

**Liposomale Zytostatika
zur Untersuchung und Überwindung
von Chemoresistenzen
in Ovarialkarzinom-Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michaela Lilian Borrmann geb. Krieger

aus

Siegen

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der Promotion: 28.06.2016

Erscheinungsjahr: 2016

**Thomas
und meinen Eltern**

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine Geduld sowie seine umfassende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, welche entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde für seine Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren.

Den weiteren Professoren danke ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Allen Mitarbeitern der Laborgruppe aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich für das gute Arbeitsklima und die Kameradschaft im Zytostatika-Zelllabor und dem Analytik-Labor. Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Verena Schneider für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Modifizierung und Optimierung des ATP-Assays und an Dr. Anya Kalayda für die Bereitstellung des fluoreszierenden Platin-Derivates sowie die Hilfe am Fluoreszenz-Mikroskop.

Den Mitgliedern aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Michael Wiese danke ich für das gute und kollegiale Miteinander. Besonders Dr. Martin Koch sei für die Auswertung des Microarrays gedankt.

Für die Aufarbeitung meiner Proben und die Durchführung des Microarrays danke ich Herrn Norbert Brenner aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Dieter Royer.

Herrn Dennis Alex aus der Forschungsgruppe um Dr. Ralf A. Hilger vom Universitätsklinikum Essen gebührt mein Dank für die Platinbestimmung mittels ICP-MS.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle (ehemaligen) Kollegen des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas für das harmonische Miteinander und die freundschaftliche Atmosphäre sowie die vielen guten, inspirierenden und lustigen Gespräche in dieser Zeit.

Meinen ehemaligen Bürokollegen Dr. Juliane Habermann (geb. Fritzsche) und Dr. Sara Gosk danke ich für die schöne Zeit und die wertvollen Tipps zu Beginn meiner praktischen Arbeiten. Dipl.-Pharm. Annette Konold und M. Sc. Drug Research Daniel Philipp Stölting

gebührt mein Dank für die gelungene Zusammenarbeit und ihre Unterstützung im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Master-Arbeiten. Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Astrid Fermum (geb. Hartung) für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft, die gute Stimmung im Liposomen-Labor und ihre Unterstützung bei allen FACS-Fragen und an Dr. Katrin Reder-Christ für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, ihre Freundschaft und ihre Motivation. Für das kollegiale Miteinander bedanke ich mich auch bei allen Assistenten des 1. Semesters.

Meinen Eltern Dagmar und Michael Krieger und meinen Schwiegereltern Karin und Herbert Borrmann danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung.

Dir, lieber Thomas, danke ich für deine unermüdliche Geduld und dein ausdauerndes Korrekturlesen. Danke, dass du immer für mich da bist!

Ohne diesen guten Familienzusammenhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	vii
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Teil	3
2.1 Ovarialkarzinom	3
2.1.1 Cisplatin-Wirkmechanismus, Toxizität und zelluläre Antwort	4
2.1.2 Cisplatin-Resistenz	8
2.1.3 Doxorubicin-Wirkmechanismus	13
2.1.4 Doxorubicin-Resistenz	14
2.2 Liposomen	16
2.2.1 Passives Tumortargeting	17
2.2.2 Aktives Tumortargeting	18
2.2.3 Liposomales Cisplatin	21
2.2.4 Liposomales Doxorubicin	23
2.3 Resistenzüberwindung durch Liposomen	25
2.4 Ziele der Arbeit	26
3 Material und Methoden	29
3.1 Verwendete Materialien	29
3.1.1 Geräte	29
3.1.2 Chemikalien	31
3.1.3 Lipide	33
3.1.4 Antikörper	33
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	34
3.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	36
3.3 Liposomenpräparation	43
3.3.1 Synthese des Cyanur-Ankers	43
3.3.2 Hydratationsmethode	43
3.3.3 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Liposomen	44

3.3.4	Herstellung von Cisplatin-haltigen Liposomen	45
3.3.5	Caelyx - liposomales Doxorubicin	46
3.3.6	Konventionelle Kopplung von Proteinen an Liposomen	46
3.3.7	Post-Insertionstechnik (PIT)	47
3.4	Liposomencharakterisierung	48
3.4.1	Partikelgrößenbestimmung	48
3.4.2	Phosphatquantifizierung nach Bartlett	48
3.4.3	Proteinquantifizierung nach Peterson-Lowry	49
3.5	Zellkultur	50
3.5.1	Zelllinien A2780	50
3.5.2	Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung von Zellen . . .	51
3.5.3	Zellzahlbestimmung	52
3.5.4	Prüfung auf Mykoplasmenkontamination	52
3.6	Durchflusszytometrie	54
3.6.1	Bindung von Liposomen an A2780-Zellen	55
3.6.2	Bestimmung der Expression von P-gp und Tfr auf A2780-Zellen . . .	55
3.6.3	Induzierbarkeit der Tfr-Expression auf A2780-Zellen	56
3.6.4	Kinetikaufnahmen mit freiem Doxorubicin	56
3.6.5	Bestimmung der Transporter Ctr1, ATP7A und ATP7B in fixierten, permeabilisierten A2780-Zellen	57
3.7	Fluoreszenzspektrometrie	59
3.7.1	Bindung von Liposomen an A2780-Zellen	59
3.7.2	Quenchingtest	59
3.7.3	Quantifizierung der Doxorubicin-Konzentration in Liposomen	60
3.7.4	Intrazelluläre Doxorubicin-Akkumulation	60
3.8	Fluoreszenzmikroskopie	61
3.8.1	Immunhistochemische Färbungen	61
3.9	Platinanalytik mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	62
3.9.1	Quantifizierung Cisplatin-haltiger Liposomen	63
3.9.2	Intrazelluläre Platin-Akkumulation	63
3.9.3	Proteinquantifizierung mittels BCA-Kit	64
3.10	Platinanalytik mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plas- ma (ICP-MS)	65
3.10.1	DNA-Platinierung	65
3.10.2	DNA-Isolierung, UV-Quantifizierung und Probenaufarbeitung für die ICP-MS	66

3.11 Zytotoxizitätsbestimmungen	67
3.11.1 MTT-Assay	67
3.11.2 ATP-Assay mittels ATP-Kit	70
3.11.3 Proteinquantifizierung in 96-Well-Platten	73
3.12 Microarray	73
3.12.1 Präparation der Zellen	74
3.13 Statistische Methoden	75
4 Ergebnisse und Diskussion	77
4.1 Liposomales Cisplatin	77
4.1.1 Liposomencharakterisierung	77
4.1.2 Bindungsstudien	78
4.1.3 Expressionsstudien	80
4.1.4 Intrazelluläre Platin-Akkumulation	85
4.1.5 Zytotoxizitätsstudien	87
4.1.6 DNA-Platinierung	94
4.1.7 Microarray - ein Ausblick	96
4.2 Liposomales Doxorubicin	100
4.2.1 Liposomencharakterisierung	100
4.2.2 Bindungsstudien	102
4.2.3 Expressionsstudien	103
4.2.4 Intrazelluläre Doxorubicin-Akkumulation	105
4.2.5 Zytotoxizitätsstudien	112
5 Zusammenfassung	119
Literaturverzeichnis	123
Publikationsverzeichnis	141
Verfassererklärung	143

Abkürzungsverzeichnis

A2780 adr	Doxorubicin-resistente Ovarialkarzinomzelllinie
A2780 cis	Cisplatin-resistente Ovarialkarzinomzelllinie
A2780 sens	Ovarialkarzinomzelllinie
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABC	ATP binding cassette
Abt.	Abteilung
AE	Elutionspuffer
AIF	Apoptosis inducing factor
AL	Arbeitslösung
Alb	Albumin
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	Adenosintriphosphat Alpha-Polypeptid
ATP7B	Adenosintriphosphat Beta-Polypeptid
AS	Aminosäure(n)
AUC	Area under the curve
AW	Waschpuffer
Bad	Bcl (b-cell lymphoma)-XL/Bcl-2 associated death protein
Bax	Bcl-2 associated x-protein
BCA	Bichinolin-4-carbonsäure
Bcl-2	B-cellymphoma 2
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2 (Gen)
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	Cysteinyl aspartate-specific proteinase
cDDP	Cis-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin)
CFDA-Platin	1-([5-(und-6)-carboxyfluoresceindiacetat]aminomethyl)- 1,2-ethylendiamin-dichloridoplatinum(II)
CHO	Chinese Hamster Ovary

Chol	Cholesterol
Ctr1	Copper transporter 1
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dauno	Daunorubicin
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbo-cyaninperchlorat
DOC	Na-deoxycholat
Doxo	Doxorubicin
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000]
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em.	Emission
EPR-Effekt	Enhanced Permeability and Retention-Effekt
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
Ext.	Extinktion
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Forward scatter
G	Guanin
GF-AAS	Graphitrohrofen-Atomabsorptionsspektrometrie
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GSH	Glutathion
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	High-Mobility-Group
Holo	Holotransferrin
HSPC	Hydriertes Sojaphosphatidylcholin
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

KHP	Krebs-HEPES-Puffer
LUV	Large unilamellar vesicle
MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1
MBS	Metal Binding Site
MDR	Multidrug Resistance
MLV	Multilamellar vesicle
MMR	Mismatch-Repair
mPEG	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglycol)-2000]
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MRP7 1/2	Multidrug resistance-related protein 1/2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Nukleotid
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
OTC 1-3	Organischer Kationen-Transporter 1-3
p53	Tumorsuppressorprotein 53
p73	Tumorsuppressorprotein 73
PBS	Phosphate-buffered saline
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
P-gp	P-glycoprotein
PI	Polydispersitätsindex
PIT	Post-Insertionstechnik
PROMT	Precision Optimized Measurement Time
RES	Retikulo-endotheliales System
R _F	Resistenzfaktor
RFC	Replication factor C
Rho	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamin-rhodamin B sulfonyl)
RPA	Replication protein A
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
QC	Quality control
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

SL	Stammlösung
SLC	Solute Carriers
SPC	Sojaphosphatidylcholin
SUV	Small unilamellar vesicle
TCA	Trichloressigsäure
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSA	Trichostatin A
WK	Wachstumskontrolle

Die in der Arbeit verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem.

1 Einleitung

Im Jahr 2011 sind in Deutschland gemäß einer aktuellen Schätzung des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts etwa 228.260 Frauen und 255.320 Männer an Krebs erkrankt.

Obwohl sich die Therapiemöglichkeiten erheblich verbessert haben, sind Krebserkrankungen aufgrund von starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie z.B. Nephrotoxizität, Kardiotoxizität, Neurotoxizität oder Emesis, oft nicht adäquat behandelbar. Hinzu kommen primäre Resistenzen bzw. ein starker Verlust der Wirksamkeit der unter der Therapie verwendeten Arzneistoffe (sekundäre Resistenzen). Diese Probleme sind häufig limitierend in der Behandlung von Krebserkrankungen und schränken die Therapie-Möglichkeiten massiv ein.

Der Einsatz liposomaler Formulierungen wurde über viele Jahre hinweg als möglicher Ausweg angesehen, durch eine veränderte Pharmakokinetik die Zytostatika-Wirksamkeit zu erhöhen. Mit dieser Rationale wurden auch bereits unterschiedliche liposomale Formulierungen wie Caelyx® oder Myocet® entwickelt und als Arzneimittel zugelassen. Die gezielte Umgehung von Resistenzen durch Liposomen war hingegen bislang nicht im Fokus der pharmazeutischen Entwicklung.

In der vorliegenden Arbeit werden daher unterschiedlich funktionalisierte, Zytostatika-haltige Liposomen hergestellt und als Werkzeug genutzt, um mittels verschiedener Methoden Zytostatika-Resistenzen in Ovarialkarzinom-Zellen zu analysieren. Als Ergebnis dieser Untersuchungen wird erstmals gezeigt, dass Liposomen funktionell Chemoresistenzen überwinden können.

2 Theoretischer Teil

2.1 Ovarialkarzinom

Eierstockkrebs zählt zu den aggressivsten Tumoren und ist die zweithäufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane [1]. Das große Problem dieser Erkrankung ist, dass sie erst sehr spät entdeckt wird, da bis in ein weit fortgeschrittenes Stadium keine Symptome vorhanden sind. Wird der Tumor entdeckt, hat er sich zumeist schon im Bereich des kleinen Beckens ausgebreitet [2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren und die 5-Jahres-Überlebensrate altersabhängig zwischen 35 % und 49 % [3]. Etwa 10 % der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt und oft mit Mammakarzinomen assoziiert. Das Lebenszeitrisiko betroffener Frauen ist um ein 3- bis 50-faches erhöht, wenn eine Keimbahnmutation der Gene BRCA 1/2 oder TP53 nachgewiesen wurde [2].

Die Auswahl der therapeutischen Maßnahmen wird anhand der Beurteilung des Tumors festgelegt und erfolgt nach der WHO-Klassifikation [2]. Entscheidend für eine höhere Heilungs- und Überlebensrate ist die möglichst vollständige operative Entfernung aller makroskopischen Tumormanifestationen mit anschließender Chemotherapie [4]. Ein Tumorrest, der größer als zwei Zentimeter ist, geht mit einer deutlich verringerten Überlebensrate von 12-16 Monaten einher, verglichen mit einem Tumorrest kleiner als zwei Zentimeter (Überlebensrate: 40-45 Monate) [5, 6]. Für die weitere Prognose sind das Alter, der Allgemeinzustand der Patientin sowie das Tumorstadium, die histologische Typisierung des Tumors und der bereits erwähnte postoperative Tumorrest wichtig. Die S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von malignen Ovarialkarzinomen beinhaltet eine adjuvante platinhaltige Kombinationstherapie mit Paclitaxel über drei bis sechs Zyklen. Aufgrund der vergleichbaren Wirkung von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin und des günstigeren Nebenwirkungsprofils wird empfohlen Carboplatin zu verwenden [2, 7].

Diese *first line*-Therapie erweist sich bei über 80 % der Patientinnen als effektiv und führt bei 40-60 % sogar zu einer vollständigen Remission der Erkrankung [6, 8]. Dennoch gestaltet sich die Folgetherapie als problematisch, da ein großer Teil nach einer mittleren progressionsfreien Zeit von 18 Monaten einen Rückfall erleidet [6, 8, 9]. Bei Progression der Erkrankung kann,

aufgrund des Ansprechens des Tumors in der primären Therapie, zwischen drei verschiedene Kategorien unterschiedenen werden [6]:

- Platin-*sensitives* Rezidiv (Progression nach platinhaltigem Therapieregime nach mehr als sechs Monaten)
- Platin-*resistentes* Rezidiv (Progression nach platinhaltigem Therapieregime nach weniger als sechs Monaten)
- Platin-*refraktäres* Rezidiv (Progression trotz platinhaltigen Therapieregimes oder nach weniger als sechs Monaten)

Bei Platin-*sensitiven* Rezidiven ist die Carboplatin-Paclitaxel-Kombinationstherapie oder eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Gemcitabin weiterhin erste Wahl [2]. Im Falle der beiden anderen Kategorien wird die Therapie umgestellt auf eine nicht-platinhaltige Monotherapie wie liposomales Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin oder Etoposid. Eine weitere Therapieoption bieten die GnRH-Analoga (bsp. Tamoxifen oder Gestagene) [2, 10].

Da die Prognose für resistente bzw. refraktäre Rezidive besonders schlecht ist, hat die Folgetherapie palliativen Charakter. Im Vordergrund steht die Beschwerdelinderung durch Hinzuzögern des Krankheitsprozesses und Optimierung der Lebensqualität [2].

2.1.1 Cisplatin-Wirkmechanismus, Toxizität und zelluläre Antwort

Der planare Komplex cis-Diamindichloroplatin(II), auch als Cisplatin bekannt (siehe Abbildung 2.1), ist der erste Vertreter einer Klasse von platinhaltigen, antineoplastisch wirksamen Substanzen, die eine große Bedeutung in der onkologischen Therapie von verschiedensten Tumoren, unter anderem Bronchial-, Hoden- und Ovarialkarzinomen, sowie Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches haben [11].

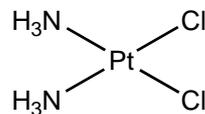


Abb. 2.1: Chemische Struktur von Cisplatin, $M_R = 300,1 \text{ g/mol}$.

Die zytotoxische Wirkung dieser Substanz wurde in den 60er-Jahren zufällig von ROSENBERG und seinen Mitarbeitern entdeckt, die den Einfluss von elektrischem Strom auf das Wachstum von *E. coli*-Bakterien untersuchten. Dabei stellte sich heraus, dass die Bakterienkultur sich nicht weiter teilte, sondern die Bakterien in langen Filamenten wuchsen, wenn

Wechselstrom über die Platinelektroden in der Bakterienkultur angelegt wurde [12]. Nach intensiver Analyse wurde Cisplatin als aktivste Substanz identifiziert. In den folgenden Jahren wurde die antineoplastische Wirksamkeit bewiesen [13].

Cisplatin selbst ist nicht sehr toxisch. Intravenös, gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, appliziert wird ein Großteil an lösliche Proteine (besonders Albumin) im Blut gebunden und ist damit inaktiviert. Gelangt es aktiv oder passiv in die Zelle, wird es dort aufgrund der niedrigen Chloridionen-Konzentration zu den wesentlich aktiveren Aquakomplexen hydrolysiert (siehe Abbildung 2.2) [14, 15].

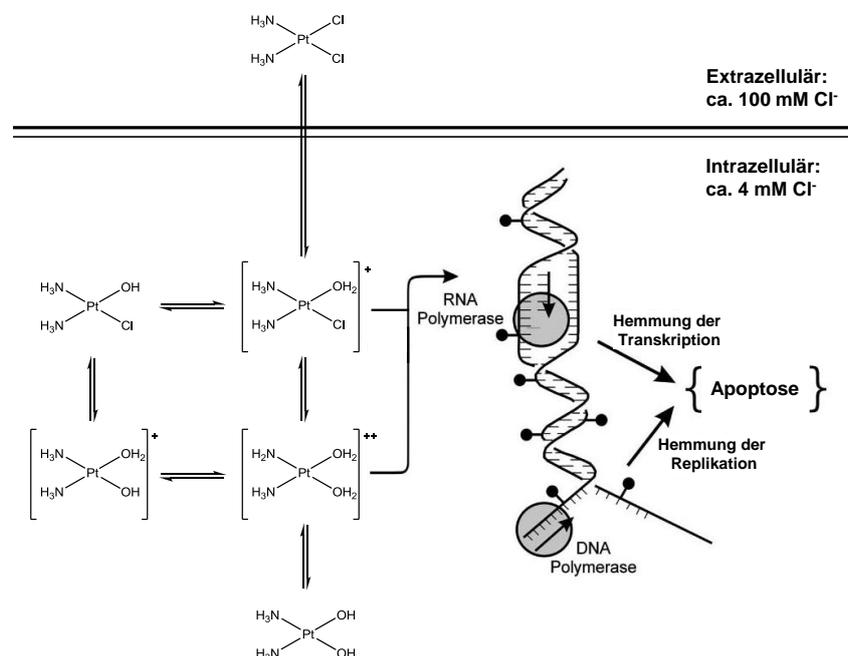


Abb. 2.2: *In vivo* Aktivierung von Cisplatin und die durch die DNA-Platinierung ausgelöste Hemmung der Replikation und Transkription. Dies resultiert in der Hemmung der Zellteilung und/oder der Apoptose; modifiziert nach [16].

Die zytotoxische Wirksamkeit nach Bioaktivierung beruht dabei, ähnlich den Alkylantien, auf Interaktionen mit der DNA. Da die Imidazolringe des Adenin- und des Guanin-Moleküls über eine stärkere Nukleophilie verfügen als die anderen Nukleobasen, finden die Reaktionen zwischen Cisplatin und der DNA überwiegend an der Position N7 dieser DNA-Basen statt [17, 18]. Mono- oder Diaquakomplexe sind darüber hinaus auch in der Lage an Position N1 der Imidazolringe zu binden. Nach monofunktionalen Bindungen (DNA-Protein-Vernetzungen) bilden sich zunächst bifunktionale Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Strangs (*intrastrand crosslink*) aus. Dabei werden 60-65 % aller Addukte an der Posi-

tion N7 benachbarter Guaninbasen ausgebildet und 25-30 % zwischen benachbarten Adenin- und Guaninbasen, ebenfalls an Position N7. Neben diesen beiden häufigen Addukten bilden sich ungefähr zu fünf Prozent auch Intrastrang-Quervernetzungen zwischen Guaninbasen aus, die ein Nukleophil (N) überspringen, sogenannte GNG-Addukte. Nur etwa ein Prozent der Cisplatin-DNA-Addukte bilden in einem weiteren Schritt dann weitere bifunktionale Quervernetzungen mit dem komplementären DNA-Strang aus, wenn keine geeigneten Basen im gleichen Strang erreichbar sind (*interstrand crosslink*) [18]. In der nachfolgenden Abbildung 2.3 werden einige Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin mit Proteinen und DNA dargestellt.

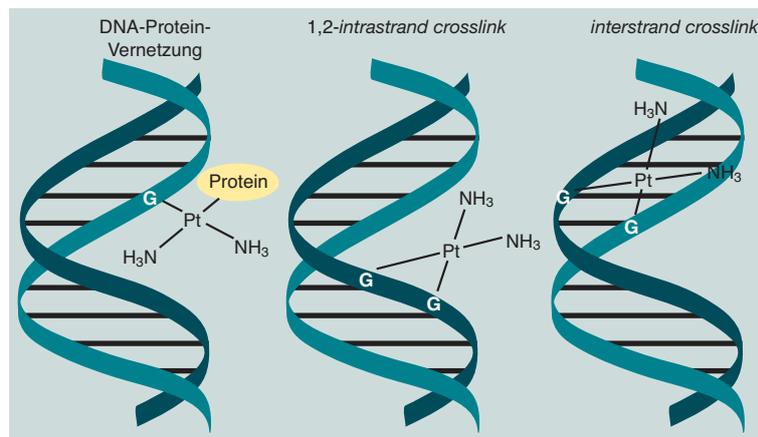


Abb. 2.3: Beispielhafte Darstellung der verschiedenen Bindungsmöglichkeiten von bioaktiviertem Cisplatin an Guanin (G) in doppelsträngiger DNA [15].

Die DNA-Platinierung und die damit einhergehende Konformationsänderung führt in der S-Phase (Synthese-Phase) des Zellzyklus zu einer Hemmung der Topoisomerase und damit zu Strangbrüchen. Eine fehlerfreie Replikation und Transkription der DNA ist nicht mehr möglich. Dies äußert sich in einer Hemmung der Zellteilung oder in der Apoptose der Zellen (siehe Abbildung 2.2) [14–16].

In begrenztem Ausmaß verfügen Zellen über Mechanismen platinierter DNA zu reparieren. Eines der wichtigsten Reparatursysteme ist das NER (**N**ukleotid **E**xzisions-**R**eparatur). Neben UV-Schäden an der DNA erkennt das NER auch polyzyklische aromatische Verbindungen sowie Schäden, die durch Platin-Verbindungen an der DNA entstanden sind [19]. Dabei werden Schäden an der DNA erkannt und herausgeschnitten. Die entstehende Lücke wird dann im Prozess der Replikation durch die DNA-Polymerase oder Replikationsproteine (RPA, RFC) erneut gefüllt [20]. Im Falle einer vollständigen Reparatur überlebt die Zelle, bei unvollständiger Reparatur kann Apoptose ausgelöst werden. FURUTA *et al.* konnten zeigen, dass NER-defiziente Zellen hypersensitiv auf Exposition mit Cisplatin reagierten [21]. Jedoch ist die Reparatur-Kapazität nicht NER-defizienter Zellen relativ gering und nicht ausreichend,

um alle Schäden zu erkennen und zu beheben. SIDDIK *et al.* vermuten, dass die geringe Substratspezifität des NER eine mögliche Erklärung für Kreuzresistenzen bieten könnte [22].

Neben dem NER gibt es zwei weitere relevante Protein-Systeme, die eine Reparatur der DNA ermöglichen. Zum einen das **MisMatch-Repair** Protein (MMR), welches post-replikativ ungepaarte und fehlgepaarte Nukleotide korrigiert [23]. Dies konnte durch Cisplatin-verursachte DNA-Schäden in *E. coli* nachgewiesen werden [24].

Zum anderen können Cisplatin-ausgelöste DNA-Schäden auch über Proteine der **High-Mobility-Group** (HMG) behoben werden [23]. Diese Gruppe von kleinen Proteinen gehört zu den nicht-Histon, Chromatin-verbundenen Proteinen, welche in die Genregulation und in die Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur eingebunden sind [25, 26].

Die Toxizität und die durch Cisplatin ausgelöste Apoptose der Zellen umfasst ein weites Spektrum von subzellulären Reaktionen der Signaltransduktion. Im Zellkern spielen infolge des oben diskutierten Wirkmechanismus von Cisplatin unterschiedliche Signaltransduktionswege eine Rolle. Von zentraler Bedeutung ist hier die p53-vermittelte Signaltransduktion [27], die im Falle einer DNA-Schädigung die Transkription pro-apoptotischer Proteine wie Bak und Bax aktiviert [26]. Entsprechende Effekte werden außerdem über p63 und p73 vermittelt [28, 29]. Daneben werden p38-vermittelt zum einen die Expression von TNF- α sowie in Verbindung mit JNK die Expression von Fas-Ligand und damit in beiden Fällen der extrinsische Apoptose-Weg aktiviert [30–33]. Darüber hinaus wird einerseits durch Cisplatin via ERK der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF κ B gehemmt, über TNF- α indirekt hingegen aber auch aktiviert, sodass je nach Aktivierung der entsprechenden Signaltransduktionswege ein apoptotisches Signal überwiegt und zum Untergang der Zellen führt [26, 34]. In den Mitochondrien führen charakteristische Veränderungen zur Aktivierung des intrinsischen Signaltransduktionswegs, was letztlich in Apoptose bzw. anderen zum Zelltod führenden Signalen resultiert [26]. Dabei bewirkt hierbei der Cisplatin-bedingte Abbau des äußeren Transmembranpotentials einen Anstieg der Membranpermeabilität und infolge dessen eine Freisetzung bestimmter Moleküle ins Zytosol, die dort über die Aktivierung entsprechender Signalübertragungswege zum Zelltod führen können [35]. So hat z.B. die Freisetzung von Cytochrom C letztlich u.a. die Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 7 zur Folge, welche wiederum unterschiedliche apoptotische Mechanismen initiieren [26]. Des Weiteren wird nach Schädigung der Mitochondrienmembran das Protein AIF (Apoptosis inducing factor) ins Zytosol freigesetzt, welches eine wichtige Funktion bei der programmierten Nekrose erfüllt [36]. Darüber hinaus wurden direkte Effekte von Cisplatin auf die Zellatmung sowie eine Cisplatin-vermittelte Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien beschrieben. Hier sind die exakten Mechanismen noch nicht vollständig geklärt [37, 38]. In jedem Fall führt der über Cisplatin induzierte Anstieg von ROS zu mito-

chondrialem sowie zellulärem oxidativem Stress, was wiederum u.a. eine Permeabilisierung der Mitochondrien zur Folge hat [39]. Ferner können Mitochondrien auch indirekt durch Cisplatin-aktivierte, extra-mitochondriale Faktoren, wie z.B. den pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bak und Bad der Bcl-2-Familie bzw. über eine Calcium-vermittelte Veränderung der mitochondrialen Homöostase geschädigt werden [26, 40].

Die lysosomale Toxizität von Cisplatin beruht zum einen auf einem direkten Cisplatin-Effekt im Sinne einer Permeabilisierung der lysosomalen Membran nach Cisplatin-Akkumulation unter Beteiligung von Cathepsin D [41]. Zum anderen ergibt sich eine Destabilisierung der Lysosomen-Membran auch durch indirekte Cisplatin-Effekte auf die Mitochondrien (ROS), die DNA (p53), das endoplasmatische Reticulum (Caspase 2) bzw. über eine Aktivierung von Bax [42–44].

Auch hinsichtlich des endoplasmatischen Reticulums (ER) werden sowohl direkte Effekte von Cisplatin nach Akkumulation im ER als auch indirekte Effekte diskutiert. Bei Letzteren spielen insbesondere die Proteine Bax und Bak der Bcl-2-Familie, p53 sowie die Caspasen 2 und 4 eine wichtige Rolle [26].

Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin wird auch über Effekte in der Plasmamembran sowie im Zytoskelett vermittelt. In der Plasmamembran reagiert Cisplatin zum einen mit Proteinen des Plasmalemmas sowie zum anderen mit negativ geladenen Phospholipiden. So wird die Aktivität von Ionenkanälen und Transportern reduziert bzw. das Plasmalemma destabilisiert. Infolge dessen wird u.a. über eine Stimulation von Fas der extrinsische Apoptose-Weg aktiviert [45]. Der Cisplatin-Effekt auf das Zytoskelett ergibt sich v.a. aus einer Interaktion mit der Aktin-Polymerisation bzw. der G- bzw. F-Aktin-Depolymerisation, was wiederum in die Apoptose mündet [26, 46].

2.1.2 Cisplatin-Resistenz

Die zytostatische Wirkung von Cisplatin steht in engem Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber Cisplatin. Dabei unterscheidet man Resistenzen, die schon zu Beginn einer Behandlung gegen einen oder mehrere Arzneistoffe bestehen (*primäre* oder *intrinsische Resistenz*), und Resistenzen die im Verlaufe einer Arzneimittel-Therapie erworben werden (*sekundäre* oder *erworbene Resistenz*). Mit Cisplatin-Resistenzen, unabhängig von ihrem Ursprung, ergeben sich oft Kreuzresistenzen zu anderen platinhaltigen Zytostatika. Eine vollständige Kreuzresistenz gegen Carboplatin konnte bereits zu Beginn der 90er-Jahre belegt werden [17, 47]. Aus diesem Grund wird in der onkologischen Therapie von Tumorerkrankungen zumeist eine Kombinationstherapie mit Wirkstoffen gewählt, die andere Wirkmechanismen haben, um die Gefahr der Selektion von Tumorzellen und damit die Entstehung von Resistenzen nicht

zu begünstigen.

Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin können unterschiedlichste Ursachen haben. Ausgehend von der primären Zielstruktur Cisplatins, der Schädigung der DNA, können verschiedenste Effekte in der intrazellulären Transduktion festgestellt werden [17]. Dazu zählen gesteigerte Reparaturmechanismen, Bindung von HMG-Proteinen und Transkriptionsfaktoren, sowie Zellzyklusarrest und Modifikationen in den Regulationsmechanismen der Apoptose. Darüber hinaus sind seit einigen Jahren rezeptorvermittelter verminderter Influx bzw. gesteigerter Efflux und gesteigerte Detoxifikation bekannt (siehe Abbildung 2.4) [17, 26, 47].

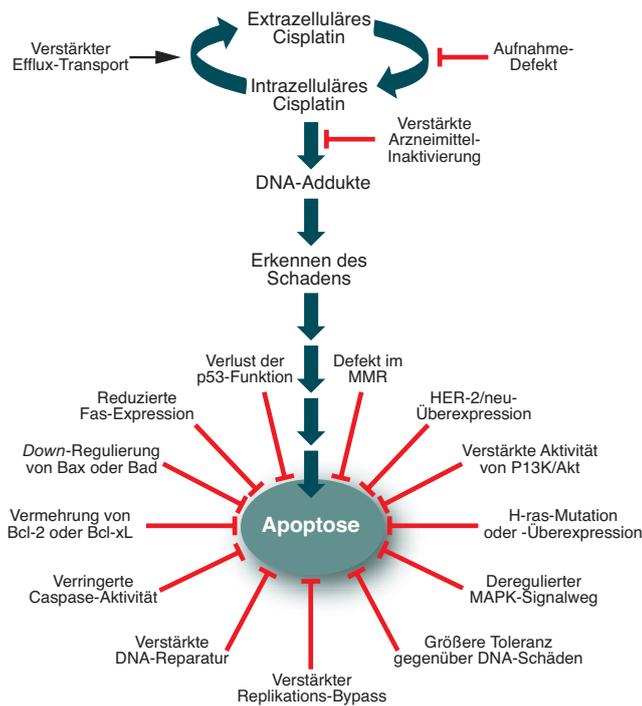


Abb. 2.4: Zusammenfassung wesentlicher Cisplatin-Resistenzmechanismen [17, 48].

Im Folgenden werden einige aus der Literatur bekannte Mechanismen kurz vorgestellt, wobei der Fokus auf den Mechanismen liegt, die für die vorliegende Arbeit relevant sind:

Für Cisplatin sind aktuell drei Klassen von Influx-Transportern beschrieben, die alle zur Superfamilie der SLCs (**S**olute **C**arriers) gehören. Zu ihnen zählen die Kupfer-Transporter Ctr 1 und 2 (SLC31A1 und SLC31A2), die organischen Kationen-Transporter OTC 1 und 2 (SLC22A1 und SLC22A1), sowie der Transporter MATE 1 (**M**ultidrug and **t**oxin **e**xtrusion, SLC47A1) [49]. In diesem Abschnitt wird lediglich auf das Kupfer-Transport-System eingegangen, da es für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist.

Der **Ctr 1** ist ein Homotrimer bestehend aus drei einzelnen Ctr 1-Polypeptiden (190 AS), die sich vermutlich zu einer Pore zusammenlagern [50]. Kennzeichnend für jedes Ctr 1-Polypeptid

sind drei transmembranäre Domänen mit zwei Methionin-reichen extrazellulären Motiven im Bereich des N-Terminus und einer weiteren Methionin-reichen Sequenz in der zweiten transmembranären Domäne (siehe Abbildung 2.5). Die extrazellulären Methionin-Domänen haben die Funktion der Bindung von Kupfer sowie der Endozytose von Ctr 1. Das transmembranäre Methionin-Motiv ist hoch konserviert und in allen Transportproteinen der Ctr-Familie zu finden. Diese Sequenz übernimmt ebenfalls eine wichtige Rolle in der durch Kupfer stimulierten Endozytose von Ctr 1 bzw. dessen Abbau [51]. Der C-Terminus liegt intrazellulär und ist durch ein Cys-His-Motiv gekennzeichnet.

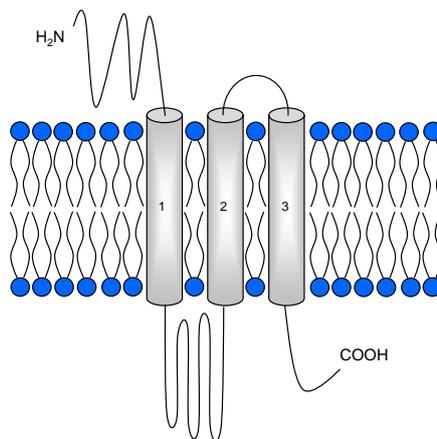


Abb. 2.5: Topologiemodell des Ctr1, bestehend aus drei transmembranären Domänen; modifiziert nach [49].

Physiologisch ist der Ctr 1 zusammen mit den P-Typ ATPasen ATP7A und ATP7B in die Regulation des Kupfer-Haushaltes der Zelle involviert, da hohe Konzentrationen ungebunden Kupfers in der Zelle toxisch wirken [52]. Die genaue Kupfer-Aufnahme in die Zelle ist noch nicht abschließend erforscht, es werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert ausgehend von der zuvor beschriebenen Pore: ALLER *et al.* beschreiben den Ctr 1 als Pore-ähnlichen Kanal für Metall-Ionen [53], SINANI hingegen postuliert, dass die Aufnahme von Kupfer mit einer Konformationsänderung der Pore einhergeht und damit die Aufnahme einem Arzneistoff-Transport ähnelt [54]. Die Funktion des Ctr 1 ist Temperatur-, pH- und Kaliumionen-abhängig [55].

In vitro-Studien an *Saccharomyces cerevisiae* und Säugetier-Zellen, in denen der Ctr 1 herunterreguliert wurde, konnten eine merkliche Reduktion der Cisplatin-Aufnahme und damit eine Steigerung der Cisplatin-Resistenz zeigen. Ebenso führt ein Funktionsverlust von Ctr 1 zu einer verminderten Aufnahme von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin [50, 56, 57]. Diese Studien belegen, dass der Ctr 1 an Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin beteiligt ist.

Die P-Typ ATPasen **ATP7A & B** sind im Golginetzwerk lokalisiert und ebenfalls beim Kupfertransport involviert. Anders als Ctr1 sind sie für den intrazellulären Kupfertransport verantwortlich; dies umfasst Sequestrierung und Efflux. ATP7A & B weisen eine 67%ige Übereinstimmung in ihren Aminosäure-Sequenzen auf und verfügen über einen analogen Aufbau (siehe Abbildung 2.6). Beide P-Typ ATPasen haben acht transmembranäre Domänen mit einem zytosolischen N-Terminus, welcher sechs charakteristische sich wiederholende Sequenzen aufweist, die zusammen als Metall-Bindungsstelle (MBS - **M**etal **B**inding **S**ite) bezeichnet werden. In der dritten zytosolischen Schleife ist eine Phosphatase-Domäne lokalisiert und die vierte sehr große und variable Schleife enthält eine Phosphorylierungsstelle und eine ATP-Bindungs-Domäne. Das C-terminale Ende hat im Fall von ATP7A ein Di-Leucin-Motiv, welches eine wichtige Rolle für die endozytotische Wiederaufnahme in das Golgi-Netzwerk und für das Targeting an der basolateralen Membran übernimmt. ATP7B verfügt an dieser Stelle über ein Tri-Leucin-Motiv, welches ebenfalls mit der Regenerierung des Transportproteins in der Golgi-Membran in Verbindung gebracht wird [51].

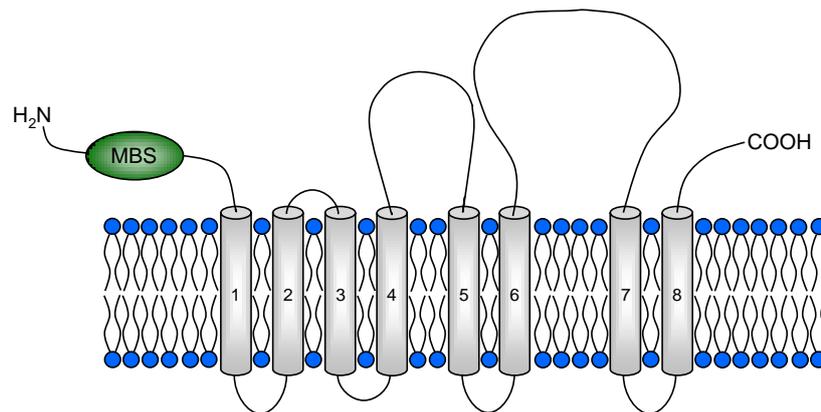


Abb. 2.6: Vereinfachtes Topologiemodell von ATP7A & B, bestehend aus acht transmembranären Domänen; modifiziert nach [51]. ATP7A & B weisen eine 67%ige Übereinstimmung in ihren Aminosäure-Sequenzen auf. Das C-terminale Ende verfügt bei ATP7A über ein Di-Leucin-Motiv und bei ATP7B an dieser Stelle über ein Tri-Leucin-Motiv [51].

Physiologisch wird ATP7A in höheren Konzentrationen in der Leber exprimiert. ATP7B ist dort ebenfalls lokalisiert, sowie zusätzlich im Nierengewebe und in der Plazenta. Es konnte gezeigt werden, dass eine genaue Lokalisation von ATP7A & B in der Zelle Kupfer-abhängig ist. Eine Grundkonzentration von beiden Rezeptoren ist in jeder Zelle im Golginetzwerk nachweisbar. Bei Anwesenheit von Kupfer hingegen sind beide Transporter in der Plasmamembran oder in Vesikeln zu finden [51, 58]. Die genauen Mechanismen der Sequestrierung bzw. der Translokation sind sehr komplex; maßgeblich ist die große, variable vierte im Zyto-

sol gelegene Schleife mit der Phosphorylierungs-Stelle und der ATP-Bindungs-Domäne darin involviert [51]. Zytoplasmatisches Kupfer ist an spezifische Metallochaperone (ATOX 1, CCS und COX 17) gebunden und wird so an ATP7A & B abgegeben und sequestriert. Das Kupfer-Chaperon ATOX 1 ist spezifisch für den Efflux-Signalweg und es ist bekannt, dass es mit ATP7A & B interagiert [52]. Störungen oder Funktionsverlust dieser beiden Transportproteine sind als Menkes und Wilson's Krankheit bekannt. Beide Krankheiten sind Kupfer-Speicher-Krankheiten [59].

Erhöhte Expressionsraten von ATP7A & B wurden in verschiedenen *in vitro*-Studien mit platinhaltigen Arzneistoffen mit einer verstärkten Resistenz in Verbindung gebracht [52]. Darüber hinaus wurde in einigen klinischen Studien beobachtet, dass erhöhte Spiegel dieser Transporter mit einer schlechteren Prognose korrelierten [51, 52, 60, 61].

Trotz des sehr ähnlichen Aufbaus unterscheiden sich ATP7A & B in einigen Punkten:

Eine Überexpression von ATP7B geht mit einer verminderten Kapazität der Zellen Platin zu akkumulieren und mit einem verstärkten Efflux einher [52]. Bei ATP7A ist Gegenzugliches zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression zu höheren Platinspiegeln führt und mit einem stärkeren Resistenzgrad der Zellen einhergeht [52, 62]. Diese beiden Tatsachen erklären die mögliche Funktion von ATP7A: Bindung und Sequestrierung von platinhaltigen Arzneistoffen, sodass eine zytotoxische Wirkung durch DNA-Platinierung verhindert wird. Die Unterschiede der beiden P-Typ ATPasen sind in Tabelle 2.1 dargestellt:

Tab. 2.1: Unterschiede in den Funktionen von ATP7A und ATP7B [52].

	ATP7A	ATP7B
Gewährleisten Resistenz gegenüber Pt-haltigen Arzneistoffen	+	+
Sequestrierung von cDDP in Vesikel	+	+
Re-Lokalisation von Vesikeln in Abhängigkeit der Pt-Exposition	minimal	gut
Vermitteln cDDP-Efflux	wenig	gut
Reduzieren Pt-DNA-Addukte	verschieden	+
Lokalisation in Exosomen	+	+

Eine andere Schutzfunktion der Zelle vor toxischen Substanzen ist die **Detoxifikation**, beispielsweise über Glutathion (GSH) oder Metallothioneine. Physiologisch übernehmen diese Thiol-haltigen Moleküle eine Entgiftungsfunktion, indem Metallionen als Chelatkomplex gebunden werden. Die Limitierung dieser Schutzfunktion liegt in der Synthese des Glutathions durch die γ -Glutamin-Synthetase [63]. Cisplatin wird entweder direkt an GSH gebunden oder katalysiert über das Enzym Glutathion-S-Transferase. GSH-gebundenes Cisplatin kann nur noch bedingt mit der DNA reagieren. Eine Monoaddukt-Bildung mit einem DNA-Strang ist möglich, jedoch können keine Quervernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen mehr

entstehen. In einem weiteren Schritt kann der gebildete Platin-GSH-Komplex dann ATP-abhängig über MRP 2 aus der Zelle geschleust werden [64]. Darüber hinaus wird von GODWIN *et al.* postuliert, dass erhöhte GSH-Konzentrationen in resistenten Krebszellen eine gesteigerte Reparatur der Platin-DNA-Addukte auslösen [22, 63].

Die Cisplatin-Resistenz ist ein komplexes Netzwerk von Faktoren, die ineinandergreifen und schlussendlich eine geänderte Signaltransduktion zur Folge haben (siehe Kapitel 2.1.1).

2.1.3 Doxorubicin-Wirkmechanismus

Die Anthracycline Doxorubicin und Daunorubicin sind zytostatisch wirksame Antibiotika (siehe Abbildung 2.7) und werden zur Gruppe der DNA-Interkalatoren gezählt.

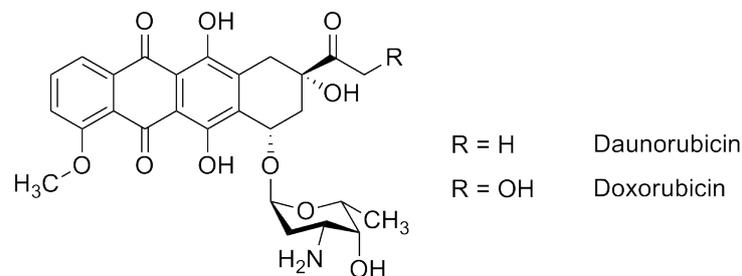


Abb. 2.7: Chemische Strukturen von Daunorubicin und Doxorubicin.

Sie werden aus *Streptomyces*-Arten gewonnen und seit den 60er-Jahren in der onkologischen Therapie eingesetzt, da sie über ein breites antitumorales Wirkspektrum verfügen. Ihre zytostatische Wirkung beruht auf verschiedenen ineinandergreifenden Mechanismen, die hauptsächlich in der S-Phase (Synthese-Phase) eingreifen, in der die DNA repliziert wird: Da sowohl Doxorubicin als auch Daunorubicin planare Moleküle sind, können sie sich in die doppelsträngige DNA einlagern und interkalieren [65]. Über hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zu Störungen der helikalen Struktur der DNA und in Folge dessen zu Strangbrüchen. Replikation und Transkription der DNA ist nicht mehr möglich. Zusätzlich entstehen DNA-Strangbrüche durch Hemmung der Topoisomerase II. Bei der Biotransformation der Anthracycline entstehen freie Radikale, welches zum einen ebenfalls in Strangbrüchen resultiert, zum anderen die zum Teil Therapie-limitierende Kardiotoxizität dieser Substanzen erklärt. Darüber hinaus erhöhen Daunorubicin und Doxorubicin die Fluidität und Permeabilität von Zellmembranen, indem sie sich an bestimmte Bestandteile der Membranen anlagern und damit Apoptose auslösen [66, 67].

2.1.4 Doxorubicin-Resistenz

Resistenzen gegen Anthracycline wurden schon sehr früh entdeckt. So konnte DANO bereits 1973 einen aktiven Efflux von Daunorubicin in resistenten Ehrlich-Ascites-Zellen beobachten [68]. Drei Jahre später entdeckten JULIANO & LING in Kolchizin-resistenten CHO-Zellen eine Effluxpumpe, die verantwortlich für eine Reihe von Resistenzen ist und beschrieben sie als P-Glykoprotein (P-gp) [69].

