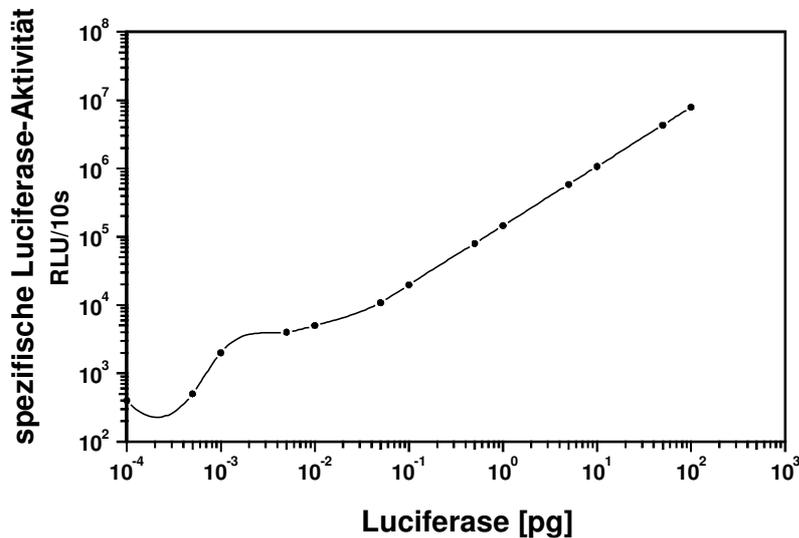


Abbildung 4.5 Luciferase Kalibriergerade nach Meyer^[213]

Die doppeltlogarithmische Auftragung der Werte ergibt zwischen 0,05 - 100 pg einen linearen Verlauf (siehe Abbildung 4.5), für den Gleichung (3) gilt:

$$\ln(m_{\text{Luciferase}}) [\text{pg}] = (\ln(\text{RLU}) - 5.8541) / 1.172879 \times 1000 \quad (3)$$

Zur Berechnung der Aktivierung wird das Ergebnis delogarithmiert und durch 50 geteilt (da 50 µL Zellextrakt vermessen werden), wodurch fg Luciferase / µL Proteinextrakt erhalten werden. Das Ergebnis wird durch die nach Bradford^[217] (vgl. 8.3.3.7, S. 205) ermittelte Gesamtproteinmenge dividiert, so dass schließlich fg Luciferase / µg Protein erhalten werden.

Damit verschiedene Tests miteinander verglichen werden können, wird das Ergebnis in relativer Luciferase-Aktivität auf die maximale Aktivierung durch E2 bezogen ausgedrückt (siehe Abbildung 4.3). Zu diesem Zweck wird in jedem Test 10⁻⁸ M E2 als Kontrolle mitgetestet und die resultierende Aktivierung gleich 100% gesetzt. Die durch das ebenfalls mitgetestete reine Lösungsmittel hervorgerufene Aktivierung entspricht 0%. Die durch die Testsubstanzen erreichte Aktivierung wird auf die

Stimulierung durch die Kontrolle bezogen und als relative Luciferase-Aktivität angegeben (Siehe Abbildung 4.6).

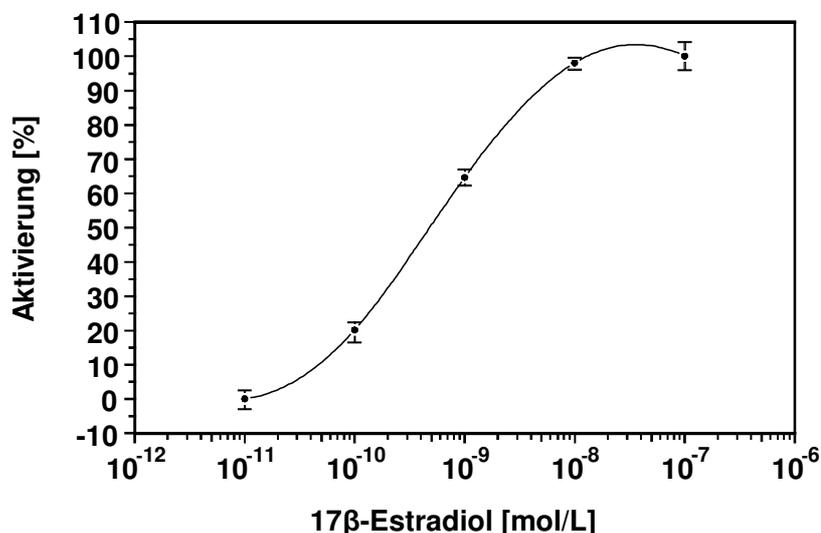


Abbildung 4.6 Relative Transkriptionsaktivierung durch E2

4.2.3 Ermittlung der antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der antagonistischen Eigenschaften einer Substanz wird die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der E2-bedingten Luciferaseexpression ermittelt. Hierzu werden MCF-7-2a-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten und einer festen Konzentration E2 (10^{-9} M) inkubiert.

