

KOMBINATORISCHE WIRKSTOFFTESTUNG

**Entwicklung eines neuartigen diffusions-
gestützten Bioassays &
Einfluss von Kinaseinhibitoren
auf die T-Zell-Signaltransduktion**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von Alexander Ganser
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

vorgelegte

Dissertation

2009

Tag der

mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2008

Dekan: Prof. Dr. H. A Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Brock

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nordheim

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Professor Dr. Roland Brock in der Zeit von Februar 2005 bis zum Juli 2008 am Institut für molekulare Zellbiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und dem Nijmegen Centre for Molecular Life Science der Universitätsklinik der Radboud Universität Nimwegen angefertigt.

DANKSAGUNG

Für die Aufnahme als Doktorand, die Betreuung der Doktorarbeit und Bereitstellung der Projektthemen möchte ich mich besonders bei Professor Dr. Roland Brock, Professor Dr. A. Nordheim, Professor Dr. Karl-Heinz Wiesmüller und Dr. Günter Roth bedanken.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Brock danken, die ich während meiner Dissertation kennenlernen durfte.

Joris Witsenburg, bei dem ich während meiner Anfangszeit in den Niederlanden zwei Wochen Unterkunft auf der Wohnzimmercouch fand, Ivo Rutteolk der mir immer schlagende Argumente lieferte, Michael Sinziger, welcher mir mit treffenden Formulierungen aushalf, Yi-Da Chung der mir asiatische Gelassenheit lehrte sowie Heike Glauner, mit der ich zeitweise eine Fahrtgemeinschaft bildete.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch Falk Duchhardt, Jenny van Oostrum, Petra Bovee, Giel Bosmann, Wim van Grip, Dr. Thomas Andre, Dr. Rainer Fischer, Antje Hoff, Dr. Mariola Fotin-Mleczek, Dr. Oda Stoevesandt, Dr. Söhnke Voss und Susanne Wolf. Bei ihnen möchte ich mich vor allem für die heitere und anregende Atmosphäre bedanken.

Besonders möchte ich ebenfalls bei den Studenten Janneke Hilderink, Joost J. G. Wammes und Ralph Jaspers danken, die mir während ihrer Praxisaufenthalte in unserer Arbeitsgruppe unterstützend zur Seite gestanden haben.

Dr. Ingo Müller möchte ich außerdem großen Dank für die Bereitstellung von Chemotherapeutika, Zelllinien und Anmerkungen bezüglich der Anwendung unserer Methode aussprechen.

Bei Herrn Joost van Galen und Dr. Frank van der Leeuwen möchte ich mich ebenfalls für die gute Kooperation, die mir den Einstieg in die neue Arbeitsumgebung in Nijmegen erleichtert hat, sowie zusätzliche Motivation in den letzten Monaten der Dissertation bedanken.

Weiterer Dank gebührt Thomas Peter, der mir durch die freundliche Bereitstellung von Kollagen Typ I eine immer gleichbleibende Zelleinbettung während meiner Dissertation gewährleisten konnte. Er, sowie Dr. Johanna Schanz standen mir beim Feinschliff der Arbeit zudem lektorierend und beratend zur Seite – vielen Dank!

Für die finanzielle Unterstützung danke ich unter anderem dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für das Projekt „Diffusionsplattform“ FKZ 13N8647 und der Volkswagenstiftung (I 77472).

Vor allem danke meiner ganzen Familie, die mich immer unterstützt hat. Besonders meinen Eltern, die immer an mich glaubten und meine lange Ausbildung, die für sie nicht selbstverständlich war, lange mitgetragen haben.

Zuletzt möchte ich mich meiner Frau Miriam bedanken, die mich während meines Aufenthalts in Nijmegen heiratete, mit mir eine Wochenendeheliche führen musste, stets Geduld mit mir hatte und die unserem Sohne Emil das Leben schenkte.

Mit Ihrem Organisationstalent, ihrer Klugheit und ihrer Arbeit als Lektorin hat sie zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ausgangssituation.....	1
1.2 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....	2
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1 Überblick über Krebskrankheiten.....	4
2.2 Leukämie.....	7
2.3. Behandlungsarten der Leukämie.....	11
2.3.1. Chemotherapeutika.....	13
2.3.1.1 Antimetabolite.....	13
2.3.1.2 Genotoxische Substanzen.....	14
2.3.1.3 Mikrotubulimodifizierende Substanzen.....	15
2.3.1.4 Kinaseinhibitoren.....	16
2.4. In-vitro Testsysteme.....	20
2.4.1 Hochdurchsatzverfahren.....	20
2.4.2 Kombinatorische Wirkstofftestung.....	25
2.4.3. Mikrosystemtechnik.....	28
2.4.3.1 Diffusion und Gradienten in in-vitro Testsystemen.....	30
2.5 Diffusion	42
2.6 T-Zell-Signaltransduktion.....	45

3. Material und Methoden.....	49
3.1. Materialauflistung.....	49
3.1.1 Einsatz der Diffusion Devices in eine 12-Loch-Zellkultur- platte.....	49
3.1.2 Aufzeichnung der Konzentrationsgradienten.....	50
3.1.3 Zelleinbettung in ein Kollagen-Hydrogel.....	50
3.1.4 Apoptosenachweis im Diffusion Device.....	51
3.1.5 MTT-Test.....	51
3.1.6 Bild- und Datenverarbeitung.....	52
3.1.7 Anti-CD3/CD28 T-Zellstimulation unter Verwendung von Kinaseinhibitoren.....	52
3.1.8 IL-2 ELISA.....	53
3.1.9 Aufreinigung von CD4+ T-Zellen aus einer Blutprobe.....	54
3.1.10 Verwendete Chemotherapeutika.....	54
3.1.11 Zelllinien.....	56
3.2. Methoden.....	58
3.2.1 Der Diffusion Device.....	58
3.2.2 Einsatz der Diffusion Devices in einer 12-Loch Zellkulturplatte.....	59
3.2.3 Aufzeichnung der Konzentrationsgradienten.....	63
3.2.4 Zelleinbettung in ein Kollagen-Hydrogel.....	64
3.2.5 Apoptosenachweis im Diffusion Device.....	64
3.2.6. MTT-Test.....	67
3.2.6.1 MTT-Test im Diffusion Device.....	67

3.2.6.2 MTT-Test in der Mikrotiterplatte.....	68
3.2.7 MTT-Ausleseverfahren im Diffusion Device.....	69
3.2.8. Bild- und Datenverarbeitung.....	69
3.8.2.1 Bestimmung von Diffusionskonstanten und EC ₅₀ - Werten.....	69
3.8.2.2 Erstellen von 3D-Dosis-Wirkungs-Diagrammen.....	71
3.8.2.3 Kombinationsindex und EC ₅₀ nach Chou.....	72
3.2.9 Anti-CD3/28 Antikörper T-Zell-Stimulation unter Verwendung von Kinaseinhibitoren.....	75
3.2.10 IL-2 ELISA.....	76
3.2.11 Aufreinigung von CD4 ⁺ T-Zellen aus einer Blutprobe.....	76
4. Ergebnisse und Diskussion.....	78
4.1. Diffusion Device.....	78
4.1.1 Charakterisierung des Diffusion Device.....	78
4.1.2 Konzentrationsbestimmung der Doxorubicingradienten.....	85
4.1.3. Implementierte Zelltests.....	89
4.1.3.1 Apoptosenachweis.....	91
4.1.3.2 MTT-Test.....	99
4.2 Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die T-Zell-Signaltransduktion bei unterschiedlicher Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern	110
5. Zusammenfassung und Fazit.....	116
5.1 Diffusion Device.....	116

5.2 Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die T-Zell-Signaltransduktion bei unterschiedlicher Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern.....	120
--	-----

Literaturverzeichnis

Anhang

Lebenslauf

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1:	Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanomischen Hautkrebs in Deutschland 2004.....	5
Abb. 2.2:	Verlauf der Hämatopoese mit beteiligten Wachstumsfaktoren..	8
Abb. 2.3:	ALL 1986-1994, AML 1976-1984 und 1986-1994.....	9
Abb. 2.4:	AML 2000-2005.....	9
Abb. 2.5:	Zeitleiste der Kinaseinhibitorentwicklung.....	20
Abb. 2.6:	Entwicklung der Hochdurchsatzstrategie bei Pfizer von Mitte der 80er Jahre bis 2001.....	22
Abb. 2.7:	Betrachtung der Pipettierschritte in Kombinations- und Einzelsubstanzmessungen.....	28
Abb. 2.8:	Prinzip des Agar Diffusionstest.....	30
Abb. 2.9:	Chemotaxisversuch mit der Mikropipetten-Methode.....	32
Abb. 2.10:	Auf der Boyden Kammer basierender Transwell Assay.....	32
Abb. 2.11:	Darstellung einer Zigmondkammer.....	33
Abb. 2.12:	Prinzip des Verarmungsgradienten.....	34
Abb. 2.13:	Passive Gradientenbildung mit membrangeschützten Diffusionsraum.....	36
Abb. 2.14:	Schema eines T-Sensors (a) und eines Vormischer-Gradientenbildners (b) und eines Universal Gradientenbildners (c).....	38
Abb. 2.15:	Schema der T-Zell-Signaltransduktion einer CD4 ⁺ T-Helferzelle.....	48
Abb. 3.1:	Verschiedene Darstellungen des Diffusion Device.....	59
Abb. 3.2:	Hilfsmittel zur Aufbringung der Diffusion Devices.....	60
Abb. 3.3:	Einsatz der Diffusion Devices in eine 12-Loch-Zellkulturplatte.....	62
Abb. 3.4:	Schema einer CFSE-Färbung.....	66
Abb. 3.5:	MTT vor und nach der Reduktion zu einem Formazansalz.....	67
Abb. 3.6:	Darstellung einer Errorfunktion.....	70

Abb. 3.7:	Darstellung des Dose-Response Fits innerhalb der Origin Software.....	71
Abb. 3.8:	Erstellung eines 3D-Dosis-Wirkungs-Diagramms.....	73
Abb. 3.9:	Kombinationsindex-Beispieldiagramm.....	75
Abb. 4.1:	Fluorophorgradienten.....	80
Abb. 4.2:	Kalibration des Diffusion Device.....	81
Abb. 4.3:	Diffusionsverläufe und -koeffizienten.....	82
Abb. 4.4:	Diffusionskoeffizienten für Rhodamin und Fluoreszein.....	83
Abb. 4.5:	Theoretische Betrachtung der Konzentrationsverteilung.....	84
Abb. 4.6:	Gradientenbildung mit verschiedenen Lösungsmitteln.....	85
Abb. 4.7:	Vorraussage der Konzentrationsverläufe.....	86
Abb. 4.8:	Verdünnungsfaktoren für Doxorubicin im Diffusion Device.....	89
Abb. 4.9:	Zellverteilung ohne Kollagen und Fluoreszenzfärbungen mit Annexin und Propidiumiodid.....	90
Abb. 4.10:	Zellverteilung in einem Kollagengel.....	91
Abb. 4.11:	Propidiumiodidfärbung in Abhängigkeit eines Doxorubicingradienten.....	92
Abb. 4.12:	Crosstalk von Doxorubicin und Propidiumiodid.....	93
Abb. 4.13:	Zellfärbungen mit Syto® und Sytox® Green.....	93
Abb. 4.14:	Annexin-Alexa 647 und CFSE Färbung.....	95
Abb. 4.15:	Doxorubicin-Antwortprofile.....	96
Abb. 4.16:	Apoptosenachweis-Kombinationsexperimente mit Doxorubicin, Methotrexat und Paclitaxel.....	97
Abb. 4.17:	Zelllinienspezifische Unterschiede der doxorubicin-induzierten Apoptosesensitivität.....	98
Abb.4.18:	Bestimmung der optimalen Konzentration für einen MTT-Test im Diffusion Device.....	100
Abb. 4.19:	Zellvitalität über der Diffusionsdistanz und Konzentration bei verschiedenen Zelldichten.....	101
Abb. 4.20:	EC ₅₀ -Werte aus Versuchen mit verschiedenen Zelldichten im Diffusion Device.....	101

Abb. 4.21:	Vergleichsexperimente in Mikrotiterplatten zur Zelldichte-abhängigkeit des EC_{50} -Werte.....	102
Abb. 4.22:	Abhängigkeit der EC_{50} -Konzentration von verschiedenen Zelldichten und der Einbettung in Kollagen.....	103
Abb. 4.23:	Vergleich von Diffusion Device mit Mikrotiterplatten generierten 3D-Wirkungsprofilen.....	104
Abb. 4.24:	EC_{50} -Werte aus Mikrotiterplatten Experimenten und Diffusion Device für Molt-4 und KG1a Zellen.....	105
Abb. 4.25:	Vergleich von Dosis-Wirkungs-Profilen von 6 Leukämie Zelllinien.....	106
Abb. 4.26:	Vergleich der 3D-Dosis-Wirkungs-Profile von KG1a und Molt-4 Zellen.....	107
Abb. 4.27:	Kombinationsindices für Mikrotiterplatten- und Diffusion Device-Experimente.....	109
Abb. 4.28	Testung von primären Krebszellen im Diffusion Device.....	110
Abb. 4.29:	Stimulusabhängigkeit der IL-2 Expression -Test von Inhibitoren der NFAT-Aktivierung in der T-Zell-Signaltransduktion.....	114
Abb. 4.30:	Stimulusabhängigkeit der IL-2 Expression-Test verschiedener pharmakologischer Kinaseinhibitoren.....	115

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1:	Geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2004.....	5
Tab. 2.2:	Eigenschaften von zellbasierten und zellfreien in-vitro Tests in Hochdurchsatzverfahren	23
Tab. 2.3:	Auswahl zellfreier und zellbasierter in-vitro Testverfahren.....	24
Tab. 2.4:	Vergleich von Gradientenbildnern.....	41
Tab. 4.1:	Ergebnisse aus den Doxorubicin-Diffusionsmessungen....	87
Tab. 4.2:	Konzentrationswerte für verschiedene Startkonzentrationen und Inkubationszeiten.....	88
Tab. 5.1:	IC ₅₀ -Literaturwerte einiger der verwendeten Kinaseinhibitoren.....	121

ABKUERZUNGSVERZEICHNIS

AGC	cAMP-Dependent Protein Kinases A, cGMP-Dependent Protein Kinases G, and Phospholipid-Dependent Protein Kinases C
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AP1	Activator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCR-ABL	Breakpoin Cluster Region – Abelson Murin Leukemia
CAD	Computer Aided Design
CAMK	Calmodulin abhängige Kinase
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclinabhängige Kinase
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CK1	Casein Kinase 1
CLK	Cdc2 Like Kinase
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNC	Computerized Numerical Control
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CSK	C-terminale src-Kinase
D	Diffusionskoeffizient
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FCCP	Carbonyl Cyanid 4-Trifluormethoxy Phenylhydrazon
Gab2	GRB2-Associated Binding Protein 2
GEF	Guanin Nukleotid Exchange Factor

GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HTS	Highthroughput Screening
IL-2	Interleukin 2
INF	Interferon
IP3	Inositol-3-Phosphat
ITAM	Immun Receptor Tyrosine Based Activation Motif
ITK	IL-2 Inducible T-Cell Kinase
L	Liter
LAT	Linker of Activation in T-Cells
Lck	Lymphocyte Specific Protein Tyrosin Kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NCI	National Cancer Institutes
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
nm	Nanometer
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin Homologe
PLCγ	Phospho Lipase C Gamma
PTB	Phosphotyrosin Binding

Ras	Rat sarcoma
Rpm	Rounds per Minute
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SH	Src Homology
SLP-76	SH2 Domain Containing Leukocyte Protein of 76 kDa
Src	Genname im Rous Sarkom Virusgenom, kodiert für eine Src-Kinase
Syk	Spleen Tyrosin Kinase
TCR	T-Cell Receptor
TK	Tyrosin Kinase
TKL	Tyrosin Kinase Like
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WASP	Wilcott-Aldrich Syndrom Protein
WIP	WASP Interacting Protein
μ l	Microliter
μ m	Micrometer
ZAP 70	Zeta chain associated Protein 70 kD

ABSTRACT

In experiments with combinations of substances, pipetting steps in standard micro plate methods increases exponentially with the number of substances and the concentrations which should be tested. Minimizing these pipetting steps in combinatorial experiments could mean a good improvement for further methodical development.

In the clinical application of chemotherapeutics primarily empirical findings are crucial. Thereby patient subgroups which don't or less respond to a certain drug combination are often not considered. The approach of the preclinical method presented in this dissertation with which individual patient responses could be foreknown, can be an important development in the treatment of cancer patients.

To reach these aims the phenomena of diffusion has been employed. Therefore a so called "diffusion device" has been invented. Due to an orthogonal arrangement of two diffusion directions we had the ability to create many substance mixtures.

In this present dissertation the handling and function of the "diffusion device" has been optimized and a cell based bioassay has been implemented. Potential application areas for this approach are the secondary screening of drug candidates or the application in the field of individualized diagnostic.

To accomplish this, first steps had been validation of all diffusion parameters of the diffusion device. Then chemotherapeutic substances were tested against cancer cell lines and primary cancer cells. The implemented bioassays were an annexin linked apoptosis assay and a MTT-cytotoxicity assay. Priority laid on simple handling and low equipment usage. The next step after implementation of the bioassays has been an implementation of parallelization with which the testing of several cell lines or drug combinations at once could be showed.

In addition of the microarray work "stimulus dependence of the action of small-molecule inhibitors in the CD3/CD28 signaling network" (Kohler et al. 2008) combination experiments were carried out with t-cells. It was the aim to prove that different t-cell stimuli can lead to an unexpected result in kinase inhibitor testing. Therefore several kinase inhibitors had been applied as well as ciclosporin and FK506 under different stimuli ratios of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. As readout the expression of the cytokine IL-2 had been measured. Additionally some pharmacological kinase inhibitors which were not included in the microarray work of Kohler et al. had been used.

1. Einleitung

Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden im Zeitraum von Februar 2005 bis August 2008 am interfakultären Institut für molekulare Zellbiologie der Universität Tübingen und am Nijmegen Centre for Molecular Life Science (NCMLS) der Radboud Universität Nijmegen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Brock angefertigt.

Prof. Dr. Brocks Forschungsschwerpunkt liegt auf der Aufklärung von Signaltransduktionsprozessen innerhalb von T-Zellen auf molekularer Ebene. Hierzu werden verschiedene neue Vorgehensweisen entwickelt und angewendet. Neben Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie beschäftigt sich die Gruppe mit Peptid Mikroarrays und Mikrostrukturierungen von Oberflächen mit funktionellen Biomolekülen. Mit zellgängigen Peptiden und pharmakologischen Inhibitoren wird der Einfluss einzelner Stufen der Signalkaskade auf die übergeordnete Zellreaktion getestet. Für die Aufnahme von Peptiden wurde dabei eine umfassende Expertise im Bereich Cell Penetrating Peptides (CPP) aufgebaut.

1.1 Ausgangssituation

Im Rahmen der T-Zell-Signaltransduktion reagiert die Zelle auf eine Vielzahl von externen Signalen, welche in eine gerichtete Zellantwort gelenkt werden müssen. Dem entsprechend werden in diesem Bereich vermehrt Kombinationsexperimente mit mehreren Signalmolekülen durchgeführt. Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeiten summiert sich die Anzahl der entsprechenden Pipettierschritte schnell auf. Die Zahl der Pipettierschritte in Kombinationsexperimenten zu minimieren, nicht nur bei der T-Zell-Signaltransduktion, kann in Zukunft eine methodische Weiterentwicklung bedeuten.

In der klinischen Anwendung von Chemotherapeutika sind in erster Linie empirische Erkenntnisse, die in klinischen Studien gewonnen werden, entscheidend. Dabei können Patienten-Untergruppen, in denen eine Kombination von Chemotherapeutika keine oder nur eine verringerte Wirkung zeigen, oftmals nicht berücksichtigt werden. Der Ansatz, der in dieser Dissertation vorgestellten präklinische Methode, mit welcher patientenspezifisches Ansprechen auf Chemotherapeutika-Kombinationen voraus-

gesagt werden kann, kann einen entscheidend Fortschritt in der Behandlung von Krebspatienten bedeuten.

Zum Erreichen dieser Ziele wird sich das Phänomen der Diffusion zu Nutze gemacht. Auf diesem Ansatz basierend entstand der erste Prototyp des Diffusion Device, welcher auf eine gelartige Matrix aufgesetzt, über eine rechtwinklige Anordnung von zwei Diffusionsrichtungen Mischungsverhältnisse generiert (Brock 2004).

In dieser Dissertation sollte zum einen die Handhabung und Funktionsweise des Diffusion Device optimiert werden. Daneben war die Implementierung eines Bioassays, mit dem Kombinationsexperimente mit minimalem Aufwand durchgeführt werden können, von besonderer Wichtigkeit. Hierbei ist die entstehende Zeit- und Materialersparnis besonders hervorzuheben.

1.2 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Ziel, der in dieser Dissertation vorgestellten Arbeiten war es, die Diffusionsparameter des Devices zu validieren und Substanzkombinationen auf ihre chemotherapeutischen Potentiale im Diffusion Device zu testen. Ein mögliches Anwendungsgebiet des Diffusion Device stellt das Sekundärscreening in der Entwicklung von Kombinationswirkstoffen dar. Daneben kann mit Hilfe des Diffusion Device eine individuelle Diagnostik bei der Krebsbehandlung ermöglicht werden.

In dieser Arbeit wurden Kombinationen aus etablierten Chemotherapeutika auf Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen getestet. Da bei Krebspatienten hohe Variationen in der Reaktion auf eine spezielle Behandlungsart vorherrschen (Woodcock 2007;Yong, Innocenti, & Ratain 2006) kann sich eine Optimierung der Behandlung entscheidend auf den Therapieerfolg auswirken. Selbst bei gut behandelbaren Krebsarten wie Leukämien gibt es Patientenuntergruppen, die auf den Standardbehandlungsplan schlechter, oder mit häufigeren Rückfällen reagieren (Downing & Mullighan 2006). Der Diffusion Device soll in der klinischen Diagnostik den empirischen Ansatz des Einsatzes von Chemotherapeutika ergänzen und so helfen, die Therapie mit in Kombination eingesetzten Wirkstoffen zu verbessern.

Bei den in den Device implementierten zellbasierten in-vitro Tests, handelt es sich um einen annexinbasierten Apoptosenachweis und einen MTT-Zytotoxizitätstest. Damit kann eine diagnostisch relevante Aussage über Wirkungen von Wirkstoff-

kombinationen getroffen werden. Die einfache Handhabung und ein geringer Geräteinsatz wurden hierbei priorisiert.

Abschließend beschäftigt sich diese Dissertation mit der Verwirklichung der Parallelisierung der Bioassays. Mit dieser können mehrere verschiedene Zelltypen oder Substanzkombinationen gleichzeitig getestet werden. Dieses Testsystem, welches eine präklinische Diagnostik von Patientenzellen in einer geringen zeitlichen und räumlichen Nähe zuließe, könnte einen deutlichen Fortschritt in der Therapie von Krebspatienten bedeuten.

Des Weiteren kann der Diffusion Device bei Chemotaxisexperimenten und der Anwendung von Gradienten aus Morphogenen eingesetzt werden, um dort methodische Optimierungsmöglichkeiten zu erlangen.

Zur Ergänzung der Mikroarraystudie „Stimulus dependence of the action of small-molecule inhibitors in the CD3/CD28 signalling network“ (Kohler et al. 2008) wurden zudem Kombinationsexperimente mit T-Zellen durchgeführt. Ziel war es, nachzuweisen, dass bei der Kinaseinhibitortestung unterschiedliche Zellstimulationen zu unerwarteten Ergebnissen führen können. Selten wird der Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse von Stimuli berücksichtigt, wenn es um die Testdurchführung von neuen Wirkstoffen, wie zum Beispiel Kinaseinhibitoren, geht. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Kinaseinhibitoren sowie Ciclosporin und FK506 eingesetzt, um unter unterschiedlichen Stimulationsverhältnissen von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern die IL2-Sekretion in Jurkat-Zellen und primären CD4⁺ Zellen zu beobachten. Zusätzlich wurden pharmakologische Kinaseinhibitoren getestet, die nicht Bestandteil dieser Mikroarraystudie waren.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Überblick über Krebskrankheiten

Krebszellen zeichnen sich durch unkontrolliertes Wachstum und unabhängig vom Gewebeverbund fortschreitende Zellteilung aus. Dies gilt für alle Neoplasmen, sowohl für benigne (nicht streuend) als auch für maligne (streuend). Neoplasmen werden alle Arten von abnormalem Zellwachstum genannt. Maligne Neoplasmen können darüber hinaus metastasieren, d. h. in andere Bereiche des Körpers gelangen und weiter proliferieren. (Blume-Jensen & Hunter 2001).

Jedes Gewebe oder Organ kann Ausgangspunkt der Entwicklung einer entarteten, krebsartigen Zelle sein. Dementsprechend gibt es viele Krebsarten unterschiedlichen Ursprungs.

Krebsarten können in drei große Bereiche unterteilt werden: Karzinome, Leukämien und Sarkome. Karzinome beschreiben Krebsarten, die sich aus Epithelzellen entwickeln. Sie machen 90% aller Krebserkrankungen aus. Leukämien betreffen die blutbildenden Zellen des Körpers und haben einen Anteil von 8% aller Krebserkrankungen (Deschler & Lubbert 2006; Hunter 2007; Van Etten 2007). Sarkome sind dadurch charakterisiert, dass sie in Binde- und faserigem Gewebe wie Muskeln und Knochen vorkommen. Sie machen den geringsten Anteil der Krebserkrankungen aus. Als Schwerpunkt dieser Dissertation wird der Bereich der Leukämien anschließend genauer betrachtet. Nachfolgende Tabelle (Tab. 2.1) und Grafik (Abb. 2.1) geben einen Überblick über die Häufigkeit und Verteilung von Krebserkrankungen in Deutschland.

Krebserkrankungen entstehen nach heutigem Verständnis aus kumulierten genetischen Veränderungen innerhalb einer Zelle bzw. einer Stammzelle, die sich meist in speziellen Nischen befinden und damit monoklonalen Ursprungs sind. Je nach Krebsart müssen sich 3–20 Mutationen anhäufen, welche die Regulation des Zellteilungszyklus betreffen. Krebsstammzellen wurden mittlerweile in vielen verschiedenen Krebsarten nachgewiesen (Finkel, Serrano, & Blasco 2007; Hanahan & Weinberg 2000; Humphries & Wright 2008; Jagani & Khosravi-Far 2008; Kavalierchik, Goff, & Jamieson 2008; Lobo et al. 2007).

Tab. 2.1: Geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2004
(Batzler et al. 2008)

ICD = Internationale Klassifikation der Krankheiten

Lokalisation	ICD-10	Männer	Frauen
Mundhöhle und Rachen	C00–C14	7.620	2.780
Speiseröhre	C15	3.880	1.050
Magen	C16	11.000	7.780
Darm	C18–C21	37.250	36.000
Bauchspeicheldrüse	C25	6.320	6.620
Kehlkopf	C32	2.990	390
Lunge	C33, C34	32.850	13.190
Maligne Melanom der Haut	C43	6.520	8.380
Brustdrüse der Frau	C50		57.230
Gebärmutterhals	C53		6.190
Gebärmutterkörper	C54, C55		11.700
Eierstöcke	C56		9.660
Prostata	C61	58.570	
Hoden	C62	4.750	
Niere und ableitende Harnwege	C64–C66, C68	10.750	6.500
Harnblase*	C67, D09.0, D41.4	21.410	7.340
Schilddrüse	C73	1.520	3.540
Morbus Hodgkin	C81	1.040	940
Non-Hodgkin-Lymphome	C82–C85	6.780	6.070
Leukämien	C91–C95	4.810	4.300
Alle bösartigen Neubildungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs	C00–C97 o. C44	230.500	206.000

* einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

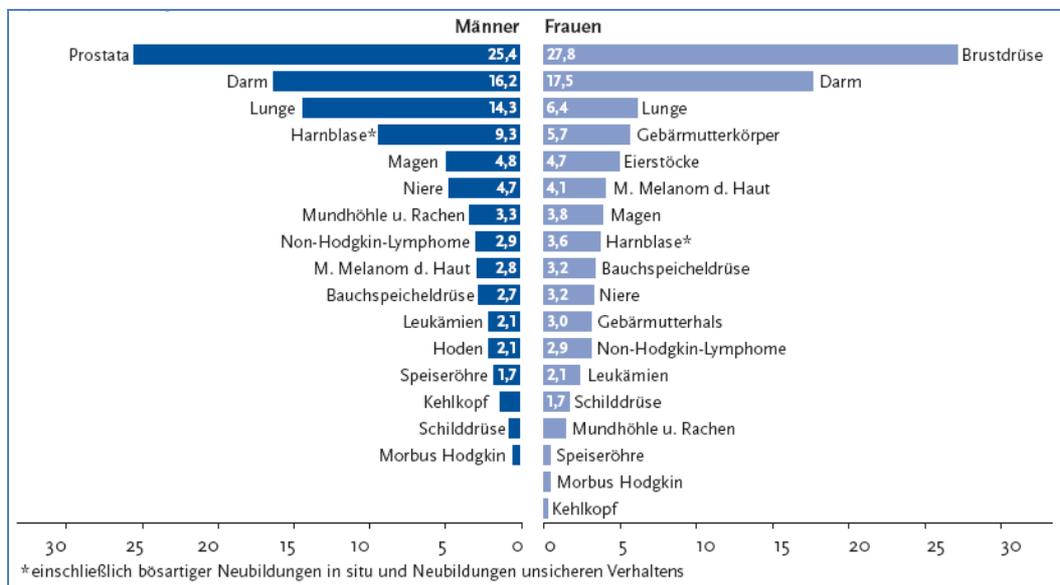


Abb. 2.1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen/arten an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanomischen Hautkrebs in Deutschland 2004
(Batzler et al. 2008)

Diese Veränderungen führen zu einer ungehinderten Vermehrung der Zelle, unabhängig vom umliegenden Zellverband oder regulatorischen Signalen. Ein Anzeichen dafür, dass Krebs als Summe von genetischen Mutationen auftritt, ist das erhöhte Vorkommen von Krebs bei Menschen höheren Alters (Cooper 2000; Finkel, Serrano, & Blasco 2007; Hanahan & Weinberg 2000; Webb et al. 2000). Nachdem mutationsbedingter Verlust der Zellzykluskontrolle, bilden die Zellen einen Tumor und häufen währenddessen weiter Mutationen an. Diese zusätzlichen Mutationen, können schnelleres Wachstum oder die Fähigkeit in fremdes Gewebe zu metastasieren bedeuten. Innerhalb des Tumorgewebes setzen sich die vorteilsbringenden Mutationen durch. Dies nennt Cooper et al. klonale Selektion (Cooper 2000). Dadurch erwirbt sich ein Tumor während seines Wachstums immer bessere proliferative und maligne Eigenschaften, d.h. die Fähigkeit in anderes Gewebe zu dringen. Hanahan et al. fasst die entarteten Mechanismen, die nahezu alle humanen Tumore gemeinsam haben, in sechs Blöcke zusammen: die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die Unsensibilität gegen wachstumshemmende Signale, das Ausschalten des geregelten Zelltods (Apoptose), das unlimitierte Replikationspotential, die anhaltende Angiogenese (Bildung von neuen Blutgefäßen) und die Fähigkeit zur Einwanderung in fremdes Gewebe. Hanahan et al. stellen den Vergleich auf, dass die entarteten Zellen sich im Sinne der darwinistischen Evolutionstheorie durchsetzen und damit die Oberhand gewinnen (Hanahan & Weinberg 2000).

Die Ursachen der krebsverursachenden Zellveränderungen können neben der „natürlichen“ Altersanhäufung von Mutationen vielfältigen Ursprungs sein. So besteht die Möglichkeit, dass Strahlung (ultraviolett, radioaktiv), chemische Substanzen, Vererbung, falsche Ernährung und Virusinfektionen dafür sorgen, dass unsere Zellen eine genetische Veränderung erfahren. Das Rauchen ist dabei mit einem Cocktail von krebsverursachenden Substanzen (Nikotin, Blausäure, Benzol, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe) für ein Drittel aller krebsverursachten Todesfälle verantwortlich (Cooper 2000). Bestimmte Viren verursachen nach dem Einbau der Viren-DNA in den Wirt, durch dauerhafte Aktivität des Genprodukts, krebsartige Veränderungen. Sie sind häufig die Ursache für Leberkrebs und Gebärmutterhalskrebs.

Bei Leukämieerkrankungen sind häufig keine erkennbaren Ursachen auszumachen. Aber es wurden Risikofaktoren identifiziert, die eine solche Krankheit mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eintreten lassen. Diese Risikofaktoren sind Alter, chemotherapeutische Behandlung, Ethnizität und Geschlecht, Vererbung, ionisierende Strahlung, chemische Belastungen, Vergiftungen sowie Virusinfektionen (CancerQuest.org 2008).

2.2. Leukämie

Leukämie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Arten von Krebs, ausgehend vom blutbildenden Organ Knochenmark (National Cancer Institute 2008b). Meist ist dieses Krankheitsbild durch entartete und in abnormer Menge vorhandene Leukozyten gekennzeichnet. Leukozyten, weiße Blutkörperchen, beinhalten alle Blutzellen ausschließlich Erythrozyten (rote Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen) (Alberts et al. 2002a; Meyers Lexikonverlag 2007).

Generell werden Leukämien durch die Art der betroffenen Blutzellen und durch den Verlauf der Krankheit unterschieden. Klassifiziert wird in myeloische und lymphatische Leukämie sowie in einen akuten und chronischen Verlauf. Zu den myeloischen Zellen werden die Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen gezählt, zu den lymphatischen Zellen die B- und T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (Abb. 2.2).

Akute Krankheitsbilder sind aggressiv und haben ihren Ursprung in den frühen Entwicklungsstadien der betroffenen Blutzellen. Blutbildende Zellen werden im Knochenmark durch krankhafte Zellen verdrängt, wodurch ein Mangel an roten und verschiedenen „gesunden“ weißen Blutkörperchen auftritt. Meistens ist die Zahl der Leukozyten dabei abnorm hoch. Unbehandelt führen akute Krankheitsverläufe schnell zum Tod (CancerQuest.org 2008).

Akute lymphatische Leukämie (ALL), ist der am häufigste diagnostizierte Blutkrebs bei Kindern (Abb. 2.3). ALL umfasst etwa drei Viertel aller Leukämien, während akute myeloische Leukämie (AML) am häufigsten in Erwachsenen auftritt (Abb. 2.4). Es ist bisher noch ungeklärt, warum ein solch hohes Vorkommen von ALL bei den 1-7-jährigen besteht.

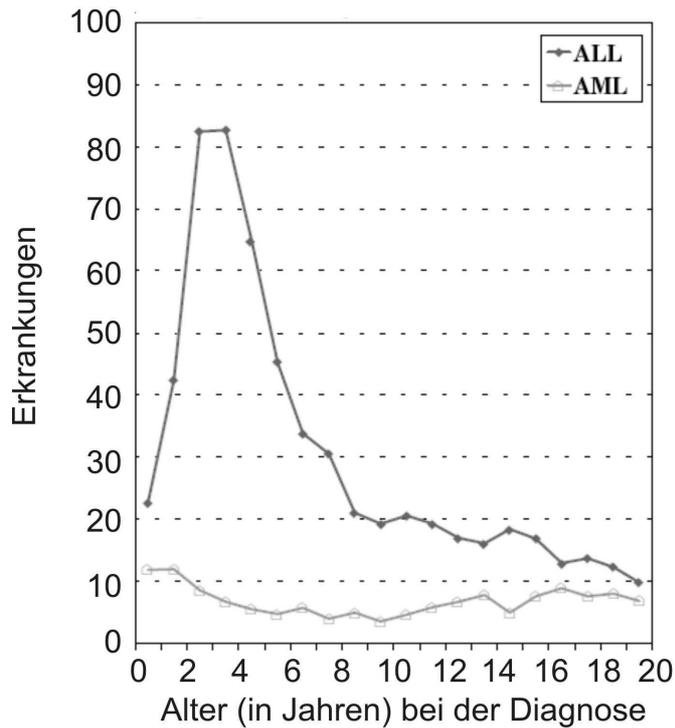


Abb. 2.3: ALL 1986-1994, AML 1976-1984 und 1986-1994

Aus (Kaufmann & Anderson 2003; Smith et al. 1999)

Mittelwerte jährlicher Erkrankungen pro Lebensjahr über den angegebenen Zeitraum pro Millionen Einwohner in den USA.

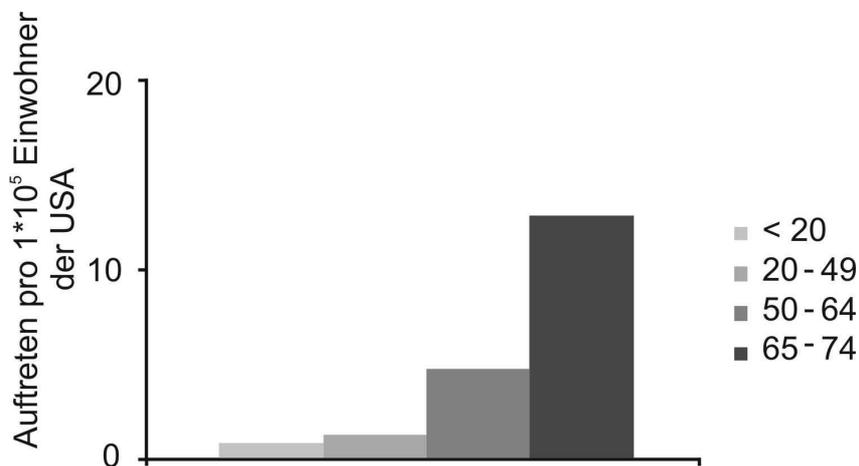


Abb. 2.4: AML 2000-2005

Verändert aus (Surveillance Epidemiology and End Results program 2008)

Mittelwerte jährlicher Erkrankungen pro Lebensjahr über den angegebenen Zeitraum pro hunderttausend Einwohner in den USA.

Chronische Krankheitsbilder, die gehäuft bei Erwachsenen auftreten, nehmen einen langsameren Verlauf. Kennzeichnend für dieses Krankheitsbild ist, dass sich krebsartige Leukozyten in vielen verschiedenen Reifegraden in der Blutzirkulation oder die entsprechenden Vorstufen im Knochenmark befinden. Dieser Verlauf ist meistens schwerer zu behandeln als der der akuten Leukämien (CancerQuest.org 2008; Hoffbrand, Pettit, & Moss 2006; Meyers Lexikonverlag 2007).

Chronische Leukämien zeichnen sich dadurch aus, dass sich vollständig oder weit entwickelte T- oder B-Zellen im Blut akkumulieren. Das verbindet sie mit dem Lymphom-Blutkrebs, der T- oder B-Zellen in den Lymphknoten und Lymphgefäßen akkumuliert. Chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist bei weitem die am häufigsten vorkommende chronische Leukämie, bei der vor allem die B-Zellen krankhaft verändert sind. Diese Erkrankung betrifft vor allem Menschen im Altern von 60 bis 80 Jahren (Hoffbrand, Pettit, & Moss 2006). Unterarten der CLL sind prolymphatische Leukämie, Haarzellen-Leukämie, Plasmazellen-Leukämie, große granuläre lymphatische Leukämie und T-Zell-prolymphatische-Leukämie (CancerQuest.org 2008). Chronische myeloische Leukämie (CML) betrifft ca. 15% aller Leukämieerkrankungen und entsteht durch eine Veränderung der hämatopoetischen Stammzellen. Als Folge, befinden sich Zellen myeloischer Herkunft, in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung im Blutkreislauf. Diese Leukämieart ist, weit über das Maß welches nach ihrem Vorkommen vermutet werden kann, erforscht worden. Dies lässt sich auf das Vorkommen der Chromosomentranslokation zwischen Chromosom 22 und 9 (Philadelphia Chromosom, entdeckt 1960 von Peter Nowell (NOWELL 1962) und der daraus resultierenden BCR-ABL Kinase zurückführen.

Bis heute sind bei vielen Leukämieunterarten Translokationen bekannt, welche auch als prognostische Faktoren herangezogen werden (D'Achille, Seymour, & Campbell 2006; Liu et al. 2004; Pui & Evans 2006; Strick et al. 2006). Beim Philadelphia Chromosom codiert dabei die verkürzte Version des Chromosoms 22 die Abl-Kinase, welche daraufhin nicht mehr reguliert werden kann und daher konstitutiv (ständig) tätig ist (Hehlmann, Hochhaus, & Baccarani 2007; Shtivelman et al. 1985; Van Etten 2007). Als Folge davon teilt sich eine solche Zelle unabhängig davon, welche Steuerungssignale sie aus ihrer Umgebung erhält. Durch die Entdeckung von Kinasen, als Auslöser der Entartung einer Zelle, wurden Kinaseinhibitoren entwickelt, die eine zielgerichtete Behandlung der Krankheit zulassen. Das wohl bekannteste

Beispiel ist „Imatinib“, welches unter dem Markennamen Gleevec[®] vertrieben wird. Überraschenderweise sind kurz nach Einführung des Medikaments schon Patienten mit Resistenzen in fortgeschrittenen Stadien von CML, in der eine höhere genetische Instabilität herrscht, aufgetreten. Diese Entwicklung machte eine weitere Forschung nach veränderten Kinaseinhibitoren nötig. (Cohen 2002;Jabbour et al. 2008;Quintas-Cardama, Kantarjian, & Cortes 2007)

2.3. Behandlungsarten der Leukämie

Die häufigsten Behandlungsarten von Leukämie sind die Chemotherapie, Immuntherapie, Bestrahlung, Stammzellentransplantation und Operation (CancerQuest.org 2008). Die Behandlungsarten werden auch kombiniert angewandt.

Die gegenwärtig chemotherapeutische ALL-Behandlung unterscheidet sich bei Erwachsenen und Kindern. Die Prognose für eine komplette Remission steht bei Kindern momentan bei 80% und bei Erwachsenen bei 50%. Die Behandlung folgt dabei einem Schema der Remissionsinduktion, einer Intensivierung der Behandlung (Konsolidierung) und einer weitergehenden Behandlung über einen bestimmten Zeitraum. Ungeachtet der Unterschiede im Behandlungsplan, besteht eine Kombinationstherapie während der Remissionsinduktion in der Regel aus einem Glukokortikoid (Prednisolon, Dexamethason), Vincristine und einem Anthracyclin - mit oder ohne Asparaginaseanwendung (National Cancer Institute 2008a;Pui & Evans 2006). Der Median der Remissionsdauer umfasst dabei 15 Monate. Nach einem Relapse (Rückfall) ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der Patient der Krankheit innerhalb eines Jahres erliegt. Wenn eine Möglichkeit zu einer Stammzellentransplantation besteht, ist dies deswegen bei unter 55-jährigen eine Option zur Weiterbehandlung (CancerQuest.org 2008).

Bei der Behandlung von ALL gehen die Ärzte von prognostischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Leukozytenanzahl, Leukozyteneigenschaften und genetischer Prädisposition aus (Pui et al. 2004). Nach diesen Faktoren werden die Patienten in Gruppen eingeteilt. Nach diesen Gruppeneinteilungen ergibt sich die weitere Behandlung im Sinne von chemotherapeutischer Substanz, Dosis und Verabreichungsdauer. Nach 7 bis 8 Tagen der Behandlung, erfolgt eine erneute Aufnahme und Analyse der Leukozyten um die Behandlung zu optimieren.

Duval et al. wendet eine initiale Behandlung mit Vincristin, Prednisolon, Daunorubicin, Methotrexat und Asparaginase an. Hochrisikopatienten erhalten bei passendem Spender eine Knochenmarkstransplantation oder werden mit Cyclophosphamid, Cytarabin, Methotrexat, Asparaginase und Mercaptopurin zur Konsolidierung des Krankheitsverlaufs behandelt. Danach erhalten die Patienten weitere Dosen mit Dexamethason, Cytarabin, Mitoxantrone, Etoposid und Asparaginase (der sogenannte VANDA-Block). Im nächsten Schritt werden Infusionen von Methotrexat und Cytarabin verabreicht, gefolgt von einer Behandlung des „BMF-relapse protocol“ (Henze et al. 1987). Zur Aufrechterhaltung der Remission wird Mercaptopurin und Methotrexat angewendet. Der Zeitraum der Behandlung umfasst ca. zwei Jahre (Duval et al. 2002).

Die wichtigsten prognostischen Faktoren bei AML-Erkrankungen sind das Alter und die Unterart der AML. Sie bestimmen die weitere Behandlung. Die Induktion der Remission kann mit Cytarabin und Daunorubicin begonnen werden. Mit Etoposid oder 6-Thioguanin konnte die Rate der kompletten Remission auf 90 % erhöht werden (Pui, Schrappe, Ribeiro, & Niemeyer 2004). In der post-Remissionsphase werden hohe Dosen von Cytarabin mit L-Asparaginase, Mitoxantron, Amsacrin oder Etoposid kombiniert.

CML wird durch eine Monotherapie des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib behandelt, mit dem sehr gute Resultate erzielt werden konnten. Durch das Auftreten von Imatinib-resistenzen wurde das Augenmerk auf die Entwicklung weiterer Kinaseinhibitoren gelegt. Mit Dasatinib und Nilotinib konnten ebenfalls Remissionsraten von 90% erreicht werden. Ein weiterer Kinaseinhibitor, der Imatinibresistenzen überwinden kann, ist der Aurorakinaseinhibitor VX680 (Hunter 2007; Padmanabhan et al. 2008).

Bei CLL werden Prognosen anhand des Stadiums der Krankheit getroffen. Es wird in ein frühes, mittleres und fortgeschrittenes Stadium unterschieden (Byrd, Stilgenbauer, & Flinn 2004). Weitere wichtige prognostische Faktoren sind die Mutationsrate der schweren Ketten (VH) von Immunglobulinen und damit korreliertes häufigeres Auftreten von CD38 und ZAP-70. Die Chancen für eine vollständige Heilung sind, ausgenommen von einer Stammzellentransplantation, gering. Die Behandlung mit Chlorambucil oder der Kombination aus Cyclophosphamid, Vincristin, (Doxorubicin) und Prednison bringt eine partielle Remission von 60-70% (Byrd, Stilgenbauer, & Flinn 2004). Der Einsatz von Nukleosid-Analoga ergab

Fortschritte in der Behandlung, wobei eine Kombination aus Fludarabin und Cyclophosphamid den größten Erfolg in der Erreichung einer kompletten Remission brachte (Byrd, Stilgenbauer, & Flinn 2004). Mit Einführung von monoklonalen Antikörpern gegen CD20 (Rituximab) und CD52 (Alemtuzumab) wurden die Komplett-Remissionsraten sprunghaft gesteigert. Problematisch waren dabei vermehrte bakterielle Infektionen, die der Patient im Laufe der Behandlung erleiden kann. Die Kombination aus Antikörperbehandlung mit Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab ist ein erster Versuch eine Erstbehandlung mit diesen Substanzen zu etablieren (Byrd, Stilgenbauer, & Flinn 2004).

Das Thema Behandlungsregime bei Leukämieerkrankungen ist sehr komplex und ständig im Wandel. Die Therapiepläne werden durch Resultate aus klinischen Studien und aus der Grundlagenforschung ständig verbessert und geändert. Einen sehr guten Überblick über Entscheidungsstrategien und zu Behandlungsarten von Leukämien und Krebserkrankungen kann sich verschafft werden auf den Seiten der National Cancer Institutes unter den Seiten Physician Data Query (PDQ[®]) (National Cancer Institute 2008c). Hier kann sich umfassend über die gängigen Behandlungsmethoden und laufende klinische Studien informiert werden.

2.3.1. Chemotherapeutika

2.3.1.1 Antimetabolite

Diese Substanzen wirken inhibitorisch bei der Produktion und Replikation von DNA und RNA und stören somit die Teilungsfähigkeit einer Zelle. Die Antimetabolite können nach ihrem Wirkungsort in der Zelle unterteilt werden.

Folat-Antagonisten werden als Krebsmedikamente, antimikrobielle, entzündungshemmende und immunsuppressive Substanzen genutzt. Sie inhibieren die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), ein Enzym das durch den Transfer von Kohlenstoffeinheiten in der Synthese der Nukleotide Adenin und Guanin eingebunden ist (Kamen, Cole, & Bertino 2003). Wenn Zellen neue DNA synthetisieren, kommt es so zu einem Nukleotidmangel und die Zellen initiieren den programmierten Zelltod (Apoptose). Einer der bekanntesten und auch in Standardtherapien eingesetzter Folatantagonist ist Methotrexat, welcher bei Blutkrebs, und dort vor allem bei ALL eingesetzt wird (Kamen, Cole, & Bertino 2003).

Purin-Antagonisten inhibieren die DNA-Synthese auf zwei verschiedene Wege. Zum einen inhibieren sie die Produktion von Purinen, die zur Synthese der Nucleobasen Adenin und Guanin benötigt werden. Zum anderen werden metabolisierte Formen in die DNA eingebaut, welche die DNA-Exonuklease inhibieren (Perrino et al. 1999). Ein älteres Beispiel hierfür ist 6-Mercaptopurin, welches schon seit 1953 als Chemotherapeutikum eingesetzt wird (BURCHENAL et al. 1953; BURCHENAL & RHOADS 1954). Clofarabin wurde 2005 von der FDA zugelassen, was die Aktualität dieser Art von Chemotherapeutika verdeutlicht (Kantarjian et al. 2007; Korycka, Lech-Maranda, & Robak 2008).