P-gp (MDR1, ABCB1) ist das Produkt des human *MDR1* (*multidrug resistance*) Gens und vermutlich das am besten untersuchte Transportprotein der Gruppe der ABC-Transporter [70]. Es besteht aus 1280 Aminosäuren und hat glykosyliert ein Molekulargewicht von 170 kDa. Strukturell kann P-gp in zwei homologe Hälften geteilt werden (siehe Abbildung 2.8), die jeweils aus sechs transmembranären Domänen bestehen und über eine Nukleotid-Bindungsstelle flexibel miteinander verbunden sind [71].

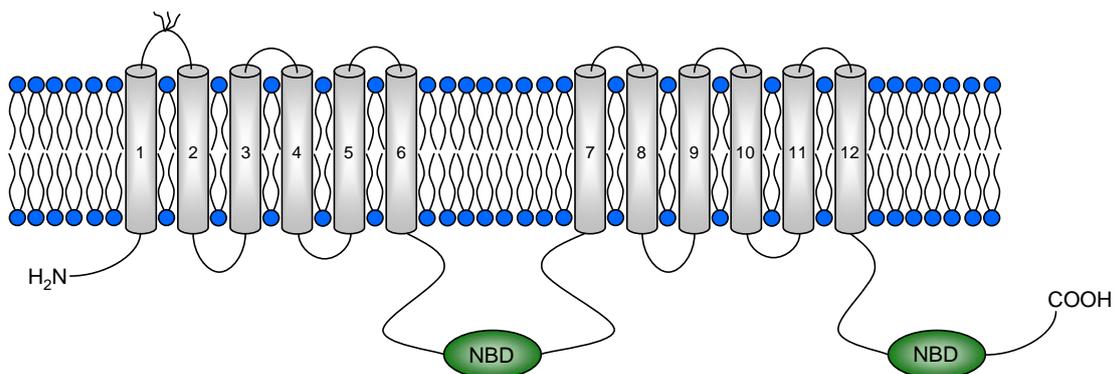


Abb. 2.8: Topologiemodell des P-gp, bestehend aus zwei homologen transmembranären Domänen und zwei NBDs (Nukleotid-Bindungs-Domänen). Die erste extrazelluläre Schleife ist N-glykosyliert.

Für eine fehlerfreie Funktion des P-gps sind beide homologen transmembranären Domänen essentiell [72], ebenso wie die Bindung von ATP und seine Hydrolyse an der NBD, die die notwendige Energie zum Transport von Substraten liefert [71, 73, 74]. Die Eigenschaft dieses Transporters, bzw. aller Transporter dieser Familie, Energie aus der ATP-Hydrolyse zu gewinnen und damit einen aktiven Transport gegen einen Konzentrationsgradienten zu ermöglichen, ist namensgebend: ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette) [75].

Physiologisch übernehmen einige Transporter aus der ABC-Superfamilie in nicht entartetem Gewebe eine Schutzfunktion vor toxischen Substanzen im Organismus. So erklären sich die hohen Expressionsraten in Niere, Leber und Darm, sowie in der Blut-Hirn- und Plazenta-Schranke [71, 76, 77]. Die Heterogenität dieser Transporter-Familie zeigt sich auch in ihrer

Substratspezifität. Neben hoch Substrat-spezifisch arbeitenden Transportern gibt es auch ABC-Transporter, die eine breite Substratspezifität aufweisen, so auch das P-gp. Dies wird für das P-gp mit unterschiedlichen Bindungstaschen für verschiedene Substrate erklärt:

SAHIRO & LING konnten fluorenszenzspektrometrisch unter Zusatz von P-gp stimulierenden und inhibierenden Substanzen, zwei verschiedene Bindungsstellen mit Rhodamin 123 (R-Site) und Hoechst 33342 (H-Site) nachweisen [78]. Es konnte gezeigt werden, dass Daunorubicin und Doxorubicin an der R-Site binden, Quercetin und Kolchizin hingegen an der H-Site. Darüber hinaus binden Etoposid, Verapamil und Vinblastin mit vergleichbarer Affinität an beiden Bindungstaschen. Es stellte sich heraus, dass beide Substratbindungsstellen positiv kooperativ interagieren.

Bis heute werden die Funktionen und Lokalisation weiterer Bindungstaschen des P-gp sowie die transportierten Substrate immer noch erforscht und diskutiert, da sich der Vorteil der breiten Substratspezifität als Schutz des Organismus vor Xenobiotika in der Therapie von malignen Erkrankungen als großes Therapie-limitierendes Problem erweist. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über die Heterogenität der P-gp-Substrate [74, 75].

Tab. 2.2: Auswahl P-gp-Substrate.

Substanzklasse	Vertreter	(Zytostatikaklasse)
Zytostatika	Mitomycin Antrazykline: Daunorubicin, Doxorubicin Podophyllotoxine: Etoposid, Teniposid Taxane: Paclitaxel, Docetaxel Vinka-Alkaloide: Vinblastin, Vincristin	(Alkylantien) (DNA-Interkalatoren) (Mitosehemmstoffe) (Mitosehemmstoffe) (Mitosehemmstoffe)
Corticoide	Dexametason, Hydrocortison, Triamcinolon	
Antibiotika	Erythromycin, Valinomycin	
HIV-Proteaseinhibitoren	Indinavir, Ritonavir, Saquinavir	
Andere Arzneistoffe	Opioid: Loperamid Immunsuppressivum: Cyclosporin	
Sonstige Verbindungen	Fluoreszenzfarbstoffe: Rhodamin 123, Hoechst 33342	

Eine erhöhte Expressionsrate von einigen ABC-Transportproteinen wie P-gp, BCRP (**B**reast **C**ancer **R**esistance **P**rotein) oder MRP 1 (**M**ultidrug **R**esistance-related **P**rotein 1), die eine sehr breite Substrattoleranz zeigen, ist die Ursache von MDR in einer Vielzahl von Tumoren [71, 79]. Tumoröses Gewebe, das eine MDR aufweist, zeigt charakteristischerweise sehr niedrige Arzneistoffkonzentrationen aufgrund des gesteigerten Efflux durch die oben genannten Transportproteine. Zusätzlich sind die meisten multiresistenten Tumore nicht nur gegen

einen Arzneistoff resistent, sondern gegen verschiedenste Arzneistoffe. Dieses Phänomen wird als Kreuzresistenz bezeichnet und zeigt sich im teilweisen oder vollständigen Versagen der Chemotherapie.

2.2 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige, kolloidale Vesikel, bestehend aus einer oder mehreren quellbaren, wasserunlöslichen, konzentrisch angeordneten Phospholipid-Doppelschichten um einen wässrigen Kern. Liposomen ähneln in ihrem Aufbau damit biologischen Membranen. Ihre Größe variiert von ca. 20 nm bis zu mehreren μm . Klassifiziert werden Liposomen nach ihrer Größe bzw. der Anzahl der Phospholipid-Doppelschichten: Bei den unilamellaren Liposomen unterscheidet man zwischen SUV (**s**mall **u**nilamellar **v**esicles) mit einer Größe bis zu 50 nm und in LUV (**l**arge **u**nilamellar **v**esicles) im Bereich größer 100 nm. Darüber hinaus gibt es MLV (**m**ultilamellar **v**esicles), die durch mehrere bis viele Phospholipid-Doppelschichten in den unterschiedlichsten Größen definiert sind.

Erstmalig wurden Liposomen von BANGHAM und seinen Mitarbeitern beschrieben, die Versuche mit trockenen Lipiden und Wasser durchführten und dabei elektronenmikroskopisch die spontane Bildung von sphärischen Kugeln (Liposomen) beobachteten [80, 81]. Mit Liposomen ist es möglich, sowohl hydrophile Substanzen im Inneren einzuschließen als auch lipophile Substanzen in die lipophile Membran einzulagern. Zudem ist durch Auswahl unterschiedlichster Lipide eine große Bandbreite an Liposomen möglich, die sich beispielsweise in Größe, Membranfluidität oder der Oberflächenladung und ihren chemischen Eigenschaften (pH-Sensitivität) unterscheiden.

Zur systemischen Applikation eignen sich unilamellare Liposomen bis zu einer Größe von 400 nm [82]. *In vivo*-Anwendungen waren aber lange Zeit nur bedingt möglich, da die Liposomen durch das RES (**R**etikulo-**E**ndotheliale **S**ystem) innerhalb von Minuten erkannt und abgebaut wurden. Das RES, auch MPS (**M**ononukleäre **P**hagozyten-**S**ystem) genannt, ist ein sehr wichtiger Bestandteil des körpereigenen Immunsystems und dient dazu, Fremdstoffe aus dem Organismus zu eliminieren. Folglich wurde diese erste Generation von Liposomen vorwiegend in der Leber, Milz und Lunge angereichert, da das RES dort verstärkt aktiv ist. Um eine bessere Stabilität zu gewährleisten, wird Cholesterol in die Liposomen eingebaut. Cholesterol erhöht die Packungsdichte der Liposomen und verhindert so Interaktionen mit Serumproteinen und einen vorzeitigen Verlust des hydrophilen Arzneistoffs aus dem wässrigen Kern der Liposomen [83]. Eine deutliche Verbesserung der Zirkulationszeit von Liposomen im Organismus gelang in den 90er-Jahren durch eine anteilige Verwendung von

Lipiden mit voluminösen, hydrophilen (PEGylierten) Kopfgruppen. Diese so sterisch stabilisierten Liposomen können bis zu Tagen im Organismus zirkulieren. Durch lange PEG-Ketten (Molekulargewicht zwischen 2000 und 5000 g/mol) lagert sich Wasser an die Liposomenoberfläche an und verhindert so die Anlagerung von Opsoninen und die damit verbundene Phagozytose bzw. Eliminierung durch das RES.

2.2.1 Passives Tumortargeting

Das als Tumortargeting bezeichnete zielgerichtete Ansprechen des Tumors mit antitumoralen Arzneistoffen verfolgt das Ziel eines direkten, gezielten Arzneistofftransports zum Tumor ohne Kontakt zum gesunden Gewebe und dadurch eine Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen [84]. Diese Form der Arzneistoffapplikation ist immer dann erwünscht, wenn im Rahmen einer Therapie mit schweren systemischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu rechnen ist, z.B. bei der Hochdosischemotherapie. Liposomen erfüllen diesen optimalen und exklusiven Wirkstofftransport: Sie schirmen den Arzneistoff vor vorzeitiger Metabolisierung im Organismus ab und sind selbst pharmakologisch und physiologisch indifferent [85].

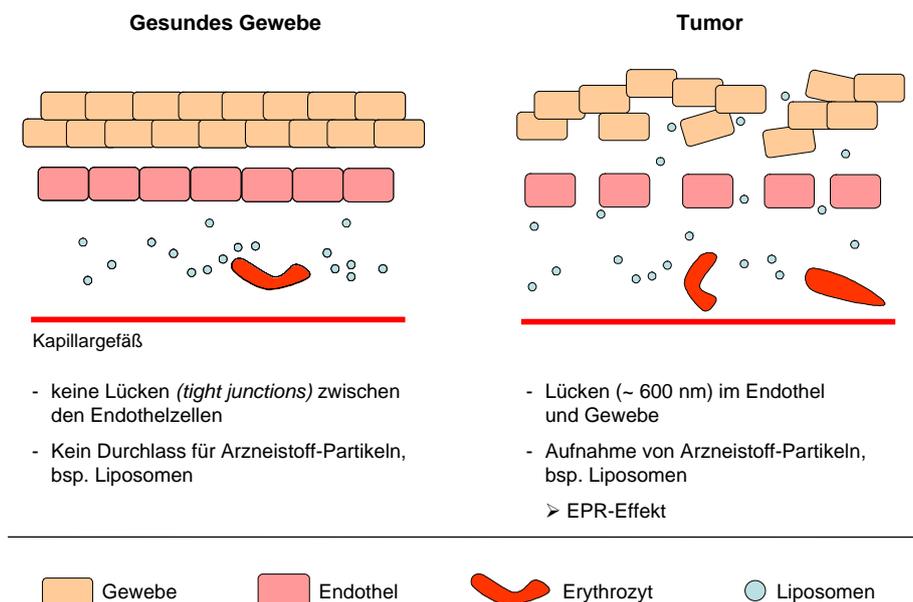


Abb. 2.9: Graphische Darstellung des EPR-Effektes.

Der Effekt des passiven Targetings liegt in der Morphologie des Tumors begründet. Zum

einen entstehen durch schnelles, ungeordnetes Wachstum Lücken im Endothel, zum anderen ist das Lymphsystem in vielen Tumoren nur mangelhaft ausgebildet. Beides führt zu einer verlängerten Verweildauer und einem verzögerten Abtransport von Molekülen.

MATSUMURA & MADEA beschrieben bereits 1986 dieses Phänomen und bezeichneten es als EPR-Effekt (**E**nhanced **P**ermeability and **R**etention) [86, 87]. Diese beiden Besonderheiten ermöglichen die Verwendung von makromolekularen Arzneistoffen (<20 kDa) bzw. Liposomen zur Tumorthherapie (siehe Abbildung 2.9). Hingegen steuert nicht entartetes Endothel die Aufnahme von Stoffen gezielt über "tight junctions". Liposomen sind somit zu groß, um in gesundes Gewebe einzudringen.

Um ein passives Targeting im Tumor zu gewährleisten, müssen die Tumoren gut vaskularisiert sein und dürfen eine bestimmte Größe nicht überschreiten [88]. Der fehlende lymphatische Abfluss verlängert die Verweildauer der Liposomen, weil diese nicht gezielt abtransportiert werden können [89].

2.2.2 Aktives Tumortargeting

Aktives Targeting, auch als Ligand-vermitteltes oder spezifisches Targeting bezeichnet, basiert auf den bekannten Effekten des passiven Targetings, jedoch mit der Prämisse, dass die Liposomen gezielt an einen Rezeptor adressiert werden. Um diese spezifische Anreicherung von Liposomen zu erreichen, wird die Oberfläche der Liposomen modifiziert und der Ligand meist über kovalente Bindungen an die Oberfläche der Liposomen gekoppelt. Für ein erfolgreiches spezifisches Tumor-Targeting sollten folgende Voraussetzungen auf zellulärer Ebene erfüllt sein: Die Zielstrukturen sollten stabil und ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden oder im Vergleich zu gesundem Gewebe sehr stark überexprimiert sein. Darüber hinaus sollte der Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen exprimiert sein, um eine adäquate Erreichbarkeit durch spezifisch targetierte Liposomen zu ermöglichen [90, 91]. Damit eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme gesichert ist, sollten bevorzugt Rezeptoren gewählt werden, welche über Endozytose internalisieren [92].

Die zum Targeting verwendeten Strukturen umfassen monoklonale Antikörper oder Fragmente, Peptide, Proteine, Glycoproteine oder auch kleine Strukturen wie Biotin.

Ein sehr großer Vorteil von Ligand-vermitteltem Targeting ergibt sich aus dem Ligand-Arzneistoffverhältnis: Bei einer Antikörper-vermittelten Targetierung von Wirkstoffmolekülen ist das Verhältnis Rezeptor zu Antikörper 1:1. Im Falle von wirkstoffbeladenen, spezifisch targetierten Liposomen verschiebt sich das Verhältnis: Targetiert über eine kleine Menge an Liganden auf der Liposomen-Oberfläche wird eine große Menge an Arzneistoff (im Innern der Liposomen) in die Zelle abgegeben. Zudem verbessert sich bei targetierten Liposomen

die Bindungsfähigkeit und damit auch die Arzneistoffaufnahme in die Zellen. Es resultiert ein intensivierter therapeutischer Effekt [93].

Transferrin-Rezeptor - spezifisches Targeting

Der Transferrin-Rezeptor 1 (TfR 1, CD71) ist ein Zellmembran-assoziiertes, homodimeres Glycoprotein, welches an der zellulären Eisenaufnahme und an der Regulation des Zellwachstums beteiligt ist [94, 95]. Jedes Monomer besteht aus 760 Aminosäuren (90-95 kDa). Verknüpft sind die beiden Einheiten über zwei Disulfidbrücken zwischen Cys 89 und Cys 98 [96]. Darüber hinaus hat der Tf-Rezeptor eine große extrazelluläre C-Domäne mit 671 Aminosäuren, die die Transferrin-Bindungsstelle enthält. Über einen kurzen transmembranären Bereich (28 AS) ist die extrazelluläre Domäne mit der intrazellulären N-terminalen Domäne (61 AS) verbunden (siehe Abbildung 2.10).

Zur vollständigen Funktionsfähigkeit müssen im Bereich der C-Domäne eine O-Glycosylierung (Thr 104) und drei N-Glycosylierungen (Asp 251, 317, 727) vorhanden sein [95].

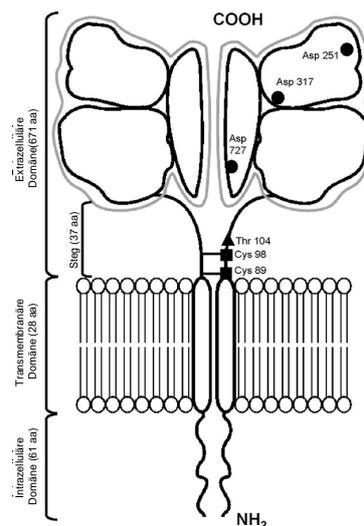


Abb. 2.10: Struktureller Aufbau des Transferrin-Rezeptors (TfR) [95].

Die Eisenaufnahme durch den Transferrin-Rezeptor erfolgt endozytotisch: Dabei werden zwei Moleküle Eisen, welche als Chelat-Komplex an das Transferrin-Molekül gebunden sind, aktiv über den Transferrin-Rezeptor Clathrin-vermittelt aufgenommen (siehe Abbildung 2.11).

Nach der Internalisierung des Transferrin-TfR-Komplexes, bildet sich zunächst ein frühes Endosom und in der weiteren intrazellulären Prozessierung ein Endosom. Diese Entwicklung ist durch eine stetige pH-Wert-Abnahme im Inneren des Endosoms gekennzeichnet und ermöglicht so eine Konformationsänderung des Transferrins, welche in der Abgabe des kom-

plexierten Eisens mündet [97]. Der Apo-Transferrin-TfR-Komplex kann nach Abgabe des Eisens wieder in die Zellmembran integriert werden und steht erneut für eine Internalisierung zur Verfügung. Dies wird durch die mangelnde Bindungsfähigkeit des Apo-Transferrins zum Tf-Rezeptor bei physiologischem pH-Wert forciert, welcher nach Abgabe des Eisens vorliegt [98]. Ungefähr 10% der Transferrin-Rezeptoren unterliegen nach der Eisenabgabe einer langsameren Wiederaufarbeitung durch das Golgi-Netzwerk [99].

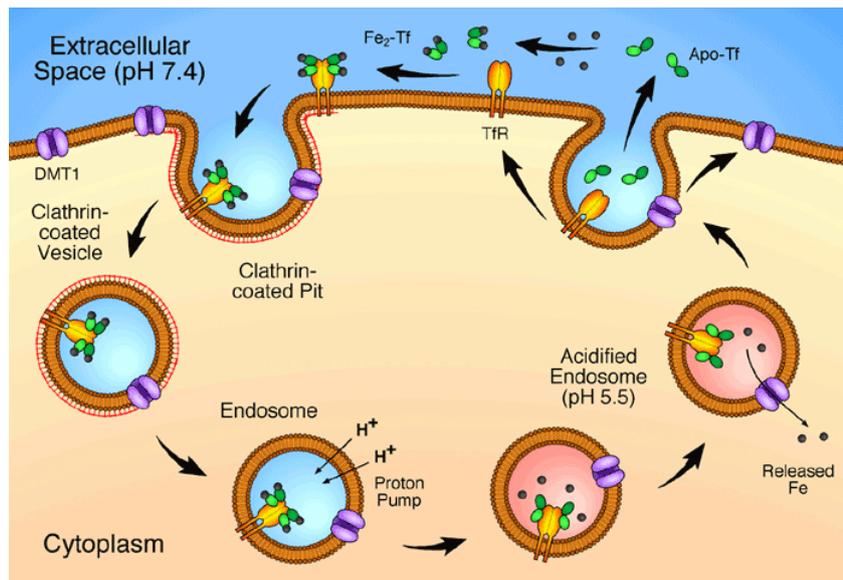


Abb. 2.11: Rezeptor-vermittelte Eisenaufnahme über den Transferrin-Rezeptor [100].

Im Gegensatz zum TfR 2, welcher ausschließlich in der Leber vorkommt, wird der TfR 1 ubiquitär in geringen Mengen in gesundem Gewebe exprimiert. Stark überexprimiert ist der TfR 1 auf allen Zellen mit hohem Eisenbedarf, frühkindlichen erythroiden Zellen [99], Plazenta-Gewebe und schnell-teilenden Zellen, wie Darmepithel-Zellen oder basalen Epidermis-Zellen. Viele Studien haben belegen können, dass es im Vergleich zu physiologischem Gewebe auf Tumorzellen eine erhöhte Expressionsrate des TfR 1 gibt [95, 101].

Diese umfassen verschiedenste maligne Erkrankungen, unter anderem Lungenkarzinome [102, 103], Lymphknotenkrebs, Darm- und Pankreas-Krebs. Bereits 1986 konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesunden Brustzellen die Expressionsrate des TfR auf Brustkrebszellen um das vier- bis fünffache erhöht ist [104, 105]. Aus einer Brustkrebs-Studie aus dem Jahr 2010 geht hervor, dass eine erhöhte Expressionsrate des TfR mit einer schlechteren Prognose einhergeht [106].

Diese klinischen Beispiele zeigen zum einen die klinische Relevanz des TfR, zum anderen auch das mögliche therapeutische Potential des TfR für ein aktives Tumor-Targeting.

2.2.3 Liposomales Cisplatin

Die Idee, Cisplatin in Liposomen einzuschließen, wurde bereits von FREISE *et al.* in den 80er-Jahren verfolgt. Hintergrund hierfür waren vor allem das Therapie-limitierende Nebenwirkungsprofil und die damit verbundene hohe Toxizität von freiem Cisplatin. Dazu zählen insbesondere die hohe Nephrotoxizität, Neurotoxizität und Emesis, als Ergebnis der pharmakokinetischen Eigenschaften von Cisplatin. Diese sind charakterisiert durch eine kurze Plasma-Halbwertszeit, schnelle renale Elimination und eine hohe Plasmaproteinbindung [107].

Mit einer liposomalen Formulierung kann eine Therapie-Optimierung durch verbesserte Biokompatibilität, mögliches Beladen mit größeren Wirkstoffmengen und Schutz des Wirkstoffs vor rascher Plasma-Eiweißbindung ermöglicht werden. Darüber hinaus wird mit einer liposomalen Formulierung eine längere Plasma-Halbwertszeit bei gleichzeitig langsamerer renaler Elimination sowie guter Verfügbarkeit eines höheren Anteils an freiem Cisplatin im Blut erreicht. Hinzu kommt die Perspektive des Tumor-Targetings durch den Einsatz von Liposomen. Als Folge dieser Eigenschaften bieten Liposomen gegenüber freiem Cisplatin die Möglichkeit eines besseren Nebenwirkungsprofils der Cisplatin-Behandlung bei gleichzeitig verstärkter Wirksamkeit [107].

Bis heute gibt es drei liposomale Formulierungen von klinischer Relevanz (siehe Tabelle 2.3). **LiPlaCis[®]** ist eine besondere Form von liposomalem Cisplatin, da Lipide verwendet wurden, die durch Phospholipase A₂ abgebaut werden und so ein gezieltes Tumor-Targeting ermöglichen. Jedoch wurde seine Weiterentwicklung bereits im Rahmen der Phase I-Studie in Folge akuter Reaktionen bei der Applikation vorzeitig beendet [108, 109]. Um den letztlichen klinischen Einsatz von LiPlaCis[®] zu ermöglichen, müsste somit die Liposomen-Zusammensetzung weiter optimiert werden.

SPI-77 sind sterisch stabilisierte Liposomen mit einer längeren Plasma-Halbwertszeit von 16 Stunden in Mäusen, verglichen mit 0,24 Stunden bei freiem Cisplatin. Unter der Anwendung von SPI-77 konnte eine 60-fach höhere Plasma-AUC, eine 3-fach höhere maximale Plasmakonzentration sowie eine 4-fach geringere Anreicherung in den Nieren und eine 28-fach höhere Tumor-AUC als bei Cisplatin gemessen werden [112]. Die verbesserte Pharmakokinetik bestätigte sich auch in einer Phase-I-Studie an Menschen [113]. Allerdings zeigte SPI-77 in präklinischen Studien eine schlechtere Wirksamkeit als freies Cisplatin [114]. Wahrscheinlichste Ursache ist, dass nur ca. 10% des eingeschlossenen Cisplatins aus SPI-77 freigesetzt werden, was in einer im Vergleich mit Cisplatin geringeren *in-vitro* Zytotoxizität resultiert [115]. In mehreren Phase-II-Studien an Menschen bestätigte sich, dass SPI-77 keine signifikante Wirksamkeit bei fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs bzw. Platin-sensitiven Ovarialkarzinom-Rezidiven zeigte [109, 116, 117].

Tab. 2.3: Liposomale Cisplatin-Formulierungen von klinischer Relevanz.

Name	SPI-77 [110]	Lipoplatin™ [111]	LiPlaCis® [108]
Arzneistoff	Cisplatin	Cisplatin	Cisplatin
Zusammensetzung (Cisplatin-Lipid-Verhältnis)	HSPC / Chol / DSPE-PEG ₂₀₀₀ 1:70	SPC / Chol / DPPG / mPEG 2000-DSPE 1:10	DSPC / DSPG / DSPE-PEG ₂₀₀₀ Nicht bekannt
Liposomen-Größe (Ø)	110 nm	110 nm	Nicht bekannt
Klinischer Status	Phase II	Phase II, III	Phase I
Indikation	- Ovarialkarzinom - Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom - Kopf-Hals-Karzinome	- Pankreas-Karzinom - Kopf-Halskarzinom - Mesotheliom - Brustkrebs - Magenkrebs - Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Nicht bekannt

Derzeit ist die am meisten versprechende liposomale Formulierung von Cisplatin in der klinischen Entwicklung das **Lipoplatin™** [109, 117]. STATHOPOULOS *et al.* konnten eine schnelle Aufnahme und Internalisierung von Lipoplatin™ in MCF-7 Mammakarzinomzellen belegen [111]. Im Gegensatz zu freiem Cisplatin, das bereits 5 Minuten nach Verabreichung an Ratten bis zu 5 Stunden und darüber hinaus mit Abstand vor allem in den Nieren akkumulierte, wurden für Lipoplatin™ deutlich niedrigere Cisplatin-Konzentrationen in der Niere beobachtet, die sogar bereits nach 4 Stunden nach Gabe die Konzentrationen in Leber und Milz unterschritten [111, 118]. Bereits 2005 wurde eine Pharmakokinetik-Studie am Menschen publiziert, die zeigte, dass eine maximale Plasmakonzentration nach Lipoplatin™-Infusion nach 8 Stunden erreicht wurde. Die Platin-Konzentration ging 4 Tage nach Gabe (100 mg/m²) bzw. 7 Tage nach Gabe (125 mg/m²) wieder auf Platin-Konzentrationen im Bereich der Standard-Therapie zurück. Herausragend war, dass keine Veränderung der Nierenfunktion und nur eine leichte Toxizität hinsichtlich Neutropenie bzw. Übelkeit/Erbrechen (Grad 1-2) beobachtet wurden [119]. Im gleichen Jahr erschien eine Studie, in der 4 Patienten eingeschlossen wurden, die mit Lipoplatin™ vor operativer Tumorentnahme behandelt wurden. Das Ergebnis war eine um den Faktor 10-50 höhere Platin-Akkumulation im Tumorgewebe als im umliegenden gesunden Gewebe [120].

Die überlegene Zytotoxizität in Tumorzellmodellen sowie eine deutlich geringere Toxizität in anderen Zellen wurden für Lipoplatin™ im Vergleich mit Cisplatin in Maus- und Ratten-Modellen bestätigt [111, 121, 122].

CASAGRANDE *et al.* untersuchten die Wirkung von Lipoplatin™ an ME-180-Cervixkarzinom-

Zellen und einem Cisplatin-resistenten (R-ME-180) Klon und HeLa-Zellen. Das Ergebnis dieser Studie demonstrierte die potente anti-Tumor-Aktivität von Lipoplatin™ gegenüber allen drei Zelltypen. Es wurden eine konzentrationsabhängige und gegenüber freiem Cisplatin überlegene Hemmung der Proliferation von R-ME-180-Zellen, die Induktion von Apoptose, eine Hemmung von Migration und Invasion sowie eine deutliche Reduktion der Spheroid-Bildung von R-ME-180-Zellen *in vitro* sowie der Tumor-Bildung in Mäusen gezeigt [123]. Darauf aufbauend wurden unterschiedliche Ovarialkarzinom-Zelllinien in 2D- bzw. 3D-Zellmodellen sowie *in vivo* an Tumor-Xenograft-Modellen untersucht. Die dem freien Wirkstoff überlegene Anti-Tumor-Aktivität von Lipoplatin™ konnte in allen Ovarialkarzinom-Zelllinien bestätigt werden. Die weitere Analyse ergab, dass Lipoplatin™ Apoptose induziert und dass Caspase 3, 8 und 9 aktiviert, Bcl-2 dereguliert und im Gegenzug Bax hochreguliert werden. Darüber hinaus zeigte sich ein synergistischer Effekt mit Doxorubicin, der eine Reduktion von Spheroid-Wachstum und -Vitalität sowie der Zellmigration aus Sphroiden, mehr als 90 % Hemmung des Tumor-Xenograft-Wachstums bei minimaler systemischer Toxizität und kein weiteres Tumorwachstum nach Absetzen der Behandlung ergab [124]. In verschiedenen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Lipoplatin™ bei gleichzeitiger Reduktion der Toxizität, insbesondere der Nierentoxizität, im Vergleich mit dem freien Wirkstoff nachweisen werden [111, 120, 125]. Eine Dosis-Eskalationsstudie mit 39 Patienten, die eine Lipoplatin™-Monotherapie erhielten, zeigte, dass die maximal tolerierte Dosis (MTD) bei 300 mg/m² und die Dosis-limitierende Toxizität (DLT) bei 350 mg/m² lag. Auch hier wurde die gute Verträglichkeit des liposomalen Cisplatin dokumentiert. Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit und Neutropenie wurden nur im Bereich Grad 1-2 gefunden. Andere Nebenwirkungen (Grad 3) traten nur bei einem sehr kleinen Anteil der Patienten auf [125]. In unterschiedlichsten Krebsarten zeigte Lipoplatin™ in Kombinationstherapie mit Gemcitabin, Paclitaxel oder 5-Fluoruracil verglichen mit der entsprechenden Erstlinien-Kombinationstherapie des freien Wirkstoffs eine sehr gute Verträglichkeit und eine deutlich reduzierte Toxizität [126–129]. Besonders in Kombination mit Paclitaxel bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom bzw. bei nicht-Plattenepithel-Lungenkarzinom war Lipoplatin™ dem freien Wirkstoff auch hinsichtlich der Ansprechrate signifikant überlegen [128, 129].

2.2.4 Liposomales Doxorubicin

Doxorubicin ist seit einigen Jahren eine relevante Therapieoption bei unterschiedlichen Krebsarten. Sein klinischer Einsatz ist allerdings durch seine akute und chronische Toxizität, insbesondere seine Kardiotoxizität, aber auch Myelosuppression, Alopezie, Übelkeit und Erbrechen, limitiert. Daher wurde die Entwicklung von liposomalen Doxorubicin-Formulierungen,

vor allem mit dem Ziel, die Toxizität bei gleichzeitig weiterbestehender bzw. verbesserter Wirksamkeit zu reduzieren, vorangetrieben. 1995 wurde das erste liposomale Doxorubicin-haltige Präparat Caelyx[®] zugelassen.

Aktuell gibt es auf dem internationalen Markt vier liposomale Doxorubicin-Formulierungen, die in jeweils unterschiedlichen Ländern zugelassen sind. Diese sind in Tabelle 2.4 mit ihren jeweiligen Indikationsgebieten aufgeführt.

Tab. 2.4: Zugelassene liposomale Formulierungen von Doxorubicin-HCl.

Handelsname	Caelyx [®] [130] / Doxil [®] [133]	Myocet [®] [131]	NUDOXA [132]
Arzneistoff	Doxorubicin-HCl	Doxorubicin-HCl	Doxorubicin-HCl
Hersteller	Essex Pharma / ALZA Corporation	Cephalon	Zydus
Zusammensetzung	HSPC / Chol / mPEG	EPC / Chol	DSPE / Chol
Liposomen-Größe (Ø)	100 nm	150 nm	
Indikation (verkürzt)	- Metastasierendes Mammakarzinom - Fortgeschrittenes Ovarialkarzinom - Multiples Myelom - AIDS-assoziiertes Kaposi-Sarkom	- Metastasierendes Mammakarzinom	- Mammakarzinom - Fortgeschrittenes Ovarialkarzinom - AIDS-assoziiertes Kaposi-Sarkom

Die sterisch stabilisierten Caelyx[®]-Liposomen schützen den enthaltenen Wirkstoff effektiv vor einer zu starken Plasmaproteinbindung und damit auch vor dem phagozytotischen Abbau im Plasma. Daraus resultiert eine im Vergleich zu freiem Doxorubicin (30 Stunden) verlängerte Plasmahalbwertszeit von 3-4 Tagen [134]. Mit Caelyx[®] konnte ferner die Kardiotoxizität entscheidend reduziert werden [135, 136]. Allerdings gab es Hinweise darauf, dass die mit der PEG-Stabilisierung einhergehende Größe der Liposomen die Wirkstoff-Akkumulation im Tumorgewebe reduziert und sich damit negativ auf die Wirksamkeit auswirken könnte [137]. Darüber hinaus verursacht liposomales Doxorubicin mit PEG-Stabilisierung das Dosis-limitierende Hand-Fuß-Syndrom, das bei ca. 50 % aller mit einer Dosis von 50 mg/m² behandelten Patienten beobachtet wurde [130, 133, 134, 138].

Myocet[®] sind nicht PEGylierte Liposomen mit verbessertem Sicherheitsprofil, welches sich, verglichen mit Caelyx[®], durch eine weiter verringerte Kardiotoxizität und die hier nun zurückgedrängte unerwünschte Arzneimittelwirkung des Hand-Fuß-Syndroms auszeichnet [131, 134].

In NUDOXA, einer in Indien zugelassenen liposomalen Doxorubicin-Formulierung, sind

die pharmakokinetischen Vorteile der PEGylierten Caelyx[®]-Liposomen mit dem verbesserten Toxizitätsprofil und Fehlen des Hand-Fuß-Syndroms vereint [132, 134].

Die Verträglichkeit liposomaler Doxorubicin-Formulierungen wurde in unterschiedlichen systematischen Reviews analysiert. Der systematische Review mit Metaanalyse von SMITH *et al.* beurteilte die Kardiotoxizität unter Behandlung mit verschiedenen Anthrazyklin-Formulierungen. Es wurden fünf randomisierte kontrollierte Studien mit dem Fokus auf fortgeschrittenem Mammakarzinom eingeschlossen. Das Ergebnis zeigte, dass bei der Therapie mit Anthrazyklinen gegenüber nicht-Anthrazyklinen ein signifikant erhöhtes Risiko von Kardiotoxizität gegeben war. Die Kardiotoxizität war bei Verwendung von liposomalem Doxorubicin gegenüber freiem Doxorubicin signifikant niedriger (Reduktion um 22 %) [139].

In einem weiteren systematischen Review mit Metaanalyse von RAFIYATH *et al.* konnte die Senkung der Kardiotoxizität mit liposomalem Doxorubicin bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde Indikations-übergreifend anhand von 9 randomisierten, kontrollierten Studien mit insgesamt 2.220 Patienten die Sicherheit und Toxizität von liposomalem Doxorubicin mit freiem Doxorubicin verglichen. Das Ergebnis war eine jeweils signifikante Reduktion von Herzinsuffizienz, Alopezie, Neutropenie und Thrombozytopenie, sowie von Übelkeit und Erbrechen unter liposomalem Doxorubicin. Die Häufigkeit von Hand-Fuß-Syndrom war in beiden Gruppen vergleichbar [140]. Im Jahre 2015 wurde eine Übersichtsstudie zur Behandlung von fortgeschrittenem Mammakarzinom mit liposomalem Doxorubicin im Vergleich mit freiem Doxorubicin veröffentlicht, in der insgesamt 10 randomisierte, kontrollierten Studien mit insgesamt 2.889 Patienten eingeschlossen wurden. Die Metaanalyse ergab, dass mit der liposomalen Formulierung ein signifikant reduziertes Risiko von Kardiotoxizität und außerdem auch eine signifikante Verbesserung der Ansprechrate im Vergleich mit freiem Wirkstoff gegeben war [141].

2.3 Resistenzüberwindung durch Liposomen

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels targetierter Zytostatika-haltiger Liposomen Chemoresistenzen in Ovarialkarzinom-Zellen zu untersuchen und diese zu umgehen. Für die Resistenz gegenüber Doxorubicin ist vor allem die Effluxpumpe P-gp maßgeblich (siehe Kapitel 2.1.4) [70]. Die Gründe für Resistenzen gegenüber Cisplatin sind komplex und Gegenstand der aktuellen Forschung. Es werden geänderte Aufnahmeverhalten sowie eine verstärkte Ausschleusung des Wirkstoffes ebenso wie eine veränderte Signaltransduktion diskutiert (siehe Kapitel 2.1.2) [124, 142].

Die Zytostatika-Therapie mit Cisplatin sowie mit Doxorubicin ist häufig limitiert durch

Mehrfachresistenzen (MDRs) [143, 144]. Abgesehen von den pharmakokinetischen Vorteilen einer liposomalen Formulierung im Sinne eines verbesserten Nebenwirkungsprofils sowie optimierter Tumor-Targetierung bieten Liposomen auch die Möglichkeit der Resistenzumgehung. Grundlegend hierfür sind unterschiedliche funktionelle Mechanismen, wie die Targetierung von Endozytose-Rezeptoren, die im Gegensatz zum freien Wirkstoff andere intrazelluläre Prozessierung und damit eine Adressierung vom freien Wirkstoff abweichender Signaltransduktionswege.

Für liposomales Doxorubicin wurden über die in dieser Arbeit verfolgten Ansätze hinaus [145] bereits Wege zur Resistenzumgehung beschrieben, die in der Regel auf einer Hemmung von P-gp basieren [144]. In zwei Studien wurde der Ansatz gewählt, Doxorubicin mit Verapamil, einem P-gp-Inhibitor, liposomal zu formulieren und auf eine mögliche Resistenzumgehung und gesteigerte Wirksamkeit hin zu untersuchen. Es konnte in Doxorubicin-resistenten Leukämie-Zellen (K562) und in Uterus-Sarcoma-Zellen eine gesteigerte Wirksamkeit des liposomalen Wirkstoffs gezeigt werden [146, 147]. In zwei weiteren Studien wurde der Folat-Rezeptor mit liposomalem Doxorubicin adressiert und eine signifikante Steigerung der Doxorubicin-Aufnahme in Zervix- bzw. Lungen-Karzinomzellen demonstriert [148, 149]. Darüber hinaus gab es Versuche zur Resistenzüberwindung mit Immuno-Liposomen [150].

Im Hinblick auf die funktionelle Überwindung von Cisplatin-Resistenzen durch liposomale Formulierungen liegen über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bzw. hierauf basierenden, nachfolgenden Untersuchungen hinaus allerdings praktisch keine Daten vor [142, 151–153]. Insbesondere die Funktionalisierung von Liposomen zur gezielten Resistenzumgehung sowie die Adressierung anderer Signaltransduktionswege stellen vielversprechende Ansätze zur Überwindung von Resistenzen dar und wurden daher als Ziele dieser Arbeit verfolgt.

2.4 Ziele der Arbeit

Resistenzen stellen bei der Behandlung von Krebserkrankungen ein zentrales und für die Therapie häufig limitierendes Problem dar. Die Entwicklung liposomaler Zytostatika-Formulierungen zielt seit einigen Jahren primär darauf ab, durch eine veränderte Pharmakokinetik die Wirksamkeit der Behandlung zu steigern.

Hauptziel dieser Arbeit war es hingegen, Liposomen zur funktionellen Überwindung von Chemoresistenzen einzusetzen und hierbei involvierte, gegebenenfalls vom freien Wirkstoff abweichende Signaltransduktionsmechanismen aufzuzeigen.

Hierzu sollten zunächst Cisplatin-haltige fluide und sterisch stabilisierte Liposomen hergestellt und spezifisch mit Holotransferrin bzw. unspezifisch mit Albumin funktionalisiert wer-

den. Darüber hinaus war eine Funktionalisierung Doxorubicin-haltiger Caelyx[®]-Liposomen mittels Post-Insertionstechnik geplant. Als Referenz sollten jeweils nicht funktionalisierte bzw. wirkstofffreie Liposomen dienen. Als Zellsystem sollten drei Ovarialkarzinom-Zelllinien (A2780 sens, cis und adr) eingesetzt und auf den Expressionsstatus und die Induzierbarkeit der relevanten Rezeptoren sowie das Bindungsverhalten von Liposomen hin getestet werden. Mit diesen Werkzeugen sollten die Effekte der oben genannten liposomalen Zytostatika-Formulierungen im Vergleich zum freien Wirkstoff in sensitiven sowie resistenten Ovarialkarzinom-Zellen untersucht werden. Die entsprechenden Experimente sollten die Bestimmung der Zytotoxizität und der intrazellulären Wirkstoff-Akkumulation, sowie im Falle von Cisplatin eine Quantifizierung der DNA-Platinierung und Messung der resultierenden ATP-Spiegel umfassen.

Es ist bekannt, dass die organischen Kationentransporter Ctr1 sowie ATP7 & B eine Rolle in der Resistenz gegenüber Cisplatin spielen. Daher waren zum Nachweis einer Rezeptorvermittelten Resistenzumgehung durchflusszytometrische Analysen und lasermikroskopische Betrachtungen der Lokalisation der Transporter in An- bzw. Abwesenheit von Cisplatin im Vergleich zu liposomalem Cisplatin geplant. Abschließend sollte ein Microarray mit sensitiven und resistenten Ovarialkarzinom-Zellen unter Einfluss von Cisplatin-haltigen Liposomen im Vergleich mit freiem Wirkstoff tiefere Einblicke in die jeweils involvierten Signaltransduktionsprozesse liefern, die einer gezielten funktionellen Resistenzumgehung durch Liposomen zugrunde liegen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Tab. 3.1: Informationen zu den verwendeten Geräten und deren Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller
Analysenwaage Sartorius, Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Kern 770	Gottlieb Kern und Sohn, Albstadt, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometrie	
Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220	Varian, Darmstadt, Deutschland
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian, Darmstadt, Deutschland
Autosampler PSD 100	Varian, Darmstadt, Deutschland
Begasungsbrutschrank Thermo	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
CASY® 1 Model TT, Cell Counter und Analyser System	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Multiwellreader	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Handdispenser Handystep	Brand, Wertheim, Deutschland
Konfokales Laser-Mikroskop Nikon Eclipse Ti	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Inversmikroskop Axiovert® 25	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Laborschüttler KS-15	Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Luminescence Spectrometer LS 55	Perkin Elmer precisely, Waltham, Massachusetts, USA
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH und Co. KG, Kelheim, Deutschland

Fortsetzung – Geräte und Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller
Multiscan [®] EX	Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
PCS Malvern Autosizer 2c	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK
pH-Meter	
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
pH-Kalomel-Elektrode (für pH-Meter)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Suprasil [®] Typ-Nr.105.202-QS	
Probenmischer	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Rotationsverdampfer Rotavapor R	Büchi AG, Essen, Deutschland
Schüttelinkubator Unimax [®] 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sonicator	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex [®] Super RK 103 H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Univapo 100 H	UniEquip Laborgerätebau & Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland
UV-Multiwellreader LUMIstar Optima	BMG-Lab-Technologies, Offenburg, Deutschland
UV/VIS-Spektrophotometer, Model Genesys 6	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Vakuumpumpe PC5	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Zentrifugen	
Allegra [™] R5	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Microfuge [®] Lite	Krefeld, Deutschland
Micro 200 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Tab. 3.2: Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Hersteller
Ammoniaklösung 26%	Riedel-de Haen Seelze, Deutschland
Ammoniummolybdat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
6-Carboxyfluorescein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Caelyx®	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
Daunorubicin-HCl	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Doxorubicin-HCl	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 37 %	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
Immersionsöl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Molybdän Pulver APS3-7	Alfar Aesar, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Hersteller
Natriumcitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge, 1 M	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
Natronlauge, 0,1 M	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
Perchlorsäure 70 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphatstandard-Lösung (0,65 mmol / mL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol 99,9 %	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Salpetersäure 65 % Suprapur [®]	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure, 1 M	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
Salzsäure, 0,1 M	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
Schwefelsäure 95-97%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Sephadex [®] 50 fine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Holotransferrin (human)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Triton X	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 Lipide

Tab. 3.3: Informationen zu den verwendeten Lipide

Lipide	Hersteller
Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
3,3`-Dioctadecyloxacarbocyaninperchlorat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium Salz)	Avanti Lipids Inc., Alabaster, USA
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamine-rhodamine B sulfonyl) (Ammonium Salz)	Avanti Lipids Inc., Alabaster, USA
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium Salz)	Avanti Lipids Inc., Alabaster, USA
Hydriertes Sojaphosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Sojaphosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland

3.1.4 Antikörper

Tab. 3.4: Informationen zu den verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor [®] 488, chicken anti-goat IgG (A21468)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Alexa Fluor [®] 594, chicken anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Fortsetzung – Antikörper

Antikörper	Hersteller
(A21467) Alexa Fluor® 488, anti-rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
(A21442) Alexa Fluor® 594, anti-rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
(A21441) ATP7A (FL-190), goat polyclonal IgG (SC-30856)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
ATP7B (K-13), goat polyclonal IgG (SC-33446)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Ctr1 (FL-190), rabbit polyclonal IgG (SC-66847)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
GTN38 (C-15) goat polyclonal IgG (SC-27680)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
FITC-conjugated mouse anti-human P-gp monoclonal antibody (557002)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FITC-conjugated mouse anti-human trans- ferrin monoclonal antibody CD71 (L11339-CD71)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.5: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
ATP Determination Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BCA Protein Assay Kit Novagen®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bacillo® AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CASY® ton Lösung	Scharfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Deckgläser, rund, Durchmesser 18 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser, quadratisch, 18 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
EDTA-Lösung (0,02%) E8008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Einmal-Küvetten PMMA (1,5 mL halbmikro)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Einmal-Küvetten PS (4,5 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Einmalspritzen Injekt 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
F96 MicroWell™ Plates, weiß, steril	Nunc, Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
FACS Clean™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow™	Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glaskugeln (2,5 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Handdispenser Aufsatz 0,5; 2,5; 12,5 & 25 mL	Brand, Wertheim, Deutschland
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Melsept®SF	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Multiwellpipette 20-200 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
MycoAlert®-Mycoplasma Detection Kit	Lonza Cologne AG; Köln, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Pipette 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1-5 mL Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen 1-10 µL, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1-200 µL, gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 101-1000 µL, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5 ml Plastibrand®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PS-Microplate, V-Form, 96 K	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger mit mattem Rand	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
QiAamp®-Blood-Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Tissue Culture Dish 100 x 20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Trypsin / EDTA-Lösung (0,25%)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm ² , steril, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm ² , steril, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 175 cm ² , steril, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-6-Well-Platten, farblos, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-96-Well-Platten, farblos, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 15 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

3.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Tab. 3.6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Albumin-SL (20 µM)	25 mg ad 1,0 mL Boratpuffer pH = 8,8 oder isoton. Kochsalzlösung
ATP-SL (500 µM)	0,1 mL ATP-Standard (5 mM) im Kit ATP-Kit enthalten ad 1,0 mL Aqua millipore
ATP-AL (20 µM)	0,2 mL ATP-SL ad 5,0 mL Aqua millipore
Blockierungspuffer 1 % (m / V)	1 g BSA ad 100,0 mL Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Boratpuffer pH 8,8	618 mg Borsäure ad 100,0 ml Aqua millipore (pH-Einstellung auf 8,8 mit 1 M NaOH)
6-CF-Lösung (0,1 M)	1,882 g 6-CF ad 50,0 mL Aqua millipore 6-CF in isotonischer Kochsalzlösung anlösen, mit NaOH-Plätzchen zur vollständigen Lösung bringen; anschließend ggf. pH-Wert auf 7,4 einstellen.
Cisplatin-SL (5 mM)	15 mg Cisplatin ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Cisplatin-AL (200 µM)	0,4 mL Cisplatin-SL ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
DAPI-SL	1 mg DAPI ad 1,0 mL Methanol Lagerung bei 4 °C
DAPI-AL (5 µg / mL)	50 µL DAPI-SL ad 10,0 mL Aqua millipore Lagerung bei 4 °C
DC-Sprühreagenzien	
Sprühreagenz 1	20 mg Bromthymolblau 40 mg Kaliumhydroxid ad 100,0 mL Aqua millipore Bromthymolblau in einigen Tropfen Ethanol lösen, KOH hinzufügen und mit Aqua millipore auffüllen.
Lösung A	124,8 g H ₂ SO ₄ konz. 4 g MoO ₃ ad 100,0 mL Aqua millipore MoO ₃ in Aqua millipore anlösen, die H ₂ SO ₄ konz. hinzufügen, bis zum vollständigen Lösen kochen und nach dem Abkühlen mit Aqua millipore ergänzen.