Die Aufarbeitung erfolgt entsprechend der Bestimmung der agonistischen Wirkung. Die erhaltenen Messwerte entsprechen der verbleibenden E2-induzierten Aktivierung [%] nach Zugabe des jeweiligen Antagonisten. Aus der Konzentrations-Aktivierungskurve, in der die Konzentration des Antagonisten gegen die prozentuale Luciferase-Aktivierung analog zu Abbildung 4.7 aufgetragen wird, kann diejenige Konzentration des Inhibitors abgelesen werden, bei der die Luciferase-Aktivierung auf 50% des E2-Werts reduziert wird (IC_{50}).

4.3 *In vitro*-Zytotoxizitätstest

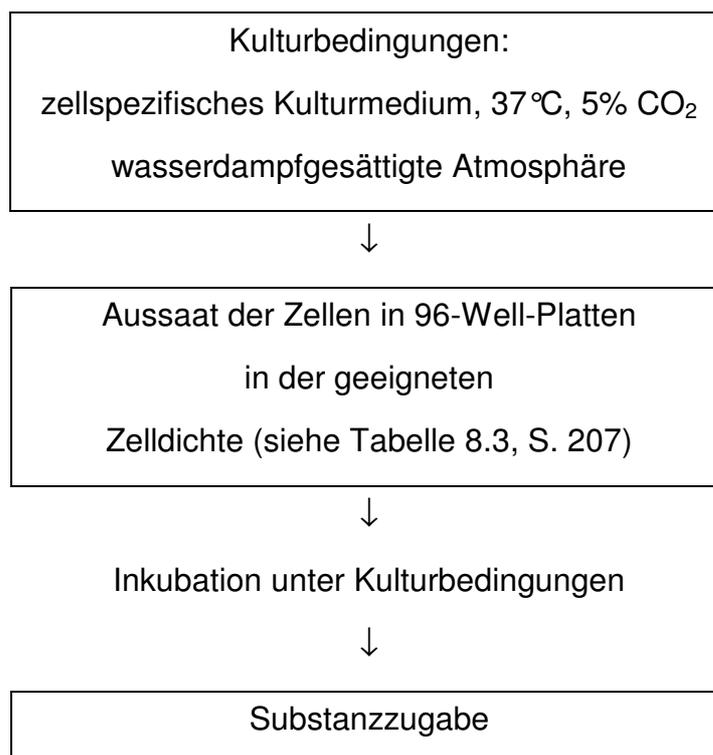
Zur Charakterisierung der antiproliferativen Eigenschaften von Verbindungen, bietet sich der Einsatz von *in vitro*-Zytotoxizitätstests an. Im Vergleich zu Tierversuchen

werden schnell, effektiv und kostengünstig Ergebnisse erhalten. Für die *in vitro*-Untersuchung der ER-vermittelten Proliferationshemmung von Brustkrebs wird die MCF-7-Brustkrebszelllinie eingesetzt. Ausgewählte Verbindungen werden zusätzlich an der hormonunabhängigen MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie untersucht.

4.3.1 Der Kristallviolett-Assay

Die Zytotoxizität der untersuchten Verbindungen wird mit Hilfe eines kolorimetrischen Verfahrens bestimmt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Testmodell wurde von Gillies et al. 1986 ^[218] zum ersten Mal beschrieben. Es handelt sich um einen Zellkulturtest, bei dem die antiproliferative Wirkung über die veränderte Zellmasse, die der Zellmenge proportional ist, in Monolayerkulturen mittels eines Kristallviolett-Assays bestimmt wird. Seit der Übertragung dieses Testmodells auf Mikrotiterplatten ^[219] besitzt es gegenüber früheren *in vitro*-Zytotoxizitätstests ^[220, 221, 222, 223, 224] entscheidende Vorteile, wie die verbesserte statistische Auswertbarkeit und einfache Handhabung.