Pyrimidin-Antagonisten inhibieren die Produktion der Pyrimidin Nucleobasen Thymin und Cytosin bzw. Uracil. Durch die strukturelle Ähnlichkeit mit Uracil werden sie als Substrate erkannt, inhibieren aber den weiteren Weg zur Synthese der Nucleotide. Prominente Vertreter dieser Substanzklasse sind 5-Fluorouracil und Cytosin-Arabinosid (Pizzorno, Diasio, & Cheng 2003).

2.3.1.2 Genotoxische Substanzen

Diese Substanzen beeinträchtigen die Erbinformation einer Zelle. Sie interagieren direkt mit der DNA, indirekt über Enzyme die in die DNA-Replikation bzw. Reparatur eingebunden sind, oder die diese Substanzen in aktive Formen umwandeln. Die genotoxischen Substanzen werden wiederum in drei Gruppen eingeteilt.

Alkylierende Substanzen bilden kovalente Bindungen mit elektronenreichen Molekülen und binden somit auch an die DNA. Durch bifunktionelle alkylierende Substanzen wird die DNA kreuzvernetzt, wodurch es zu Fehlern bei der DNA-Replikation und Reparatur kommt. Monofunktionale alkylierende Substanzen methylieren die DNA und verursachen Strangbrüche. Die Zytotoxizität wird dabei vor allem von den „mismatch“-Reparaturmechanismen der Zelle vermittelt. Innerhalb dieser Substanzklasse gibt es wiederum eine Einteilung in die Stickstoff-Lost-Verbindungen, Aziridine und Epoxide und Hexamethylmelamine (Colvin 2003).

Interkalierende Substanzen umfassen Anthracycline und Anthracendione. Die Struktur von Anthracyclinen ist aus Tetracyclinen, verbunden mit einem Daunosa-minzucker aufgebaut. Bei physiologischen pH-Wert sind sie positiv geladen, was die Interkalation in die DNA erleichtert. Durch Quinonreste zwischen benachbarten

Ringen, können Anthracycline auch an Elektronentransportvorgängen teilnehmen und so reaktive Sauerstoffspezies produzieren. Die zytotoxische Wirkung wird durch strukturelle Veränderungen der DNA, Interaktion mit Topoisomerase und durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht. Die bekanntesten Vertreter sind Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin und Epirubicin (Piccart-Gebhart 2006).

Anthracenedione sind als strukturverwandte Wirkstoffe entwickelt worden, um die kardiotoxischen Eigenschaften von Anthracyclinen zu vermeiden. Das Tumorspektrum dieser Substanzart ist kleiner als bei Anthracyclinen. Anthracendione verursachen Strangbrüche durch die Manipulation der Topoisomerase II, generieren aber im Gegensatz zu Anthracyclinen keine oder wenig reaktive Sauerstoffspezies. Ein bekannter Vertreter der Anthracenedione ist Mitoxantron.

Enzyminhibitoren beeinträchtigen vor allen die Funktion der Topoisomerase I oder II. Die Inhibitoren interkalieren nicht in die DNA, sondern binden direkt an das Enzym. Epipodophyllotoxine waren in Gebrauch, lange bevor herausgefunden wurde welches Zielprotein diese Substanz bindet. Ursprünglich wurden diese Substanzen zur Inhibition von Mikrotubulibildung erforscht. In Ihrer Funktion als Topoisomerase II-Inhibitoren werden sie aber in der Chemotherapie eingesetzt. Die Stoffklasse der Camptothecine inhibiert dagegen die Topoisomerase I. Die bekanntesten Vertreter der Epipodophyllotoxine sind Etoposid (V-16) und Teniposid (V-26) und für die Camptothecine Topotecan und Irinotecan (Eckhardt et al. 2000; Grabenbauer et al. 1999; Rubin & Hait 2003).

2.3.1.3 Mikrotubulimodifizierende Substanzen

Mikrotubuli sind Komponenten des Zytoskeletts, die bei der Zellteilung eine wichtige transport- und strukturgebende Aufgabe haben. Während der Zellteilung sorgen die Spindelfasern für die richtige Anordnung der replizierten Chromosomen. Die Spindeln bestehen aus Mikrotubulinen. Es wurden in den 50er und 60er Jahren verschiedene Naturstoffe gefunden, die mit Mikrotubulinen interagieren und deren Aufbau und Dynamik stören. Die zwei Hauptgruppen sind dabei die Taxane mit Paclitaxel und Docetaxel als bekannte Vertreter (Parekh & Simpkins 1997) und die Vinca-Alkaloide mit Vincristine und Vinblastine (Rowinsky 2003). Paclitaxel und Docetaxel verhindern die Depolymerisation von Mikrotubuli während Vinca-Alkaloide

die Polymerisation verhindern. Beide Stoffgruppen arretieren Zellen in der G2/M-Phase bevor sie Apoptose auslösen.

2.3.1.4 Kinaseinhibitoren

Wie schon erwähnt ist dereguliertes Zellwachstum ist ein gemeinsames Merkmal aller Neoplasmen, sowohl der benignen als auch der malignen (Blume-Jensen & Hunter 2001). Ursache für eine solche Deregulation sind Mutationen in Genen, die entweder eine Verstärkung oder eine Verminderung der Funktion im späteren Protein verursachen. Eine Verstärkung wird dabei Gain-of-Function (GOF) und eine Verminderung Loss-of-Function (LOF) genannt. Die Gene die dabei für GOF's verantwortlich sein können, werden als proto-Oncogene betitelt, die tatsächlich entstandenen Mutationen Oncogene. Mutierte Gene, die eine LOF verursachen heißen dagegen Tumorsuppressor-Gene. (Alberts et al. 2002b).

In den letzten Jahrzehnten bildete sich heraus, dass Signalübertragungsprozesse einer Zelle eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Krebserkrankung spielen. Ein wichtiger Prozess ist dabei die kinasevermittelte Phosphatrestübertragung von ATP auf Proteine, um diese zu aktivieren oder für andere Proteine zugänglich zu machen. Die Phosphorylierungen bewirken Aktivierung durch Konformationsänderungen oder die Erzeugung von Bindestelle im Zielprotein (zum Beispiel eine Kinase oder ein Adapter-, Effektor- oder Strukturprotein). Phosphorylierungen sind ein wichtiger Bestandteil der Signalweiterleitung, die am Ende ein Protein in der Art aktiviert, dass es in den Zellkern vordringen kann, um dort die Transkription bestimmter Gene zu initiieren.

Veränderte Kinaseaktivität kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass eine Kinase-Überexpression durch vermehrte Transkriptionsaktivität (Genamplifikation) verursacht wird. Des Weiteren sind Chromosomentranslokationen verantwortlich für mutierte Kinasen. Gestörte Paracrine und autokrine Stimulation von Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinasen, Verlust von Tumor-Suppressor-Genen, Infunktionalität von gegensteuernden Phosphatasen und aktivierende Mutationen innerhalb von Protein-Kinasedomänen können ebenso für eine abnormale Kinasefunktion verantwortlich sein (Blume-Jensen & Hunter 2001;Cohen 1999;Sridhar, Hanson-Painton, & Cooper 2000). Aufgrund der immer neueren

Erkenntnisse im Feld der Proteinkinasen wurden Strategien entwickelt, um bestimmte Kinasen, die als entartet in Krebszellen erkannt wurden, zu inhibieren. Zwei klinisch erfolgreiche Strategien sind die Inhibition von Proteinkinasen oder anderer intrazelluläre funktionelle Proteine mittels kleiner zellgängiger Moleküle „small molecules“ und die Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibition mittels Antikörper (Blattman & Greenberg 2004; Collins & Workman 2006). Bei Kinasen können „small molecules“ dabei entweder das aktive Zentrum der Kinasen blockieren, an allosterische Zentren oder in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum binden. Die zwei letzteren Fälle versprechen eine höhere Spezifität, da diese Bereiche von Kinase zu Kinase variabler in ihrer Aminosäuresequenz sind als die aktiven Zentren.

In den frühen achtziger Jahren wurde erkannt, dass bei Krankheiten wie Krebs und Autoimmunität Störungen in der Phosphorylierung von Proteinen vorliegen. Daher unternahm Wissenschaftler und forschende pharmazeutische Unternehmen enorme Anstrengungen, kleine zellgängige Moleküle zu entwickeln, welche die Funktion von Proteinkinasen modulieren oder inhibieren können (Bain et al. 2003; Cohen 2002). Ende der achtziger Jahre war aber noch kein Wirkstoff in die klinische Testung gelangt und es wurde angenommen, dass wegen der konservativen Struktur der aktiven Zentren aller Kinasen eine Spezifität schwer zu erreichen sei. Auch einen Wirkstoff zu finden, der mit der hohen intrazellulären Konzentration von ATP (2-10 mM) konkurrieren kann, wurde als sehr schwierig eingeschätzt (Cohen 2002).

Währenddessen wurden die intrazellulären Rezeptormoleküle von Ciclosporin und FK-506 (Tacrolimus) entdeckt. Dabei wurde das erste Mal nachgewiesen, dass es möglich ist, mit kleinen zellgängigen Molekülen zielgerichtet innerhalb einer Zelle ein Protein zu inhibieren. Ciclosporin A ist ein cyclisches Protein, aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert und FK-506 ist ein Makrolid, gewonnen aus einem Bodenbakterium. Zusammen mit Immunophilinen bzw. Cyclophilinen bilden sie Komplexe, die die Oberflächenstruktur der Immunophilinen verändern und die weiteren Interaktionen stören. Dadurch wird die Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin inhibiert, was im Endergebnis die ganze Immunantwort von T-Zellen hemmt. (Griffith et al. 1995). Die Affinität von Ciclosporin und FK506 zu den entsprechenden Zielproteinen bewegt sich dabei in der selben Größenordnung wie

die von Wachstumsfaktoren zu ihren Rezeptoren (Ho et al. 1996). Inhibiertes Calcineurin ist nicht mehr fähig den Transkriptionsfaktor NFAT zu dephosphorylieren, weswegen dieser nicht mehr in den Zellkern gelangen kann. Das hat zur Folge, dass Zytokine wie Interleukin 2 oder 4 nicht mehr exprimiert werden, welche eine wichtige Rolle bei der Koordination von Immunzellen während der Immunantwort spielen (Crabtree & Olson 2002). Darum werden beide Substanzen nach Transplantationen zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen als so genannte Immunsuppressoren schon seit 1983, bevor die eigentliche Wirkungsweise bekannt war, eingesetzt (Bain et al. 2007). Eine nach demselben Prinzip (Bindung an das entsprechende Immunophilin) funktionierende Substanz ist Rapamycin. 1999 erstmals klinisch eingesetzt (Fireman et al. 2004), ist Rapamycin strukturell mit FK506 verwandt, hat aber nach der Bindung an das Immunophilin, eine kinaseinhibitorische Wirkung auf mTOR. Im Gegensatz zu Ciclosporin und FK506, welche die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Zellkern verhindern und damit die Expression von für die Immunantwort wichtigen Interleukinen unterbinden, inhibiert Rapamycin die IL-2 vermittelte T-Zell-Proliferation, indem die Zellen in der G2-Phase arretiert werden (Strauss, Osen, & Debatin 2002).

PP1 und PP2 entstammen aus der Substanzklasse der Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine und wurden Mitte der neunziger Jahre als erste hochspezifische und hochwirksame Inhibitoren von Proteintyrosinkinasen (Src-Familie Proteintyrosinkinasen) charakterisiert (Hanke et al. 1996). Neuere Ergebnisse zeigen, dass PP1 und 2 auch p38, CSK und MAPK inhibieren, jedoch mit 2-10-fach geringerem Potential (Bain et al. 2007).

Alsterpaullone, ein Derivat aus der Ausgangsstruktur Kenpaullone, wurde unter anderem, in den neunziger Jahren auf der Suche nach Wirkstoffen zur Kontrolle des Zellzyklus bzw. Kontrolle der Cyclin abhängigen Kinasen, als wirkungsvoller Inhibitor von Signalübertragungsprozessen identifiziert. Neben den Cyclin abhängigen Kinasen inhibiert Alsterpaullone Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) mit hohem Wirkungsgrad (Leost et al. 2000). Alsterpaullone wird häufig zur Untersuchung von Signaltransduktion eingesetzt, wurde innerhalb des NCI 60-Screenings auf die Eigenschaften als Krebswirkstoff getestet und zeigte dabei nennenswerte Antikrebs-Eigenschaften (Schultz et al. 1999).

Viele Kinaseinhibitoren befinden sich zurzeit in der klinischen Testung (Abb. 2.5). Neben Kinaseinhibitoren gegen Wachstumsfaktorrezeptoren, werden auch zyto-

plasmatische Proteinkinasen als Zielproteine identifiziert. Kinasen sind momentan die zweitgrößte Gruppe der Wirkstoffziele nach den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Da das Kinom an die 550 Kinasen beinhaltet (Manning et al. 2002), wird sich in nächster Zeit wahrscheinlich kein Mangel an interessanten Wirkstoffzielen einstellen (Cohen 2002).

Die meisten erwähnten und in der Zeitleiste (Abb. 2.5) gezeigten Kinaseinhibitoren sind ATP-Kompetitoren. Sie binden das katalytische Zentrum im aktiven Zustand der Kinase. Spezifität wird dabei über die Struktur die um die ATP-Bindestelle konkurriert und durch zusätzliche Strukturen, die an weniger konservative Stellen um das Aktivitätszentrum herum binden, erreicht. Eine zweite Art der Inhibition ist die Bindung an eine Kinase in ihrem inaktiven Zustand. Hierbei wird zusätzlich zum aktiven Zentrum eine hydrophobe Tasche (DFG-Domäne) besetzt, welche normalerweise eine strukturelle Veränderung bei Aktivierung der Kinase erfährt. Die hydrophobe Tasche ist weniger konserviert als das aktive Zentrum und bietet deshalb eine Möglichkeit für höhere Spezifität bei weniger Konkurrenz mit ATP. BIRB 0796 (Doramapimod) ist ein Beispiel für einen solchen Kinaseinhibitor. Eine dritte Art der Inhibition von Kinasen ist die Hemmung der Bindung der Kinase an das entsprechende Substrat. PD 98059 ist ein solcher Kinaseinhibitor. Er bindet an MKK1 und verhindert die Phosphorylierung durch Raf (Cohen 2002).

Kinaseinhibitoren bilden heute ein wertvolles Instrument zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen und finden in der Behandlung von Leukämien und anderen Krebserkrankungen vermehrt Anwendung. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden haben Kinaseinhibitoren den Vorteil, als Medikamente einfach verabreicht werden zu können. Bei der Entwicklung und Validierung von Kinaseinhibitoren, sind zellfreie in-vitro Messungen und zellbasierte Verfahren oder in-vivo Experimente in Kombination anzuwenden. Zellfreie in-vitro Tests können Spezifitäten und Bindekonstanten genau bestimmen, aber in zellbasierten Verfahren können die Parameter wie ATP-Spezifität und Konzentration, Wechselwirkung mit Phosphataseaktivität, unspezifische Effekte mit anderen Proteinen und die Aufnahme in die Zelle berücksichtigt werden (Gonzalez-Nicolini & Fussenegger 2005).

Ein weiterer Vorteil ist, dass sich Kinaseinhibitoren auch zur Unterstützung von herkömmlichen Chemotherapien in Kombination einsetzen lassen, ohne dass sie die

Funktion der Chemotherapeutika verändern oder im Zusammenspiel unerwünschte Nebeneffekte erzeugen (Cohen 2002).

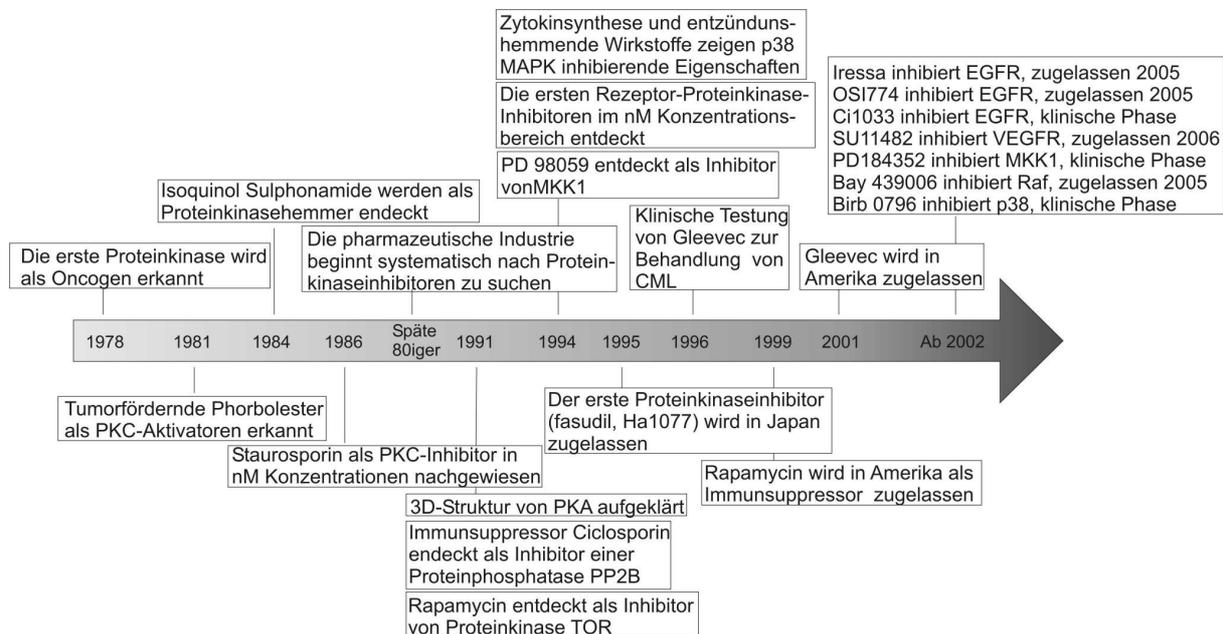


Abb. 2.5 Zeitleiste der Kinaseinhibitorentwicklung

Adaptiert aus (Cohen 2002)

2.4. In-vitro Testsysteme

2.4.1 Hochdurchsatzverfahren

Hochdurchsatzverfahren sind in der Pharmaforschung nicht mehr wegzudenken. Sie haben einen erheblichen Anteil an der Entdeckung neuer Wirkstoffe. Während Anfang der achtziger Jahre noch 1-2 Jahre benötigt wurden, um 3000 Substanzen auf ihre Wirkung zu testen, wurden in den neunziger Jahren schon mehrere tausend Substanzen innerhalb einer Woche getestet (Pereira & Williams 2007).

Die Anwendung der Hochdurchsatztechniken fand zunächst in der Testung von Naturprodukten und im mikrobiologischen Bereich statt. Mit fortschreitenden Technologieverbesserungen und ihrer universellen Einsetzbarkeit eroberten Hochdurchsatzverfahren nach 20 Jahren auch vollständig die Pharma- und Biotechnologiebranche. In Abb. 2.6 ist die Entwicklung des Hochdurchsatzverfahren anhand der Pharmafirma Pfizer aufgezeigt.

Mit fortschreitender Zeit und der Entdeckung vieler Wirkstoffe, zeigte sich, dass die Wirkstoffe auch den ADME-Kriterien (Adsorption, Distribution, Metabolismus und Sekretion) stellen müssen, um erfolgreich eingesetzt werden zu können (Pereira & Williams 2007). Dafür wurden zunächst P450-Enzymtests, Proteinbindeverhalten, Zytotoxizität (z. B. MTT-Tests), Permeabilitätstests mit CaCo 2-Zellen und Mikrokernauszählungen in die Hochdurchsatzverfahren implementiert (Pereira & Williams 2007).

Neuere Bereiche von Hochdurchsatzverfahren sind die Genetik und Proteomforschung (Cunningham 2000) in Form von Oligonukleotid Mikroarrays, „Bead-based“ Technologien (Koch 2004) sowie Peptid- und Protein-Chips (Tomizaki, Usui, & Mihara 2005; Yeo et al. 2005), die mit sehr hohen Probendurchsätzen operieren können. Ausserdem können diese Methoden auch aus einzelnen Proben einen enorm großen Informationsgehalt ziehen. High Content Screening (HCS) ist ein mikroskopischer Ansatz, der durch Automatisierung ebenfalls einen hohen Probendurchsatz erreicht und aus jeder Probe einen großen Informationsgehalt gewinnen kann (Haney et al. 2006). Durch verbesserte Bildverarbeitungsprogramme und Mikroskopiesysteme kann HCS in letzter Zeit auch in Primärscreens mit größerem Probendurchsatz eingesetzt werden (Haney, LaPan, Pan, & Zhang 2006). Sehr schnell erkannte die Krebsforschung das Potential der Hochdurchsatzverfahren für die Entdeckung, Entwicklung und Optimierung neuer Medikamente. Mit der Entwicklung der 96-Loch Zellkulturplatten begann eine massive Suche nach neuen, krebisrelevanten Wirkstoffen (Finlay, Baguley, & Wilson 1984; Finlay, Wilson, & Baguley 1986; Gonzalez-Nicolini & Fussenegger 2005; Shoemaker 2006).

Immer mehr Krebszelllinien wurden in dieser Zeit etabliert, so dass das „National Cancer Institute“ zusammen mit den „International Health Institutes“ begann, eine große Substanzbibliothek an 60 etablierten Krebszelllinien zu testen. Dieser umfassende „NCI-60 drug screen“, d. h. die in diesem Screen verwendeten Zelllinien, dienen immer noch der Wirkstofftestung. Die daraus bisher generierten Ergebnisse, werden zum Teil immer noch unter verschiedenen Gesichtspunkten statistisch ausgewertet (Lee et al. 2007a; Shoemaker 2006). Da für jedes Hochdurchsatzverfahren auch eine Substanzbibliothek benötigt wird, bietet das National Cancer Institut über die Jahre optimierte Substanzbibliotheken an, die ein bestimmtes Spektrum an strukturellen Eigenschaften aufweisen. Diese sollen helfen, die

Einführung eines Hochdurchsatzverfahrens zu validieren. So kann zum Beispiel ein Diversity- oder ein Training-Set an Substanzen erworben werden (Shoemaker et al. 2002). Insgesamt hat das NCI in mehr als vier Jahrzehnten über 500.000 synthetische Substanzen in ihre Bibliothek aufgenommen.

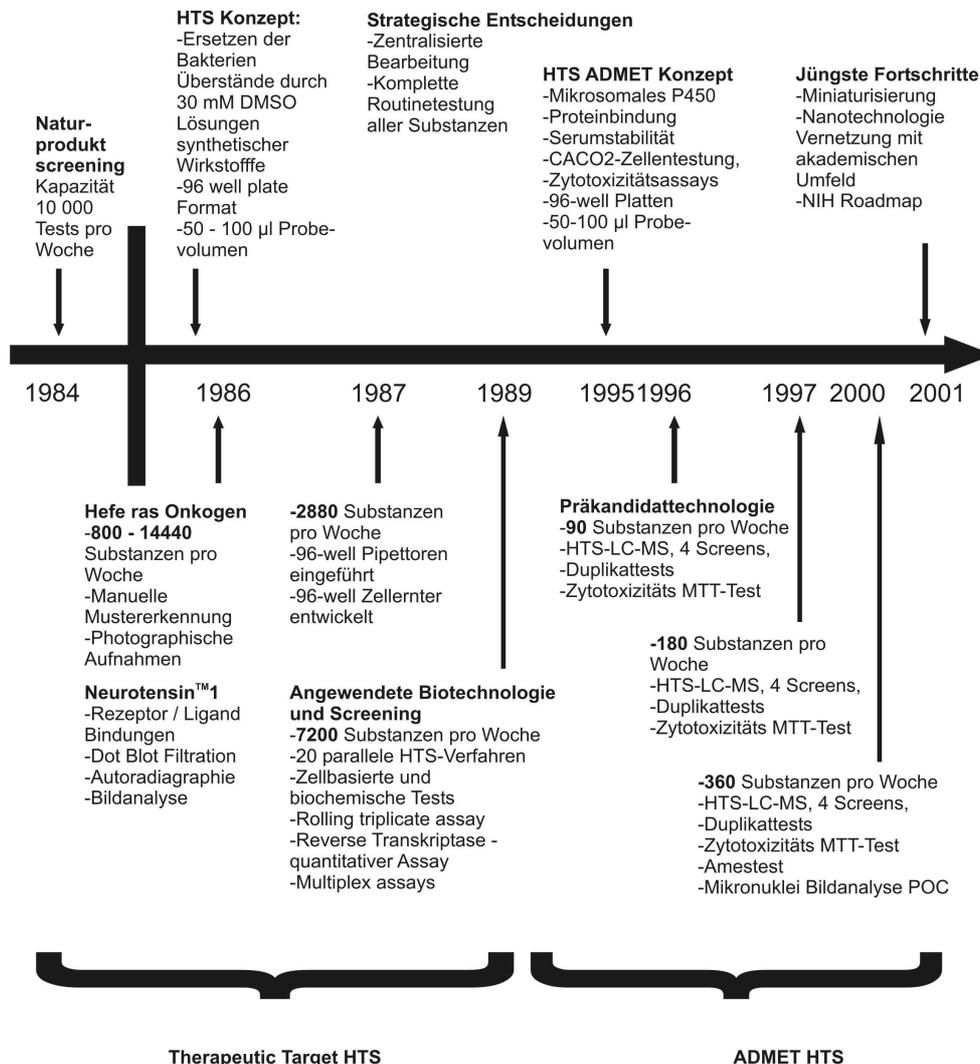


Abb. 2.6: Entwicklung der Hochdurchsatzstrategie bei Pfizer von Mitte der 80er Jahre bis 2001
(Abb. adaptiert aus (Pereira & Williams 2007))

In-vitro Tests in Hochdurchsatzverfahren werden generell in zellfreie und in zellbasierte Tests unterschieden. In zellfreien in-vitro Tests werden Proteine, ausserhalb der Zelle unter kontrollierten Bedingungen, ausschließlich auf ihre Funktion und

Interaktionen mit Substraten oder Liganden überprüft. Dies bietet somit Einfachheit, Präzision, weniger Störeffekte und gute Automatisierbarkeit (Tab. 2.2). Bei der Anwendung der aus diese Tests gewonnenen Wirkstoffe in Zellen, zeigten sich wegen unerwünschten Nebeneffekten, geringer Bioverfügbarkeit oder Stabilität in Zellkulturen, aber oftmals ernüchternde Ergebnisse (Gonzalez-Nicolini & Fussenegger 2005).

Zellbasierte Testverfahren ermöglichen Aussagen über intrazelluläre Spezifität, funktionsunabhängige Zytotoxizität, metabolische Stabilität und Bioverfügbarkeit. Da aber die Wirkungsweise einer Substanz, in dieser Art von Primärtest, meist unklar ist, muss der Wirkmechanismus nachfolgend aufgeklärt werden (Bain et al. 2007; Gonzalez-Nicolini & Fussenegger 2005; Shoemaker et al. 2002).

Tab. 2.2: Eigenschaften von zellbasierten und zellfreien in-vitro Tests in Hochdurchsatzverfahren
(Shoemaker et al. 2002)

Zellbasierte Zelltests	Zellfreie Zelltests.
Wirkziele befinden sich im Zellkontext	Einfach
Membraneinfluss	Präzise
Metabolismus	Sehr geeignet für HTS-Verfahren
Serumbindeeigenschaften berücksichtigt	Wirkstoffkandidaten benötigen Validierung in zellbasierten Systemen
Aktive Wirkstoffkandidaten müssen mechanistisch aufgeklärt werden	

Tab. 2.3: Auswahl zellfreier und zellbasierter in-vitro Testverfahren

Entnommen aus (Gonzalez-Nicolini & Fussenegger 2005)

Literaturstellen: (1)(Sorg et al. 2002), (2)(Vogt et al. 2003), (3)(DeBonis et al. 2004), (4)(Vainshtein et al. 2002), (5)(Seethala & Menzel 1998), (6)(Glover et al. 2003), (7)(Godard et al. 2002), (8)(Zhu & Fahl 2000), (9)(Nagami et al. 2002), (10)(Skehan et al. 1990), (11)(Steff et al. 2001), (12)(Dunstan et al. 2002), (13)(Monks et al. 1991), (14)(Rapisarda et al. 2002), (15)(Webb, Hose, Koochekpour, Jeffers, Oskarsson, Sausville, Monks, & Vande Woude 2000)

Testverfahren	Testsystem	Ausleseverfahren
Zellfreie Verfahren	Serin/Threonin Kinaseinhibitoren Proteinphosphatase-Inhibitoren Mikrotubuliinhibitoren Proteinkinaseinhibitoren Proteinkinaseinhibitoren Proapoptotische Faktoren	³³ p Inkooperation (1) Fluoreszenz (HCS) (2) Immunfluoreszenz (3) β-Galaktosidase Komplementation (4) Fluoreszenzpolarisation (5) Fluoreszenzpolarisation (6)
Zellbasierte Verfahren	Topoisomeraseinhibitoren in CHO-Zellen HepG2 Heptoma Zellen Proapoptotische Faktoren in Lymphozyten Zytotoxizität in versch. Zelllinien Zytotoxizität in EGFP transferierten Zelllinien Topoisomeraseinhibitoren in Säugerzellen Humane Tumor-Zelllinien Angiogeneseinhibierende Substanzen in Giomazellen Inhibitoren der Met Tyrosinkinase in MDCK-Zellen	Alkalischer Comet Test (7) GFP basierte Fluoreszenz (8) Kolometrisches Verfahren (9) Fluoreszenz (10) EGFP basierte Fluoreszenz (11) Kolometrische Verfahren (12) Sulphorrhodamin Test (13) Luziferase Assay (14) Chromogenes Reportersystem (15)

Ein häufig genutzter Nachweis zur Testung der Wirksamkeit einer chemotherapeutischen Substanz in zellbasierten Systemen, ist bis heute die Bestimmung der Zellvitalität. Diese kann fluoreszenztechnisch mittels fluoreszierenden Fusionsproteinen, fluoreszent markierten Proteine oder durch Enzymreaktionen die ein fluoreszierendes Produkt bilden, ermittelt werden. Eine Alternative zu fluoreszenz- oder chemiluminiszenztechnischen Ausleseverfahren sind einfache kolorimetrischen Verfahren (Tab. 2.3). Ein bekanntes kolorimetrisches Testverfahren ist der MTT-Test, bei dem ein Tetrazoliumsalz von mitochondrialen Enzymen reduziert und in ein farbiges Produkt umgesetzt wird (Mosmann 1983). Nach dem MTT-Test wurden der

XTT- und WST-Test entwickelt, bei dem das farbige Produkt nicht mehr in einem zusätzlichem Arbeitsschritt gelöst werden muss. Alternativ entwickelte kolorimetrische Testverfahren sind der Methylenblautest und die schließlich in großen Hochdurchsatzprojekten angewendeten Tests mit Sulphorhodamin B und Almar Blue (Shoemaker 2006).

Der MTT-Test diente als Testsystem um Naturprodukte auf ihre zytostatische und zytotoxische Anti-Krebswirkung hin zu untersuchen und war auch der Basistest der NCI-HIV Wirkstoffsuche (Sausville & Shoemaker 2001; Shoemaker 2006; Weislow et al. 1989). Der Vorteil an diesen Techniken, ist das einfache und schnelle Auslesen nach der Inkubationszeit in einem für Lochplatten geeignetem Spektralphotometer.

Die Miniaturisierung ist bis heute schon in den unteren Mikroliterbereich in 1536-Lochplatten vorgedrungen, um in immer größere Mengen an Substanzen testen zu können und in schnellerer Zeit Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung zu finden (Maffia, III, Kariv, I, & Oldenburg 1999; Ulrike Honisch 2003; Wood 2007; Wu et al. 2003).

Jedoch können Hochdurchsatzverfahren auch mit relativ einfachen Methoden in 96-Lochplatten durchgeführt werden. Die Planung für ein Hochdurchsatzverfahren hängt dabei vom jeweiligen Wirkmechanismus und dem dazugehörigen Testverfahren ab (Shoemaker et al. 2002). Bis heute ist der organisatorische und kostenmäßige Aufwand für ein Hochdurchsatzverfahren nur von finanzstarken Firmen oder Kooperationen zu bewältigen (Pharmaindustrie, NCI, ChemBioNet). Möglichkeiten für kleinere Forschergruppen, Substanzen in zeit- und kostenmäßig vertretbaren Rahmen in höherer Zahl zu testen, gibt es dabei kaum. Bei der Mehrzahl der Publikationen sich mit der Wirkstoffsuche und -testung beschäftigen, werden die Auswirkungen von Einzelsubstanzen auf ein Testsystem, oder einfache Wirkstoff-Substratbeziehungen gemessen. Kombinationen von Wirkstoffen finden im Vergleich weniger Beachtung.

2.4.2 Kombinatorische Wirkstofftestung

Die kombinierte Anwendung von Wirkstoffen wird schon seit jeher in der chinesischen Medizin oder in anderen historischen Behandlungsarten angewendet (Keith, Borisy, & Stockwell 2005). Schon zwischen 1872 (durch Fraser) bis 1928

(LOEWE 1928) untersuchten zahlreiche Forscher die optimale Art und Weise, Informationen in Bezug auf Modellierung, Anwendung und Auswertung, aus kombinatorischen Experimenten zu gewinnen. Die kombinierte Anwendung von Wirkstoffen ist immer noch aktuell (Chou 2006) und hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (Zimmermann, Lehar, & Keith 2007). Seit sich die Wissenschaft mit Kombinationsexperimenten beschäftigt, sind mindestens 13 verschiedene Theorien und Methoden zur Bestimmung von Additivität, Synergie und Antagonismus entwickelt worden (Chou 2006).

Grundsätzlich können zwei Substanzen, die in einem Testsystem einzeln einen Effekt erreichen, zusammen getestet, einen synergistischen, additiven oder antagonistischen Effekt erzielen. Ist nur eine der beiden Substanzen alleine aktiv und zusammen wird dennoch ein höherer Effekt erreicht, wird von einer Potenzierung des Effekts gesprochen. Synergistisch sind solche Kombinationen, die einen höheren Effekt als den additiven Effekt erreichen. Andersherum erreicht eine antagonistische Kombination einen niederen als den additiven Effekt. Letztendlich ist die entscheidende Frage, wie Additivität definiert wird. Zwei der anerkanntesten Modelle sind das additive Referenzmodell (LOEWE 1953) und die Kombinationsindexmethode (Chou 2006). Beide Ansätze gehen davon aus, dass bei Kombination ein und der selben Substanz, ein additiver Effekt erzeugt wird. In der Methode nach Loewe wird ein Isobologramm erstellt, bei dem die Wirkstoffkonzentrationen bei z.B. EC_{10} , EC_{50} und EC_{90} für beide Wirkstoffe gegeneinander aufgetragen werden. Liegen die experimentellen Ergebnisse über oder unter den dargestellten Werten, sind sie antagonistisch bzw. synergistisch. Bei der generellen Methode nach Chou, welche Kombinationseffekte auf der Basis von Gleichgewichts-Bindekinetiken betrachtet, bedeuten errechnete Kombinationsindexwerte unter eins Synergismus und über eins Antagonismus.

Kombinierte Wirkstoffe, sowie die kombinierte Anwendung von Medikamenten, zeigen gute Erfolge bei Krankheiten wie Krebs, Erkrankungen des zentralen Nervensystems sowie HIV (Borisy et al. 2003; Chou 2006). Gerade diese Krankheiten, aber auch Diabetes oder Arthritis, beruhen auf einer Störung von Zellen in ihren komplexen Signaltransduktionswegen sowie Kontrollmechanismen und können nicht mit nur einer Intervention an einem einzigen Wirkort kontrolliert werden. Des Weiteren kann dieser Ansatz auf der einen Seite besser Multiresistenzen überwinden und auf

der anderen Seite die Kosten für die Entwicklung für einen neuen Wirkstoff signifikant senken. Wenn eine Wirkstoffkombination eine neue oder effektivere Wirkung zeigt, kann auch ein Zeitersparnis bei der Entwicklung eines neuen erfolgreichen Medikaments erreicht werden (Borisy et al. 2003). Bis heute sind etablierte Testverfahren mit Mikrotiterplatten und damit einem entsprechend hohem Pipettieraufwand, oder hohem technischen Aufwand in Form von Pipettierrobotern verbunden.

Da Wirkstoffkombinationen in das komplexe Zusammenspiel von Molekülen in einer Zelle eingreifen, muss die kombinatorische Testung von Wirkstoffen auf zellbasierte Testverfahren gestützt werden. Für die Krebsforschung wurden dabei Proliferations-Tests, wie Metabolisierung von Edukten (MTT, WST, XTT, Almar blue), ATP-Quantifizierung, DNA-Bestimmung oder Apoptose assoziierte Testverfahren (Annexin Assay, Caspase Assay) verwendet (Zimmermann, Lehar, & Keith 2007). Die Standard-Pipettiermethoden haben dabei ihre Limitationen, wenn es um hochauflösende kombinatorische Dosis-Wirkungsprofile geht. Die Pipettierschritte und die Substanzmengen, die binäre kombinatorische Experimente, mit höherer Anzahl der zu testenden Substanzen oder mehr Mischungsverhältnissen erfordert, steigen exponentiell an. Daher ist ab einer gewissen Anzahl von Substanzen eine Miniaturisierung solcher Versuche und die Reduzierung der Pipettierschritte wünschenswert (Abb. 2.7).

Für Labore, die Screenings mit Substanzkombinationen durchführen wollen, wäre eine Methode, welche ohne den hohen Zeit- und Materialaufwand des Pipettierens auskommt eine wünschenswerte Alternative. Aber auch für klinische Anwendungen in denen individuelle Patientensensitivitäten getestet werden, würde es eine Erleichterung bedeuten solch eine Methode zur Hand zu haben. (Shoemaker 2006; Trusheim, Berndt, & Douglas 2007).

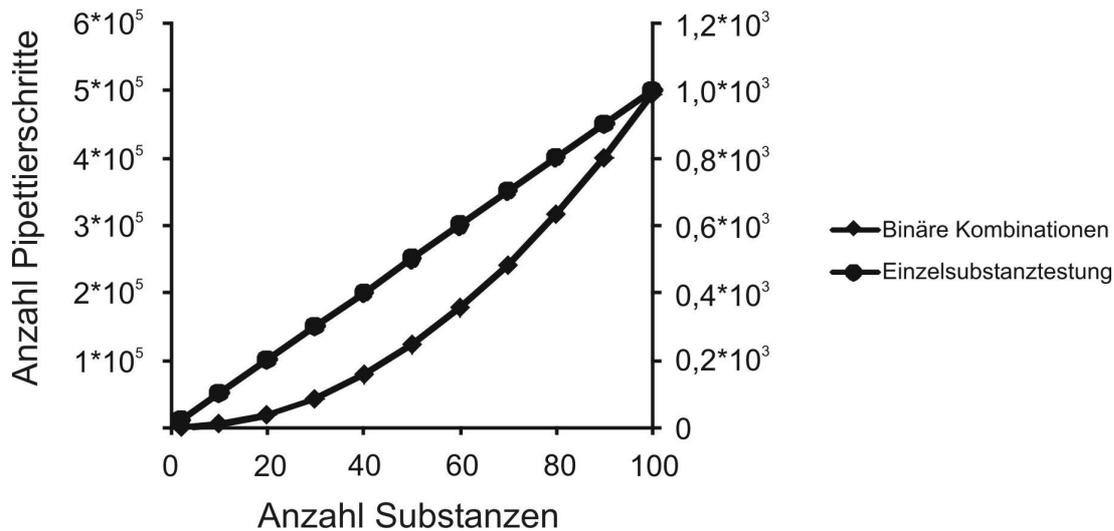


Abb. 2.7: Betrachtung der Pipettierschritte in Kombinations- und Einzelsubstanztestungen

(Eigene Darstellung)

Die Rauten beziehen sich auf die primäre und die Kreise auf die sekundäre y-Achse des Diagramms. Den Berechnungen liegen 10 Konzentrationsschritte pro Substanz zugrunde.

2.4.3. Mikrosystemtechnik

Hinter dem Wort Mikrosystemtechnik (MST) verbirgt sich die Vereinigung mehrerer funktionellen Systeme in einem einzigen Bauteil. Die Maße dieses Bauteils bewegen sich dabei im Mikrometerbereich. In einem Mikrosystem können Nano- oder Mikro Technologien aus unterschiedlichsten Bereichen (z.B. Biologie, Chemie, Maschinenbau) integriert sein, die dadurch steuerbar und nach außen hin fassbar gemacht werden können.

Durch die geringen Ausmaße eines Mikrosystems werden bestimmte Effekte auf Mikro- und Nanoebene erst zugänglich gemacht. Die Miniaturisierung erlaubt den Einsatz von wertvollen Materialien, eine günstige Massenfertigung und die Anwendungen können in mobile Systeme integriert werden (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2008).

Die Mikrosystemtechnik, die im Englischen auch micro (opto) electro mechanical systems (M(O)EMS) oder in Japan „micro machines“ genannt wird, ist bereits in vielen Industriezweigen stark vertreten. Darunter befinden sich die Kommunikationstechnologie, der Anlagenbau, die Umwelttechnik, die Chemie und Pharmazie,

Energietechnik, Logistik, Haus und Gebäudetechnik, der Automobilbau und die Medizintechnik (Mikrosystemtechnik Baden-Württemberg 2008).

In Mikrosystemen werden meist mehrere Basistechnologien wie Mikrofluidik, -optik, -elektronik, und -mechanik vereint. Dabei sind oft Sensoren und Aktoren mit einer Datenverarbeitungseinheit verbunden. Die bekanntesten Systeme sind zum Beispiel Beschleunigungs- oder Drehradsensoren, zur Auslösung von Airbags und Steuerung von Stabilitäts- und Navigationsinstrumenten in Automobilen, Mikrospiegelarrays in Beamern oder Instrumente zur minimal invasiven Chirurgie. Auch spielt MST eine immer wichtigere Rolle als so genannte „Enabling Schlüsseltechnologie“, die über skalenvertikale (von Nano nach Makro) und technologieübergreifende (Nano- und Biotechnologie und Mikroelektronik) Systemintegration viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten und Materialien erschließt (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2008).

In der Medizintechnik, Biotechnologie und Pharmaindustrie werden „vollständige“ Mikrosysteme zum Beispiel als nicht invasive Bestimmung von Blutparametern durch ein UV/VIS Mikrospektrometer oder minimal invasive Chirurgie verwendet. Oft werden aber einzelne Mikrotechnologien wie zum Beispiel die Mikrofluidik für spezielle Anwendungen, wie zum Beispiel der Lab-on-a-chip Systeme angewandt. Dort werden durch Mikrofluidik, Aktionen wie Einfüllen, Teilen, Mischen und Auslesen ausgeführt, ohne dass zusätzliche Komponenten vonnöten sind. Die Mikrofluidik ist ein großer Bereich der Mikrotechnologien innerhalb der Biotechnologie und wird beispielsweise eingesetzt in der Wirkstoffverabreichung, Diabetisbehandlung, Antibiotikaresistenztestung und in HTS-Systemen und DNA- und Mikroarrays um einige zu nennen. In der biologischen Forschung gewinnen diese neuen Mikrotechnologien auch immer mehr an Bedeutung um grundlegende Fragestellungen zu bearbeiten.

2.4.3.1 Diffusion und Gradienten in in-vitro Testsystemen

Die ersten in PubMed verzeichneten Experimente, bei denen Substanzen mittels Diffusion auf ihre Wirkung hin untersucht wurden, sind so genannte Agar-Diffusionstests (Gillissen 1954). Bei dieser Methode werden Mikroorganismen in Agar eingegossen und einer Substanz ausgesetzt, die entweder in ein ausgestanztes Loch (Lochtest), auf einem Filterpapier (Filtertest) oder in einem Metallzylinder (Zylinder-test) aufgetragen wird. Um den Auftragungsort herum entstehen nachfolgend entweder Bereiche mit erhöhtem oder verringertem Mikroorganismenwachstum (Abb. 2.8). Diese Methode wurde und wird meist verwendet zur Testung von Antibiotika gegen bestimmte Bakterienstämme.

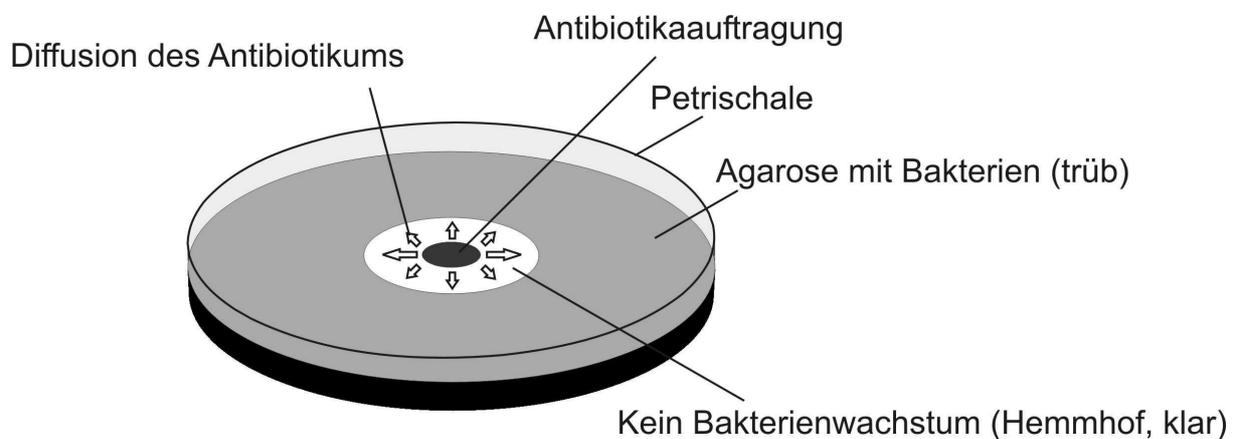


Abb. 2.8: Prinzip des Agar-Diffusionstest

(Eigene Darstellung)

Eine weitere sehr wichtige Anwendung von diffusionserzeugten Substanzgradienten ist die Untersuchung von biologischen Prozessen, die auf Abstufungen in Konzentrationen reagieren oder davon abhängig sind. Solche biologischen Prozesse sind Zell- und Organentwicklung, Entzündungsprozesse, Wundheilung und Metastasenbildung bei Krebskrankheiten. Wegen der Wichtigkeit der Fragestellungen, die den gradientenabhängigen Signalverarbeitungsprozessen zu Grunde liegen, wurden in den letzten Jahrzehnten viele verschiedene Methoden zur Generierung von Gradienten ausgearbeitet. Die Methoden zur Generierung von Substanzgradienten lässt sich in traditionelle, passive Diffusionsvorgänge und in modernere, steuerbare, mit der Mikrofluidik aufgekommene Methoden unterscheiden (Keenan & Folch 2008). Im

Folgenden werden Methoden beider Ansätze aufgeführt und ihre Vor- und Nachteile aufgezeigt. Biologische Hydrogele wie Agarose, Kollagen, Fibrin oder speziell zusammengestellte Hydrogele wurden und werden oft benutzt, um Zellen oder ganzen Explantaten Substanzgradienten auszusetzen (Foxman, Campbell, & Butcher 1997; Friedl et al. 1998; Heit et al. 2002; Rosoff et al. 2005). Hierbei befinden sich die zu testenden Zellen und die Quelle des diffundierenden Stoffes oft nebeneinander in einem Hydrogel. Nach einiger Zeit können dann Chemotaxis, Colony Forming Units, Zellzahlen oder die Expression bestimmter Proteine beobachtet werden.

Als Vorteile der Hydrogele zählen die einfache Vorbereitung ohne aufwendige Ausstattung und die physiologischere Umgebung im Vergleich zu 2D-Kulturschalen. Nachteilig bei der Benutzung von Hydrogelen ist die schwierige Reproduktion der Gradientenverläufe und die Unkontrollierbarkeit der Gradientenbildung. Ein weiteres Problem kann die Abhängigkeit der diffundierenden Spezies vom verwendeten Gelmaterial sein. Bei einer einfachen Diffusionen in einem Gel ist es daneben auch schwierig, bestimmte Zellantworten mit konkreten Konzentrationen zu korrelieren. Eine andere Methode, Zellen einem Konzentrationsgradienten auszusetzen, ist die Mikropipetten-Methode (de la Torres jr. et al. 1997; Gundersen & Barrett 1979). Hier diffundiert eine Substanz entweder passiv aus einer lang gezogenen, sehr dünnen Glaskapillare heraus, oder die Substanz wird mit pneumatischen Impulsen in das umgebende Medium befördert (Abb. 2.9). Diese Methode wird vor allem bei Neuronen (de la Torres jr. et al. 1997) und Neutrophilen (Dehghani et al. 2003) angewendet. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass Zellen während der Reaktion auf den Gradienten sehr gut mit mikroskopischen Verfahren untersucht werden können. Nachteilig an dieser Methode sind die Störungsanfälligkeit durch thermische Unregelmäßigkeiten, Verdunstungseffekte, Variationen von Experimentiertag zu Experimentiertag durch unterschiedlich geformte Kapillaröffnungen. Außerdem besteht die Notwendigkeit, relativ unhandliche Mikromanipulatoren gebrauchen zu müssen.