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung B	50 mL Lösung A 180 mg Molybdänpulver 15 Min. kochen, abkühlen und mit Aqua millipore ergänzen und filtrieren.
Sprühreagenz 2	5 mL Lösung A 5 mL Lösung B ad 20,0 mL Aqua millipore
Daunorubicin-HCl-SL (10 mM)	11,3 mg Daunorubicin-HCl ad 2,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Daunorubicin-HCl-AL 1 (100 µM)	100 µL Daunorubicin-HCl-SL ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Daunorubicin-HCl-AL 2 (30 µM)	30 µL Daunorubicin-HCl-SL ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Doxorubicin-HCl-SL (10 mM)	11,6 mg Doxorubicin-HCl ad 2,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Doxorubicin-HCl-AL 1 (100 µM)	100 µL Doxorubicin-HCl-SL ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Doxorubicin-HCl-AL 2 (30 µM)	30 µL Doxorubicin-HCl-SL ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C
Formaldehyd-Lösung 3,7 % (V/V)	1 mL Formaldehyd-Lösung 37 % ad 10,0 mL PBS (Vor jedem Versuch frisch herstellen.)

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Holotransferrin-SL (20 µM)	25 mg ad 1,0 mL Boratpuffer pH = 8,8 oder isoton. Kochsalzlösung
<u>Lipid-Stammlösungen</u>	
Chol (10 mM)	193 mg ad 50,0 mL Chloroform
Cyanur-Anker (1 mM)	109,9 mg (Ausbeute) ad 34,1 mL Chloroform
HSPC (10 mM)	381 mg ad 50,0 mL Chloroform
mPEG (1 mM)	138 mg ad 50,0 mL Chloroform
Rho (0,1 mM)	2 mg (1 Ampulle) ad 15,36 mL Chloroform
SPC (10 mM)	379 mg ad 50,0 mL Chloroform
KHP (5 x Konzentrat)	17,25 g NaCl 0,876 g KCl 0,408 g KH ₂ PO ₄ 0,882 g NaHCO ₃ 5,790 g Glucose-Monohydrat 5,960 g HEPES (freie Säure) ad 500,0 mL Aqua millipore pH-Einstellung auf 7,4 mit 1 M NaOH
CaCl₂-Lösung (1 M)	1,470 g CaCl ₂ ad 10,0 mL Aqua millipore
MgSO₄-Lösung (1 M)	2,465 g MgSO ₄ ad 10 mL Aqua millipore

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
KHP (gebrauchsfertige Lösung)	50 mL KHP (5 x Konzentrat) 300 µL MgSO ₄ 325 µL CaCl ₂ ad 250,0 mL Aqua millipore
MTT-Reagenz	50 mg ad 10,0 mL PBS
NaCl-Lösung (1,54 M) (10 x Konzentrat)	90,0 g NaCl ad 1000,0 mL Aqua millipore Lagerung bei 4 °C
NaCl-Lösung (154 mM) (isotonische Lösung)	100 mL NaCl-Lösung (10 x Konzentrat) ad 1000,0 mL Aqua millipore Sterilfiltration
PBS (20 x Konzentrat)	2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ ad 500,0 mL Aqua millipore Lagerung bei 4 °C
PBS (gebrauchsfertige Lösung)	25 mL PBS (20 x Konzentrat) ad 500,0 mL Aqua millipore gegebenenfalls pH-Einstellung auf 7,4 Sterilfiltration oder Autoklavieren; Lagerung bei 4 °C
Phosphatquantifizierung (Bartlett)	
Molybdat-Reagenz	1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O 7,15 mL H ₂ SO ₄ konz. ad 500 mL H ₂ O Lagerung der fertigen Lösung bei 4 °C
Ascorbinsäure-Lösung 10 % (m / V)	1,0 g Ascorbinsäure ad 10,0 mL Aqua millipore (Vor jedem Versuch frisch herstellen.)

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Standard-Phosphatlösung 1	gebrauchsfertige Lösung (0,65 M), kommerziell erhältlich
Standard-Phosphatlösung 2 (200 mM)	124 µL Standard-Phosphatlösung-Lösung 1 276 µL Aqua millipore
Proteinquantifizierung (Peterson-Lowry)	
Lösung A	0,5 g CuSO ₄ × 5 H ₂ O 1 g Na-Citrat × 2 H ₂ O ad 100,0 mL Aqua millipore
Lösung B	2 g NaOH 10 g Na ₂ CO ₃ ad 500,0 mL Aqua millipore
Lösung C	1 Teil Lösung A 49 Teile Lösung B
Lösung D	Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz
DOC-Lösung 0,3 % (m / V)	300 mg Na-deoxycholat ad 100,0 mL Aqua millipore
Proteinstandard-Lösung 1 (10 × Konzentrat)	20 mg BSA ad 10,0 mL Aqua millipore
Proteinstandard-Lösung 2 (gebrauchsfertige Lösung)	1 mL Proteinstandard-Lösung (10 × Konzentrat) ad 10,0 mL Aqua millipore
TCA-Lösung 70 % (m / V)	70 g Trichloressigsäure ad 100,0 mL Aqua millipore
Waschpuffer 0,5 % (m / V)	0,5 g BSA ad 100,0 mL PBS Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C

Fortsetzung – Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Triton X 1 % (m / V)	1 g Triton X ad 100,0 mL Aqua millipore Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C)
Triton X 0,1 % (V / V)	10 mL Triton X 1 % ad 100,0 mL Aqua millipore Sterilfiltration, Lagerung bei 4 °C
Triton X 0,02 % (V / V)	0,2 mL Triton X 1 % ad 100,0 mL PBS Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C
Tween-20-SL 10 % (m / V)	10 g Tween 20 ad 100,0 mL PBS Aliquotieren zu 1 mL, Lagerung bei -20 °C
Tween-20 0,01 % (V / V)	0,1 mL Tween 20-SL ad 100,0 mL PBS Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C
WK-X-24-AL (30 µM)	6 µL WK-X-24-SL (50 mM) (aus dem AK von Herrn Prof. Dr. Wiese) ad 10,0 mL isotonische Kochsalzlösung Lagerung bei -20 °C

3.3 Liposomenpräparation

3.3.1 Synthese des Cyanur-Ankers

Die Synthese des Cyanur-Ankers wurde bereits 1999 von Gerd Bendas *et al.* beschrieben und in dieser Arbeit modifiziert durchgeführt [154]: Zunächst wurden 50 mg DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ und 2,5 mg N,N-Diisopropylethylamin in ca. 10 mL wasserfreiem Chloroform in einem Rundkolben gelöst und mit Argon überschichtet. Nun wurden 5 mg Cyanurchlorid in 4 mL wasserfreiem Chloroform gelöst, zum Ansatz hinzugefügt und mit weiteren 4 mL Chloroform quantitativ überführt. Der Reaktionsansatz wurde 72 Stunden bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (Kieselgel-DC-Platten F₂₅₄) zeigte dabei eine nahezu quantitative Umsetzung. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und 26 %iger Ammoniaklösung (65:35:1 V/V/V) verwendet. Darüber hinaus wurde die Kieselgelplatte mit zwei Sprühreagenzien behandelt, zunächst mit Bromthymolblau (Sprühreagenz 1) und nach einem Trocknungsschritt mit Molybdänlösung (Sprühreagenz 2), um die Phospholipide blau zu markieren [155]. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel und die Hilfsbase am Rotationsverdampfer entfernt und zweimal jeweils mit Chloroform und Methanol codestilliert. Der getrocknete Lipidfilm mit dem DSPE-PEG₂₀₀₀-Cyanur (Cyanur-Anker) wurde dann in Chloroform mit einer resultierenden Konzentration von 1 mM aufgenommen.

3.3.2 Hydratationsmethode

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, sterisch stabilisierten Liposomen wurden mit der sogenannten Hydratationsmethode, auch als Filmmethode bezeichnet, hergestellt. Für diese Technik wurden die verschiedenen Lipide in Chloroform gelöst. Diese Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden sie auf RT erwärmt und alle benötigten Lipidlösungen in einem Rundkolben gemischt. Das Chloroform wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt und der Lipidfilm für 45 Minuten getrocknet. Unter Zusatz von isotonischer Kochsalzlösung oder Puffer und Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 2,5 mm wurde der Lipidfilm auf dem Vortexer dispergiert und hydratisiert. Nach Bildung einer visuell homogenen Liposomensuspension wurden die Liposomen für 24 Stunden bei RT auf einem Schüttler (150 Schüttelbewegungen / Minute) gelagert. Im Falle von fluoreszenzmarkierten Liposomen wurde der Rundkolben mit Alufolie vor Licht geschützt. In dieser Zeit bildeten sich vorrangig multilamellare Vesikel (MLV). Im Anschluss daran wurden die Liposomen unter Eiskühlung mit Ultraschall (7 mal 5 Zyklen à 30 Sek., 60 % Intensität) behandelt,

um möglichst homogene, unilamellare Liposomen einer Größe von 100 - 140 nm zu erhalten. Diese noch ungekoppelten und noch nicht aufgereinigten Liposomen werden nachfolgend als Rohliposomen bezeichnet.

3.3.3 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Liposomen

Für die Bindungsexperimente ebenso wie für die mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops angefertigten Bilder wurden speziell markierte Liposomen benötigt. Es wurden sowohl Liposomen mit einer fluoreszierenden Lipidmarkierung als auch mit einem eingeschlossenen fluoreszierenden Farbstoff hergestellt. Die Herstellung erfolgte in analoger Weise wie im Abschnitt zuvor beschrieben. Zusätzlich wurden alle Gefäße mit Alufolie umwickelt, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor Licht zu schützen. Als Lipidmarkierung wurde ein roter Farbstoff gewählt, wobei die Kopfgruppe des Lipides an ein Rhodaminmolekül (Rho) gebunden ist, oder ein gelb-fluoreszierender Farbstoff (DiO), welcher sich in die Lipidhülle der Liposomen einlagert:

- Lipidmarkierte Liposomen:

SPC/Chol/mPEG/Rho (65/30/5/1,5 mol %)

SPC/Chol/mPEG/Cyanur-Anker/Rho (65/30/2/3/1,5 mol %)

(hydratisiert mit isotonischer Kochsalzlösung)

HSPC/Chol/mPEG/DiO (56/38/5/0,5 mol %)

HSPC/Chol/mPEG/Cyanur-Anker/DiO (56/38/2/3/0,5 mol %)

(hydratisiert mit isotonischer Kochsalzlösung)

Es wurde ein zweiter Ansatz an lipidmarkierten Liposomen mit gleicher Lipidzusammensetzung hergestellt. Jedoch wurde statt der isotonischen Kochsalzlösung eine übersättigte Cisplatin-Lösung verwendet. Die Herstellung wird unter 3.3.4 (Herstellung Cisplatin-haltiger Liposomen) beschrieben. Für die doppelt markierten Liposomen wurde als Lipidmarker das eben beschriebene Rho verwendet. Für die Färbung des Liposomeninhaltes wurde 6-Carboxyfluorescein-Lösung mit grüner Farbe als Modell eines „ideal-löslichen“ Arzneistoffs gewählt. Dieser Farbstoff besitzt neben der guten Löslichkeit einen weiteren Vorteil, da er in höher konzentrierter Lösung (0,1 M) den Effekt der Fluoreszenzlöschung („Quenching“) aufweist. Somit fluoresziert der eingeschlossene Farbstoff zunächst wenig, wird er jedoch von Zellen aufgenommen und die Liposomen im Laufe des intrazellulären Prozessierens zerstört, färbt sich die gesamte Zelle grün ein.

- Doppelt markierte Liposomen:
SPC/Chol/mPEG/Rho (65/30/5/1,5 mol %)
SPC/Chol/mPEG/Cyanur-Anker/Rho (65/30/2/3/1,5 mol %)
(hydratisiert mit 0,1 mM 6-Carboxyfluorescein-Lösung)

3.3.4 Herstellung von Cisplatin-haltigen Liposomen

Cisplatin-haltige Liposomen wurden in einem molaren Verhältnis von SPC/Chol/mPEG (65/30/5 mol %) bzw. SPC/Chol/mPEG/Cyanur-Anker (65/30/2/3 mol %) hergestellt. Um eine adäquate Menge an Cisplatin einschließen zu können, wurde die Liposomenherstellung mit einer Lipidkonzentration von 60 mM begonnen. Damit der Lipidfilm hydratisiert werden konnte, wurden 8 mg Cisplatin / mL isotonische Kochsalzlösung eingewogen und bei 65 °C im Ultraschallbad gelöst. Sobald eine klare Cisplatin-Lösung entstand, wurde diese kurz abgekühlt und dann sofort zur Liposomenherstellung verwendet. Da der Lipidfilm bei diesen Liposomen sehr dick war, wurde der Rundkolben neben dem Mischen mit Glaskügelchen auf dem Vortexer auch im Wasserbad erwärmt, bis eine homogene Liposomensuspension entstand. Der Rundkolben mit den Liposomen wurde mit Alufolie vor Licht geschützt und ebenfalls für 24 Stunden bei RT auf den Schüttler (150 Schüttelbewegungen / Minute) gestellt. Am nächsten Tag wurden die Liposomen unter Eiskühlung mit Ultraschall (7 mal 5 Zyklen à 30 Sek., 60 % Intensität) behandelt, um möglichst homogene, unilamellare Liposomen einer Größe von 100-140 nm zu erhalten. Die Kopplung der Liposomen an Albumin oder Holotransferrin erfolgte in analoger Weise wie es unter 3.3.6 beschrieben ist. Nach gelchromatographischer Abtrennung des überschüssigen Proteins erfolgte immer eine Platinquantifizierung mittels AAS. Einmal hergestellte und auf ihren Platingehalt untersuchte Liposomen wurden dann innerhalb von 24 Stunden für Zellversuche verwendet, um möglichen Instabilitäten vorzubeugen.

Um eine Kontamination aller Glasgeräte im Labor zu vermeiden, wurden immer die selben Rundkolben verwendet. Auch beim Beschallen der Liposomen wurde ein gesonderter Ultraschall-Aufsatz verwendet. Nach Abschluss der Arbeiten wurden Glasgeräte und benutzte Laborgeräte mit Salpetersäure (6,5 %) und Wasser dekontaminiert und im Anschluss gereinigt.

Als Referenzliposomen wurden Cisplatin-freie Liposomen mit gleicher Lipidkonzentration hergestellt. Zum Hydratisieren wurde dann lediglich isotonische Kochsalzlösung verwendet.

3.3.5 Caelyx - liposomales Doxorubicin

Für die Versuche mit Doxorubicin-haltigen Liposomen wurden kommerziell erhältliche Liposomen der Firma Essex Pharma mit Handelsnamen Caelyx[®] verwendet. In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Peschka-Süss aus Freiburg wurde Caelyx[®] hinsichtlich der Lipidzusammensetzung untersucht (siehe Tabelle 3.7). Neben überwiegend rigiden Lipiden ist der Arzneistoff Doxorubicin-HCl in einer Konzentration von 2 mg / mL Caelyx[®] enthalten.

Tab. 3.7: Zusammensetzung Caelyx[®].

Caelyx [®]		
12,10 mM	56,44 mol %	HSPC
8,20 mM	38,25 mol %	Chol
1,14 mM	5,31 mol %	mPEG
21,44 mM Gesamtlipidgehalt		

Die Herstellung von Caelyx[®] erfolgt mit einem Verfahren, welches als „active loading“ bezeichnet wird. Dabei wird durch einen pH-Gradienten das Doxorubicin als Ion in den Liposomen konzentriert und liegt dort mikrokristallin vor.

Als Referenz wurden arzneistofffreie Liposomen (HSPC/Chol/mPEG 56/39/5 mol %) mit einem Gesamtlipidgehalt von 20 mM hergestellt.

3.3.6 Konventionelle Kopplung von Proteinen an Liposomen

Um Liposomen zu funktionalisieren, wurde der Cyanur-Anker im Liposomenansatz mit Boratpuffer (pH = 8,8) basisch aktiviert und die errechnete Menge an Protein hinzugefügt (siehe Abbildung 3.1 (B)). Es kamen zwei Proteine zum Einsatz: Albumin wurde als unspezifische Funktionalisierung (Kontrolle) und Holotransferrin als spezifische Targetierung verwendet. Bei beiden Proteinen wurde ein molares Protein-Lipid-Verhältnis von 1:1000 gewählt [156]. Die kovalente Bindung des Proteins an das terminale Ende des Cyanur-Ankers erfolgte dann über Nacht, bei RT auf dem Schüttler (150 Schüttelbewegungen / Minute). Nicht gebundenes Protein wurde im Anschluss durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex[®] G-50, fine) abgetrennt. Als Elutionsmittel wurde isotonische Kochsalzlösung verwendet.

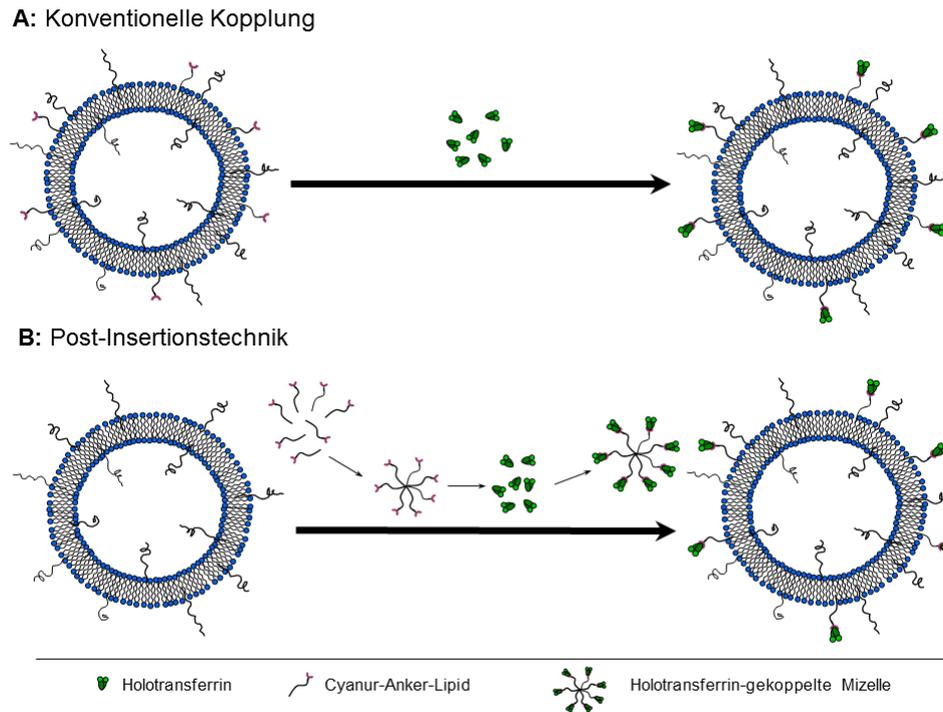


Abb. 3.1: Darstellung der konventionellen Kopplung von Proteinen (A) im Vergleich zur Post-Insertionstechnik (B).

3.3.7 Post-Insertionstechnik (PIT)

Neben der konventionellen Kopplung von Proteinen oder Antikörpern an Liposomen gibt es auch eine Möglichkeit, Liposomen nachträglich zu funktionalisieren, welche als Post-Insertionstechnik bezeichnet wird [157]. Dazu werden zunächst Mizellen aus einem Ankerlipid hergestellt, welche dann an das gewünschte Protein gekoppelt werden. In einem zweiten Schritt werden zu den funktionalisierten Mizellen vorgefertigte Liposomen gegeben. Die lipophilen Reste des Ankers lagern sich dann spontan in die äußere Membran der Liposomen ein (siehe Abbildung 3.1 (B)).

In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck Mizellen aus dem Cyanur-Anker hergestellt: Von der Cyanur-Anker-SL in Chloroform wurde eine entsprechende Menge in einen Rundkolben pipettiert und das Chloroform am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt. Anschließend wurde der Lipidfilm für ca. 30 Minuten bei Unterdruck getrocknet und mit Boratpuffer (pH = 8,8) unter Zugabe von Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 2,5 mm hydratisiert. Um die Mizellbildung zu unterstützen, wurde der Rundkolben leicht geschüttelt und für 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung der Mizellen auf RT wurde eine gewünschte Menge entnommen, mit der korrespondierenden Menge an

Holotransferrin-SL gemischt und für 16 Stunden auf dem Schüttler (150 Schüttelbewegungen / Minute) bei RT inkubiert.

Die Bedingungen für die Postinsertion (Fusion der Mizellen mit den Liposomen) waren für Caelyx[®] 30 Minuten bei 55 °C im Wasserbad. Es wurde ein molares Verhältnis Lipid (Liposomen) zu Mizellen von 0,994 zu 0,006 gewählt [158, 159]. Nicht eingebaute Mizellen sowie ungebundenes Protein wurden im Anschluss durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex[®] G-50, fine) abgetrennt. Als Elutionsmittel wurde isotonische Kochsalzlösung verwendet.

3.4 Liposomencharakterisierung

3.4.1 Partikelgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Liposomengröße wurde Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) angewendet. Dieses Verfahren beruht auf der dynamischen Lichtstreuung und ermöglicht Größenbestimmungen zwischen 5 und 5000 nm. Monochromatisches Licht wird in eine Dispersion von Partikeln gestrahlt. Das von den Partikeln zurückgestreute Licht wird nicht als direkte Streulichtintensität detektiert, sondern es wird die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität gemessen, welche auf der Brown'schen Molekularbewegung beruht. Neben der mittleren Partikelgröße wird während der Messung auch der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Homogenität der Verteilung errechnet. Bei monodispersen Partikeln wird ein PI von 0, bei einer engen Partikelverteilung von 0,1-0,2 und bei einer breiteren Verteilung von 0,3-0,5 erreicht [160]. Allgemein sollte der PI unter 0,5 liegen. Die PCS-Messungen wurden mit einem Malvern Autosizer 2c in einer PP-Halbmikroküvette durchgeführt. Dazu wurde 1 mL isotonische Kochsalzlösung sterilfiltriert und 10-30 µL Liposomensuspension hinzugefügt. Die Größenbestimmung erfolgte automatisiert in drei Zyklen mit je zehn Messungen. Daraus resultierte die mittlere Liposomengröße \pm SD und der PI \pm SD.

3.4.2 Phosphatquantifizierung nach Bartlett

Eine Phosphatbestimmung wurde herangezogen, um auf den Gesamtlipidgehalt der Liposomen zu schließen. Diese Methode basiert auf der kolorimetrischen Bestimmung der Phosphate [161]: Dazu werden die Phosphorsäureester der in den Liposomen enthaltenen Lipide mit 70 %iger Perchlorsäure oxidativ zerstört. Die entstehende Phosphorsäure reagiert in stark saurer Lösung mit Molybdänsalzen zu einem löslichen Komplex. In einer weiteren reduktiven

Reaktion mit Ascorbinsäure-Lösung entsteht Molybdänblau, welches UV-spektrometrisch detektiert werden kann.

Um den Phosphatgehalt der Liposomen zu bestimmen, wurde mit einer 65 mM Phosphatstandard-Lösung eine Kalibriergerade im Bereich von 2-65 nmol Phosphat in Mikroreagenzgläsern erstellt. 10-30 μL Liposomen wurden ebenfalls in Mikroreagenzgläser pipettiert. Anschließend wurden alle Proben mit 200 μL 70 %iger Perchlorsäure versetzt, die Reagenzgläser mit Alufolie verschlossen und für 30 Minuten in einem Heizblock bei 190 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Proben auf RT wurden alle Proben mit je 2 mL Molybdat-Reagenz gemischt und nach Zugabe von 250 μL 10 %iger Ascorbinsäure-Lösung und erneutem gründlichen Mischen auf dem Vortexer 15 Minuten in einem siedenden Wasserbad entwickelt. Die Proben wurden anschließend mit eiskaltem Wasser zügig abgekühlt, erneut gemischt, in Halbmikroküvetten überführt und bei 812 nm am UV/Vis-Spektrometer quantifiziert.

3.4.3 Proteinquantifizierung nach Peterson-Lowry

Um den Proteingehalt der funktionalisierten Liposomen zu bestimmen, wurde nach einer Methode von Peterson gearbeitet [162]. Vorteilig bei dieser Verfahrensweise erschien, dass die in den Liposomen enthaltenen Phospholipide wenig stören, weil die Proteine in dem Versuchsansatz ausgefällt und somit von den Phospholipiden getrennt werden. Zudem ist die Empfindlichkeit der Methode erhöht, da sie eine Kombination aus Biuretreaktion (Bildung eines bläulichen Kupfer(II)-Komplexes mit den Proteinen im Alkalischen) und Folin-Reaktion (Reduktion des Folin-Ciocalteau-Reagenzes durch das im Protein enthaltene Tyrosin zur Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure) darstellt.

Für die Proteinquantifizierung wurde zunächst eine Kalibrierreihe aus der Proteinstandard-Lösung 2 mit steigenden Proteinmengen zwischen 2-12 μg in 2 mL Eppendorfgefäße pipettiert und zusätzlich, entsprechend der eingesetzten Menge an funktionalisierten Liposomen, pegylierte Liposomen zugegeben, um den Einfluss der Phospholipide ausschließen zu können. 10-30 μL der zu untersuchenden Liposomensuspension wurden ebenfalls in entsprechende Eppendorfgefäße pipettiert. Alle Proben wurden nun mit Aqua millipore auf 1,0 mL aufgefüllt und mit je 50 μL 0,3 %iger DOC-Lösung (zur Lyse der Liposomen) versetzt und gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit wurden zunächst 100 μL 70 %ige TCA-Lösung zugegeben und erneut gemischt, gefolgt von einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13520 g und 4 °C, um die präzipitierten Proteine zu sammeln. Der Überstand wurde dekantiert und das verbleibende Pellet in jeweils 1 mL Lösung C gelöst. Zur Unterstützung des Lösungsprozesses wurde zehn Minuten bei RT inkubiert, bevor je 50 μL Lösung D zu jeder Probe pipettiert wurden. Die Proben wurden wieder gemischt und in einer anschlie-

ßenden Inkubation für 30 Minuten unter Lichtausschluss bei RT entwickelt. Falls die Proben trüb waren, wurde für zwei Minuten bei 13520 g zentrifugiert. Waren die Proben klar, entfiel dieser Schritt. Der Überstand bzw. die Proben wurden dann in Halbmikroküvetten überführt und bei 750 nm am UV/Vis-Spektrometer quantifiziert. Die verwendete BSA-AL wurde ebenfalls an diesem Gerät bei einer Wellenlänge von 278 nm in Quarz-Halbmikroküvetten bestimmt, um über das Lambert Beersche Gesetz die Kalibrierung korrigieren zu können.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zelllinien A2780

Die humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 wurden ursprünglich aus einer unbehandelten Patientin isoliert und aus England von der ECACC bezogen.

A2780

Diese Zelllinie wird in dieser Arbeit als A2780 sens bezeichnet, da sie sensitiv auf die gewählten Arzneistoffe anspricht. Um genetische Veränderungen während der Experimentreihen auszuschließen, wurde diese Zelllinie zwölf Passagen lang genutzt und dann verworfen.

A2780 cis

Diese Zelllinie entstand aus der sensitiven Zelllinie durch chronische Cisplatin-Exposition. Sie unterscheidet sich morphologisch von der unbehandelten Zelllinie, da sie spindelförmig wächst und ein verlangsamtes Wachstum aufweist. Um auch in dieser Zelllinie unerwünschte genetische Veränderungen auszuschließen, und weil ein ausreichender Resistenzgrad vorhanden war, wurden die A2780 cis-Zellen nicht mit Cisplatin behandelt, sondern nur zwölf Passagen lang genutzt und dann verworfen.

A2780 adr

Die Zelllinie A2780 adr ist gegen den Arzneistoff Doxorubicin (erstes Handelspräparat: **Adriamycin**) resistent und wurde ebenfalls durch chronische Doxorubicin-Exposition aus der sensitiven Zellvariante gezüchtet. Sie weist keine morphologischen oder Wachstumsveränderungen zur sensitiven Zelllinie auf. Da A2780 adr-Zellen relativ schnell ihre Resistenz verlieren bzw. nach der Inkulturnahme eine sehr geringe Resistenz aufweisen, wurden sie nach folgendem Schema behandelt:

Einen Tag nach Aussaat der Zellen wurde mit steigenden Doxorubicin-Konzentrationen inkubiert; zunächst mit 0,1 µM Doxorubicin, dann mit 0,3 µM, 0,5 µM und in einigen Fällen auch mit 1 µM Doxorubicin. Die Zellen wurden zwei Tage in Doxorubicin-haltigem Medium

kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und bis zur 90%igen Konfluenz in zytostatikafreiem Medium weiterkultiviert. Zur Kontrolle wurden MTT-Assays durchgeführt, wobei darauf zu achten war, dass der Assay nicht direkt nach Arzneistoffinkubation durchgeführt werden sollte, sondern eine Passage ohne Zytostatikum dazwischen lag. War eine ausreichende Resistenz erreicht, wurde die Zelllinie zwölf Passagen lang genutzt.

3.5.2 Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung von Zellen

Inkulturnahme

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen der gewünschten Zelllinie aus dem Stickstofftank genommen und kurz in der Hand erwärmt. Dann wurde 1 mL 37 °C warmes Medium hinzugefügt und die Zellsuspension zügig in ein Zentrifugenröhrchen, in welchem 9 mL warmes Medium vorgelegt wurde, überführt, um den toxischen Einfluss des im Einfriermedium enthaltenen DMSO so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde bei 4 °C und 160 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Pellet in frischem Medium suspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Bei Inkulturnahme wurden die Zelllinien A2780 sens und A2780 adr in eine T75 und die A2780 cis in eine T25-Kulturflasche gegeben, da das Zellwachstum der Cisplatin-resistenten Zelllinie sehr verlangsamt ist.

Kultivierung

Alle drei Zelllinien wurden adhärent in Kulturflaschen in einem 37 °C Inkubator mit 5 % CO₂-Sättigung kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit Zusatz von 10 % FKS, 1 % P/S und 1,5 % L-Glutamin verwendet. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. War der Zellrasen zu 90 % konfluent, wurden die Zellen verwendet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Je nach Kulturflasche wurden dann 1-2 mL Trypsin/EDTA beimpft. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2-5 Minuten wurden 8-9 mL Medium hinzugefügt, um das Trypsin/EDTA zu blockieren. Die nur noch lose anhaftenden Zellen wurden durch Spülen mit dem Medium vom Boden der Kulturflasche abgelöst und die erhaltene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurde bei 4 °C und 160 g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde ein Viertel oder ein Zehntel der Zellsuspension verwendet. Für die entsprechenden Experimente wurde die genaue Zellzahl (siehe Kapitel 3.5.3) bestimmt.

Kryokonservierung

Um Zellen dauerhaft bei $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff zu lagern, wurden die Zellen mit einem speziellen Einfriermedium (10 % DMSO und 90 % FKS) versetzt. Dafür wurden die Zellen abgelöst und gezählt (siehe Kapitel 3.5.3). Das durch Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit Einfriermedium zu einer finalen Konzentration von 2 Mio. Zellen / mL suspendiert. Je 1 mL wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und für ca. 5 Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt. Um zu gewährleisten, dass die Zellen für die Experimente immer aus einer vergleichbaren genetischen Population stammen, wurde ein „Stammvorrat“ mit 20 und ein „Arbeitsvorrat“ mit 100 Kryoröhrchen pro Zelllinie angelegt. Damit war es möglich, jederzeit auf Mykoplasmenfreie Zellen zurückzugreifen. Bei Aufbrauchen des „Arbeitsvorrats“, konnte wieder ein neuer aus dem „Stammvorrat“ angelegt werden.

3.5.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der genauen Zellzahl für die Zellexperimente wurde das CASY® Modell TT verwendet. Dafür wurde zunächst ein Zellpellet gewonnen (siehe Kapitel 3.5.2) und in Medium oder Puffer suspendiert. Aus dieser Suspension wurden 20 μL entnommen und mit 10 mL sterilfiltrierter CASY®ton Lösung gemischt. Die eigentliche Messung verlief automatisiert nach dem Prinzip eines Coulter Counters: Dabei wurde die CASY®ton Lösung mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Größe gesaugt. An dieser Kapillare wurde über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt. Stromfluss und Widerstand waren unter diesen Bedingungen konstant. Werden Zellen durch die Kapillare gesaugt, ändert sich der Widerstand, da intakte Zellen keine leitenden Eigenschaften haben und mit ihrem Volumen den Durchmesser der Kapillare verringern. Dadurch konnte nicht nur auf die Zellzahl, sondern auch auf die Größe der Zellen geschlossen werden.

3.5.4 Prüfung auf Mykoplasmenkontamination

Mykoplasmen sind die kleinsten vermehrungsfähigen Bakterien (0,22-2 μm), die zur Klasse der Mollicutis zählen. Sie leben parasitär, intra- und extrazellulär und kommen natürlicherweise auf und im Menschen vor. Wird ein artifizielles Zellsystem von Mykoplasmen befallen, zum Beispiel durch mangelhafte Hygiene in der Zellkultur, kann das verschiedene Folgen für das Wachstumsverhalten und die Rezeptorexpression, bis hin zum Verlust der Vitalität der Zellen haben.

DAPI-Test

Die einfachste Methode, um auf eine Mykoplasmenkontamination zu prüfen, ist der Nachweis mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI (siehe Abbildung 3.2). Dabei interkaliert DAPI mit der DNA und markiert so den Zellkern. Die Auswertung des Tests erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm. Bei einem Negativ-Test werden nur die Zellkerne der zu untersuchenden Zellen blau gefärbt. Liegt eine Kontamination vor, ist eine Wolke aus blauen Fluoreszenzsignalen um den Zellkern sichtbar, da die DNA der Mykoplasmen ebenfalls mit DAPI interkaliert.

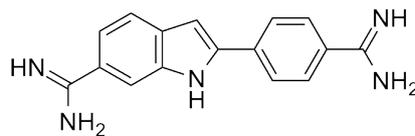


Abb. 3.2: Chemische Struktur von DAPI.

Zur Durchführung des Tests wurden Zellen aus einer Kulturflasche abgelöst (siehe Kapitel 3.5), zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. In eine sterile Petrischale (\varnothing 15 cm) wurde dann ein autoklavierter Objektträger gelegt und 10 mL 37 °C warmes Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden in diese vorbereitete Schale so ausgesät, dass sie nach drei Tagen nicht mehr als 80 % Konfluenz aufwiesen. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium nicht gewechselt. Anschließend wurden 500 μ L des Mediums entnommen, in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gefüllt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Restliches Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL eisgekühltem (-20 °C) Methanol fixiert. Nun wurden vorsichtig 80 μ L DAPI-AL auf den Objektträger getropft und 5 Minuten unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Abschließend wurde der Objektträger mit 5 mL PBS gewaschen, abgesaugt und einige Minuten getrocknet. Nun wurden einige Tropfen Fluomount-Medium auf den Objektträger gegeben, darauf ein Deckglaschen möglichst luftblasenfrei geklebt und für mindestens 5 Stunden bei RT unter Lichtausschluss getrocknet. Die so hergestellten Proben sind dauerkonserviert.

MycoAlert[®] -Test

Falls die mikroskopische Auswertung nicht eindeutig war, wurde der MycoAlert[®]-Mykoplasma Detection Kit der Firma Lonza hinzugezogen. Da bestimmte Enzyme in den Mykoplasmen mit dem MycoAlert[®]-Substrat unter Bildung von ATP reagieren, kann der lineare Zusammenhang zwischen ATP und entstehenden Lichtquanten bei diesem Test ausgenutzt werden. Der Test arbeitet nach folgendem Prinzip: Das Enzym Luciferase spaltet bei Anwesenheit von ATP Luciferin. Pro Spaltungsreaktion wird ein Lichtquant freigesetzt, welches

luminometrisch detektiert werden kann (siehe Kapitel 3.11.2). Sind Mykoplasmen in der Probe enthalten, so werden erhöhte Lumineszenzwerte gemessen.

Für die Durchführung wurden die beim DAPI-Test eingefrorenen Proben aufgetaut und fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Testung verwendet. Es wurde genau nach der MycoAlert®-Kit Beschreibung gearbeitet. 100 µL der zu überprüfenden Proben und der im Kit enthaltenen Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen wurden in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 100 µL MycoAlert®-Reagenz hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation unter Lichtausschluss im Lumistar, einem Plattenreader, wurde die Platte ein erstes Mal gemessen (Messung A). Anschließend wurde jeder Ansatz mit 100 µL MycoAlert®-Substrat beimpft und erneut zehn Minuten unter gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Es folgte eine zweite Messung (Messung B). Ausgewertet wurden die Messungen, indem der Quotient aus Messung B und Messung A gebildet wurde. War der errechnete Wert größer 1,2, wiesen die Zellen Mykoplasmen auf und wurden verworfen. Lag der Quotient unterhalb von 1,0, waren die Zellen nicht kontaminiert. Grenzwertige Ergebnisse (1,0 - 1,2) wurden als Kontamination angesehen und die Zellen verworfen.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch als **fluorescence activated cell sorting** (FACS) bezeichnet, ermöglicht es, unterschiedliche Eigenschaften von Einzelzellen oder anderer Teilchensuspensionen zu untersuchen. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen vereinzelt und an einem Argonlaser (Ext. 488 nm) vorbeigeführt. Gemessen wird dabei das Streulicht, das im Kreuzungspunkt zwischen Laserstrahl und Zelle entsteht, sowie die Fluoreszenz bei markierten Zellen.

In Abhängigkeit vom Detektionswinkel erhält man verschiedene Informationen über die Zelle. Das parallel zum eingestrahlten Licht gemessene „Vorwärtsstreulicht“ (FSC - **F**orward**s**catter) wird überwiegend durch die Zellgröße, das in einem 90° - Winkel zum Laserstrahl gemessene „Seitwärtsstreulicht“ (SSC - **s**ide **s**catter) in erster Linie durch die Granularität bestimmt. Je größer die Zelle und je strukturierter ihr Inneres, desto stärker ist das entstehende Streulicht. Zur Bestimmung der Transportproteine wurden Alexa Fluor® 488-markierte Antikörper verwendet und mit dem Bandpassfilter FL1 (Em. 530/15 nm) analysiert.

Für die Bindungsversuche von Liposomen an Zellen wurden Rhodamin-markierte Liposomen eingesetzt und mit dem Bandpassfilter FL2 (Em. 585/22 nm) detektiert.

Die allgemeinen FACS-Einstellungen wurden für diese Versuche gleich gewählt (siehe Tabelle 3.8). Gemessen wurde die jeweilige Fluoreszenz der Hauptpopulation einer Zelllinie mit dem entsprechenden Bandpassfilter. Gezählt wurden immer 10.000 Zellen; die so bestimmte

Population wurde manuell durch Setzen eines Auswertefensters („Gates“) definiert, welches immer mindestens 75 % der Population einschloss.

Tab. 3.8: Allgemeine FACS-Einstellungen.

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	6,5	Lin
P2	SSC	230	1,0	Log
P3	FL1	550	1,0	Log
P4	FL2	550	1,0	Log
P5	FL3	550	1,0	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL2-W		1,00	Lin

3.6.1 Bindung von Liposomen an A2780-Zellen

Um die Bindungseigenschaften von Liposomen an A2780-Zellen zu untersuchen, wurden drei verschiedene Liposomenpräparationen (Lipidzusammensetzung siehe Kapitel 3.3.3) hergestellt: Liposomen ohne Targetierung (mPEG), Albumin-gekoppelte Liposomen mit unspezifischer Targetierung (Alb) und Holo-transferrin-gekoppelte Liposomen (Holo) als spezifisches Target.

Für die Durchführung wurden die Zellen aus den Kulturflaschen wie unter 3.5.2 beschrieben abgelöst. Das erhaltene Pellet wurde mit 10 mL eisgekühltem KHP resuspendiert und die Zellzahl (siehe Kapitel 3.5.3) bestimmt. Anschließend wurde die Suspension mit KHP so verdünnt, dass die Zellkonzentration $1 \cdot 10^5 / 100 \mu\text{L}$ betrug. Von dieser Suspension wurden 100 μL pro Well in eine 96-Well-V-Boden-Platte überführt. Mit 100 nmol Lipid (Liposomen) wurden die Zellen beimpft und für 90 Minuten unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Liposomen wurden durch zweimaliges Waschen mit je 100 μL KHP und anschließendes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge Allegra™ R5 (1580 g, 4 °C, 4 Minuten) abgetrennt. Abschließend wurden die Zellen in 100 μL KHP pro Well resuspendiert und die Platte mit dem Autosampler des Durchflusszytometers quantifiziert.

3.6.2 Bestimmung der Expression von P-gp und TfR auf A2780-Zellen

Die Expression von P-gp und TfR wurde auf allen drei A2780-Zellen untersucht. Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden die Zellen abgelöst und das erhaltene Pellet in 5 mL eisgekühltem Waschpuffer suspendiert, erneut zentrifugiert (160 g, 4 °C, 4 Minuten)

und in 10 mL eisgekühltem Waschpuffer resuspendiert. Davon wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.5.3) und die Suspension zu einer finalen Konzentration von $1 \cdot 10^5 / 20 \mu\text{L}$ Waschpuffer verdünnt. 20 μL pro Well wurden nun in eine 96-Well-V-Boden-Platte pipettiert und mit 5 μL Antikörper (Verdünnung 1:5 in PBS) beimpft. Nach einer Inkubation von 40 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis schlossen sich zwei Waschschriffe mit je 100 μL Waschpuffer an, auf die immer ein Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge Allegra™ R5 (1580 g, 4 °C, 4 Minuten) folgte. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100 μL Waschpuffer pro Well suspendiert.

3.6.3 Induzierbarkeit der TfR-Expression auf A2780-Zellen

Um den Einfluss der Holotransferrin-gekoppelten Liposomen auf die Expression des Transferrin-Rezeptors zu prüfen, wurden 2 Mio. Zellen A2780 sens bzw. 3 Mio. Zellen A2780 cis jeweils in eine T75-Kulturflasche ausgesät und über Nacht anhaften gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 2 μM Holotransferrin-gekoppelten Referenzliposomen (Lipidzusammensetzung siehe Kapitel 3.3.4) für 72 Stunden unter Standardbedingungen im Inkubator inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen für die Durchflusszytometrie entsprach der unter Kapitel 3.6.2 erläuterten Durchführung.