Abbildung 4.7 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf des Zytotoxizitätstests, der grundsätzlich für alle Zelllinien gleich ist. (siehe Kapitel 8.3.4, S. 206)



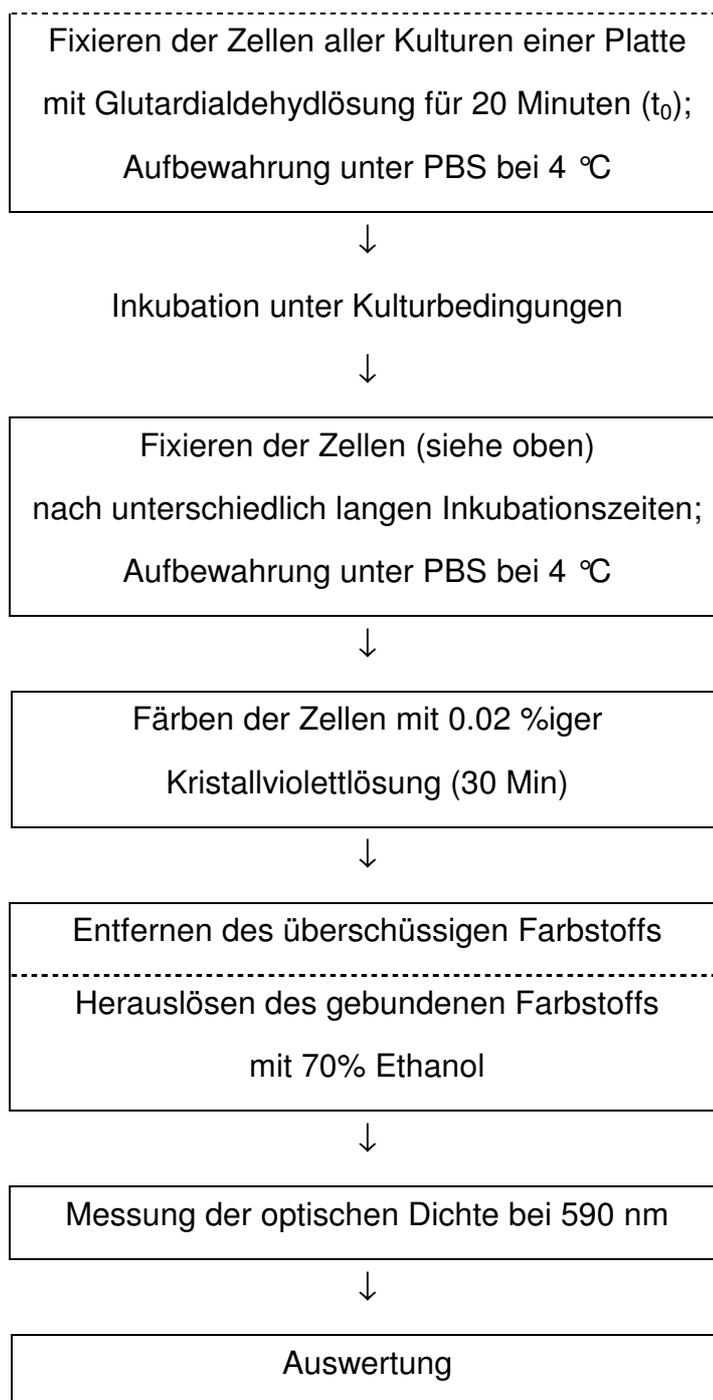


Abbildung 4.7 Flussdiagramm für den Testablauf des Zytotoxizitätstests (Kristallviolett-Assay)