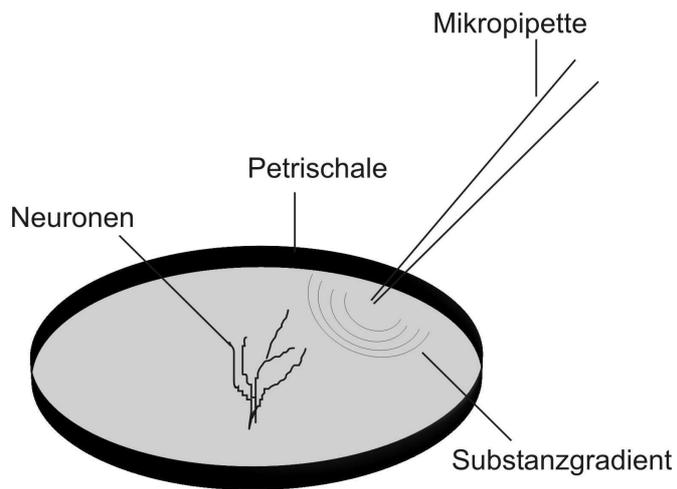


Abb. 2.9: Chemotaxisversuch mit der Mikropipetten-Methode
(Eigene Darstellung)

Ein sehr bekannter Bioassay, der auf der Wirkung eines Gradienten basiert, ist die Boydenkammer (Boyden 1962), in neueren Ausführungen auch Transwell Assay genannt (Abb. 2.10). In der Boydenkammer werden Zellen, in einer oberen Kammer, getrennt durch eine Membran, von chemotaktischen Substanzen in einem unteren Kompartiment, inkubiert. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird der Übertritt von Zellen durch die Membran betrachtet. Die Anzahl der Zellen die im unteren Kompartiment gezählt werden, korrelierten mit dem chemotaktischen Potential.

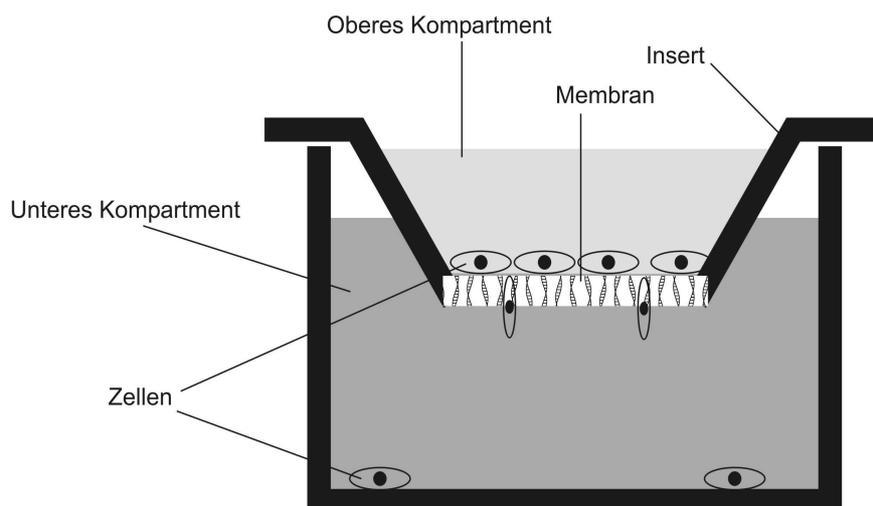


Abb. 2.10: Auf der Boyden Kammer basierender Transwell Assay
(Eigene Darstellung)

Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass viele Versuche parallel ausgeführt werden können. So ist eine einfache statistische Validierung einzelner Beobachtungen möglich. Der Konzentrationsgradient und die Vorgänge in einer Zelle, können mit dieser Methode nicht direkt nachvollzogen werden und so ist dieser Test hauptsächlich ein effektiver, populationsbasierter Migrations-Assay (Keenan & Folch 2008).

Präzise, reproduzierbare und mathematisch berechenbare 1D-Gradienten lassen sich mit der Zigmondkammer herstellen (Zigmond 1977) (Abb. 2.11). Die Zigmondkammer hat das Aussehen einer Zählkammer und ist mit zwei Kanälen versehen, die durch einen Kamm getrennt sind. Auf die zwei Kanäle und den Kamm wird ein Deckglas mit darauf adherierten Zellen gelegt woraufhin sich ein Gradient zwischen den Kanälen bildet und die Zellen beeinflusst.

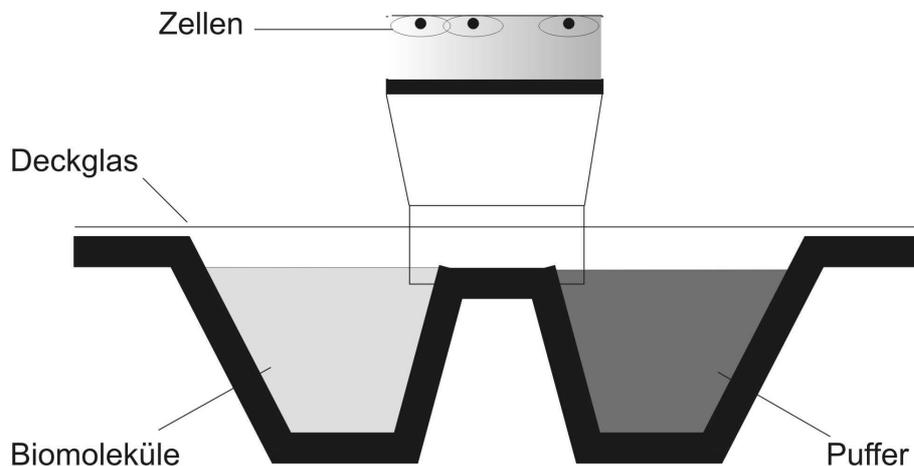


Abb. 2.11: Darstellung einer Zigmondkammer

(Zigmond 1977)

Mit dieser Vorrichtung lassen sich für begrenzte Zeit, gleichbleibende Gradienten herstellen mit denen Migration, Zellwachstum und Differenzierung unter dem Mikroskop beobachtet werden können. Der Gradient ist nur für etwa eine Stunde stabil und ist deswegen nur für schnell reagierende Zelltypen wie Neutrophile und Spermazellen geeignet (Keenan & Folch 2008). Dem gleichen Prinzip folgend, aber mit unterschiedlicher Geometrie, folgt die Dункammer (Zicha, Dunn, & Jones 1997). Der Vorteil der veränderten Geometrie ist, dass der Versuchsaufbau weniger anfällig für Verdampfungen ist.

Mit der schnellen Entwicklung der Mikroelektronik und der damit verbundenen Entwicklung von Mikrostrukturen fanden die biomedizinisch, elektromechanischen Mikrosysteme und die Mikrofluidik Einzug in die Zellbiologie. Mit diesen Techniken können Mikroumgebungen definiert dargestellt und Möglichkeiten, Zellen einzeln zu manipulieren geschaffen werden. Auch in der Generierung von Gradienten, wurden die neuen Möglichkeiten der Mikrostrukturierung, zu vielen Entwicklungen genutzt. Die Verfahren können in drei Hauptgruppen unterteilt werden. Die Erzeugung von oberflächengebundenen Gradienten, sich über die Zeit entwickelnde Gradienten und die Bildung von stationären Gradienten.

Eine Art oberflächengebundene Gradienten herzustellen ist die Verarmungsmethode (Delamarche et al. 1997; Fosser & Nuzzo 2003). Hier wird das große Verhältnis von Oberflächen zu Volumen in mikrofluidischen Kanälen ausgenutzt. Dabei lagern sich Biomoleküle, während sie in einem Puffer durch einen Mikrokanal fließen, an den Kanalwänden ab (Abb 2.12). Die Konzentration des Biomoleküls muss dabei so niedrig sein, dass die Absättigung der Oberflächen nur in einem kurzen Bereich am Beginn des Mikrokanals anhält. Die Flüssigkeit muss aktiv durch die Mikrokanäle gepumpt werden. Der Gradient ist vor allem abhängig vom Querschnitt des Kanals und der Flussgeschwindigkeit.

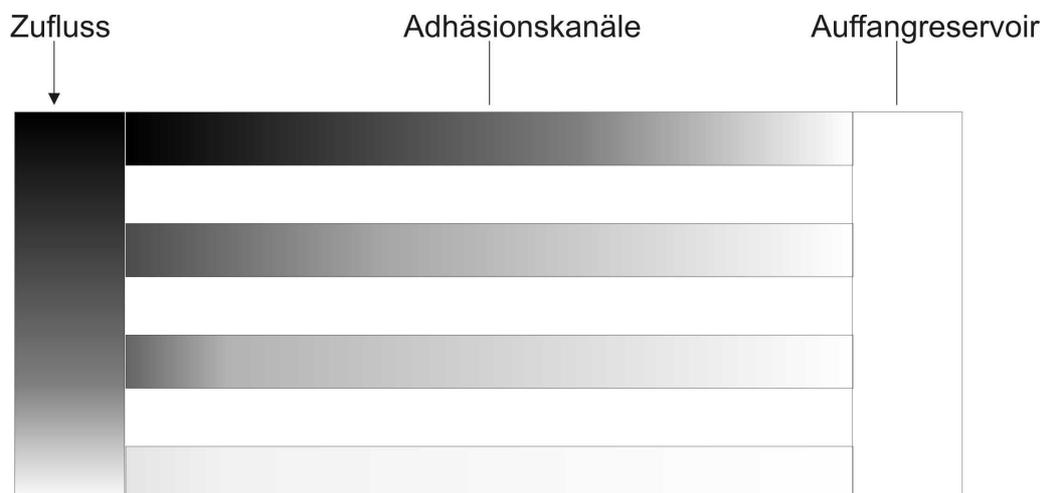


Abb. 2.12: Prinzip des Verarmungsgradienten
(Eigene Darstellung)

Die Bildung der Gradienten mit dieser Methode ist schnell auszuführen, braucht keine aufwendigen zusätzlichen Apparaturen und ist leicht in den Laboralltag einzuführen. Auf der anderen Seite sind die Gradienten durch sich ändernde Adsorbtienseigenschaften, die von verschiedenen funktionellen Gruppen, Temperatur und lokale Konzentrationen beeinflusst werden, schwierig voraus zu berechnen (Keenan & Folch 2008). Eine weitere mögliche Einschränkung ist die Anfälligkeit zur Denaturierung bestimmter Biomoleküle bei Adsorption an Oberflächen. Oberflächengebundene Gradienten können auch über mikrostrukturierte (gestempelte) Gradienten erzeugt werden. Hierbei werden biokompatible Elastomere dazu benutzt, um zunächst auf die Elastomeroberfläche aufgetragene Biomoleküle auf andere Oberflächen in einer bestimmten Mikrostruktur zu übertragen (Quist, Pavlovic, & Oscarsson 2005). Wenn Strukturen in subzellulären Abständen mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen gedruckt werden, nehmen Zellen diese Strukturen als kontinuierlichen Gradienten wahr und reagieren entsprechend. Die Vorteile der gestempelten Gradienten sind die Kontrollierbarkeit der Konzentrationen, der geringe Materialaufwand, und die gute Implementierbarkeit in ein normales Laborumfeld. Einschränkungen sind wiederum die Empfindlichkeit mancher Biomoleküle auf adsorptive Prozesse und die Verfügbarkeit der Biomoleküle nur an der Materialoberfläche.

Die zweite Klasse der mikrostrukturbasierten Gradientenerzeugung sind die passiven, sich über die Zeit entwickelnden Gradienten. Ein Beispiel dafür ist die Methode von Abhyankar und Mitarbeiter, welche ohne Adsorptionsprozesse und externe Kräfte auskommt (Abhyankar et al. 2006). Dabei befinden sich an beiden Enden eines Mikrokanals jeweils ein Reservoir. Das Zugaberesservoir ist im Vergleich zum Auffangreservoir viel kleiner, was die Bildung eines stabilen Konzentrationsgradienten ermöglicht. Um die mikrokanaltypischen Probleme mit unkontrollierter Konvektion zu verhindern, ist der Kanal vom Zugaberesservoir mit einer engporigen Membran (200 nm) abgetrennt. Ebenso ist der Zugabeport für Zellen durch eine Membran geschützt. Dort ist die Porengröße aber so gewählt, dass Zelle hindurch gelangen und sich in der Nähe des Auffangreservoirs absetzen können (Abb. 2.13).

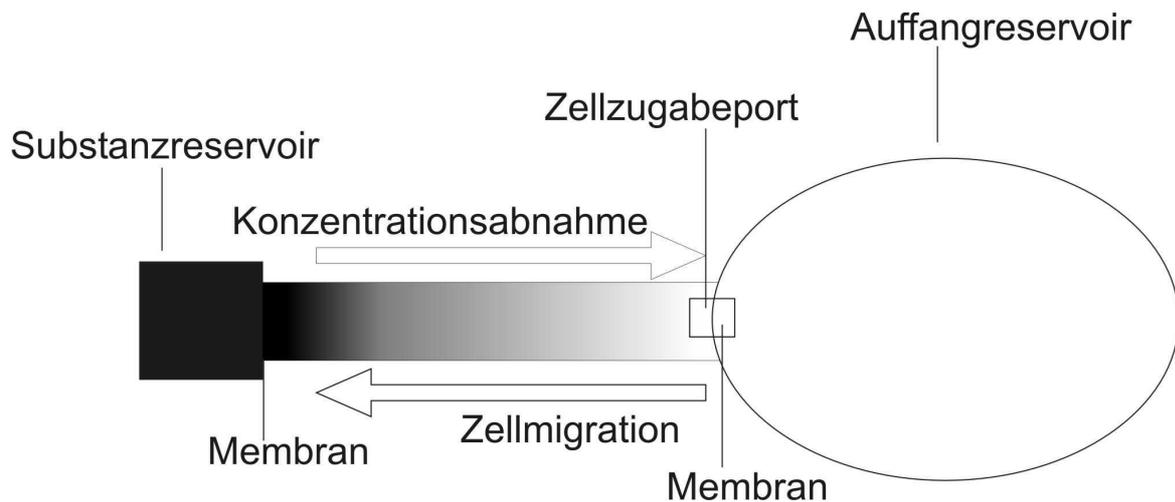


Abb. 2.13: Passive Gradientenbildung mit membrangeschützten Diffusionsraum

Abbildung adaptiert aus (Abhyankar et al. 2006)

Mit dieser Methode kann in sechs Stunden ein über 24 Stunden stabiler Gradient geschaffen werden. Dieser Ansatz ist einfach handzuhaben und durch das Fehlen von externen Flüssen können auch auto- und paracrine Effekte berücksichtigt werden. Einschränkungen sind, dass die Bildung der Gradienten nicht mehr kontrolliert werden kann, nachdem der Vorgang gestartet ist und das Langzeitexperimente problematisch im Sinne der Nährstoffzuführung werden können. Die mathematische Vorausberechnung der Gradientenbildung ist nicht trivial, weil der Massentransport durch eine Membran berücksichtigt werden muss. Zwei weitere passive Methoden sind der Mikroventil Chemotaxis Device (Frevert et al. 2006) und die mikrofluidische Multiinjektor-Methode (Chung, Lin, & Jeon 2006). Erstere funktioniert über eine bewegliche Membran, die den Weg zwischen zwei Kammern versperrt und freigeben kann, um Diffusion zu ermöglichen. Zweitere ist die mikrofluidische Umsetzung der Mikropipetten Methode, mit der die Anwendung mehrerer Mikropipetten gleichzeitig ermöglicht wird.

Die dritte Gruppe der mikrostrukturbasierten Gradientenerzeuger sind die Methoden mit denen stationäre und steuerbare Gradienten ermöglicht werden. Die Designs für die Bildung stationärer Gradienten beruhen auf zwei Prinzipien. Entweder werden die Gradienten in Parallel-Flusssystemen oder in flussresistenten Systemen erzeugt. Die Parallel-Flußsysteme werden in T-Sensor (Hatch et al. 2001;Kamholz et al. 1999), Vormischer-Gradientenbildner (Dertinger et al. 2002;Li et al. 2002;Mosadegh et al.

2007) und „Universal“-Gradientenbildner (Irimia, Geba, & Toner 2006) unterschieden (Abb. 2.14). Vormischer und Universal-Gradientenbildner sind Weiterentwicklungen aus T-Sensoren, bei denen im Prinzip viele T-Sensoren in unterschiedlicher Weise angeordnet werden, um das Ziel einer Gradientenbildung zu erreichen (Keenan & Folch 2008).

In einem Parallel-Flusssystem werden nebeneinander, zwei laminare Ströme erzeugt. Die Diffusionsrichtung der Substanzen findet dabei senkrecht zur Flussrichtung statt. Die Konzentrationsverläufe können über die Flussgeschwindigkeit und die zulaufenden Konzentrationen gesteuert werden. In den Bereichen, in denen sich ein Gradient bildet, kann ein Bioassay ausgeführt werden. Ein Vorteil hierbei ist die Möglichkeit, Konzentrationen während des Versuchs genau zu kontrollieren und Gradientenverläufe schnell ändern und reproduzieren zu können. Die Reaktionen auf diese Änderungen sind der mikroskopischen Beobachtung zugänglich, da die Strukturen auf einem Deckglas aufgebaut werden können. Versuche bei denen lösliche Faktoren wie para- oder autokrine Signale eine Rolle spielen, können dagegen schwer realisiert werden, weil die sekundären Signalstoffe mit dem Fluss herausgewaschen werden. Daneben werden große Mengen an Reagenzien verbraucht, je länger das Experiment andauert, um den Zustand des Gradienten aufrecht zu halten.

Die T-Sensoren sind der einfachste Aufbau, bei dem ein Gradient in der Überlagerung zweier Ströme entsteht. Beim Vormischer-Gradientenbildner wird durch die wiederholte Auftrennung und wieder Zusammenführung von zwei Strömen ein Gradient geschaffen, der kontinuierlich von einer Seite zur anderen verläuft. Der Universal-Gradientenbildner erlaubt es, durch seinen Aufbau eine Vielzahl verschiedener Gradientenverläufe herzustellen und Zellen damit zu testen. Die Versuchsaufbauten sind oft umfangreich, weil Pumpen, die einen Fluss aufrecht erhalten, angeschlossen werden müssen. Die strömungsbedingt auftretenden Scherkräfte können bei solchen Versuchsaufbauten empfindliche Zellen auch schädigen oder Ergebnisse verfälschen (DePaola et al. 2001; Shikata et al. 2005).

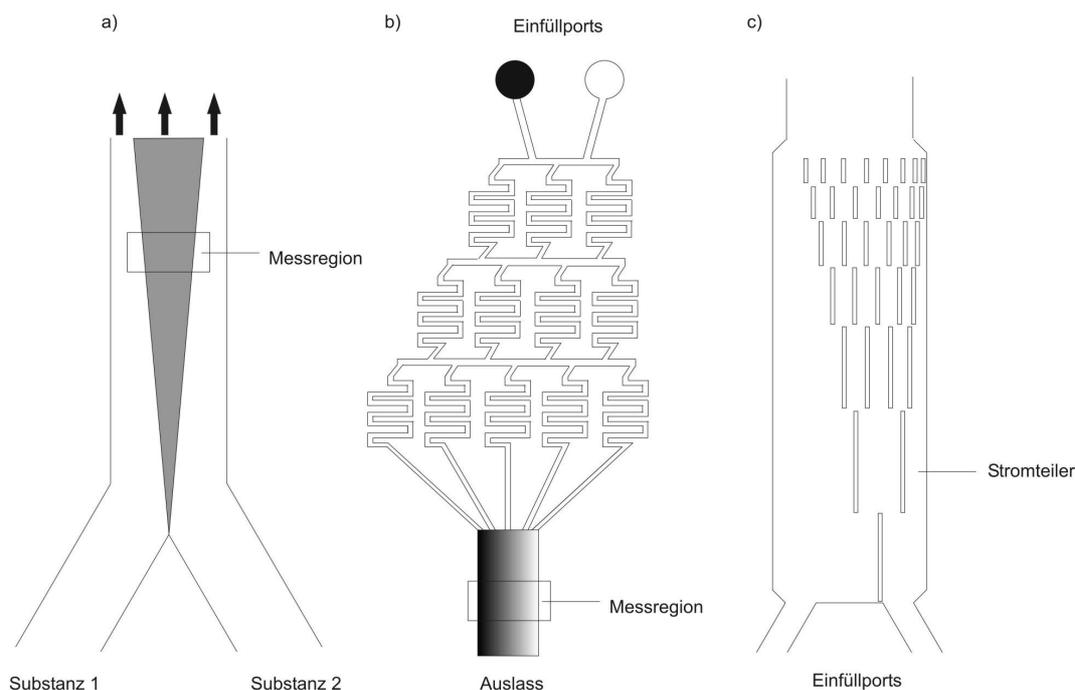


Abb. 2.14: Schema eines T-Sensors (a), eines Vormischer-Gradientenbildners (b) und eines Universal Gradientbildner (c)

Abbildung adaptiert aus (Keenan & Folch 2008)

Die Erzeugung von stationären Gradienten wurde bei chemotaktischen Untersuchungen bei verschiedenen Zelltypen (Dertinger, Jiang, Li, Murthy, & Whitesides 2002; Gunawan et al. 2006; Li, Baskaran, Dertinger, Whitesides, Van de, & Toner 2002; Saadi et al. 2006) eingesetzt, bei der Untersuchung von Zelldifferenzierung (Chung et al. 2005), gradueller viraler Infektion von Zellen (Keenan & Folch 2008), in der Anwendung bei der Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von Wirkstoffen (Fujii et al. 2006; Ye et al. 2007) sowie in verschiedenen anderen Bioassays (Cabrera & Yager 2001; Hatch, Kamholz, Hawkins, Munson, Schilling, Weigl, & Yager 2001; Macounova, Cabrera, & Yager 2001).

Ohne aufwendige, den Device umgebende Geräte, kommt der Gradientenmischer mit osmosebetriebener Pumpe aus, der eine Mischung aus T-Sensor und passiver diffusionsgetriebener Gradientenherstellung darstellt (Park et al. 2007). Bei diesem Aufbau wird ein Fluss durch osmotischen Druck, zwischen zwei unterschiedlich konzentrierten Flüssigkeiten erzeugt. Der Baustein zum Erzeugen des osmotischen

Druckes ist klein und kann leicht in Versuchsaufbauten integriert werden. Diese Methode wurde zu Migrationsversuchen von mesenchymalen Stammzellen verwendet.

Die zweite Gruppe von Erzeugern stationärer Gradienten ist die der flussresistenten Gradientenbildner. Hier werden zwei Reservoirs mit einer konvektionsarmen Matrix, oder durch Mikrostrukturen verbunden. Diese verhindern Konvektion, lassen aber gleichzeitig einen durch Diffusion erzeugten Massentransport zu. Der Gradient bildet sich hierbei über die Zeit ohne externe, flusserzeugende Systeme. Gegenüber dem membranstabilisierten System ist die Diffusion zu einem größeren Grad vor äußeren Einflüssen geschützt. Ansätze mit einem Hydrogel als Diffusionsstabilisator, sind beschrieben von (Wu, Huang, & Zare 2006) mit dem „Hydrogel-Capped Arbitrary“ Gradientenbildner und (Diao et al. 2006) mit dem Hydrogel-Membran Gradientenbildner. Ansätze mit einer geometrischen Restriktion sind von (Keenan, Hsu, & Folch 2006) mit der Mikrojet Methode und von (Li, Chen, & Yang 2007; Paliwal et al. 2007) mit den „Cross Channel“ Gradientenbildnern beschrieben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die verschiedenen Ansätzen, mittels Diffusion Gradienten zu bilden und diese in biologischen Assays einzusetzen, immer Vorteile und Nachteile mit sich bringen. Bei den traditionellen Methoden liegen die Vorteile in der Einfachheit des Aufbaus, der natürlicheren Umgebung mit Hydrogelen, dem geringen Verbrauch der Biomoleküle und der Möglichkeit mehrere unabhängige Gradienten erzeugen zu können. Die Nachteile liegen in der schwierigen Reproduzierbarkeit und Störanfälligkeit der Gradienten und dem Fehlen einer Steuerungsmöglichkeit der Gradientenbildung, während des Experiments. Die Gradienten entwickeln sich während des Experiments weiter und machen es daher schwierig konkrete Dosis-Wirkungsbeziehungen herzustellen.

Die moderneren mikrofluidischen Methoden bringen die Vorteile der Gradientensteuerbarkeit während eines Experiments, stabile Gradienten und gute Zugänglichkeit für mikroskopische Auswertungen. Die Nachteile sind hier aber wiederum in der Verwendung eines kontinuierlichen Flusses. Damit verbundenen ist die Auswaschung von sekundären Signalmolekülen, die Erzeugung von Scherkräften bei denen Zellen geschädigt oder Zellreaktionen verfälscht werden und ein hoher Wirkstoffverbrauch. In Tab. 2.4 sind die einzelnen Methoden übersichtlich zusammengestellt.

Die Kombination einzelner Vorgehensweisen könnten Vorteile bringen, wie zum Beispiel die Verbindung von Hydrogelen mit mikrofluidischen Netzwerken, oder Mikrostrukturen. Die Auswahl von Gradientenbildnern ist von der biologischen Fragestellung abhängig.

Es sind wenige der Methoden, die auf Mikrostrukturen beruhen kommerziell zu erhalten und obwohl viele Erkenntnisse und Forschungsergebnisse mit dieser neuen Technik schon gewonnen wurden, ist die Zahl der Labore, die solche Methoden benutzen noch begrenzt. Das mag daran liegen, dass biologische Labore nicht über die Möglichkeiten oder die Erfahrung verfügen, selbst einfachste Mikrostrukturen selbst herzustellen und die Vernetzung zu Gruppen, die Mikrostrukturen herstellen, noch zu wenig fortgeschritten ist.

Meist werden Gradienten für Chemotaxis und Migrationsuntersuchungen verwendet. Es gibt auch Gradientenbildner die für High Content Screening (Ye, Qin, Shi, Liu, & Lin 2007), Toxizitätstests (Kim, Yeon, & Park 2007) und „Live Cell Screening“ (Lee et al. 2007b) eingesetzt werden. Ein weiterer Schritt in zellbasierten Testverfahren ist auch die Kombination der genannten Methoden mit 3D-Zellkultivierungen. So können physiologische Bedingungen geschaffen werden, die mehr der tatsächlichen Zellumgebung im Körper entsprechen (Frisk et al. 2007; Kim, Yeon, & Park 2007; Lee, Gaige, Ghorashian, & Hung 2007b; Mosadegh et al. 2007b; Rosoff, McAllister, Esrick, Goodhill, & Urbach 2005)

Tab. 2.4: Vergleich von Gradientenbildnern

Entnommen aus (Keenan & Folch 2008)

	Gradiententyp	Scherkräfte	Dynamische Kontrolle von Konzentration und Profil	Möglichkeit mehrerer unabhängiger Gradienten	Biomolekülmenge
Traditionelle Methoden					
Biologische Hydrogele	fortlaufend	-	-	+	20 µl pro exp.
Mikropipette	fortlaufend	-	-	+	0,0108 µl/h
Transwell	fortlaufend	-	-	-	>235 µl pro exp.
Zigmond Kammer	kurzzeitig stabil	-	-	-	100 µl pro exp.
Dunn Kammer	kurzzeitig stabil	-	-	-	30 µl pro exp.
Mikrofluidische Methoden					
Substratgebunden					
Verarmung	stabil	-	-	+	
Mikrostrukturiert	stabil	-	-	+	
Zeitentwickelnd					
Nanoporen	fortlaufend	-	-	+	10 µl pro exp.
Multi Mikropipette	kurzzeitig stabil	-	-	+	0,33 µl pro exp.
Parallelfloss					
T-Sensor	stabil	+	+	-	6-300 µl/h
Vormischer	stabil	+	+	-	448-60 µl/h
Universal	stabil	+	+	-	3 µl/h
Flussvermindert					
Hydrogel-capped arbitrary	stabil	-	-	-	
Hydrogel Membran	stabil	-	-	+	60 µl/h
Microjets	stabil	-	+	+	9 µl/h pro jet
Cross-Channel	stabil	-	-	-	0,6-6 µl/min

2.5 Diffusion

Passive Diffusionsprozesse und daraus resultierende Gradienten spielen in der Biologie eine große Rolle. Sie treten in chemotaktischen Vorgängen wie der Embryogenese auf (Behar et al. 1994;Goentoro et al. 2006;Gregor et al. 2005), dem Neuronenwachstum (Rosoff et al. 2004), der Signaltransduktion (Boyden 1962;Meyers, Craig, & Odde 2006), der Immunreaktion (Kelly, Hwang, & Kubes 2007), der Metastasenbildung bei Krebskrankheiten (Fleury, Boardman, & Swartz 2006;Muller et al. 2001) sowie bei der Wundheilung (Kelly, Hwang, & Kubes 2007).

Die erste wissenschaftliche Betrachtung dieses Bereichs erfolgte bereits 1828 durch Thomas Graham. Er entwickelte 1854 das Prinzip der Dialyse, mit dem sich Teilchen aus einer Flüssigkeit mittels Diffusion über eine Membran trennen lassen (Philibert 2005).

Die erste mathematische Erfassung des Diffusionsprozesses erfolgte durch den Mathematiker A. Fick (Fick 1855). Er adaptierte die mathematische Formeln zur Beschreibung des Wärmetransports, die ein paar Jahre zuvor von Fourier formuliert wurden (Fourier 1822). Mit dem Werk über die zufälligen Bewegungen von gelösten Teilchen in ruhenden Flüssigkeiten, in dem Beobachtungen von Robert Brown (Brown 1828), durch Albert Einstein (Einstein 1905) in mathematische Formeln überführt wurden, waren die zwei herausragendsten Werke für die Diffusionsforschung verfasst.

Diffusion ist ein Prozess, bei dem Materie, nur aufgrund der zufälligen Bewegungen der Teilchen, aus der die jeweilige Materie besteht, von einem Ort zum anderen transportiert wird (Crank 1956). Dies kann in Flüssigkeiten, Feststoffen und in Gasen geschehen. In einem Experiment mit roter Iodidlösung und vorsichtig überschichtetem farblosem Wasser, lässt sich anfänglich eine klare Grenze zwischen beiden Medien sehen. Diese verschwimmt aber mit der Zeit mehr und mehr. Nach ausreichend langer Zeit, wird sich eine Lösung ergeben, die an jedem Punkt gleich intensiv gefärbt ist. Diese Vermischung der zwei Lösungen ereignet sich ohne äußere Einwirkungen (sei es durch Schütteln, Temperatur- oder Druckschwankungen) und ist somit ein selbstorganisierter Prozess.

Die Teilchen sind in ihrer Bewegung, in dem sie umgebenden Raum, völlig frei und die Wahrscheinlichkeit sich in eine bestimmte Richtung zu bewegen, ist für alle

Raumkoordinaten gleich groß. Die makroskopisch beobachtbare Bewegung ergibt sich aus der Tatsache, dass es bis zur kompletten Vermischung, immer Bereiche mit höherer und niedrigerer Konzentration des diffundierenden Stoffes gibt. Die Wahrscheinlichkeit ist dabei höher, dass an solchen Konzentrationsübergängen mehr Teilchen aus höher konzentrierten Bereichen in nieder konzentrierte Bereiche übertreten, als andersherum. Daher gleichen sich diese Unterschiede mit fortschreitender Zeit aus. Durch dieses ständige Herstellen des Gleichgewichts, schreitet die Diffusionsfront voran, bis keine Konzentrationsunterschiede mehr auszugleichen sind (Crank 1956).

In isotropen Systemen, bei denen an jedem Punkt keine der möglichen Bewegungsrichtungen bevorzugt wird, kann die Diffusion durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$F = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.1)$$

F beschreibt den Massetransport, C die Konzentration der diffundierenden Substanz, x entspricht der Raumkoordinate und D beschreibt den Diffusionskoeffizient mit der Dimension $Länge^2 \cdot Zeit^{-1}$. Negativiert wird dieser Zusammenhang, da sich die Diffusion in der entgegengesetzten Richtung zum Konzentrationsgradienten bewegt.

Bei einer gegebenen Konzentrationsverteilung eines diffundierenden Teilchens und gegebenem Diffusionskoeffizienten, kann mit diesem 1. Fickschen Gesetz (und gegebenen Randbedingungen) der Diffusionsstrom berechnet werden. Soll errechnet werden, wie sich die Konzentration zeitlich an einer bestimmten Stelle ändert, muss bilanziert werden, was durch ein Referenzvolumen hinein und wieder hinausdiffundiert. Die Differentialgleichung (2.2) sagt aus, dass die zeitliche Konzentrationsänderung der diffundierenden Spezies linear zur zweiten Ableitung der Konzentration nach dem Ort verläuft. Der Diffusionskoeffizient ist auch hier die Proportionalitätskonstante (Fick 1855; Höll 2008).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left\{ \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right\} = D \cdot \Delta c \quad (2.2)$$

Zur Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes lassen sich die Gauß-Verteilung oder eine (Gauß'sche) Fehlerfunktion heranziehen.

Die Gauß'sche Fehlerfunktion lässt sich nicht geschlossen darstellen und muss daher als tabellarisierte Funktion angelegt werden. Sie ist in den meisten Datenanalyseprogrammen vorhanden. Im Falle einer unerschöpflichen Quelle (konstant bleibende Anfangskonzentration), ist die Fehlerfunktion eine Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes um Konzentrationsverläufe zu berechnen.

$$c(x) = c_0 - c_0 \cdot \operatorname{erf} \left\{ \frac{x}{\sqrt{D \cdot t}} \right\} \quad (2.3)$$

Mit c_0 = Startkonzentration, erf = Ausdruck für die Fehlerfunktion, x = Diffusionsstrecke, D = Diffusionskoeffizient und t = Zeit.

Im Falle einer versiegenden (erschöpflichen) Quelle kann die Gauß'sche Glockenfunktion als eine mögliche Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes dienen. Die Beziehung von Diffusionskoeffizient, Temperatur und dem tatsächlichen Radius (Stokes-Radius, Hydrodynamischer Radius) eines diffundierenden Moleküls in einem bestimmten Lösungsmittel gibt die Stokes-Einstein Gleichung wieder.

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.4)$$

Mit D = Diffusionskoeffizient, K_B = Boltzmannkonstante, T = Temperatur, η = Viskosität des Lösemittels und r = hydrodynamischer Durchmesser des diffundierenden Moleküls.

Mit der Bestimmung von D , T und η kann der hydrodynamische Durchmesser von Molekülen bestimmt werden. Die Methoden, die dazu genutzt werden können, sind Pulsed Field Gradient (PFG)-NMR und IR-Spektroskopie, Lichtreflexion, Reversed

Gas Chromatographie, Fluorescence After Photobleaching (FRAP) und Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS).

Die Anwendungsgebiete der Diffusion befinden sich in der Materialforschung, Energiewirtschaft, Katalysatorentwicklung, Stofftrennung, Proteindiffusion in Zellmembranen, Hirnforschung, der Wirkstoffdarreichung (Kärger, Grinberg, & Heitjans 2005) und wie oben beschrieben, in der biologischen Testung von zellulären Systemen.

Eine große Bereicherung hat der kontrollierte Einsatz von Diffusion in der Halbleiterindustrie erbracht. Hier spielen Diffusionsvorgänge bei der Herstellung von Lichtwellenleitern, Kodiffusions-Transistoren und Flash-Speichern eine wichtige Rolle (Reisch et al. 2003a;Widmann, Mader, & Friedrich 2000a).

2.6 T-Zell-Signaltransduktion

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein Tyrosinkinase assoziierter Rezeptor. Er besteht aus zwei transmembranen variablen Aminosäureketten, der TCR α und TCR β -Kette (seltener $\gamma\delta$ -Ketten). Diese Ketten bilden extrazelluläre variable Domänen zum Erkennen von Antigenen auf MHC-Molekülen (van der Merwe & Davis 2003;Janeway et al. 2001b;Janeway et al. 2001c). Auf der zytosolischen Seite der Membran bilden sie eine Einheit mit dem CD3-Komplex (invariante $\gamma\delta\epsilon$ -Ketten) und einem ξ -Ketten Homodimer, von dem aus die zytosolische Signalweiterleitung startet. (Janeway et al. 2001a).

CD3 und die ξ -Ketten weisen Immunrezeptor tyrosinbasierte Aktivierungsmotive (ITAM's) auf, welche bei Bindung des TCR und eines Korezeptors phosphoryliert werden (Pitcher & van Oers 2003). Bei den Kinasen, die diese Phosphorylierungen katalysieren, handelt es sich um Lck und Fyn, Mitglieder der Familie zytosolischer Kinasen der so genannten Src-Familie (Palacios & Weiss 2004). In unstimulierten Zustand, wird Lck durch die Aktivität von CSK (c-terminale Src-Kinase) negativ reguliert. Durch die membranständige Phosphatase CD45 wird diese inhibierende Phosphorylierung wieder rückgängig gemacht (Mustelin et al. 2003). Durch die Bildung spezieller Membranstrukturen (Lipid Rafts, Supramolecular Activation Cluster-SMAC) während einer Anbindung an eine antigenpräsentierende Zelle, verändert sich das Verhältnis von CSK zu CD45 zugunsten einer Aktivierung

von Lck (Varma et al. 2006). Sind die ITAM's phosphoryliert, wird ZAP-70 (ξ -assoziertes Protein 70 kD), eine Protein Tyrosinkinase der Syk-Familie rekrutiert. Das an den T-Zell Rezeptor rekrutierte ZAP-70 wird nun seinerseits wieder durch die Src-Kinase Lck phosphoryliert und damit aktiviert. Die Substrate für ZAP-70 sind das transmembrane Strukturprotein LAT (Linker of Activation in T-cells), das Adapterprotein SLP 76 und der inhibitorische Adapter Gads (Zhang et al. 1998). Das transmembrane LAT befindet sich durch seine Palmitylgruppen, mit der es zusätzlich an die Membran assoziiert ist, in den cholesterolreichen „Lipid Rafts“, in denen alle für die Signalübertragung wichtigen Proteine versammelt werden. LAT ist ein Knotenpunkt für viele Signalproteine, von dem drei Hauptsignalwege von Zellmembran zum Zellkern ausgehen. Zum einen die Aktivierung von PLC γ über SLP 76 und ITK-Kinase (Su et al. 1999), welches die second messenger DAG (Diacylglycerin) und IP3 (Inositol trisphosphat) generiert, wobei zwei separate Signalwege eröffnet werden. Zum anderen findet eine Aktivierung von dem G-Protein Ras durch Guanin Nukleotid Exchange Factors (GEF's) statt, welches die Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Phosphorylationskaskade initiiert.

IP3 löst über eine Erhöhung der Kalziumkonzentration und Calcineurin die Aktivierung von NFAT aus. NFAT initiiert die Transkription verschiedener Interleukine wie IL 2, 3, 4, 5, 13 oder Signalmoleküle wie Fas Ligand, CD40 Ligand, INF γ oder TNF α . Die Serin/Threonin Kinase GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) ist der Gegenspieler von Calcineurin indem sie durch Phosphorylierung die NLS (Nuclear Localisation Sequenz) des NFAT maskiert (Frame & Cohen 2001).

DAG bleibt an der Zellmembran lokalisiert, während sie die Serin/Threonin Kinase PKC an die Zellmembran rekrutiert, so dass diese von Lck phosphoryliert werden kann (Liu et al. 2000). In T-Zellen aktiviert PKC θ , möglicherweise über AKT/MAP3K, die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 (Activator Protein 1). Daraufhin können diese in den Zellkern gelangen, um dort die Transkription von Immunantwortgenen wie zum Beispiel IL-2 zu initiieren (Sun et al. 2000).

Eine andere Funktion von PKC θ ist die Phosphorylierung von WASP (Wilcott-Aldrich Syndrom Protein). Dieses kann sich aus der inhibitorischen Bindung von WIP (WASP Interacting Protein) lösen und die Aktinorganisation regulieren.

Die Transkription verschiedener wichtige Gene der Immunantwort wird auch von den MAP-Kinasen initiiert. (Dodeller & Schulze-Koops 2006; Janeway, Travers, Walport, &

Shlomchik 2001a). Es gibt für verschiedenen Zelltypen und Stimuliertarten verschiedene MAP-Kinasen die aktiviert werden, aber alle den konservativen Aufbau einer aus drei Modulen bestehenden Kinasekaskade besitzen. Die Erk MAP-Kinase Kaskade wird induziert von Stimuli für Zellwachstum und Proliferation. Auslöser der p38 und Jun-Kinase Kaskade ist hingegen Zellstress, jedoch auch proinflammatorischen Signale wie Interleukin 1, TGF β oder TNF α (Ashwell 2006). Die Transkriptionsfaktoren, welche am Ende einer MAP Kinasekaskade aktiviert werden, hängen somit von den aktivierten Rezeptormolekülen und auslösenden Signalen ab, welche von den Zellen wahrgenommen werden. So werden je nach stimulierender Umgebung der Zellen, verschiedene Transkriptionsfaktoren kombiniert, womit eine Zelle entsprechend reagieren kann.

CD28, ein Korezeptor des T-Zell-Rezeptors und wichtiger Kostimulus, komplettiert die T-Zell-Immunantwort (Acuto & Michel 2003). Bei naiven T-Zellen, bei denen der CD28-Kostimulus fehlt, wird Anergie (fehlende Reaktion auf ein Antigen) verursacht, oder die Zelle begibt sich in Apoptose (programmierter Zelltod). Nach der allgemeinen Vorstellung werden der CD28- und der TCR-Signalweg über Lck, PI3K, AKT und GSK 3 miteinander zur vollen Effekterreichung synchronisiert. So wird eine komplette Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und AP1 erreicht (Cross et al. 1995; Holdorf et al. 1999; Kane & Weiss 2003; Schneider & Rudd 2008; Vanhaesebroeck & Alessi 2000).

Aus der Übersicht des T-Zell-Signalweges und der dabei beteiligten Kinasen, wird ersichtlich, wie wichtig Kinasen für die geregelten Abläufe in einer Zelle sind. Doch gibt es auch bei den Kinasen Gegenspieler, die durch Dephosphorylierungen meistens eine inhibitorische Funktion ausüben (Mustelin, Rahmouni, Bottini, & Alonso 2003). Diese Enzyme heißen Phosphatasen. SHP1 und 2. SHP1 inhibieren Kinasen der Src- und Syk-Kinase-Familie. SHP2 kann positive und negative Auswirkungen auf die T-Zell-Signaltransduktion haben (Mustelin, Rahmouni, Bottini, & Alonso 2003). Des Weiteren gibt es SHIP und PTEN, Gegenspieler der PI3K, dass schon erwähnte CD45, LMPTP, ein Positivregulator von ZAP70 und viele Phosphatasen die MAP-Kinasen regulieren (Mustelin, Rahmouni, Bottini, & Alonso 2003). In Abb. 2.15 ist der T-Zell-Signalweg noch einmal schematisch wiedergegeben.

Antigen-
präsentierende
Zelle

T-Zelle

Zellkern

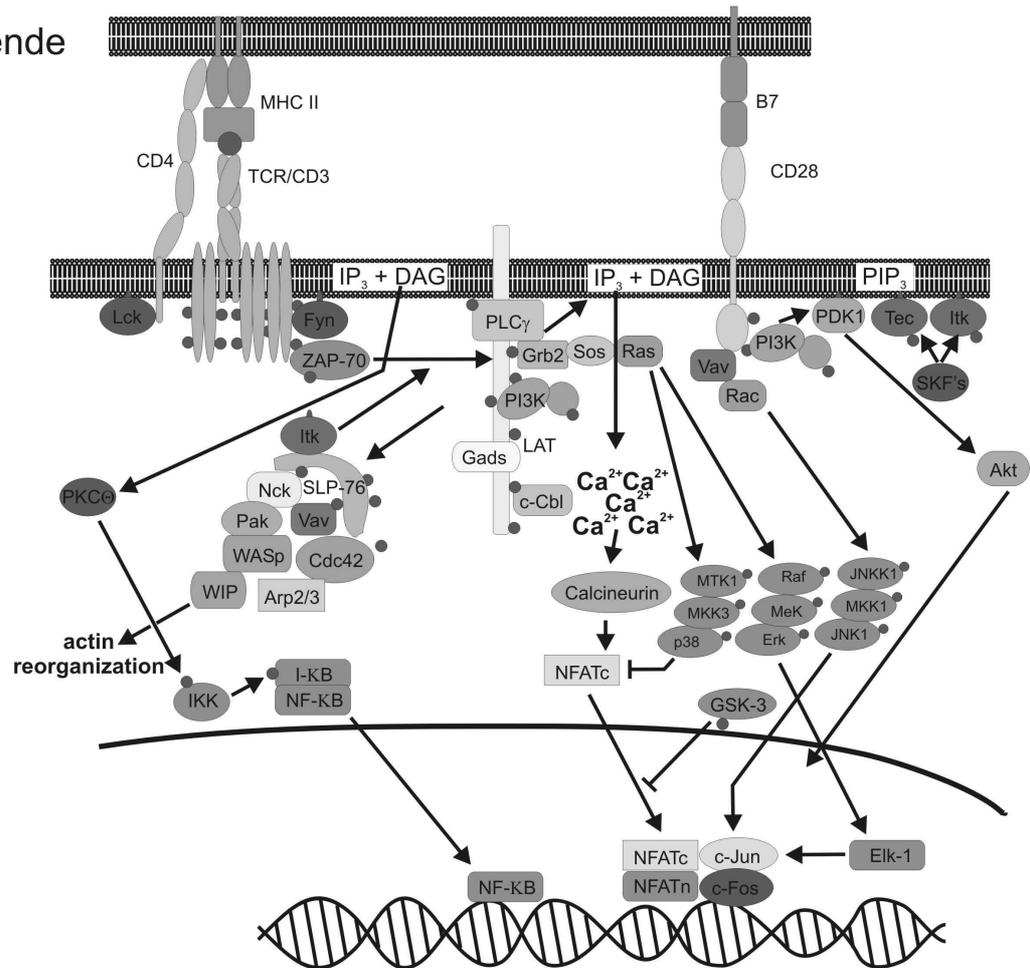


Abb. 2.15: Schema der T-Zell Signaltransduktion einer CD4⁺ T-Helferzelle

Dunkle Punkte = Phosphorylierungen, SFK = Src-Familie Kinase

Abbildung adaptiert von Prof. Dr. Brock

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialauflistung

3.1.1 Einsatz der Diffusion Devices in eine 12-Loch-Zellkulturplatte

12-Loch-Zellkulturplatte: Cellstar, Produktnr. 665 102, Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland.

Diffusion Device: Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen, Ausführung der CNC-Fräsarbeiten von Antje Treftz, Material: Polyoxymethylen, Delrin, Du Pont, Wilmington, USA.

Fettschicht-Applikator: Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen, Ausführung der CNC-Fräsarbeiten von Antje Treftz, Material: AlMg3.

Device-Applikator: Gefertigt mittels CNC-Fräsen in der Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen von Antje Treftz, Material: AlMg3.

Wärmeplatte: Gefertigt mittels CNC-Fräsen in der Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen von Antje Treftz, Material: AlMg3.

Wattestäbchen: Handelsübliche Wattestäbchen/Drogeriemarkt

Ethanol: Klinipath, Produktnr.: 4099.9005, Duiven, Niederlande.

Agarose: Low melting point, Produktnr.: A9414-5G, Sigma Taufkirchen, Deutschland.

Zellmedium: RPMI 1640, Produktnr.: P04-18500, Pan-Biotech Aidenbach, Deutschland.

Vaseline: Schönbuch-Apotheke Tübingen, Deutschland.

Penicillin/Streptomycin: GibcoBRL, Produktnr.: 15140-122, Eggenstein, Deutschland.

Heizplatte: M21/1, Framo-Gerätetechnik Eisenach, Deutschland.

Gewebeklebeband: Handelsübliche gewebeverstärkte Klebebänder wie Gaffa oder Panzertape oder laborübliche Gewebeklebebander zum Markieren von Laboreinrichtungen.

3.1.2 Aufzeichnung der Konzentrationsgradienten

Rhodamin B:	Produktnr.: 83689, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
Fluoreszein:	Produktnr.: 46955, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
Epifluoreszenz- mikroskop:	Axiovert 100, Zeiss Jena, Deutschland, Quecksilber Dampfampe, SensiCam gekühlte 12-bit CCD Kamera von PCO Computer Optics Kelheim, Deutschland, Objektiv Plan Neofluar 10 fach, NA 0,3, Zeiss Jena, Deutschland.
Filterset Fluoreszein:	Anregungsfilter HQ470/40, Q495LP dichroitischer Spiegel, Emmissionsfilter HQ525/50, Chroma Fürstfeldbruck, Deutschland.
Filterset Rhodamin:	Anregungsfilter HQ548/10, Q565LP dichroitischer Spiegel, Emmissionsfilter HQ610/75, Chroma Fürstfeldbruck, Deutschland.
Konfokales Mikroskop	TCP SP5-Scanner kombiniert mit inversen Mikroskopstand DMI 600B, Objektiv 10-fach HCX PL Fluotar NA 0,3, 488 nm Anregungslaser für Doxorubicin, Laserleistung 33.4 μ W, Leica, Mannheim, Deutschland.
Mikroskopsteuerungs- Software	Metamorph, Universal Imaging Downingtown, PA, USA.

3.1.3 Zelleinbettung in ein Kollagen-Hydrogel

Kollagen:	5 mg/ml, Typ I isoliert aus Rattenschwanzsehnen, gelöst in 0,1% Essigsäure, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Peter, Labor Zellsysteme Heike Mertsching, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrens- technik, Stuttgart, Deutschland.
Gelmedium:	2 Teile HEPES (47,6 mg/ml), Produktnr.: H4034, Sigma Taufkirchen, Deutschland.

2 Teile fötales Kälberserum (FCS), Produktnr.: P03-3302, Pan-Biotech Aidenbach Deutschland.

1 Teil RPMI 1640 zehnfach, ohne Phenolrot, Produktnr.: P04-16520, Pan-Biotech Aidenbach, Deutschland.

pH-Wert auf 7,6 – 7,8 eingestellt, sterilfiltriert.

HEPES: Produktnr.: H-4034, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland

FCS (fötales Kälberserum): Produktnr.: 3302-(P260822), Südamerika, Pan-Biotech Aidenbach, Deutschland.

3.1.4 Apoptosenachweis im Diffusion Device

Annexin V-Alexa 647: Produktnr.: A23204, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

Annexin V-Alexa 488: Produktnr.: A13201, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

Propidiumiodid: Produktnr.: P1304MP, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

Syto® 10 Green: Produktnr.: S32704, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

Sytox® Green: Produktnr.: S7020, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

Laser Scanning Mikroskop: LSM 510, Zeiss Jena, Deutschland, 10 × Objektiv, 488 und 633 nm Laser

CFDA-SE,Carboxy-fluoreszeindiacetat succinimidylester: Produktnr.: C1157, Invitrogen Karlsruhe, Deutschland.