3.6.4 Kinetikaufnahmen mit freiem Doxorubicin

Die Influxkinetik mit freiem Doxorubicin in A2780 sens-Zellen und A2780 adr-Zellen wurde ebenfalls mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Es wurde dabei nach zwei verschiedenen Verfahren gearbeitet:

Kontinuierliches Verfahren:

Zunächst wurden die Zellen aus einer Kulturschale abgelöst und gezählt (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Das erhaltene Pellet wurde in Phenolrot-freiem Medium ohne Zusatz von FKS und L-Glutamin zu einer Zellkonzentration von 1,25 Mio. Zellen / 1 mL resuspendiert. 1,6 mL dieser Suspension wurden jeweils in Rundboden-FACS-Röhrchen überführt, mit 200 μL Phenolrot-freiem Medium und 200 μL Doxorubicin-AL 2 zu einer Endkonzentration von 3 μM Doxorubicin-HCl in 2 mL Versuchsansatz ergänzt. Bis zur Probenentnahme verblieben die FACS-Röhrchen unter Schütteln in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad. So war es möglich, kontinuierlich von einer Probe über fünf Stunden den Influx von Doxorubicin zu bestimmen. Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Röhrchen kurz auf dem

Vortexer gemischt. Es wurden in den ersten 2 Stunden alle 20 Minuten, danach bis zur fünften Stunde alle 30 Minuten bei jeder Messung 10.000 Zellen quantifiziert.

Physiologisches Verfahren:

Für dieses Experiment wurden am Vortag 1 Mio. Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte mit 2 mL Medium ausgesät. Für den Versuch wurde das Medium zu Phenolrot-freiem Medium ohne Zusatz von FKS und L-Glutamin gewechselt und die einzelnen Wells mit 3 μ M Doxorubicin-HCl (Doxorubicin-AL 2) beimpft. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ unter Ausschluss von Licht inkubiert, wobei die gleichen Zeitpunkte gewählt wurden wie im kontinuierlichen Verfahren. Zur Aufarbeitung wurde zunächst das Doxorubicin-haltige Medium entfernt und mit 1 mL eisgekühltem PBS gewaschen. Daran schloss sich ein zweiminütiger Inkubationsschritt mit 200 μ L Trypsin/EDTA-Lösung an, der durch Zugabe von 800 μ L Phenolrot-freiem Medium ohne Zusatz von FKS und L-Glutamin gestoppt wurde. Bis zur Quantifizierung der Proben mittels Durchflusszytometrie wurden die Proben auf Eis und unter Lichtausschluss gelagert. Analog wurden auch hier 10.000 Zellen bestimmt. Für diese durchflusszytometrische Bestimmung der Proben wurden die oben genannten FACS-Einstellungen in folgender Weise geändert:

Tab. 3.9: Einstellungen des Durchflusszytometers für die Doxorubicin-Kinetikexperimente.

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	6,5	Lin
P2	SSC	350	1,5	Lin
P3	FL1	550	1,0	Log
P4	FL2	550	1,0	Log
P5	FL3	550	1,0	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL2-W		1,00	Lin

3.6.5 Bestimmung der Transporter Ctr1, ATP7A und ATP7B in fixierten, permeabilisierten A2780-Zellen

Um Proteine in Zellen mit Hilfe von markierten Antikörpern zu färben, müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit die Antikörper passiv in die Zelle gelangen können. Die Zellen wurden zunächst an Stelle von Trypsin/EDTA-Lösung mit EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche gelöst, um die Rezeptoren an und in den Zellen möglichst wenig zu schädigen. Nach Überführung der Zellen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation (160 g, 4 °C) wurde das erhaltene Pellet in eisgekühltem Waschpuffer suspendiert

und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 10 mL 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung für 10 Minuten bei RT fixiert, erneut zentrifugiert (370 g, 4 °C, 5 Minuten) und der Überstand verworfen. Daran schloss sich ein weiterer Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt mit 10 mL eisgekühltem (mind. -20 °C) 90 %igem Methanol für 10 Minuten im Kühlschrank an, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (370 g, 4 °C, 5 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 0,01 %iger Tween 20-Lösung aufgenommen, nicht suspendiert, sondern sofort zentrifugiert (370 g, 4 °C, 5 Minuten). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 mL Blockierungspuffer suspendiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Aus dieser Lösung wurden 20 µL entnommen und zur Zellzählung verwendet (siehe Kapitel 3.5.3). Die Zellsuspension wurde so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5 / 100 \mu\text{L}$ Blockierungspuffer entstand. Entsprechend der gewählten Ansätze wurden nun je 100 µL Zellsuspension pro Well in eine 96-Well-V-Boden-Platte pipettiert und die Platte auf Eis gelagert. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge Allegra™ R5 (1580 g, 4 °C, 4 Minuten) an. Die Platte wurde ausgeschlagen, um den Überstand zu entfernen. Die verbleibenden Pellets wurden nun entweder in 30 µL 0,01 %iger Tween 20-Lösung oder in 30 µL primärer Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:10 in Blockierungspuffer) re-suspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten auf Eis und unter Lichtausschluss wurden 70 µL 0,01 %iger Tween 20-Lösung zu jedem Ansatz pipettiert und zentrifugiert (1580 g, 4 °C, 4 Minuten). Nachdem der Überstand entfernt war, wurden die Proben entweder mit 30 µL 0,01 %iger Tween 20-Lösung oder mit 30 µL sekundärer Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:100 in Blockierungspuffer) behandelt. Die Platte mit den Proben wurde dann für 40 Minuten auf Eis und unter Lichtausschluss gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 70 µL 0,01 %iger Tween 20-Lösung pro Well hinzugegeben und abschließend zentrifugiert (1580 g, 4 °C, 4 Minuten), um ungebundenen Antikörper abzutrennen. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100 µL 0,01 %iger Tween 20-Lösung pro Well suspendiert und auf Eis in Dunkelheit gelagert. Nach Anfärbung der Zellen können die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Analyse mehrere Stunden gelagert werden (laut Angaben des Antikörper-Herstellers Santa Cruz bis zu 24 Stunden), da sie fixiert sind.

Zu diesem Versuch wurde noch eine Variation durchgeführt:

Dazu wurde das Medium in einer T75-Kulturschale bei 80 %iger Konfluenz der Zellen gewechselt und die Zellen für 24 Stunden mit 5 µM Cisplatin oder Cisplatin-haltigen Holotransferrin-gekoppelten Liposomen behandelt. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Zytostatika-haltige Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Im Anschluss fand die Zellaufarbeitung wie oben beschrieben statt.

3.7 Fluoreszenzspektrometrie

3.7.1 Bindung von Liposomen an A2780-Zellen

Um die Bindungseigenschaften von den Liposomen, die in der Lipidzusammensetzung der Caelyx[®]-Liposomen entsprechen, an A2780-Zellen zu untersuchen, wurden ebenfalls drei verschiedene Liposomenpräparationen (Lipidzusammensetzung siehe Kapitel 3.3.3) hergestellt: Liposomen ohne Targetierung (mPEG), Albumin-gekoppelte Liposomen mit unspezifischer Targetierung (Alb) und Holotransferrin-gekoppelte Liposomen (Holo) als spezifisches Target. Für diesen Assay wurden je eine Kulturschale sensitive und resistente Ovarialkarzinom-Zellen abgelöst, gezählt und zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^4 / 90 \mu\text{L}$ suspendiert. Von dieser Suspension wurden 90 μL pro Well in eine sterile, schwarze 96-Well-Platte mit flachem Boden ausgesät. Dabei wurde darauf geachtet, dass in den Rand-Wells der Platte nur Puffer als Verdunstungsschutz gegeben wurde. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen mit den verschiedenen fluoreszenzmarkierten Liposomenpräparationen mit einer Konzentration von 30 nmol pro Well beimpft und für 90 Min. unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte direkt mit Hilfe des Plattenreaders FLUOstar OPTIMA, um die Gesamtfluoreszenz pro Well zu erfassen. Gewählt wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm und eine Emissionswellenlänge von 525 nm. Ungebundene Liposomen wurden durch zweimaliges Waschen mit je 100 μL PBS pro Well abgetrennt. Abschließend wurde in jedes Well 100 μL PBS gegeben und die Platte erneut quantifiziert.

3.7.2 Quenchingtest

Da der Wirkstoff Doxorubicin-HCl in den Caelyx[®]-Liposomen durch die Art der Herstellung mikrokristallin vorliegt, unterliegt er dem Phänomen der Fluoreszenzlöschung („Quenching“). Um das Ausmaß dieses Effektes zu untersuchen, wurden je 50 μL aufsteigende Konzentrationen von Caelyx[®] im Vergleich zu freiem Doxorubicin-HCl in schwarze 96-Well-Platten pipettiert. Die eine Hälfte jeder Platte wurde mit 50 μL Phenolrot-freiem Medium, die andere Hälfte mit 50 μL 0,1 % Triton X ergänzt. Durch Triton X wurden die Liposomen lysiert. Dadurch lag Doxorubicin nicht mehr mikrokristallin vor und die Fluoreszenzlöschung wurde aufgehoben, wodurch höhere Fluoreszenzintensitäten resultierten.

Die Messungen wurden am FLUOstar OPTIMA, einem Plattenreader, durchgeführt. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm und ein Emissionsfilter von 525 nm verwendet. Die graphische Auswertung erfolgte halblogarithmisch.

3.7.3 Quantifizierung der Doxorubicin-Konzentration in Liposomen

Durch die Targetierung von Doxorubicin-haltigen Liposomen bzw. durch anschließende größenausschlusschromatographische Aufreinigung der Liposomen wurde die ursprüngliche Liposomensuspension mit einem unbestimmten Faktor verdünnt, sodass eine erneute Quantifizierung des Doxorubicin-HCl-Gehalts notwendig wurde. Die quantitative Bestimmung wurde mit Hilfe des Luminescence Spectrometer LS 55 durchgeführt, wobei eine Anregungswellenlänge von 488 nm gewählt und bei einer Emissionswellenlänge von 555 nm detektiert wurde. Der Extinktions- und Emissionsspalt wurde jeweils auf 2,5 eingestellt.

Zunächst wurde eine Kalibrierung von 0,05 mM bis 0,5 mM Doxorubicin-HCl in 0,25 % Triton X vorgenommen. Die hergestellten Liposomen wurden 1 : 10 verdünnt, mit 1 %iger Triton X-Lösung für 10 Minuten bei RT lysiert und mit Aqua millipore aufgefüllt, sodass eine finale Konzentration von 0,25 % Triton X in allen Proben erhalten wurde. Diese Lösung wurde dann in PS-Küvetten überführt und quantifiziert.

3.7.4 Intrazelluläre Doxorubicin-Akkumulation

Um die intrazelluläre Doxorubicin-Konzentration in den Zellen zu bestimmen, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem die Zellen und Liposomen abschließend lysiert wurden, um den Quenching-Effekt der Liposomen zu umgehen.

Resistente (adr) und sensitive (sens) A2780-Zellen wurden zu 1 Mio. Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte am Vortag des Versuches ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium zu Phenolrot-freiem Medium ohne FKS und L-Glutamin gewechselt und entweder mit der Doxorubicin-AL 1 oder liposomalem Doxorubicin zu einer Konzentration von 10 µM Doxorubicin pro Well beimpft. Es wurde Caelyx[®] und mit Holotransferrin targetierte Caelyx[®]-Liposomen eingesetzt. Der Inkubationszeitraum betrug eine bzw. vier Stunden unter Lichtausschluss im Inkubator. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurde das zytostatikahaltige Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 mL eisgekühltem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 200 µL Trypsin / EDTA für 2 Minuten bei RT auf die Zellen gegeben und die nur noch lose anhaftenden Zellen mit 800 µL eisgekühltem Phenolrot-freiem Medium ohne FKS und L-Glutamin ab gespült. Die Zellsuspension wurde in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge 1 Minute (1520 g, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Pellet mit 1 mL eisgekühltem PBS suspendiert und erneut 1 Minute (24100 g, 4 °C) zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Probe bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert. Die Lyse und Quantifizierung der Proben erfolgte in analoger Weise wie im vorherigen Abschnitt

(3.7.3) beschrieben. Lediglich der Kalibrierbereich wurde für diese Messungen zwischen 0,01 und 1 μM Doxorubicin-HCl angepasst, wobei der Extinktions- und Emissionsspalt jeweils auf 10 eingestellt wurde.

Zusätzlich wurde dieser Versuch mit einer weiteren Modifikation durchgeführt, um den Einfluss des P-gp-Inhibitors WK-X-24 auf die Doxorubicin-Akkumulation zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen 15 Minuten vor Zugabe der Doxorubicin-Lösungen mit 3 μM WK-X-24 behandelt. Das weitere Vorgehen entsprach den oben beschriebenen Abläufen.

3.8 Fluoreszenzmikroskopie

3.8.1 Immunhistochemische Färbungen

Zur Vorbereitung der Zellen für immunhistochemische Färbungen wurden sowohl sensitive als auch resistente A2780-Zellen aus je einer Flasche abgelöst und gezählt (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Um die Zellen in 6-Well-Platten auszusäen, wurde in jedes Well ein autoklaviertes Deckgläschen (Ø 18 mm) gelegt und 2 mL warmes Medium vorgelegt. Danach wurden in jedes Well je $2 \cdot 10^5$ A2780 sens-Zellen bzw. $3 \cdot 10^5$ A2780 cis-Zellen gegeben, die 6-Well-Platten vorsichtig geschwenkt und die Zellen über Nacht kultiviert. Waren die Zellen schlecht angewachsen, wurden sie einen weiteren Tag im Inkubator belassen. Am Tag der Versuchsdurchführung wurde das Medium abgesaugt und 1 mL Medium, 5 μM Cisplatin-haltiges Medium oder entsprechend der Menge an freiem Cisplatin liposomales Cisplatin (siehe Kapitel 3.3.3) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurde das Medium entfernt und jedes Well mit 1 mL PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 mL 3,7 %iger Formaldehydlösung wurden die Zellen 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler fixiert. Die Formaldehydlösung wurde entfernt und die Zellen mit je 1 mL 0,02 %iger Triton X-Lösung für 15 Minuten bei RT permeabilisiert. Daran schloss sich eine dreißigminütige Inkubation bei RT mit 1 %iger BSA-Lösung an, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach Absaugen der BSA-Lösung wurden je 50 μL des primären Antikörpers (Verdünnung 1 : 10 in 1 %iger BSA-Lösung) auf ein Deckgläschen gegeben und ein quadratisches Deckgläschen (18 mm) darauf gelegt. Die so präparierten 6-Well-Platten wurden in ein feuchtes Tuch eingeschlagen, mit Alufolie umwickelt und im Inkubator für 90 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das quadratische Deckgläschen entfernt und jedes Well mit 1 mL PBS gewaschen. Zur Färbung der primären Antikörper wurden nun 50 μL des sekundären Antikörpers (Verdünnung 1 : 100 in 1 %iger BSA-Lösung) auf jeweils ein Deckgläschen gegeben und wieder mit einem quadratischen Deckgläschen (18 mm) abgedeckt. Die 6-Well-Platte wurde analog zum primären

Antikörper im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde nach Entfernen des quadratischen Deckgläschens erneut mit 1 mL PBS gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden nun 40 μ L DAPI-AL auf jedes Deckgläschen pipettiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit je 1 mL PBS an. Abschließend wurde je 1 mL Aqua millipore in jedes Well gegeben und die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den Wells genommen und für einige Minuten zum Trocknen auf ein Papiertuch (mit der Zellseite nach oben) gelegt. Nun wurde ein Tropfen Fluomount-Medium auf den Objektträger gegeben, darauf ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei (mit der Zellseite nach unten) geklebt und für mindestens 5 Stunden bei RT unter Lichtausschluss getrocknet. Danach wurde jedes Deckgläschen mit klarem Nagellack luftdicht versiegelt.

Die Analyse erfolgte mithilfe eines konfokalen Laser-Mikroskops (Nikon Eclipse Ti). Zur Bearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde Adobe® Photoshop® CS3 verwendet.

3.9 Platinanalytik mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Quantifizierung Cisplatin-haltiger Liposomen bzw. der Platin-Akkumulation in den Zellversuchen erfolgte mit flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie mit Graphitrohrentechnik (GF-AAS). Diese Methode wurde ursprünglich von Kloft *et al.* [163] entwickelt und von Frau Dr. Pieck [164] im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Jaehde modifiziert und validiert. Das Messprinzip beruht auf der Eigenschaft von Metallen, als freie Atome im Gaszustand konzentrationsabhängig Licht der gleichen Wellenlänge zu absorbieren, die sie auch emittieren (Resonanzabsorption). Dies führt zu einer Abschwächung des eingestrahnten Lichts, welche ausgewertet werden kann. Zum Atomisieren des in den Proben enthaltenen Platins wurde in dieser Arbeit die Graphitrohrentechnik angewendet. Die erforderlichen hohen Temperaturen (2500 und 2700 °C) werden durch Anlegen hoher Stromstärken erreicht. Als Anregungslichtquelle wurde eine für Platin spezifische Hohlkathodenlampe (UltrAA®) verwendet. Die Messungen wurden selbstständig im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde durchgeführt.

Messbedingungen

Vor jeder Platinquantifizierung wurde in einem Konzentrationsbereich von 5-50 ng/ml eine Kalibrierung durchgeführt (Einfachinjektion). Da die Erstellung der Kalibrierung durch die Software SpectrAA® vollautomatisiert abläuft, wurde lediglich ein Aliquot (600 μ L) des Standards 50 für die Kalibrierung benötigt. Um die Qualität, hinsichtlich Richtigkeit und

Präzision, der anschließend gemessenen Proben über den kompletten Messverlauf sicherzustellen, wurde nach drei Proben jeweils eine Qualitätskontrolle (QC) gemessen. Die gewählten Konzentrationen für die QC betragen für die Einfachinjektion 10, 20 und 40 ng/mL und wurden unabhängig von der Kalibratorlösung (Standard 50) hergestellt. In der Dissertation von Herrn Dr. Garmann [165] wird die genaue Herstellung, Aliquotierung und Lagerung des Standards 50 bzw. der Qualitätskontrollen beschrieben, ebenso wie das Temperaturprogramm, mit dem die Einfachinjektion durchgeführt wurde. Bedingung für einen erfolgreichen Probenlauf war, dass mindestens 67 % der QCs innerhalb des relativen Fehlers von $\pm 15\%$ lagen. Die Programmierung des Autosamplers arbeitete nach dem PROMT-Modus (**P**recision **o**ptimized **m**easurement **t**ime). Das bedeutet, dass jeder Messwert aus mindestens zwei Injektionen resultiert. Weicht das Messsignal um mehr als 5 % von der ersten zur zweiten Injektion ab, erfolgt automatisch eine dritte und gegebenenfalls eine vierte Injektion. Lagen die Standardabweichungen der Messwerte dann nicht unter 15 % wurden die Proben erneut gemessen bzw. neue Proben generiert.

3.9.1 Quantifizierung Cisplatin-haltiger Liposomen

Um den Gehalt Cisplatin-haltiger Liposomen zu bestimmen, wurden Proben von 10 μL genommen und diese mit 6,5 %iger HNO_3 supra pur 1 : 3000 verdünnt. Ebenso wurde der Plattingehalt der Rohliposomen bestimmt. Diese Proben wurden jedoch 1 : 0,5 Mio. mit 6,5 %iger HNO_3 supra pur verdünnt. Eine weitere Lyse der Proben im Wasserbad entfiel, da sich das Platin nicht in einer zellulären Matrix befand. Die Quantifizierung wurde immer in Triplikaten und mittels Einfachinjektion wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

3.9.2 Intrazelluläre Platin-Akkumulation

Für die Bestimmung der intrazellulären Platinkonzentration wurden je 1 Mio. Zellen pro Well von Cisplatin-resistenten (cis) und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zellen in eine 6-Well Platte am Vortag ausgesät. Am Morgen des Versuchstages wurde das Medium gewechselt und entweder mit der Cisplatin-AL oder liposomalem Cisplatin zu einer Konzentration von 20 μM Platin pro Well beimpft. Es kamen drei verschiedene Arten von Liposomen (Lipidzusammensetzung siehe Kapitel 3.3.4) zum Einsatz: Liposomen ohne Targetierung (mPEG), Albumin-gekoppelte Liposomen mit unspezifischer Targetierung (Alb) und Holotransferrin-gekoppelte Liposomen (Holo) als spezifisches Target. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C mit 5 % CO_2 Sättigung im Inkubator. Es wurde eine Platinakkumulation über einen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet; die Proben wurden nach folgenden Zeitpunkten isoliert: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und

24 Stunden. Nach diesen Zeitpunkten wurde jeweils das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 mL eisgekühltem PBS gewaschen. Daran schloss sich ein zweiminütiger Inkubationsschritt mit 200 μL Trypsin/EDTA-Lösung bei RT an, der nach 2 Minuten durch Zugabe von 800 μL eisgekühltem Medium gestoppt wurde. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die noch lose anhaftenden Zellen abgespült, in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und in der Eppendorfszentrifuge Micro 200 R (1520 g, 4 °C, 1 Minute) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 mL eisgekühltem PBS suspendiert. Daraus wurde eine Probe von 20 μL zur Proteinbestimmung entnommen, in ein 0,5 mL Eppendorfgefäß gefüllt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (24100 g, 4 °C, 1 Minute) an. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet erneut in 1 mL eisgekühltem PBS suspendiert und abschließend zentrifugiert (24100 g, 4 °C, 1 Minute). Das erhaltene Pellet konnte entweder bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert oder direkt aufgearbeitet werden.

Probenaufarbeitung für die Platinquantifizierung mittels GF-AAS:

Frisch generierte bzw. tiefgekühlte Proben-Pellets wurden mit 50 μL 65 %iger HNO_3 supra pur mit einem Vortexer suspendiert und anschließend zur Lyse in einem Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Die so vorbereiteten Proben wurden nach dem Abkühlen mit Aqua millipore je nach Platinkonzentration im Bereich 1:1 bis 1:10 verdünnt. Darüber hinaus wurde mit 6,5 %iger HNO_3 supra pur verdünnt und mittels Einfachinjektion an der GF-AAS quantifiziert.

3.9.3 Proteinquantifizierung mittels BCA-Kit

Die während der Generierung der intrazellulären Platin-Akkumulation entnommenen Proteinproben wurden mit Hilfe des BCA-Protein-Assay-Kit Novagen® der Firma Merck analysiert. Dieser Assay basiert auf zwei miteinander verknüpften Reaktionen: Proteine können in alkalischem Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Zwei Moleküle BCA reagieren dann mit einem Molekül Cu^+ unter Bildung eines purpurfarbenen Chelatkomplexes, welcher UV-spektrometrisch analysiert werden kann.

Ausgehend von dem im Kit enthaltenen BSA-Standard (2 mg / mL) wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 50 und 400 μg / mL hergestellt, aliquotiert und bei +4 °C bis zur Verwendung gelagert. Ebenso wurde bei der Herstellung der QC (150, 250 und 350 μg / mL) verfahren, welche unabhängig von der Verdünnungsreihe hergestellt wurden. 40 μL der Kalibratoren und QC wurden jeweils in 0,5 mL Eppendorfgefäße pipettiert und mit 20 μL (die Proteinproben der Zellen mit 10 μL) 0,1 molarer NaOH für 30 Minuten bei RT im Ultraschallbad

lysiert und anschließend mit der gleichen Menge an 0,1 molarer HCl neutralisiert. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 10 µL Aqua millipore verdünnt. Im Anschluss wurden 20 µL von jedem Ansatz zweimal auf eine 96-Well-Platte übertragen (Doppelbestimmung). Aus 50 Teilen BCA-Lösung und 1 Teil Kupferlösung, beide Lösungen sind im Kit gebrauchsfertig enthalten, wurde eine Reaktionslösung hergestellt und alle Ansätze mit 200 µL pro Well versetzt. Abschließend wurde die Platte bei 60 °C für eine Stunde im Trockenschrank entwickelt und nach Abkühlen bei 570 nm im Multiskan® EX, einem Microplattenreader, ausgelesen. Zur Beurteilung, ob der Assay auswertbar war, mussten mindestens 67 % der QCs innerhalb des relativen Fehlers von ± 15 % liegen. Zur Angabe der intrazellulären Platinkonzentration wurden die Ergebnisse aus der GF-AAS-Messung mit den Ergebnissen aus dem Protein-Assay verrechnet. Die Angabe des Platingehalts erfolgte immer als Platin / Protein (ng / µg).

3.10 Platinanalytik mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Die ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) ermöglicht es, Elemente im picomolaren Bereich qualitativ (auf Grund ihrer Masse) und quantitativ (auf Grund der in der Probe enthaltenen Menge) zu analysieren. Damit eignet sich diese Methode sehr gut dazu, metallorganische Arzneistoffe, wie sie in der Onkologie eingesetzt werden zu quantifizieren [166].

Die Quantifizierung der DNA-Platinierung wurde im Arbeitskreis von Herrn Dr. Ralf A. Hilger in Essen von Herrn Dennis Alex durchgeführt.

3.10.1 DNA-Platinierung

Der Versuchsaufbau zur DNA-Platinierung gleicht dem der Bestimmung der intrazellulären Platin-Akkumulation (siehe Kapitel 3.9.2). Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung wird in analoger Weise durchgeführt, jedoch wird keine Probe zur Proteinquantifizierung genommen. Die Proben wurden nach 4, 8, 12 bzw. 24 Stunden isoliert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Pellets bei -20 °C gelagert oder direkt zur DNA-Quantifizierung verwendet.

3.10.2 DNA-Isolierung, UV-Quantifizierung und Probenaufarbeitung für die ICP-MS

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mittels Festphasenextraktion mit dem QiAamp[®]-Blood-Mini-Kit der Firma Qiagen. Es wurde nach Vorschrift des Handbuches (Stand 11 / 2007) gearbeitet. Für die Durchführung wurden tiefgekühlte Pellets aufgetaut oder frisch generierte Pellets verwendet. Zunächst wurde zu jeder Probe 200 μL PBS, 4 μL RNase (100 mg / ml), 20 μL Protease und 200 μL Lysepuffer (Puffer AL) pipettiert, die Proben auf einem Vortexer gemischt und 10 Minuten im Ultraschallbad bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden je 200 μL Ethanol (96 - 100%) zu jeder Probe gegeben und erneut mit dem Vortexer gemischt. Um die Tropfen aus den Deckeln der Eppendorfgefäße zu entfernen wurden die Proben eine Minute zentrifugiert (6000 g), auf eine Minifestphasensäule gegeben und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit einer Microfuge[®]-Lite-Zentrifuge zentrifugiert. Die so vorbereitete DNA adsorbierte an die Membran der Festphasensäule. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule auf ein neues Auffanggefäß aufgesetzt. 500 μL des Waschpuffers AW-1 wurden auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (1 Minute, 6000 g), gefolgt von einem zweiten Waschschrift mit 500 μL Waschpuffer AW-2 und entsprechender Zentrifugation (3 Minuten mit Maximalgeschwindigkeit). Der vorhergehende Zentrifugationsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, jedoch ohne Zugabe von Waschpuffer. Die Säule wurde nun auf ein leeres, gewogenes 2 mL Eppendorfgefäß gesteckt. Anschließend wurden 200 μL Elutionspuffer (Puffer AE) auf die Säule gegeben und 5 Minuten bei RT inkubiert, um die adsorbierte DNA zu eluieren, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (1 Minute, 6000 g). Zur quantitativen Überführung der DNA wurde dieser Schritt mit 100 μL Elutionspuffer und fünfminütiger Inkubation bei RT im gleichen Eppendorfgefäß wiederholt. Diese mit ca. 300 μL gefüllten Eppendorfgefäße wurden erneut gewogen.

UV-Quantifizierung

Die Bestimmung der Reinheit und die Quantifizierung der so gewonnen DNA wurde mittels UV-Spektrometrie in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil[®] durchgeführt. Die Proben wurden bei Bedarf mit Puffer AE verdünnt und bei drei verschiedenen Wellenlängen (A_{260} , A_{280} , A_{320}) mit dem Puffer AE als Referenz gemessen. Die Wellenlänge A_{320} diente der Korrektur und wurde von den beiden anderen Wellenlängen subtrahiert. Aus den so korrigierten Wellenlängen wurde das Verhältnis gebildet (siehe Gleichung 3.1).

$$\frac{(A_{260} - A_{320})}{(A_{280} - A_{320})} = 1,7 - 1,9 \quad (3.1)$$

Lag das Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9, konnte von einer vollständigen Abtrennung der Proteine ausgegangen werden, und die Proben hatten die gewünschte Reinheit. Der Gehalt an DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) wurde auf der Basis des linearen Zusammenhangs der korrigierten Absorption bei 260 nm und der DNA-Konzentration nach folgender Formel (siehe Gleichung 3.2) berechnet.

$$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\text{mL}] = 50 * (A_{260} - A_{320}) \quad (3.2)$$

Aus dem Volumen des Eluates und der erhaltenen DNA-Konzentration konnte die Menge an DNA [μg] berechnet werden. In einem weiteren Schritt wurde dann die Stoffmenge an Nukleotiden aus der errechneten Masse und der durchschnittlichen molaren Masse der Nukleotide ($M_{\text{Nukleotid}} = 330 \text{ g/mol}$) ermittelt. Über die Avogadrokonstante konnte zusätzlich auf die Anzahl der enthaltenen Nukleotide geschlossen werden.

Die DNA-Quantifizierung mittels QiAamp[®]-Blood-Mini-Kit wurde von Frau Dr. Pieck im Rahmen ihrer Dissertation validiert [164].

Probenaufarbeitung für die ICP-MS

Nach der DNA-Quantifizierung wurden die Proben in der Speed-Vac[®] Univapo 100 H bis zur Trockne eingedampft. Danach wurde die DNA in 2 mL 1%ige HNO₃ aufgenommen und über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 70 °C inkubiert. Die so vorbereiteten Proben wurden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und konnten direkt mittels ICP-MS quantifiziert werden.

Nach Erhalt und Berechnung der Ergebnisse der DNA-Platinierung und der DNA-Quantifizierung wurden diese Ergebnisse kombiniert als Platin-Nukleotid-Verhältnis angegeben.

3.11 Zytotoxizitätsbestimmungen

3.11.1 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay lassen sich relativ leicht Substanzen auf ihre Zytotoxizität testen. Im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Wiese wurde dieser Assay von Herrn Dr. Müller etabliert und optimiert [167] und in dieser Arbeit modifiziert angewendet. Lebende Zellen bauen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einer violetten, wasserunlöslichen Formazan-Verbindung um (siehe Abbildung 3.3).

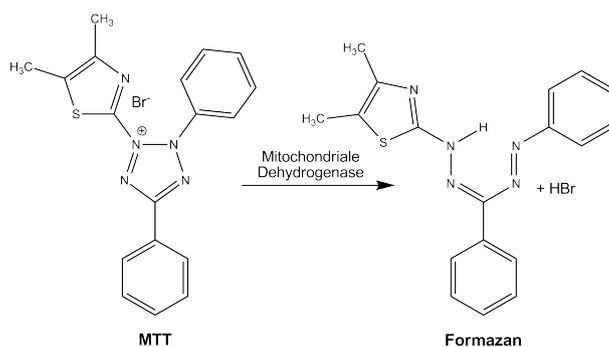


Abb. 3.3: Chemische Reaktion des MTT zum violetten Formazan.

Da die Zellzahl mit steigender Konzentration des Zytostatikums abnimmt und damit auch weniger Mitochondrien zur Umsetzung des Farbstoffs vorhanden sind, kann man somit direkt auf die Vitalität der Zellen schließen.

Für diesen Assay wurden je eine Kulturschale sensitive und resistente Zellen des Ovarialkarzinoms abgelöst, gezählt und zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^4 / 90 \mu\text{L}$ suspendiert. Von dieser Suspension wurden $90 \mu\text{L}$ pro Well in eine sterile, klare 96-Well-Platte mit flachem Boden ausgesät. Dabei wurde darauf geachtet, dass in den Rand-Wells der Platte nur Puffer als Verdunstungsschutz (siehe Abbildung 3.4) gegeben wurde. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit aufsteigenden Konzentrationen an Zytostatikum beimpft, sodass sich ein Endvolumen von $100 \mu\text{L}$ in jedem Well befand. Die Wachstumskontrollen wurden auf jeder Platte mit isotonischer Kochsalzlösung beimpft. Es wurden immer sensitive und resistente Zellen auf einer Platte verglichen.

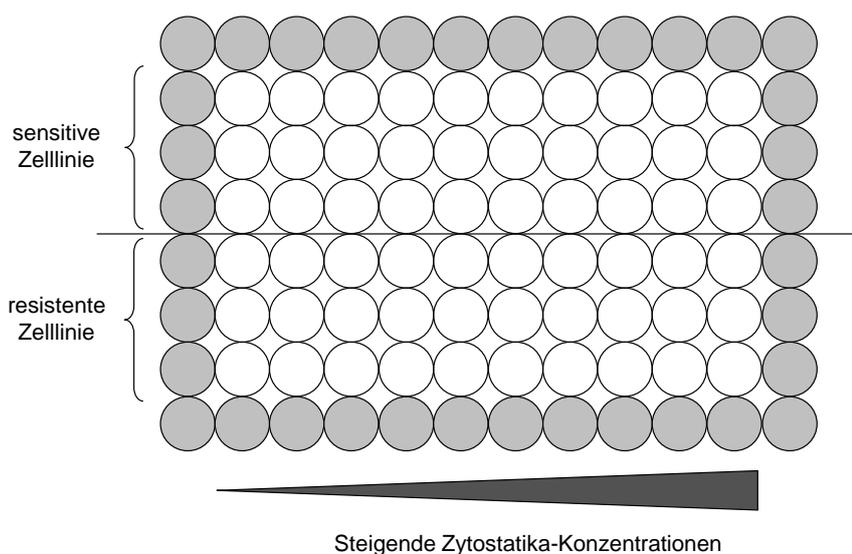


Abb. 3.4: Pipettierschema für den MTT-Assay.

Nach einer Inkubationszeit von 71 Stunden wurden 20 μL MTT-Reagenz in jedes Well gegeben und die Platte ca. eine Stunde im Inkubator entwickelt. In dieser Zeit bildeten sich wasserunlösliche Formazannadeln, die mit Hilfe des Mikroskops beobachtet werden konnten. Bei sichtbaren Formazannadeln wurde die Entwicklung durch Ausschlagen der Platte gestoppt. Anschließend wurden 100 μL DMSO in jedes Well gegeben, um die Zellen zu lysieren und die Formazanverbindung zu lösen. Die Platte wurde nun direkt im Multiskan[®] EX, einem Microplattenreader, bei zwei Wellenlängen, 570 nm und 690 nm, analysiert.

Variationen des MTT-Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Zytostatika und ihre toxische Wirkung untersucht: Doxorubicin-HCl, Daunorubicin-HCl (als Vergleich zu Doxorubicin) und Cisplatin. Im Vergleich zu Doxorubicin und Cisplatin wurden die liposomalen Formulierungen (siehe Kapitel 3.3.4 und 3.3.5) und zusätzlich auch die Referenzliposomen (mPEG, Alb und Holo) auf Ihre Toxizität überprüft.

Um Unterschiede in der Toxizität der verschiedenen Zytostatika bzw. ihrer Formulierungen genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inkubationszeiträume und Zellzahlen gewählt, wie aus Tabelle 3.10 ersichtlich ist.

Tab. 3.10: Inkubationszeit- und Zellzahlvariationen des MTT-Assays.

Inkubationszeit	Zellzahl pro Well
24 Stunden	20.000
	40.000
48 Stunden	20.000
	40.000
72 Stunden	10.000
	20.000

Zur Bestimmung der Toxizität von Zytostatika in Gegenwart von P-gp- oder HDAC-Inhibitoren wurden ebenfalls je eine Kulturschale sensitive und resistente A2780-Zellen abgelöst, gezählt und zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^4 / 80 \mu\text{L}$ suspendiert. Von dieser Suspension wurden 80 μL pro Well in eine sterile, klare 96-Well-Platte mit flachem Boden pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und zunächst jedes Well mit 10 μL einer festgelegten Inhibitorkonzentration beimpft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration des Inhibitors im nicht-toxischen Bereich lag. Für den P-gp-Inhibitor WKX-24 wurde eine 15-minütige, für den HDAC-Inhibitor eine zweistündige Präinkubation gewählt [168]. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen eines Zytostatikums

beimpft. Das weitere Vorgehen entsprach dem schon beschriebenen MTT-Assay inklusive der Variationen.

Datenanalyse

Zunächst wurden die Werte der Hintergrundmessung (690 nm) von den Werten, die bei einer Wellenlänge von 570 nm ermittelt wurden, subtrahiert. Mit den so korrigierten Datensätzen wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] Version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) eine nicht-lineare Regression mit Anwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung durchgeführt. Daraus resultierte eine Konzentrations-Effekt-Kurve. Aus den ermittelten EC_{50} -Werten wurde mit folgender Gleichung der Resistenzfaktor (R_F) berechnet.

$$R_F = \frac{EC_{50} (\text{resistente Zelllinie})}{EC_{50} (\text{sensitive Zelllinie})} \quad (3.3)$$

3.11.2 ATP-Assay mittels ATP-Kit

Der ATP-Assay wurde ebenso wie der MTT-Assay von Müller *et al.* etabliert [167]. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Verena Schneider [169] aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde wurde dieser Assay modifiziert und optimiert. Dieser Assay basiert auf der ATP-abhängigen Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase (siehe Abbildung 3.5). Bei der Spaltungsreaktion wird pro umgesetztes ATP-Molekül ein Lichtquant freigesetzt, das luminometrisch detektiert werden kann. Da diese Reaktion sehr sensitiv ist, ist es möglich, mit einem geringen Probevolumen zu arbeiten bzw. sehr feine ATP-abhängige Änderungen in der Zelle zu verfolgen [170].

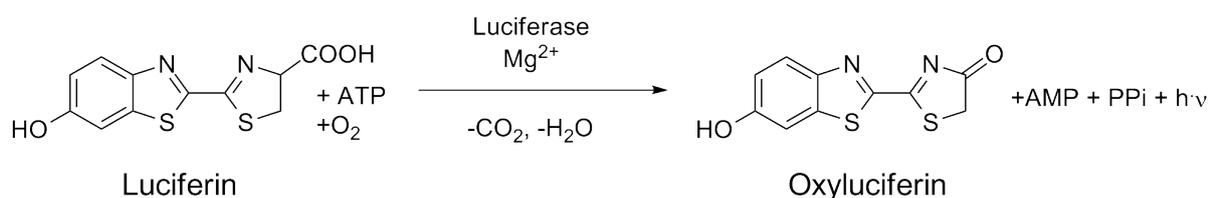


Abb. 3.5: Chemische Umsetzung von Luciferin durch Luciferase.

Für die Durchführung wurde zunächst analog zum MTT-Assay gearbeitet und je eine Zellsuspension von resistenten und sensitiven Zellen mit einer finalen Konzentration von $2 \cdot 10^4 / 90 \mu\text{L}$ hergestellt. $90 \mu\text{L}$ pro Well wurden von dieser Suspension am Vortag in eine sterile weiße 96-Well-Platte pipettiert und über Nacht vorinkubiert. Die Wells am Rand der

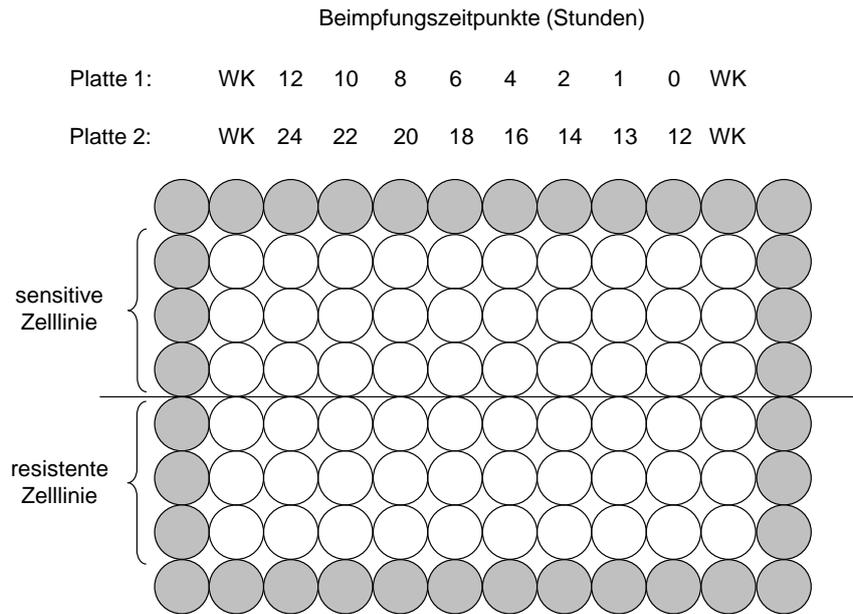


Abb. 3.6: Pipettierschema für den ATP-Assay.

Platte wurden wieder mit Puffer gefüllt. Es wurde immer mit zwei Platten parallel gearbeitet, um eine Absterbekinetik über 24 Stunden beobachten zu können (siehe Abbildung 3.6). Die Platten wurden nun nach dem in Abbildung 3.6 beschriebenen Schema mit einer festgelegten Zytostatika-Konzentration beimpft, sodass sich 100 μL Flüssigkeit in jedem Well befanden. Die Wachstumskontrollen (WK) wurden mit isotonischer Kochsalzlösung beimpft. Nach zwölf Stunden wurde die Platte 2 für weitere zwölf Stunden im Inkubator belassen, während Platte 1 ausgeschlagen wurde. In jedes Well wurden 100 μL 1 %iger Triton X-Lösung zur Lyse pipettiert und zehn Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Rand-Wells mit je 100 μL PBS pro Well gewaschen und sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Im Anschluss wurden in diese Wells zunächst 90 μL 1 %iger Triton X-Lösung und 10 μL der Kalibratorlösungen zugegeben, sodass sich ein Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2,0 μM ATP ergab. Die QCs wurden in gleicher Weise aufgetragen. Die so präparierte Platte wurde in den auf 28 $^{\circ}\text{C}$ temperierten LUMIstarTM, einen Microplattenreader, gestellt. Dann wurde mit Hilfe des Pumpsystems des Microplattenreaders automatisiert 25 μL des Standardreaktionsgemisches (genaue Zusammensetzung siehe Produktinformation ATP Determination Kit) in jedes Well pipettiert und im Anschluss direkt gemessen. Die Messbedingungen sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Zur Beurteilung, ob der Assay auswertbar war, wurden die gleichen Bedingungen an die QCs gestellt, wie es unter 3.9.3 beschrieben wurde.

Tab. 3.11: Geräteeinstellungen für den ATP-Assay.

Einstellungen	
No. of intervals	80
Position delay	0,5 s
Measurement interval time	0,1 s
Interval time	0,1 s
Injection volume	25 μ L
Required value	40 %
Reader temperature	28 °C
Optic	Top optic
Scan modus	Well

Von den 80 gemessenen Zyklen pro Well wurde aus den Zyklen 60 bis 80 ein Mittelwert gebildet und der Gehalt an ATP (nmol) mittels linearer Regression berechnet. Zur besseren Darstellung der Kinetik über 24 Stunden wurden die Ergebnisse der Wachstumskontrollen auf 100 % gesetzt und die Werte der restlichen Zeitpunkte darauf bezogen.

Herstellung und Lagerung der ATP-Standards für die Kalibrierung und QCs

Da ATP-Lösungen auf Grund der leichten Zersetzbarkeit des ATPs nicht sehr lange haltbar sind, musste bei der Herstellung und Handhabung der Lösungen mit besonderer Vorsicht vorgegangen werden. Aus dem im Kit enthaltenen ATP-Standard (5 mM) wurde eine Stammlösung und eine Arbeitslösung hergestellt: ATP-SL mit einer Konzentration von 500 μ M und ATP-AL mit einer Konzentration von 20 μ M. Aus ATP-AL 1 wurden die Standards für die Kalibrierung und die QCs hergestellt (siehe Tabelle 3.12). Die hergestellten Standards und QCs wurden dann zu 100 μ L in 0,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.12: Herstellung der Standards und der QCs für den ATP-Assay.

	ATP-AL (20 μM) [mL]	Aqua millipore [mL]
Std 1 μ M	0,050	0,950
Std 2,5 μ M	0,125	0,875
Std 5 μ M	0,250	0,750
Std 7,5 μ M	0,375	0,625
Std 10 μ M	0,500	0,500
Std 15 μ M	0,750	0,250
Std 20 μ M	1,000	0,000
QC 3 μ M	0,150	0,850
QC 6 μ M	0,300	0,700
QC 18 μ M	0,900	0,100

Bei der Durchführung des Versuches wurden die Kalibrator- und QC-Lösungen zunächst im Kühlschrank aufgetaut und durch Auftragen von 10 μL in 90 μL 1 %iger Triton X-Lösung in der Platte 1:10 verdünnt, sodass sich eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2,0 μM ATP ergab.

3.11.3 Proteinquantifizierung in 96-Well-Platten

Um den ATP-Gehalt der Proben auf die Gesamtmenge an Proteinen, die in einem Well enthalten sind, beziehen zu können, wurde die Proteinquantifizierung mittels BCA-Protein-Assay-Kit Novagen[®] der Firma Merck so modifiziert, dass der Assay vollständig in einer 96-Well-Platte durchgeführt werden konnte. Diese Modifikation wurde ebenfalls mit Frau Dr. Verena Schneider aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Jaehde durchgeführt. Um vergleichbare Versuchsbedingungen wie im ATP-Assay zu erreichen, wurde parallel zum ATP-Assay immer eine entsprechende Anzahl an sterilen, klaren 96-Well-Platten verwendet, die analog zum oben beschriebenen ATP-Assay vorbereitet und beimpft wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Vergleichsplatte ausgeschlagen, vorsichtig mit 100 μL pro Well gespült und erneut ausgeschlagen. Diese Platte wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Proteinquantifizierung wurde in jedes Probenwell 20 μL PBS pipettiert und anschließend wie im Kapitel 3.9.3 beschrieben weiter verfahren. Damit in den Standards und QCs vergleichbare Bedingungen vorlagen, wurden diese auch in einer 96-Well-Platte bearbeitet. Statt der Behandlung im Ultraschallbad während der ersten Inkubation wurden die Platten nur bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde mikroskopisch die Zellyse kontrolliert. Bedingung war dabei, dass keine sichtbaren Zellen mehr in den einzelnen Wells erkennbar waren. Nach Neutralisation und Verdünnung wurden die Proteinproben in eine neue klare 96-Well-Platte übertragen. Daran schlossen sich die Entwicklung und Quantifizierung im Microplattenreader wie unter 3.9.3 beschrieben an.