Die Zellen werden in ihrem Kulturmedium (vgl. 8.1.2.5, S. 143) in 96-Well-Kulturplatten ausgesät. Da die Aussaatdichte einen großen Einfluss auf den Testverlauf und die Reproduzierbarkeit hat, wird für jede Zelllinie eine definierte Zelldichte ausgesät (vgl. Tabelle 8.3, S. 207). Nach der Anwachszeit werden die zu untersuchenden Substanzen, Cisplatin und reines Lösungsmittel (DMF) als Kontrolle für Wachstum ohne Substanz zu den Zellen zugegeben und diese weiter inkubiert. Diese Anwachszeit ist ebenfalls spezifisch für eine Zelllinie. Da eine Wirkungskinetik der zuge-

setzten Substanzen bestimmt werden soll, wird zu fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten das Medium inklusive Substanz entfernt und die Zellen mittels Glutardialdehyd an den Mikrotiterplatten fixiert. Tote Zellen haften nicht mehr am Untergrund und werden dadurch entfernt. Um das Austrocknen der Zellen bis zur Auswertung zu vermeiden, werden sie mit PBS überschichtet und bei 4 °C aufbewahrt. In die Berechnung der antiproliferativen Wirkung fließt auch die Ausgangszellmasse ein, deshalb werden die Zellen einer ganzen Platte zum Zeitpunkt der Substanzzugabe abgestoppt und fixiert, wie oben beschrieben.

Dem Färbeprozess werden alle Platten gleichzeitig unterzogen. Dadurch werden Fehler durch unterschiedliche Färbebedingungen vermieden. Als Farbstoff dient Kristallviolett, das vor allem die DNA-assoziierten Nukleoproteine in den Zellen anfärbt. Der überschüssige Farbstoff wird mit Wasser herausgewaschen, gebundenes Kristallviolett wird anschließend mit Ethanol 70% aus den Zellen wieder herausgelöst und die Extinktion dieser Lösung vermessen. Nach Spruß^[225] korreliert diese sehr gut mit der Zellmasse. Aus den erhaltenen Daten kann die zytotoxische Wirkung (relative prozentuale Wachstumshemmung T/C_{korr}) der untersuchten Verbindungen nach der folgenden Gleichung (4) berechnet werden.

$$T/C_{\text{korr}} = [(T^* - C_0) / (C^* - C_0)] \times 100 [\%] \quad (4)$$

T^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen

C^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kontrollkulturen (mit reinem Lösungsmittel behandelte Kulturen)

C_0 : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

Bei zytoziden Verbindungen ist der Mittelwert der Extinktion der behandelten Kulturen T^* geringer als der Ausgangswert C_0 . Nach Skehan^[226] wird die Zellmenge der Kontrollkulturen C^* in die Berechnung zur Quantifizierung der Wirkung nicht miteinbezogen. Anstelle von T/C_{korr} wird deshalb der τ -Wert nach Gleichung (5) berechnet.

$$\tau = [(T^* - C_0) / C_0] \times 100 [\%] \quad (5)$$

T*: Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen

C₀: Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

Die Ergebnisse unterliegen unterschiedlich hohen Schwankungen, die als prozentuale Standardabweichung (SE [%]) ausgedrückt werden. Je wirksamer eine getestete Verbindung ist, desto geringer ist die SE [%].

Die T/C_{korrr}-Werte, über die die antiproliferativen Eigenschaften der Testsubstanzen bewertet werden, werden nach folgender Einteilung interpretiert:

T/C_{korrr} > 80% keine antiproliferative Wirkung

T/C_{korrr} < 80% antiproliferative Wirkung

T/C_{korrr} 20 - 0% zytostatische Wirkung

T/C_{korrr} < 0 % zytozide Wirkung

Unter zytotoxischer Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

4.3.2 Die MCF-7-Zelllinie

Die MCF-7-Zelllinie (*Michigan Cancer Foundation*) ist eine menschliche, hormonsensitive Mammatumorzelllinie. Sie wurde 1970 aus dem malignen Pleuraerguß einer Patientin gewonnen, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre lang mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war ^[227].

Die weit verbreitete und gut charakterisierte Zelllinie ^[228] besitzt unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron. Sie hat einen hohen Hormonrezeptorgehalt ^[229, 230] von 70 - 90 fmol / mg Protein, weswegen sie auch als hormonabhängig bezeichnet wird, jedoch ist sie auch für Substanzen ohne hormonelle Wirkung, wie z. B. Platinkomplexe, sensitiv.

4.3.3 Die MDA-MB-231-Zelllinie

Die MDA-MB-231-Zelllinie wurde ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss einer Patientin mit metastasierendem duktalem Mammakarzinom, das zuvor drei Wochen mit Chemotherapeutika behandelt worden war, gewonnen. Die Zelllinie wurde 1974 etabliert^[231] und gilt aufgrund des Fehlens nachweisbarer Estrogen- und Progesteronrezeptoren als hormoninsensitiv^[232].