PBS: 137 mM NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.4

Annexin Bindepuffer: 0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂, pH-Wert 4,7

HEPES: Produktnr.: H-4034, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland

3.1.5 MTT-Test

MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide, Produktnr.: M5655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.

FCCP:	Carbonylcyanid 4-trifluormethoxy-phenylhydrazon, Produktnr.: C2920, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
96-Loch-Zellkulturplatte:	Produktnr.: 83.1835.500, Sarstedt Nümbrecht, Deutschland.
Spektralphotometer:	BioRad, Benchmark Plus™, München, Deutschland.
Kollagenase:	Produktnr.: C-9891, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
Krebs-Ringer Bicarbonat Puffer (KRB-Puffer):	D-Glucose (1,8 g/L), MgCl (0,0648 g/L), KCl (0,34 g/L), NaCl (7 g/L), Natriumhydrogenphosphat (0,1 g/L)
Kollagenase-Puffer:	KRB-Puffer, 0,4 mM Ca ²⁺ , 1 % BSA.
Stereomikroskop:	MZFL III, Kamera DC 200, Leica, Mannheim, Deutschland.
Deckgläschen:	Rund, 12 mm, Assistent, Sondheim, Deutschland.
Paraformaldehyd:	Produktnr.: 158127, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.

3.1.6 Bild- und Datenverarbeitung

Bildverarbeitungs- Software:	ImagePro Plus, Media Cybernetics Bethesda, USA.
Diagrammerstellung:	Excel 2007, Microsoft, Washington, USA und SigmaPlot 2001, Systat, Erkrath, Deutschland.
Datenanalyse/Kurven- Anpassung:	Origin 6.11, Origin Lab Northampton, USA.
Bildbearbeitung:	CorelDraw 10, Corel, Ottawa, Kanada.

3.1.7 Anti-CD3/CD28 T-Zell-Stimulation unter Verwendung von Kinaseinhibitoren

ELISA-Platte:	Produktnr.: 655092, Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland.
96-Loch-Zellkulturplatte:	Produktnr.: 83.1835.500, Sarstedt Nümbrecht, Deutschland.

Anti-CD3- und CD28 Antikörper:	Klon OKT3 (Anti-CD3) und Klon 9.2 (Anti-CD28), aufgereinigt über eine Protein A Affinitäts-Chromatographiesäule und dialysiert gegen PBS. Freundlicherweise bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Jung, Institut für Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland.
PP2:	Selektiver Inhibitor der Src-Kinasen, Produktnr.: 529573, Calbiochem Schwalbach, Deutschland
Alsterpaullone:	Inhibitor von GSK-3, Produktnr.: A4847, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
FK506 (Tacrolimus):	Calcineurininhibitor, Produktnr.: F-4900, LC Laboratories Woburn, MA, USA.
Ciclosporin:	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingo Müller, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Deutschland
Gleevec:	BCR-ABL Tyrosinkinaseinhibitor
Sorafenib:	Raf1 Tyrosinkinaseinhibitor
Erlotinib:	EGFR Tyrosinkinaseinhibitor
Doramapimod:	p38 Tyrosinkinaseinhibitor
Vx 680:	BCR-ABL und Aurorakinaseninhibitor
Gefinitib:	EGFR Tyrosinkinaseinhibitor
Canertinib:	EGFR Tyrosinkinaseinhibitor
SU 6688:	VEGF Tyrosinkinaseinhibitor
Sunitinib:	VEGF Tyrosinkinaseinhibitor
MEK1 Inhibitor:	MEK1 Tyrosinkinaseinhibitor

3.1.8 IL-2 ELISA

ELISA-Platte:	Produktnr.: 655092, Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
Anti-IL-2-Antikörper:	Maus anti-human, Produktnr.: 555051, BD Pharmingen Heidelberg, Deutschland

Biot. Anti-IL-2-Antikörper:	anti-human, Produktnr.: 555040, BD Pharmingen Heidelberg, Deutschland.
Streptavidin-HRP:	Produktnr.: 554066, BD Pharmingen Heidelberg, Deutschland.
TMB-Substrat:	Produktnr.: N301, Pierce Rockford, USA
BSA:	Produktnr.: A7906, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
Tween 20:	Produktnr.: P1379, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland.
Waschpuffer:	PBS + 0,2% Tween.
ELISA-Reader:	SpectraMAX340, Molecular Devices Ismaning, Germany

3.1.9 Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen aus einer Blutprobe

50 ml Spritze:	Produktnr.: 318-100-88137, Beckton Dickinson Heidelberg, Deutschland
50 ml Röhrchen:	Produktnr.: 62.547.004, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanüle:	Produktnr.: 2050812, 0.70 x 30 mm, Braun, Melsungen, Deutschland
Heparin:	Produktnr.: 4042.1, Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Ficoll:	Produktnr.: F4375, Sigma Taufkirchen, Deutschland
MACS Beads Für CD4 ⁺ Zellen:	Produktnr.: 130-045-101, Milteny Biotec Bergisch-Gladbach, Deutschland

3.1.10 Verwendete Chemotherapeutika

Doxorubicin (Adriamycin):	Gebrauchsfertig für die klinische Anwendung, 3,45 mM in 0,9% NaCl. Als Anthracyclin interkaliert es in die DNA und inhibiert Topoisomerase II (Chuang & Chuang 1979). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingo Müller, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Deutschland und Joost van Galen, Pediatriche Onkologie, Abteilung Pädiatrie, Universitätsklinik der Radboud Universität Nijmegen, Niederlande.
------------------------------	---

- Methotrexat:** Gebrauchsfertig für die klinische Anwendung, 5,5 mM in 0,49 % NaCl, Dihydrofolatreduktaseinhibitor (Huennekens 1994). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingo Müller, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Deutschland und Joost van Galen, Pediatriche Onkologie, Abteilung Pädiatrie, Universitätsklinik der Radboud Universität Nijmegen, Niederlande.
- Paclitaxel:** Produktnr.: 7191, Sigma, Taufkirchen, Deutschland Pulverform, löslich bis zu 50 mg/ml in DMSO. Bindet an die β -Einheit von Mikrotubulinen und verhindert ihre Depolymerisation (Parekh & Simpkins 1997).
- Etoposid:** Gebrauchsfertig für die klinische Anwendung, 35 mM in 2 mg/ml Zitronensäure, 30 mg/ml Benzylalkohol, 80 mg/ml Polysorbent80/Tween 80, 650 mg PEG300 und 30,5 % Ethanol. Topoisomerase II-Inhibitor (You et al. 2008). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Joost van Galen, Pediatriche Onkologie, Abteilung Pädiatrie, Universitätsklinik der Radboud Universität Nijmegen, Niederlande.
- Clofarabin:** Gebrauchsfertig für die klinische Anwendung, 3,3 mM in ungepuffertem NaCl. Purin-Nukleotidanalogen, inhibiert Ribonukleotidreduktase, wird in die DNA eingebaut und löst Apoptose aus (Kantarjian, Jeha, Gandhi, Wess, & Faderl 2007). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingo Müller, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Deutschland.

Alle Wirkstoffe wurden bei -20° C gelagert. Angefangene Aliquots wurden bei 4 ° C gelagert.

3.1.11 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 kultiviert und bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ bei 37 ° C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Molt-4, CEM, KG1a, K562 und PLB 598 Zellen wurden freundlicherweise von Ingo Müller Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Deutschland bereitgestellt. Jurkat-Zellen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) unter der ACC Nummer 282, Lot12 erworben.

- Molt-4: T-Lymphoblasten aus Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie etabliert: Die Zelllinie wurde aus einem Patienten gewonnen, der einen Rückfall (relapse) nach Remission erlitt. Der Patient erhielt multi-medikamentöse Chemotherapie (ATCC - Zelllinienbank 2008; Takada, Takada, & Minowada 1974).
- Jurkat: T-Lymphozyten aus Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie etabliert: Nach einem erstem Rückfall eines Patienten gewonnen. Zellen exprimieren CD3 und schütten nach Phorbol-esterstimulation hohe Mengen an IL-2 aus (Abraham & Weiss 2004; ATCC - Zelllinienbank 2008; DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 2008; Ramanujan et al. 2002).
- CEM: T-Lymphoblasten aus Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie etabliert: Zellen wurden aus einem Rückfallpatienten entnommen. Erste kontinuierlich weitergeführte T-ALL Zelllinie. Zellen begehen spontane Apoptose bei niedrigen Zelldichten (ATCC - Zelllinienbank 2008; DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 2008; Sandstrom & Buttke 1993).

- KG1a: Myeloblasten aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie etabliert: Sublinie von KG-1, besteht hauptsächlich aus undifferenzierten Promyeloblasten. (ATCC - Zelllinienbank 2008; Koeffler & Golde 1980).
- K562: Myeloblasten aus Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie etabliert: Zellen entnommen während einer „blast-crisis“. Hochgradig undifferenzierte Zellen der Granulozytenlinie. Die Myeloblasten sind multipotent und können spontan in Vorläufer von Erythrozyten, Granulozyten und Monocyten differenzieren. Die Zellen tragen das Philadelphia Chromosom (ATCC - Zelllinienbank 2008;DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen 2008;Koeffler & Golde 1980).
- PLB 598: Myeloblasten aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie etabliert: Zellen aus 38-jähriger Patientin während eines Krankheitsrückfalls entnommen. Die Zellen sind Myeloblasten welche durch PMA in Monozyten differenzieren können. Unterart der HL-60 Zellen (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 2008;Tucker et al. 1987)

3.2. Methoden

3.2.1 Der Diffusion Device

Die Grundidee des Diffusion Device ist es, durch Überkreuz-Diffusion zweier Substanzen unendlich viele Mischungen dieser beiden Substanzen entstehen zu lassen. Wie in Abb. 3.1 ersichtlich ist, besteht der Device aus einer quadratischen Aussparung, der so genannten Testfläche. An diese grenzen zwei schmale Aussparungen, die zum Einpipettieren der Substanzen erdacht sind, an. Durch die rechtwinklige Anordnung der Pipettierschlitze ist gewährleistet, dass alle Mischungen von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration, innerhalb eines gewählten Konzentrationsbereiches, ohne Redundanzen abgedeckt werden. Die drei kleinen Löcher an zwei, den Pipettierschlitzen gegenüberliegenden Seiten, dienen zur Entlüftung bei der Anpressung des Devices auf eine Gelstruktur. An der Unterseite des Diffusion Device wurden Grate eingearbeitet, die sich später in der Diffusionsmatrix verankern sollen. Dabei ist zu beachten, dass die Grate an der Außenseite tiefer in die Diffusionsmatrix reichen, als an der Innenseite. Dies soll dem Zwecke dienen, dem Diffusionsstrom in den der Testfläche abgewandten Richtungen, mehr Widerstand entgegenzusetzen. Als Material wurde Polyoxymethylen gewählt, ein inerter Kunststoff mit geeigneten Eigenschaften zum Fräsen, der auch in der Medizintechnik verwendet wird.

Die Produktion erfolgte in der Universitätswerkstatt des Instituts für Angewandte Physik in Tübingen mittels CAD (Computer Aided Design) und CNC (Computerized Numerical Control). Wegen geringer Stückzahlen, war es notwendig, die Devices nach Gebrauch, aus Gründen der Wiederverwertung, einer Waschprozedur zu unterziehen. Zum Ende der praktischen Arbeiten, wurden Vorbereitungen zur Spritzgußfertigung einer größeren Menge Devices getroffen, um Einmalartikel im großen Maßstab herstellen und verwenden zu können.

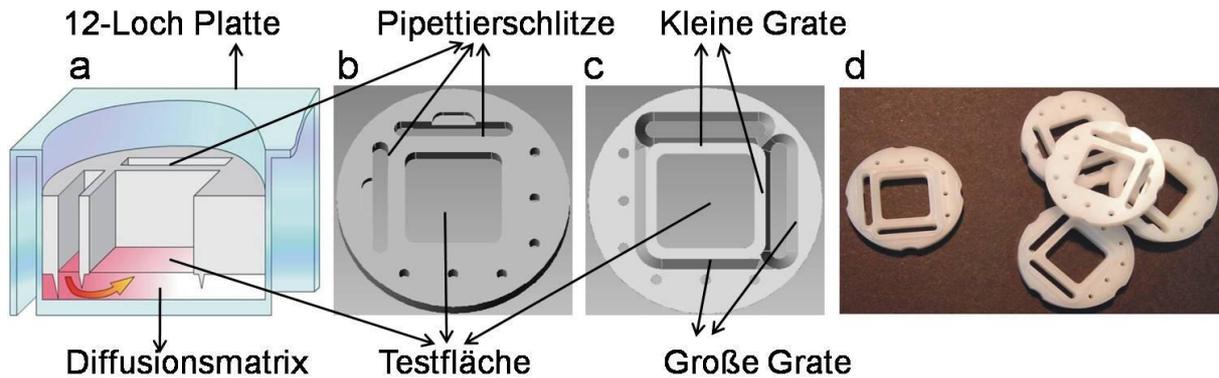


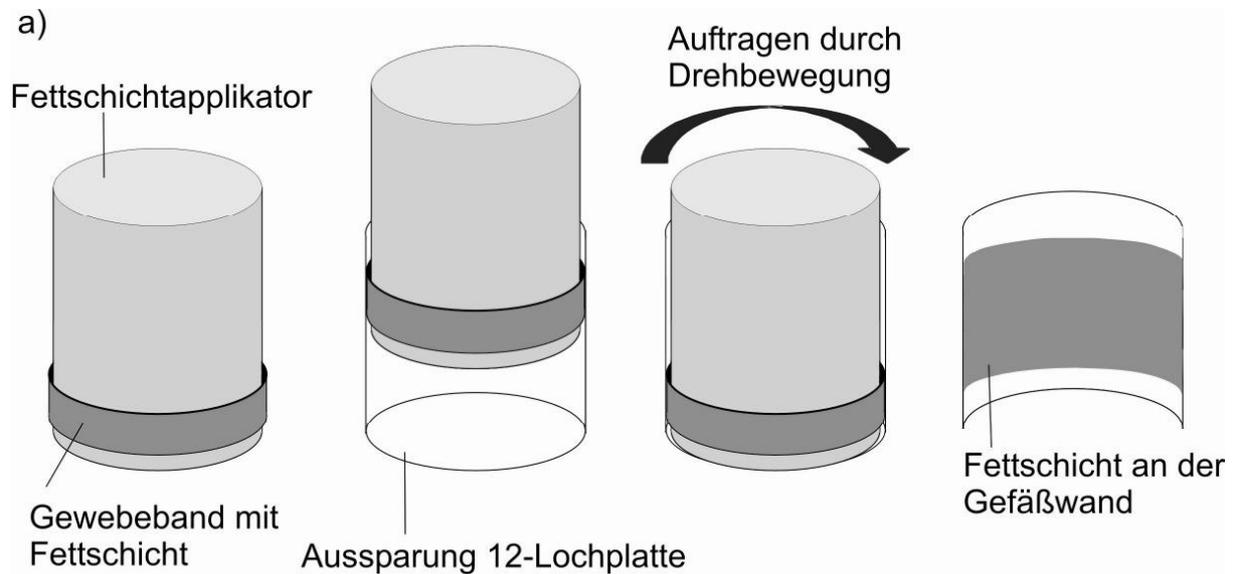
Abb. 3.1: Verschiedene Darstellungen des Diffusion Device

- a) Schematische Darstellung des Devices in der Kavität einer 12-Loch-Zellkulturplatte.
- b) 3D-Ansicht des Device von oben (erstellt mit SpinfireReader, Actify, Hinckley, UK).
- c) 3D-Ansicht des Device von unten
- d) Photographie einiger Diffusion Devices. Abmessungen und technische Zeichnung befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Anhang 1).

3.2.2 Einsatz der Diffusion Devices in einer 12-Loch-Zellkulturplatte

Der Fettschicht-Applikator wurde mit einem Gewebeklebeband wie in Abb 2.2 (a) gezeigt vorbereitet. Dabei wurde ein etwa 1 mm großer Abstand von der Unterseite des Applikators freigelassen. Die Dicke der Klebebandschicht war ausreichend, wenn beim Einführen des Applikators ein fester Kontakt mit der Gefäßwand der 12-Loch-Zellkulturplatte hergestellt werden konnte. Die anschließende Beschichtung des Gewebeklebebandes mit Vaseline, erfolgte mit Hilfe eines Wattestäbchens. Während der so präparierte Applikator in eine Kavität der 12-Loch Zellkulturplatte bis zum Anschlag geschoben und mehrere Male gedreht wurde, übertrug sich die Vaseline von dem Applikator auf die Innenseite der Kavität. Dieser Vorgang wurde für jede Kavität wiederholt, einschließlich der Auftragung der Vaseline auf den Applikator. Durch die Aufbringung der Fettschicht wurde verhindert, dass sich beim späteren Befüllen der Kavität mit Agarose ein Meniskus bildet. Der Abstand von 1 mm entspricht einer späteren Agaroseschicht dieser Höhe. Nach diesen Maßnahmen wurden die Kavitäten mit Ethanol (99,6 %) befüllt und 5- 10 Minuten bei RT inkubiert. Während der Wartezeit wurden auch die Innenseiten der Diffusion Devices mit Vaseline beschichtet. Überschüssige Vaseline konnte durch Abreiben der Innenflächen mit einem Tuch entfernt werden. Nachfolgend wurden die Devices

in 70 % Ethanol desinfiziert. Zusammen, mit dem ebenfalls mit 70% Ethanol desinfizierten Device-Applikator, wurden die Werkteile im nächsten Schritt in die Zellkultur-Werkbank gelegt.



b)



c)



Abb. 3.2: Hilfsmittel zur Aufbringung der Diffusion Devices.

a) Schemazeichnung zur Benutzung des Fettschichtapplikators. b) Wärmeplatten mit und ohne Röhrchen und 12-Loch Zellkulturplatte. c) Device-Applikator mit aufgelegten Diffusion Devices.

Im nächsten Schritt wurde die Zellkulturplatte ausgeschüttelt und mit einem Luftstrom trocken geblasen. Dem folgte das sofortige Abdecken mit dem Plattendeckel. Vor der Agarosevorbereitung, wurde die Wärmeplatte auf eine Heizplatte gelegt und erwärmt. Dabei war zu beachten, dass die Wärmeplatte nicht zu heiß wird um das

Plastik nicht zu beschädigen. Die Agaroselösung betrug 1,5 % aufgelöst in Medium mit 10% FCS ohne Phenolrot. Anschließend wurde die suspendierte Agarose in einer Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Bei wiederholtem Erhitzen können dabei Flocken, durch Hitzedenaturation der Proteine, im FCS entstehen. Durch Abzentrifugieren ließen sich diese Flocken wieder entfernen. Die flüssige 1,5% Agarose wurde anschließend in einer Halterung auf der Wärmeplatte aufbewahrt (Abb. 3.2 (b)). Zusammen mit der 12-Loch-Zellkulturplatte, konnte die Agarose auf der Wärmeplatte, anschließend in die Zellkultur-Werkbank gestellt werden. In der Agarose wurde nachfolgend eine 100-fach konzentrierte Penicillin/Streptomycin-Mischung einfach in die Agarose verdünnt. So war die Agarose bereit, in die einzelnen Kavitäten der 12-Lochplatte gefüllt zu werden. Das jeweilige Volumen betrug 550 µl. Jeder Pipettierschritt musste mit einer neuen Pipettenspitze ausgeführt werden, da sich sonst durch die Hitzeeinwirkung der heißen Agarose die Volumina in der Pipette änderten. Nach Befüllung der 12-Loch-Platte, wurde diese geschwenkt bis in allen Kavitäten der Boden komplett mit Agarose bedeckt war. In diesem Zustand ruhte die Platte auf einer geraden Oberfläche bei Raumtemperatur, bis die Agarose einen zur Weiterarbeit geeigneten Festigkeitsgrad erreicht hatte. Dieser Vorgang dauerte zwischen 8–15 Minuten und war von der Einstellung des Mikrowellengerätes und der Außentemperatur abhängig. Ab ca. acht Minuten sollte minütlich getestet werden, ob die Agarose den richtigen Festigkeitsgrad erreicht hat. Dies geschah zunächst durch „Klopfen“ an der Platte um zu sehen, ob die Agarose sich noch in einem teilflüssigen Zustand befand. War dies nicht der Fall, wurde die Platte vorsichtig kopfüber auf den Device-Applikator gesetzt. Machte die Konsistenz der Agarose beim Kontakt mit den Devices einen wachsartigen Eindruck, konnte die Platte leicht angepresst werden. Machte die Konsistenz der Agarose hingegen noch einen zu instabilen Eindruck, wurde noch eine Minute gewartet. Befand sich die 12-Loch-Zellkulturplatte schließlich auf den Devices, wurde der Device-Applikator mit der 12-Loch-Platte angehoben und in einer schnellen Bewegung herumgedreht. Es sollten dabei so wenig Scherkräfte wie möglich auf die Agarose einwirken und am Ende der Bewegung sollte das volle Gewicht des Applikators auf die Devices in der Agarose einwirken. Nach dem Herumdrehen konnten die 12-Loch-Zellkulturplatte und der sich nun oben befindende Applikator vorsichtig abgestellt werden. Die sicherste Art und Weise des Anhebens und Absetzens war es, nur den jeweils

unteren Teil der Platte bzw. des Applikators zu halten. Der Applikator wurde noch einmal angedrückt und konnte danach sofort entfernt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Devices durch ihre Grate, in der Agarose verankert (Abb 3.3). Es war möglich, dass sich in den Pipettierschlitzten Agarose nach oben schob. Diese Agarose musste noch nachträglich vorsichtig mit einer 200 µl Pipettenspitze entfernt werden.

War die Agarose beim Aufbringen der Devices zu fest, begann sie zu reißen. War sie zu flüssig, gab es unebene Oberflächen, oder die Agarose floss in die Pipettierschlitzte, hinein.

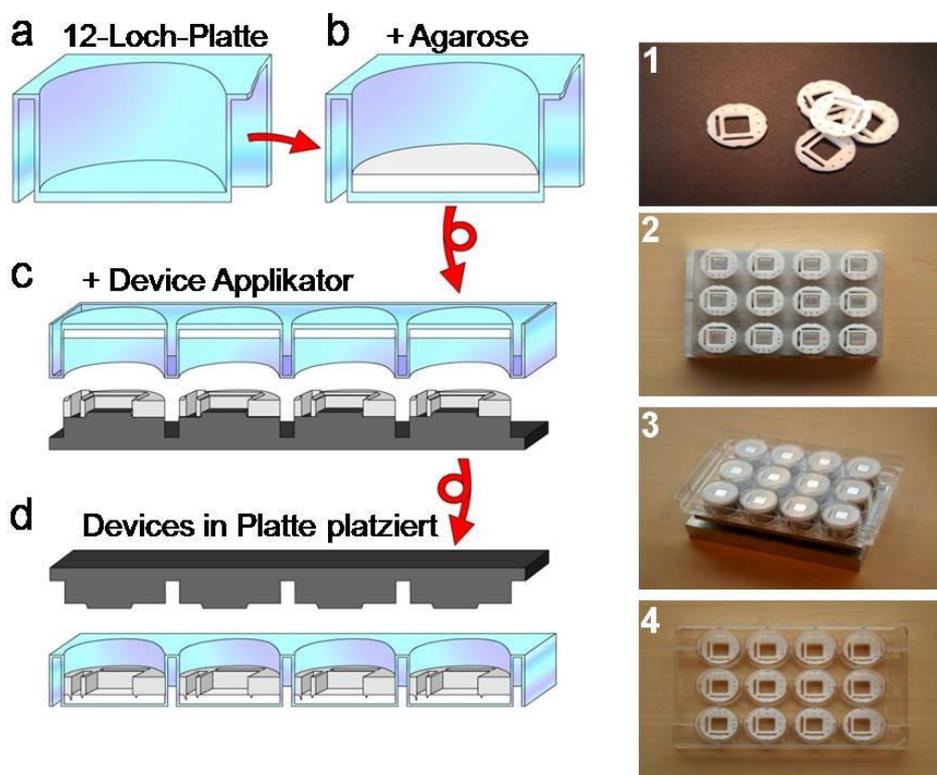


Abb.3.3: Einsatz der Diffusion Devices in eine 12-Loch Zellkulturplatte

a) Eine Kavität einer 12-Loch Zellkulturplatte. b) Kavität einer 12-Loch Zellkulturplatte mit eingegossener Agarose. c) Die Diffusion Devices sitzen auf dem Device-Applikator und eine 12-Loch-Platte wird kopfüber darauf gepresst. d) Der Device-Applikator und die 12-Loch-Zellkulturplatte werden zusammen herumgedreht. Die Devices sind in der Agarose verankert und der Device-Applikator kann entfernt werden. Neben der Schemazeichnung sind die einzelnen Schritte in Photoaufnahmen zum besseren Verständnis nochmals dargestellt

3.2.3 Aufzeichnung der Konzentrationsgradienten

Die Aufzeichnung der Fluorophorgradienten erfolgte mittels eines inversen Epifluoreszenzmikroskops. Mit diesem wurden 10 Aufnahmen entlang eines Gradientenverlaufs aufgenommen. Um den Gradientenverlauf der ganzen Testfläche überblicken zu können, wurden je Device drei Gradientenverläufe an versetzten Startpunkten aufgenommen. Die Aufnahmen konnten mit Hilfe eines in der Software „Metamorph“ implementierten Macros über die komplette 12-Loch-Platte automatisiert angefertigt werden.

Zur Erstellung von Kalibrationskurven, wurden Konzentrationsreihen in einer 96-Lochplatte für Agarose, Gelatine und in Wasser erstellt und anschließend mit den selben, für die Gradientenvermessung verwendeten Mikroskopieeinstellungen, gemessen. Die Messtiefe betrug 200 μm aus Sicht des inneren Plattenbodens. Alle Intensitätswerte wurden auf eine Millisekunde Beleuchtungszeit normalisiert, bevor die Konzentrationen bestimmt wurden.

Die Aufzeichnung der Doxorubicingradienten erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. Dazu wurde eine Kachelaufnahme mit 7*7 oder 8*8 Einzelaufnahmen der kompletten Testfläche mit einem 10 \times Objektiv angefertigt. Die Messtiefe im Gel oder in der Flüssigkeit betrug ebenfalls 200 μm . Nach der Fertigstellung der Kachelaufnahme, wurden innerhalb der Mikroskop-Software 3 Linienprofile in Richtung des Gradientenverlaufs gelegt. Die Werte des Linienprofils konnten anschließend zur Weiterverarbeitung nach Excel exportiert werden.

Zur Bestimmung von Doxorubicinkonzentrationen aus den erhaltenen Intensitätswerten, mussten ebenfalls Kalibrierkurven angefertigt werden. Hierzu wurde Doxorubicin in bekannten Konzentrationen in RPMI-Medium mit 10% FCS gelöst. Die Anregungswellenlänge betrug mit 488 nm und der Detektionsbereich 496–598 nm. Die Leistung des Laser betrug 33,4 μW . Vor jeder Gradientenmessung bestimmte man Kalibrierlösungen dreier verschiedener Konzentrationen. Typischerweise waren dies 1, 10 und 100 μM in Medium + 10% FCS verdünnt. So konnten eventuelle Veränderungen, die die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität betreffen, wieder an die Kalibrierkurve angeglichen werden.

3.2.4 Zelleinbettung in ein Kollagen Hydrogel

Zum Vorbereiten auf die Einbettung in Kollagen, wurden die zu testenden Zellen in gewünschter Anzahl in ein Zellkulturrohrchen gefüllt und bei 340 g 5 Minuten abzentrifugiert. Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in eisgekühltes Gelmedium, um sie anschließend darin zu suspendieren. Danach wurde das eisgekühlte Kollagen (5 mg/ml) zur Zellsuspension hinzugefügt. Das Verhältnis von Gelmedium zu Kollagen betrug 3:1. Die zwei Komponenten wurden mit einer Pipette gut gemischt und zügig in die Devices pipettiert. Dauerte der Pipettiervorgang zu lange, war es möglich, dass das Kollagen auspolymerisierte und somit nicht mehr pipettierbar war. Die Kühlung des Gelmediums und des Kollagens zögern die Polymerisierung hinaus. Pro Device wurden 100 µl Kollagen eingebettete Zellen verwendet.

Beispielrechnung für eine 12-Loch-Zellkulturplatte und $7,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Device

$$\text{Benötigtes Gelmedium: } \frac{12 \times 100 \mu\text{l}}{4} \times 3 = \underline{900 \mu\text{l}}$$

$$\text{Benötigtes Kollagen: } \frac{12 \times 100 \mu\text{l}}{4} \times 1 = \underline{300 \mu\text{l}}$$

$$\text{Benötigte Zellen: } 12 \times 7,5 \cdot 10^5 = \underline{9 \cdot 10^6 \text{ Zellen}}$$

Nach erfolgreicher Überführung der Zellen in das Device wurde die 12-Loch-Zellkulturplatte für ca. 10 Minuten zur Auspolymerisierung bei 37° C, 5% CO₂ und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in einen Brutschrank gestellt. Im Anschluss daran wurde jedem Device 200 µl Zellkulturmedium zupipettiert. Die Wirkstoffe konnten je nach Vorgehen, zu jedem Zeitpunkt nach der Verankerung der Devices in der Agarose, zugegeben werden.

3.2.5 Apoptosenachweis im Diffusion Device

Die Methode, Apoptose mittels fluoreszenzmarkierten Annexins zu detektieren, wurde Mitte der neunziger Jahre eingeführt (Koopman et al. 1994; Vermes et al. 1995). Dabei wird die Fähigkeit des Annexins, Phosphatidylserin mit hoher Affinität zu binden ($K_d = 7 \text{ nM}$), ausgenutzt. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid der

Zellmembran, welches beim programmierten Zelltod (Apoptose) zur Außenseite einer Zelle umklappt. Das so genannte „flip-flop“-Verhalten der Phosphatidylserine erleichtert phagozytierenden Zellen, apoptotische und somit zu beseitigende Zellen zu erkennen.

Annexin ist ein 36 kD großes Protein, welches von Epithelzellen vieler Gewebe produziert wird. Es können acht Annexin-V-Moleküle unter Anwesenheit von Kalziumatomen an ein Phosphatidylserin binden (*MICAD (Molecular Imaging and Contrast Agent Database) 2006*). Die am häufigsten eingesetzten Methoden zur Detektion apoptoseabhängiger Annexinbindeverhalten sind dabei flußzytometrischer oder fluoreszenzmikroskopischer Natur. Hierbei muß das Annexin mit einem Fluorophor markiert werden.

Für die ersten Färbereaktionen, wurden 15 µl Annexin-Alexa 488, 5 µl (50 µg/ml) Propidiumiodid und 10 µl zehnfach konzentriertem Annexinpuffer, mit Medium auf 100 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Nachdem vorher das Medium aus der Inkubation vorsichtig entfernt wurde, gab man diese 100 µl auf die Zellen. Es folgte eine Inkubation von 30 min, auf Eis und unter Lichtausschluß. Bei der Verwendung von Sytox® und Syto® Green wurde die Konzentration auf 5 µM im Reaktionsvolumen eingestellt.

Für die Messung des Apoptosegradienten mit Annexin-Alexa 647 und der CFSE-Hintergrundkorrekturfärbung, wurden zwei separate Zellfärbungen durchgeführt. Bevor die Zellen in die Kollagenmatrix einbettet wurden, erfolgte eine Färbung mit CFSE. Dieser Schritt diente dazu, eine Färbung aller Zellen in der ganzen Testfläche zu erreichen, um später diese überall verteilte Fluoreszenz mit der apoptosebedingten Fluoreszenz verrechnen zu können. Dieser Korrekturvorgang wurde nötig, weil Bereiche der Zell-Kollagenmatrix bei manchen Devices aus dem Fokus des Anregungslichtstrahls gerieten.

Für die CFSE-Färbung wurden 10^6 Zellen in 1 ml, auf 37° C vorgewärmtes, PBS suspendiert und CFDA-SE für eine Endkonzentration von 1 µM zugegeben. Diese Mischung wurde kurz geschüttelt und für 15 Minuten bei 37° C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre in den Brutschrank gestellt. Bei diesem Prozess diffundiert CFDA-SE spontan in die Zellen und wird intrazellulär von Esterasen in anionisches CFSE umgewandelt. CFSE bindet durch eine Aktivestergruppe, freie Aminogruppen die in einer Zelle zur Verfügung stehen. (Abb. 3.4).

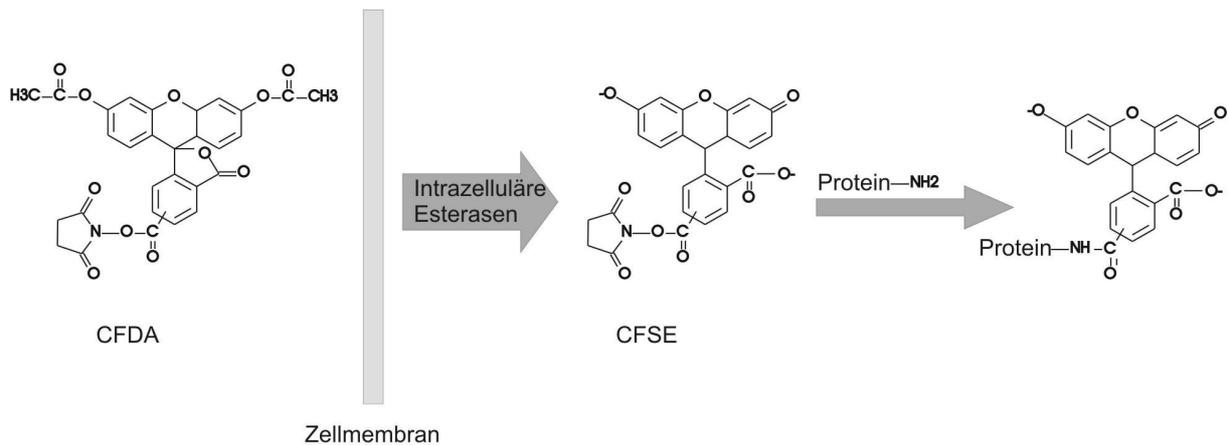


Abb. 3.4: Schema einer CFSE-Färbung

Bild adaptiert aus der Invitrogen Produktinformation
 (<http://probes.invitrogen.com/servlets/publications>)

Nach der Inkubationszeit wurde mit 340 g, 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand gegen Medium ausgetauscht. Sind die Zellen im Medium resuspendiert, inkubierten sie für weitere 30 Minuten in den Brutschrank. Dabei reagierte das restliche CFDA-SE mit den Proteinbestandteilen des Mediums vollständig ab. Nach 30 Minuten Wartezeit, wurden die Zellen in Medium gewaschen und waren fertig für Einbettung in das Kollagen.

Die Annexin V-Alexa 647-Färbung dagegen, fand während der Inkubation der Zellen im Diffusion Device statt. Dazu wurden pro Device, 3 µl Annexin, in der gelieferten Konzentration, in das Gelmedium mit den Zellen gegeben, bevor es mit dem Kollagen gemischt wurde. In das Gelmedium war zuvor zehnfach konzentrierter Annexinpuffer auf eine einfache Konzentration verdünnt worden. Der restliche Prozess, verlief analog wie im Kapitel „Zelleinbettung in ein Kollagen-Hydrogel“ beschrieben. Nach der Färbung, konnten unmittelbar Aufnahmen an einem konfokalen Laserrastermikroskop gemacht werden. Es war auch möglich, die Zellen in der Kollagenmatrix mit PFA zu fixieren, um die Probe später zu untersuchen. Die Parameter der Multikanalaufnahme, mussten an den verschiedenen Versuchstagen immer neu angepasst werden.

3.2.6 MTT-Test

Der MTT-Test ist eine weit verbreitete Methode um den Einfluss von Wirkstoffen auf das Zellüberleben oder die Vitalität von Zellen zu untersuchen. Die in den achtziger Jahren entwickelte Methode (Mosmann 1983) nutzt Dehydrogenasen, welche in der Mitochondrienmembran einer Zelle lokalisiert sind. Diese Dehydrogenasen besitzen die Eigenschaft MTT zu einem Formazan-Salz reduzieren zu können (Abb. 3.5). Dieses Salz ist wasserunlöslich und hat eine schwarz bläuliche Farbe. Wenn der Niederschlag mit einem Detergenz oder organischem Lösungsmittel solubilisiert wird (10% SDS mit 10 mM HCl, DMSO oder azifizierter Ethanol), wird eine schwarz bläuliche Lösung, die bei einer Wellenlänge von 560 nm in einem Spektralphotometer vermessen werden kann, erhalten.

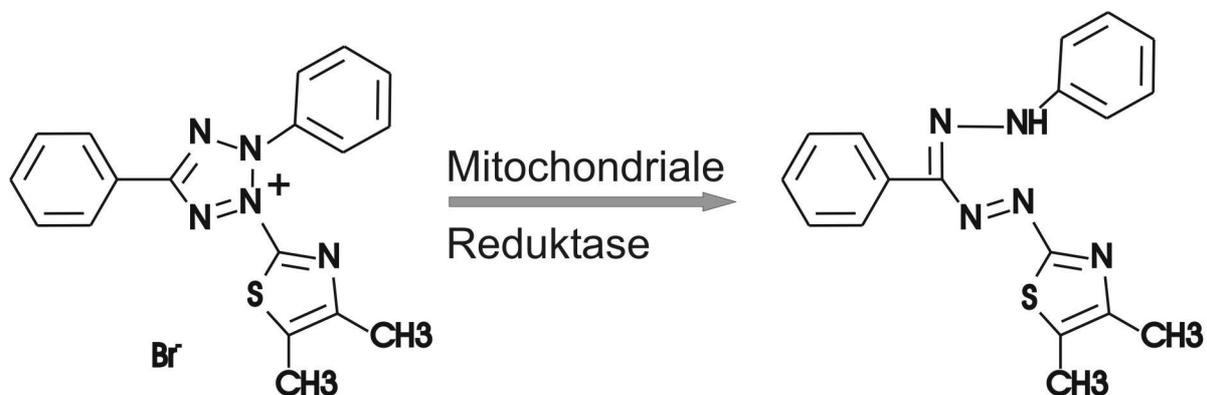


Abb. 3.5: MTT vor und nach der Reduktion zu einem Formazansalz

3.2.6.1 MTT-Test im Diffusion Device

Die Stammlösung des MTT betrug 5 mg/ml in PBS. Nach der Inkubation der Zellen mit den Wirkstoffen, wurde für den Diffusion Device die Stammkonzentration auf 1 mg/ml in Medium verdünnt und diese Lösung gegen das Medium in den Devices ausgetauscht. Die Flüssigkeit aus den Pipettierschlitzten sollte ebenfalls entfernt werden. Das Volumen des zugegebenen MTT betrug 200 μ l. Nach der Zugabe des MTT wurde die 12-Loch-Zellkulturplatte wieder in den Brutschrank gestellt. Nach 1-3 Stunden wandelte sich das MTT in das wasserunlösliche, blauschwarze Formazan-Salz um, welches als Präzipitat im Kollagen-Hydrogel gebunden wurde. Dunkle Bereiche zeigen somit vitale Zellen, wohingegen helle Stellen für geschädigte Zellen sprechen.

3.2.6.2 MTT-Test in der Mikrotiterplatte

Im Standard-MTT-Test wurden in jede Kavität einer 96-Loch-Zellkulturplatte, die gewünschte Menge von Zellen in 50 µl Medium gegeben. In weiteren 50 µl Medium wurde der Wirkstoff in der gewünschten Konzentration hinzugefügt. Das Endvolumen betrug somit 100 µl. Nach der Inkubationszeit mit dem Wirkstoff, fügte man 11 µl der MTT-Stammlösung zu. So ergab sich eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Nach der Zugabe des MTT, wurde die 96-Loch-Zellkulturplatte 1-3 Stunden bei 37° C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre in den Brutschrank gestellt. Hatten sich die Formazankristalle in ausreichendem Maße gebildet, konnte die Zellkulturplatte aus dem Brutschrank genommen und die Kristalle mit 10% SDS-Lösung plus 10mM HCl gelöst werden. Danach wurde die Platte in Aluminiumfolie eingewickelt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt, bis sich die Kristalle gelöst hatten. Die klare schwarz bläuliche Lösung konnte bei 560 nm in einem Spektralphotometer vermessen werden. Aus statistischen Gründen wurden Dupletts oder Tripletts von jeder Konzentrationsbedingung angefertigt, um Abweichungen ausgleichen zu können. Als Negativkontrolle wurden Medium, MTT und SDS vermessen. Um den konzentrationsabhängigen Einfluss von Doxorubicin, auf die Absorbionsmessung bei höheren Konzentrationen ausschließen zu können, war eine Titationsreihe von Doxorubicin in Medium sinnvoll.

Waren die Zellen innerhalb eines Multiwellexperiments in Kollagen eingebettet, wurde nach der MTT-Umsetzung 1 µM (Endkonzentration) Carbonyl-Zyanid-p-Trifluoro-methoxyphenylhydrazon (FCCP) zugegeben, damit die MTT-Umsetzung stoppte. FCCP ist ein Ionophor und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung und stört somit die Bildung des Redoxpotentials an den Mitochondrienmembranen. Als Folge sind auch die Mitochondrienproteine in ihrer Funktion gestört. Das Kollagen wurde durch 5 zupipettierte Units Kollagenase (6 µl 820U/ml) verdaut, um die spektralphotometrische Bestimmung der Formazansalzbildung störungsfrei durchführen zu können. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37° konnte die SDS-Lösung zugegeben werden, um das Formazansalz zu lösen.

3.2.7 MTT-Ausleseverfahren im Diffusion Device

Nach der Bildung der Formazansalzkrystalle und der Entfernung des MTT-Reagenz, inkubierte das Kollagen-Hydrogel zusammen mit den Zellen und dem Präzipitat für eine halbe Stunde, zur Fixierung, in einer 2% PFA-Lösung. Im Anschluss konnten die Devices mit einer Pinzette aus den Kavitäten der Zellkulturplatte genommen werden. Hier musste mit Umsicht gearbeitet werden, da sonst Verschiebungen oder das Zusammenfallen des Kollagengels möglich war.

Nach der Entnahme der Devices, konnte überschüssige Agarose entfernt werden. Auf ein Deckglas wurde ein Tropfen Wasser pipettiert und vorsichtig, mit dem Tropfen nach unten zeigend, auf das Kollagengel gelegt. Dadurch konnte eine planare, nicht spiegelnde Oberfläche für die folgende Mikroskopaufnahme erreicht werden. Waren alle Kollagengele mit einem Deckgläschen versehen, konnten sie mikroskopiert werden. Das Bild wurde dabei mit einer 1fachen Vergrößerung in Graustufenmodus erstellt und im Tiff-Format abgespeichert.

3.2.8 Bild- und Datenverarbeitung

3.2.8.1 Bestimmung von Diffusionskonstanten und EC_{50} -Werten

Gemessene Fluoreszenzintensitäten bzw. Konzentrationen wurden in der Software Origin gegen die entsprechende zurückgelegte Diffusionsstrecke aufgetragen. Mit der daraus resultierenden Kurve, konnte eine Kurvenanpassung mittels einer den Diffusionsprozess beschreibenden „Error-Funktion“ durchgeführt werden (Abb 3.6). Vor dem Angleichen mussten die Formelparameter in den richtigen Bereich gesetzt werden. c_0 wurde dabei aus den Messparametern abgelesen und als variabel eingestellt. x_0 ist eine Abmessung des Devices und wurde mit -2,5 voreingestellt und als nicht variabel eingestellt. y_0 ist der Wert für das Hintergrundsignal und wurde in der Regel ebenfalls als nicht variabel eingestellt. Es folgten D für den Diffusionskoeffizienten der mit $1 \cdot 10^{-10}$ als variabel eingestellt wurde und zum Schluss t für die Zeit welche bekannt und damit nicht variabel war.

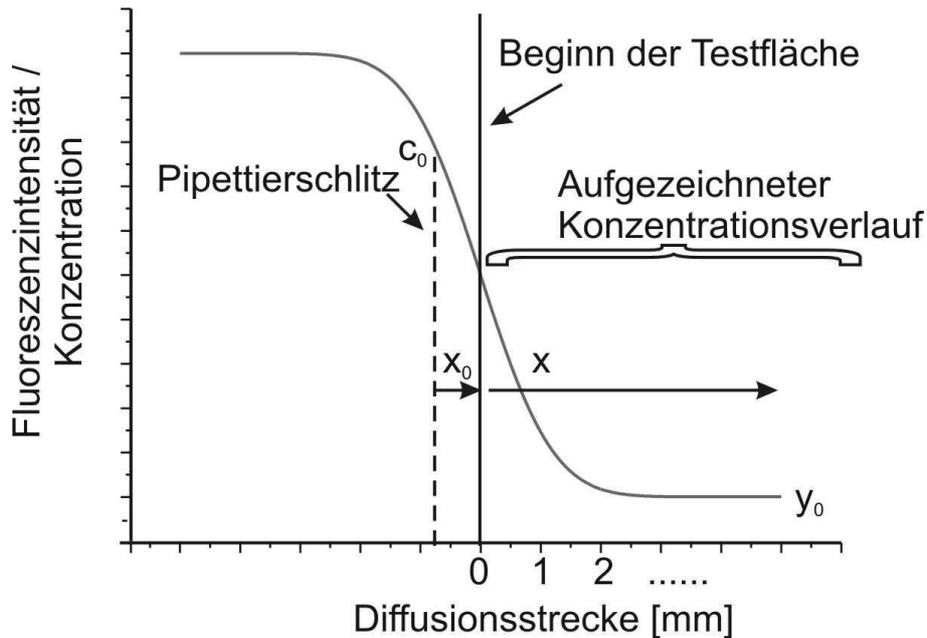


Abb. 3.6: Darstellung einer Errorfunktion mit Parametern aus Formel 2.1.

$$y = c_0 \cdot \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{(x - x_0)}{2\sqrt{D \cdot t}} \right) \right) + y_0 \quad \text{Formel 3.1}$$

Die einzelnen Variablen und Bezeichnungen stehen für:

$c_0 + y_0$: Konzentration der Diffusionslösung im Pipettierschlitz ($\mu\text{g} / \text{ml}$)

erf: Errorfunktion

x : Diffusionsstrecke (m)

x_0 : Position des Pipettierschlitzes (m)

D : Diffusionskoeffizient (m^2 / s)

t : Zeit (h)

Werte für x , y_0 und t sind bekannt. Alle anderen Werte werden über den Fit ermittelt.

Der EC_{50} -Wert, bei dem 50% der maximalen Wirkung erzielt wird, konnte ebenfalls durch einen Fit ermittelt werden. Dieser so genannte Dose-Response-Fit ist in der Software Origin als vorprogrammierte Formel zu finden.

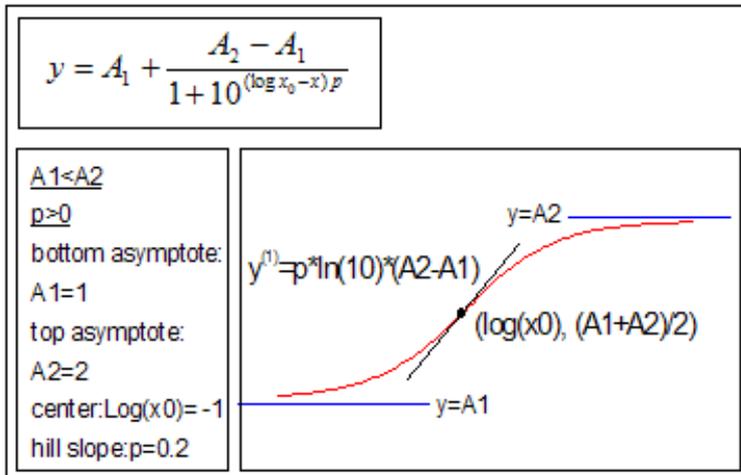


Abb. 3.7: Darstellung des Dose-Response Fits innerhalb der Origin Software

Hierbei stehen die Variablen für:

- A_1 : Asymptote welche den unteren Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung markiert
- A_2 : Asymptote welche den oberen Verlauf markiert
- X_0 : jeweilige Dosis der getesteten Substanz
- p : Steigung im Wendepunkt der Funktion

Der Wendepunkt oder $\log(x_0)$ -Wert markiert dabei den EC_{50} -Wert. Problematisch bei der Ermittlung des EC_{50} -wertes war es, wenn die Dosis-Wirkungsbeziehungen nicht sigmoidal verlaufen und somit nicht genau angeglichen werden konnten. Ebenfalls problematisch war es, wenn die Substanz nicht den maximalen Effekt erzielen konnte. In diesem Fall konnte auf die Auswertung nach Chou, beschrieben in Kapitel 3.2.8.3, ausgewichen werden.