Zur Berechnung des ATP-Gehalts in den Zellen wurden die Ergebnisse des ATP-Assays mit denen des Protein-Assays verrechnet und als ATP / Protein [$\text{pmol} / \mu\text{g}$] angegeben.

3.12 Microarray

Der Microarray, auch als DNA-Mikromatrix-Analyse bezeichnet, ermöglicht einen qualitativen Nachweis des zu einem bestimmten Zeitpunkt genetisch aktiven Materials von Zellen. Entsprechend der experimentellen Fragestellungen, wurde mRNA aus Probenmaterial isoliert, in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. Die so vorbehandelten

Proben wurden auf Genchips der Firma Agilent gegeben, auf denen Oligonukleotid-Sonden immobilisiert sind („Oligonukleotide Microarrays“). Anschließend wurde der Chip fluoreszenzspektrometrisch ausgelesen und die erhaltenen Daten bioinformatisch ausgewertet.

Da die bioinformatische Analyse der Daten von Herrn Dr. Martin Koch aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese durchgeführt wurde, wird hier auf eine detaillierte Darstellung der Analysenmethode verzichtet.

3.12.1 Präparation der Zellen

Zur Probenvorbereitung des Microarrays wurde je eine Flasche A2780 sens und A2780 cis abgelöst, gezählt (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.5.3) und entsprechend der gewählten Probenansätze in T75er-Flaschen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ für die sensitiven Zellen und $3 \cdot 10^6$ für die resistenten Zellen pro Flasche ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 15 mL frisches Medium mit freiem Cisplatin, liposomalem Cisplatin oder Referenzliposomen hinzugefügt. Die so vorbereiteten Kulturflaschen wurden 72 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ ohne Mediumwechsel inkubiert.

Folgende Versuchsansätze wurden gewählt:

- A2780 sens und A2780 cis ohne Cisplatin-Exposition
- A2780 sens behandelt mit 1,72 µM (EC₅₀) Cisplatin und A2780 cis behandelt mit 8,94 µM (EC₅₀) Cisplatin
- A2780 sens behandelt mit liposomalem Cisplatin entsprechend der EC₅₀ von freiem Cisplatin und A2780 cis behandelt mit liposomalem Cisplatin entsprechend der EC₅₀ von freiem Cisplatin
- A2780 sens behandelt mit Referenzliposomen, 0,80 µmol Lipid, entsprechend der Menge an Lipid des liposomalen Cisplatins und A2780 cis behandelt mit Referenzliposomen, 4,15 µmol Lipid, entsprechend der Menge an Lipid des liposomalen Cisplatins

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen und der Puffer vollständig entfernt. Anschließend wurde 1 mL RLT-Puffer in jede Kulturflasche gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Flasche gelöst. Die gallertartige Masse aus jeder Flasche wurde in je ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die weitere Aufarbeitung der Zellen und der Microarray wurden in der Stiftung Caesar im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Royer von Herrn Norbert Brenner durchgeführt. Es wurde ein „dual-color“-Microarray durchgeführt. Für die Auswertung des Microarrays wurde folgende Gegenüberstellung zur

Generierung der Daten gewählt (siehe Tabelle 3.13). Ein Teil der generierten cDNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Em. 550 nm - grün) und ein anderer Teil mit Cy5 (Em. 649 nm - rot) markiert:

Tab. 3.13: Versuchsaufbau - Microarray.

	Cy3 (grün)	Cy5 (rot)
A2780sens	Referenzliposomen unbehandelte Zellen	liposomales Cisplatin Cisplatin
A2780cis	Referenzliposomen unbehandelte Zellen	liposomales Cisplatin Cisplatin

3.13 Statistische Methoden

Die Ergebnisse dieser Arbeit repräsentieren, wenn nicht anders angegeben, Mittelwerte aus mindestens drei identischen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels des nonparametrischen Mann-Whitney-Tests durchgeführt oder andernfalls entsprechend gekennzeichnet. Die Signifikanzebenen sind den jeweiligen Darstellungen zu entnehmen, wobei gilt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Liposomales Cisplatin

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, gibt es unterschiedlichste Faktoren, die in die Cisplatin-Resistenz von Krebszellen involviert sind. Um die Unterschiede des Einflusses von freiem Cisplatin im Vergleich zu liposomalen Formulierungen herauszuarbeiten, wurde ein korrespondierendes Zelllinienpaar verwendet, das aus einer Cisplatin-sensitiven und einer Cisplatin-resistenten Zelllinie besteht (A2780 sens und A2780 cis).

Es wird postuliert, dass bei liposomaler Formulierung aufgrund der Targetierung und der galenischen Veränderung des freien Wirkstoffes die Resistenz bei A2780 cis-Zellen zu einem gewissen Grad umgangen werden kann. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich zunächst wirkstofffreie Liposomen markiert und charakterisiert und die Wechselwirkungen mit dem Zellsystem untersucht. Daran schlossen sich Zellversuche mit wirkstoffhaltigen Liposomen im Vergleich zum freien Wirkstoff an, um die Resistenzmechanismen der Zellen näher zu analysieren und eine mögliche Umgehung mit der liposomalen Formulierung zu untersuchen.

4.1.1 Liposomencharakterisierung

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mittels Hydratationsmethode. Daran schlossen sich Homogenisierungsschritte an, entweder durch Extrusion bei wirkstofffreien Liposomen oder mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung bei Cisplatin-haltigen Liposomen. Aus Sicherheitsgründen konnte die Homogenisierung der Cisplatin-haltigen Liposomen ausschließlich mittels Ultraschall erfolgen. Die hergestellten Liposomen wiesen eine Größe von 99 bis 129 nm auf. Liposomen, welche durch Extrusion homogenisiert wurden, wiesen eine geringere Partikelgrößen-Streuung auf (siehe Tab. 4.1) als Liposomen, die mit Ultraschall (siehe Tab. 4.2) behandelt wurden.

Tab. 4.1: Charakterisierung der wirkstofffreien Referenz- und fluoreszenzmarkierten Liposomen.

Formulierung	Partikelgröße ± SD [nm]	Kopplungskonstante ± SD [µg Protein / µmol Phospholipid]
Holo	129,0 ± 4,3	58,5 ± 11,9
Alb	129,0 ± 4,3	76,5 ± 8,6
mPEG	128,0 ± 3,2	-

Für die meisten Versuchsansätze wurden drei verschiedene Liposomen hergestellt. mPEG-Liposomen stellen sterisch stabilisierte Liposomen ohne Funktionalisierung dar. Albumin (Alb) wurde als unspezifische Funktionalisierung und Holotransferrin (Holo) als spezifische Targetierung verwendet. Dazu wurden diese Proteine über einen Cyanur-Anker an die Liposomen gekoppelt. Kontrolliert wurde die Funktionalisierung durch Bestimmung der Kopplungskonstante [154]. In den Versuchsreihen wurden Kopplungskonstanten zwischen 50 und 80 µg Protein / µmol Phospholipid ermittelt, welche eine ausreichende Kopplung der Proteine am Cyanur-Anker bezeichnet.

Tab. 4.2: Charakterisierung Cisplatin-haltiger Liposomen.

Formulierung	Partikelgröße ± SD [nm]	Kopplungskonstante ± SD [µg Protein / µmol Phospholipid]	Einschlussrate ± SD [mmol Pt / mmol Lipid]
Holo-cDDP	116,0 ± 15,1	80,1 ± 12,6	0,24 ± 0,05 / 8,33 ± 0,34
Alb-cDDP	107,9 ± 5,9	53,6 ± 4,7	0,29 ± 0,04 / 9,31 ± 0,50
mPEG-cDDP	99,6 ± 8,4	-	0,27 ± 0,13 / 8,89 ± 2,75

Für die Experimente mit Cisplatin-haltigen Liposomen wurde als abschließender Schritt der Liposomenherstellung der Platingehalt mittels AAS bestimmt, um eine exakte und vergleichbare Cisplatin-Konzentration in allen Versuchen zu gewährleisten (siehe Tab. 4.2).

4.1.2 Bindungsstudien

Detaillierte Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit von Liposomen wurden mittels Durchflusssyztometrie durchgeführt. Die Detektion der Zellen erfolgte über eine fluorimetrische

Quantifizierung mittels Rhodamin-markierter Liposomen.

Die Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 ist ein etabliertes Zellmodell zur Erforschung von Resistenzmechanismen [171, 172]. So wurde zunächst geprüft, ob die Zelllinie A2780 eine prinzipielle Bindungsfähigkeit von Holotransferrin-gekoppelten Liposomen besitzt, um eine endozytotische Aufnahme sicherzustellen, was wiederum die Voraussetzung ist, um mögliche Resistenzmechanismen zu umgehen.

HAMELERS *et al.* beschrieben, dass diese Karzinomzelllinie A2780 ausschließlich Clathrin-vermittelt und nicht Caveolin-vermittelt endozytiert. Dies ist für die vorliegende Arbeit von Vorteil, da der Transferrinrezeptor Clathrin-vermittelt eine Zellaufnahme realisiert [173]. Die Versuche zeigten, dass eine grundsätzliche Bindungsfähigkeit von Liposomen an die Zellen gegeben ist. Verglichen wurden sterisch stabilisierte untargetierte Liposomen (mPEG) mit zwei unterschiedlich targetierten Liposomen (Alb und Holo). Albumin-targetierte Liposomen interagieren unspezifisch mit der Zelloberfläche und Holotransferrin-targetierte Liposomen interagieren spezifisch über den Transferrinrezeptor (siehe Abb. 4.1).

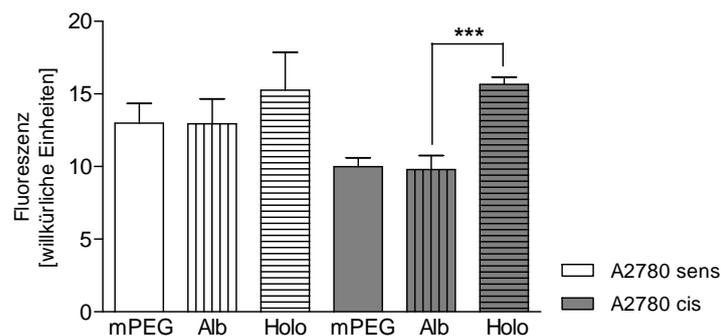


Abb. 4.1: Bindung von unterschiedlich targetierten Rhodamin-markierten Liposomen an A2780-Zellen. Die Zellen wurden für 90 Min. bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Anhand der Fluoreszenzwerte wird deutlich, dass untargetierte und unspezifisch targetierte Liposomen in beiden Zelllinien vergleichbar schwach binden. Spezifisch targetierte Liposomen binden vor allem in den resistenten Zellen signifikant besser.

Trotz der unterschiedlich starken Ausprägung der Bindungsfähigkeit in beiden Zelllinien, zeigten die Holotransferrin-gekoppelten Liposomen in beiden Zelllinien die stärkste bzw. spezifischste Bindung. Daher wurden Holotransferrin-gekoppelte Liposomen als Grundlage für weitergehende Untersuchungen verwendet.

4.1.3 Expressionsstudien

Expression von TfR

Um zu klären, welchen Einfluss Holotransferrin auf die Expression des Transferrinrezeptors auf den Zellen hat, wurde dieses mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Beide Zelllinien exprimieren diesen Rezeptor, wobei die resistenten Zellen im Vergleich mit sensitiven Zellen eine etwas erniedrigte Expressionsrate aufwiesen (siehe Abb. 4.2).

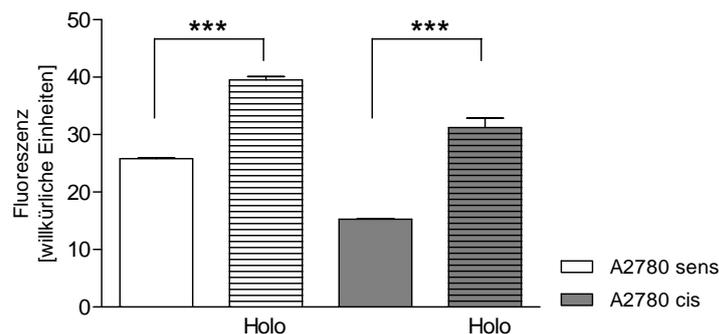


Abb. 4.2: Einfluss von Holotransferrin auf A2780-Zellen: Resistente und sensitive Zellen wurden jeweils mit 2 μ M Liposomen beimpft und für 72 Stunden inkubiert.

Da auch ein Teil der Zellexperimente über einen Zeitraum von 72 Stunden erfolgte, wurde der Einfluss Holotransferrin-targetierter Leerliposomen auf die Zellen in diesem Zeitraum untersucht. Es zeigte sich, dass der Transferrinrezeptor nach einer Exposition mit Holotransferrin-gekoppelten Liposomen signifikant stärker exprimiert wird. Im Falle der resistenten Zellen verdoppelte sich die Expressionsrate sogar.

Expression der Kupfertransporter ATP7A & B und Ctr1

Es war angedacht, die Expression der Kupfertransporter ATP7A & B und Ctr1 mit unterschiedlichen Techniken darzustellen, um einen detaillierten Einblick in die Rezeptor-abhängige Resistenz der Ovarialkarzinom-Zellen zu ermöglichen.

KALAYDA *et al.* konnten eine von der Platin-Exposition abhängige geänderte Lokalisierung der Kupfertransporter ATP7A & B beobachten [172].

Basierend darauf wurden immunhistochemische Färbungen (siehe Kapitel 3.8.1) zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten im Vergleich mit freiem Cisplatin, mit CFDA-Platin, einem fluoreszierenden Platinkomplex (der von Frau Dr. Kalayda aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde zur Verfügung gestellt wurde) und Rhodamin-markierten

Cisplatin-haltigen Holotransferrin-gekoppelten Liposomen durchgeführt. Um einen Eindruck der durchgeführten Färbungen zu vermitteln, sind im Folgenden exemplarisch für jeden Kupfertransporter in der resistenten Zelllinie ausgewählte Bilder, passend zum entsprechenden durchflusszytometrischen Versuch, zusammengestellt (siehe Abb. 4.4 **B**, 4.5 **B**, 4.6 **B**). Die darüber hinausgehenden Anfärbungen führten im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zu valide auswertbaren Ergebnissen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Expression der Kupfertransporter unter dem Einfluss von freiem bzw. liposomalem Cisplatin gestaltete sich komplizierter als der Nachweis des Transferrinrezeptors, da die inkubierten Zellen zunächst fixiert und permeiert werden mussten, um dann mit den entsprechenden FITC-markierten Antikörpern die Transportproteine im Inneren der Zelle zu färben (siehe Kapitel 3.6.5). Um zu belegen, ob die Färbung der verschiedenen Transportproteine erfolgreich war, wurde bei jedem Versuchsansatz als positiv-Kontrolle GTN38, ein Protein aus dem Golgi-Apparat, markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass weder freies Cisplatin noch liposomales Cisplatin im Vergleich zu unbehandelten Zellen Einfluss auf das Golginetzwerk hat (siehe Abb. 4.3). Damit ist die Färbung von GTN38 als Kontrolle für die Expressionsstudien der Kupfertransporter ATP7A & B und Ctr1 geeignet.

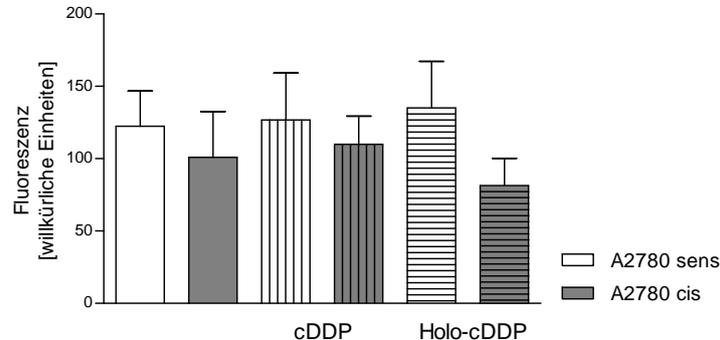


Abb. 4.3: Expression von GTN38. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte Expression von GTN38 in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Dieser Golginetzwerkmarker dient als Positivkontrolle im Vergleich zur Expression der Kupfertransporter ATP7A & B sowie Ctr1. Sensitive und resistente A2780-Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M freiem oder liposomalem Cisplatin inkubiert.

Bei der Auswertung aller Versuche stellte sich heraus, dass sich die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Transporter erheblich voneinander unterschieden, sodass sie zur besseren Beurteilung in separaten Graphiken mit unterschiedlicher y-Achsenkalierung getrennt betrachtet wurden. Die Versuchsdurchführung erfolgte jedoch konzertant, um die Vergleichbarkeit im

Zellsystem sicherzustellen.

Die Kupfertransporter ATP7A & B, die ebenfalls im Golginetzwerk lokalisiert sind, sind in die Sequestrierung und den Efflux des Cisplatin involviert [52]. In resistenten und sensitiven Zellen konnte ATP7A mit vergleichbarem Expressionsniveau nachgewiesen werden. Wurden die Zellen mit freiem Cisplatin inkubiert, so zeigte sich, im Gegensatz zu den resistenten Zellen, in sensitiven Zellen eine signifikant erhöhte Expressionsrate. Mit Holotransferrin funktionalisierte, Cisplatin-haltige Liposomen hatten keinen Einfluss auf die Expressionsrate von ATP7A. Die Fluoreszenzwerte entsprachen denen der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 4.4 A).

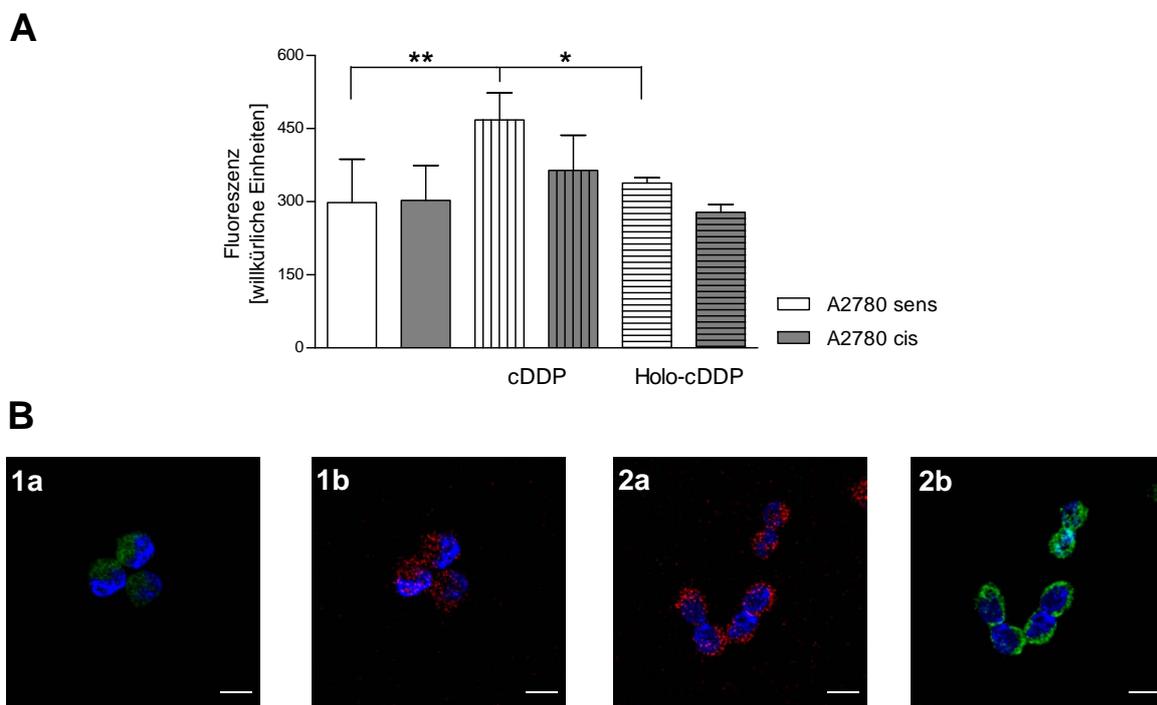


Abb. 4.4: Einfluss von Cisplatin auf die Expression von ATP7A.

A: Durchflusszytometrische Analyse von ATP7A. Sensitive und resistente A2780-Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M freiem oder liposomalem Cisplatin inkubiert.

B: Exemplarisch dargestellte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an resistenten A2780-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 5 μ M Cisplatin-Komponente.

1a: CFDA-Platin (grün); **1b:** ATP7A (rot); **2a:** Rhodamin-markierte Cisplatin-haltige Liposomen (rot); **2b:** ATP7A (grün).

In allen immunhistochemischen Färbungen wurde der Kern mit DAPI blau markiert; Maßstabsbalken = 10 μ m.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Analyse der Fluoreszenzwerte für das Transportprotein ATP7B gefunden. ATP7B wurde in beiden Zelllinien in gleichem Ausmaß exprimiert. Eine Inkubation mit freiem Cisplatin zeigte lediglich in sensitiven Zellen eine signifikante Steigerung der Expressionsrate. Liposomales Cisplatin zeigte auch hier keinen Einfluss auf das Expressionsniveau (siehe Abb. 4.5 A).

Diese Ergebnisse stehen in gutem Zusammenhang mit den physiologischen Eigenschaften der Zelllinien: Vergleicht man das Wachstum der sensitiven Zelllinie mit der resistenten, zeigte sich, dass das Wachstum der resistenten Zellen deutlich verlangsamt ist. So scheint ein Aspekt der Resistenz dieser Zelllinie ein verlangsamter Stoffwechsel und weniger eine Veränderung des Rezeptorstatus zu sein. Entsprechend änderte sich bei Exposition mit Cisplatin auch in diesen Untersuchungen der Rezeptorstatus nicht signifikant.

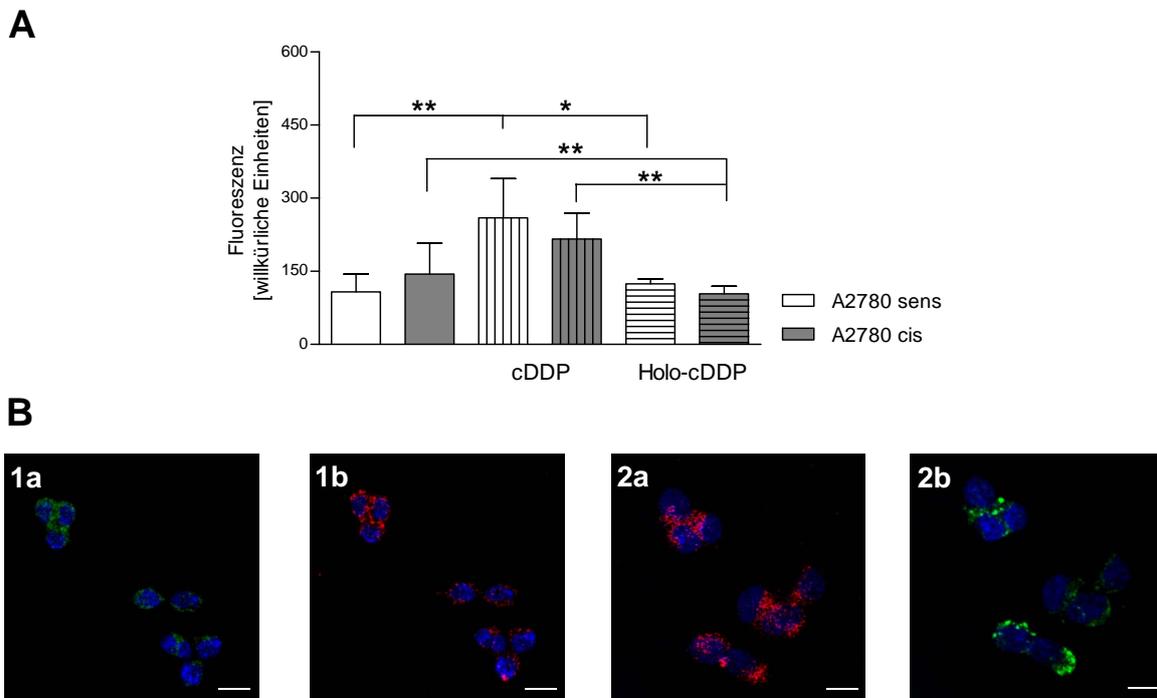


Abb. 4.5: Einfluss von Cisplatin auf die Expression von ATP7B.

A: Durchflusszytometrische Analyse von ATP7B. Sensitive und resistente A2780-Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M freiem oder liposomalem Cisplatin inkubiert.

B: Exemplarisch dargestellte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an resistenten A2780-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 5 μ M Cisplatin-Komponente.

1a: CFDA-Platin (grün); **1b:** ATP7B (rot); **2a:** Rhodamin-markierte Cisplatin-haltige Liposomen (rot); **2b:** ATP7B (grün).

In allen immunhistochemischen Färbungen wurde der Kern mit DAPI blau markiert; Maßstabsbalken = 10 μ m.

Die sensitive Zelllinie reagierte mit einer Erhöhung der Expression von ATP7A & B, um Cisplatin aus der Zelle zu transportieren. Holotransferrin-gekoppelte, Cisplatin-haltige Liposomen führten in beiden Zellen zu keiner Veränderung in der Expression. Dies deutet darauf hin, dass das Cisplatin im Inkubationszeitraum (24 Stunden) in der Zelle nicht als Noxe erkannt wurde und die Zelle nicht mit einer erhöhten Expression gegenregulieren konnte.

Betrachtet man die Fluoreszenzwerte der Expression von Ctr1, so zeigte sich ein anderes Ergebnis (siehe Abb. 4.6 A): Die Expressionsniveaus der unbehandelten sensitiven und resistenten Zelllinien unterschieden sich signifikant. In resistenten Zellen ist die Rezeptorausprägung um ca. 50% reduziert.

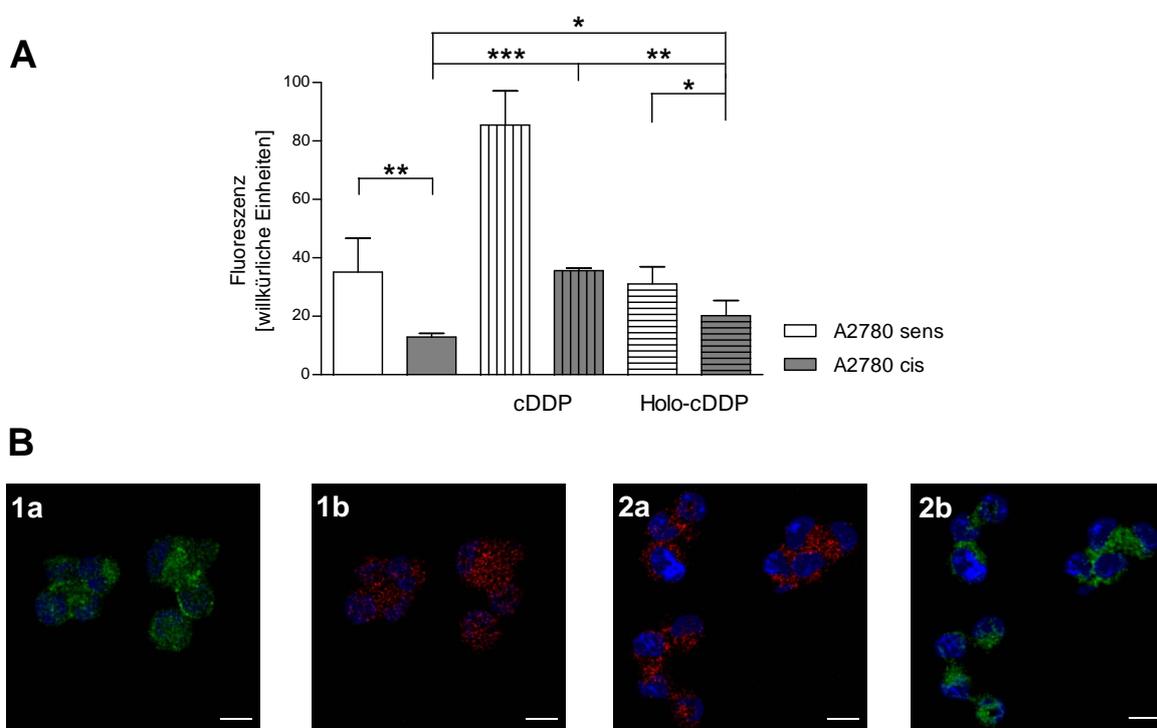


Abb. 4.6: Einfluss von Cisplatin auf die Expression von Ctr1.

A: Durchflusszytometrische Analyse von ATP7B. Sensitive und resistente A2780-Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M freiem oder liposomalem Cisplatin inkubiert.

B: Exemplarisch dargestellte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an resistenten A2780-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 5 μ M Cisplatin-Komponente.

1a: CFDA-Platin (grün); 1b: Ctr1 (rot); 2a: Rhodamin-markierte Cisplatin-haltige Liposomen (rot); 2b: Ctr1 (grün).

In allen immunhistochemischen Färbungen wurde der Kern mit DAPI blau markiert; Maßstabsbalken = 10 μ m.

Eine Inkubation mit freiem Wirkstoff führte in beiden Zelllinien zu einer Steigerung der Expressionsrate. Wurden die Proben mit liposomalem Wirkstoff behandelt, zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in den resistenten Zellen und ebenfalls eine erhöhte Expression in sensitiven Zellen (siehe Abb. 4.6 A).

Da der Kupfertransporter Ctr1 im Zusammenhang mit dem Influx von Cisplatin steht [52], ist es im Hinblick auf die Resistenz ein zu erwartendes Ergebnis, dass die gefundenen Expressionsraten in den resistenten Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen stark vermindert sind. Dieses Ergebnis korreliert gut mit den bereits diskutierten Ergebnissen zu den p-Typ ATPasen A & B.

Holotransferrin-gekoppelte Liposomen umgehen das Transportprotein Ctr1 und werden Clathrin-vermittelt via TfR, der die Eisenaufnahme in die Zelle ermöglicht, endozytiert. Überraschenderweise reagieren die resistenten Zellen mit einer signifikanten Steigerung der Ctr1-Expression. Mögliche Gründe hierfür könnten im TfR-Protein liegen, da die zelluläre Eisenaufnahme in direktem Zusammenhang mit Zellwachstum steht [94, 95]. Durch die Aufnahme von Transferrin-targetierten Liposomen wird nicht nur das Expressionsniveau von TfR angehoben (siehe Abb. 4.2), sondern möglicherweise auch das Wachstum der Zellen stimuliert, welches sich indirekt in einer Steigerung der Expressionsrate von Ctr1 zeigen könnte.

4.1.4 Intrazelluläre Platin-Akkumulation

Die Resistenz von Zellen gegenüber Cisplatin ist oft mit einem reduzierten intrazellulären Platingehalt, bzw. mit vermindertem Influx und/oder gesteigertem Efflux assoziiert.

Um dies für die korrespondierenden Ovarialkarzinom-Zelllinien zu prüfen, wurde eine Influx-Kinetik über 24 Stunden aufgenommen (siehe Abb. 4.7). Es zeigte sich, dass der Influx von freiem Cisplatin in beiden Zelllinien sehr unterschiedlich war. Die sensitiven Zellen nahmen, verglichen mit den resistenten Zellen zu diesem Zeitpunkt, bis zu viermal mehr Cisplatin auf (24 Stunden-Wert) (siehe Abb. 4.7 A).

In Analogie zum Influx mit freiem Cisplatin, wurde die Influx-Kinetik mit liposomalem Cisplatin ebenfalls mit einer Wirkstoffkonzentration von 20 μM über 24 Stunden untersucht (siehe Abb. 4.7 B & C). Mit liposomalem Wirkstoff zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme, sowohl in den sensitiven als auch in den resistenten Zellen. Vergleicht man beide Zelllinien mit freiem und liposomalem Wirkstoff, so zeigten die Liposomen einen nivellierenden Effekt in Bezug auf den Influx. Das bedeutet, dass die intrazelluläre Platin-Akkumulation mittels liposomalem Cisplatin über die Zeit in sensitiven und in resistenten Zellen nahezu identisch ist.

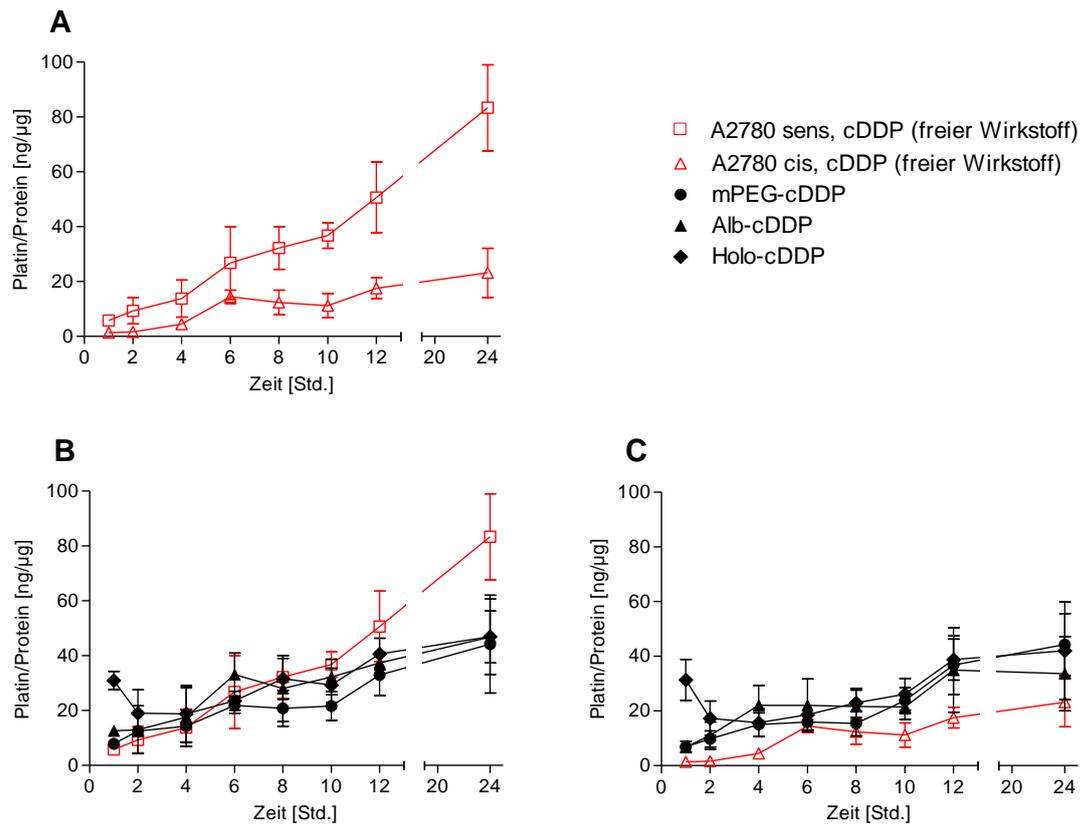


Abb. 4.7: Intrazelluläre Platin-Akkumulation von 20 μ M Cisplatin über 24 Stunden. A: Influx von freiem Wirkstoff in sensiblen und resistenten Zellen. **B:** Vergleich des freien Wirkstoffes mit liposomalem Cisplatin in sensiblen Zellen und **C:** resistenten Zellen.

In den resistenten Zellen überstieg der Influx der liposomalen Formulierung teilweise den des freien Wirkstoffes. In den sensiblen Zellen zeigte sich ein gegensätzliches Ergebnis. Zwischen den unterschiedlichen liposomalen Platinformulierungen konnten keine Unterschiede beim Influx festgestellt werden. Die spezifische Funktionalisierung mit Holotransferrin erwies sich als nicht überlegen im Vergleich mit den Vergleichsformulierungen.

Fazit dieser Analyse ist, dass mit Hilfe von Liposomen als Arzneistoff-Carrier in resistenten Zellen höhere Platin-Konzentrationen erreicht werden können als mit freiem Wirkstoff. Es ist jedoch erwiesen, dass ein höherer Wirkstoffspiegel in der Zelle nicht mit einer erhöhten Toxizität korrelieren muss.

4.1.5 Zytotoxizitätsstudien

MTT-Assay

Wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben, wurden zur Bestimmung des zytotoxischen Einflusses von freiem Cisplatin bzw. von den liposomalen Formulierungen MTT-Assays in modifizierter Form verwendet. Üblicherweise wird dieser Assay nach einem Zeitraum von 72 Stunden ausgewertet. Um die Kinetik-Ergebnisse aus der intrazellulären Platin-Akkumulation besser einordnen zu können, wurden MTT-Assays nicht nur nach 72 Stunden, sondern auch nach 24 und 48 Stunden analysiert. Da nicht nur die Arzneistoffkonzentration im Zusammenspiel mit der Inkubationszeit Einfluss auf das Versuchsergebnis hat, sondern auch die Zellzahl pro Well, wurden zu jedem der drei Auswertungszeitpunkte auch Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zellzahlen durchgeführt.

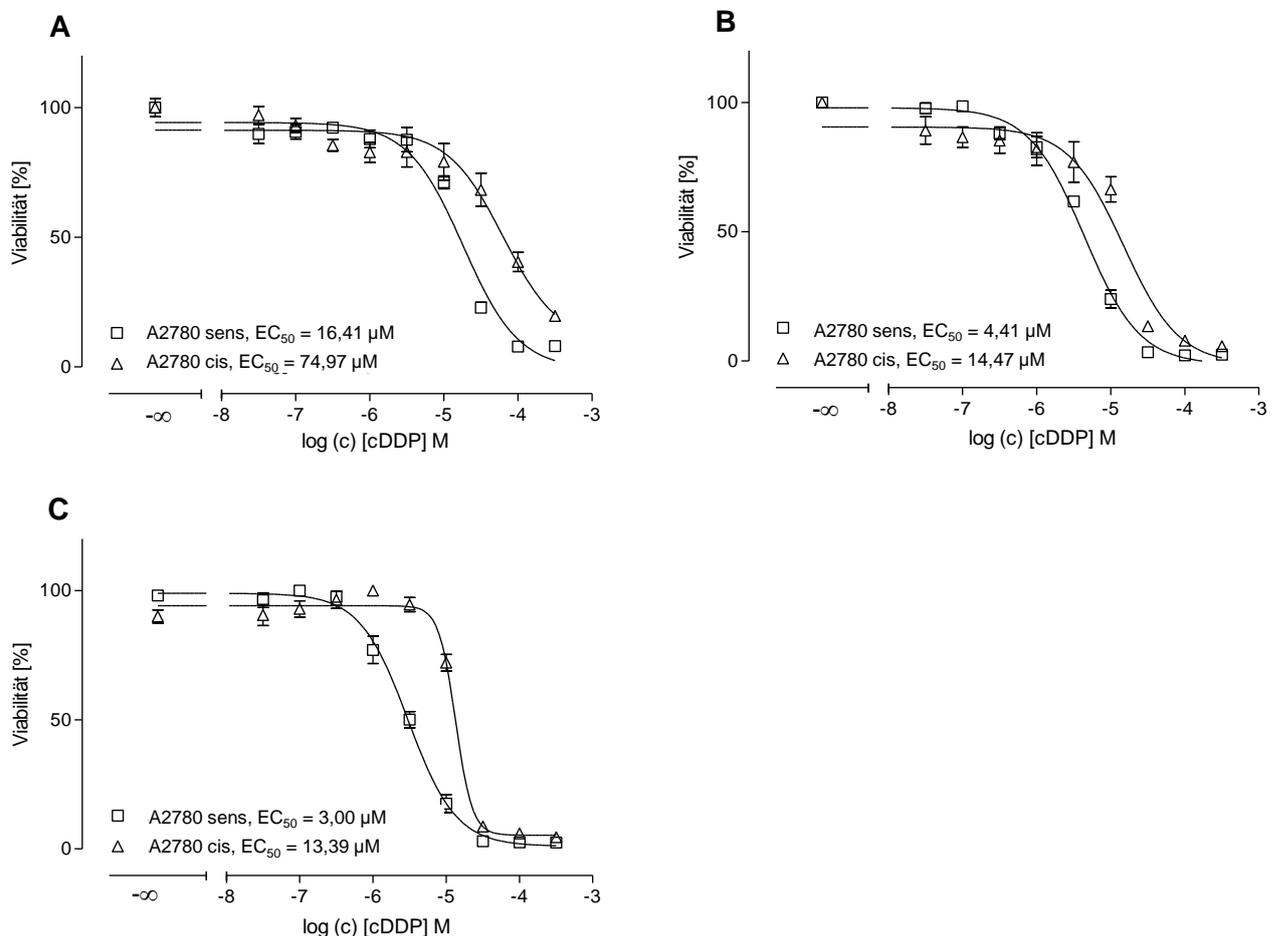


Abb. 4.8: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Zytotoxizität von freiem Cisplatin in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Es wurden 20000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zytotoxizität wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: **A:** 24 Stunden, **B:** 48 Stunden und **C:** 72 Stunden.

Für freies Cisplatin konnte bereits nach 24 Stunden eine Konzentrations-Effekt-Kurve berechnet werden (siehe Abb. 4.8 A). Der Effekt des freien Wirkstoffs intensivierte sich mit steigender Inkubationszeit, welches sich durch einen ausgeprägteren sigmoidalen Kurvenverlauf zeigte (siehe Abb. 4.8 B & C).

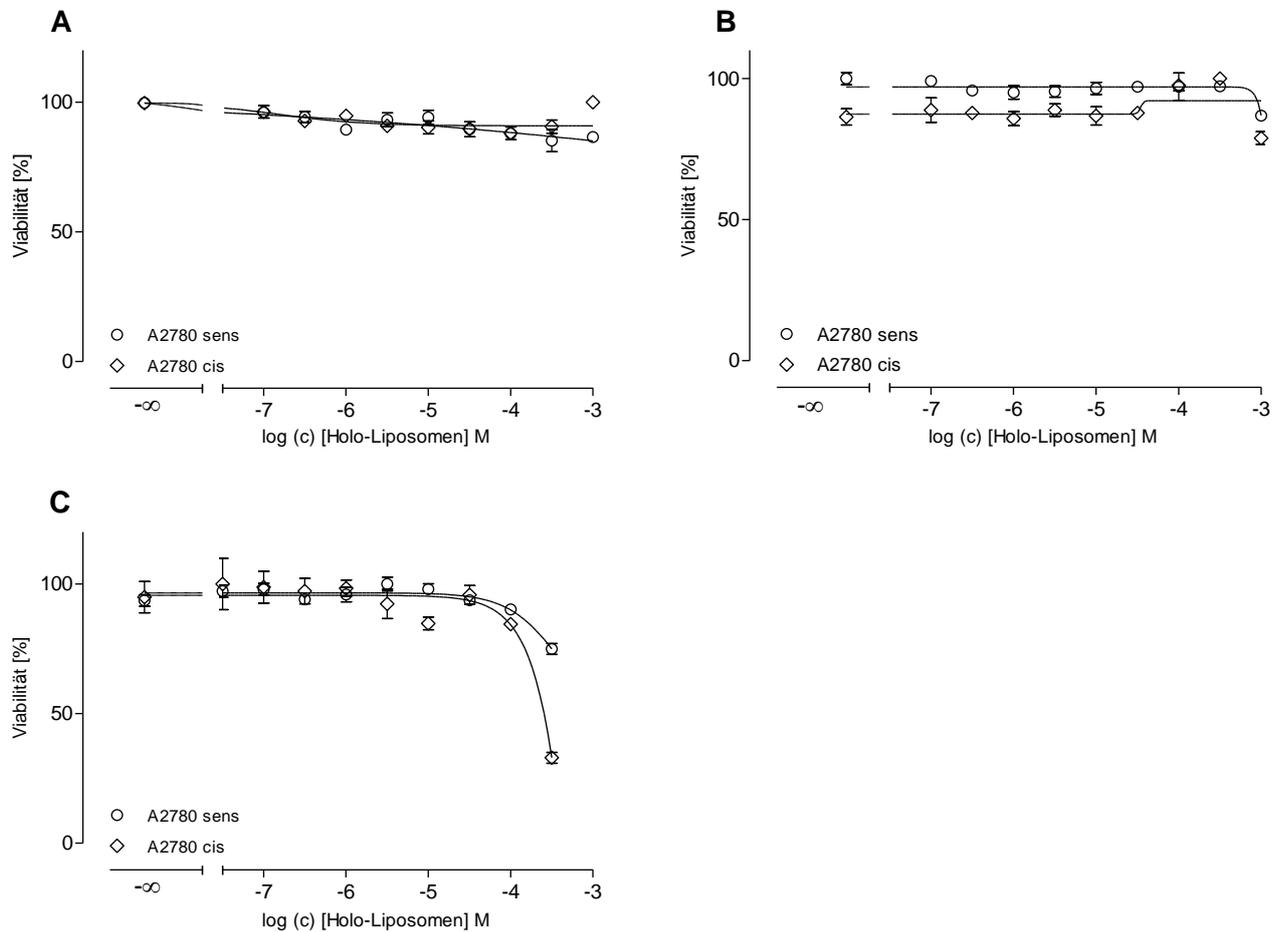


Abb. 4.9: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Zytotoxizität von Holotransferrin-gekoppelten Leerliposomen in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Es wurden 20000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zytotoxizität wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: **A:** 24 Stunden, **B:** 48 Stunden und **C:** 72 Stunden.

Der potentielle Einfluss der in den Liposomen enthaltenen Lipide auf die Zellen wurde mit Leerliposomen untersucht, um die Zytotoxizität von liposomalem Cisplatin unabhängig von möglichen Lipid-Effekten beurteilen zu können. Exemplarisch für alle Liposomen-Arten (mPEG, Alb und Holo) zeigten die in Abbildung 4.9 dargestellten Daten bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M keine toxischen Effekte nach 24 Stunden (Abb. 4.9 A). Dies trifft ebenso auf den Zeitpunkt nach 48 Stunden zu (Abb. 4.9 B). Erst nach 72 Stunden und

wenn die Lipidkonzentration 10^{-4} M überstieg, wurde eine Hemmung des Wachstums erkennbar (Abb. 4.9 C). Diese Ergebnisse mit 20000 Zellen pro Well waren ebenso übertragbar auf Versuche mit anderen Zellzahlen (10000 und 20000 Zellen pro Well, Daten nicht dargestellt).