3.2.8.2 Erstellen von 3D-Dosis-Wirkungs-Diagrammen

Nach der Bildaufnahme eines Kollagen-Gels wurde dieses Bild mit einer Negativ-Kontrolle hintergrundkorrigiert. Die Negativkontrolle bestand dabei aus einem Agarosegel ohne aufliegendes Kollagen. Die Hintergrundkorrektur geschah mit der Software Image-Pro Plus. Danach wurden die Bilder mit der Software Corel PhotoPaint exakt auf die Form des Kollagengels zugeschnitten. Bildgröße und

Auflösung wurden auf Werte gebracht, die auf die spätere Auswertung optimiert sind. In diesem Zustand wurden die Bilder wieder in ImagePro Plus geöffnet und dort mit einem selbst erstellten Macro ausgewertet. Dieses Macro rasterete die quadratische Fläche des Kollagen-Gels mit zehn mal zehn quadratischen Regions-Of-Interest (ROI) ab. Jedes dieser kleineren Quadrate gibt als Wert den durchschnittlichen Graustufenwert innerhalb seiner Fläche an. Nach einer Abrasterung, wurden die so entstandenen 100 Daten in Excel weiterverarbeitet. Dort spiegelten die Daten den Antwortgradienten bei der Bildaufnahme, in einer Zahlenmatrix wieder. Von der Zahlenmatrix wurde die Negativkontrolle abgezogen und danach mit dieser und der Positivkontrolle in das Verhältnis gesetzt. Nachfolgend wurde die Zahlenmatrix noch einmal mit der Positivkontrolle korrigiert. Als letzter Schritt wurden alle Werte von eins abgezogen. So konnte ein vollständig korrigiertes 3D-Dosis-Wirkung-Diagramm mit Effekt über Konzentration erhalten werden (Abb. 3.8).

3.2.8.3 Kombinations-Index und EC₅₀-Wert nach Chou

Der Kombinationsindex ist ausführlich in (Chou 2006;Chou & Talalay 1984) beschrieben. Kurz umrissen, müssen Dosis-Wirkungskurven beider Wirkstoffe einzeln und eine Dosis-Wirkungskurve für die Kombination der beiden Wirkstoffe, experimentell bestimmt werden. Im Fall des Diffusion Device werden die Dosis-Wirkungskurven verwendet die der geringsten Konzentration des anderen Wirkstoffes ausgesetzt sind. Von allen drei Kurven wird eine doppelt logarithmische Auftragung aus $\log_{10}(\text{Effekt}/1-\text{Effekt})$ über $\log_{10}(\text{Konzentration})$ angefertigt. Wenn der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve sigmoidal ist, werden durch diese Auftragung drei Geraden erhalten, von denen die Steigung und der Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt werden müssen. Der Schnittpunkt mit der x-Achse gibt gleichzeitig den jeweiligen EC₅₀-Wert an. Mit Formeln (2.2) – (2.7) kann anschließend ein so genanntes CI-Diagramm erstellt werden.

$$D_1 = EC_{50 \text{ Wirkstoff 1}} \times (\text{Effekt}/(1-\text{Effekt}))^{(1/\text{Steigung Wirkstoff 1})} \quad (2.2)$$

$$D_2 = EC_{50 \text{ Wirkstoff 2}} \times (\text{Effekt}/(1-\text{Effekt}))^{(1/\text{Steigung Wirkstoff 2})} \quad (2.3)$$

$$D_{\text{Kombination}} = EC_{50 \text{ Kombination}} \times (\text{Effekt}/(1-\text{Effekt}))^{(1/\text{Steigung Kombination})} \quad (2.4)$$

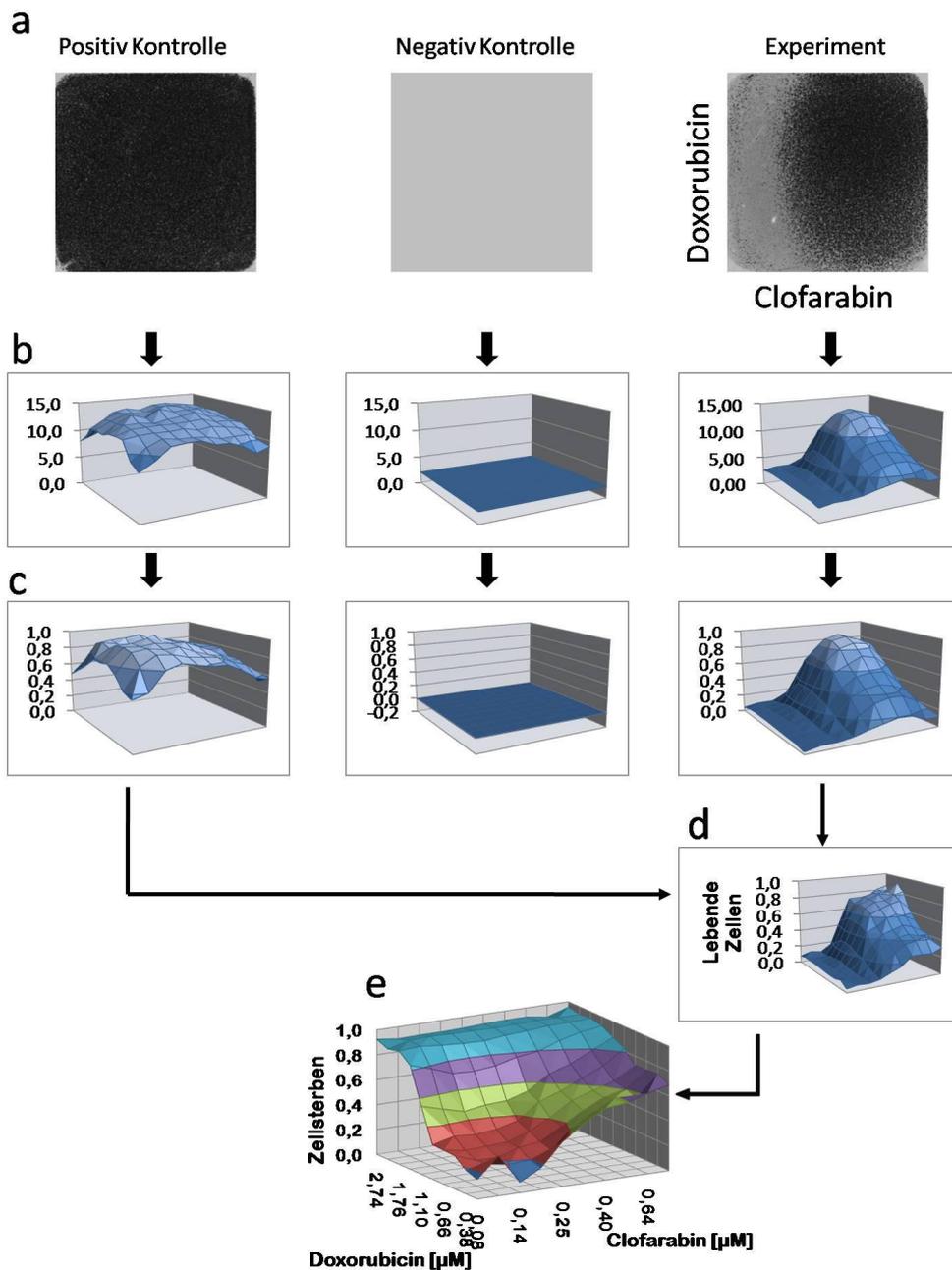


Abb. 3.8: Erstellung eines 3D-Dosis-Wirkungs-Diagramms

aus den Ergebnissen des Diffusion Device am Beispiel einer Diffusion von Doxorubicin gegen Clofarabin. a) Original Bilder, die mit dem Stereomikroskop nach dem MTT-Test gemacht wurden. b) 3D-Diagramme nach der Abrasterung der Bilder in Image Pro Plus. c) Nach der Verrechnung mit der Negativ- und Positivkontrolle d) Korrektur des Ergebnisses mit der Positivkontrolle zum Ausgleichen der Randeffekte. e) Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung mit Wirkstoffkonzentration gegen Anzahl toter Zellen in der vertikalen Achse.

$$D_{1 \text{ Kombination}} = D_{\text{Kombination}} \times \left[\frac{c_1/c_2}{c_1/c_2 + 1} \right] \quad (2.5)$$

$$D_{2 \text{ Kombination}} = D_{\text{Kombination}} \times \left[\frac{1}{c_1/c_2 + 1} \right] \quad (2.6)$$

$$CI_{\text{gleicher Wirkmechanismus}} = \left[\frac{D_1}{D_{1 \text{ Kombination}}} + \frac{D_2}{D_{2 \text{ Kombination}}} \right] \quad (2.7)$$

$$CI_{\text{untersch. Wirkmechanismus}} = \left[\frac{D_1}{D_{1 \text{ Kombination}}} + \frac{D_2}{D_{2 \text{ Kombination}}} \right] + \left[\frac{D_1 \times D_2}{D_{1 \text{ Kombination}} \times D_{2 \text{ Kombination}}} \right] \quad (2.8)$$

D_1, D_2 und $D_{\text{Kombination}}$ stehen für die Konzentration, die für den jeweiligen erreichten Effekt benötigt wird. Der Effekt ist ein Wert zwischen 0 und 1. $D_{1 \text{ Kombination}}$ und $D_{2 \text{ Kombination}}$ stehen für die Konzentration, die für den jeweiligen erreichten Effekt innerhalb der Kombination benötigt wird. c_1/c_2 steht für das Mischungsverhältnis beider Konzentrationen, welches idealerweise über alle Konzentrationen innerhalb des Experiments, konstant gehalten wird.

Die experimentell bestimmten Werte sind EC_{50} -Werte und Steigungen der beiden Einzel-Substanzbestimmungen und der Kombinationsbestimmung. Die Werte für D_1, D_2 und $D_{\text{Kombination}}$ wurden daraus über den möglichen Effektbereich hinweg bestimmt (2.2 – 2.4). In unserem Fall wurden Werte von 0,1, 0,2, 0,3... - 0,9 eingesetzt. Daraus errechnet sich wie viel die einzelnen Wirkstoffe innerhalb der Kombination beitragen (2.5 – 2.6). Schließlich werden die CI-Werte berechnet (2.7 – 2.8) und gegen die eingesetzten Effekte aufgetragen.

Ein von Chou vorgeschlagenes Klassifikationssystem schlägt vor CI-Werte von 0,9 – 1,1 als additiv anzusehen, 1,1 – 1,2 als leicht antagonistisch, 1,2 – 1,45 als moderat antagonistisch, 1,45 – 3,3 als antagonistisch, 3,3 – 10 als stark antagonistisch und größer 10 als sehr stark antagonistisch. In der entgegengesetzten Richtung sind Werte zwischen 0,9 – 0,85 leicht synergistisch, 0,85 – 0,7 moderat synergistisch, 0,7 – 0,3 synergistisch, 0,3 – 0,1 stark synergistisch und Werte unter 0,1 sehr stark synergistisch.

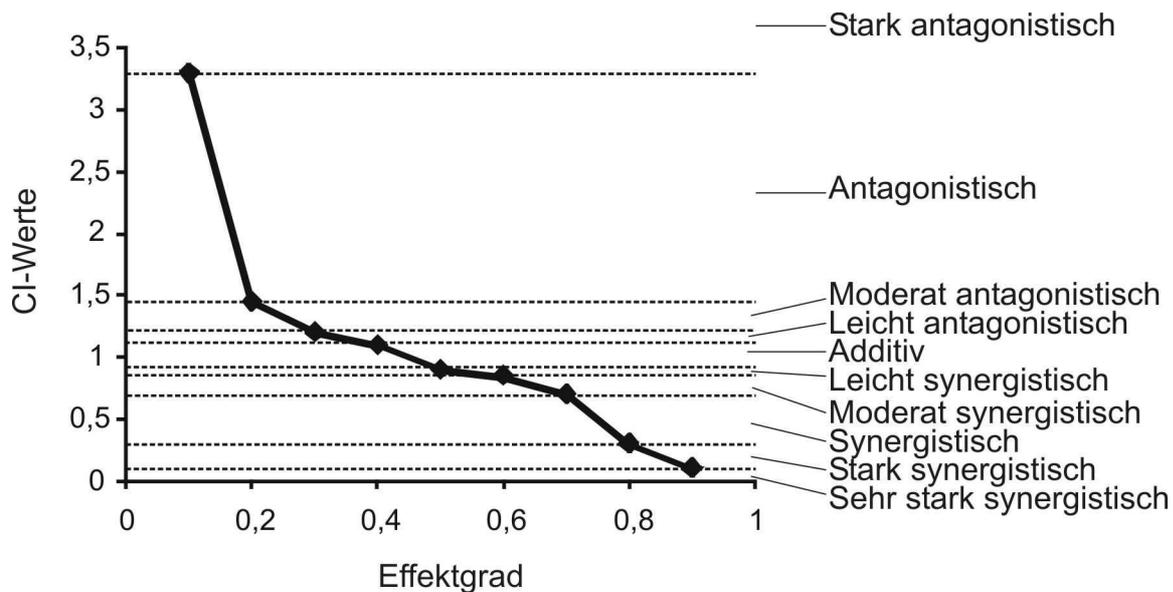


Abb. 3.9: Kombinationsindex-Beispieldiagramm

3.2.9 Anti-CD3/CD28 Antikörper T-Zell-Stimulation unter Verwendung von Kinaseinhibitoren

Eine ELISA-Platte wurde mit vorgemischten anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper-Lösungen in PBS, bei RT über Nacht, oder 3 h bei 37° C beschichtet. Die Konzentration der Antikörper zusammen, betrug insgesamt immer 2 µg/ml. Innerhalb dieser Konzentration wurde das Verhältnis 1:0, 0:1, 1:1, 1:0,25 oder 0,25:1 eingestellt. Nach dieser Inkubationszeit, wurde 1 h mit 4 % BSA blockiert und mit Medium gewaschen. In diesem Zustand waren die Antikörper bereit für die Stimulation der T-Zellen. Währenddessen wurden $1 \cdot 10^6$ CD4⁺ T-Zellen mit den Inhibitoren in 200 µl Medium, 30 Minuten, bei 37° C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre vorinkubiert. Nach dieser Inkubationszeit kamen die Zellen in die Antikörperbeschichtete ELISA-Platte und anschließend für 16 h bei 37° C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in den Brutschrank. Für jede Konzentration wurden Dreifachmessungen ausgeführt. Für ELISA-Messungen wurde nach der Inkubationszeit der Überstand vorsichtig abgenommen und entweder gleich verwendet oder für spätere Verwendung bei -80° C eingefroren.

3.2.10 IL-2 ELISA

Für die Beschichtung der ELISA-Platte wurden 100 µl, 1 µg/ml IL-2 Antikörper in die Kavitäten der Platte pipettiert. Die Antikörper konnten über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt, bei dem die Kavitäten der Platte mit 200 µl 4% BSA-Lösung, 1 h bei Raumtemperatur, inkubiert wurden. Danach wurde erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Im dritten Schritt wurden die Kavitäten mit 100 µl der Zellüberstände befüllt und 1 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang, folgte der zweite, biotinylierte IL-2-Antikörper. Er wurde mit 0,5 µg/ml in 100 µl PBS hinzugefügt und 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde im fünften Schritt 0,1 µg/ml Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase, in 100 µl PBS zupipettiert und 30 Minuten inkubiert, bevor wiederholt drei Mal gewaschen wurde. Im vorletzten Schritt wurde 100 µl TMB Substratlösung zugefügt. Nach dem Umsatz des Substrats wurde die Reaktion durch 100 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt. Nun konnte die Platte in einem ELISA-Reader bei 450 nm ausgelesen werden.

3.2.11 Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen aus einer Blutprobe

Einem Spender wurden ca. 30 ml Blut entnommen. In der Spritze befand sich etwas Heparin, um die Gerinnung zu stoppen. Das Blut wurde mit 37° C vorgewärmten PBS 1:2 – 1:3 verdünnt. Für einen Dichtegradienten wurden 10 ml Ficoll in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit der verdünnten Blutprobe vorsichtig überschichtet. Danach zentrifugierte man 20 min bei 20° C und 805 g. In der Folge konnten verschiedenen Phasen innerhalb des Röhrchens erhalten werden. Die Interphase mit den T-Zellen wurde vorsichtig abpipettiert, die entnommene Phase zwei Mal mit PBS gewaschen und 8 min. mit 750 g bei 20° C zentrifugiert. Die gewaschenen peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC's) wurden gezählt und die Zellzahl pro ml bestimmt. Um in MACS-Puffer aufgenommen zu werden, mussten die Zellen erneut 8 min. bei 20 ° C und 750 g abzentrifugiert werden. Laut Vorschrift mussten danach pro 10 Mio. Zellen, 20 µl CD4⁺ MACS-Beads hinzupipettiert werden. Diese Mischung inkubierte 20 min auf Eis. Währenddessen wurde eine MACS LS-Säule am Magneten befestigt und mit 3 ml MACS Puffer equilibriert. Die Zell/Partikel Mischung wurde auf die Säule gegeben und dreimal mit MACS Puffer gewaschen. Der Magnet

wurde im Folgenden entfernt und noch einmal 5 ml MACS Puffer zugefügt. Der ganze Restpuffer wurde mit einem Stempel aus der Säule herausgepresst. Das Eluat wurde wiederum 8 min. bei 20° C und 750 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 Medium + 10% FCS aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Diffusion Device

Wirkstofftests, in denen Substanzen in Kombination eingesetzt werden, verursachen in mikrotiterplattenbasierten Methoden Pipettierschritte, die mit der Zahl der zu testenden Kombinationen und Konzentrationen exponentiell steigen. Darum ist ein solches Vorhaben, in größerem Umfang, nur mit einem hohen technischen- und kostenintensiven Aufwand, in Form einer leistungsfähigen Pipettiermaschine, dazugehörigen Anschlußgeräten und vielen Mikrotiterplatten, möglich. Für klinische Anforderungen, bei der eine schnelle, kostengünstige und patientenspezifische Diagnostik benötigt wird, ist diese Maßnahme wenig geeignet. Durch eine Reduzierung von Pipettierschritten und Materialeinsatz, ließen sich jedoch auch in groß angelegten Wirkstoffscreenings Ressourcen sparen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen verdeutlichen, wie Informationen über die Effektivität einer Wirkstoffkombination mit nur zwei Pipettierschritten und speziell entwickelten, kostengünstigen Kunststoffwerkteilen möglich ist.

Die verwendeten Hilfsmittel, wurden speziell für Screeninganwendungen entwickelt. Sie sollten als günstige Einwegartikel anwendbar sein und so wenig personellen und materiellen Aufwand wie möglich verursachen. Der Diffusion Device, entwickelt zur einfachen Herstellung von Substanzmischungen mit nur zwei Pipettierschritten, lieferte dafür eine gute Basis. Die Methode basiert dabei auf der Idee von orthogonal angelegten Konzentrationsgradienten. Diese Vorgehensweise wird in der Halbleiterindustrie schon länger für Lichtwellenleiter, Codiffusions-Transistoren und Speicherkarten genutzt (Reisch et al. 2003;Widmann, Mader, & Friedrich 2000).

In dieser Arbeit werden die orthogonal angelegten Gradienten für die Bildung und anschließende Testung von unendlich vielen Wirkstoffmischungen in einem gewählten Konzentrationsbereich, genutzt.

4.1.1 Charakterisierung des Diffusion Device,

Wirkstoffe oder Testsubstanzen wurden in die an der Testfläche angrenzenden Pipettierschlitze eingefüllt. Diese sollen, nachdem sie in die Testfläche eindiffundiert sind, mit den dort fixierten Zellen interagieren. Durch Diffusion bilden sich zwei, zueinander rechtwinklig verlaufende Konzentrationsgradienten. Durch die Überlager-

ung der Gradienten kommt es zur Vermischung der Substanzen. Dieser Prozess, der die Diffusion aus einem Reservoir in ein angrenzendes Medium beschreibt, ist ein gut verstandener und mathematisch beschriebener Prozess der Physik. Innerhalb eines definierten Konzentrationsbereiches entstehen so unendlich viele Mischungsverhältnisse zwischen den Substanzen, die in die Pipettierschlitze gefüllt werden. Dieser Vorgang entspricht einer Miniaturisierung von Reaktionsräumen.

Als Diffusionsmatrices kamen nach den ersten Versuchen 1,5% Agarose und 5% Gelatine in Frage. Diese Materialien erfüllen die Voraussetzung einer biokompatiblen Substanz, die ein weitmaschiges Netzwerk bildet und einer diffundierenden Substanz so wenig Widerstand wie möglich entgegensetzt. Darüber hinaus, muss auch genügend mechanische Stabilität gewährleistet sein. Bei der Optimierung der Matrices wurde beachtet, dass so wenig Material wie möglich eingesetzt wird, um möglichst große Zwischenräume in der Matrix zu erreichen. Bei der Wahl von Gelatine muss darauf hingewiesen werden, dass bei Temperaturen um 37° C die mechanische Stabilität verloren geht.

Um die Gradientenbildung zu untersuchen, wurden zunächst Diffusionen mit den Fluorophoren Rhodamin B und Fluoreszein durchgeführt. Für die Validierung der Methode waren eine homogene Diffusionsfront, Diffusionskoeffizienten und die daraus folgende Erkenntnis, ob es sich bei den gegebenen Bedingungen um eine Diffusion den Fick'schen Gesetzen folgend handelt, die ersten Untersuchungsaspekte (Abb. 4.1, 4.3 und 4.4).

Um aufgezeichnete Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin B und Fluoreszein in absolute Konzentrationen umzurechnen, wurde eine Kalibrationskurve erstellt. Durch diese konnte mit der Messung von nur einigen Kalibrierlösungen (typischerweise 3 Kalibrierlösungen von 1, 10 und 100 µg/ml) vor jeder Gradientenbestimmung Korrekturfaktoren errechnet werden. Mit diesen konnte gewährleistet werden, dass die Umrechnung von Fluoreszenzintensität in Konzentrationen die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse wiedergibt (Abb. 4.2). Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten pro Konzentrationseinheit können durch Umbauten und normale Handhabung des Mikroskopaufbaus (Objektivwechsel, Lampenwechsel, Veränderung im Strahlengang), oder durch Veränderungen des Fluorophors selbst (Bleichung) entstehen.

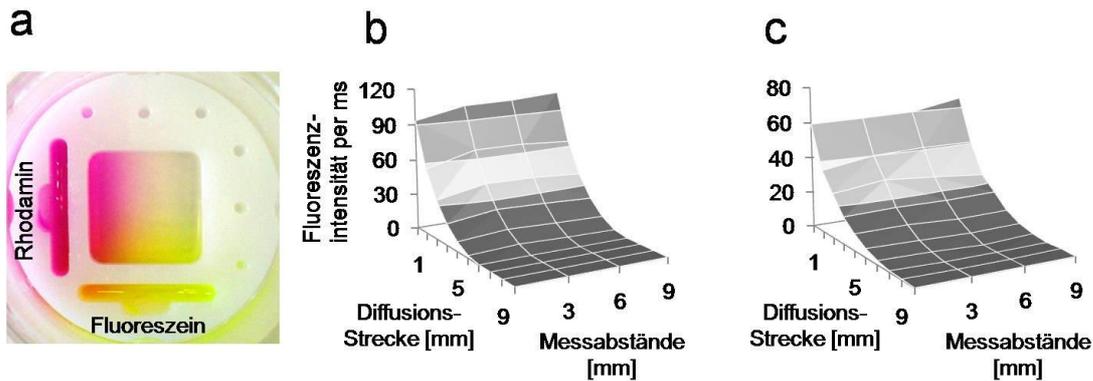


Abb. 4.1: Fluorophorgradienten

(a) Photographie eines Diffusion Device mit bereits ausgebildeten Gradienten von Rhodamin B und Fluorescein. (b, c) Diffusionsverlauf für Rhodamin und Fluorescein, aufgezeichnet in vier parallelen über die Diffusionsfläche verteilte Bahnen, in Richtung des Diffusionsverlaufs. Die Fluoreszenzintensitäten sind auf 1 ms Belichtungszeit normalisiert. Es wurden für jeden Fluorophor 20 μ l einer 1 mg/ml Lösung in den Pipettierschlitz gegeben (entspricht 3 mM für Rhodamin B und 2,1 mM für Fluorescein), die Fluoreszenzintensitäten wurden nach 5 Stunden aufgezeichnet. Als Diffusionsmatrix wurde 1,5 % Agarose in PBS gelöst.

Die beobachteten Diffusionsfronten verliefen über die Breite der Testfläche sehr gleichmäßig (Abb. 4.1) Nur in den Randbereichen konnte es zu geringen Abweichungen kommen, die zum einen auf Unterschiede durch das manuelle Aufbringen der Devices und zum anderen durch Irritationen der Agarosematrix, Phasenübergänge oder die Nachbarschaft zum zweiten Pipettierschlitz bedingt sein konnten. Aus den Kalibriergeraden ließ sich erkennen, dass bei Rhodamin ein starkes Selbstquenching und bei Fluorescein ein Sättigungsbereich ab 100 μ g/ml einsetzte. Gelatine schien im Vergleich zu den in Wasser gemessenen Fluorophoren, als Fluoreszenzdonator für Rhodamin und als Fluoreszenzakzeptor bei Fluorescein zu wirken. Agarose verhielt sich im Vergleich zu den in Wasser gelösten Fluorophoren hingegen neutral (Abb. 4.2 (a, b)).

Für die in folgenden Experimenten verwendeten Konzentrationen und Zeiten konnten die erhaltenen Konzentrationsgradienten mit einer Kurvenanpassung auf Grundlage der Fick'schen Gesetze beschrieben werden (Abb 4.3 (b)). Mit der zusätzlichen Übereinstimmung der Diffusionskonstanten mit den Literaturwerten (Abb. 4.4) konnte daher von einer ungehinderten Diffusion ausgegangen werden.

Außerdem sind Limitationen der Diffusionsquelle für kleine Moleküle bis zu 1,5 Tagen auszuschließen. Ab 40 h war der Übergang der Diffusion von unendlicher zur endlichen Quelle zu erkennen, was sich im Abflachen der Kurve widerspiegelte, sowie im „Leerlaufen“ des Pipettierschlitzes (Abb 4.3 (a)). Die Steigung von Δc über die Diffusionsdistanz und der Konzentrationsbereich der überspannt werden konnte, ist durch die Parameter Konzentration und Zeit variabel. Hierbei sind Konzentrationsbereiche über zwei bis drei Zehnerpotenzen durchaus erreichbar. Überkreuzdiffusionen der zwei Fluorophore zeigten keinen Einfluss auf die Bildung der Konzentrationsgradienten.

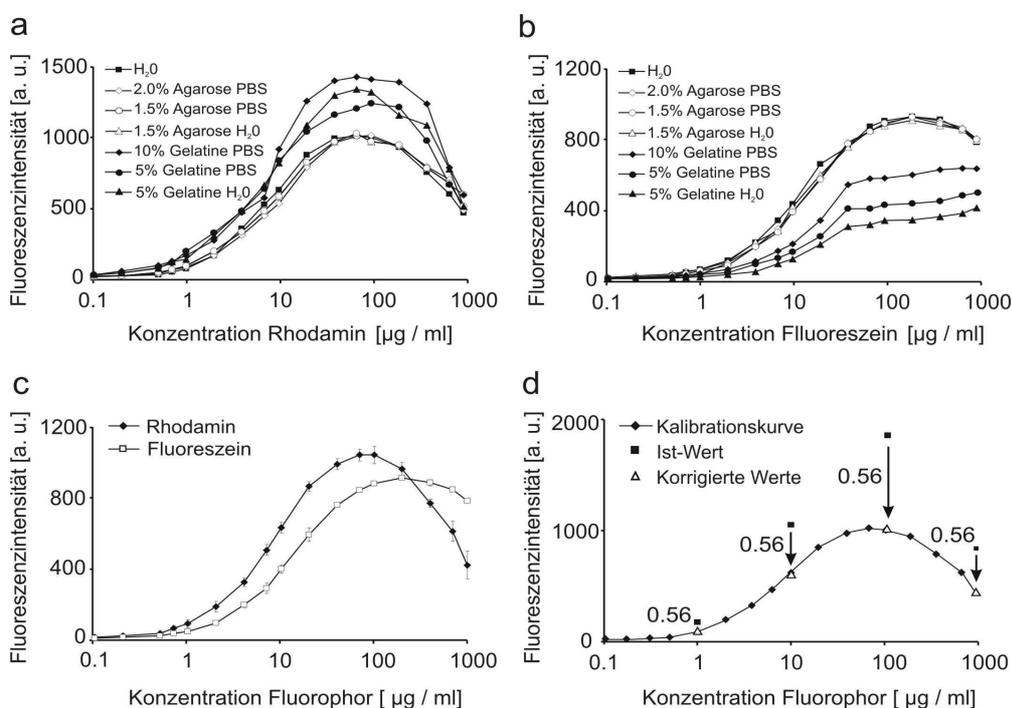


Abb. 4.2: Kalibration des Diffusion Device

Fluoreszenzintensität über Konzentration für (a) Rhodamin B und (b) Fluorescein in Wasser, PBS, Agarose und Gelatine in verschiedenen Konzentrationen. (c) Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aus der in Wasser und 1,5% bzw. 2% Agarose gemessenen Werte, aufgetragen gegen Konzentrationen von Rhodamin und Fluorescein. (d) Kalibrationskurve für Rhodamin B mit Istwerten von Kalibrationslösungen (schwarze Quadrate) und den dazugehörigen korrigierten Werten (weiße Dreiecke). Die Werte neben den Pfeilen zeigen den jeweiligen Korrekturfaktor an. Mit dem Mittelwert dieser 4 Korrekturfaktoren werden die Intensitätswerte für Fluorophore (hier Rhodamin), die im Diffusion Device gemessen wurden korrigiert und dann in absolute Konzentrationswerte umgerechnet.

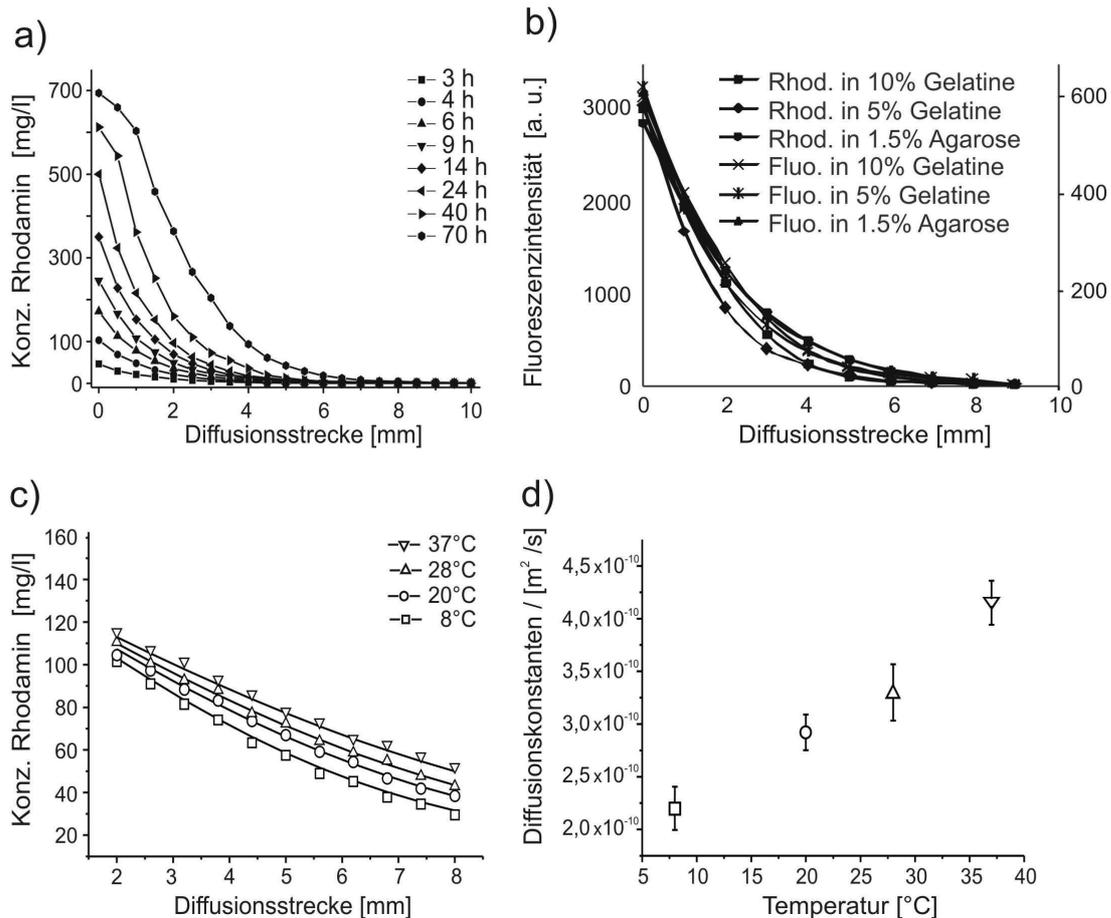


Abb. 4.3: Diffusionsverläufe und -koeffizienten

(a) Zeitabhängigkeit von Rhodamin B Konzentrationsprofilen. Die Diffusionen wurden unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur mit 1 mg/ml Rhodamin ausgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Gradient aufgezeichnet. (b) Konzentrationsprofile für Rhodamin und Fluoreszein in Gelatine (5 und 10% w/v) und Agarose (1,5 % w/v). Alle Kurven können auf Grundlage der Fick'schen Gesetzen mit unendlicher Quelle beschrieben werden. Fluoreszenzintensitäten für Rhodamin B befinden sich auf der primären y-Achse und Intensitäten für Fluoreszein auf der sekundären y-Achse. Die Gradienten wurden aufgenommen zwischen 5 und 8 Stunden Diffusionszeit und mit 700 $\mu\text{g/ml}$ Fluorophor. (c) Konzentrationsprofile von Fluoreszein durch Diffusion unter verschiedenen Temperaturen. Die Startkonzentration von Fluoreszein war 1 mg/ml (2,1 mM) und die Diffusionszeit betrug 36 h. (d) Diffusionskoeffizienten bestimmt aus den Kurven von Diagramm (c). Die Fehlerbalken entsprechen dem 95% Konfidenzintervall der Kurvenanpassung.

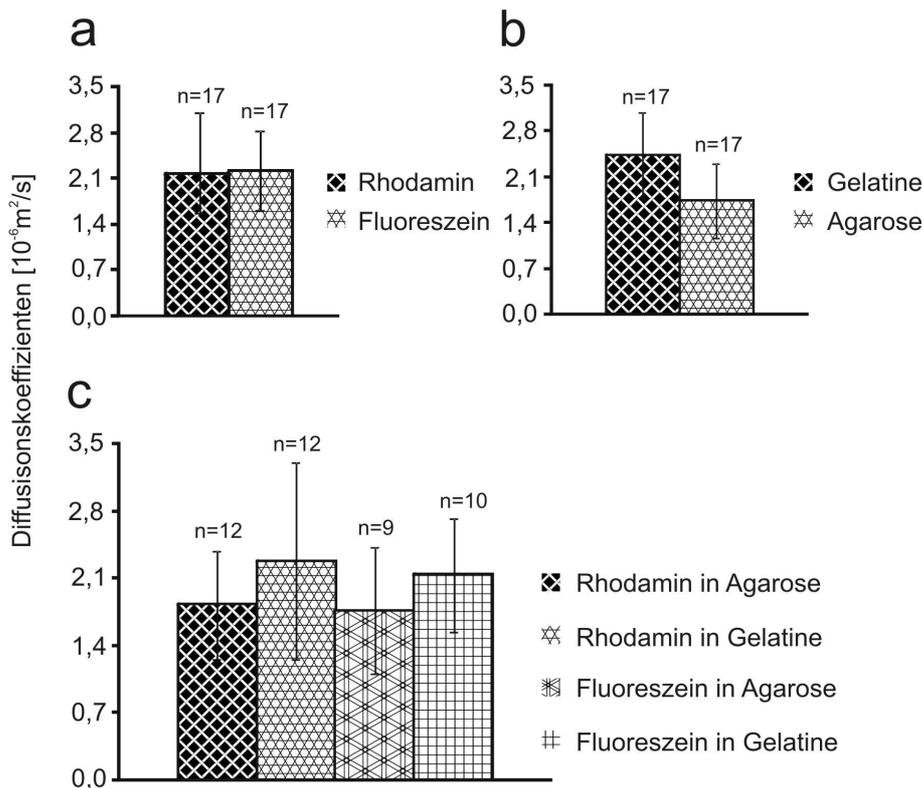


Abb. 4.4: Diffusionskoeffizienten für Rhodamin und Fluoreszein

(a) Aus Diffusionen, in 1,5% Agarose und 5% Gelatine durchgeführt, gemittelte Diffusionskoeffizienten für Fluoreszein und Rhodamin. (b) Gemittelte Diffusionskoeffizienten für Gelatine und Agarose. Die Koeffizienten für Fluoreszein und Rhodamin sind hier zusammengefasst (c) Auflistung der gemittelten Diffusionskonstanten nach Matrix und Fluorophor. Die Diffusionskoeffizienten wurden durch Kurvenanpassungen unter der Annahme einer unendlichen Wirkstoffquelle ermittelt. Die Werte der Diffusionskoeffizienten sind vergleichbar mit entsprechenden Literaturangaben (Hansen, Zhu, & Harris 1998; Labille, Fatin-Rouge, & Buffle 2007). Bei der Durchführung von statistischen Analysen zeigten die Ergebnisse keine Signifikanzen der Abhängigkeit von verwendeten Diffusionsmatrices oder Fluorophoren (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Aus theoretischen Überlegungen lässt sich ableiten, dass eine Diffusion im Device nach kurzen Zeiten (ca. 1 h) den größten Konzentrationsbereich abdeckt (Abb 4.5 (b)). Werden aber Konzentrationsunterschiede zwischen benachbarten Diffusionsdistanzen betrachtet, nähern sich die Konzentrationen nach kurzer Gesamtdistanz Werten, die keine messbaren Reaktionen in einer Zelle auslösen können (Abb. 4.5 (c)). Nach Abb. 4.5 (b) und (c) würde eine Diffusion, die nach 8-16 Stunden abgebrochen wird, die besten Ergebnisse im Sinne eines überspanntem

Konzentrationsbereiches (zwei bis drei Größenordnungen) und Nutzung der gesamten Testfläche erreichen.

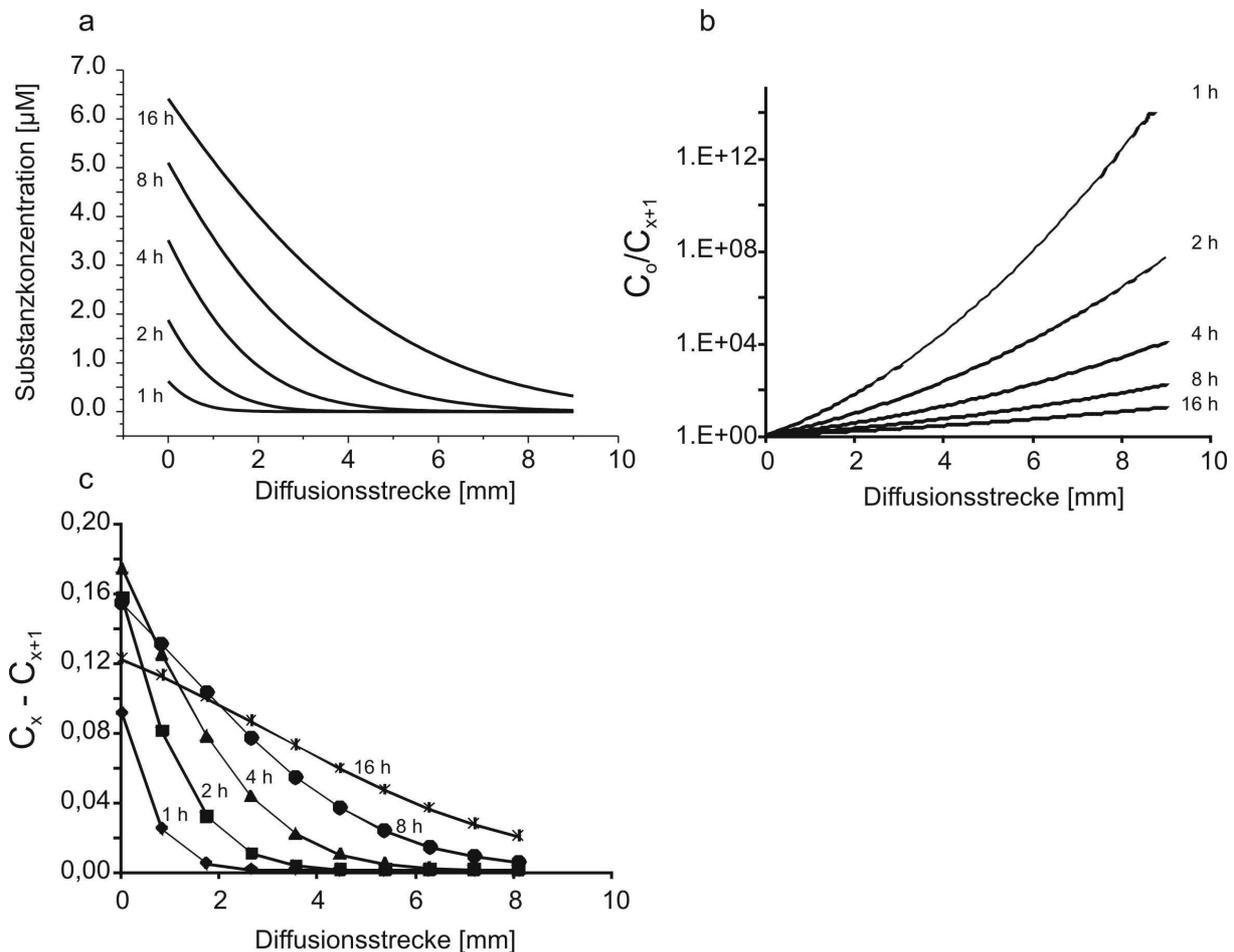


Abb. 4.5: Theoretische Betrachtung der Konzentrationsverteilung

(a) Simulation von Diffusionen kleiner Moleküle mit folgenden Parametern: Diffusionskonstante $D = 2,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$; Ausgangskonzentration = 10 µM ; Abstand zwischen Pipettierschlitz und Testfläche = $2,5 \text{ mm}$; Hintergrundfluoreszenz = 0 ; Diffusionszeit = $1, 2, 4, 8, 16 \text{ h}$.
 (b) Quotienten aus Anfangskonzentration bei Distanz 0 mm und allen danach folgenden Konzentrationen (c) Subtraktion eines Messwertes mit dem, auf der Streckenachse nächstfolgenden Wert. Die Abstände wurden mit $0,9 \text{ mm}$ gewählt.

Wirkstoffe sind oft in Lösungsmitteln wie DMSO oder DMF, in hohen Konzentrationen gelöst. Sie werden aus diesen Stammlösungen heraus verdünnt und in den jeweiligen Testverfahren angewandt. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Frage, ob eine höhere Konzentration von organischem Lösungsmittel einen Einfluss auf den Verlauf einer Diffusion hat. Unter Einbeziehung, dass bei zellbasierten in-vitro Tests

die DMSO oder DMF Konzentrationen 1% nicht übersteigen sollten, sowie der Tatsache, dass von Pipettierschlitz zur Testfläche der Verdünnungsfaktor der Konzentration ca. 10 beträgt, wurden für Diffusionsexperimente Fluorophorlösungen in 10% DMSO und DMF hergestellt. Abb. 4.6 zeigt den Vergleich der Diffusionskurven von Rhodamin in PBS, DMSO oder DMF gelöst.

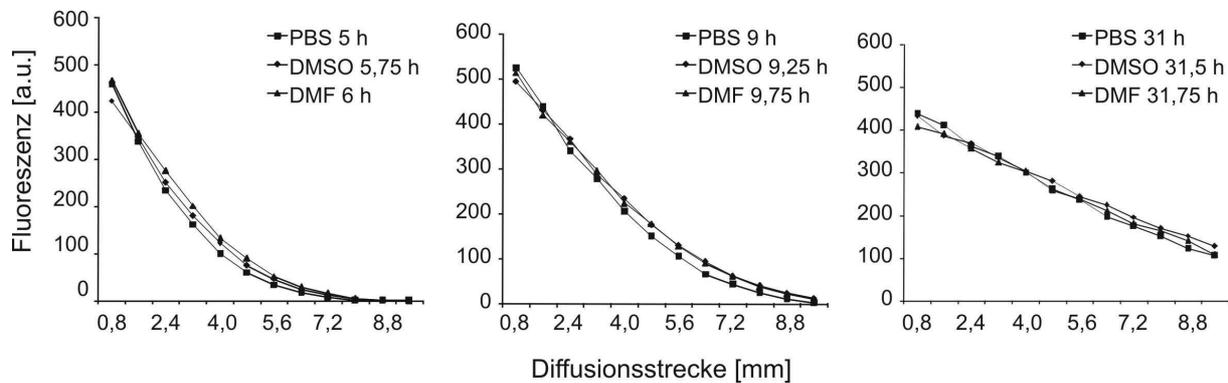


Abb. 4.6: Gradientenbildung mit verschiedenen Lösungsmitteln

Rhodamin wurde in PBS, DMSO und DMF 10% (v/v) gelöst. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Diffusionskurven aufgenommen.

4.1.2. Konzentrationsbestimmung der Doxorubicingradienten

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen aus Bioassays, welche im Diffusion Device durchgeführt werden sollen, werden Konzentrationsverläufe von den auf Zellen einwirkenden Substanzen benötigt. Aufgrund des diffusionsgestützten Ansatzes der Gradientenbildung ändern sich die Konzentrationen pro Zeiteinheit kontinuierlich. Daher musste eine Abschätzung über den Konzentrationsverlauf verschiedener Substanzen vorgenommen werden. Durch eine schwache Eigenfluoreszenz von Doxorubicin, konnten experimentelle Konzentrationsbestimmungen und daraus abgeleitete Simulationen für eine in den Experimenten relevante Substanz erstellt werden (Abb. 4.7). Doxorubicin kann bei 488 nm angeregt werden und besitzt zwei Emissionsmaxima bei 560 und 593 nm (Karukstis et al. 1998). Die Ergebnisse verschiedener Experimentiertage, an denen die Diffusion von Doxorubicin verfolgt wurde und aus denen die Parameter für die nachfolgenden Simulationen ermittelt wurden, sind in Tab 4.1 dargestellt. Durch Simulieren von Diffusionskurven auf der Grundlage der experimentell bestimmten Gradientenverläufe, wurden für die jeweils angewendeten Inkubationszeiten

zeitgewichtete Durchschnittskonzentrationen aus Abb. 4.7 (d) ermittelt und in Tab. 4.2 dargestellt. Zeitgewichtet bedeutet hierbei, dass ein Wert, der nach 1 h einer 24-stündigen Inkubationszeit an einer bestimmten Stelle innerhalb der Testfläche bestimmt wird, 24 mal in den Mittelwert eingeht und der Wert zur Stunde 24 dagegen nur einmal. Die Werte aus Tab. 4.2 sind die Konzentrationswerte, die für eine bestimmte Substanz und eine bestimmte Inkubationszeit in Dosis-Wirkungsprofilen eingehen. Für die Diffusionssubstanzen, die nicht mit fluoreszenztechnischen Methoden zugänglich waren, mussten die Konzentrationsprofile aus der Simulation für Doxorubicin übernommen werden.

Tritt der Wirkstoff aus dem Pipettierschlitz in die Matrix ein, wird er verdünnt. Bis zum Erreichen der Testfläche hat der Wirkstoff daher einen bestimmten Verdünnungsgrad erreicht. Aus den Konzentrationen, die in der Testfläche gemessen wurden sowie den Anfangskonzentrationen, konnte ein Verdünnungsfaktor errechnet werden (Abb 4.8). Dieser Verdünnungsfaktor ist wichtig, um die Konzentrationsgradienten richtig abschätzen zu können. Er ist ebenfalls in Tab. 4.1 wiedergegeben.

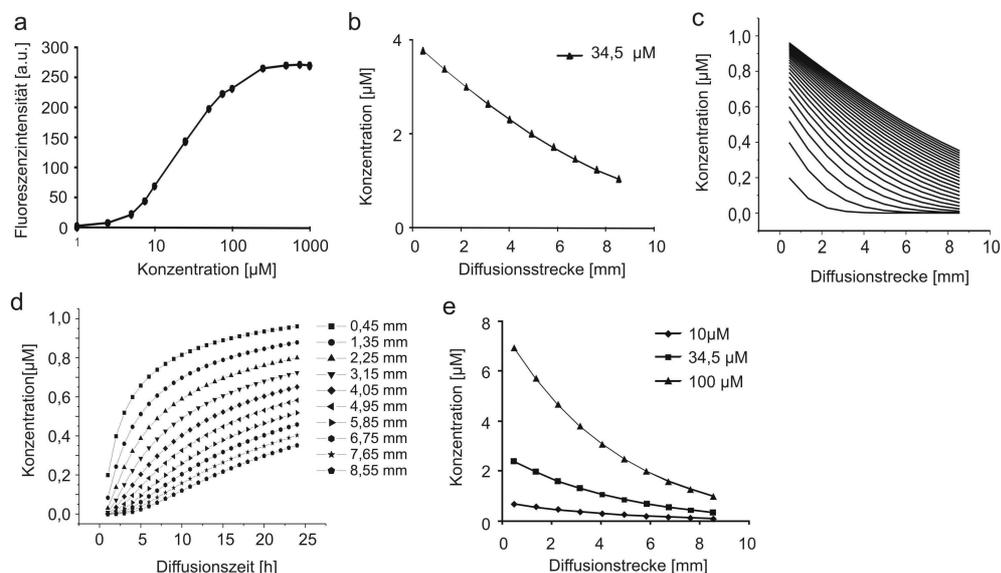


Abb. 4.7: Voraussage der Konzentrationsverläufe

(a) Kalibrationskurve für Doxorubicin in RPMI 1640 Medium + 10% FCS (b) Experimentell bestimmte Diffusionskurve von Doxorubicin mit der Startkonzentrationen von 34,5 µM nach 17 h. (c) Mit Parametern gewonnen aus (b) simulierte Konzentrationskurven von 1-24 h. Aus Tabelle 4.1 wurden dafür die Parameter Diffusionskoeffizient $D = 6,1 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ und Startkonzentration c_0 ermittelt. Der Diffusionskoeffizient ist in Übereinstimmung mit Literaturwerten für Antibiotika gleichen Molgewichts (Stewart 1996). Der Parameter x_0

konnte durch das Vermessen des Devices ermittelt werden. (d) Übertragung der Daten aus (c) in Konzentrationsverläufe an einem Ort über 24 h. (e) Durch eine zeitgewichtete Mittelwertbildung generierte Konzentrationskurven einer Inkubationszeit von 24 h auf Grundlage der in (c) und (d) gezeigten Ergebnisse. Die verschiedenen Kurven zeigen die Konzentrationsgradienten für verschiedene Startkonzentrationen.

Tab. 4.1: Ergebnisse aus den Doxorubicin Diffusionsmessungen

Messergebnisse aus Doxorubicin-Diffusionen an verschiedenen Tagen generiert. $x = 0$ zeigt die Anfangskonzentration an und $x = 2,95$ mm entspricht dem Ort der ersten Messpunkterfassung in der Testfläche.

Startkonzentration n (μM)	Diffusionszeit (h)	Diffusions- koeffizient $10 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	Konzentration bei $x = 0$ (μM)	Chi- square	Verdünnungs- faktor bei $x = 0$	Verdünnungs- faktor bei $x = 2,95$	Verdünnungs- verhältnis $X_{(0)}/X_{(2,95)}$
11. März							
100	18,00	7,81	9,930	0,0400	10,070	13,28	0,758
75	17,50	8,20	7,420	0,0200	10,108	13,50	0,749
50	17,50	5,10	5,300	0,0200	9,434	12,90	0,731
25	17,50	5,90	3,240	0,0060	7,716	10,64	0,725
10	17,50	12,60	1,810	0,0001	5,525	6,83	0,809
Average		7,30					0,74
Stdv		1,23					0,02
19. Mrz							
100	15,75	9,57	8,920	0,0490	11,211	14,12	0,794
75	15,75	4,91	7,350	0,0120	10,204	14,76	0,691
50	15,50	5,59	4,280	0,0210	11,682	17,41	0,671
25	15,50	2,37	4,330	0,0230	5,774	6,73	0,858
Average		5,25					0,72
Stdv		0,48					0,07
28. Mrz							
500	4,00	6,65	16,010	0,0400	31,230	63,71	0,490
500	8,00	5,74	14,100	0,0400	35,461	60,00	0,591
500	16,00	7,77	9,670	0,0500	51,706	69,20	0,747
500	24,00	6,31	9,510	0,0300	52,576	67,90	0,774
100	4,00	5,10	7,960	0,0200	12,563	14,32	0,877
100	8,00	8,00	6,670	0,0090	14,993	22,42	0,669
100	16,00	6,41	5,300	0,0220	18,868	24,27	0,777
100	24,00	7,75	4,970	0,0290	20,121	24,40	0,825
10	4,00	9,10	1,100	0,0007	9,091	16,13	0,564
10	8,00	4,10	1,900	0,0070	5,263	10,30	0,511
10	16,00	2,40	0,750	0,0004	13,333	22,80	0,585
Average		6,43					0,70
Stdv		1,31					0,14
19. Jan							
34,5	17,00	6,10	5,130	0,0000	6,725	9,15	0,735
Average		6,10					0,73
Stdv							
11. Apr							
10	4,75	7,50	5,740	0,0400	1,742	3,18	0,548
10	8,50	6,30	4,200	0,0200	2,381	3,11	0,766
10	16,75	2,60	1,750	0,0200	5,714	10,77	0,531
100	16,30	9,85	5,960	0,0100	16,779	21,64	0,775
100	24,57	6,50	3,430	0,0100	29,155	36,50	0,799
500	24,60	3,75	9,000	0,0200	55,556	75,80	0,733
Average		6,01					0,71
Stdv		1,60					0,11

Startkonzentration (μM)	Diffusionszeit (h)	Diffusionskoeffizient $10 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	Konzentration bei $x = 0$ (μM)	Chi-square	Verdünnungsfaktor bei $x = 0$	Verdünnungsfaktor bei $x = 2,95$	Verdünnungsverhältnis $x_{(0)}/x_{(2,95)}$
29. Mai							
100	4,00	3,46	20,570	0,0400	4,861	14,30	0,340
100	24,00	5,07	7,550	0,0500	13,245	18,62	0,711
Average		4,27					0,53
Stdv		1,14					0,26

Tab. 4.2: Konzentrationswerte für verschiedene Startkonzentrationen und Inkubationszeiten

Diffusionsstrecke	10 μM			34,5 μM			100 μM		
	1 - 16 h	1 - 24 h	4 - 20 h	1 - 16 h	1 - 24 h	4 - 20 h	1 - 16 h	1 - 24 h	4 - 20 h
0,45	0,617	0,696	0,794	2,127	2,400	2,737	6,166	6,958	7,932
1,35	0,483	0,572	0,673	1,665	1,970	2,321	4,827	5,711	6,728
2,25	0,375	0,467	0,564	1,294	1,610	1,943	3,751	4,667	5,633
3,15	0,290	0,380	0,466	1,000	1,311	1,607	2,898	3,799	4,657
4,05	0,223	0,308	0,381	0,767	1,062	1,312	2,224	3,079	3,804
4,95	0,170	0,249	0,307	0,585	0,857	1,060	1,696	2,485	3,073
5,85	0,128	0,200	0,246	0,443	0,689	0,847	1,284	1,997	2,455
6,75	0,097	0,160	0,194	0,333	0,551	0,670	0,965	1,597	1,943
7,65	0,072	0,127	0,152	0,248	0,439	0,526	0,720	1,271	1,523
8,55	0,053	0,101	0,118	0,184	0,348	0,409	0,533	1,008	1,184

Nach 16 Stunden Diffusion, ergaben sich annähernd konstante Verdünnungsfaktoren. Ein Verdünnungsfaktor von 10 schließt innerhalb eines 50% Konfidenzintervalls 72,8% von 18 Messpunkten bei Startkonzentrationen von 10 – 100 μM ein. Werte mit Anfangskonzentrationen von 100 μM verzeichnen dabei einige Abweichungen (Abb. 4.8). Der Verdünnungsfaktor wird bei Festlegung von c_0 in der Simulation der Diffusionsverläufe berücksichtigt. Die Konzentration, die in den Pipettierschlitz gegeben wird, beeinflusst den Verdünnungsfaktor ebenfalls. Hierbei kann beobachtet werden, dass vor allem bei höher eingesetzten Konzentrationen der Verdünnungsfaktor erheblich steigt (Abb. 4.8)

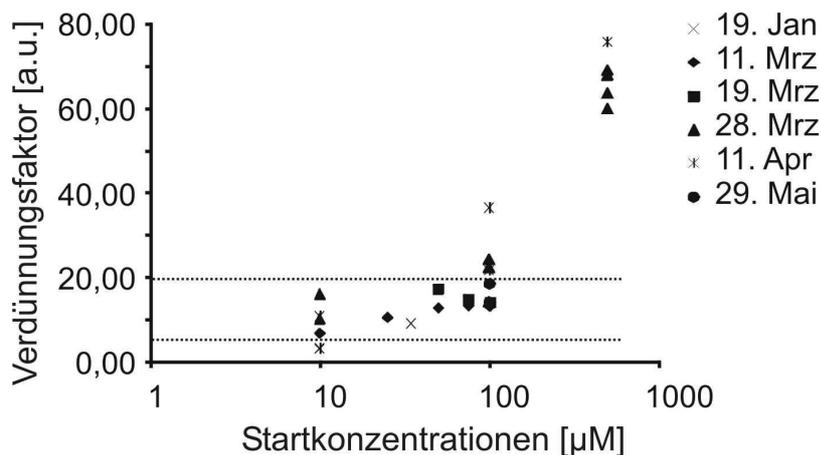


Abb. 4.8: Verdünnungsfaktoren für Doxorubicin im Diffusion Device

Verdünnungsfaktoren aus verschiedenen Startkonzentrationen und mit verschiedenen Inkubationszeiten gemessen am Punkt $x = 2,95$ mm. Die gestrichelten Linien geben das 50% Konfidenzintervall an.

4.1.3. Implementierte Zelltests

In der Vergangenheit konnten Kombinationstherapien in der Leukämiebehandlung erfolgreich angewandt werden (Kimby, Nygren, & Glimelius 2001). Durch die Zusammenarbeit mit den pädiatrischen Abteilungen der Universitätskliniken in Tübingen und Nijmegen, wurden daher Versuche mit klinisch etablierten Chemotherapeutika gegen verschiedene Leukämie-Zelllinien geplant. Als zellbasierte in-vitro Tests wurden der Annexin vermittelte Apoptosenachweis und der MTT-Zytotoxizitätstest ausgewählt. Beide Assays lassen eine optische Auswertung einer graduellen Wirkstoffeinwirkung zu.

Bereits vor der Implementierung eines Zelltests wurde erkannt, dass durch einfaches Einpipettieren der Zellen keine homogene Verteilung innerhalb der Testfläche erreicht werden konnte. Es wurde festgestellt, dass vor allem Randeffekte, Fließbewegungen des Mediums und Unebenheiten der Agaroseoberfläche die Zellverteilung beeinflussten (Abb. 4.9 (a)). Die Folge war eine sehr ungleiche Zellverteilung, die eine spätere Auswertung des Versuchs nicht sinnvoll erscheinen ließ.

Deshalb wurden Versuche, angelehnt an Studien zum Verhalten von T-Lymphozyten in einer Kollagenmatrix, durchgeführt (Bijian, Zhang, & Shen 2007; Friedl, Entschladen, Conrad, Niggemann, & Zanker 1998; Friedl, Noble, & Zanker 1995). Mit

einer Kollagenmatrix gelang es, die verwendeten Zellen in einem dreidimensionalen Raum mit den Abmessungen $9 \times 9 \times 0,5-1$ mm in Position zu halten (Abb. 4.10). Dadurch konnte die Wirkung eines Konzentrationsgradienten orts aufgelöst wiedergegeben werden. Gleichzeitig ermöglichte dies eine Kultivierung in einer biologischen Matrix, welche einer physiologischen Umgebung der Zelle eher entspricht.

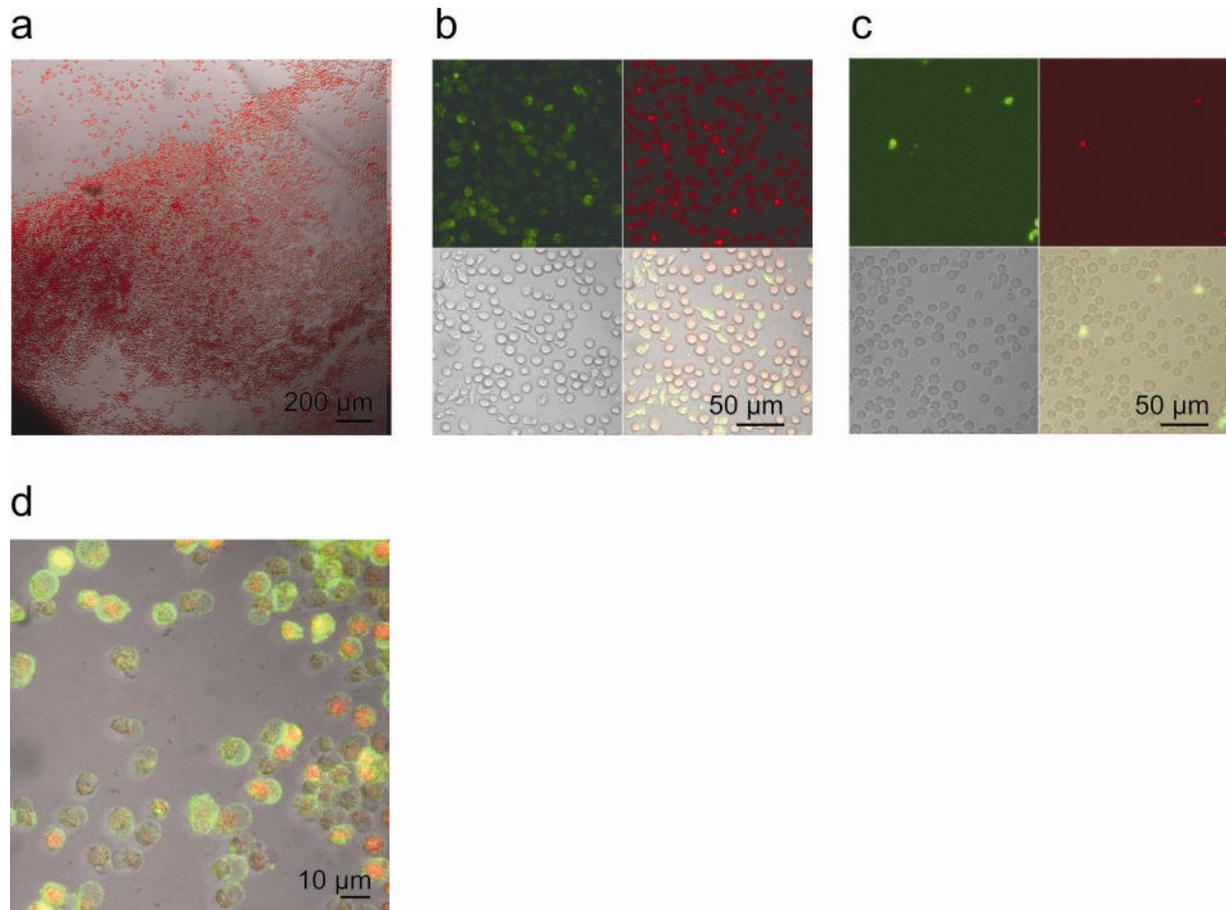
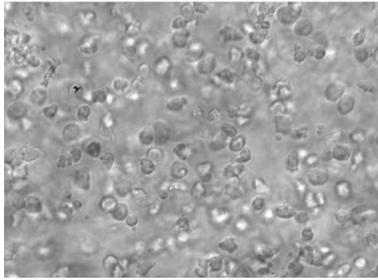


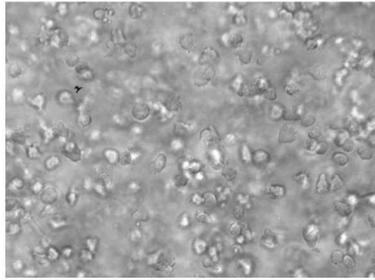
Abb. 4.9: Zellverteilung ohne Kollagen und Fluoreszenzfärbungen mit Annexin und Propidium-iodid

(a) Ungleiche Verteilung der Zellen im Diffusion Device ohne Kollageneinbettung. (Zellen mit 0,5% Tween 20 abgetötet und mit $5 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid angefärbt). (b) Kontroll-experiment mit $1 \cdot 10^6$ Zellen auf Agarose ohne Diffusion Device mit Zugabe von $34,5 \mu\text{M}$ Doxorubicin zur Auslösung von Apoptose, nach 17 h angefärbt mit Annexin-Alexa 488 ($4 \mu\text{l}$) und Propidiumiodid ($25 \mu\text{g/ml}$). Die grüne Färbung weist auf Apoptose hin, während die rote Färbung Zellen anzeigt, deren Membranintegrität verloren gegangen ist und daher mit PI gefüllt sind. (c) Gleiche Bedingungen und Anfärbung wie in (b) ohne Zugabe von Doxorubicin. (d) Vergrößertes Bild aus der Testfläche. Es sind die PI-gefärbten Zellkerne und die sie umgebenden annexingefärbten Zellmembranen zu erkennen.

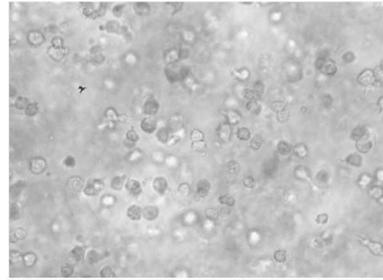
KG1A



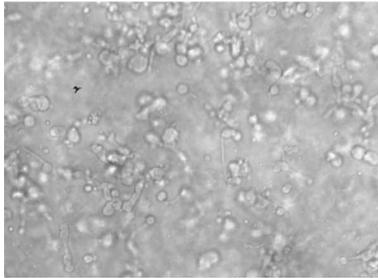
K562



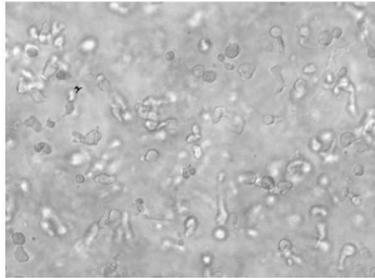
PBL



Jurkat



CEM



Molt-4

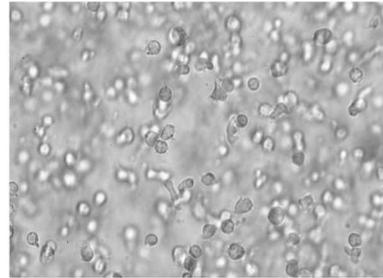


Abb 4.10: Zellverteilung in einem Kollagengel

Sechs der verwendeten Zelllinien, mit der selben Zelldichte in Kollagen eingebettet, und aufgenommen mit einer Spiegelreflexkamera, verbunden mit der Optik eines Durchlichtmikroskops, nach 16 h Inkubationszeit.

4.1.3.1 Apoptosenachweis

Die ersten Anwendungen des Diffusion Devices im Zusammenhang mit einem Bioassay wurden mit Annexin-FITC und Propidiumiodid (PI) durchgeführt, um Apoptose fluoreszenzbasiert zu untersuchen. Zu Beginn konnte festgestellt werden, ob durch Einwirkung von 1 μ M Doxorubicin über einen Zeitraum von 8 h (Muller et al. 1997), Zellen mit Annexin und mit Propidiumiodid spezifisch nach Zellzustand angefärbt werden konnten (Abb. 4.9). Die Idee war es, zwischen frühem und spätem Zustand der Apoptose zu unterscheiden. Da im frühen Stadium der Apoptose Phosphatidylserine der Membran nach außen umklappen („flip-flop“) aber die Membranintegrität erhalten bleibt, wird in diesem Stadium nur die Membran der Zelle mit fluoreszentelem Annexin angefärbt. Erst zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose kann auch das Propidiumiodid in die Zelle gelangen, da die Zellen mehr und mehr geschädigt werden. Bei Nekrose sollten die Zellen hauptsächlich durch PI gefärbt sein. Abb. 4.11 zeigt eine erste Messung einer Doxorubicingradient abhängigen PI-Aufnahme in Zellen, welche gleichmäßig in einem Kollagengel verteilt waren.

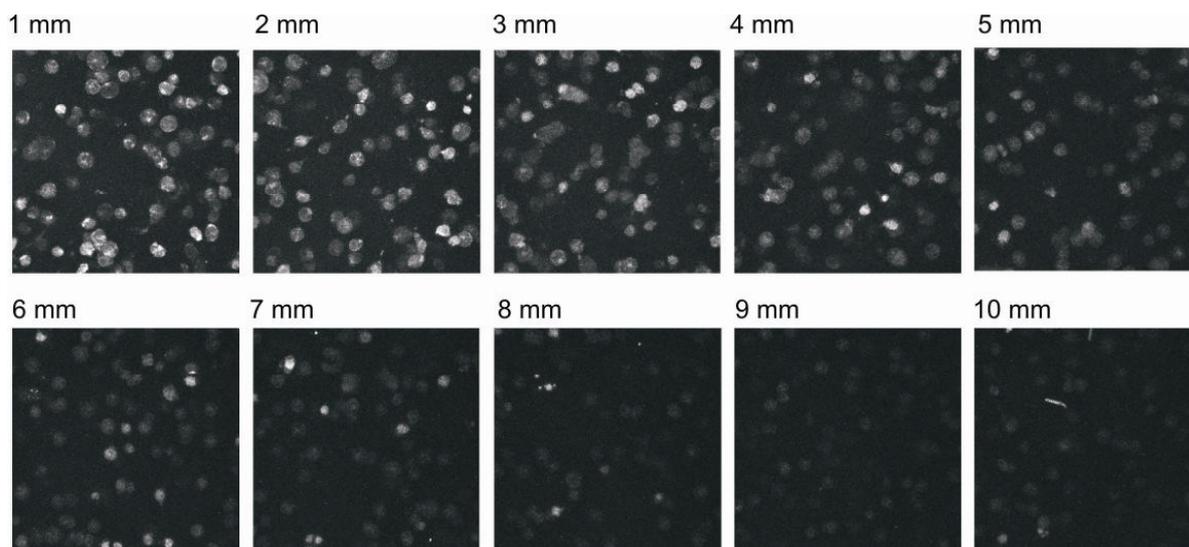


Abb. 4.11: Propidiumiodidfärbung in Abhängigkeit eines Doxorubicingradienten

Messung mit einem Laser Scanning Mikroskop bei Anregung von 543 nm und Detektion durch einen 560 nm Long Pass-Filter. Es wurden 20 μl 3,45 mM Doxorubicin in den Pipettierschlitz pipettiert. Die Zellen und das Doxorubicin wurden zur selben Zeit in den Diffusion Device gegeben. Die Messung fand nach 16 h statt.

Bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm und einem Long Pass Filter ab 560 nm wurde eine Überschneidung der Fluoreszenzspektren zwischen Doxorubicin und PI festgestellt (Abb. 4.12). Da dieser Crosstalk nicht erwünscht war, wurde in nachfolgenden Versuchen nicht mehr Annexin-Alexa 488 verwendet, sondern Annexin-Alexa 647 mit Sytox Green als Gegenfärbung. Mit Sytox Green wurden ebenfalls Färbungen im Diffusion Device durchgeführt (Abb. 4.13)

Mit Sytox Green konnten wie mit PI, Aufnahmen von geschädigten Zellen im Diffusion Device angefertigt werden. Bei der Inaktivierung von Zellen durch Diffusion von 10% Tween 20 konnte ein diskreter Übergang von toten zu lebenden Zellen aufgezeichnet werden (Abb. 4.13 (b)). Mit Sytox Green, welches in lebende und tote Zellen eindringt, konnte ebenfalls die Einwirkung einer zytotoxischen Substanz visualisiert werden (Abb. 4.13 (a)). Hierbei kommt der Effekt zum Tragen, dass bei fortgeschrittener Apoptose die DNA-Fragmentierung immer weiter fortschreitet und sich der Farbstoff nicht mehr im Zellkern konzentrieren kann. So werden bei hohen Konzentrationen von Doxorubicin immer weniger Zellen detektiert.

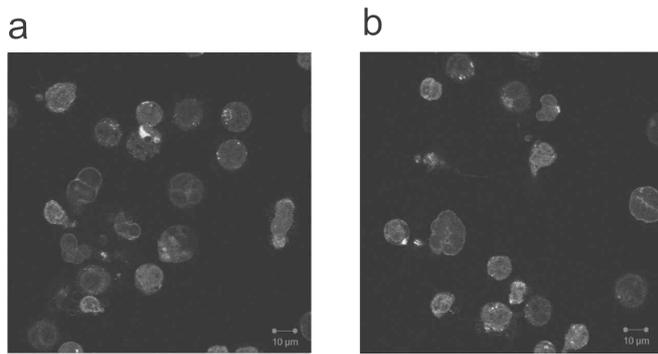


Abb. 4.12: Crosstalk von Doxorubicin und Propidiumiodid

(a) Zellen wurden 3 h mit Doxorubicin und PI inkubiert (b) Zellen wurden 3 h nur mit Doxorubicin inkubiert. Die Mikroskopieeinstellungen lauteten 543 nm Anregungswellenlänge, Detektion mit Long Pass Filter bei 560 nm, Objektiv Apochromat-C 63 X, Pinhole-Öffnung 123 µm eingestellt. Die Inkubationszeit des Doxorubicin war nicht ausreichend, um die Zellen schädigen zu können. Da in (a) und in (b) die gleiche Fluoreszenz zu sehen war wurde davon ausgegangen, die Fluoreszenz von intrazellulärem Doxorubicin zu detektieren.

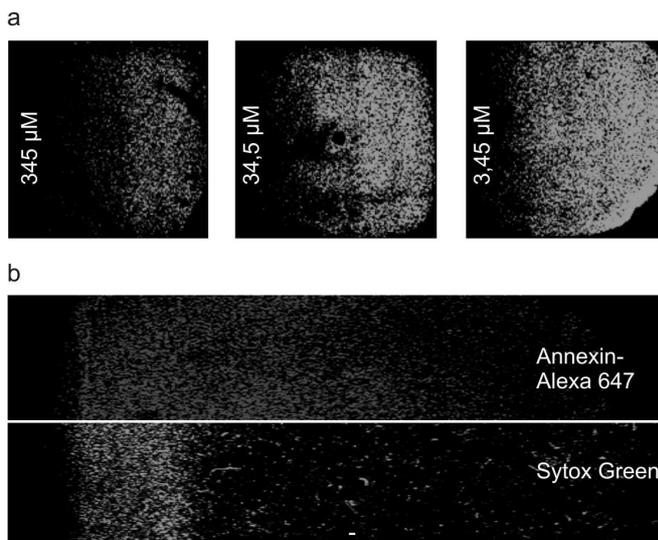


Abb. 4.13: Zellfärbungen mit Syto und Sytox Green

(a) Abhängigkeit der Syto Green Zellfärbung von der Doxorubicin Startkonzentration. Bei hoher Startkonzentration ist die DNA nur in Zellen in der rechten Hälfte der Testfläche anfärbbar. Je kleiner die Startkonzentration, desto mehr Zellen konnten noch angefärbt werden und die Fluoreszenzfront wandert nach links. Die Diffusion von Doxorubicin beginnt jeweils an der linken Seite der gezeigten Bilder. (b) Unterschied der Antwortprofile zwischen Doxorubicin und Tween 20. Es konnte beobachtet werden, dass die durch Doxorubicin verursachte Apoptose graduell verläuft während Tween 20 einen abrupten Übergang von durch Sytox Green detektierten, toten und lebenden Zellen verursacht.

Nach weiteren Versuchen im Diffusion Device, wurde Annexin von Anfang an mit der Zell/Kollagenmatrix gemischt und in den Device gegeben. Hierbei verliefen die Apoptosenachweise reproduzierbarer und lieferten einheitlichere Ergebnisse. Bei Färbungen direkt vor der Mikroskopieauswertung ist vermutlich eine inhomogene und langsame Verteilung des Annexin innerhalb der Kollagenmatrix hinderlich (Ramanujan, Pluen, McKee, Brown, Boucher, & Jain 2002). Eine zu lange Inkubationszeit ist aufgrund der Vorgabe eine Methode zu entwickeln, die unter anderem die Arbeitszeit reduzieren soll, ebenfalls nicht erwünscht. Ein weiterer Nachteil besteht in der erhöhten Inkubationszeit der Zellen während der Färbeprozedur. Wird das Annexin sofort dazugegeben, ist eine gleichmäßige Verteilung des Annexin sichergestellt und das Annexin kann sich im Laufe der Inkubationszeit an den Membranen der apoptotischen Zellen aufkonzentrieren.

Als weitere Hürde in der Aufzeichnung von apoptotischen Zellen im Diffusion Device erwies sich die zum Teil nicht planare Agaroseoberfläche. Dies konnte zu Schwierigkeiten während der Mikroskopie führen, da Teile der Zellschicht aus dem Fokus des Anregungs- bzw. Detektionslichtstrahls geraten konnten und markierte Zellen nicht mehr detektiert wurden. Um diese fokusbedingten Veränderungen auszugleichen, wurde eine zusätzliche Färbung mit Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE) eingeführt (Abb. 4.14). Damit wurden alle Zellen gleichmäßig gefärbt und die Fluoreszenzintensität der Annexinfärbung mit der CFSE-Färbung korrigiert. Abb. 4.14 (b) zeigt die Graustufenbilder der beiden einzelnen Kanäle, wie sie für die Bildanalyse angefertigt werden.

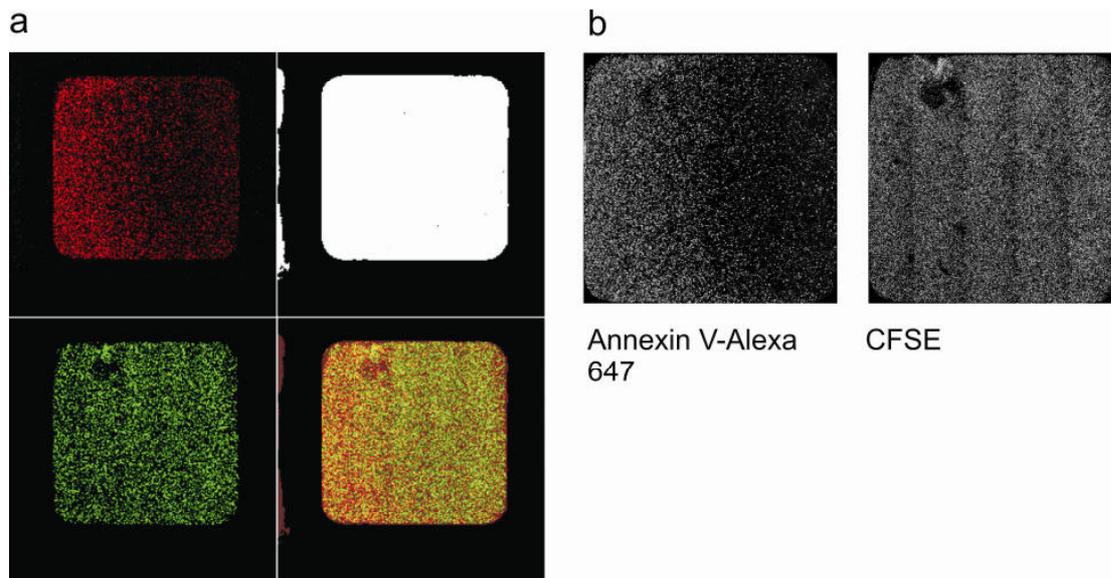


Abb. 4.14: Annexin-Alexa 647 und CFSE Färbung

(a) Originalaufnahme der Testfläche mit einem konfokalen Laserraster Mikroskop. Die rote Färbung zeigt die Annexin-Alexa 647 markierten Zellen und die grüne Färbung die Markierung mit CFSE. Rechts oben ist das Transmissionsbild sichtbar und rechts unten die Überlagerung aller Kanäle. (b) Annexin-Alexa 647 und CFSE Markierung in Graustufen in einem für die Bildanalyse bearbeiteten Format dargestellt.

Während der Bildanalyse werden die Bilder in 10×10 Regions-Of-Interest (ROIs) aufgeteilt. Für jede ROI wird der durchschnittliche Graustufenwert berechnet. Die Graustufenwerte aus der CFSE Aufnahme wurden durch die Graustufenwerte aus der Annexin-Alexa 647 Aufnahme geteilt, um fokusbedingte Fluoreszenzintensitätsunterschiede ausgleichen zu können. Aus den daraus generierten Daten wurden Diagramme zur wirkstoffabhängigen Apoptoserate im Diffusion Device erstellt.

Nach den Experimenten bei denen ausschließlich Doxorubicin Verwendung fand (Abb. 4.15), wurden weitere Wirkstoffe getestet. Bei diesen Wirkstoffen handelte es sich zum einen um Methotrexat und zum anderen Paclitaxel, welche beide schon lange Einzug bei der Behandlung von verschiedenen Krebsarten erhalten haben. Bei Tests von Methotrexat und Paclitaxel als alleinige Substanz, konnten keine Wirkstoffabhängigen Apoptosegradienten gemessen werden. Aus den Kombinationsexperimenten mit Doxorubicin konnte eine Tendenz der Potentierung des Doxorubicineffektes durch Methotrexat und Paclitaxel festgestellt werden. Diese Versuchsergebnisse mit Beteiligung von Methotrexat und Paclitaxel waren im

Vergleich zu den durchgeführten Versuchen zu selten reproduziert um eine endgültige Beurteilung zuzulassen (Abb. 4.16).

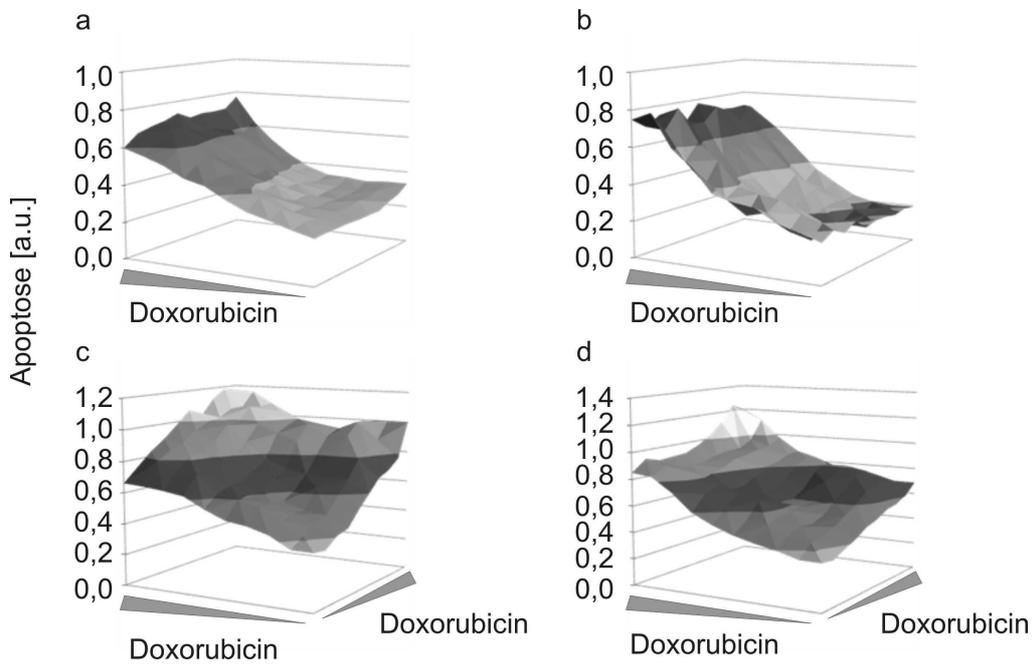


Abb. 4.15: Doxorubicin-Antwortprofile

(a,b) Eindimensionale Diffusion von Doxorubicin. (c, d) Zweidimensionale Diffusion von Doxorubicin. Die Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ CFSE vorgefärbt und mit einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $100 \mu\text{l}$ $1,25 \text{ mg/ml}$ Kollagen mit $1,5 \mu\text{l}$ Annexin-Alexa 647 pro Device inkubiert. Die Diffusionszeit des Doxorubicin betrug 16 h und die Startkonzentration $345 \mu\text{M}$. Die Zellen und das Doxorubicin wurden zur gleichen Zeit dazugegeben. Die Ordinate zeigt dabei den Quotienten der Graustufenwerte aus dem Annexin-Alexa 647 Detektionskanal und dem CFSE Detektionskanal an.

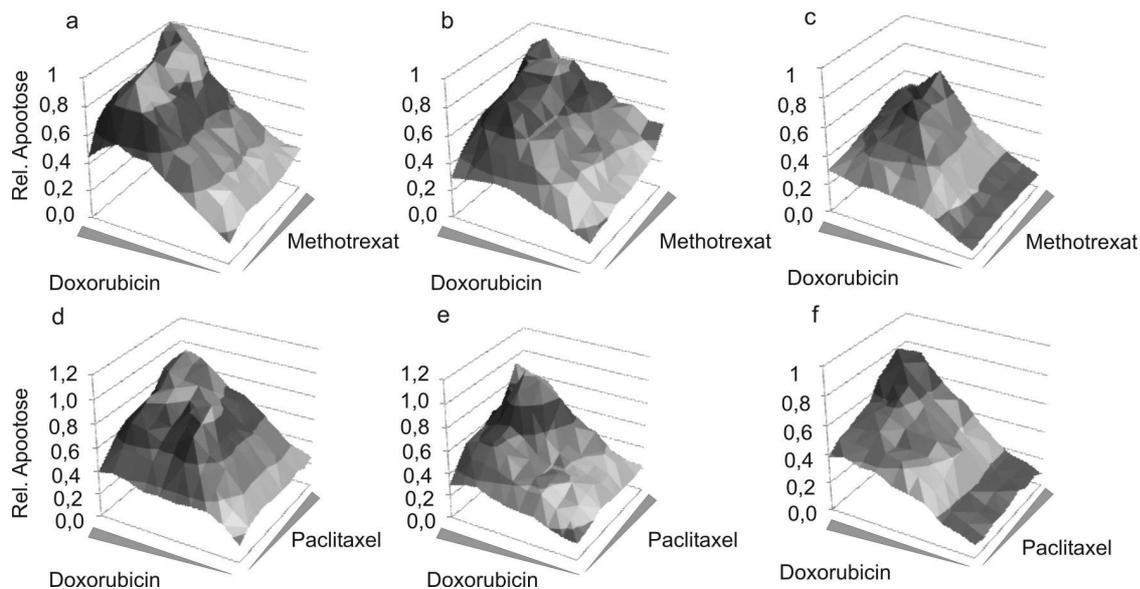


Abb 4.16: Kombinationsexperimente mit Doxorubicin, Methotrexat und Paclitaxel

(a)(b)(c) 345 μM Doxorubicin und 550 μM Methotrexat als Startkonzentrationen. (d)(e)(f) 345 μM Doxorubicin und 50 μM Paclitaxel als Startkonzentrationen. Bei allen Experimenten sind die Wirkstoffe und die Zellen zur selben Zeit eingefüllt worden. Die Diffusionszeit betrug 16 h bei 37° C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre. Die Ordinate zeigt dabei den Quotienten der Graustufenwerte aus dem Annexin-Alexa 647 Detektionskanal und dem CFSE Detektionskanal an.

In nachfolgenden Experimenten wurde ermittelt ob es möglich ist, Apoptose-Antwortprofile in Abhängigkeit vom Zelltyp zu unterscheiden. Dazu wurden die Resultate, die bisher mit Jurkat-Zellen generiert wurden, mit Versuchsergebnissen die mit Molt-4-Zellen erstellt wurden verglichen (Abb. 4.17). Es wurde ersichtlich, dass die Molt-4-Zelllinie sensitiver auf Doxorubicin reagierte als Jurkat-Zellen. Die gezeigten Ergebnisse sind jedoch nur qualitativ. Das lag an der Schwierigkeit für dieses Ausleseverfahren zuverlässige Positiv- und Negativkontrollen zu etablieren, mit denen Unter- und Obergrenzen für zu erreichende Effekte hätten ermittelt werden können. Anhand der Gradientenverläufe über die Diffusionsstrecke hinweg, ließen sich Aussagen über die Sensitivitäten zwischen den Zelllinien machen.

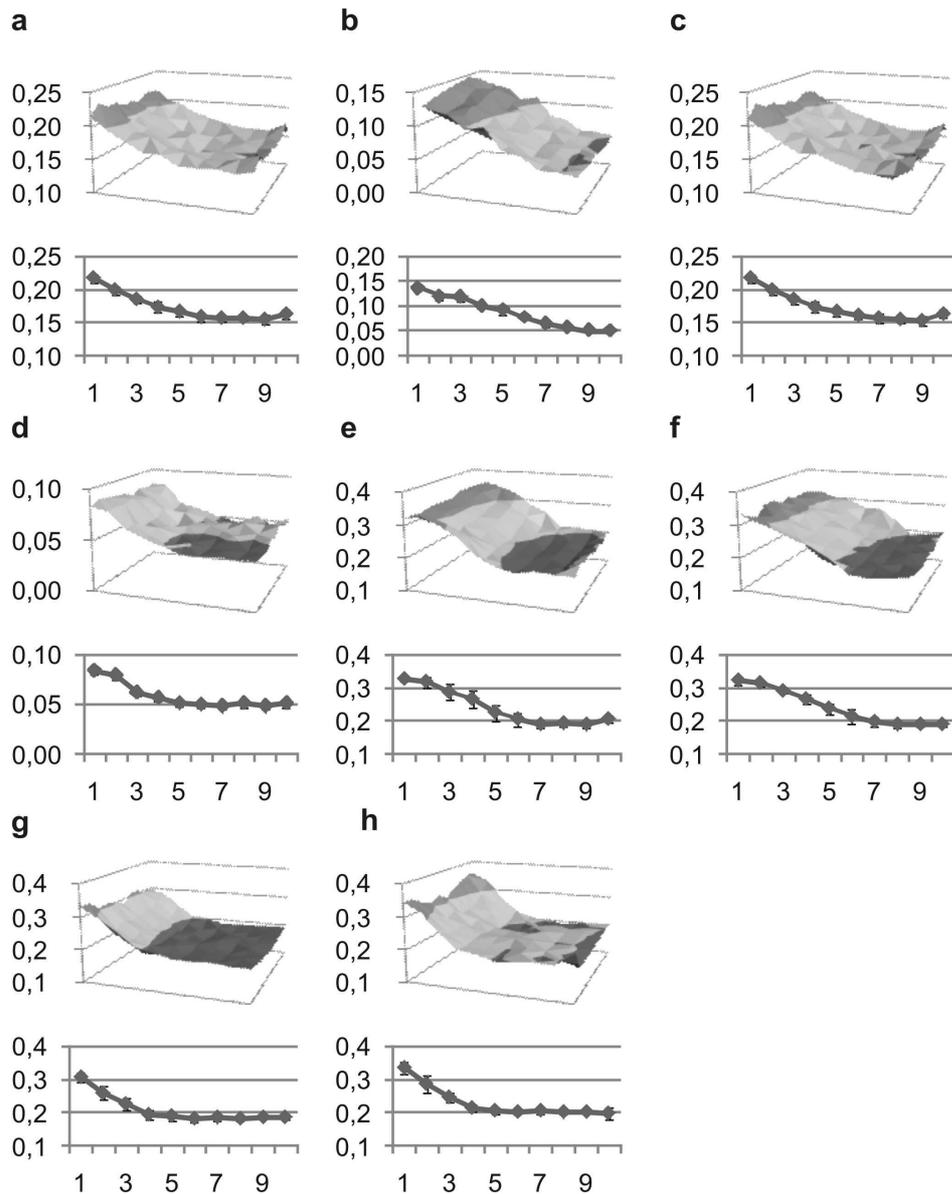


Abb. 4.17: Zelllinienspezifische Unterschiede der doxorubicininduzierten Apoptosesensitivität

(a,b,c) Molt-4-Zellen 16 h inkubiert mit 37° C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre bei Zugabe von 20 μl 34,5 μM Doxorubicin in den Applikationsschlitz. (d) Molt-4-Zellen mit den selben Bedingungen wie in (a,b,c) nur mit 3,45 μM Doxorubicin getestet. (e,f) Jurkat-Zellen mit Zugabe von 345 μM Doxorubicin und (g,h) mit Zugabe von 34,5 μM. Die Abzisse zeigt die Distanz im Diffusionsverlauf in mm und die Ordinate die Ratio zwischen der CFSE und der Alexa 647 Färbung, d. h. höhere Werte stehen für erhöhte Apoptose. Die Oberen Teilabbildungen stellen jeweils das 3-D-Dosis-Wirkungsprofil dar. Die unteren Teilabbildungen sind Mittelwertkurven, welche die Einheitlichkeit des Reaktionsprofils über die Testfläche verdeutlicht und die Unterschiede zwischen den Zelllinien hervorhebt. Alle Zellen hatten die gleichen Inkubationszeiten und Bedingungen.

In Abb. 4.17 ist nach qualitativer Betrachtung eine höhere Sensitivität der Molt-4 Zellen zu beobachten. Während die Antwortprofile von Molt-4-Zellen bei Zugabe von 3,45 μM Doxorubicin denen von Jurkat-Zellen bei Zugabe von 34,5 μM Doxorubicin entsprachen, gilt das gleiche für Molt-4-Zellen mit 34,5 μM Doxorubicin zu Jurkat-Zellen mit 345 μM Doxorubicin. Mit zunehmender Konzentration von Doxorubicin wird der Grundwert der Fluorophorratios später erreicht. Ein Beispiel bildet Abb. 4.17 (e)(f) bei 7mm (345 μM , Jurkat-Zellen) und Abb. 4.17 (g)(h) bei 4 mm (34,5 μM , Jurkat Zellen).

4.1.3.2 MTT-Test

Während der Versuche zur Apoptosefärbung stellte sich die Frage, wie der Geräte- und Zeitaufwand für das Ausleseverfahren verringert werden kann. Mittels Bestimmung der Zellvitalität durch einen MTT-Test konnte die Zytotoxizität eines Wirkstoffgradienten, durch die Bildung eines schwarzen Niederschlages, in einem Antwortgradienten sichtbar gemacht werden. Unterstützt wird dieser Prozess dadurch, dass das Kollagen-Hydrogel den Niederschlag in den Zellen ebenfalls einbettet und immobilisiert. Die Intensität des Niederschlags wird mittels einer CDD-Kamera aufgenommen und kann anschließend Bildanalytisch ausgewertet werden.

Zu Beginn der Versuche wurde beobachtet, dass die Randbereiche der Testfläche durch Meniskusbildung des Kollagens, sehr viel höhere Zellsterberaten aufwiesen. Diese Effekte waren zum Teil so umfangreich, dass sich oft die gesamte Zellvitalität der Zellen erniedrigte. Deshalb wurden die Devices an den Innenseiten ebenfalls mit einer hydrophoben Fettschicht behandelt, was eine Vermeidung der Meniskusbildung der Zell/ Kollagenmischung zur Folge hatte. Dadurch konnte ein negativer Einfluss vermindert werden.

In MTT-Tests (Mosmann 1983) werden in Mikrotiterplatten standardmäßig 0,5 mg/ml MTT verwendet. Für nachfolgend beschriebene Methode testeten wir Konzentrationen von 0,1; 0,5 und 1 mg/ml (Abb. 4.18). Dies erschien notwendig, da eine gewisse Verdünnung des MTT bei der Zugabe in den Device nicht vermieden werden konnte. Daher musste die optimale Konzentration erst noch ermittelt werden. Nach Auswertung dieser Vorversuche wurde eine Standardkonzentration von 1 mg/ml MTT verwendet, da die Intensität der Färbung und die Inkubationsdauer bei

diesen Bedingungen ideal erschienen. Ein weiterer Grund für diese Entscheidung waren die höheren Reproduzierbarkeiten bei dieser Konzentration. Die Dauer der Inkubationszeit des MTT wirkte sich zwischen 1-3 h nicht wesentlich auf den Verlauf des Antwortgradienten aus. Die Intensitäten aus den Versuchen wurden in jedem Experiment mit einer Positivkontrolle, in der kein Wirkstoff zugegeben wurde, abgeglichen.

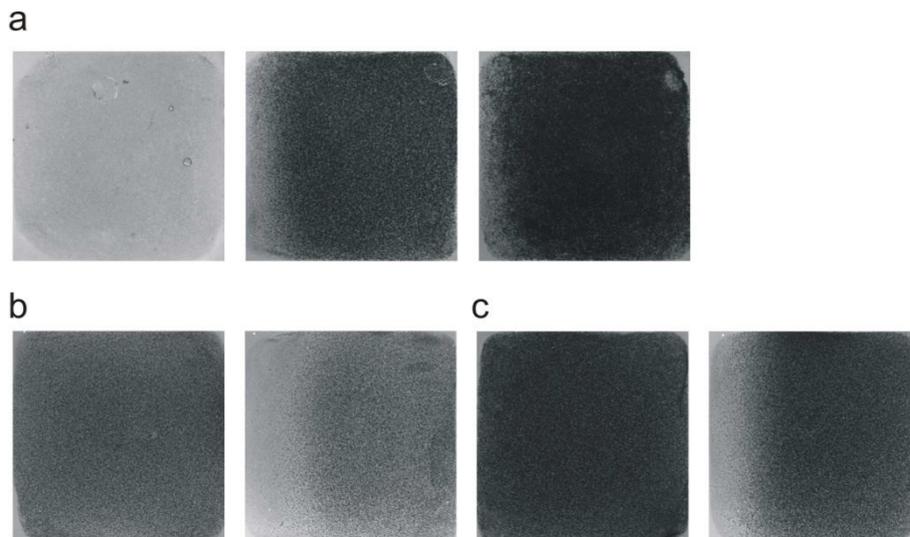


Abb. 4.18: Bestimmung der optimalen Konzentration für den MTT-Test im Diffusion Device

(a) Von links nach rechts wurden 0,1, 0,5 und 1 mg/ml MTT für 2 h inkubiert, nach einer Inkubationszeit von 16 h mit der Doxorubicin-Startkonzentration von 34,5 μ M. (b) $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 0,5 mg/ml MTT für 2 h inkubiert und nach 16 h Inkubation mit 34,5 μ M Doxorubicin als Startkonzentration. Links ist die Positivkontrolle sichtbar und rechts das Experiment mit dem zugegebenen Wirkstoff (c) $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 1 mg/ml MTT für 2 h unter den selben Bedingungen wie bei (b).

Der nächste bisher vernachlässigte Parameter, bildet die Zelldichte im Diffusion Device. Es stellte sich heraus, dass die Zelldichte direkten Einfluss auf den Antwortgradienten hat. Um mehr Klarheit darüber zu bekommen, wie die Zelldichte das Ergebnis innerhalb des Diffusion Device beeinflusst, wurden Versuche mit verschiedenen Zelldichten durchgeführt (Abb. 4.19).

Neben einer Zunahme des absoluten MTT-Signals ist eine Verschiebung der Kurven zu höheren Konzentrationen ersichtlich. Daher wurden aus den Kurven der Abb. 4.19 (b) EC_{50} -Werte nach der Methode von Chou (Chou 2006; Chou & Talalay 1984)

errechnet und in Abb. 4.20 dargestellt. Je höher die Zelldichten werden, desto höher der EC_{50} -Wert. Die Angaben der Zelldichte beziehen sich auf 100 μ l Kollagenmatrix.