Auf dieser Grundlage wurden nun alle drei Arten von Cisplatin-haltigen Liposomen im Vergleich zum freien Wirkstoff beurteilt (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Zytotoxizitätsstudien mit freiem Cisplatin und drei liposomalen Cisplatin-Formulierungen.

Inkubationszeit	Formulierung	Zellen/Well	A2780 sens EC ₅₀ [μM]	A2780 cis EC ₅₀ [μM]	R _f	
24 Stunden	cDDP	20000	16,41	74,97	4,57	
		40000	18,57	64,38	3,47	
	Holo-cDDP	20000	U: 10,71	U: 11,02	-	
		40000	U: 222,82	16,11	-	
	Alb-cDDP	20000	U:10,08	26,23	-	
		40000	66,2	3,93	0,06	
	mPEG-cDDP	20000	12,06	24,40	2,02	
		40000	U: 31,97	U: 16,11	-	
	48 Stunden	cDDP	20000	4,41	14,47	3,28
			40000	5,48	19,12	3,49
		Holo-cDDP	20000	7,89	8,28	1,05
			40000	13,31	16,29	1,22
Alb-cDDP		20000	8,00	13,06	1,63	
		40000	U: 10,51	13,40	-	
mPEG-cDDP		20000	4,50	8,32	1,85	
		40000	U: 10,07	11,44	-	
72 Stunden		cDDP	10000	3,34	13,19	3,95
			20000	3,00	13,36	4,46
		Holo-cDDP	10000	4,06	7,19	1,77
			20000	6,63	7,04	1,06
	Alb-cDDP	10000	4,27	6,92	1,62	
		20000	6,29	8,50	1,35	
	mPEG-cDDP	10000	5,75	6,25	1,09	
		20000	6,51	8,01	1,23	

Zu allen Zeitpunkten zeigte der freie Wirkstoff große Unterschiede in der Aktivität in sensitiven und resistenten Zellen. Die errechneten Resistenzfaktoren für den freien Wirkstoff lagen zwischen 3,28 und 4,57 und bestätigten die gefundenen Verhältnisse aus den Influx-Kinetiken (siehe Abb. 4.7 A). Ebenso geht aus diesen Daten zu allen Zeitpunkten der nivellierende Effekt der Liposomen in sensitiven und resistenten Zellen klar hervor (siehe Abb. 4.7 B & C). Liposomen zeigten vergleichbare Zytotoxizitäten in beiden Zelllinien. Die berechneten EC_{50} -Werte in resistenten Zellen wurden durch die liposomale Applikation des Wirkstoffes fast halbiert, während in den sensitiven Zellen die EC_{50} -Werte aller liposomalen Formulierungen durchgängig höher waren als die des freien Cisplatin.

Innerhalb der verschiedenen Liposomenpräparationen wurde ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Formulierungen gibt. Auch hier zeigte sich, dass die spezifisch targetierten Liposomen (Holo-cDDP) keinen überragenden Vorteil gegenüber den Vergleichsformulierungen (mPEG-cDDP, Alb-cDDP) aufwiesen. Vergleicht man die Resistenzfaktoren über die verschiedenen Zeitpunkte mit 20000 Zellen pro Well, ergab sich ein Vorteil der Holotransferrin-gekoppelten Liposomen gegenüber den Vergleichsformulierungen (siehe Tab. 4.3), da die berechneten R_f -Werte niedriger waren.

In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse der mit Holotransferrin targetierten Liposomen im Vergleich zum freien Wirkstoff nach 72 Stunden (exemplarisch) graphisch zusammengefasst.

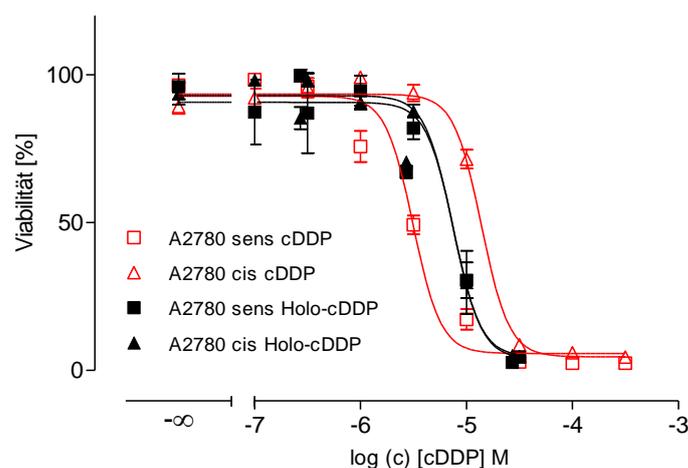


Abb. 4.10: Graphische Zusammenfassung (exemplarisch) der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Holotransferrin-gekoppelten Cisplatin-haltigen Liposomen in sensitiven und resistenten A2780-Zellen (20000 Zellen/Well) nach 72 Stunden.

Es wurde deutlich, dass die liposomale Formulierung die Resistenz in einem gewissen Maß umgeht, da die sigmoidale Kurve der Liposomenpräparation deutlich nach links in Richtung

der sensitiven Zellen verschoben ist. Es zeigte sich auch, dass die Liposomen offenbar von der Resistenz unabhängig aufgenommen werden und in der Zelle anders prozessiert werden müssen, da sich die Zytotoxizitäten der liposomalen Formulierungen deutlich von denen des freien Wirkstoffs in sensitiven und resistenten Zellen unterscheiden.

Betrachtet man die Ergebnisse unter dem Aspekt „Zellen pro Well“, kommt man zu dem Schluss, dass für die Zeitpunkte 48 bzw. 72 Stunden 20000 Zellen pro Well ideal waren, da sie sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden auswertbare und vergleichbare Ergebnisse lieferten.

Als problematisch erwies sich die Zytotoxizität nach 24 Stunden: Zwar konnte schon nach dieser kurzen Zeit eine Konzentrations-Effekt-Kurve für den freien Wirkstoff berechnet werden, jedoch waren die Daten für die Liposomen so gut wie nicht auswertbar. Die einzelnen EC_{50} -Werte unterschieden sich sehr stark von denen, die nach 48 bzw. 72 Stunden ermittelt wurden. Zumindest für den freien Wirkstoff konnte nach 24 Stunden ein mit dem nach 48 bzw. 72 Stunden vergleichbarer R_f -Wert ermittelt werden. Die 24 Stunden-Werte der liposomalen Versuchsreihen konnten durch das Programm GraphPad Prism[®] in den meisten Fällen nicht korrekt berechnet werden (in der Tab. 4.3 als „U = ungenau“ gekennzeichnet). Dies bedeutet, dass eine nicht-lineare Regression mit Anwendung der 4-Parameterlogistischen Gleichung nicht möglich war. Auch in diesen Versuchsreihen wurde versucht, eine Optimierung des Assays durch Variation der Zellzahl zu erreichen, jedoch ohne Erfolg. Die 24-Stunden-Ergebnisse zeigen somit die Grenzen der Durchführbarkeit des MTT-Assays nach einem so kurzen Zeitraum. Und obwohl die MTT-Daten der beiden anderen Zeitpunkte einen umfassenden Einblick in die zeitabhängige Zytotoxizität von Cisplatin-Formulierungen geben, konnte die These des Nutzens von Liposomen in resistenten Zellen in diesem sensiblen Zeitbereich der ersten 24 Stunden nicht adäquat ausgewertet werden.

ATP-Assay

Um einen besseren Einblick in die intrazellulären Prozesse in den ersten 24 Stunden zu bekommen, wurden ATP-Assays durchgeführt. Dabei wurde über die intrazellulären ATP-Niveaus der Zellen auf die Zellaktivität geschlossen.

Zunächst wurde ein Vorversuch mit freiem Cisplatin in einer Konzentration von 100 μ M analysiert. Die gewählte Konzentration liegt um ca. 15 μ M über der ermittelten EC_{50} der resistenten Zellen ($EC_{50} = 74,97$) und ca. 83 μ M über der EC_{50} der sensitiven Zellen ($EC_{50} = 16,41$) in der Zeitspanne 24 Stunden (siehe Tab. 4.3). Damit sollte eine resultierende Effekt-Kurve sichergestellt sein, da die Konzentration der Cisplatin-Exposition für beide Zelllinien in einem toxischen Bereich lag. Diese Annahme wurde durch den Vorversuch bestätigt (siehe

Abb. 4.11). Besonders drastisch ist dies in den sensitiven Zellen erkennbar. Nach einem leichten Anstieg des ATP-Gehalts in den ersten 8 Stunden, konnte nach 12 Stunden ein nahezu lineares Absterben der Zellpopulation beobachtet werden. In den resistenten Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch fehlte ein erkennbarer Anstieg des ATP-Niveaus in den ersten 8 Stunden. Nach 12 Stunden wurde ebenfalls ein Absterben der Zellen beobachtet, allerdings trat es etwas verzögert auf und führte nicht zur Apoptose der Zellen, sondern lediglich zu einer deutlichen Reduktion der ATP-Level in den Zellen.

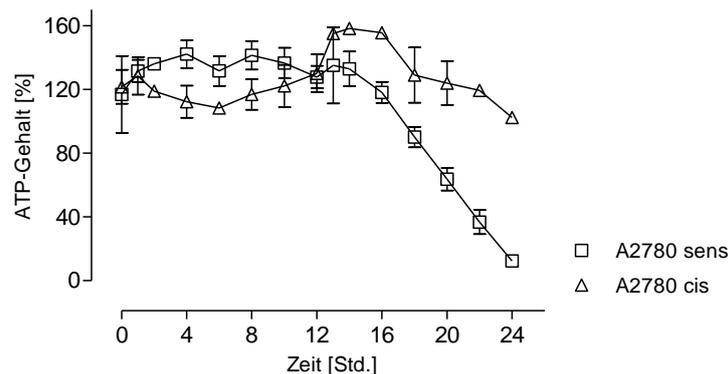


Abb. 4.11: Vorversuch zur Kinetik des intrazellulären ATP-Gehalts [%]. Inkubation der Zellen mit 100 μM Cisplatin (freier Wirkstoff) in einer Zeitspanne von 24 Stunden in sensitiven und resistenten Zellen.

Um in Analogie zu der zuvor beschriebenen intrazellulären Platin-Akkumulation (siehe Kapitel 4.1.4) zu arbeiten, wurde für alle weiteren Versuche eine Konzentration von 20 μM Cisplatin gewählt. Diese Konzentration liegt in den sensitiven Zellen leicht über dem gefundenen EC_{50} -Wert und in den resistenten Zellen deutlich unter diesem (siehe Tab. 4.3).

Die Analyse der Versuche ergab, dass sich die Kinetiken der ATP-Level durch die Platin-Exposition in den sensitiven sehr von den resistenten Zellen unterschieden (siehe Abb. 4.12 A). Mit freiem Cisplatin nahm in den sensitiven Zellen der Gehalt an ATP in den ersten 10 Stunden leicht zu, bevor eine stetige Abnahme der ATP-Level beobachtet werden konnte. Dies könnte eine Gegenregulation der sensitiven Zellen sein, welche sich in einem erhöhten ATP-Niveau zeigt. Die Expressionsdaten von ATP7A & B (siehe Abb. 4.4 & 4.5) bestärken diese Schlussfolgerung, da die sensitiven Zellen mit einer signifikanten Steigerung der Expression nach Exposition mit 5 μM Cisplatin über 24 Stunden reagierten.

In den resistenten Zellen fehlte die Steigerung der ATP-Level in den ersten 10 Stunden, stattdessen war ein Plateau des Gehalts zu beobachten. Nach diesem Zeitraum war eine wesentlich schwächere Abnahme der ATP-Level erkennbar. Nach 18 Stunden überstiegen die ATP-Level der resistenten Zellen die der sensitiven.

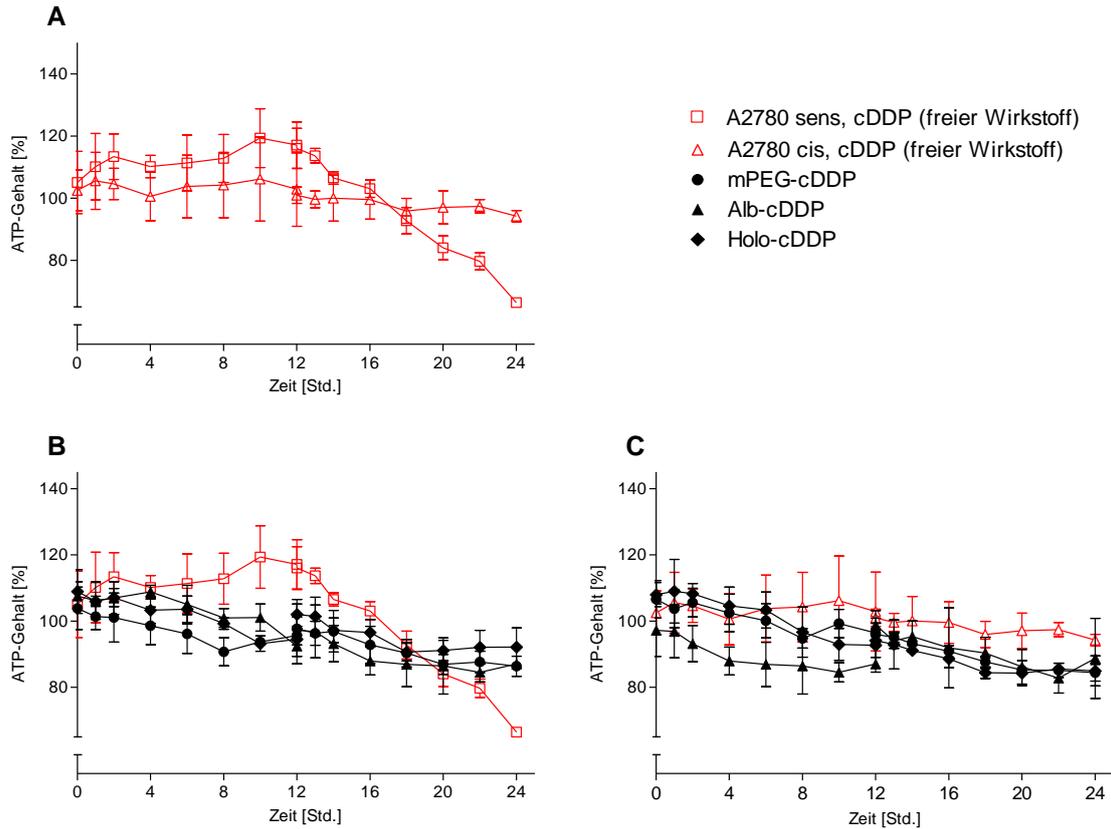


Abb. 4.12: Kinetik des intrazellulären ATP-Gehalts [%] über 24 Stunden. A: Vergleich der ATP-Kinetik in sensitiven und resistenten Zellen über 24 Stunden unter Einfluss von 20 μM Cisplatin (freier Wirkstoff). **B:** Vergleich des freien Wirkstoffes mit liposomalem Cisplatin (20 μM Cisplatin) in sensitiven Zellen und **C:** resistenten Zellen.

Vergleicht man die ATP-Kinetiken der liposomalen Cisplatin-haltigen Formulierungen mit denen des freien Wirkstoffs, so zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wie es auch schon in den Versuchen zur intrazellulären Platin-Akkumulation (siehe Kapitel 4.1.4) beobachtet werden konnte:

Beim Vergleich der beiden Zelllinien wiesen die Liposomen einen nivellierenden Effekt auf. Dies war in der sensitiven Zelllinie dadurch gekennzeichnet, dass ein Anstieg des Gehalts an ATP ausblieb und der Kinetikverlauf dem des freien Wirkstoffs in resistenten Zellen ähnelte. So überstiegen die Werte der ATP-Level der Liposomen ab 20 Stunden die des freien Wirkstoffs in den sensitiven Zellen (siehe Abb. 4.12 B). In den resistenten Zellen zeigten alle liposomalen Cisplatin-haltigen Formulierungen einen analogen Verlauf zum freien Wirkstoff, jedoch blieben die ATP-Niveaus unter denen des freien Wirkstoffs (siehe Abb. 4.12 C). Betrachtet man neben der ATP-Kinetik den Gehalt an ATP in unbehandelten Zellen, so stellte sich heraus, dass die resistenten Zellen ($0,0041 \pm 0,0013$ [nmol/ μg]) signifikant mehr ATP enthielten als die sensitiven Zellen ($0,0034 \pm 0,0011$ [nmol/ μg]) (siehe Abb. 4.13).

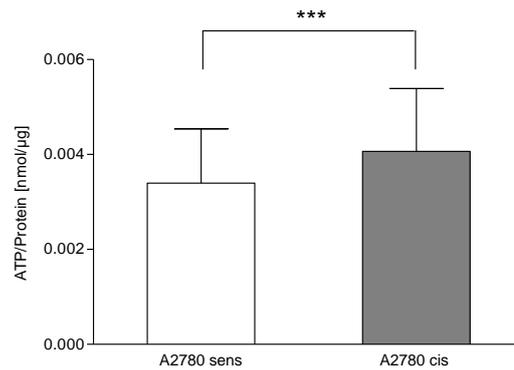


Abb. 4.13: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] in unbehandelten Zellen (20000 Zellen/Well), $n = 26 \pm SD$.

4.1.6 DNA-Platinierung

Um die analysierten Daten aus intrazellulärer Platin-Akkumulation und der Zytotoxizität der Cisplatin-haltigen Liposomen im Vergleich zum freien Wirkstoff besser einordnen zu können, wurde die DNA-Platinierung in beiden Zelllinien bestimmt. Damit eine Vergleichbarkeit zur intrazellulären Platin-Akkumulation gegeben war, wurde mit derselben Wirkstoffkonzentration des Cisplatin bzw. der Cisplatin-haltigen Liposomen (20 μM Cisplatin) gearbeitet.

Bestimmt wurde die gesamte DNA der Zellen. Es wurde nicht in DNA des Nukleus und der Mitochondrien unterschieden. Die Analyse wurde mittels ICP-MS von Herrn Dennis Alex aus dem Arbeitskreis von Herrn Dr. Ralf A. Hilger in Essen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (4, 8, 12 und 24 Stunden) durchgeführt, um den Fortschritt der DNA-Platinierung besser verfolgen zu können.

Betrachtet man die DNA-Platinierung in sensitiven Zellen mit freiem Wirkstoff in den ersten 12 Stunden, so war klar erkennbar, dass zum einen die Platinierung der gesamten DNA nach Inkubation mit freiem Wirkstoff zu allen Zeitpunkten über der nach Inkubation mit liposomalem Wirkstoff lag. Zum anderen wurde ein Plateau der Platinierung ($\sim 29 \text{ ng}/\mu\text{g}$) bereits nach 8 Stunden erreicht (siehe Abb. 4.14 **A**). Analog zum freien Wirkstoff erreichte nach 8 und 12 Stunden auch die DNA-Platinierung mit liposomalem Cisplatin ein Plateau, jedoch im Ausmaß um ein Drittel niedriger als beim freien Wirkstoff.

In den resistenten Zellen zeigte sich ein gegensätzliches Bild (siehe Abb. 4.14 **B**): Dort lag die DNA-Platinierung des liposomalen Wirkstoffs immer etwas über der des freien Wirkstoffs, die wiederum hier deutlich geringer ausgeprägt war als in sensitiven Zellen. Die Platinierung, die durch den freien Wirkstoff in resistenten Zellen hervorgerufen wurde, zeichnete sich durch

einen stetigen Anstieg über die Zeit aus. Im Gegensatz hierzu erreichte die Platinierung durch den liposomalen Wirkstoff bereits nach 8 Stunden ein Plateau.

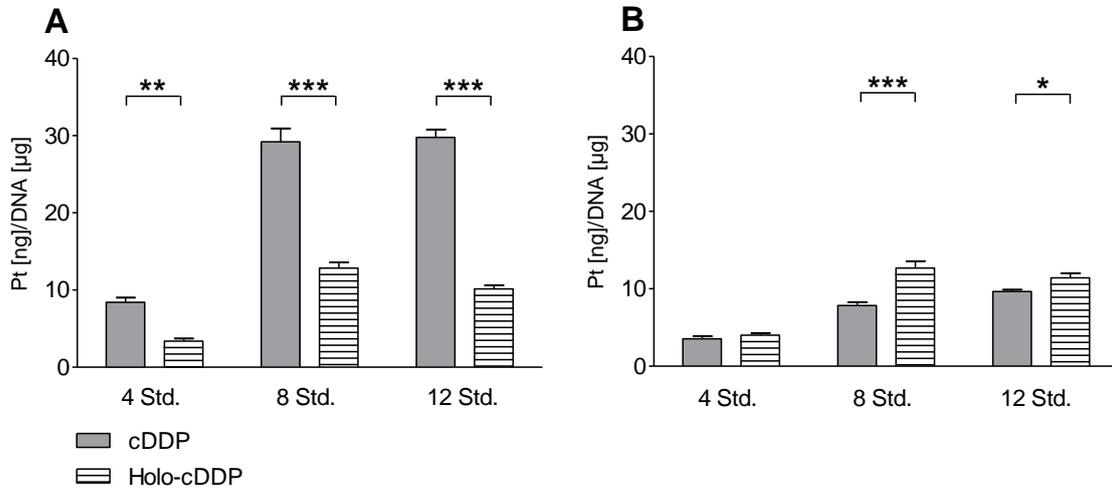


Abb. 4.14: Platinierung der gesamten DNA nach 4, 8 und 12 Stunden.

A: A2780 sens, **B:** A2780 cis. Die Zellen wurden mit 20 µM Cisplatin oder mit 20 µM Holotransferrin-gekoppelten Cisplatin-haltigen Liposomen inkubiert.

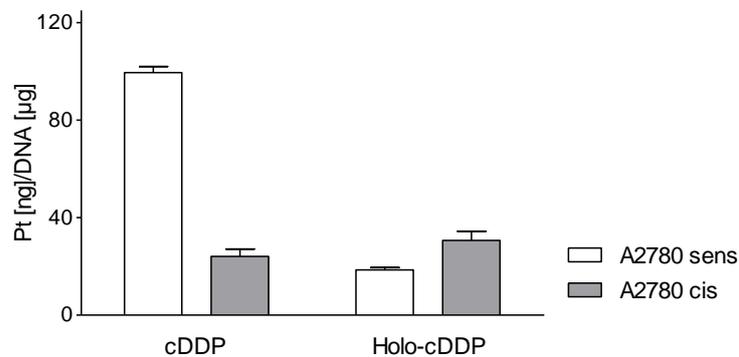


Abb. 4.15: Platinierung der gesamten DNA nach 24 Stunden. Zellen wurden mit 20 µM Cisplatin oder mit 20 µM Holotransferrin-gekoppelten Cisplatin-haltigen Liposomen inkubiert.

Vergleicht man die Platinierung durch liposomales Cisplatin in sensitiven und resistenten Zellen über 12 Stunden, so erkennt man einen nahezu identischen Verlauf. Dies lässt darauf schließen, dass die Liposomen in der Zelle unabhängig von der Resistenz prozessiert werden.

Betrachtet man nun abschließend die Platinierung der gesamten DNA nach 24 Stunden, werden die Unterschiede markant (siehe Abb. 4.15). In der sensitiven Zelllinie ist die Pla-

tinierung der DNA mit freiem Wirkstoff fünfmal so hoch wie in der resistenten. Auch hier zeigte sich erneut, dass die Liposomen in resistenten und sensitiven Zellen einen ähnlichen Effekt auslösen und die Platinierung in beiden Zelllinien vergleichbar auf einem ähnlichen Niveau lag. Dabei lag die Platinierung der DNA in resistenten Zellen, die durch Cisplatin-haltige Liposomen hervorgerufen wurde, nur leicht über der des freien Wirkstoffs.

Fazit dieser Ergebnisse ist, dass die in resistenten Zellen gegenüber sensitiven Zellen deutlich geringere DNA-Platinierung mit freiem Cisplatin sich bei liposomalem Cisplatin so nicht wiederfindet. Die liposomale Formulierung scheint hier die DNA-Platinierung in resistenten bzw. sensitiven Zellen auf niedrigem Niveau zu nivellieren. Bemerkenswert hierbei ist, dass die DNA-Platinierung in resistenten Zellen mit liposomalem Cisplatin nur marginal höher ist als in sensitiven Zellen. Die Tatsache, dass, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, die Zytotoxizität in resistenten Zellen durch die liposomale Formulierung erhöht werden konnte, offenbar aber das Ausmaß der DNA-Platinierung gegenüber freiem Cisplatin unverändert bleibt, deutet darauf hin, dass liposomales Cisplatin in den Zellen möglicherweise andere Signaltransduktionswege adressiert und somit die Wirksamkeit nicht alleine auf einen DNA-schädigenden Effekt reduzierbar ist.

4.1.7 Microarray - ein Ausblick

Da die Liposomen einen neuen Blickwinkel auf die Überwindung von Cisplatin-Resistenz geben, wurde in einem abschließenden Projekt ein Microarray geplant und durchgeführt (siehe Kapitel 3.12).

Liposomales Cisplatin wird im Vergleich zum freien Wirkstoff intrazellulär anders prozessiert. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Ergebnisse aus den zuvor diskutierten Kapiteln betrachtet. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit nur auf die Ergebnisse für die resistente Ovarialkarzinom-Zelllinie eingegangen, auch wenn der Microarray wesentlich umfassender angelegt war (siehe Kapitel 3.12).

Die verschiedenen Analysen der Daten wurden mittels MetaCor™ (GeneGo, Carlsbad, CA, USA) von Herrn Dr. Martin Koch aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese durchgeführt [174]. In einer Genanalyse, in der die Genexpressionsmuster sensitiver und resistenter A2780-Zellen verglichen wurden, wurde für resistente Zellen eine erhöhte Expressionsrate von Genen für verschiedene Histone und von Histon-modifizierenden Genen und Sirtuinen gefunden (siehe Tabelle 4.4).

Diese Analyse zeigt eindeutig, dass in den resistenten Zellen die transkriptionelle Reprogrammierung Teil der Resistenz ist. Hinzu kommt, dass die Klasse der Sirtuine ebenfalls induziert ist. Diese werden verantwortlich gemacht für die intrazelluläre Stressantwort und den Ener-

giemetabolismus. Beides wird ebenfalls in Verbindung mit Resistenz gebracht [175, 176].

Tab. 4.4: Gene, die im GeneGo Prozessnetzwerk „Transkription und Chromatin Modifikation“ in der Zelllinie A2780 cis induziert sind [142].

Gene symbol	RefSeq ID	Gene name
CHAF1B	NM_005441	Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
H3F3A	NM_002107	H3 histone, family 3A
HDAC7	NM_015401	Histone deacetylase 7, transcript variant 1
HDAC7	NM_001098416	Histone deacetylase 7, transcript variant 4
HIST1H4B	NM_003544	Histone 1, H4b
HIST1H4C	NM_003542	H4 histone family, member G
HIST1H4D	NM_003539	Histone 1, H4d
HIST1H4L	NM_003546	H4 histone family, member K
HIST2H2AC	NM_003517	H2A histone family, member Q
HIST3H3	NM_003493	H3 histone family, member T
KAT2A	NM_021078	K(lysine) acetyltransferase 2A
RBBP7	NM_002893	Retinoblastoma binding protein 7
SATB1	NM_002971	SATB homeobox 1
SETDB1	NM_012432	SET domain, bifurcated 1
SIRT1	NM_012238	Sirtuin 1
SIRT3	NM_012239	Sirtuin 3
SIRT7	NM_016538	Sirtuin 7
SMARCA4	NM_001128844	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
SMARCC2	NM_003075	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
SMARCD3	NM_003078	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3
SMYD3	NM_022743	SET and MYND domain containing 3
TADA3	NM_006354	Transcriptional adaptor 3

Aus der Literatur ist bekannt, dass der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) Cisplatin-resistente Zellen für Cisplatin sensitivieren kann, da TSA intrazelluläre Faktoren aktiviert, die pro-apoptotisch und in den intrinsischen (mitochondrialen) Apoptose-Signalweg involviert sind [168]. TSA ist ein HDAC-Inhibitor, der spezifisch die Klassen I, IIa, IIb und IV hemmt [177, 178].

Ausgehend von dieser Recherche wurden MTT-Assays mit TSA und Cisplatin bzw. mit liposomalem Cisplatin durchgeführt, um den Einfluss von TSA auf das Zellsystem zu prüfen und einen weiteren möglichen Erklärungsansatz zur Cisplatin-Resistenz der Ovarialkarzinom-Zellen zu finden (siehe Tab. 4.5). Dabei konnten die Aussagen von MUSCOLINI *et. al.* bestätigt werden [168]: TSA steigerte die Wirksamkeit von freiem Cisplatin in sensitiven und resistenten Zellen. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Einfluss von TSA auf die Wirksamkeit

der liposomalen Formulierung.

Tab. 4.5: Zytotoxizitätsstudien mit Cisplatin und Holotransferrin-gekoppelten Cisplatin-haltigen Liposomen mit und ohne TSA-Zusatz. Es wurden 20000 Zellen/Well ausgesät, 2 Stunden mit TSA vorinkubiert und nach 72 Stunden mittels MTT-Assay analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-6 unabhängigen Versuchen (in Triplikaten) \pm SD [142].

Formulierung	A2780 sens EC ₅₀ [μ M]	A2780 cis EC ₅₀ [μ M]
cDDP	4,53 \pm 1,19	10,95 \pm 1,11
cDDP + TSA	2,07 \pm 0,65	8,05 \pm 4,73
cDDP-Holo	4,97 \pm 1,15	4,09 \pm 0,10
cDDP-Holo + TSA	3,92 \pm 0,57	4,24 \pm 1,32

Diese Daten belegen, dass zum einen die Resistenz der Ovarialkarzinom-Zellen im Wesentlichen nicht von Histondeacetylasen kontrolliert wird. Zum anderen wurde erneut aufgezeigt, dass Cisplatin-haltige Liposomen in der Zelle anders verstoffwechselt werden als der freie Wirkstoff.

Ausgehend von diesen Aussagen wurden weiterführende Analysen von Herrn Dr. Koch durchgeführt, die die Unterschiede in der Exposition zwischen freiem und liposomalem Cisplatin in resistenten Zellen besser aufarbeiten sollten. Dabei wurden, um schlüssige Aussagen treffen zu können, die Datensätze aus der Behandlung der Zellen mit Referenzliposomen ebenfalls ausgewertet (Ergebnisse nicht dargestellt). In Abbildung 4.16 sind die induzierten Prozessnetzwerke aus der Analyse von freiem und liposomalem Cisplatin gegenübergestellt. Die funktionelle Zusammenfassung der Signaltransduktionswege beweist eindrucksvoll, dass durch liposomales Cisplatin im Vergleich mit freiem Cisplatin nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Funktionswege unterschiedlich reguliert werden. So werden z. B. vor allem die Prozessnetzwerke "Transcription Chromatin modification" und "Apoptosis Apoptotic nucleus" hochreguliert (siehe Abbildung 4.16 **B**). Sie belegen, dass Cisplatin-haltige Liposomen mehr sind als Arzneistoff-Vehikel, da sie offenbar andere Signalwege induzieren als der freie Wirkstoff.

Bezugnehmend auf die Resistenz lässt sich zusammenfassend darlegen, dass der freie Wirkstoff vor allem Gene induziert, die in den intrinsischen (mitochondrialen) Signaltransduktionsweg involviert sind. Diese umfassen Bax, Bid und Casp9, um nur einige zu nennen. Im Gegensatz dazu induziert der liposomale Wirkstoff insbesondere Gene des extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) Signaltransduktionswegs, wie TNFRSF20B-DR6, c-FLIP-L und CD70-TNFSF7 [142].

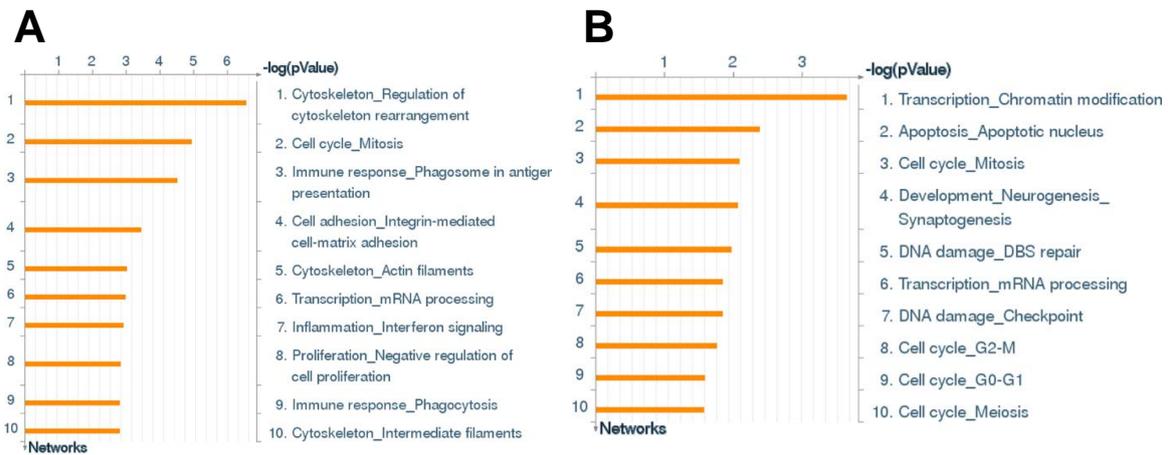


Abb. 4.16: Signifikante induzierte GeneGO Prozessnetzwerke in resistenten Ovarialkarzinom-Zellen. A: A2780 cis nach Inkubation mit freiem Cisplatin. **B:** A2780 cis nach Inkubation mit Cisplatin-haltigen Holotransferrin-gekoppelten Liposomen. Die Zellen wurden mit der jeweiligen EC_{50} über 72 Stunden inkubiert [142].

Die Daten legen außerdem nahe, dass freies cDDP mit oxidativem Stress in Verbindung stehende Gene induziert, während diese Gene unter Exposition mit liposomalem Cisplatin nicht hochreguliert waren. Da oxidativer Stress mit einer Reihe von Nebenwirkungen von Cisplatin, wie Ototoxizität, peripherer Neuropathie, Neurotoxizität und Nierentoxizität in Verbindung gebracht wird [179], könnte eine mögliche Behandlung mit liposomalem Cisplatin gegebenenfalls mit einer geringeren Toxizität einhergehen, wie es auch schon für Doxorubicin-haltige Liposomen, die eine deutlich geringere Kardiotoxizität aufweisen, beschrieben wurde [136]. Aufbauend auf der detaillierten Auswertung der erhobenen Microarray-Daten wird eine tiefere Analyse der durch liposomales Cisplatin induzierten, in den extrinsischen apoptotischen Signaltransduktionsweg involvierten Gene in resistenten Zellen durch systematische Untersuchungen auf Proteinebene durch Herrn Daniel Stölting (Dissertation in Vorbereitung) in unserem Arbeitskreis weitergeführt [152, 153].

4.2 Liposomales Doxorubicin

Wie schon der Vergleich von freiem Cisplatin zu Cisplatin-haltigen Liposomen in sensitiven und resistenten Ovarialkarzinom-Zellen gezeigt hat, besitzen Liposomen ein gegenüber dem freien Wirkstoff verändertes Aufnahme-Profil und entsprechend auch eine andere Toxizität in den Zellen.

Da die Effluxpumpe P-gp verantwortlich für die Resistenz von Krebszellen gegen Doxorubicin ist (siehe Kapitel 2.1.4), sollen in diesem Kapitel die schon beschriebenen Ergebnisse der intrazellulären Wirkstoffakkumulation und der Zytotoxizität aus dem vorherigen Kapitel auf eine mögliche Umgehung der Rezeptor-vermittelten Resistenz in Doxorubicin-resistenten Zellen (A2780 adr) mit liposomalem Doxorubicin untersucht werden.

Aus diesem Grund wurde ebenfalls ein korrespondierendes Zelllinienpaar (A2780 sens vs. A2780 adr) verwendet. Auch hier wurden zunächst wirkstofffreie Liposomen markiert und charakterisiert, um Wechselwirkungen mit dem Zellsystem zu untersuchen. Daran schlossen sich Zellversuche mit Wirkstoff-haltigen, kommerziell erhältlichen Doxorubicin-haltigen Liposomen des Arzneimittels Caelyx[®] an, die mittels Post-Insertionstechnik nachträglich funktionalisiert wurden, um eine mögliche Umgehung der Resistenz mittels targetierter Caelyx[®]-Liposomen zu untersuchen.

4.2.1 Liposomencharakterisierung

Um die kommerziell erhältlichen Caelyx[®]-Liposomen zu charakterisieren, wurden zunächst wirkstofffreie Liposomen, mit einer Caelyx[®] entsprechenden Lipid-Zusammensetzung (siehe Tab. 3.7 in Kapitel 3.3.5) mittels Hydratationsmethode (konventionell) hergestellt und durch Extrusion homogenisiert (siehe Kapitel 3.3). Die so hergestellten Liposomen waren 30 bis 40 nm größer als Caelyx[®]-Liposomen und wiesen eine kleinere Partikelgrößen-Streuung auf (siehe Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Partikelgröße der Referenzliposomen im Vergleich zu Caelyx[®]. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

	Partikelgröße [nm]	PI
Holo	112,4 \pm 1,6	0,099 \pm 0,005
Alb	116,1 \pm 3,4	0,133 \pm 0,075
mPEG	117,2 \pm 9,5	0,092 \pm 0,122
Caelyx [®]	80,4 \pm 3,3	0,165 \pm 0,066

Diese Liposomen wurden mit Albumin oder Holotransferrin funktionalisiert. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Kopplungstechniken:

Zum einen wurde die konventionelle Kopplung (siehe Kapitel 3.3.6), wie sie auch für Cisplatin-haltige Liposomen verwendet wurde, zum anderen die Post-Insertionstechnik (PIT) angewendet (siehe Kapitel 3.3.7). Mit dieser Technik können Liposomen nachträglich funktionalisiert werden. Dazu wurden zunächst Mizellen aus dem Cyanur-Anker-Lipid hergestellt und an diesen Anker dann die gewünschten Proteine gekoppelt. Danach wurden die funktionalisierten Mizellen mit den Liposomen im Wasserbad bei 55°C für 30 Minuten inkubiert, um eine Fusion der Mizellen mit den Liposomen (Postinsertion) zu ermöglichen. Die Temperatur des Wasserbades wurde entsprechend der verwendeten Lipide gewählt (genaue Zusammensetzung der in Caelyx[®] enthaltenen Lipide siehe Tab. 3.7 in Kapitel 3.3.5). In einem abschließenden Schritt wurden die so funktionalisierten Liposomen mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt, um nicht-fusionierte Mizellen und ungekoppeltes Protein abzutrennen. Mittels SDS-Page wurde die erfolgreiche Funktionalisierung nachgewiesen (siehe Abb. 4.17). Dabei wurden konventionell hergestellte Liposomen mit gekoppelten Mizellen und Liposomen, die mittels PIT funktionalisiert wurden, verglichen.

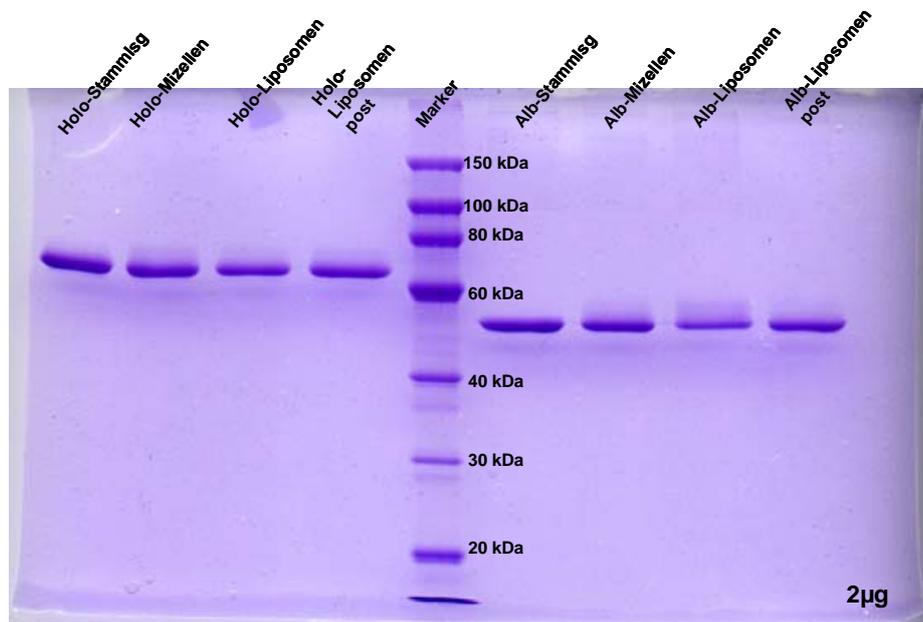


Abb. 4.17: Nachweis der Funktionalisierung der Liposomen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page). Verglichen wurden die Protein-Stammlesung, die gekoppelten Mizellen und die mittels PIT funktionalisierten Liposomen („Holo-Liposomen post“ bzw. „Alb-Liposomen post“) mit konventionell hergestellten gekoppelten Liposomen („Holo-Liposomen“ bzw. „Alb-Liposomen“) [180].

Das semiquantitative Verfahren der SDS-Page zeigte äquivalente Banden der verschiedenen Ansätze, sowohl für Albumin als auch für Holotransferrin. Damit ist eine erfolgreiche Funktionalisierung der Caelyx[®]-Liposomen mittels PIT für weiterführende Versuche im Zellsystem gewährleistet.

4.2.2 Bindungsstudien

Die hergestellten Wirkstoff-freien, DiO-markierten Liposomen wurden fluorimetrisch auf ihre Bindungsfähigkeit im gewählten Zellsystem untersucht. Es wurden konventionell funktionalisierte Liposomen mit Liposomen, die mittels PIT funktionalisiert wurden, verglichen (siehe Abb 4.18). Die Messungen erfolgten im Fluorimeter FLUOstar OPTIMA.

Der von HAMELERS *et al.* beschriebene Caveolin-vermittelte Endozytoseweg für die Cisplatin-resistente Karzinomzelllinie A2780 ist ebenso auf die Doxorubicin-resistente Zelllinie A2780adr übertragbar, da beide resistenten Zelllinien ausgehend von der sensitiven Zelllinie gezüchtet wurden (siehe Kapitel 3.5.1) [173].

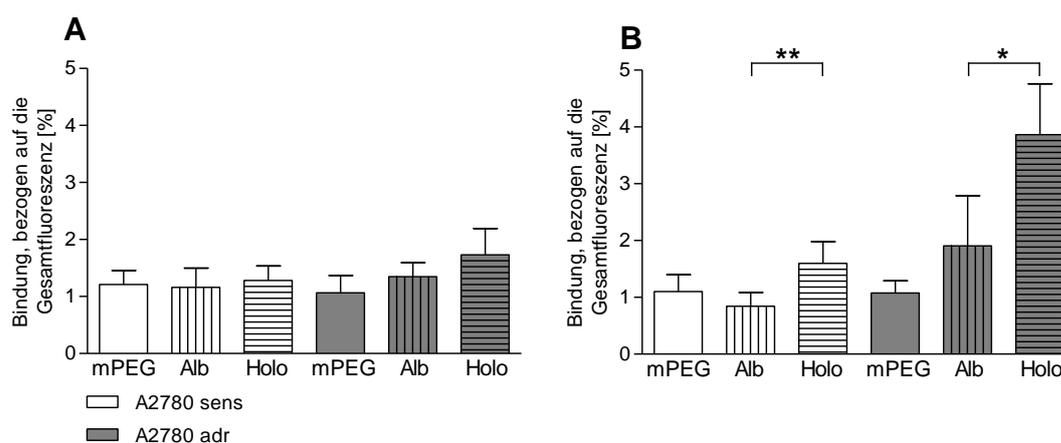


Abb. 4.18: Bindung von unterschiedlich targetierten DIO-markierten Liposomen an A2780-Zellen. A: Konventionell targetierte Liposomen, **B:** Liposomen, die mittels PIT funktionalisiert wurden. Die Zellen wurden für 90 Min. bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Die Versuche ergaben, dass eine prinzipielle Bindungsfähigkeit aller Liposomen-Ansätze an das Zellsystem gegeben ist. Wie auch schon in Kapitel 4.1.2 für fluide Liposomen gezeigt werden konnte, ergaben sich in diesen Versuchen mit den rigiden konventionell gekoppelten Liposomen keine signifikanten Unterschiede in Targetierung und Bindung, sowohl für die sensitiven als auch für die resistenten Zellen (siehe Abb. 4.18 A). In resistenten Zellen

war eine tendenziell bessere Bindung der Holotransferrin-gekoppelten Liposomen erkennbar, jedoch ohne Signifikanz im Sinne einer Spezifizierung durch Holotransferrin-gekoppelte Liposomen.

Für die PIT-funktionalisierten Liposomen ergaben sich deutliche Unterschiede (siehe Abbildung 4.18 **B**). Vergleicht man die prozentuale Bindung der Liposomen in sensitiven Zellen, so verbesserte sich die Bindung durch die Targetierung mit Holotransferrin signifikant gegenüber der Targetierung mit Albumin. In den Doxorubicin-resistenten Zellen waren die Unterschiede noch ausgeprägter.

Es konnte nicht geklärt werden, warum die PIT-funktionalisierten Liposomen im Zellsystem ein so unterschiedliches Ergebnis aufwiesen, wohingegen die Charakterisierung der Liposomen ein ähnliches Ergebnis beider Arten der Targetierung erbrachte (siehe Kapitel 4.2.1).

Trotz dieser ambivalenten Ergebnisse der Bindungsstudien war bei beiden Techniken eine mehr oder weniger ausgeprägte spezifischere Bindung der Holotransferrin-gekoppelten Liposomen erkennbar, was die Grundlage für die weitere Verwendung dieser Liposomen darstellte.