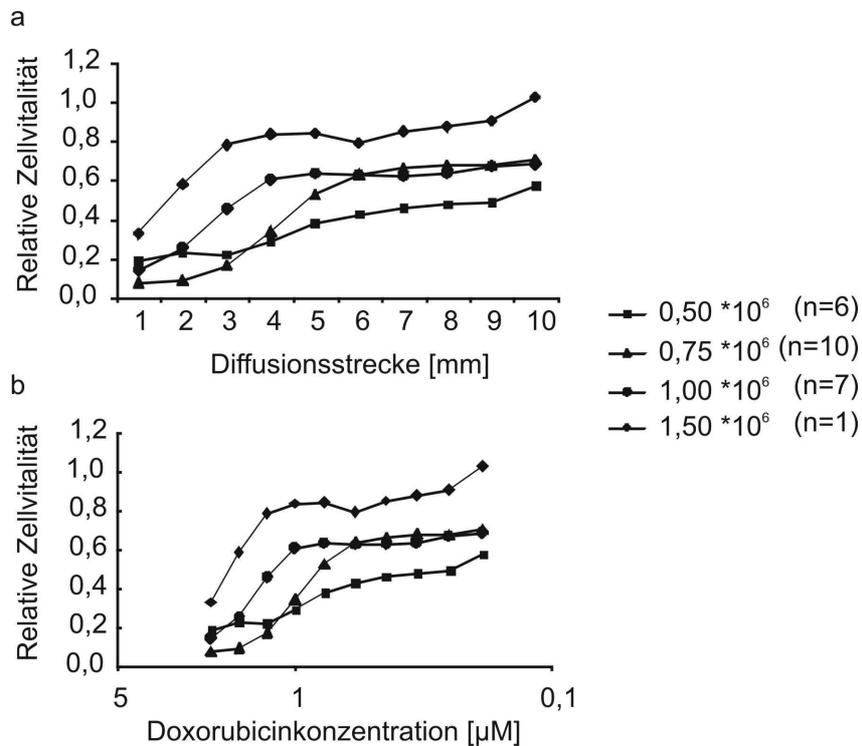


Abb. 4.19: Zellvitalität über der Diffusionsdistanz und Konzentration bei verschiedenen Zelldichten

(a) Zellvitalität über der Diffusionsdistanz (b) Zellvitalität über der Doxorubicinkonzentration. Es wurden Zelldichten von 0,5; 0,75; 1 und 1,5 * 10⁶ Zellen/100 μ l Kollagenmatrix/Device getestet. Die Doxorubicin Startkonzentration betrug 34,5 μ M und die Inkubationszeit lag bei 16 h. n = Anzahl der Experimente. Die Konzentrationen wurden wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben ermittelt und aus Tab. 4.2 entnommen.

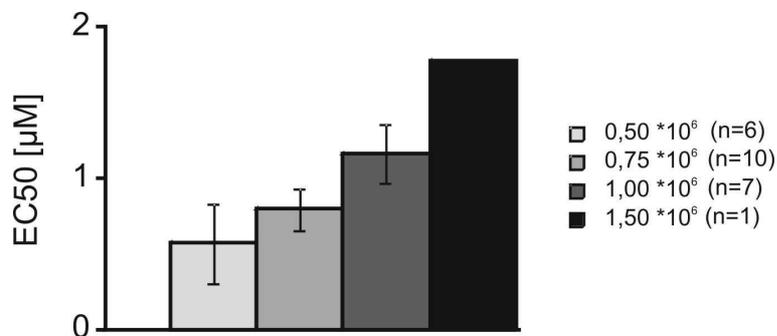


Abb. 4.20: EC_{50} -Werte aus Versuchen mit verschiedenen Zelldichten im Diffusion Device

Um zu klären, ob der Effekt der zell-dichte-abhängigen EC_{50} -Konzentration auch bei Versuchen in Mikrotiterplatten zu beobachten ist, wurden entsprechende Experimente gemacht (Abb. 4.21). Die Annahme, dass sich der EC_{50} -Wert mit steigender Zelldichte erhöht, wurde in diesen Experimenten bestätigt. Da aber die E_{50} -Werte aus den Device-Experimenten immer noch 4-5 mal höher lagen als in Mikrotiterplatten-Experimenten wurde auch der Einfluss des Kollagens auf die Sensitivität der Zellen in Mikrotiterplatten untersucht (Abb. 4.22). In der Literatur ist beschrieben, dass durch die Stimulierung von Integrinen durch extrazelluläre Komponenten wie Kollagen der Zelle Überlebenssignale gegeben werden können (Bijjan, Zhang, & Shen 2007). Tatsächlich wurde in den Versuchen festgestellt, dass der Einfluss des Kollagen den EC_{50} -Wert erhöht. Die Kurven zeigen eine Tendenz zu höheren Konzentrationen wobei der Einfluss der höheren Zelldichte größer ist (ca. zehnfach) als der des Kollagens (ca. zweifach)

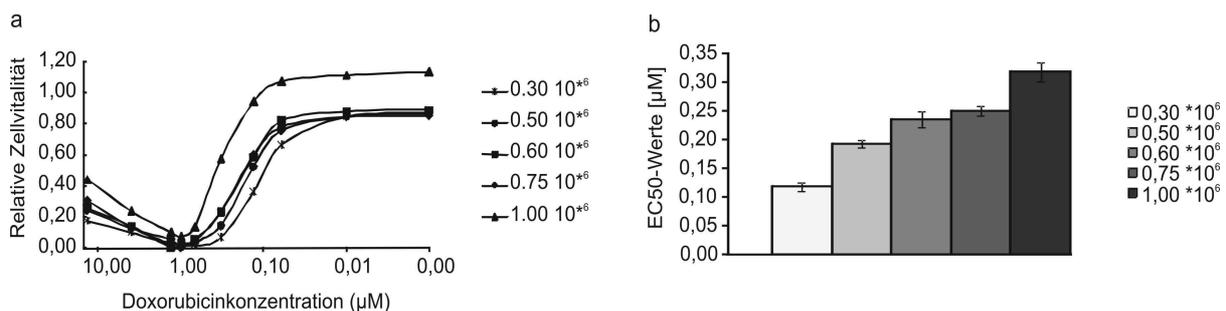


Abb. 4.21: Vergleichsexperimente in Mikrotiterplatten zur Zelldichteabhängigkeit des EC_{50} -Wertes

(a) Dosis-Wirkungskurven bei verschiedenen Zelldichten. (b) daraus resultierende EC_{50} -Werte. Die Angaben der Zellzahl beziehen sich auf 100 μl Medium. Die gezeigten Standardabweichungen errechnen sich aus einer Dreifachbestimmung.

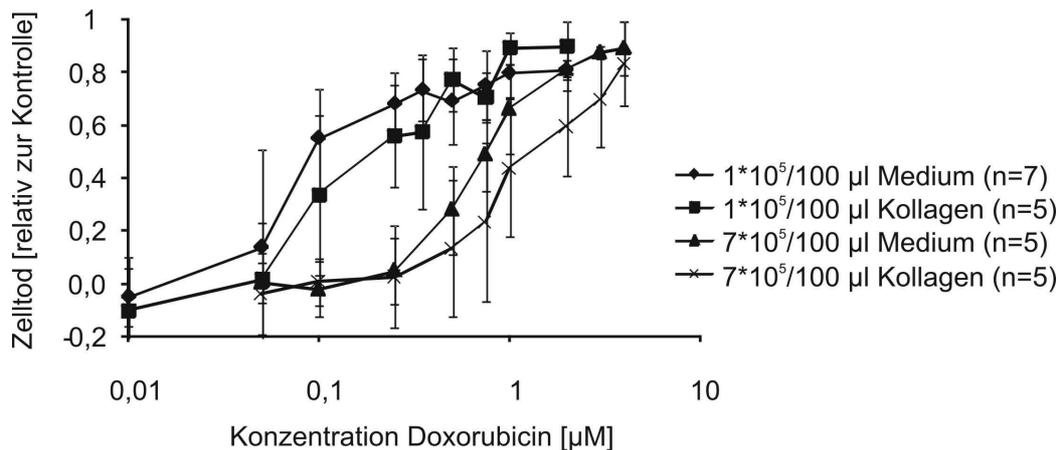


Abb. 4.22: Abhängigkeit des EC_{50} -Wertes von verschiedenen Zelldichten und der Einbettung in Kollagen

Die Kurven zeigen eine Verschiebung zu höheren Konzentrationen, wobei der Einfluss der höheren Zelldichte größer ist (ca. zehnfach) als der des Kollagens (ca. zweifach). Die aus den EC_{50} Bestimmungen nach Chou gewonnenen EC_{50} -Werte sind: $0,072 \mu\text{M}$ für $1 \cdot 10^5$ Zellen/100 μl Medium; $0,19 \mu\text{M}$ für $1 \cdot 10^5$ Zellen/100 μl Kollagenmatrix; $0,76 \mu\text{M}$ für $7 \cdot 10^5$ Zellen/50 μl Medium; $1,56 \mu\text{M}$ für $7 \cdot 10^5$ Zellen/50 μl Kollagenmatrix.

Nach den Untersuchungen der MTT-Konzentration, der Zelldichte und des Kollageninflusses wurden die Standardbedingungen für einen Diffusion Device MTT-Test mit $0,75 \cdot 10^6$ Zellen pro Device und 1 mg/ml MTT festgelegt. Nach Klärung der möglichen Freiheitsgrade und methodenspezifischen Unterschieden zu Mikrotiterplatten-Experimenten, konnten parallelisierte Versuche mit zwei 12-Lochplatten (= 24 Kombinationsexperimente) gleichzeitig an zwei Tagen durchgeführt und ausgewertet werden. Dadurch wurde es möglich, in relativ kurzer Zeit verschiedene Wirkstoffkombinationen oder mehrere Zelltypen gegen eine bestimmte Wirkstoffkombinationen zu testen. In Abb. 4.23 werden im Diffusion Device generierte 3D-Dosis-Wirkungsprofile der lymphatischen Leukämiezelllinie Molt-4 mit in Mikrotiterplatten generierten Ergebnissen verglichen. Die Wirkprofile ergaben sich durch Konzentrationsgradienten von Kombinationen aus Doxorubicin, Clofarabin und Etoposid. Die Ergebnisse aus den Diffusion Devices stimmten dabei mit den Ergebnissen, die mit der Mikrotiterplattenmethode gewonnen wurden qualitativ überein. Die nach Chou berechneten EC_{50} -Werte (Chou 2006; Chou & Talalay 1984) lagen bei der Diffusion Device Methode zwischen 2–14 mal höher als in der Mikrotiterplatte (Abb. 4.24). Die EC_{50} -Werte des Diffusion Device und der Mikrotiterplatten-Methode zeigten aber eine ähnliche Verteilung auf. Die Ausnahme bildete Clofarabin, welches sich in der

Diffusion Device Methode als viel effektiver gegenüber den zwei anderen Wirkstoffen darstellte, als in der Mikrotiterplatten-Methode.

Neben dem Vergleich verschiedener Wirkstoffkombinationen, ist auch die Sensitivität verschiedener Zelltypen gegenüber bestimmten Wirkstoffkombinationen für die klinische Anwendung interessant. Um die Eignung des Diffusion Device für diese Anwendung zu prüfen, wurden Versuche durchgeführt, in denen 6 Zelllinien gleichzeitig mit der selben Wirkstoffkombination, parallel getestet wurden (Abb. 4.25). Bei den Zelllinien handelte es sich um 3 lymphatische Zelllinien (Jurkat, Molt-4, CEM) und drei myeloische Zelllinien (K562, PBL, KG1A). Unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit 10×10 getesteten Konzentrationen wären 198 Pipettierschritte notwendig, um eine Kombination zu pipettieren. Dies ergibt für 12 Kombinationen schon 4752 Pipettierschritte. Im Gegensatz dazu benötigt der Diffusion Device nur 24 Pipettierschritte.

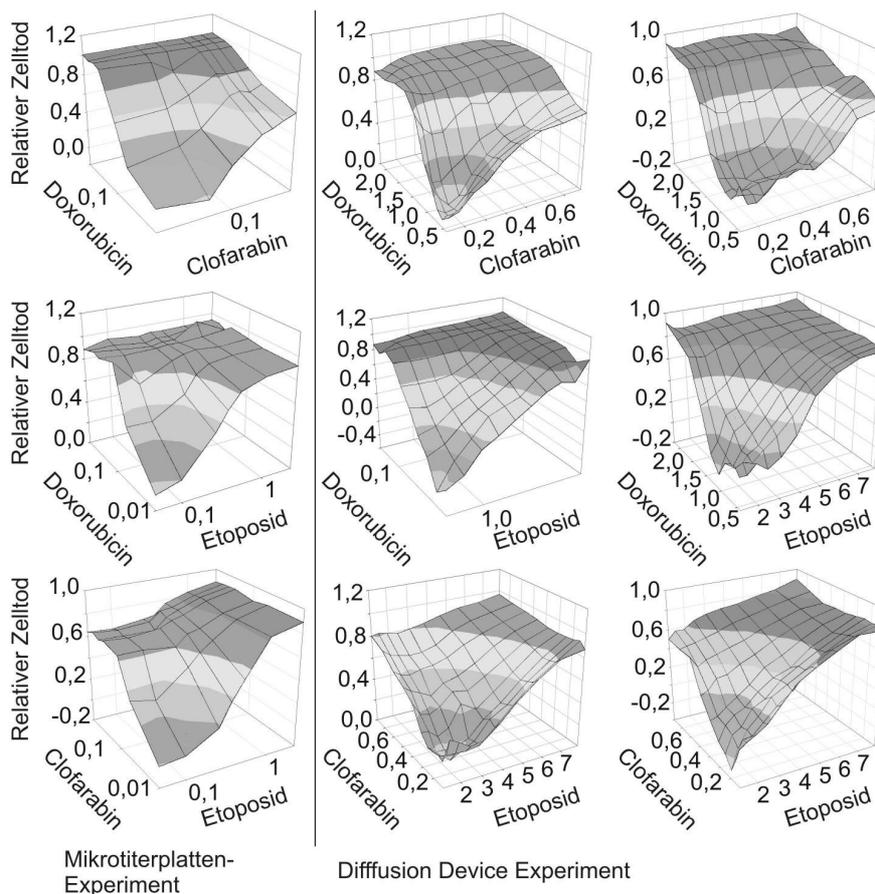


Abb. 4.23: Vergleich von Diffusion Device mit Mikrotiterplatten generierten 3D-Wirkungsprofilen

Vergleich von Dosis-Wirkungs-Profilen aus Standard-96-Well-Platten und dem Diffusion Device mit Molt-4-Zellen. Die Wirkstoffkonzentrationen betragen 34,5 μM für Doxorubicin, 10 μM für Clofarabin, 100 μM Etoposide und die Inkubationszeit lag bei 16 h. Die Zelldichte pro Device wurde $7,5 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μl Kollagen eingestellt. In der Mikrotiterplatte betrug die Zelldichte $5 \cdot 10^4$ Zellen pro 100 μl Medium. Auf die vertikale Achse ist der zytotoxischen Effekt der Wirkstoffe relativ zur Kontrolle ohne Wirkstoffe aufgetragen.

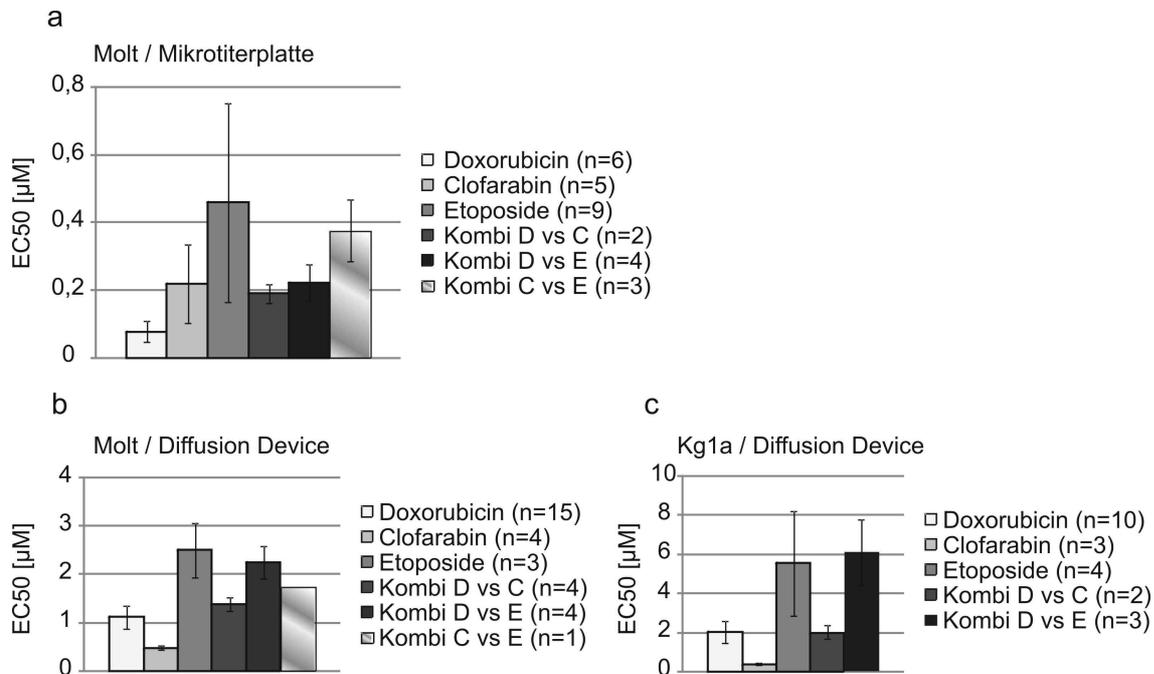


Abb. 4.24: EC₅₀-Werte aus Mikrotiterplatten-Experimenten und Diffusion Device für Molt-4 und KG1a-Zellen

(a) EC₅₀-Werte aus Mikrotiterplatten-Experimenten für die Wirkstoffe alleine und in Kombination. Dabei wurden $1 \cdot 10^5$ Molt-4-Zellen in 100 μl Medium per Well verwendet. (b) EC₅₀-Werte aus der Device Methode generiert mit Molt-4-Zellen. Die Zelldichte lag bei $7,5 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μl Kollagen, überschichtet mit 200 μl Medium. (c) EC₅₀-Werte aus der Device Methode generiert mit KG1a-Zellen. Die Zelldichte war die selbe wie bei (b). Die Fehlerbalken stammen aus der Mittelwertbildung der Ergebnisse aus mehreren Versuchstagen.

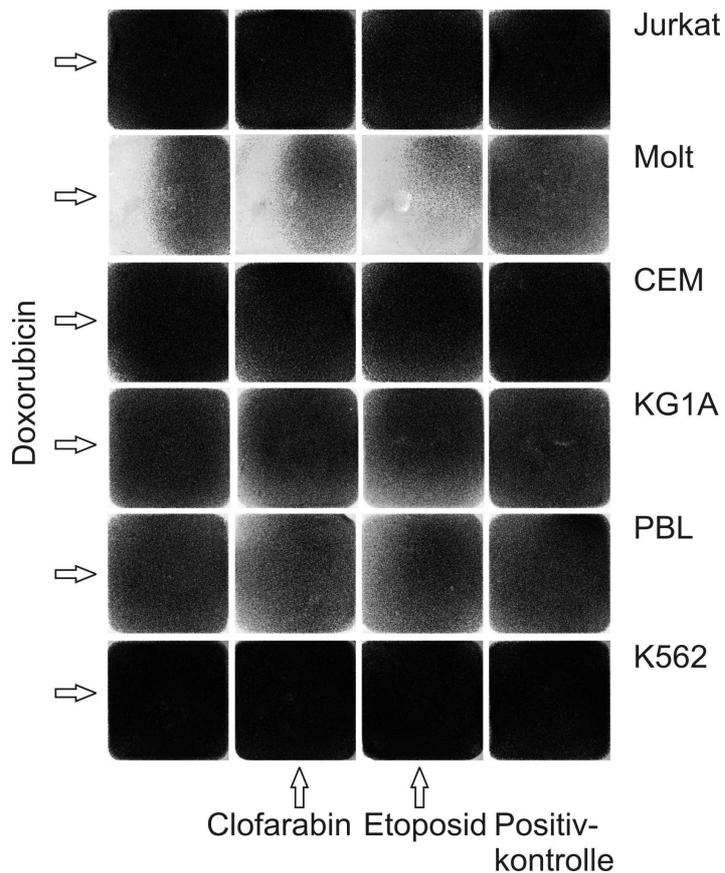


Abb. 4.25: Vergleich von Dosis-Wirkungs-Profilen von 6 Leukämie Zelllinien

in einem Experiment generiert. Die Positivkontrollen (ganz rechts) wurden ohne Wirkstoffe inkubiert. Von unten diffundierten Clofarabin oder Etoposid und von links diffundierte Doxorubicin in die Testfläche. Für jedes Experiment betrug die Zelldichte $7,5 \cdot 10^5$ Zellen/100 μ l. Gezeigt sind die MTT Umsetzungen.

Unterschiedliche Sensitivitäten der verschiedenen Zelllinien, gegen die angewandten Wirkstoffe konnten eindeutig belegt werden. Aber auch unterschiedliche Wirkprofile, wie zum Beispiel zwischen Molt 4 Zellen und KG1a-Zellen konnten erkannt werden. Die Unterschiede zwischen den Wirkungsprofilen von Molt 4- und KG1a Zellen sind in Abb. 4.26 mit einzelnen 3D-Dosis-Wirkungsprofilen hervorgehoben. Hieraus wurde ersichtlich, dass in KG1a Zellen die Sensitivität gegenüber Doxorubicin generell geringer ist. Gegen Clofarabin und Etoposid hingegen war die Sensitivität bei Molt-4 Zellen vergleichbar oder stärker. Dieser Unterschied lässt sich auch in Abb. 4.24 ablesen. Ebenfalls konnte erkannt werden, dass die EC_{50} -Werte im Vergleich zu Molt-4 Zellen bei den KG1a Zellen nur halb so groß sind. Die EC_{50} -Werte für Clofarabin blieben jedoch konstant. Das Verhältnis der Wirkstoffsensitivitäten von

Molt-4- zu KG1a Zellen erfährt somit eine Verschiebung von Doxorubicin zu den beiden anderen Wirkstoffen. Die EC_{50} -Werte für Etoposid stellten sich von Versuchtag zu Versuchstag heterogener dar und zeigen in manchen Versuchen eine Verschiebung der Sensitivitäten von Doxorubicin zu Etoposid.

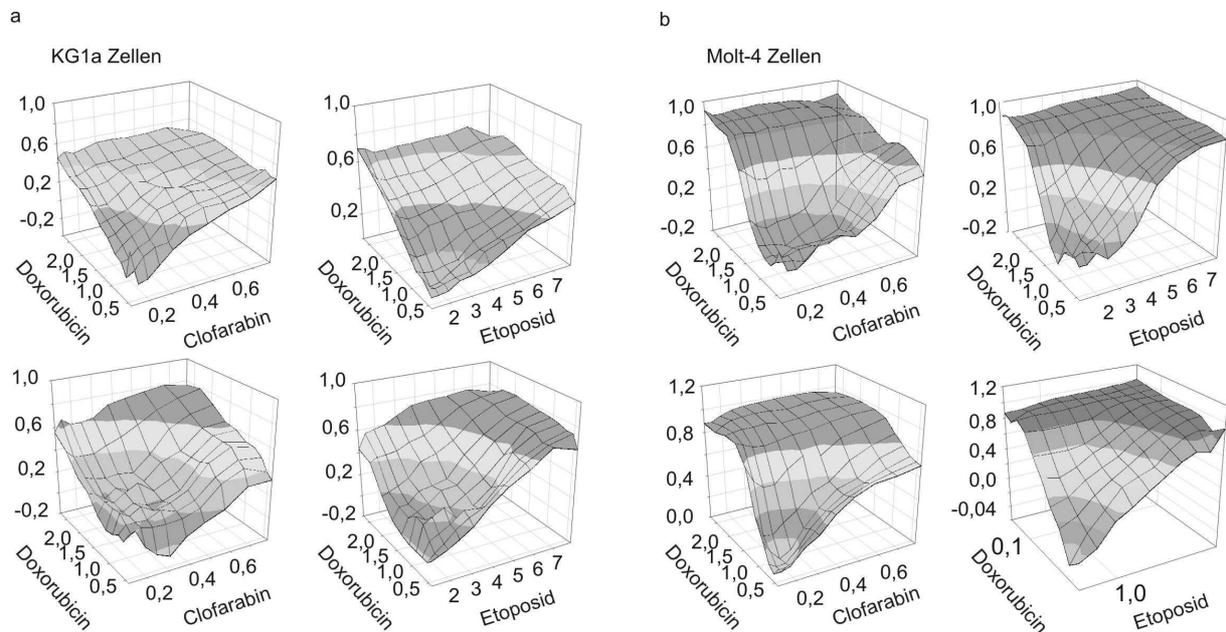


Abb. 4.26: Vergleich der 3D-Dosis-Wirkungsprofile von KG1a- und Molt-4 Zellen

a) Wirkprofile der KG1a Zellen mit Doxorubicin/Clofarabin und Doxorubicin/ Etoposide. b) Die selben Wirkstoffkombinationen bei Molt-4-Zellen eingesetzt. Pro Device wurden $7,5 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Die Inkubationszeit der Wirkstoffe betrug 16 h.

Durch die Möglichkeit mit dem Diffusion Device, Dosis-Wirkungsprofile von Wirkstoffkombinationen aus unterschiedlichen Zelltypen zu erhalten, soll die Anwendung des Diffusion Device Fortschritte erbringen, eine patientenspezifische Therapie so früh wie möglich zu optimieren.

Zur Feststellung von Synergie, Antagonismus oder Additivität können die Ergebnisse auch zur Berechnung von Kombinationsindices verwendet werden. In Abb. 4.27 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Kombinationsindices (CI) nach Chou wiedergegeben (Chou 2006; Chou & Talalay 1984). EC_{50} -Werte für Abb. 4.24 entstammen ebenfalls diesen Berechnungen, da die EC_{50} -Werte für die Berechnung der Kombinationsindices benötigt werden. Die Kombinationsindices wurden für die Ergebnisse der Mikrotiterplatten-Experimente und der Diffusion Device-Experimente

berechnet. Ein von Chou empfohlenes Klassifikationssystem schlägt vor, Werte von 0,9–1,0 als additiv anzusehen, 1,1–1,2 als leicht antagonistisch, 1,2–1,45 als moderate antagonistisch, 1,45–3,3 als antagonistisch, 3,3–10 als stark antagonistisch und größer 10 als sehr stark antagonistisch. In der entgegengesetzten Richtung sind Werte zwischen 0,9–0,85 leicht synergistisch, 0,85–0,7 moderate synergistisch, 0,7–0,3 synergistisch, 0,3–0,1 stark synergistisch und Werte unter 0,1 sehr stark synergistisch.

In den Experimenten mit Mikrotiterplatten wurde ganz klar ein Unterschied zwischen der Kombination aus Doxorubicin und Etoposid zu den Kombinationen Doxorubicin und Clofarabin, oder Clofarabin und Etoposid ersichtlich. Während sich „Doxo-Eto“ immer um den Wert 1, also additiv befindet, tendierte die Kombinationen „Doxo-Clof“ dazu, aus stark antagonistischen Bereichen für kleine Effekte auf moderat antagonistische Werte für große Effekte zu fallen. Die CI-Diagramme aus den Diffusion Device Experimenten für die Molt-4-Zellen entsprechen denen der Mikrotiterplatten-Experimente. Die CI-Werte für „Doxo-Eto“ verliefen im Unterschied zu den Mikrotiterplatten generierten CI-Werten aber in moderat antagonistischen Bereichen. Die Kurve für „Doxo-Clof“ endet im antagonistischen Bereich. Die CI-Werte für „Doxo-Clof“ und „Doxo-Eto“, welche auf KG1a Zellen getestet wurden, zeigen keine wesentlichen Unterschiede auf. Sie verlaufen leicht abfallend in antagonistischen Bereichen.

Eine weitere Herausforderung, der sich der Diffusion Device in der patientenspezifischen Diagnostik ebenfalls stellen muss, ist die geringe Vitalität von primärem Krebszellen in der Zellkultur. Ziel war es aufzuzeigen, dass primäre Leukämiezellen ebenfalls im Diffusion Device getestet werden können.

Während der Experimente mit primären Krebszellen wurde erkannt, dass eine größere Anzahl von Zellen benötigt wird als bei den bisherigen Versuchen. Dies könnte auf einer geringeren metabolischen Aktivität von Leukämiezellen ex-vivo zurückzuführen sein (Savitskiy, Shman, & Potapnev 2003).

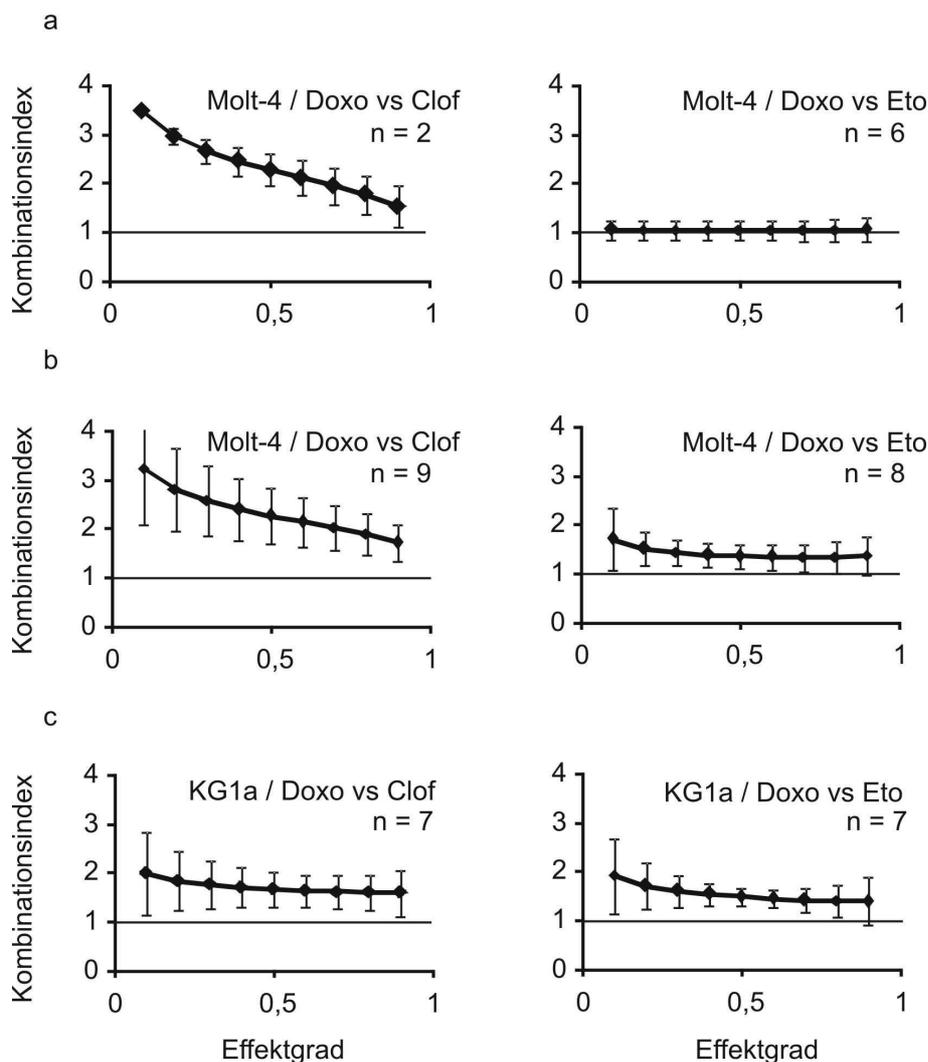


Abb. 4.27: Kombinationsindices für Mikrotiterplatten- und Diffusion Device-Experimente

- (a) Kombinationsindices für Molt-4-Zellen in Mikrotiterplatten Experimenten.
- (b) Kombinationsindices für Molt-4-Zellen in Diffusion Device Experimenten.
- (c) Kombinationsindices für KG1a-Zellen in Diffusion Device Experimenten. (n = Anzahl gemittelter, an verschiedenen Tagen ausgeführter, Experimente).

Ein weiterer Unterschied, der eine größere Zellzahl erfordern kann, ist die geringe Größe der primären Leukämiezellen im Vergleich zu den bisher verwendeten Zelllinien. Von den Zellisolaten wurden daher pro Device $3 \cdot 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{l}$ Kollagen, im Gegensatz zu $7,5 \cdot 10^5$ bei den Zelllinien verwendet. Das Zellvolumen pro Device relativiert sich dabei durch die geringere Größe der Leukämiezellen. Schließlich konnten auch bei Primärzellen klare Antwortgradienten nach 16 h Inkubationszeit erhalten werden, die durch eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Doxorubicin entstanden sind (Abb. 4.28).

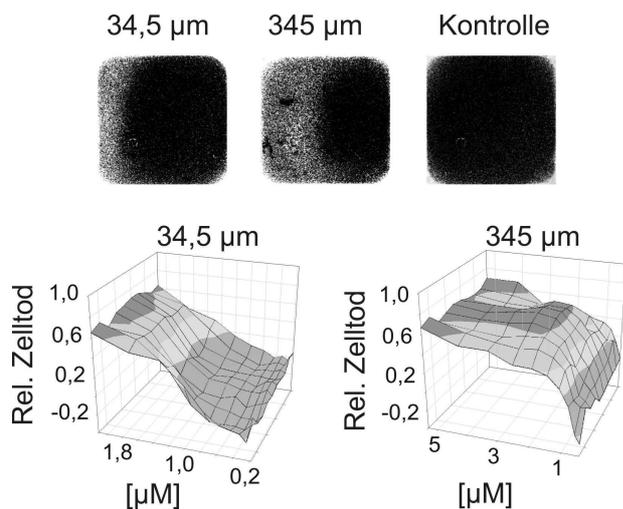


Abb. 4.28 Testung von primären Krebszellen im Diffusion Device

Oben: Intensitätsgradienten der MTT-Färbung mit der Startkonzentration 34,5 und 345 μM und der Positivkontrolle. Unten: Dosis-Wirkungsdiagramme nach der Analyse der oben gezeigten Bilder. Die daraus nach der Methode von Chou generierten EC_{50} -Werte sind $1,82 \pm 0,15 \mu\text{M}$ ($n=4$ aus verschiedenen Versuchstagen).

4.2. Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die T-Zell-Signaltransduktion bei unterschiedlicher Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern

Zellen in ihrer natürlichen Umgebung sind gleichzeitig einer Vielzahl von verschiedenen Signalen ausgesetzt. Diese Signale werden in der Zelle in physiologisch bedeutende Ergebnisse verarbeitet. T-Zellen reagieren je nach Stimulus, Differenzierungs- und Aktivierungsgrad und der zellulären Umgebung mit Proliferation, Anergie oder Apoptose (Healy & Goodnow 1998). In der Wirkstofftestung ist es bisher selten, dass Zellen mit kombinierten Signalen und vor allem unterschiedlichen Ratios von Kombinationen getestet werden. Ein Beispiel für eine veränderte Wirkung eines Immunsuppressors unter variierenden kostimulatorischen Bedingungen wurde von Freebern et al. aufgezeigt (Freebern et al. 2005; Slavik et al. 2001). Köhler et al. testete Inhibitoren von Schlüsselmolekülen innerhalb der T-Zell-Signaltransduktion, unter Anwendung unterschiedlicher Stimulusverhältnisse mittels Mikroarraytechnik (Köhler et al. 2008). Als Stimulus der T-Zellen diente die Aktivierung von TCR/CD3 und dem Korezeptor CD28 über anti-CD3 und anti-CD28 stimulatorische Antikörper (Acuto & Michel 2003). Die Ausleseparameter der Mikroarrayanwendungen waren

die NFAT-Translokation und der Grad der Zellausbreitung mittels Immunfluoreszenz. Um mit zusätzlichen Daten die Mikroarrayergebnisse zu ergänzen, wurden IL-2-Expressionsstudien unter vier unterschiedlichen Antikörper-Stimulationsverhältnissen angefertigt. Mittels ELISA wurde die IL-2 Ausschüttung nach unterschiedlicher Stimulation mit anti-CD3 anti-CD28 Antikörpern (CD3 alleine; CD28 alleine; 1:1; 1:0,25 und 0,25:1) und unter Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren verfolgt. Für die CD3-Stimulierung alleine gab es lediglich sehr geringe IL-2 Ausschüttungen zu beobachten. Für die CD28-Stimulierung alleine wurde keine IL-2 Ausschüttung verzeichnet. Diese Stimulationsbedingung wurde deswegen bei weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt. Die Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern in der jeweils höchsten Konzentration ergab in allen Versuchen den größten Wert der IL-2 Ausschüttung. Zur Erzielung eines maximalen Effekts wurde übereinstimmend mit den Mikroarray-Ausleseverfahren der Aktin-Reorganisation und der NFAT-Translokation ermittelt, dass hohe Dosen von anti-CD28 Antikörper eine zum Teil wichtigere Rolle spielen als hohe Dosen von anti-CD3 Antikörpern. Die verwendeten Inhibitoren umfassen etablierte Inhibitoren der Up- und Downstream T-Zell-Signaltransduktionsprozesse, die zum Aktivieren des Transkriptionsfaktors NFAT führen. PP2 ist ein Inhibitor der frühen T-Zell-Signaltransduktion mit der Src-Tyrosinkinase Lck als Wirkziel (Hanke, Gardner, Dow, Changelian, Brissette, Weringer, Pollok, & Connelly 1996). Alsterpaullone inhibiert die Glycogen-Synthase-3 (GSK-3), kann aber auch mit fünfmal höherem IC_{50} -Wert Lck inhibieren (Leost et al. 2000). GSK-3 ist ein Gegenspieler der Phosphatase Calcineurin, welche eine wichtige Rolle in der NFAT-Translokation spielt. Calcineurin dephosphoryliert NFAT und ermöglicht den Import in den Zellkern. SB203480 und ML3403 sind als potente Inhibitoren der MAP-Kinase p38 beschrieben (Cuenda et al. 1995; Kammerer et al. 2007). Die MAP-Kinase p38 sorgt zum einen durch Phosphorylierung von NFAT für den Export aus dem Zellkern und zum anderen führt p38 mit der Expression von NFAT zu NFAT-vermittelten Transkriptionsprozessen. Ciclosporin und FK506, beides Immunsuppressoren, inhibieren indirekt über so genannte Immophiline die Phosphatase Calcineurin (Ho et al. 1996). Ciclosporin und FK506 sowie SB203480 und ML3403 inhibierten die IL-2 Ausschüttung in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 4.29 (a)(b)(f)(g)). Alsterpaullonekonzentrationen von 0,5 μ M potenzieren die IL-2 Ausschüttung und reduzierten die

Unterschiede der verschiedenen Stimulationsbedingungen. Bei 10 μM war die IL-2 Ausschüttung komplett inhibiert. Ein unerwartetes Ergebnis wurde mit der Anwendung von PP2 erhalten. Hier zeigte sich, dass ein Inhibitor je nach Stimulierungsbedingung unterschiedliche IL-2 Expressionsverläufe verursachen kann. Bei Stimulationsverhältnissen anti-CD3 zu anti-CD28 von 1:0,25 und CD3 alleine zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der IL-2 Ausschüttung. Bei den Verhältnissen 1:1 und 0,25:1, also bei einer höheren Konzentration von CD28 wurde die IL-2 Ausschüttung von 0,1-1 μM potentiert. Bei Tests mit frisch isolierten naiven CD4^+ Zellen zeigte sich ebenfalls der Unterschied zwischen den unterschiedlichen Stimuliverhältnissen, jedoch ohne die Potentierung bei höheren anti-CD28 Antikörperkonzentrationen.

In weiteren Versuchsreihen wurde eine Reihe von zugelassenen oder sich momentan in klinischen Phasen befindenden Kinaseinhibitoren auf die selbe Art und Weise getestet (Abb. 4.30). Bei diesen Versuchen wurden nur die Stimulationsverhältnisse anti-CD3 zu anti-CD28 Antikörper 1:1 und 1:0,25 berücksichtigt, da in den vorangegangenen Versuchen, für diese Bedingungen die deutlichsten Unterschiede erhalten wurden.

Sorafenib inhibiert die IL-2 Expression ab ca. 0,5 μM nach einer Potenzierung des IL-2 Signals um ca. 70-80 % in konzentrationsabhängiger Weise. Sorafenib wurde als Inhibitor der MAP-Kinase Raf1 entwickelt. Mittlerweile ist bekannt, dass Sorafenib auch Rezeptor-Tyrosinkinasen inhibiert, welche eine Rolle bei der Tumorentwicklung und der Angiogenese eine Rolle spielt (Strumberg et al. 2007; Wilhelm et al. 2004). MEK1-Inhibitor und PD (Inhibitoren im MAP-Kinase Weg (MEK1) zeigen eine starke konzentrationsabhängige Abnahme des IL-2 Signals bei 0,5 μM bzw. 0,05 μM . Doramapimod ist ebenfalls ein p38 Kinaseinhibitor (Yasui et al. 2007), welcher aber in Jurkat Zellen bis zu einer Konzentration von 50 μM keine Inhibition der IL-2 Ausschüttung zeigte.

Imatinib, ein Inhibitor der Abl Kinase bzw. der oncogenen Version BCR-ABL (Hunter 2007), zeigte keine Inhibition in der IL-2 Ausschüttung bis zur Konzentration von 5 μM . Seggewiss et al. konnte darstellen, dass die IL-2 Expression bei einer Konzentration von 10 μM in frisch isolierten T-Zellen nahezu vollständig inhibiert werden kann (Seggewiss et al. 2005). Da Imatinib vor allem Abl Kinasen, PDGFR-Tyrosinkinasen und c-Kit inhibiert (Hunter 2007) und die immunsuppressive Wirkung

von Imatinib noch unter Diskussion steht (Wolf et al. 2007), kann davon ausgegangen werden, keine IL-2 Inhibierung zu erhalten.

Der Aurorakinaseinhibitor VX 680, welcher eine mutierte Form der BCR-ABL-Kinase (T315I), die gegen Imatinib und Dasatinib resistent ist, inhibiert (Wisniewski et al. 2002), verminderte nach leichter Potentierung im Gegensatz zu Gleevec die IL-2 Produktion ab 0,05 μM in konzentrationsabhängiger Weise.

Canertinib, ein Inhibitor von ErbB Rezeptorkinasen (Calvo et al. 2004) zeigte eine stark inhibierende Wirkung auf die IL-2 Ausschüttung bei 5 μM . Auch Gefinitib, ebenfalls ein Inhibitor von EGF-Rezeptorkinasen (Ponz-Sarvise et al. 2007) zeigte inhibitorische Eigenschaften bei 5 μM , aber nicht in dem starken Maße wie Canertinib. Erlotinib dagegen, welches den EGFR Typ 1 inhibiert, zeigte keine Inhibition bis 5 μM .

Sunitinib ist als Inhibitor von VEGFR, PDGFR und c-Kit beschrieben (Abrams et al. 2003a; Mendel et al. 2003). Sunitinib hemmte in den durchgeführten Experimenten die IL-2 Ausschüttung ab 0,05 μM in konzentrationsabhängiger Weise. SU6688 besitzt ein ähnliches Kinasespektrum zeigte keine Wirkung bis 5 μM .

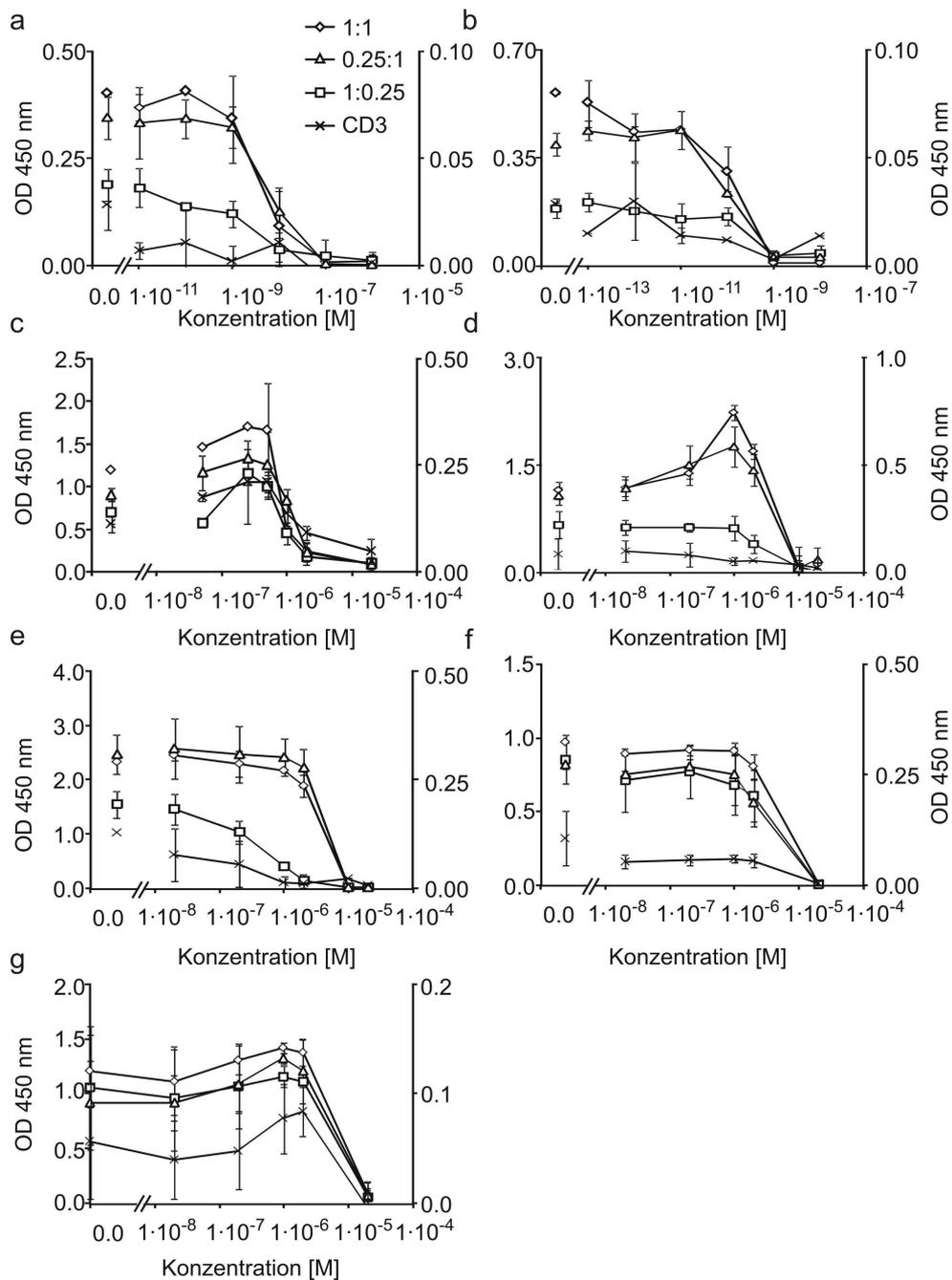


Abb. 4.29: Stimulusabhängigkeit der IL-2 Expression – Test von Inhibitoren der NFAT-Aktivierung in der T-Zell-Signaltransduktion

Jurkat Zellen waren mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern mit und ohne (a) Ciclosporin, (b) FK506, (c) Alsterpaullone und (d, e) PP2, (f) ML 3403 und (g) SB 203480 in den angezeigten Verhältnissen stimuliert worden. Bei (e) wurden die PP2 Experimente mit frisch aufgereinigten primären CD4+ Zellen durchgeführt. Die IL-2 Expression wurde mit der ELISA-Methode gemessen. Die Primärachse stellt die IL-2 Werte dar, die mit den Verhältnissen anti-CD3/CD28 Antikörpern von 1:1; 1:0,25 und 0,25:1 erhalten wurden. Die Sekundärachse bezieht sich auf anti-CD3.