4.2.3 Expressionsstudien

Zur Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden diese auf die Expression der für die vorliegende Arbeit interessanten Rezeptoren untersucht. Zum Vergleich wurde neben Doxorubicin-resistenten (*adr*) A2780-Zellen auch mit sensitiven (*sens*) und Cisplatin-resistenten (*cis*) A2780-Zellen gearbeitet.

Expression von P-Glykoprotein

Bei P-gp handelt es sich um eine membranständige Efflux-Pumpe, die in Doxorubicin-resistenten Zellen überexprimiert wird (siehe Kapitel 2.1.4). Um den Expressions-Status von P-gp auf den Ovarialkarzinom-Zelllinien zu prüfen, wurden mit Hilfe eines FITC-markierten P-gp-spezifischen Antikörpers durchflusszytometrische Versuche durchgeführt.

Abbildung 4.19 zeigt, dass sensitive und Cisplatin-resistente Zellen kein P-gp exprimieren. Hingegen ist eine deutliche Expression von P-gp auf den Doxorubicin-resistenten Zellen zu erkennen.

Da die Doxorubicin-resistenten Zellen relativ schnell ihre Resistenz verlieren bzw. bei Inkulturnahme einen relativ geringen Resistenzgrad aufwiesen, wurden die Zellen nach einem bestimmten Schema mit steigenden Doxorubicin-Konzentrationen gestresst (siehe Kapitel 3.5.1 **adr**). Wie zu erwarten war, rief eine Exposition gegenüber Doxorubicin in den Doxorubicin-resistenten-Zellen eine signifikante Steigerung der Expression von P-gp hervor.

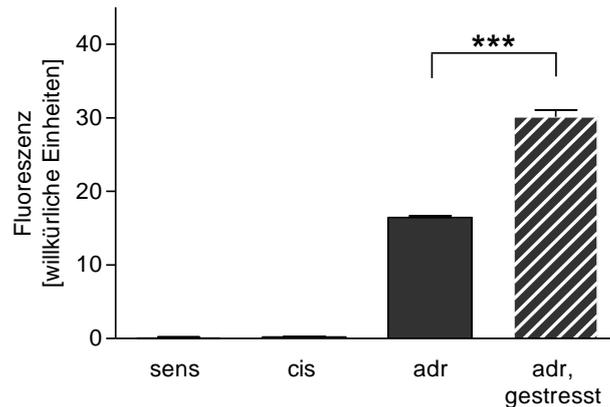


Abb. 4.19: Expression von P-gp in A2780-Zellen. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte Expression von P-gp in sensitiven (sens), Cisplatin (cis)- und Doxorubicin (adr)-resistenten A2780-Zellen und einer Charge Doxorubicin (adr)-resistenter A2780-Zellen mit einer zusätzlichen Doxorubicin-Vorbehandlung (siehe Kapitel 3.5.1 **adr**).

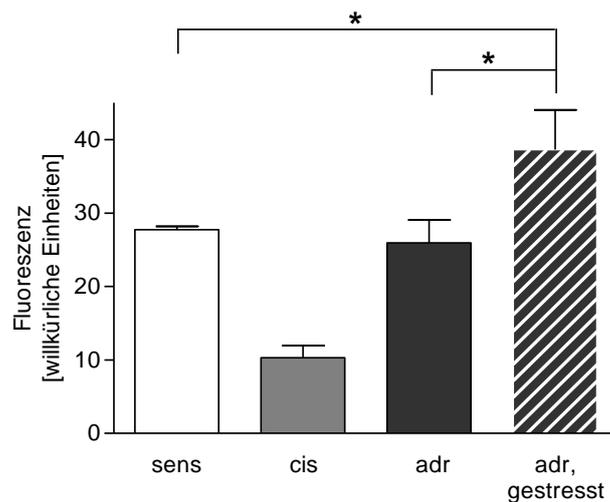


Abb. 4.20: Expression von TfR in A2780-Zellen. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte Expression von TfR in sensitiven (sens), Cisplatin (cis)- und Doxorubicin (adr)-resistenten A2780-Zellen und einer Charge Doxorubicin (adr)-resistenter A2780-Zellen mit einer zusätzlichen Doxorubicin-Vorbehandlung (siehe Kapitel 3.5.1 **adr**).

Expression des Transferrin-Rezeptors

In Kapitel 4.1.3 wurde für Cisplatin-resistente und sensitive Zellen die induzierbare Expression des TfR beschrieben. Da die Doxorubicin-resistente A2780-Zelllinie durch chronische Exposition mit Doxorubicin aus der sensitiven Zelllinie gezüchtet wurde, wurde nun in einer weiteren Analyse für alle Varianten der Ovarialkarzinom-Zelllinien der jeweilige Expressions-

Status durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass alle drei Zelllinien TfR exprimieren (siehe Abb. 4.20), wobei das Expressions-Niveau der Doxorubicin-resistenten Zellen im Bereich der sensitiven Zellen lag.

Überraschenderweise reagierten die Doxorubicin-resistenten Zellen bei Exposition mit Doxorubicin mit einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate von TfR. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die Targetierung des TfR von Vorteil, da er im Vergleich zu den sensitiven Zellen überexprimiert ist.

4.2.4 Intrazelluläre Doxorubicin-Akkumulation

Kinetik der intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation

Die intrazelluläre Akkumulation von Wirkstoffen in Zellen ist das zeitabhängige Ergebnis aus Influx und Efflux. Wie schon im vorherigen Kapitel analysiert, verfügen die ausgewählten Zelllinien über ideale Bedingungen, um eine Doxorubicin-Akkumulation in den Zellen zu untersuchen, da auf den sensitiven Ovarialkarzinom-Zellen kein P-gp exprimiert wird und im Gegensatz dazu die Doxorubicin-resistente Zelllinie P-gp überexprimiert. Daher wurde in einer ersten Versuchsreihe eine Influx-Kinetik von Doxorubicin über 4 Stunden aufgenommen (siehe Abb. 4.21).

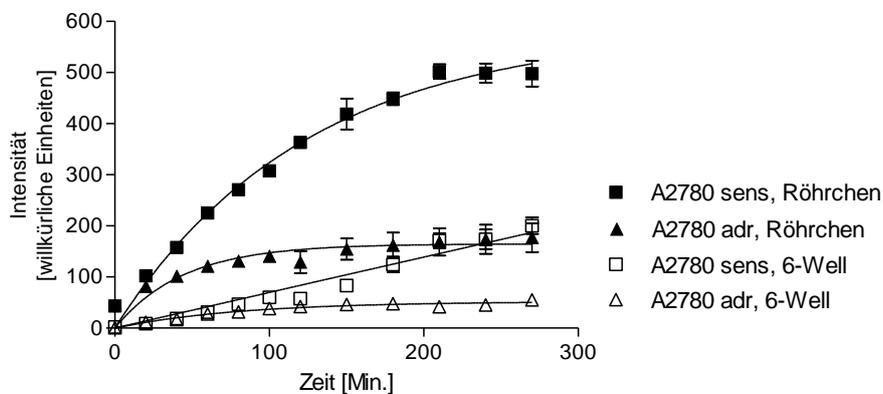


Abb. 4.21: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Influx-Kinetik mittels Durchflusszytometrie von Doxorubicin in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit 3 μM Doxorubicin inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte alle 20 Minuten entweder kontinuierlich aus einer Zellsuspension (Röhrcchen) oder durch Präparation einer 6-Well-Platte.

Aufgrund der Eigenfluoreszenz von Doxorubicin konnte die Kinetik direkt durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die technische Durchführung wurde auf zweierlei Art realisiert (siehe Kapitel 3.6.4). Zum einen wurden die Zellen nach Ablösung aus den Kulturschalen

in Phenolrot-freiem Medium suspendiert. Diese Suspension wurde dann mit 3 μM Doxorubicin beimpft und über den Versuchszeitraum unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte kontinuierlich direkt aus der Suspension.

Da die verwendeten Ovarialkarzinom-Zellen physiologisch adhärent kultiviert werden, wurden zum anderen Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit Doxorubicin inkubiert. Für die Probenentnahme zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen aus den 6-Well-Platten abgelöst und präpariert.

In Abbildung 4.21 sind eindeutig die Kinetiken entsprechend den beiden Verfahren erkennbar. Die Kinetiken, die kontinuierlich aus der Zellsuspension verfolgt wurden, zeigten deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten als die der adhärent kultivierten Zellen. Vergleicht man resistente mit sensitiven Zellen, ergab sich bereits nach einer Stunde in den resistenten Zellen ein Plateau der Fluoreszenzwerte, während in den sensitiven Zellen die Fluoreszenzintensitäten kontinuierlich zunahmten und innerhalb der 4 Stunden kein Plateau erreicht wurde. Diese evidenten Unterschiede lassen sich sehr gut mit der Aktivität von P-gp erklären. Sensitive Zellen exprimieren kein P-gp, daher akkumuliert Doxorubicin kontinuierlich in den Zellen. In resistenten Zellen ist P-gp überexprimiert. Bei Exposition mit Doxorubicin wird diese Efflux-Pumpe aktiv und wirkt dem Influx entgegen. Somit stellt sich in den resistenten Zellen ein Gleichgewicht aus Influx und Efflux von Doxorubicin ein, welches durch gleichbleibende Fluoreszenzintensitäten nach einer Stunde gekennzeichnet ist.

Die Kinetiken aus den adhärent kultivierten Zellen zeigten ein ähnliches Bild, jedoch mit deutlich geringeren Fluoreszenzintensitäten. Dies ist mit dem unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärbar. Die Zellen, die in 6-Well-Platten vorbereitet wurden, wiesen eine, trotz Exposition mit Doxorubicin, gute Vitalität auf. Erst nach Ablauf der entsprechenden Versuchszeitpunkte wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.6.4).

Doxorubicin gelangt über passive Diffusion in die Zellen. Bei adhärent wachsenden Zellen im Vergleich zu Zellen in Suspension kann Doxorubicin nur durch einen Teil der Membranoberfläche diffundieren. Um A2780-Zellen zu suspendieren, müssen sie durch Trypsin abgelöst werden, welches möglicherweise die Zellmembran beeinflusst und eine Diffusion von Doxorubicin begünstigt. Hinzu kommt, dass die Zellen über den gesamten Zeitraum durch Schütteln in Suspension gehalten wurden. Diese Form von Stress wirkte sich neben der Exposition mit Doxorubicin sehr nachteilig auf die Vitalität der Zellpopulation aus.

Intrazelluläre Doxorubicin-Akkumulation nach 1 und 4 Stunden

Aufbauend auf der zuvor beschriebenen Kinetik wurden weitere Untersuchungen zur Doxorubicin-Akkumulation nach 1 und 4 Stunden durchgeführt, um die Ergebnisse aus den Kinetiken zu sinnvoll gewählten Zeitpunkten zu untermauern. Zusätzlich zum freien Wirkstoff wurden mit Holotransferrin targetierte und nicht-targetierte Caelyx[®]-Liposomen untersucht.

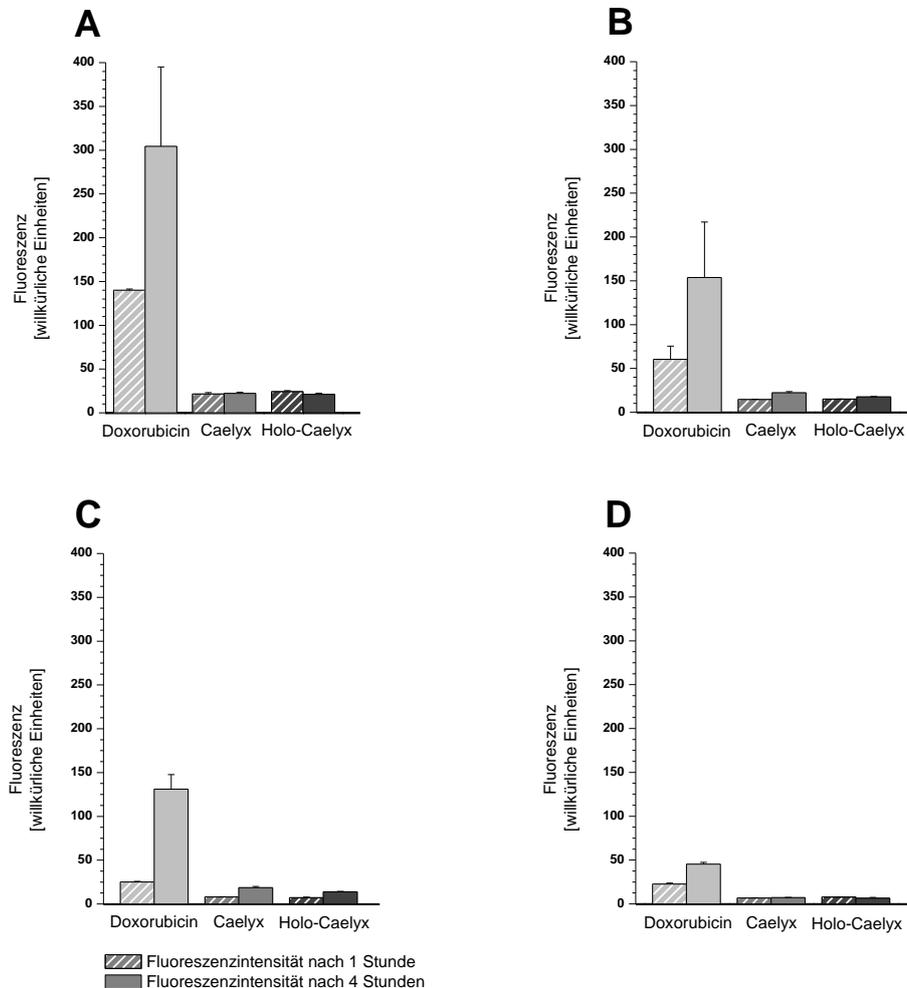


Abb. 4.22: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Doxorubicin-Konzentration nach 1 und 4 Stunden. Zellen wurden mit 3 μM Doxorubicin inkubiert. **A:** A2780sens, jeweils Probenentnahme direkt aus der Zellsuspension, **B:** A2780adr, jeweils Probenentnahme direkt aus der Zellsuspension. **C:** A2780sens, jeweils Probenentnahme durch Präparation von 6-Well-Platten, **D:** A2780adr, jeweils Probenentnahme durch Präparation von 6-Well-Platten. Die 1-Stunden-Werte sind in der jeweiligen Abbildung gestreift und die 4-Stunden-Werte einfarbig dargestellt.

Ebenso wie in der Kinetik zeigten sich im Vergleich von sensitiven und resistenten Zellen mit freiem Wirkstoff deutliche Unterschiede in der Akkumulation von Doxorubicin. Anhand der Fluoreszenzintensitäten war erkennbar, dass die sensitiven Zellen bereits nach 1 Stun-

de fast um den Faktor 3 mehr Doxorubicin aufnahmen als die resistente Zelllinie. Darüber hinaus verdoppelte sich die Fluoreszenzintensität in den sensitiven Zellen nach 4 Stunden gegenüber dem Wert nach 1 Stunde (siehe Abb. 4.22 **A** & **B**). Betrachtet man die in Abbildung 4.22 **C** & **D** dargestellten Ergebnisse, die durch Analyse der präparierten 6-Well-Platten entstanden sind, so zeigten sich für den freien Wirkstoff ähnliche Verhältnisse, jedoch mit deutlich niedrigeren Fluoreszenzintensitäten.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der liposomalen Doxorubicin-Formulierung, so wurde deutlich, dass die Caelyx[®]-Liposomen von Doxorubicin-sensitiven und resistenten Zellen gleichermaßen aufgenommen wurden, wobei keine Steigerung der Akkumulation über den Versuchszeitraum festgestellt werden konnte. Auch ein Targeting-Effekt, der mittels Holo-transferrin gekoppelten Caelyx[®]-Liposomen erreicht werden sollte, war in beiden Zelllinien nicht erkennbar (siehe Abb. 4.22). Generell unterschieden sich die Ergebnisse der liposomalen Aufnahme signifikant von denen des freien Wirkstoffes. Unabhängig von der Resistenz waren die Fluoreszenzintensitäten deutlich niedriger.

Auffallend war, dass sich sowohl bei Probenentnahme aus der Suspension als auch bei Präparation der 6-Well-Platten sehr ähnliche Fluoreszenzintensitäten ergaben. Dies lässt vermuten, dass die Liposomen nach 1 und auch nach 4 Stunden zwar in die Zellen aufgenommen wurden, jedoch der Wirkstoff möglicherweise nicht adäquat aus den Liposomen freigesetzt wurde. Es ist bekannt, dass Doxorubicin, welches in Caelyx[®]-Liposomen enthalten ist und auf Grund des Herstellungsprozesses eine hohe Konzentration in den Liposomen aufweist, dort mikrokristallin vorliegt [181].

In hoher Konzentration wird bei Doxorubicin eine Eigenfluoreszenzlöschung (Quenching) beobachtet [182]. Das bedeutet, dass durchflusszytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensitäten nicht unbedingt den intrazellulären Doxorubicin-Konzentrationen entsprechen und so das Ergebnis verfälscht sein kann.

Eigenfluoreszenzlöschung von Caelyx[®]-Liposomen

Um diese Aussage zu prüfen und den Versuchsaufbau zur Bestimmung der intrazellulären Doxorubicinkonzentration anzupassen, wurden steigende Konzentrationen Doxorubicin und Caelyx[®]-Liposomen mit dem Detergens Triton X versetzt und mit einem Fluorimeter analysiert. Durch Triton X wird die Lipidhülle der Liposomen lysiert und der enthaltene Wirkstoff freigesetzt (siehe Kapitel 3.7.2).

Mit steigender Konzentration war bei Doxorubicin eine Erhöhung der Fluoreszenz eindeutig messbar, wobei die gewählte Konzentration an Triton X nur einen marginalen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hatte (siehe Abb. 4.23).

Verfolgt man den Konzentrationsverlauf der Caelyx[®]-Liposomen, so fand man ohne Lyse der Lipidhülle keine Steigerung der Fluoreszenzintensität (Eigenfluoreszenzlöschung). Erst

nach Zugabe von Triton X war eine deutliche Steigerung erkennbar, die dann der des freien Wirkstoffs entsprach.

Dieses Zwischenergebnis macht deutlich, dass eine Anpassung des Versuchsaufbaus zur Messung der Doxorubicin-Akkumulation notwendig war.

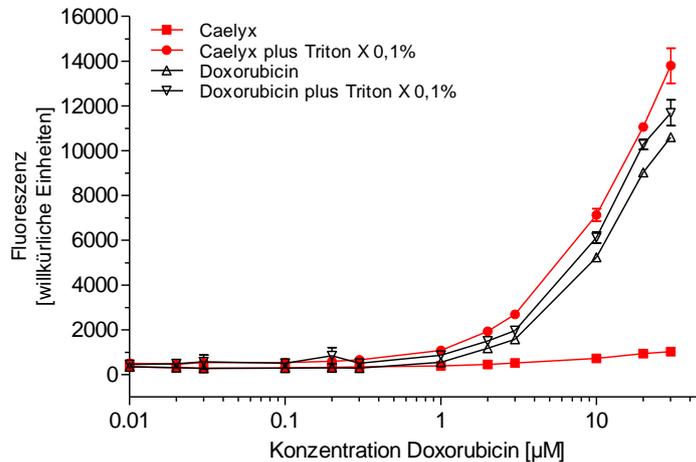


Abb. 4.23: Eigenfluoreszenzlöschung von Caelyx[®] im Vergleich zu freiem Doxorubicin. Steigende Konzentrationen liposomales und freies Doxorubicin wurden mit 0,1 % Triton X versetzt und fluoreszenzspektrometrisch bestimmt.

Optimierte Messung der intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation nach 1 und 4 Stunden

Neben dem bekannten Problem der Eigenfluoreszenzlöschung auf Grund hoher Anthrazyklin-Konzentration oder Interkalation mit der DNA [183] besteht bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zellinteraktionen mit Doxorubicin auch das Problem, dass es zu fluoreszenzverstärkenden Effekten kommen kann, beispielsweise wenn Doxorubicin mit Histonen interagiert [184].

Um eine störungsfreie Analyse der intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation in A2780-Zellen zu erreichen, wurde der Versuchsaufbau entscheidend geändert. Es wurde ausschließlich mit adhärent kultivierten Zellen gearbeitet, um eine möglichst realistische Doxorubicin-Aufnahme in die Zellen zeigen zu können. Weil die Analyse der Proben im Fluorimeter FLUOstar OPTIMA durchgeführt werden sollte, wurde die Konzentration an Doxorubicin bzw. Caelyx[®]-Liposomen auf 10 μM erhöht, um sicherzustellen, dass die Messungen in einem kalibrierbaren Bereich lagen. Um störende Effekte wie Eigenfluoreszenzlöschung oder Fluoreszenzsteigerung auszuschließen, wurden die gewonnenen Zellproben mit Triton X lysiert (siehe Kapitel 3.7.4). Neben Doxorubicin wurden Caelyx[®]-Liposomen mit und ohne Targetierung untersucht. Zusätzlich wurde zur besseren Einordnung auch die Akkumulation von

Daunorubicin analysiert.

Daunorubicin wird auch passiv in die Zellen aufgenommen und ist ebenfalls P-gp-Substrat. Jedoch ist verglichen mit Doxorubicin, die zelluläre Aufnahme von DAunorubicin wesentlich stärker, wie schon NAGASAWA *et al.* in polymorphkernigen Ratten-Leukozyten zeigen konnten [185]. Gleiches fanden MANKHETKORN *et al.* verbunden mit einer schnelleren Aufnahmekinetik für Daunorubicin in resistenten K562-Zellen [183].

In Abb. 4.24 sind die Ergebnisse für sensitive und resistente Zellen zusammengefasst.

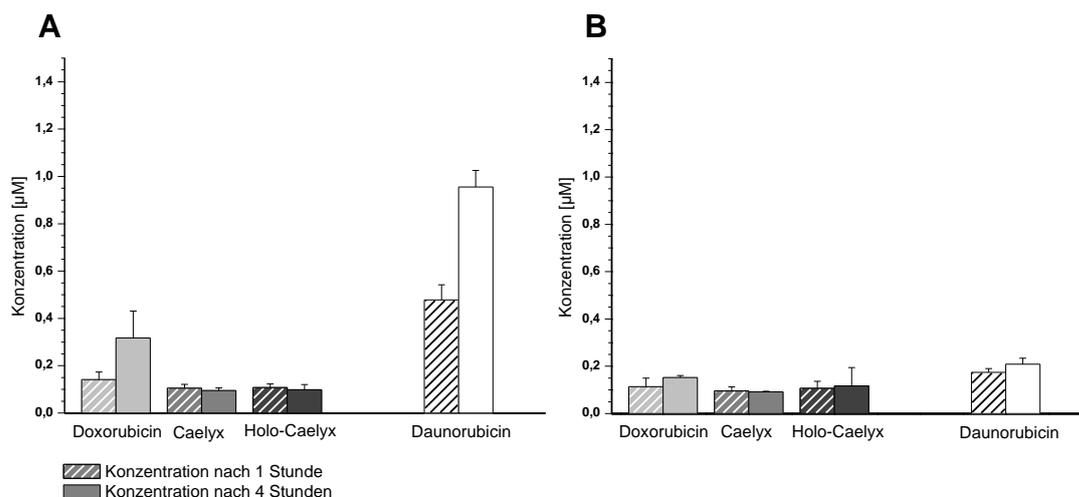


Abb. 4.24: Intrazelluläre Doxorubicin-Konzentration nach 1 und 4 Stunden. Zellen wurden mit 10 µM Doxorubicin inkubiert. **A:** A2780 sens, **B:** A2780 adr.

Dabei wurden die Unterschiede in der Akkumulation zwischen den beiden Anthracyclinen besonders in den sensitiven Zellen sehr deutlich (Abb. 4.24 **A**). Nach 4 Stunden, bezogen auf den 1 Stunden-Wert, hatte sich die Konzentration der Wirkstoffe jeweils verdoppelt. Jedoch lag die Daunorubicin-Konzentration um den Faktor 3 über der Doxorubicin-Konzentration. Die Aufnahme der Caelyx[®]-Liposomen erbrachte weder Unterschiede in den intrazellulären Doxorubicin-Konzentrationen nach 1 und 4 Stunden, noch war ein Vorteil durch die Targetierung erkennbar.

In den resistenten Zellen (Abb. 4.24 **B**) zeigte sich für die liposomalen Formulierungen ein ähnliches Bild mit einer gleichbleibenden Doxorubicin-Konzentration nach 1 und 4 Stunden. Die gefundenen Konzentrationen entsprachen denen der sensitiven Zellen. Betrachtet man die Konzentration der freien Wirkstoffe, so wird die Aktivität von P-gp offensichtlich. Die resistenten Zellen akkumulierten im Gegensatz zu den sensitiven Zellen nur eine geringe Menge an Doxorubicin und Daunorubicin. Auch nach 4 Stunden war keine Erhöhung der Konzentration messbar.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Liposomen unabhängig von P-gp in den Zellen akkumulieren.

Um diese These genauer zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit einem P-gp-Modulator, der die Aktivität der Effluxpumpe hemmt, durchgeführt. Hierfür wurde ein Modulator der dritten Generation, WK-X-24, aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese verwendet [186]. Die Potenz des Modulators lässt sich sehr gut an den zellulären Daunorubicin-Konzentrationen ablesen (siehe Abb. 4.25 **A** & **B**). Unter dem Einfluss von WK-X-24 glich die intrazelluläre Daunorubicin-Konzentration in resistenten Zellen der in sensitiven Zellen. Die Effluxpumpe P-gp wurde offenbar so stark beeinflusst, dass das Gleichgewicht aus Influx und Efflux nahezu vollständig auf die Seite des Influx verschoben wurde.

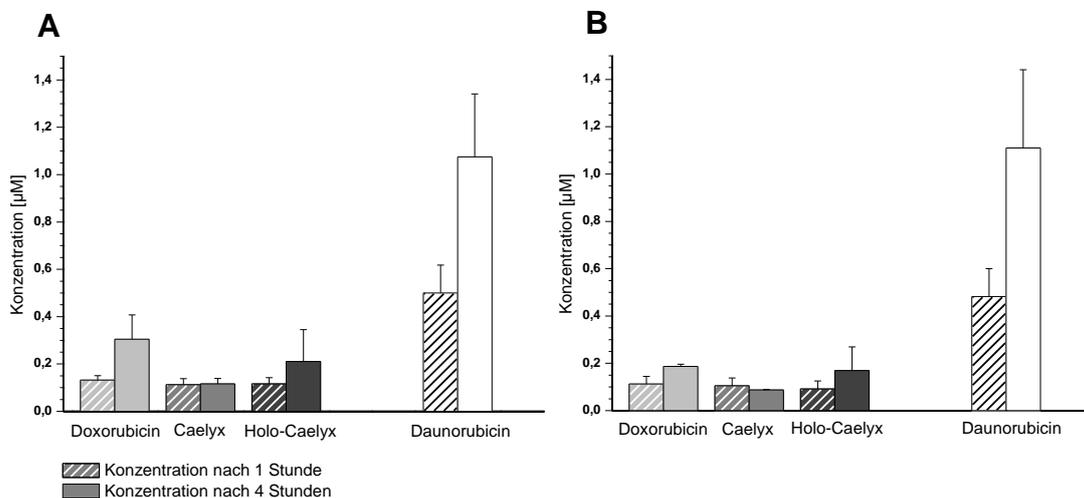


Abb. 4.25: Intrazelluläre Doxorubicin-Konzentration unter dem Einfluss von WK-X-24 nach 1 und 4 Stunden. Zellen wurden mit 10 μM Doxorubicin und mit 3 μM WK-X-24 co-inkubiert. **A:** A2780 sens, **B:** A2780 adr.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch ansatzweise bei der Betrachtung von Doxorubicin wider, jedoch ist dieser angleichende Effekt des Modulators auf die resistenten Zellen nicht so stark ausgeprägt wie bei Daunorubicin. Möglicherweise ist dies auf die langsamere Kinetik des Doxorubicins zurückzuführen.

Vergleicht man beide Zelllinien mit freiem und liposomalem Wirkstoff, so zeigten die Liposomen auch in dieser Versuchsreihe einen nivellierenden Effekt in Bezug auf den Influx. Dies konnte in gleichbleibenden Konzentrationen nach 1 und 4 Stunden beobachtet werden.

Das Resultat dieser Analyse ist, dass Liposomen unabhängig von der Resistenz in die Zellen aufgenommen werden, wenn auch in einem kleineren Ausmaß als der freie Wirkstoff. Das Vor-

handensein oder Fehlen der Efflux-Pumpe P-gp hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation des liposomalen Wirkstoffs, denn auch eine Hemmung von P-gp blieb ohne Effekt.

4.2.5 Zytotoxizitätsstudien

Ebenso wie in Kapitel 4.1.5 der zytotoxische Einfluss Cisplatin-haltiger Liposomen beschrieben wurde, wurde der MTT-Assay mit drei Zeitpunkten (24, 48, 72 Stunden) auch für Doxorubicin-haltige Liposomen durchgeführt, um die Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen Experimenten zu untermauern.

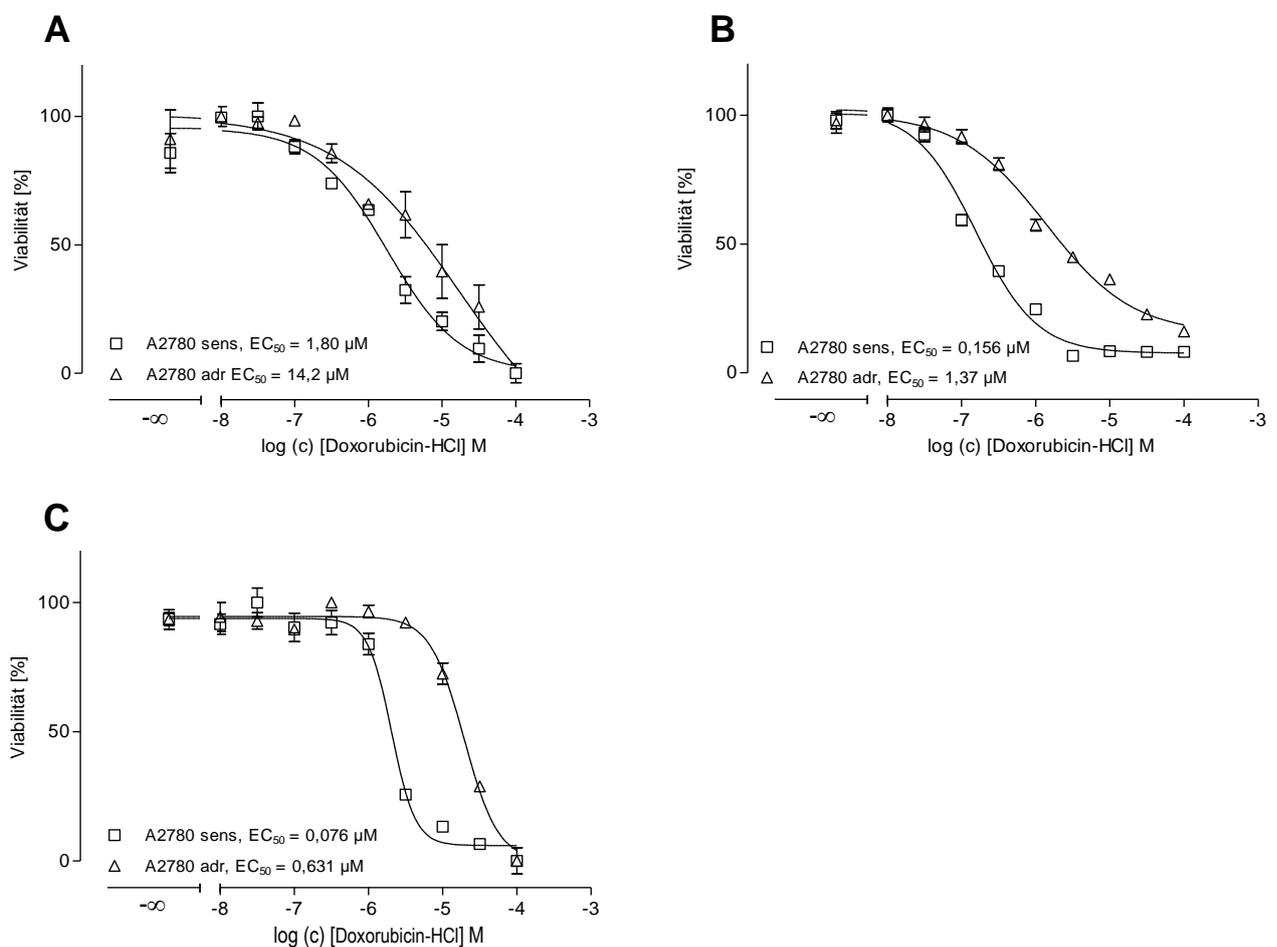


Abb. 4.26: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Zytotoxizität von freiem Doxorubicin in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Es wurden 10000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zytotoxizität wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: **A:** 24 Stunden, **B:** 48 Stunden und **C:** 72 Stunden.

Die Experimente zu diesen Studien sind in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Pharm. Annette Konold im Rahmen ihrer Diplom-Arbeit realisiert worden [180]. Die Analyse der Zytotoxizitätsstudien ergab für den freien Wirkstoff Doxorubicin bereits nach 24 Stunden auswertbare Konzentrations-Effekt-Kurven (siehe Abb. 4.26). Ähnlich wie für den Wirkstoff Cisplatin war der Kurvenverlauf mit steigender Inkubationszeit ausgeprägt sigmoidal.

Da sich Caelyx[®]-Liposomen schon seit Jahren in der klinischen Anwendung befinden, sind die verwendeten Lipide als unbedenklich bekannt. Dennoch wurde die Zytotoxizität des rigiden Lipidgemisches mittels mPEG-Leerliposomen über 72 Stunden untersucht, damit ein potentieller Einfluss der Lipide bei der Beurteilung der Caelyx[®]-Liposomen berücksichtigt werden konnte.

Betrachtet man den Kurvenverlauf in Abbildung 4.27, so hieraus ihr eindeutig hervor, dass sensitive und resistente Zellen gleichermaßen auf Leerliposomen reagieren. Erst ab einer Lipid-Konzentration über 1 μM wurde ein gewisser Einfluss der Lipide erkennbar. Jedoch ist dieser Effekt nicht sehr stark ausgeprägt. Die Lipide bewirkten lediglich eine Hemmung des Zellwachstums auf 50 % der Viabilität.

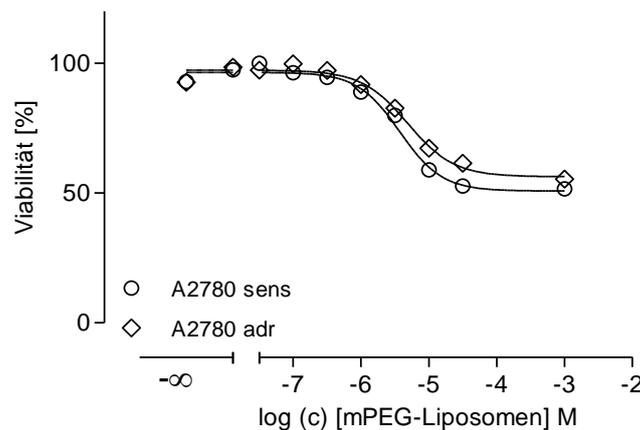


Abb. 4.27: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Zytotoxizität von mPEG-Leerliposomen in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Es wurden 10000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zytotoxizität wurde nach 72 Stunden bestimmt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die liposomalen Formulierungen im Vergleich zum freien Wirkstoff auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht (siehe Tab. 4.7).

Vergleicht man sensitive mit resistenten Zellen, so zeigte der freie Wirkstoff klare Unterschiede in der Zytotoxizität. Dabei fällt auf, dass bereits nach 24 Stunden ein Resistenzgrad von 7,90 erreicht wurde. Nach 48 bzw. 72 Stunden konnte ein Resistenzgrad im Bereich von 8-9 bestimmt werden.

Auf Caelyx[®]-Liposomen reagierten die Zellen völlig anders. Bereits nach 24 Stunden war kein Unterschied zwischen sensitiven und resistenten Zellen erkennbar, wobei die targetierten Liposomen einen leichten Vorteil gegenüber Caelyx[®]-Liposomen aufwiesen. Nach 48 Stunden war die Wirkung der Caelyx[®]-Liposomen zwar nicht wie nach 24 h dem freien Wirkstoff überlegen, aber die Resistenz war durch den Einsatz der Liposomen deutlich verringert (Doxorubicin: $R_f = 8,78$ vs. Caelyx[®]: $R_f = 4,95$).

Tab. 4.7: Zytotoxizitätsstudien von freiem Doxorubicin und zwei liposomalen Doxorubicin-Formulierungen.

* Keine Berechnung des R_f -Wertes aufgrund von Einschränkungen bei der Berechnung der nicht-linearen Regression unter Anwendung der 4-Parameter-logischen Gleichung.

Inkubationszeit	Formulierung	Zellen/Well	A2780 sens EC_{50} [μ M]	A2780 adr EC_{50} [μ M]	R_f
24 Stunden	Doxorubicin	10000	1,80	14,24	7,90
	Caelyx [®]	10000	7,13	9,02	1,27
	Holo-Caelyx [®]	10000	6,19	4,05	0,65
48 Stunden	Doxorubicin	10000	0,156	1,37	8,78
	Caelyx [®]	10000	1,25	6,19	4,95
	Holo-Caelyx [®]	10000	0,262	27,35	*
72 Stunden	Doxorubicin	10000	0,076	0,631	8,30
	Caelyx [®]	10000	0,075	2,36	*
	Holo-Caelyx [®]	10000	0,029	20,27	*

Dieses Ergebnis passt stimmig zu den analysierten Akkumulationsdaten. Die Liposomen zeigten auch in dieser Versuchsreihe einen egalisierenden Effekt auf beide Zelllinien, wobei die Toxizität der Liposomen nach 24 Stunden, bezogen auf die sensitiven Zellen, deutlich unter der des freien Wirkstoffs lag. Gründe hierfür könnten in einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffes aus den Liposomen und einer veränderten intrazellulären Verstoffwechslung der Liposomen liegen. Eine weitergehende Aussage über die Toxizität ist auf Basis dieser Versuchsreihe schwierig, da aufgrund von massiven Zellwachstumsproblemen, besonders in der resistenten Zelllinie, die Analyse der Daten erschwert wurde. Dies ist an den stark variierenden EC_{50} -Werten erkennbar, die einen direkten Vergleich durch den Resistenzgrad unmöglich machen.

Es wurde versucht, eine Optimierung der Bedingungen durch die Variation der Zellzahlen zu erreichen (siehe Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Zytotoxizitätsstudien von freiem Doxorubicin und Caelyx[®]-Liposomen: Optimierung der Zellzahl.

* Keine Berechnung des R_f -Wertes aufgrund von Einschränkungen bei der Berechnung der nicht-linearen Regression unter Anwendung der 4-Parameter-logischen Gleichung.

Inkubationszeit	Formulierung	Zellen/Well	A2780 sens EC_{50} [μ M]	A2780 adr EC_{50} [μ M]	R_f
24 Stunden	Doxorubicin	20000	0,940	5,83	6,20
		40000	1,36	8,0	5,88
	Caelyx [®]	20000	0,483	0,516	1,07
		40000	2,31	2,59	1,12
48 Stunden	Doxorubicin	20000	0,127	1,99	15,67
		40000	0,195	3,21	16,46
	Caelyx [®]	20000	0,483	9,71	20,1
		40000	1,87	15,6	8,34
72 Stunden	Doxorubicin	10000	0,0352	0,573	16,28
		20000	0,0752	1,0	13,30
	Caelyx [®]	10000	0,0690	4,36	*
		20000	0,125	10,52	*

Verfolgt man die Resistenzfaktoren von Doxorubicin über die Zeit, so wurden, mit R_f -Werten um 6, bereits nach 24 Stunden die Unterschiede deutlich. Zu späteren Zeitpunkten lag der R_f -Wert zwischen 13 und 16, welches eine ausgeprägte Resistenz anzeigt. Der nivellierende Effekt der Caelyx[®]-Liposomen wird besonders im Inkubationszeitraum von 24 Stunden evident, da der berechnete Resistenzfaktor, sowohl im Versuchsansatz mit 20000 Zellen als auch mit 40000 Zellen, auf 1 sinkt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Liposomen bereits nach einem relativ kurzen Zeitraum anders in den Zellen verstoffwechselt werden, was die Resultate aus der intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation stützt (siehe Kapitel 4.2.4).

Eine fundierte Aussage über die vergleichende Toxizität der Caelyx[®]-Liposomen nach 48 bzw. 72 Stunden ist jedoch nicht möglich, da trotz gesteigerter Zellzahlen das Wachstum der resistenten Zellen weiterhin problematisch war. Ein Konzentrationseffekt der Lipide konnte ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4.27).

Um dennoch eine Aussage über die Toxizität nach 48 und 72 Stunden treffen zu können und um in Analogie zur intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation zu arbeiten, wurde der MTT-Assay weiter angepasst. Die Wirkstoff-Exposition der Zellen wurde auf 4 Stunden

verkürzt, da die Aufnahme des Wirkstoffes in diesem Zeitraum einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. In der Durchführung des Assays bedeutet das, dass der Wirkstoff nach 4 Stunden entfernt wurde. Es folgte ein Waschschrift und die Zellen erhielten frisches Medium. Nach 72 Stunden wurde der Assay analysiert.

Mit dieser Maßnahme sollte zum einen die Proliferation der Zellen verbessert werden, zum anderen auch der Wirkmechanismus der Liposomen besser beleuchtet werden. Zum besseren Vergleich der Datensätze wurden Daunorubicin und auch der P-gp-Modulator WK-X-24 in die Experimente mit einbezogen.

In der Literatur wird für WK-X-24 in A2780 adr-Zellen ein EC_{50} von $1,1 \mu\text{M}$ angegeben [186]. Um die Zytotoxizität berechnen zu können, die dem aktuellen Versuchsaufbau entspricht, wurde mit den beschriebenen Maßnahmen der MTT-Assay für WK-X-24 durchgeführt (siehe Abb. 4.28).

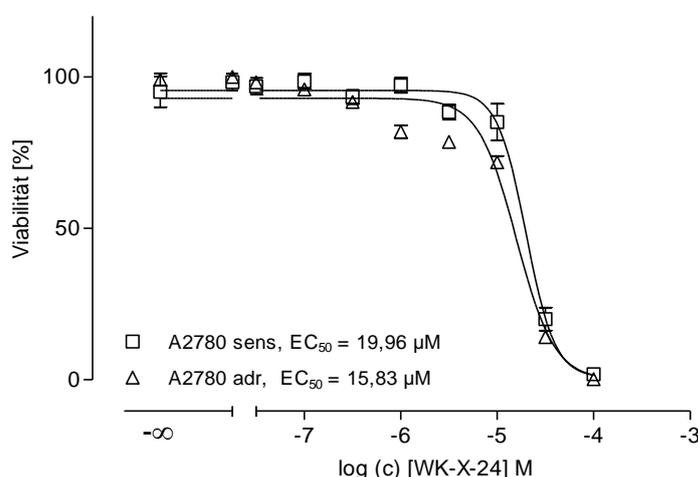


Abb. 4.28: Exemplarische Darstellung: Vergleich der Zytotoxizität von WK-X-24 in sensitiven und resistenten A2780-Zellen. Es wurden 10000 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde über 4 Stunden mit dem Modulator WK-X-24 inkubiert. Es folgte ein Spülschritt und der Assay wurde nach 72 Stunden analysiert.

In dem so modifizierten Versuchsaufbau ergab sich für sensitive Zellen ein EC_{50} -Wert von $19,96 \mu\text{M}$ und für resistente Zellen ein EC_{50} -Wert von $15,83 \mu\text{M}$. Daher wurde für die folgende MTT-Versuchsreihe eine Modulatorkonzentration von $2 \mu\text{M}$ gewählt, um eine toxische Konzentration des Modulators auszuschließen. Die Ergebnisse dieser Optimierung sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Die errechneten Resistenzgrade von Doxorubicin (9,80) und Daunorubicin (13,20) verdeutlichen, dass die Resistenz in einem ähnlichen Bereich liegt wie in den zuvor beschriebenen

Versuchen. Der Einfluss des Modulators (Reduktion des Resistenzgrades auf 2,7) wird gleichermaßen bei Doxorubicin und Daunorubicin deutlich. Der Modulator hatte keinen Einfluss auf die sensitiven Zellen, da sich die berechneten EC_{50} -Werte nahezu nicht voneinander unterschieden. Hingegen reagierten bei Zugabe des Modulators die resistenten Zellen sensitiv auf die Wirkstoffe Doxorubicin und Daunorubicin. Die Liposomen spiegelten die Ergebnisse der intrazellulären Akkumulation von Doxorubicin bzw. Daunorubicin wider. Sie hatten einen nivellierenden Effekt auf die Zellen, welcher sich im Falle von Caelyx[®] in einem Resistenzgrad von 3,74 und bei targetiertem Caelyx[®] sogar von 0,96 zeigte. Hier wurde der Vorteil der Targetierung von Liposomen mit Holotransferrin deutlich. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass WK-X-24 keinen Einfluss auf die Toxizität der Liposomen hat.

Tab. 4.9: Zytotoxizitätsstudien mit und ohne P-gp-Modulator WK-X-24. Es wurden 10000 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde 4 Stunden mit dem Modulator inkubiert. Es folgte ein Spülschritt und der Assay wurde nach 72 Stunden analysiert.

Formulierung	Zellen/Well	A2780 sens EC_{50} [μ M]	A2780 adr EC_{50} [μ M]	R _f
Doxorubicin	10000	2,05	20,09	9,80
Doxorubicin + WK-X-24	10000	2,23	6,12	2,74
Caelyx [®]	10000	9,73	36,39	3,74
Caelyx [®] + WK-X-24	10000	7,16	24,60	3,44
Holo-Caelyx [®]	10000	9,44	9,06	0,96
Holo-Caelyx [®] + WK-X-24	10000	10,04	28,31	2,71
Daunorubicin	10000	0,175	2,31	13,20
Daunorubicin + WK-X-24	10000	0,185	0,491	2,65

Fazit dieser Analyse ist, dass Liposomen offenbar unabhängig von P-gp aufgenommen werden und damit die Resistenz in einem gewissen Maße umgangen werden kann, da auch eine Hemmung der Efflux-Pumpe ohne Effekt bleibt. Die gegenüber dem freien Wirkstoff deutlich unterschiedliche Toxizität bestärkt die These einer veränderten Verstoffwechselung von Liposomen in Zellen, wie sie schon für Cisplatin beschrieben werden konnte (siehe Kapitel 4.1).

5 Zusammenfassung

Die zytostatische Wirkung antineoplastischer Substanzen wie Cisplatin und Doxorubicin steht in engem Zusammenhang mit der Resistenz gegen diese Wirkstoffe. Die Gründe hierfür liegen unter anderem in einem geänderten Aufnahmeverhalten sowie einer verstärkten Ausschleusung der Wirkstoffe und sind oftmals multifaktoriell in Folge geänderter Signaltransduktionswege.

Im Falle von Cisplatin werden verschiedene Resistenzmechanismen diskutiert. Unter anderem ist in der Literatur eine verminderte Platin-Akkumulation unter Beteiligung des Kupfertransporters Ctr1 und der P-Typ-ATPasen ATP7A & B beschrieben. Daher wird postuliert, dass targetierte Cisplatin-haltige Liposomen eine Möglichkeit darstellen, die Rezeptor-vermittelte Resistenz zu untersuchen und zu umgehen.

So wurden mit Fokus auf die Anwendung in Zellsystemen fluide, sterisch stabilisierte, sowohl Cisplatin-haltige als auch Wirkstoff-freie Liposomen hergestellt und analysiert. Das Ergebnis waren Liposomen einer Größe von 100-129 nm mit einer tolerablen Einschussrate von 0,24 nmol Cisplatin / mmol Lipid und ausreichender Kopplungseffizienz.

Die Bindungsfähigkeit der Liposomen an die Zellen konnte nachgewiesen werden, wobei sich eine Targetierung mit Holotransferrin als vorteilhaft herausstellte. Dies spiegelte sich auch in der durchflusszytometrischen Analyse der für diese Arbeit relevanten Transportproteine positiv wider. Sowohl sensitive als auch resistente Zellen exprimierten Transferrin-Rezeptoren - zwar nicht in gleichem Ausmaß, jedoch war das Expressions-Niveau durch Exposition mit Holotransferrin-gekoppelten Liposomen im Zellsystem induzierbar. Dieser Umstand ist, unter der Prämisse einer erfolgreichen Targetierung, ein positiver Nebeneffekt. Neben dem durchflusszytometrischen Nachweis von ATP7A & B konnte eine signifikante Expressions-Steigerung unter dem Einfluss von Cisplatin sowohl in Cisplatin-sensitiven als auch in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom-Zellen gezeigt werden. Auf Holotransferrin-targetierte und Cisplatin-haltige Liposomen reagierten die sensitiven Zellen mit gleichbleibender Expression von ATP7A & B. Die Wirkung der Liposomen übertraf die Erwartungen, da resistente Zellen eine signifikante Minderung der Expressionsrate von ATP7A & B zeigten. Dies lässt erkennen, dass die zelluläre Antwort auf Liposomen gegenüber der auf freies

Cisplatin verändert ist und eine Umgehung der typischen Transportmechanismen ermöglicht. Jedoch konnte dieses Verhalten nicht für den Kupfertransporter Ctr1, der für den Influx verantwortlich ist, nachgewiesen werden. Hier wurde, entgegen der Erwartungen, mit Cisplatin ebenfalls eine Steigerung der Expression erreicht. Mit liposomalem Cisplatin war die Expressionssteigerung in den resistenten Zellen sogar signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte Holotransferrin selbst sein, da der Transferrin-Rezeptor in direktem Zusammenhang mit dem Zellwachstum steht, was zu einer Resistenz-unabhängigen Expressionssteigerung geführt haben könnte.

Die Erhebung der Daten zur intrazellulären Platin-Akkumulation über die Zeit zeigte deutlich, dass die sensitiven Zellen nach 24 Stunden viermal mehr Cisplatin aufnahmen als die resistente Zelllinie. Die Aufnahme des liposomalen Cisplatins hingegen war in sensitiven und resistenten Zellen gleich und lag deutlich über der Aufnahme von freiem Cisplatin in resistenten Zellen.

Durch Messung der Zytotoxizität der Wirkstoff-freien Liposomen konnte die bekanntermaßen gute Verträglichkeit von Liposomen aufgrund der geringen Toxizität bestätigt werden. Die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsbestimmungen mit freiem Cisplatin im Vergleich mit den entsprechenden liposomalen Formulierungen konnten die Verhältnisse aus der intrazellulären Platin-Akkumulation für den freien Wirkstoff untermauern. Auch die Analyse der liposomalen Formulierungen erbrachte ähnliche Resultate im Sinne eines nivellierenden Effekts beim Vergleich der sensitiven und resistenten Zelllinie, wobei die Cisplatin-haltigen Liposomen eine deutlich toxischere Wirkung in den resistenten Zellen aufwiesen als freies Cisplatin. Dies belegt, dass die Liposomen offenbar von der Resistenz unabhängig aufgenommen werden und in der Zelle anders prozessiert werden. Unter Zuhilfenahme des ATP-Assays wurde eine 24-Stunden-Kinetik aufgenommen, um über die intrazellulären ATP-Level auf die Zellaktivität schließen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass sensitive Zellen auf Cisplatin mit einem charakteristischen ATP-Anstieg im Zeitraum zwischen 8-12 Stunden reagierten, danach sank die Aktivität kontinuierlich ab. Resistente Zellen zeigten keinen derartigen ATP-Anstieg, sondern nahezu gleichbleibende ATP-Level, wobei der absolute ATP-Gehalt der resistenten Zellen signifikant über dem der sensitiven Zellen lag. Die Cisplatin-haltigen Liposomen zeigten sowohl in sensitiven als auch in resistenten Zellen keinen ATP-Level-Anstieg. Der Verlauf war analog zum freien Wirkstoff in resistenten Zellen.

Die Ergebnisse der DNA-Platinierung untermauerten die gefundenen Zusammenhänge. In sensitiven Zellen war die DNA-Platinierung wesentlich höher als in resistenten Zellen. Die durch liposomales Cisplatin ausgelöste DNA-Platinierung lag in sensitiven Zellen deutlich unter der von freiem Cisplatin und in resistenten Zellen nur leicht über der des freien Wirkstoffs. Diese Analyse zeigte einmal mehr, dass die Wirksamkeit von liposomalem Cisplatin in den Zellen möglicherweise andere Signaltransduktionswege adressiert und somit nicht alleine

auf DNA-schädigende Effekte reduziert werden kann [151].

Bei der Auswertung des Microarrays, mit Fokus auf den Cisplatin-resistenten Zellen, wurden die Unterschiede der intrazellulären Prozessierung des liposomalen Cisplatins im Vergleich zu freiem Cisplatin markant. Während der freie Wirkstoff vor allem Gene induzierte, die in den intrinsischen (mitochondrialen) Signaltransduktionsweg involviert sind (BAX, BID, CASP9) und mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, induzierte liposomales Cisplatin vor allem Gene des extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) Signaltransduktionsweges (TNFRSF20B-DR6, cFLIP-L). Damit wird deutlich, dass die Resistenz in A2780-Zellen gegenüber Cisplatin nicht nur Rezeptor-vermittelt ist, sondern eine Vielzahl von Faktoren in der intrazellulären Signaltransduktion involviert ist [142].

Im Falle von Doxorubicin ist die Effluxpumpe P-gp für die Rezeptor-vermittelte Resistenz verantwortlich. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit versucht, mit targetierten Doxorubicin-Liposomen P-gp-vermittelte Resistenzen zu untersuchen und zu umgehen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst rigide und sterisch stabilisierte Leerliposomen mit der gleichen Lipidzusammensetzung wie beim kommerziell erhältlichen Doxorubicin-haltigen Arzneimittel Caelyx[®] hergestellt und mittels Post-Insertion nachträglich funktionalisiert. Die Analyse der Leerliposomen ergab Liposomen mit einer Größe von ca. 115 nm (Caelyx[®]: 80 nm). Die erfolgreiche Kopplung von Proteinen mit Hilfe der Post-Insertionstechnik konnte mittels Gelelektrophorese belegt werden. Die Bindungsfähigkeit der Liposomen an die Zellen zeigte ein ähnliches Ausmaß wie die in dieser Arbeit hergestellten Cisplatin-haltigen Liposomen, wobei sich die Targetierung in den Bindungsstudien auch hier als vorteilhaft erwies. Die Analyse der beteiligten Transportproteine zeigte ebenfalls eine Induzierbarkeit des Transferrin-Rezeptors bei Exposition mit Holotransferrin-gekoppelten Liposomen. Als positiver Nebeneffekt für das Targeting stellte sich auch die Vorbehandlung der Zellen mit Doxorubicin heraus, da sie nicht nur eine gesteigerte Expression von P-gp, sondern einen entsprechenden Effekt auf die Expression des Transferrin-Rezeptors hatte. Zudem wurde klar gezeigt, dass sowohl sensitive als auch Cisplatin-resistente A2780-Zellen die Effluxpumpe P-gp nicht exprimieren.

Als Basis für weitere pharmakologische Betrachtungen von Doxorubicin im Vergleich zu liposomalem Doxorubicin wurde eine Influx-Kinetik von Doxorubicin in sensitiven und Doxorubicin-resistenten Ovarialkarzinom-Zellen aufgenommen. In resistenten Zellen stellte sich nach vier Stunden ein Plateau der Fluoreszenzintensität ein, welches mit der Aktivität der Effluxpumpe P-gp einhergeht, da dieser Effekt in sensitiven Zellen nicht beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse konnten aufgrund einer ausgeprägten Eigenfluoreszenzlöschung allerdings nicht auf liposomales Doxorubicin erweitert werden.

Zur störungsfreien Analyse wurden die Zellen der verschiedenen Versuchsansätze lysiert und

fluoreszenzspektrometrisch nach ein und vier Stunden analysiert. Mit diesem optimierten Versuchsaufbau zur intrazellulären Doxorubicin-Akkumulation konnten die Verhältnisse aus den Kinetik-Experimenten wiedergefunden werden. Sensitive Zellen zeigten im Gegensatz zu resistenten Zellen eine massive Steigerung der Doxorubicin-Akkumulation nach vier Stunden. Die Aufnahme des liposomalen Doxorubicins in beiden Zelllinien glich der des freien Wirkstoffs in resistenten Zellen. Eine Steigerung der Akkumulation war auch nach vier Stunden nicht erkennbar. In einer weiteren Versuchsreihe wurde versucht, die P-gp-abhängige Resistenz durch WK-X-24, einem P-gp-Modulator der dritten Generation, in Doxorubicin-resistenten Zellen zurückzudrängen. Dieser Effekt war im Sinne einer gesteigerten Akkumulation von Doxorubicin in den resistenten Zellen für den freien Wirkstoff eindeutig nachweisbar, jedoch blieb die Aufnahme von liposomalem Doxorubicin hiervon unbeeinflusst. Daraus kann geschlossen werden, dass die membranständige Effluxpumpe keinen Einfluss auf die intrazelluläre Akkumulation des liposomalen Wirkstoffs hat und die P-gp-abhängige Resistenz somit mit der liposomalen Formulierung umgangen werden kann [145].

Die Zytotoxizitätsstudien von freiem Doxorubicin im Vergleich zu liposomalem Doxorubicin kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie sie auch im Cisplatin-Part beschrieben wurden. Die liposomalen Formulierungen zeigten in sensitiven und resistenten Zellen eine vergleichbare Toxizität. Liposomales Doxorubicin war in der Lage, die Resistenz in einem ähnlichen Ausmaß wie der P-gp-Modulator WK-X-24 zurückzudrängen. Eine Targetierung der Liposomen mit Holotransferrin erbrachte auch bei Doxorubicin keinen entscheidenden Vorteil, obgleich liposomales Doxorubicin in resistenten Zellen eine deutlich stärkere Wirkung zeigte.

Diese Arbeit veranschaulicht das Potential Zytostatika-haltiger Liposomen, Resistenzen in Ovarialkarzinom-Zellen zu untersuchen und diese zu umgehen. Durch liposomale Formulierungen konnte sowohl für Cisplatin als auch für Doxorubicin eine Wirksamkeit trotz Resistenz im Zellmodell erreicht und mit unterschiedlichen Methodiken nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird im Falle der Cisplatin-Resistenz deutlich, dass die Resistenz-Ursache multifaktoriell unter anderem auch in veränderten Signaltransduktionswegen begründet ist. Insofern eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen Blick auf Liposomen, deren funktionaler Eigeneffekt deutlich über ein rein passives Carriersystem hinausgehen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] ONKO-Internetportal, *Deutsche Krebsgesellschaft*. <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/eierstockkrebs.html>, Letzter Zugriff 09.01.2016.
- [2] *Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren*; Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e V., Ed.; Zuckerschwerdt-Verlag GmbH, 2007.
- [3] Husmann, G.; Kaatsch, P.; Katalinic, A.; Bertz, J.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Wolf, U. *Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends*; Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, Berlin, 2010; Vol. 7, 3.13 Eierstöcke.
- [4] Colombo, N.; Guthrie, D.; Chiari, S.; Parmar, M.; Qian, W.; Swart, A. M.; Torri, V.; Williams, C.; Lissoni, A.; Bonazzi, C.; collaborators, I. C. O. N. I. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 125–132.
- [5] Mutch, D. G. Surgical management of ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 3–8.
- [6] Yap, T. A.; Carden, C. P.; Kaye, S. B. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 167–181.
- [7] Trope, C.; Kaern, J.; Hogberg, T.; Abeler, V.; Hagen, B.; Kristensen, G.; Onsrud, M.; Pettersen, E.; Rosenberg, P.; Sandvei, R.; Sundfor, K.; Vergote, I. Randomized study on adjuvant chemotherapy in stage I high-risk ovarian cancer with evaluation of DNA-ploidy as prognostic instrument. *Ann. Oncol.* **2000**, *11(3)*, 281–8.
- [8] Agarwal, R.; Linch, M.; Kaye, S. B. Novel therapeutic agents in ovarian cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2006**, *32*, 875–886.
- [9] Greenlee, R. T.; Hill-Harmon, M. B.; Murray, T.; Thun, M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer. J. Clin.* **2001**, *51*, 15–36.

- [10] Agarwal, R.; Kaye, S. B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. **2003**, *3*, 502–516.
- [11] Fachinformation, *Cisplatin*. <http://www.fachinfo.de>, Stand: März 2014.
- [12] Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from platin electrode. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [13] Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **1969**, *222*, 385–386.
- [14] Zwelling, L. A.; Kohn, K. W. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II). *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63(9-10)*, 1439–1444.
- [15] Ott, I.; Gust, R. Besonderheiten anorganischer Zytostatika: Medizinische Chemie der Platinkomplexe. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35(2)*, 124–133.
- [16] Kartalou, M.; Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 23–43.
- [17] Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, *22(47)*, 7265–79.
- [18] Chaney, S. G.; Campbell, S. L.; Bassett, E.; Wu, Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *53*, 3–11.
- [19] Reed, E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **1998**, *24*, 331–344.
- [20] Chaney, S. G.; Sancar, A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1346–1360.
- [21] Furuta, T.; Ueda, T.; Aune, G.; Sarasin, A.; Kraemer, K. H.; Pommier, Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4899–4902.
- [22] Siddik, Z. H. *Cancer Drug Resistance*; Humana Press Inc., Totowa NJ, 2006; pp 261–282, 16 Cisplatin Resistance.
- [23] Gonzalez, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* **2001**, *59*, 657–663.
- [24] Sedletska, Y.; Fourrier, L.; Malinge, J.-M. Modulation of MutS ATP-dependent functional activities by DNA containing a cisplatin compound lesion (base damage and mismatch). *J Mol Biol* **2007**, *369*, 27–40.

- [25] Zamble, D. B.; Lippard, S. J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 435–439.
- [26] Sancho-Martínez, S. M.; Prieto-García, L.; Prieto, M.; López-Novoa, J. M.; López-Hernández, F. J. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther* **2012**, *136*, 35–55.
- [27] Kandioler, D. et al. Growing clinical evidence for the interaction of the p53 genotype and response to induction chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2008**, *135*, 1036–1041.
- [28] Gonfloni, S.; Tella, L. D.; Caldarola, S.; Cannata, S. M.; Klinger, F. G.; Bartolomeo, C. D.; Mattei, M.; Candi, E.; Felici, M. D.; Melino, G.; Cesareni, G. Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med* **2009**, *15*, 1179–1185.
- [29] Patel, S.; Bui, T. T. T.; Drake, A. F.; Fraternali, F.; Nikolova, P. V. The p73 DNA binding domain displays enhanced stability relative to its homologue, the tumor suppressor p53, and exhibits cooperative DNA binding. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3235–3244.
- [30] Ramesh, G.; Reeves, W. B. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **2005**, *289*, F166–F174.
- [31] Ramesh, G.; Kimball, S. R.; Jefferson, L. S.; Reeves, W. B. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF- α production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**, *292*, F812–F819.
- [32] Mansouri, A.; Ridgway, L. D.; Korapati, A. L.; Zhang, Q.; Tian, L.; Wang, Y.; Siddik, Z. H.; Mills, G. B.; Claret, F. X. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 19245–19256.
- [33] Linkermann, A.; Himmerkus, N.; Rölver, L.; Keyser, K. A.; Steen, P.; Bräsen, J.-H.; Bleich, M.; Kunzendorf, U.; Krautwald, S. Renal tubular Fas ligand mediates fratricide in cisplatin-induced acute kidney failure. *Kidney Int* **2011**, *79*, 169–178.
- [34] Yeh, P. Y.; Yeh, K.-H.; Chuang, S.-E.; Song, Y. C.; Cheng, A.-L. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF- κ B activation by protein phosphatase 4-mediated NF- κ B p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 26143–26148.

- [35] Lalier, L.; Cartron, P.-F.; Juin, P.; Nedelkina, S.; Manon, S.; Bechinger, B.; Vallette, F. M. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* **2007**, *12*, 887–896.
- [36] Baritaud, M.; Boujrad, H.; Lorenzo, H. K.; Krantic, S.; Susin, S. A. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 3166–3173.
- [37] Stöckl, P.; Zankl, C.; Hütter, E.; Unterluggauer, H.; Laun, P.; Heeren, G.; Bogengruher, E.; Herndler-Brandstetter, D.; Breitenbach, M.; Jansen-Dürr, P. Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43*, 947–958.
- [38] Cullen, K. J.; Yang, Z.; Schumaker, L.; Guo, Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr* **2007**, *39*, 43–50.
- [39] Masgras, I.; Carrera, S.; de Verdier, P. J.; Brennan, P.; Majid, A.; Makhtar, W.; Tulchinsky, E.; Jones, G. D. D.; Roninson, I. B.; Macip, S. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 9845–9854.
- [40] Kim, B.-J.; Ryu, S.-W.; Song, B.-J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 21256–21265.
- [41] Emert-Sedlak, L.; Shangary, S.; Rabinovitz, A.; Miranda, M. B.; Delach, S. M.; Johnson, D. E. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 733–742.
- [42] Denamur, S.; Tyteca, D.; Marchand-Brynaert, J.; Bambeke, F. V.; Tulkens, P. M.; Courtoy, P. J.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic Biol Med* **2011**, *51*, 1656–1665.
- [43] Yuan, X.-M.; Li, W.; Dalen, H.; Lotem, J.; Kama, R.; Sachs, L.; Brunk, U. T. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 6286–6291.
- [44] Feldstein, A. E.; Werneburg, N. W.; Canbay, A.; Guicciardi, M. E.; Bronk, S. F.; Rydzewski, R.; Burgart, L. J.; Gores, G. J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity

- by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* **2004**, *40*, 185–194.
- [45] Rebillard, A.; Lagadic-Gossmann, D.; Dimanche-Boitrel, M.-T. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem* **2008**, *15*, 2656–2663.
- [46] Zeng, H. H.; Wang, K.; Wang, B.; Zhang, Y. Studies on the thermokinetic characterisation of actin polymerization and the effect of cisplatin. *Int J Biol Macromol* **1996**, *18*, 161–166.
- [47] Gore, M. E.; Fryatt, I.; Wiltshaw, E.; Dawson, T.; Robinson, B. A.; Calvert, A. H. Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **1989**, *60*, 767–769.
- [48] Voigt, W.; Dietrich, A.; Schmoll, H.-J. Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz: Cisplatin und seine Analoga. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35(2)*, 134–143.
- [49] Burger, H.; Loos, W. J.; Eechoute, K.; Verweij, J.; Mathijssen, R. H. J.; Wiemer, E. A. C. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug. Resist. Updat.* **2011**, *14*, 22–34.
- [50] Howell, S. B.; Safaei, R.; Larson, C. A.; Sailor, M. J. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 887–894.
- [51] Furukawa, T.; Komatsu, M.; Ikeda, R.; Tsujikawa, K.; Ichi Akiyama, S. Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 3268–3278.
- [52] Safaei, R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett.* **2006**, *234*, 34–39.
- [53] Aller, S. G.; Unger, V. M. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103*, 3627–3632.
- [54] Sinani, D.; Adle, D. J.; Kim, H.; Lee, J. Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26775–26785.
- [55] Lee, J.; Petris, M. J.; Thiele, D. J. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40253–40259.

- [56] Lin, X.; Okuda, T.; Holzer, A.; Howell, S. B. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1154–1159.
- [57] Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 14298–14302.
- [58] Petris, M. J.; Mercer, J. F.; Culvenor, J. G.; Lockhart, P.; Gleeson, P. A.; Camakaris, J. Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6084–6095.
- [59] de Bie, P.; Muller, P.; Wijmenga, C.; Klomp, L. W. J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.* **2007**, *44*, 673–688.
- [60] Samimi, G.; Varki, N. M.; Wilczynski, S.; Safaei, R.; Alberts, D. S.; Howell, S. B. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5853–5859.
- [61] Aida, T.; Takebayashi, Y.; Shimizu, T.; Okamura, C.; Higashimoto, M.; Kanzaki, A.; Nakayama, K.; Terada, K.; Sugiyama, T.; Miyazaki, K.; Ito, K.; Takenoshita, S.; Yaegashi, N. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a prognostic factor in human endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **2005**, *97*, 41–45.
- [62] Samimi, G.; Safaei, R.; Katano, K.; Holzer, A. K.; Rochdi, M.; Tomioka, M.; Goodman, M.; Howell, S. B. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4661–4669.
- [63] Godwin, A. K.; Meister, A.; O'Dwyer, P. J.; Huang, C. S.; Hamilton, T. C.; Anderson, M. E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1992**, *89*, 3070–3074.
- [64] Ishikawa, T.; Ali-Osman, F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20116–20125.

- [65] Cutts, S. M.; Nudelman, A.; Rephaeli, A.; Phillips, D. R. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 73–81.
- [66] Takemura, G.; Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *49*, 330–352.
- [67] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008; Vol. 9. vollständig neu bearbeitete und erweiterte Auflage.
- [68] Dano, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, *323*, 466–483.
- [69] Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162.
- [70] Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385–427.
- [71] Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361–398.
- [72] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7750–7755.
- [73] Horio, M.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1988**, *85*, 3580–3584.
- [74] Wiese, M.; Pajeva, I. K. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 685–713.
- [75] Sharom, F. J. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* **1997**, *160*, 161–175.
- [76] Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J. P.; Boccia, J.; Casals, D.; Bertino, J. R.; Melamed, M. R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, *38*, 1277–1287.
- [77] Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216–237.

- [78] Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.
- [79] Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 219–234.
- [80] Bangham, A. D. Physical structure and behavior of lipids and lipid enzymes. *Adv. Lipid Res.* **1963**, *1*, 65–104.
- [81] Bangham, A. D. Membrane models with phospholipids. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1968**, *18*, 29–95.
- [82] Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D. A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* **1995**, *55*, 3752–3756.
- [83] Kirby, C.; Clarke, J.; Gregoriadis, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **1980**, *186*, 591–598.
- [84] Gabizon, A. A.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J. Liposome Res.* **2006**, *16*, 175–183.
- [85] Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 527–537.
- [86] Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [87] Maeda, H.; Matsumura, Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* **1989**, *6*, 193–210.
- [88] Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691–743.
- [89] Yuan, F.; Leunig, M.; Huang, S. K.; Berk, D. A.; Papahadjopoulos, D.; Jain, R. K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3352–3356.
- [90] Park, J. W.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Colbern, G.; Shalaby, R.; Baselga, J.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Moore, D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 1172–1181.

- [91] Sapra, P.; Allen, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid. Res.* **2003**, *42*, 439–462.
- [92] Abra, R. M.; Bankert, R. B.; Chen, F.; Egilmez, N. K.; Huang, K.; Saville, R.; Slater, J. L.; Sugano, M.; Yokota, S. J. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients. *J. Liposome Res.* **2002**, *12*, 1–3.
- [93] Sapra, P.; Tyagi, P.; Allen, T. M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr. Drug. Deliv.* **2005**, *2*, 369–381.
- [94] Neckers, L. M. Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. *Pathobiology* **1991**, *59*, 11–18.
- [95] Daniels, T. R.; Delgado, T.; Rodriguez, J. A.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 144–158.
- [96] Jing,; Trowbridge, Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human-transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J.* **1987**, *6(2)*, 327–31.
- [97] MacGillivray, R. T.; Moore, S. A.; Chen, J.; Anderson, B. F.; Baker, H.; Luo, Y.; Bewley, M.; Smith, C. A.; Murphy, M. E.; Wang, Y.; Mason, A. B.; Woodworth, R. C.; Brayer, G. D.; Baker, E. N. Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7919–7928.
- [98] Richardson, D. R.; Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1331*, 1–40.
- [99] Ponka, P.; Lok, C. N. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **1999**, *31*, 1111–1137.
- [100] Walz, T. http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron_Transport/Tftrtf.php, Letzter Zugriff: 09.01.2016.
- [101] Trowbridge, I. S. Transferrin receptor as a potential therapeutic target. *Prog Allergy* **1988**, *45*, 121–146.
- [102] Carbognani, P.; Rusca, M.; Romani, A.; Spaggiari, L.; Cattelani, L.; Solli, P.; Bobbio, P. Transferrin receptor expression in nonsmall cell lung cancer: histopathologic and clinical correlates. *Cancer* **1996**, *78*, 178–179.

- [103] Dowlati, A.; Loo, M.; Bury, T.; Fillet, G.; Beguin, Y. Soluble and cell-associated transferrin receptor in lung cancer. *Br J Cancer* **1997**, *75*, 1802–1806.
- [104] Tonik, S. E.; Shindelman, J. E.; Sussman, H. H. Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **1986**, *7*, 71–76.
- [105] Wrba, F.; Ritzinger, E.; Reiner, A.; Holzner, J. H. Transferrin receptor (TrfR) expression in breast carcinoma and its possible relationship to prognosis. An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **1986**, *410*, 69–73.
- [106] Habashy, H. O.; Powe, D. G.; Staka, C. M.; Rakha, E. A.; Ball, G.; Green, A. R.; Aleskandarany, M.; Paish, E. C.; Macmillan, R. D.; Nicholson, R. I.; Ellis, I. O.; Gee, J. M. W. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *119*, 283–293.
- [107] Freise, J.; Mueller, W. H.; Magerstedt, P.; Schmoll, H. J. Pharmacokinetics of liposome encapsulated cisplatin in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1982**, *258*, 180–192.
- [108] de Jonge, M. J. A.; Slingerland, M.; Loos, W. J.; Wiemer, E. A. C.; Burger, H.; Mathijssen, R. H. J.; Kroep, J. R.; den Hollander, M. A. G.; van der Biessen, D.; Lam, M.-H.; Verweij, J.; Gelderblom, H. Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation. *Eur J Cancer* **2010**, *46*, 3016–3021.
- [109] Liu, D.; He, C.; Wang, A. Z.; Lin, W. Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *Int J Nanomedicine* **2013**, *8*, 3309–3319.
- [110] Veal, G. J.; Griffin, M. J.; Price, E.; Parry, A.; Dick, G. S.; Little, M. A.; Yule, S. M.; Morland, B.; Estlin, E. J.; Hale, J. P.; Pearson, A. D.; Welbank, H.; Boddy, A. V. A phase I study in paediatric patients to evaluate the safety and pharmacokinetics of SPI-77, a liposome encapsulated formulation of cisplatin. *Br J Cancer* **2001**, *84*, 1029–1035.
- [111] Stathopoulos, G. P.; Boulikas, T. Lipoplatin formulation review article. *J Drug Deliv* **2012**, *2012*, 581363.
- [112] Newman, M. S.; Colbern, G. T.; Working, P. K.; Engbers, C.; Amantea, M. A. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **1999**, *43*, 1–7.

- [113] Terwogt, J. M. M.; Groenewegen, G.; Pluim, D.; Maliepaard, M.; Tibben, M. M.; Huisman, A.; ten Bokkel Huinink, W. W.; Schot, M.; Welbank, H.; Voest, E. E.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. M. Phase I and pharmacokinetic study of SPI-77, a liposomal encapsulated dosage form of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* **2002**, *49*, 201–210.
- [114] Bandak, S.; Goren, D.; Horowitz, A.; Tzemach, D.; Gabizon, A. Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models. *Anticancer Drugs* **1999**, *10*, 911–920.
- [115] Zamboni, W. C.; Gervais, A. C.; Egorin, M. J.; Schellens, J. H. M.; Zuhowski, E. G.; Pluim, D.; Joseph, E.; Hamburger, D. R.; Working, P. K.; Colbern, G.; Tonda, M. E.; Potter, D. M.; Eiseman, J. L. Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **2004**, *53*, 329–336.
- [116] White, S. C.; Lorigan, P.; Margison, G. P.; Margison, J. M.; Martin, F.; Thatcher, N.; Anderson, H.; Ranson, M. Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **2006**, *95*, 822–828.
- [117] Seetharamu, N.; Kim, E.; Hochster, H.; Martin, F.; Muggia, F. Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer. *Anticancer Res* **2010**, *30*, 541–545.
- [118] Boulikas, T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs* **2009**, *18*, 1197–1218.
- [119] Stathopoulos, G. P.; Boulikas, T.; Vougiouka, M.; Deliconstantinos, G.; Rigatos, S.; Darli, E.; Viliotou, V.; Stathopoulos, J. G. Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. *Oncol Rep* **2005**, *13*, 589–595.
- [120] Boulikas, T.; Stathopoulos, G. P.; Volakakis, N.; Vougiouka, M. Systemic Lipoplatin infusion results in preferential tumor uptake in human studies. *Anticancer Res* **2005**, *25*, 3031–3039.
- [121] Devarajan, P.; Tarabishi, R.; Mishra, J.; Ma, Q.; Kourvetaris, A.; Vougiouka, M.; Boulikas, T. Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals. *Anticancer Res* **2004**, *24*, 2193–2200.
- [122] Boulikas, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol Rep* **2004**, *12*, 3–12.

- [123] Casagrande, N.; Paoli, M. D.; Celegato, M.; Borghese, C.; Mongiat, M.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecol Oncol* **2013**, *131*, 744–752.
- [124] Casagrande, N.; Celegato, M.; Borghese, C.; Mongiat, M.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Preclinical activity of the liposomal cisplatin lipoplatin in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 5496–5506.
- [125] Stathopoulos, G. P.; Rigatos, S. K.; Stathopoulos, J. Liposomal cisplatin dose escalation for determining the maximum tolerated dose and dose-limiting toxicity: a phase I study. *Anticancer Res* **2010**, *30*, 1317–1321.
- [126] Jehn, C. F.; Boulikas, T.; Kourvetaris, A.; Possinger, K.; Lüftner, D. Pharmacokinetics of liposomal cisplatin (lipoplatin) in combination with 5-FU in patients with advanced head and neck cancer: first results of a phase III study. *Anticancer Res* **2007**, *27*, 471–475.
- [127] Mylonakis, N.; Athanasiou, A.; Ziras, N.; Angel, J.; Rapti, A.; Lampaki, S.; Politis, N.; Karanikas, C.; Kosmas, C. Phase II study of liposomal cisplatin (Lipoplatin) plus gemcitabine versus cisplatin plus gemcitabine as first line treatment in inoperable (stage IIIB/IV) non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2010**, *68*, 240–247.
- [128] Stathopoulos, G. P.; Antoniou, D.; Dimitroulis, J.; Michalopoulou, P.; Bastas, A.; Marosis, K.; Stathopoulos, J.; Provata, A.; Yiamboudakis, P.; Veldekis, D.; Lolis, N.; Georgatou, N.; Toubis, M.; Pappas, C.; Tsoukalas, G. Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial. *Ann Oncol* **2010**, *21*, 2227–2232.
- [129] Stathopoulos, G. P.; Antoniou, D.; Dimitroulis, J.; Stathopoulos, J.; Marosis, K.; Michalopoulou, P. Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **2011**, *68*, 945–950.
- [130] Fachinformation, *Caelyx*[®]. <http://www.fachinfo.de>, Stand: April 2015.
- [131] Fachinformation, *Myocet*[®]. <http://www.fachinfo.de>, Stand: Januar 2015.
- [132] Prescribing Information, *NUDOXA*. http://www.zydusindia.com/Nudoxa_PI.pdf, Letzter Zugriff: 09.01.2016.
- [133] Prescribing Information, *Doxil*[®]. <https://www.doxil.com/shared/product/doxil/doxil-prescribing-information.pdf>, Revised: April 2015.

- [134] Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* **2014**, *10*, 853–858.
- [135] Twelves, C. J.; Dobbs, N. A.; Aldhous, M.; Harper, P. G.; Rubens, R. D.; Richards, M. A. Comparative pharmacokinetics of doxorubicin given by three different schedules with equal dose intensity in patients with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **1991**, *28*, 302–307.
- [136] Rahman, A. M.; Yusuf, S. W.; Ewer, M. S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine* **2007**, *2*, 567–583.
- [137] Hong, R. L.; Huang, C. J.; Tseng, Y. L.; Pang, V. F.; Chen, S. T.; Liu, J. J.; Chang, F. H. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin Cancer Res* **1999**, *5*, 3645–3652.
- [138] Park, J. W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* **2002**, *4*, 95–99.
- [139] Smith, L. A.; Cornelius, V. R.; Plummer, C. J.; Levitt, G.; Verrill, M.; Canney, P.; Jones, A. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 337.
- [140] Rafiyath, S. M.; Rasul, M.; Lee, B.; Wei, G.; Lamba, G.; Liu, D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol* **2012**, *1*, 10.
- [141] Xing, M.; Yan, F.; Yu, S.; Shen, P. Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One* **2015**, *10*, e0133569.
- [142] Koch, M.; Krieger, M. L.; Stölting, D.; Brenner, N.; Beier, M.; Jaehde, U.; Wiese, M.; Royer, H.-D.; Bendas, G. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol* **2013**, *85*, 1077–1090.
- [143] Matsuo, K.; Lin, Y. G.; Roman, L. D.; Sood, A. K. Overcoming platinum resistance in ovarian carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* **2010**, *19*, 1339–1354.
- [144] Ma, P.; Mumper, R. J. Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Nano Today* **2013**, *8*, 313–331.

- [145] Krieger, M. L.; Konold, A.; Wiese, M.; Jaehde, U.; Bendas, G. Targeted doxorubicin-liposomes as a tool to circumvent P-gp-mediated resistance in ovarian carcinoma cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *48*, 442–444.
- [146] Wang, J.; Goh, B.; Lu, W.; Zhang, Q.; Chang, A.; Liu, X. Y.; Tan, T. M. C.; Lee, H. In vitro cytotoxicity of Stealth liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil on doxorubicin-resistant tumor cells. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 822–828.
- [147] Wu, J.; Lu, Y.; Lee, A.; Pan, X.; Yang, X.; Zhao, X.; Lee, R. J. Reversal of multi-drug resistance by transferrin-conjugated liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil. *J Pharm Pharm Sci* **2007**, *10*, 350–357.
- [148] Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Tarshish, M.; Zalipsky, S.; Gabizon, A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, 1949–1957.
- [149] Gaber, R. End-of-life care focus critical to a complete medical education. *J Am Osteopath Assoc* **2002**, *102*, 10.
- [150] Liu, Y.; Fang, J.; Joo, K.-I.; Wong, M. K.; Wang, P. Codelivery of chemotherapeutics via crosslinked multilamellar liposomal vesicles to overcome multidrug resistance in tumor. *PLoS One* **2014**, *9*, e110611.
- [151] Krieger, M. L.; Eckstein, N.; Schneider, V.; Koch, M.; Royer, H.-D.; Jaehde, U.; Bendas, G. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int. J. Pharm.* **2010**, *389*, 10–17.
- [152] Stölting, D. P.; Borrmann, M.; Koch, M.; Wiese, M.; Royer, H.-D.; Bendas, G. How liposomal Cisplatin overcomes chemoresistance in ovarian tumour cells. *Anticancer Res* **2014**, *34*, 525–530.
- [153] Stölting, D. P.; Koch, M.; Wiese, M.; Royer, H.-D.; Bendas, G. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther* **2014**, *52*, 78–81.
- [154] Bendas, G.; Krause, A.; Bakowsky, U.; Vogel, J.; Rothe, U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J. Pharm.* **1999**, *181*, 79–93.
- [155] Dittmer, J. C.; Lester, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids in thin-layer chromatograms. *J. Lipid. Res.* **1964**, *15*, 126–127.

- [156] Hansen, C. B.; Kao, G. Y.; Moase, E. H.; Zalipsky, S.; Allen, T. M. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1239*, 133–144.
- [157] Allen, T. M.; Sapra, P.; Moase, E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2002**, *7*, 889–894.
- [158] Nellis, D. F.; Giardina, S. L.; Janini, G. M.; Shenoy, S. R.; Marks, J. D.; Tsai, R.; Drummond, D. C.; Hong, K.; Park, J. W.; Ouellette, T. F.; Perkins, S. C.; Kirpotin, D. B. Preclinical manufacture of anti-HER2 liposome-inserting, scFv-PEG-lipid conjugate. 2. Conjugate micelle identity, purity, stability, and potency analysis. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 221–232.
- [159] Nellis, D. F.; Ekstrom, D. L.; Kirpotin, D. B.; Zhu, J.; Andersson, R.; Broadt, T. L.; Ouellette, T. F.; Perkins, S. C.; Roach, J. M.; Drummond, D. C.; Hong, K.; Marks, J. D.; Park, J. W.; Giardina, S. L. Preclinical manufacture of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-inserting conjugate. 1. Gram-scale production and purification. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 205–220.
- [160] Constantinides, P. P.; Yiv, S. H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. *Int. J. Pharm.* **1995**, *115*, 225–234.
- [161] Ames, D. D., B. The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 769–775.
- [162] Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83* (2), 346–356.
- [163] Kloft, C.; Appelius, H.; Siegert, W.; Schunack, W.; Jaehde, U. Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay. *Ther. Drug. Monit.* **1999**, *21*, 631–637.
- [164] Pieck, A. Ph.D. thesis, Universität Bonn, 2004.
- [165] Garmann, D. Ph.D. thesis, Universität Bonn, 2007.
- [166] Brouwers, E. E. M.; Tibben, M.; Rosing, H.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical pharmacological oncology research. *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 67–100.

- [167] Mueller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 506–515.
- [168] Muscolini, M.; Cianfrocca, R.; Sajeve, A.; Mozzetti, S.; Ferrandina, G.; Costanzo, A.; Tuosto, L. Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* **2008**, *7*, 1410–1419.
- [169] Schneider, V. Ph.D. thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2012.
- [170] Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; Cree, I. A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1995**, *10*, 29–34.
- [171] Garmann, D.; Warnecke, A.; Kalayda, G. V.; Kratz, F.; Jaehde, U. Cellular accumulation and cytotoxicity of macromolecular platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *J Control Release* **2008**, *131*, 100–106.
- [172] Kalayda, G. V.; Wagner, C. H.; Buss, I.; Reedijk, J.; Jaehde, U. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 175.
- [173] Hamelers, I. H. L.; Staffhorst, R. W. H. M.; Voortman, J.; de Kruijff, B.; Reedijk, J.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; de Kroon, A. I. P. M. High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 1259–1268.
- [174] Koch, M. Ph.D. thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2013.
- [175] Liang, X.-J.; Finkel, T.; Shen, D.-W.; Yin, J.-J.; Aszalos, A.; Gottesman, M. M. SIRT1 contributes in part to cisplatin resistance in cancer cells by altering mitochondrial metabolism. *Mol Cancer Res* **2008**, *6*, 1499–1506.
- [176] Yuan, J.; Luo, K.; Liu, T.; Lou, Z. Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev* **2012**, *26*, 791–796.
- [177] Lane, A. A.; Chabner, B. A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* **2009**, *27*, 5459–5468.
- [178] Carew, J. S.; Giles, F. J.; Nawrocki, S. T. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* **2008**, *269*, 7–17.
- [179] Deavall, D. G.; Martin, E. A.; Horner, J. M.; Roberts, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* **2012**, *2012*, 645460.

- [180] Konold, A. *Die Targetierung von Doxorubicin-Liposomen zur Untersuchung und Überwindung rezeptorvermittelter Zytostatikaresistenzen von Tumorzellen*, Diplomathesis, 2008.
- [181] Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Grenader, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci* **2012**, *45*, 388–398.
- [182] Karukstis, K. K.; Thompson, E. H.; Whiles, J. A.; Rosenfeld, R. J. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys Chem* **1998**, *73*, 249–263.
- [183] Mankhetkorn, S.; Dubru, F.; Hesschenbrouck, J.; Fiallo, M.; Garnier-Suillerot, A. Relation among the resistance factor, kinetics of uptake, and kinetics of the P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin, daunorubicin, 8-(S)-fluoroidarubicin, and idarubicin in multidrug-resistant K562 cells. *Mol Pharmacol* **1996**, *49*, 532–539.
- [184] Mohan, P.; Rapoport, N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm* **2010**, *7*, 1959–1973.
- [185] Nagasawa, K.; Nomiya, M.; Ohnishi, N.; Yokoyama, T.; Iwakawa, S.; Okumura, K. Transport mechanism of anthracycline derivatives in rat polymorphonuclear leukocytes: uptake and efflux of pirarubicin. *Biol Pharm Bull* **1994**, *17*, 696–700.
- [186] Klinkhammer, W.; Müller, H.; Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of a small molecule library of 3rd generation multidrug resistance modulators. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 2524–2535.

Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Krieger, M.L.; Eckstein, N.; Schneider, V.; Koch, M.; Royer, H.-D.; Jaehde, U.; Bendas, G. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int. J. Pharm.* **2010**, *389*, 10-17.

Krieger, M.L.; Konold, A.; Wiese, M.; Jaehde, U.; Bendas, G. Targeted doxorubicin liposomes as a tool to circumvent P-gp-mediated resistance in ovarian carcinoma cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *48*, 442-444.

Koch, M.; Krieger, M.L.; Stölting, D.; Brenner, N.; Beier, M.; Jaehde, U.; Wiese, M.; Royer, H.-D.; Bendas, G. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol.* **2013**, *85*, 1077-1090.

Stölting, D.P.; Borrmann, M.; Koch, M.; Wiese, M.; Royer, H.-D.; Bendas, G. How liposomal Cisplatin overcomes chemoresistance in ovarian tumour cells. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 525-530.

Buchbeiträge

Krieger, M.L.; Arzneistoffprofile: Acarbose, Amiodaron, Propafenon, In: Ammon, Mutschler, Scholz. Arzneimittelinformation und -beratung, 7. Aktualisierungslieferung, *Deutscher Apothekerverlag*, Stuttgart, **2010**.

Krieger, M.L.; Arzneistoffprofil: Adenosin, In: Ammon, Mutschler, Scholz. Arzneimittelinformation und -beratung, 8. Aktualisierungslieferung, *Deutscher Apothekerverlag*, Stuttgart, **2011**.

Poster und Kongressbeiträge

Krieger, M.L., Wirth A., Drescher A., Müller H., Kassack M.U., Jaehde U. and Bendas G., The use of cisplatin-liposomes to investigate and overcome chemoresistance of tumour cells, 17th Mountain/Sea Liposome Workshop, Ameland (NL), **2006**, (Vortrag)

Krieger, M.L., Wirth A., Drescher A., Müller H., Kassack M.U., Jaehde U. and Bendas G., The use of cisplatin-liposomes to investigate and overcome chemoresistance of tumour cells, *DPhG-Jahrestagung*, Marburg, **2006** (Poster)

Krieger M.L., Konold A.; Sterz K.; Müller H.; Jaehde U.; Wiese M. and Bendas G.; Cytostatic containing liposomes to investigate and overcome chemoresistance of tumour cells, *DPhG-Jahrestagung*, Erlangen, **2007** (Poster)

Krieger M.L.; Konold A.; Wiese M. and Bendas G., The use of doxorubicin-liposomes to investigate and overcome chemoresistance of tumour cells, *18th Mountain/Sea Liposome Workshop*, Oberjoch, **2008** (Vortrag)

Krieger M.L.; Konold A.; Schneider V.; Wiese M.; Jaehde U. and Bendas G., Doxorubicin-liposomes as a tool to investigate and overcome chemoresistance of tumour cells, *Cesar-Jahrestagung*, Heidelberg, **2009** (Poster)

Krieger M.L.; Schneider V.; Jaehde U. and Bendas G., Cisplatin containing liposomes as a tool to investigate the mechanisms of chemoresistance of tumour cells, *20th Mountain/Sea Liposome Workshop*, Ameland (NL), **2009**, (Vortrag)

Krieger M.L.; Schneider V.; Kalayda G.V.; Jaehde U. and Bendas G., Cisplatin containing liposomes to investigate the mechanisms of chemoresistance in tumour cells, *DPhG-Jahrestagung*, Braunschweig, **2010** (Vortrag)

Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet.

Weinheim,

Michaela Lilian Borrmann