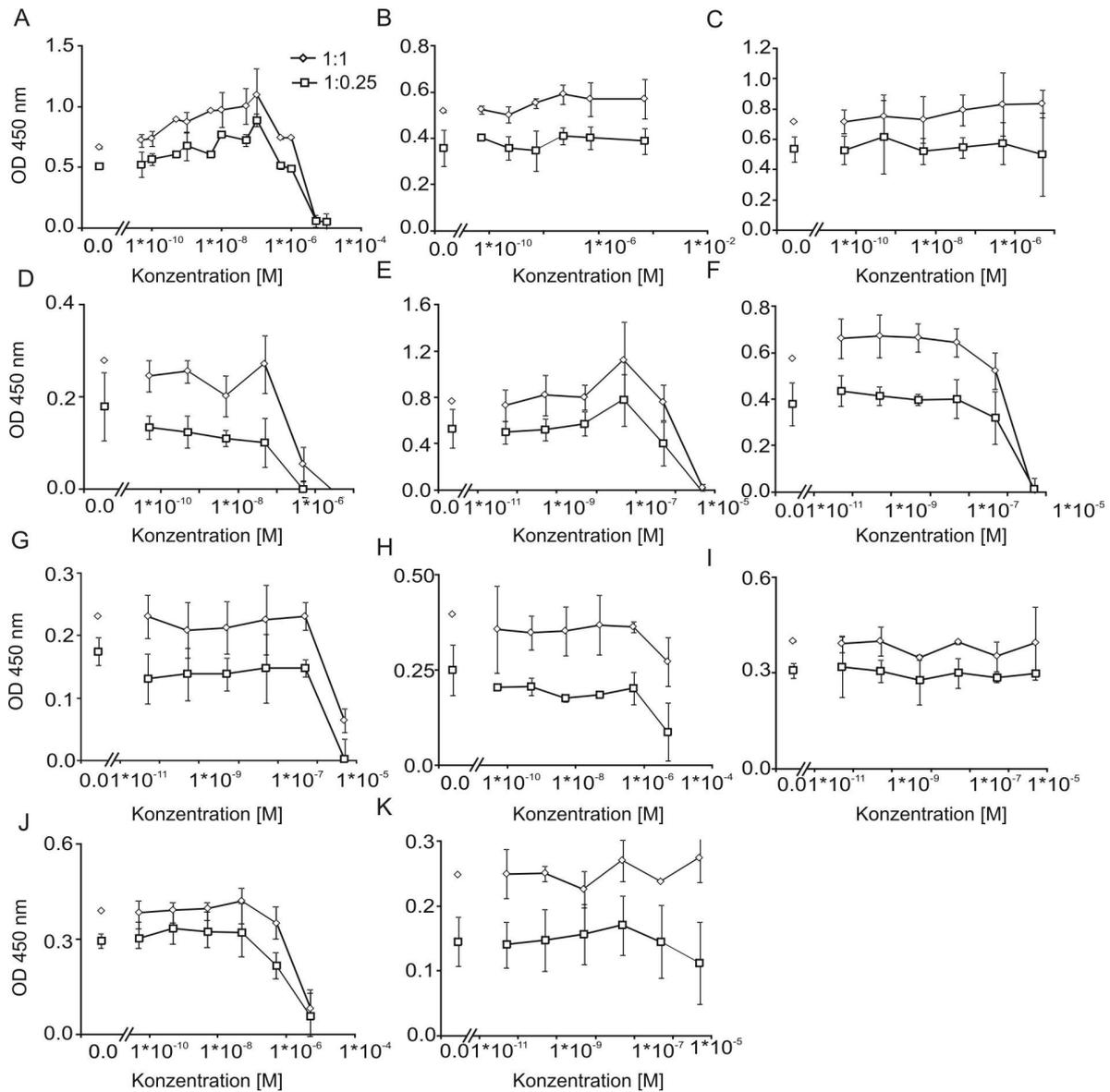


Abb. 4.30: Stimulusabhängigkeit der IL-2 Expression – Test verschiedener pharmakologischer Kinaseinhibitoren

Jurkat Zellen sind mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern mit und ohne (a) Sorafenib (Nexavar, Bay 439006), (b) Doramapimod (Birb 796), (c) Gleevec (Imatinib, STI 571) (d) MEK1 Inhibitor (e) PD, (f) VX 680 (MK-0457), (g) Canertinib (CI 1033, PD183805) (h) Gefinitib (Iressa, ZD 1839), (i) Erlotinib (Tarceva, Osi 774), (j) Sutent (Sunitinib, SU 11248), (k) SU 6688 mit den angezeigten Ratios stimuliert worden.

5. Zusammenfassung und Fazit

5.1 Diffusion Device

Die Implementierung eines fluoreszenzbasierten Apoptosenachweises und eines MTT-Zytotoxizitätstests in den Diffusion Device ist gelungen. Mit dem Apoptosenachweis konnten reproduzierbare und qualitativ auswertbare Antwortprofile für zwei Zelllinien generiert werden. Für quantitative Aussagen müssen entsprechende Positivkontrollen entwickelt werden.

Experimente ergaben, dass Molt-4-Zellen sensitiver gegenüber Doxorubicin reagieren als Jurkat-Zellen. Auch zeichnete sich ab, dass die Wirkstoffe Methotrexat und Paclitaxel innerhalb der gewählten Inkubationsdauer eine potentierende Wirkung auf Doxorubicin ausüben. Die zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnisse, welche beim Einsatz von Methotrexat und Paclitaxel entstanden, könnten mit dem Wirkmechanismus dieser Substanzen erklärt werden, der erst mit einsetzender Proliferation einer Zelle zum Tragen kommt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Zellen sich teilweise von Versuch zu Versuch in ihrem Proliferationsverhalten unterscheiden. Gründe hierfür können die Kultivierungsbedingungen der Zellen vor der Einbettung, sowie Unterschiede bei der Vorbereitung der Kollagenmatrix sein. Eine Erweiterung des Ausleseverfahrens besteht daher in der Optimierung einer besseren Vergleichbarkeit der Zellproliferation innerhalb der Diffusion Device Methode. Zusätzlich könnten neben Kollagen auch andere Biogele getestet werden.

Der MTT-Test ist eine effektive Methode, den Diffusion Device zu nutzen. Mit nur wenigen Stunden Arbeitszeit und einer Standard-Laboraausstattung, konnten 3D-Wirkprofile erstellt, Zelltypen verglichen und Wirkstoffkombinationen auf Synergie, Antagonismus und Additivität untersucht werden. Mit dem in den Diffusion Device implementierten MTT-Test ist es möglich, quantitative Aussagen über die Wirksamkeit einer Wirkstoffkombination zu bilden. Bei Vergleichen von Diffusion Device zu Experimenten in Mikrotiterplatten wurden starke Unterschiede in der Wirkung von Clofarabin beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass das Diffusionsverhalten von Clofarabin von dem des Doxorubicin abweicht. In diesem Fall wären die Voraussagen für den Konzentrationsverlauf von Clofarabin nicht zutreffend und würden die starken Abweichungen erklären. Die aus den Quantifizierungen bestimmten EC_{50} -Werte liegen 2–14-mal höher als in den Experimenten in Mikrotiterplatten. Das kann

zum einen an der Methode zur Bestimmung der gewichteten Mittelwerte liegen, welche aus den simulierten Konzentrationsverläufen von Doxorubicin bestimmt wurden. Zum anderen wurde experimentell bestimmt, dass eine hohe Zelldichte und die Einbettung in das Kollagengel die Empfindlichkeit von Zellen gegen Doxorubicin erniedrigt. Für den Wirkstoff Doxorubicin, dessen EC_{50} -Wert 14-mal höher liegt als bei der Standardmethode würde, unter Einbeziehung der 7,5fach höheren Zelldichte und der Einbettung in Kollagen, der EC_{50} -Wert bei 0,7 des Wertes der Standardmethode liegen. Bei der gleichen Betrachtungsweise für Clofarabin und Etoposide würden sich die Werte 0,1 bzw. 0,32 ergeben. Dies würde bedeuten, dass die EC_{50} -Werte, die mit dem Diffusion Device ermittelt wurden, unter Einbeziehung von Zelldichte und Kollageneinbettung unter denen der Standardmethode liegen würden.

Die der Ergebnisse aus dem Diffusion Device konnten ebenfalls zur Untersuchung des Zusammenspiels der Wirkstoffe im Sinne von Additivität, Synergie und Antagonismus dienen. Es wurde beobachtet, dass die 3D-Antwortprofile aus Diffusion Device und Mikrotiterplatte vergleichbar waren. Bei der Auftragung der CI-Werte waren für Molt-4 Zellen in Mikrotiterplatte und Diffusion Device die selben Verläufe zu erkennen. In den Experimenten mit Mikrotiterplatten wurden über die Experimentiertage gesehen gleichmäßigere und stabilere Dosis-Wirkungskurven ermittelt. Da vor Beginn der experimentellen Arbeiten nicht abzusehen war, welcher Art spätere Auswertungen sein werden, konnten für die Berechnung der CI-Werte in den Diffusion Devices meist nicht die Wirkungskurven einer Substanz alleine in die Berechnungen einbezogen werden. Stattdessen wurden die Kurven, welche die am wenigsten von einer zweiten Substanz beeinflusst wurden, herangezogen. Bei einer Inkubationszeit von 16 h nähert sich die Konzentration einer Substanz am Ende der Testfläche aber ohnehin dem Wert Null. Es könnte eine Untersuchung angestellt werden, in wie weit dieses Vorgehen das Ergebnis der Diffusion Device Methode beeinflusst.

Eine Stärke des implementierten MTT-Tests, besteht in der Einfachheit, welche es ermöglicht, mehrere Kombinationen in kurzer Zeit zu testen. So konnten 6 Zelllinien in einer Doppelbestimmung mit drei verschiedenen Wirkstoffkombinationen und jeweiliger Kontrolle in zwei Tagen mit wenigen Stunden Aufwand getestet werden. Auch konnten Unterschiede zwischen den Zelllinien Molt-4 und KG1a aus in ihren

3D-Dosis-Wirkungsprofilen, EC_{50} -Werten und den CI-Diagrammen ermittelt werden. Nach den hier beobachteten Resultaten, würde keine der Kombinationen einen entscheidenden Behandlungsvorteil bringen. Keine Wirkstoffkombination konnte den Effekt des einen oder anderen Wirkstoffes in einer synergistischen Art und Weise potenzieren. Systematische in-vitro Untersuchungen der Kombinationen von Doxorubicin/Clofarabin und Doxorubicin/ Etoposide wurden in der Literatur nicht beschrieben. Daten aus klinischen Untersuchungen sind ebenfalls nicht mit den hier generierten Daten vergleichbar.

Primäre Zellisolate konnten mit dem MTT-Ausleseverfahren ebenfalls im Diffusion Device getestet werden. Es wurden dazu mehr Zellen pro Test benötigt, was an der geringeren metabolischen Aktivität und dem kleineren Volumen der primären Zellen im Vergleich zu den Zelllinien liegt. Für die Zellisolate wurden EC_{50} -Werte berechnet, welche im Bereich der KG1a Zellen lagen. Die Beobachtung aus den Apoptosetests, dass Jurkat Zellen weniger sensitiv gegen eine chemotherapeutische Intervention reagieren, wurde in den MTT-Experimenten bestätigt. Der Apoptosenachweis scheint sogar sensitiver bezüglich einer Zellantwort zu sein als der MTT-Test. Dieser konnte im Gegensatz zum Apoptosenachweis bei $3,45 \mu\text{M}$ Doxorubicin kein Wirkprofil bei Jurkat Zellen detektieren. Das spricht dafür, in der Zukunft verschiedene in-vitro Tests im Diffusion Device zu kombinieren. Dadurch könnte ein größerer Informationsgehalt aus den Diffusion Device Experimenten gewonnen, oder mehrere Fragestellungen mit einem Kombinationsexperiment adressiert werden.

Problematisch ist die Anwendung des Diffusion Device, bei Wirkstoffen, mit einer langen Wirkdauer. Hier verursacht die während des Experiments kontinuierlich fortschreitende Diffusion, dass die Konzentrationsunterschiede immer geringer werden, bis am Ende keine mehr vorhanden sind. In diesem Fall wird die Angabe einer effektiven Konzentration oder eines gewichteten Mittelwertes und somit auch eine Quantifizierung immer schwieriger. Daher muss ein in-vitro Test gefunden werden, der eine Wirkung früh genug erkennen kann. Auch die These, ob sich die Zellen an den zeitlichen Gradienten, „erinnern“, ist konzentrationsabhängig nicht ohne weiteres darstellbar.

Das „Stoppen“ des Gradienten, beispielsweise durch Aufteilen der Diffusionsmatrix zu einer bestimmten Inkubationszeit, bildet eine Möglichkeit Zelltests mit fixen Konzentrationen durchführen zu können. In dem Fall, dass die Diffusionsmatrix in 10

× 10 Teile getrennt wird - was pro Stück ca. 1 µl entspräche - könnte mit wenigen µl Inkubationsvolumen pro Konzentration, ein Schritt in Richtung Erweiterung des Konzentrationsbereichs, mit unveränderlichen Konzentrationen im Diffusion Device erreicht werden. Mit den Berechnungen des gewichteten Mittelwertes wird momentan ein Bereich von einer Größenordnung überspannt. Aber selbst wenn mehrere Devices benötigt werden, um größere Konzentrationsbereiche zu überspannen, würden die Pipettierschritte im Vergleich zu Mikrotiterplatten minimal bleiben.

Es können grundsätzlich alle in-vitro Zelltests in den Diffusion Device implementiert werden, so lange sie auf bildgebende Fluoreszenz (zum Beispiel GFP-Reporter-system, Caspaseaktivität, fluoreszente Liganden, Immunfluoreszenz, fluoreszente Lebed/Tod Farbstoffe), Lumineszenz (zum Beispiel Luciferaseassay) oder kolorimetrischen (zum Beispiel MTT, WST, Sulphorhodamin, Trypanblau) Verfahren basieren. Es ist prinzipiell auch möglich, einzelne Zellen, nach der Einwirkung eines Substanzgradienten zu untersuchen, da dass sie umgebene Kollagengel manipulierbar ist. So kann das Kollagengel zusammen mit den darin fixierten Zellen aus dem Device genommen, bearbeitet und untersucht werden. Beim Einsatz eines Mikroskops sind dabei Vergrößerungen bis zur Einzelzelluntersuchung möglich. Die Einbettung der Zellen in ein Hydrogel wie Kollagen eines ist, eröffnet dabei ein ganzes Spektrum neuer Möglichkeiten. So können mit dieser Methode auch Sensitivitäten von Krebszellen in verschiedenen Mikroumgebungen getestet werden. In zukünftigen Anwendungen des Diffusion Device ist es sicherlich lohnend, in die Untersuchung von Hydrogelen zu investieren, um Wirkstoffe unter physiologisch vergleichbareren Bedingungen testen zu können.

Im Sinne der in dieser Arbeit beschriebenen Mikrosysteme ordnet sich der Diffusion Device zwischen die traditionellen und den flussverminderten Gradientenbildnern ein. Ein Nachteil des Diffusion Device ist dabei der während des Bioassays fortlaufende Gradient, der es erschwert Zellantworten diskreten Konzentrationen zuzuordnen. An dieser Stelle könnten aber, durch im Vergleich zu den Pipettierschlitzten große Auffangreservoirs, stabilisierende Maßnahmen getroffen werden.

Vorteilig ist, dass der Diffusion Device ohne aufwendige Aufbauten reproduzierbare Gradienten, über eine für einen Bioassay einfach zugängliche Fläche, bilden kann. Die Zellen können in dreidimensionalen Matrices inkubiert werden und haben im Normalfall keine Limitationen in der Nährstoffzufuhr. Das Wegschwemmen von

sekundären Botenstoffen ist nicht gegeben. Die orthogonale Überlagerung zweier Diffusionen, bietet darüber hinaus eine bisher einzigartige Möglichkeit in der Anwendung von diffusionsgenerierten Gradienten, Wirkstoffe in Kombinationsexperimenten auf ihre Wirksamkeit zu testen.

5.2 Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die T-Zell-Signaltransduktion bei unterschiedlicher Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern

Die Ergebnisse der pharmakologischen Tyrosinkinaseinhibitoren, welche zusätzlich zur Arbeit von Kohler et al. getestet wurden, zeigten für keine Substanz einen stimulusabhängigen, inhibitorischen Effekt.

Zu erwähnen sind die unterschiedlichen inhibitorischen Potentiale der Kinaseinhibitoren mit ähnlichem Kinasespektrum. So hatte zum Beispiel Sorafenib einen klaren inhibitorischen Effekt auf die IL-2 Expression (Abb. 4.29 (a)) während Doramapimop in dem gleichen Konzentrationsbereich keinen Effekt zeigte (Abb. 4.29 (b)). Beide Substanzen sind bekannt für ihre inhibitorische Wirkung auf Kinasen der MAP-Kinase-Kaskade.

Sunitinib konnte eine inhibitorische Wirkung auf die IL-2 Expression in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.29 (j)), wohingegen das strukturell verwandte Molekül SU6688, mit dem gleichen beschriebenen Wirkspektrum wiederum keine Effekte zeigt. Beide Substanzen sind Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen der VEGFR- und PDGFR-Familie.

Die inhibitorischen Effekte von Canertinib und Gefinitib sind unerwartet, da T-Zellen keine EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass diese Inhibitoren noch weitere Kinasen inhibieren können, die einen Einfluss auf die IL-2 Expression haben. Erlotinib zeigte wie erwartet keinen inhibitorischen Effekt.

Die potenzierende Wirkung von Sorafenib, bestätigte Beobachtungen von Kogkopoulou et al., welche eine Heraufregulierung von IL-2 über ERK 1/2 bei Inhibition von p38 unter schwachen Stimulationsbedingungen zeigten (Kogkopoulou et al. 2006).

In Tab. 5.1. sind einige Literatur IC_{50} -Werte aus zellfreien und zellbasierten in-vitro Tests aufgelistet. Vergleiche zwischen diesen Werten und den hier gezeigten Ergebnissen sind zum Teil schwierig, weil es sich zum einen um nicht zellbasierte Tests handelt und zum anderen andere Zelltypen zu Grunde liegen.

Tab. 5.1: IC_{50} -Literaturwerte einiger der verwendeten Kinaseinhibitoren

Kinaseinhibitor	IC_{50}-Wert	Testsystem	Literaturstelle
Sorafenib	5 nM	In-vitro (Raf-1)	(Wilhelm et al. 2004)
	580 nM > 10 μ M 2,6 μ M	In-vitro (FGFR-1) In-vitro (ERK-1) Zellproliferation (MDA MB 231)	
Doramapimod	280 nM	Zellproliferation (PDGF-BB HAoSMC)	(Branger et al. 2002)
	330 fach höhere Selektivität als 12 andere p38 Inhibitoren	In-vitro (Kinase Bindeverhalten und Phosphorylierung)	
Imatinib	2-3 μ M	Zellproliferation (BCR-ABL positive Imatinib resistente Zellen)	(Carter et al. 2005)
	2,2 nM	In-vitro (ABL-Kinase)	(Schindler et al. 2000)
VX680	0,48 μ M	Zellwachstum (KBM5, BCR-ABL positiv)	(Golemovic et al. 2005)
	25–125 nM	Zellwachstum und Apoptose (ATC-Zelllinien)	(Arlot-Bonnemains et al. 2008)
Canertinib	0,6, 18 und 4,6 nM	In-vitro (Aurorakinase A,B und C)	(Wang 2007)
	8,4 nM 0,8 nM	In-vitro (ERBB2) In-vitro (EGFR)	(Allen et al. 2002)
Gefinitib	0,1 μ M über 72 h	Zellproliferation 53 % inhibiert (Caco-2)	(Skvortsov et al. 2005)
	2,1 nM	In-vitro (EGFR)	(Wakeling et al. 2002)
Erlotinib	8,8 μ M	Zellwachstum in Abwesenheit von EGF	(Moyer et al. 1997)
	54 nM	In Anwesenheit von EGF	
Sunitinib	2,7 nM	In-vitro (EGFR)	(Abrams et al. 2003)
Sunitinib	2 nM	Zellteilung (SCF induziert in NCI H526 Zellen)	(Abrams et al. 2003)
	1-10 nM	KIT-Phosphorylierung	

Die Sorafenib-Ergebnisse liegen im Bereich der Literaturangaben. Das kann bedeuten, dass Sorafenib Kinasen inhibiert, welche für die Proliferation und für die Expression von IL-2 wichtig sind. Für Dorapimod konnte bei 2–3 μ M keine Inhibition der IL-2 Expression verzeichnet werden.

Imatinib erreicht in Zellwachstumstests mit BCR-ABL positiven Zellen einen IC₅₀-Wert von ~500 nM. Jurkat-Zellen scheinen jedoch keine, für die IL-2 Expression wichtige Kinasen zu beinhalten, die durch Imatinib bis 5 µM inhibiert werden.

Der Aurorakinaseinhibitor VX680 scheint auch in Jurkat Zellen Kinasen zu inhibieren, welche bei der IL-2 Expression von Wichtigkeit sind. Dabei sind die Konzentrationen, die zu dieser Inhibierung nötig sind, mit dem IC₅₀-Wert zur Proliferationshemmung von ATC (Anaplastic Thyroid Cancer) generierten Zelllinien vergleichbar.

Gefinitib und Sunitinib zeigten im Bereich von 5 µM bzw. 50 nM ebenfalls Potential die IL-2-Expression zu hemmen. Dies ist wiederum vergleichbar mit den Tabellenwerten. Gefinitib hat dort in Abwesenheit von EFG in zellbasierten Testverfahren einen IC₅₀-Wert von 8,8 µM. Die Abwesenheit von EGF bzw. EGFR, kann auch im Fall der Jurkat-Zellen voraus gesetzt werden. Sunitinib zeigt dagegen in zellfreien und zellbasierten Verfahren einen sehr niedrigen IC₅₀-Wert, wie es auch bei der IL-2-Inhibierung zu sehen ist.

Durch Anwendung unterschiedlicher Stimulationsverhältnisse wurden in Jurkat Zellen unterschiedlich starke Ausschüttungen für das Zytokin IL-2 verursacht. Die Stimulation mit hoher Konzentration von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern löste den höchsten Aktivierungsgrad im Sinne der IL-2 Ausschüttung aus. In Vergleich zu den Ergebnissen der NFAT-Translokation der Mikroarrayexperimente von Köhler et al. stellt dies einen Unterschied dar, da dort die höchste NFAT-Translokationsrate bei höherer anti-CD28 Antikörperkonzentration im Vergleich zu anti-CD3 Antikörperkonzentration beobachtet wurde (Kohler et al.). Dies veranschaulicht, wie wichtig auch das stöchiometrische Verhältnis der Signale ist, die von TCR/CD3 und CD28 empfangen und im Signaltransduktionsnetzwerk verarbeitet und weitergeleitet werden. TCR/CD3 und CD28 induzierte Signalwege tragen zu unterschiedlichen Anteilen zur Signalweiterleitung bei, die am IL-2 Promoter wieder zusammengeführt werden. CD28 spielt eine wichtig Rolle in der Translokation von NFAT, während die Aktivierung des IL-2 Promotors beide Signalwege gleichermaßen betrifft. Ersichtlich wurde auch, wie unzureichend die Aktivierung nur einer der beiden Rezeptoren ist.

Ein bemerkenswertes Ergebnis ist die stimulisabhängige Wirkung des Kinaseinhibitors PP2 (Abb. 4.28 (d)). Bei Konzentrationen von 0,1–1 µM des Inhibitors beobachtet man eine erhöhte IL-2 Ausschüttung bei starker Stimulierung von CD28 im Vergleich zu einer hohen Stimulierung nur von CD3. Diese Erhöhung der IL-2

Expression ist konsistent mit Beobachtungen aus siRNA Experimenten, bei denen die Herunterregulierung von Lck eine Potentierung des CD3 Signalweges hervorruft (Methi et al. 2005). Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu Lck defizienten Jurkat Zellen, bei denen die IL-2 Ausschüttung komplett inhibiert war. Methi et al. konnten während ihrer Arbeiten nicht feststellen, ob diese Beobachtung aus dem Umstand der unvollständigen Herunterregelung von Lck herrührten, oder ob die Lck negativen Zellen noch weitere Defizite besaßen, die eine IL-2 Ausschüttung hemmten. Die hier gezeigten Ergebnisse aus der Inhibierung mit PP2 unter unterschiedlichen T-Zell-Rezeptor und CD28-Korezeptor Stimulierungsverhältnissen zeigen, dass tatsächlich stimulus- und konzentrationsabhängige Faktoren eine Rolle spielen. Die nicht übereinstimmenden Ergebnisse, sind auch ein Beispiel dafür, wie mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden können. Die Mikroarray-Arbeiten von Köhler et al. leisteten, mit der Untersuchung von unterschiedlichen anti-CD3 und -CD28 Antikörper-Stimulusverhältnissen und der Inhibierung von Schlüsselmolekülen, innerhalb der T-Zell-Signaltransduktion, einen Beitrag zur Aufklärung dieser Frage.

LITERATURVERZEICHNIS

Abhyankar, V. V., Lokuta, M. A., Huttenlocher, A., & Beebe, D. J. 2006, "Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies", *Lab Chip.*, vol. 6, no. 3, pp. 389-393.

Abraham, R. T. & Weiss, A. 2004, "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm", *Nat.Rev.Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 301-308.

Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., & Cherrington, J. M. 2003b, "SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer", *Mol.Cancer Ther.*, vol. 2, no. 5, pp. 471-478.

Acuto, O. & Michel, F. 2003, "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling", *Nat.Rev.Immunol.*, vol. 3, no. 12, pp. 939-951.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, B. J., & Walter, P. 2002a, "Histology: The Lives and Deaths of Cells in Tissues," 4 edn.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2002b, "cancer," in *Molecularr Biology of the Cell*, 4 edn.

Allen, L. F., Lenehan, P. F., Eiseman, I. A., Elliott, W. L., & Fry, D. W. 2002, "Potential benefits of the irreversible pan-erbB inhibitor, CI-1033, in the treatment of breast cancer", *Semin.Oncol.*, vol. 29, no. 3 Suppl 11, pp. 11-21.

Arlot-Bonnemains, Y., Baldini, E., Martin, B., Delcros, J. G., Toller, M., Curcio, F., Ambesi-Impiombato, F. S., D'Armiento, M., & Ulisse, S. 2008, "Effects of the Aurora kinase inhibitor VX-680 on anaplastic thyroid cancer-derived cell lines", *Endocr.Relat Cancer*, vol. 15, no. 2, pp. 559-568.

Ashwell, J. D. 2006, "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system", *Nat.Rev.Immunol.*, vol. 6, no. 7, pp. 532-540.

ATCC - Zelllinienbank. ATCC - Zelllinienbank. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/> . 2008.

Ref Type: Electronic Citation

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., & Cohen, P. 2003, "The specificities of protein kinase inhibitors: an update", *Biochem.J.*, vol. 371, no. Pt 1, pp. 199-204.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevvernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R., & Cohen, P. 2007, "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update", *Biochem.J.*, vol. 408, no. 3, pp. 297-315.

Batzler, W. U., Giersiepen, K., Hentschel, S., Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Kieschke, J., Kraywinkel, K., Meyer, M., Stabenow, R., Stegmaier, C., Bertz, J.,

Haberland, J., & Wolf, U. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2008.pdf> [6]. 2008. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

Behar, T. N., Schaffner, A. E., Colton, C. A., Somogyi, R., Olah, Z., Lehel, C., & Barker, J. L. 1994, "GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons", *J.Neurosci.*, vol. 14, no. 1, pp. 29-38.

Bijian, K., Zhang, L., & Shen, S. H. 2007, "Collagen-mediated survival signaling is modulated by CD45 in Jurkat T cells", *Mol.Immunol.*, vol. 44, no. 15, pp. 3682-3690.

Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. 2004, "Cancer immunotherapy: a treatment for the masses", *Science*, vol. 305, no. 5681, pp. 200-205.

Blume-Jensen, P. & Hunter, T. 2001, "Oncogenic kinase signalling", *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 355-365.

Borisy, A. A., Elliott, P. J., Hurst, N. W., Lee, M. S., Lehar, J., Price, E. R., Serbedzija, G., Zimmermann, G. R., Foley, M. A., Stockwell, B. R., & Keith, C. T. 2003, "Systematic discovery of multicomponent therapeutics", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 100, no. 13, pp. 7977-7982.

Boyden, S. 1962, "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes", *J.Exp.Med.*, vol. 115, pp. 453-466.

Branger, J., van den, B. B., Weijer, S., Madwed, J., Bos, C. L., Gupta, A., Yong, C. L., Polmar, S. H., Olszyna, D. P., Hack, C. E., van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P., & van der, P. T. 2002, "Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia", *J.Immunol.*, vol. 168, no. 8, pp. 4070-4077.

Brock, R. 2004, "Device and Method for the generation of arrays of substance mixtures by diffusion", European Patent, EP 1434992

Brown, R. 1828, "A brief account of microscopic observations", *Phil.Mag*, vol. 4, no. 161.

Bundesministerium für Bildung und Forschung. Definition Mikrosystemtechnik. <http://www.mstonline.de/mikrosystemtechnik/grundlagen> . 2008.

Ref Type: Electronic Citation

BURCHENAL, J. H., MURPHY, M. L., Ellison, R. R., SYKES, M. P., TAN, T. C., LEONE, L. A., KARNOFSKY, D. A., CRAVER, L. F., DARGEON, H. W., & Rhoades, C. P. 1953, "Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases", *Blood*, vol. 8, no. 11, pp. 965-999.

BURCHENAL, J. H. & RHOADS, C. P. 1954, "Clinical evaluation of 6-mercaptopurine in the treatment of leukemia", *Trans.Assoc.Am.Physicians*, vol. 67, pp. 268-275.

Byrd, J. C., Stilgenbauer, S., & Flinn, I. W. 2004, "Chronic lymphocytic leukemia", *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* pp. 163-183.

Cabrera, C. R. & Yager, P. 2001, "Continuous concentration of bacteria in a microfluidic flow cell using electrokinetic techniques", *Electrophoresis*, vol. 22, no. 2, pp. 355-362.

Calvo, E., Tolcher, A. W., Hammond, L. A., Patnaik, A., de Bono, J. S., Eiseman, I. A., Olson, S. C., Lenehan, P. F., McCreery, H., Lorusso, P., & Rowinsky, E. K. 2004, "Administration of CI-1033, an irreversible pan-erbB tyrosine kinase inhibitor, is feasible on a 7-day on, 7-day off schedule: a phase I pharmacokinetic and food effect study", *Clin.Cancer Res.*, vol. 10, no. 21, pp. 7112-7120.

CancerQuest.org. Leukemia. <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=4325> . 2008.

Carter, T. A., Wodicka, L. M., Shah, N. P., Velasco, A. M., Fabian, M. A., Treiber, D. K., Milanov, Z. V., Atteridge, C. E., Biggs, W. H., III, Edeen, P. T., Floyd, M., Ford, J. M., Grotzfeld, R. M., Herrgard, S., Insko, D. E., Mehta, S. A., Patel, H. K., Pao, W., Sawyers, C. L., Varmus, H., Zarrinkar, P. P., & Lockhart, D. J. 2005, "Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 102, no. 31, pp. 11011-11016.

Chou, T. C. 2006, "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies", *Pharmacol.Rev.*, vol. 58, no. 3, pp. 621-681.

Chou, T. C. & Talalay, P. 1984, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Adv.Enzyme Regul.*, vol. 22, pp. 27-55.

Chuang, R. Y. & Chuang, L. F. 1979, "Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase II activity by adriamycin", *Biochemistry*, vol. 18, no. 10, pp. 2069-2073.

Chung, B. G., Flanagan, L. A., Rhee, S. W., Schwartz, P. H., Lee, A. P., Monuki, E. S., & Jeon, N. L. 2005, "Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device", *Lab Chip.*, vol. 5, no. 4, pp. 401-406.

Chung, B. G., Lin, F., & Jeon, N. L. 2006, "A microfluidic multi-injector for gradient generation", *Lab Chip.*, vol. 6, no. 6, pp. 764-768.

Cohen, P. 1999, "The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors", *Curr.Opin.Chem.Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 459-465.

Cohen, P. 2002, "Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 1, no. 4, pp. 309-315.

Collins, I. & Workman, P. 2006, "New approaches to molecular cancer therapeutics", *Nat.Chem.Biol.*, vol. 2, no. 12, pp. 689-700.

Colvin, M. 2003, "Alkylating Agents and Platinum Antitumor Compounds," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Holland & Frei, eds., BC Decker.

Cooper, G. M. 2000, "Cell Regulation," Second Edition edn, Sinauer Associates Inc..

Crabtree, G. R. & Olson, E. N. 2002, "NFAT signaling: choreographing the social lives of cells", *Cell*, vol. 109 Suppl, p. S67-S79.

Crank, J. 1956, *The Mathematics of Diffusion*, First Edition edn, Oxford University Press, Amen House, London.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. 1995, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B", *Nature*, vol. 378, no. 6559, pp. 785-789.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., & Lee, J. C. 1995, "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1", *FEBS Lett.*, vol. 364, no. 2, pp. 229-233.

Cunningham, M. J. 2000, "Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development", *J.Pharmacol.Toxicol.Methods*, vol. 44, no. 1, pp. 291-300.

D'Achille, P., Seymour, J. F., & Campbell, L. J. 2006, "Translocation (14;18)(q32;q21) in acute lymphoblastic leukemia: a study of 12 cases and review of the literature", *Cancer Genet.Cytogenet.*, vol. 171, no. 1, pp. 52-56.

de la Torres, Jr., Hopker, V. H., Ming, G. L., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., & Holt, C. E. 1997a, "Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC", *Neuron*, vol. 19, no. 6, pp. 1211-1224.

DeBonis, S., Skoufias, D. A., Lebeau, L., Lopez, R., Robin, G., Margolis, R. L., Wade, R. H., & Kozielski, F. 2004, "In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimetabolic and antitumor activities", *Mol.Cancer Ther.*, vol. 3, no. 9, pp. 1079-1090.

Dehghani, Z. A., Seveau, S., Halbwachs-Mecarelli, L., & Keller, H. U. 2003, "Chemotactically-induced redistribution of CD43 as related to polarity and locomotion of human polymorphonuclear leucocytes", *Biol.Cell*, vol. 95, no. 5, pp. 265-273.

Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Michel, B., & Biebuyck, H. 1997, "Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks", *Science*, vol. 276, no. 5313, pp. 779-781.

DePaola, N., Phelps, J. E., Florez, L., Keese, C. R., Minnear, F. L., Giaever, I., & Vincent, P. 2001, "Electrical impedance of cultured endothelium under fluid flow", *Ann.Biomed.Eng*, vol. 29, no. 8, pp. 648-656.

Dertinger, S. K., Jiang, X., Li, Z., Murthy, V. N., & Whitesides, G. M. 2002, "Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 99, no. 20, pp. 12542-12547.

Deschler, B. & Lubbert, M. 2006, "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology", *Cancer*, vol. 107, no. 9, pp. 2099-2107.

Diao, J., Young, L., Kim, S., Fogarty, E. A., Heilman, S. M., Zhou, P., Shuler, M. L., Wu, M., & DeLisa, M. P. 2006, "A three-channel microfluidic device for generating static linear gradients and its application to the quantitative analysis of bacterial chemotaxis", *Lab Chip.*, vol. 6, no. 3, pp. 381-388.

Dodeller, F. & Schulze-Koops, H. 2006, "The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells", *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. 2, p. 205.

Downing, J. R. & Mullighan, C. G. 2006, "Tumor-specific genetic lesions and their influence on therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia", *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program*. pp. 118-22, 508.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
<http://www.dsmz.de/index.htm> . 2008.

Dunstan, H. M., Ludlow, C., Goehle, S., Cronk, M., Szankasi, P., Evans, D. R., Simon, J. A., & Lamb, J. R. 2002, "Cell-based assays for identification of novel double-strand break-inducing agents", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 94, no. 2, pp. 88-94.

Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A. M., Vilmer, E., Otten, J., & Philippe, N. 2002, "Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial", *Blood*, vol. 99, no. 8, pp. 2734-2739.

Eckhardt, S. G., Baker, S. D., Britten, C. D., Hidalgo, M., Siu, L., Hammond, L. A., Villalona-Calero, M. A., Felton, S., Drengler, R., Kuhn, J. G., Clark, G. M., Smith, S. L., MacDonald, J. R., Smith, C., Moczygemba, J., Weitman, S., Von Hoff, D. D., & Rowinsky, E. K. 2000, "Phase I and pharmacokinetic study of irifulven, a novel mushroom-derived cytotoxin, administered for five consecutive days every four weeks in patients with advanced solid malignancies", *J.Clin.Oncol.*, vol. 18, no. 24, pp. 4086-4097.

Einstein, A. 1905, "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen", *Annalen der Physik*, vol. 17, no. 549, p. 12.

Fick, A. 1855, "Über Diffusion", *Annalen der Physik*, vol. 94, no. 170.

Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M. A. 2007, "The common biology of cancer and ageing", *Nature*, vol. 448, no. 7155, pp. 767-774.

Finlay, G. J., Baguley, B. C., & Wilson, W. R. 1984, "A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells", *Anal.Biochem.*, vol. 139, no. 2, pp. 272-277.

Finlay, G. J., Wilson, W. R., & Baguley, B. C. 1986, "Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukaemia cell lines", *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, vol. 22, no. 6, pp. 655-662.

Fireman, M., DiMartini, A. F., Armstrong, S. C., & Cozza, K. L. 2004, "Immunosuppressants", *Psychosomatics*, vol. 45, no. 4, pp. 354-360.

Fleury, M. E., Boardman, K. C., & Swartz, M. A. 2006, "Autologous morphogen gradients by subtle interstitial flow and matrix interactions", *Biophys.J.*, vol. 91, no. 1, pp. 113-121.

Fosser, K. A. & Nuzzo, R. G. 2003, "Fabrication of patterned multicomponent protein gradients and gradient arrays using microfluidic depletion", *Anal.Chem.*, vol. 75, no. 21, pp. 5775-5782.

Fourier, J. B. Theorie analytique de la chaleur. Theorie analytique de la chaleur . 1822.

Ref Type: Pamphlet

Foxman, E. F., Campbell, J. J., & Butcher, E. C. 1997, "Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis", *J.Cell Biol.*, vol. 139, no. 5, pp. 1349-1360.

Frame, S. & Cohen, P. 2001, "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery", *Biochem.J*, vol. 359, no. Pt 1, pp. 1-16.

Freebern, W. J., Haggerty, C. M., Montano, I., McNutt, M. C., Collins, I., Graham, A., Chandramouli, G. V., Stewart, D. H., Biebuyck, H. A., Taub, D. D., & Gardner, K. 2005, "Pharmacologic profiling of transcriptional targets deciphers promoter logic", *Pharmacogenomics.J.*, vol. 5, no. 5, pp. 305-323.

Frevert, C. W., Boggy, G., Keenan, T. M., & Folch, A. 2006, "Measurement of cell migration in response to an evolving radial chemokine gradient triggered by a microvalve", *Lab Chip.*, vol. 6, no. 7, pp. 849-856.

Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., & Zanker, K. S. 1998, "CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion", *Eur.J Immunol.*, vol. 28, no. 8, pp. 2331-2343.

Friedl, P., Noble, P. B., & Zanker, K. S. 1995, "T lymphocyte locomotion in a three-dimensional collagen matrix. Expression and function of cell adhesion molecules", *J Immunol.*, vol. 154, no. 10, pp. 4973-4985.

Frisk, T., Rydholm, S., Liebmann, T., Svahn, H. A., Stemme, G., & Brismar, H. 2007, "A microfluidic device for parallel 3-D cell cultures in asymmetric environments", *Electrophoresis*, vol. 28, no. 24, pp. 4705-4712.

Fujii, S., Uematsu, M., Yabuki, S., Abo, M., Yoshimura, E., & Sato, K. 2006, "Microbioassay system for an anti-cancer agent test using animal cells on a microfluidic gradient mixer", *Anal.Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 87-90.

Gillissen, G. 1954, "[The agar diffusion test (hole test as routine procedure).]", *Zentralbl.Bakteriol.[Orig.]*, vol. 161, no. 7-8, pp. 482-490.

Glover, C. J., Hite, K., DeLosh, R., Scudiero, D. A., Fivash, M. J., Smith, L. R., Fisher, R. J., Wu, J. W., Shi, Y., Kipp, R. A., McLendon, G. L., Sausville, E. A., & Shoemaker, R. H. 2003, "A high-throughput screen for identification of molecular mimics of Smac/DIABLO utilizing a fluorescence polarization assay", *Anal.Biochem.*, vol. 320, no. 2, pp. 157-169.

Godard, T., Deslandes, E., Sichel, F., Poul, J. M., & Gauduchon, P. 2002, "Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay", *Mutat.Res.*, vol. 520, no. 1-2, pp. 47-56.

Goentoro, L. A., Reeves, G. T., Kowal, C. P., Martinelli, L., Schupbach, T., & Shvartsman, S. Y. 2006, "Quantifying the Gurken morphogen gradient in *Drosophila* oogenesis", *Dev.Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 263-272.

Golemovic, M., Verstovsek, S., Giles, F., Cortes, J., Manshouri, T., Manley, P. W., Mestan, J., Dugan, M., Alland, L., Griffin, J. D., Arlinghaus, R. B., Sun, T., Kantarjian, H., & Beran, M. 2005, "AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia", *Clin.Cancer Res.*, vol. 11, no. 13, pp. 4941-4947.

Gonzalez-Nicolini, V. & Fussenegger, M. 2005, "In vitro assays for anticancer drug discovery--a novel approach based on engineered mammalian cell lines", *Anticancer Drugs*, vol. 16, no. 3, pp. 223-228.

Grabenbauer, G. G., Buchfelder, M., Schrell, U., Fahlbusch, R., Sauer, R., & Staab, H. J. 1999, "Topotecan as a 21-day continuous infusion with accelerated 3D-conformal radiation therapy for patients with glioblastoma", *Front Radiat.Ther.Oncol.*, vol. 33, pp. 364-368.

Gregor, T., Bialek, W., de Ruyter van Steveninck RR, Tank, D. W., & Wieschaus, E. F. 2005, "Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 102, no. 51, pp. 18403-18407.

Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., & Navia, M. A. 1995, "X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex", *Cell*, vol. 82, no. 3, pp. 507-522.

- Gunawan, R. C., Silvestre, J., Gaskins, H. R., Kenis, P. J., & Leckband, D. E. 2006, "Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins", *Langmuir*, vol. 22, no. 9, pp. 4250-4258.
- Gundersen, R. W. & Barrett, J. N. 1979, "Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor", *Science*, vol. 206, no. 4422, pp. 1079-1080.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000, "The hallmarks of cancer", *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70.
- Haney, S. A., LaPan, P., Pan, J., & Zhang, J. 2006, "High-content screening moves to the front of the line", *Drug Discov. Today*, vol. 11, no. 19-20, pp. 889-894.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., & Connelly, P. A. 1996, "Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation", *J.Biol.Chem.*, vol. 271, no. 2, pp. 695-701.
- Hansen, R. L., Zhu, L. X., & Harris, R. L. 1998, "Fluorescence Correlation Spectroscopy with Patterned Photoexcitation for Measuring Solution Diffusion Coefficients of Robust Fluorophores", *Anal.Chem.*, vol. 70, pp. 1281-1287.
- Hatch, A., Kamholz, A. E., Hawkins, K. R., Munson, M. S., Schilling, E. A., Weigl, B. H., & Yager, P. 2001, "A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor", *Nat.Biotechnol.*, vol. 19, no. 5, pp. 461-465.
- Healy, J. I. & Goodnow, C. C. 1998, "Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors", *Annu.Rev.Immunol.*, vol. 16, pp. 645-670.
- Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., & Kubes, P. 2002, "An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients", *J.Cell Biol.*, vol. 159, no. 1, pp. 91-102.
- Henze, G., Buchmann, S., Fengler, R., & Hartmann, R. 1987, "The BFM relapse studies in childhood ALL: concepts of two multicenter trials and results after 2 1/2 years", *Haematol.Blood Transfus.*, vol. 30, pp. 147-155.
- Ho, S., Clipstone, N., Timmermann, L., Northrop, J., Graef, I., Fiorentino, D., Nourse, J., & Crabtree, G. R. 1996, "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506", *Clin Immunol.Immunopathol.*, vol. 80, no. 3 Pt 2, p. S40-S45.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E., & Moss, P. A. H. 2006, *Essential Haematology*, 5th Edition edn, Blackwell Publishing Oxford.
- Holdorf, A. D., Green, J. M., Levin, S. D., Denny, M. F., Straus, D. B., Link, V., Changelian, P. S., Allen, P. M., & Shaw, A. S. 1999, "Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation", *J.Exp.Med.*, vol. 190, no. 3, pp. 375-384.

Höll, F. Die Fickschen Diffusionsgesetze. http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/mw1_ge/kap_6/backbone/r6_2_2.html . 2008.

Huennekens, F. M. 1994, "The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents", *Adv.Enzyme Regul.*, vol. 34, pp. 397-419.

Humphries, A. & Wright, N. A. 2008, "Colonic crypt organization and tumorigenesis", *Nat.Rev.Cancer*, vol. 8, no. 6, pp. 415-424.

Hunter, T. 2007, "Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib", *J.Clin.Invest*, vol. 117, no. 8, pp. 2036-2043.

Irimia, D., Geba, D. A., & Toner, M. 2006, "Universal microfluidic gradient generator", *Anal.Chem.*, vol. 78, no. 10, pp. 3472-3477.

Jabbour, E., Cortes, J. E., Ghanem, H., O'Brien, S., & Kantarjian, H. M. 2008, "Targeted therapy in chronic myeloid leukemia", *Expert.Rev.Anticancer Ther.*, vol. 8, no. 1, pp. 99-110.

Jagani, Z. & Khosravi-Far, R. 2008, "Cancer stem cells and impaired apoptosis", *Adv.Exp.Med.Biol.*, vol. 615, pp. 331-344.

Janeway, C. R., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. 2001a, " Signaling Through Immune System Receptors," in *Immunobiology*, 5 edn, Garland Publishing, New York.

Janeway, C. R., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. 2001b, "T Cell Mediated Immunity," 5 edn.

Janeway, C. R., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. 2001c, "The humoral Immune Response," 5 edn.

Kamen, B. A., Cole, P. D., & Bertino, J. R. 2003, "Folate Antagonists," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Holland & Frei, eds., BC Decker.

Kamholz, A. E., Weigl, B. H., Finlayson, B. A., & Yager, P. 1999, "Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: the T-sensor", *Anal.Chem.*, vol. 71, no. 23, pp. 5340-5347.

Kammerer, B., Scheible, H., Albrecht, W., Gleiter, C. H., & Laufer, S. 2007, "Pharmacokinetics of ML3403 ({4-[5-(4-fluorophenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-(1-phenylethyl)-amine), a 4-Pyridinylimidazole-type p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor", *Drug Metab Dispos.*, vol. 35, no. 6, pp. 875-883.

Kane, L. P. & Weiss, A. 2003, "The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3", *Immunol.Rev.*, vol. 192, pp. 7-20.

Kantarjian, H. M., Jeha, S., Gandhi, V., Wess, M., & Faderl, S. 2007, "Clofarabine: past, present, and future", *Leuk Lymphoma*, vol. 48, no. 10, pp. 1922-1930.

- Kärger, J., Grinberg, F., & Heitjans, P. 2005, *Diffusion Fundamentals*, 1 edn, Leipziger Universitätsverlag.
- Karukstis, K. K., Thompson, E. H., Whiles, J. A., & Rosenfeld, R. J. 1998, "Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin", *Biophys.Chem.*, vol. 73, no. 3, pp. 249-263.
- Kaufmann, R. M. & Anderson, K. C. 2003, "Hematologic Complications and Blood Bank Support," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Holland & Frei, eds., BC Decker.
- Kavalerchik, E., Goff, D., & Jamieson, C. H. 2008, "Chronic myeloid leukemia stem cells", *J.Clin.Oncol.*, vol. 26, no. 17, pp. 2911-2915.
- Keenan, T. M. & Folch, A. 2008, "Biomolecular gradients in cell culture systems", *Lab Chip.*, vol. 8, no. 1, pp. 34-57.
- Keenan, T. M., Hsu, C. H., & Folch, A. 2006, "Microfluidic "jets" for generating steady state gradients of soluble molecules on open surfaces", *Appl.Phys.Lett.*, vol. 89, no. 11.
- Keith, C. T., Borisy, A. A., & Stockwell, B. R. 2005, "Multicomponent therapeutics for networked systems", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 4, no. 1, pp. 71-78.
- Kelly, M., Hwang, J. M., & Kubes, P. 2007, "Modulating leukocyte recruitment in inflammation", *J.Allergy Clin.Immunol.*, vol. 120, no. 1, pp. 3-10.
- Kim, M. S., Yeon, J. H., & Park, J. K. 2007, "A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays", *Biomed.Microdevices.*, vol. 9, no. 1, pp. 25-34.
- Kimby, E., Nygren, P., & Glimelius, B. 2001, "A systematic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukaemia", *Acta Oncol.*, vol. 40, no. 2-3, pp. 231-252.
- Koch, W. H. 2004, "Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 3, no. 9, pp. 749-761.
- Koeffler, H. P. & Golde, D. W. 1980, "Human myeloid leukemia cell lines: a review", *Blood*, vol. 56, no. 3, pp. 344-350.
- Kogkopoulou, O., Tzakos, E., Mavrothalassitis, G., Baldari, C. T., Paliogianni, F., Young, H. A., & Thyphronitis, G. 2006, "Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk1/2 activity", *J Leukoc.Biol*, vol. 79, no. 5, pp. 1052-1060.
- Kohler, K., Ganser, A., Andre, T., Roth, G., Grosse-Hovest, L., Jung, G., & Brock, R. 2008, "Stimulus dependence of the action of small-molecule inhibitors in the CD3/CD28 signalling network", *ChemMedChem.*, vol. 3, no. 9, pp. 1404-1411.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. 1994, "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis", *Blood*, vol. 84, no. 5, pp. 1415-1420.

Korycka, A., Lech-Maranda, E., & Robak, T. 2008, "Novel purine nucleoside analogues for hematological malignancies", *Recent Patents.Anticancer Drug Discov.*, vol. 3, no. 2, pp. 123-126.

Labille, J., Fatin-Rouge, N., & Buffle, J. 2007, "Local and average diffusion of nanosolutes in agarose gel: the effect of the gel/solution interface structure", *Langmuir*, vol. 23, no. 4, pp. 2083-2090.

Lee, J. K., Havaleshko, D. M., Cho, H., Weinstein, J. N., Kaldjian, E. P., Karpovich, J., Grimshaw, A., & Theodorescu, D. 2007a, "A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 104, no. 32, pp. 13086-13091.

Lee, P. J., Gaige, T. A., Ghorashian, N., & Hung, P. J. 2007b, "Microfluidic tissue model for live cell screening", *Biotechnol.Prog.*, vol. 23, no. 4, pp. 946-951.

Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C., & Meijer, L. 2000, "Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25", *Eur.J.Biochem.*, vol. 267, no. 19, pp. 5983-5994.

Li, C. W., Chen, R., & Yang, M. 2007, "Generation of linear and non-linear concentration gradients along microfluidic channel by microtunnel controlled stepwise addition of sample solution", *Lab Chip.*, vol. 7, no. 10, pp. 1371-1373.

Li, J. N., Baskaran, H., Dertinger, S. K., Whitesides, G. M., Van de, W. L., & Toner, M. 2002, "Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device", *Nat.Biotechnol.*, vol. 20, no. 8, pp. 826-830.

Liu, S., Bo, L., Liu, X., Li, C., Qin, S., & Wang, J. 2004, "IGH gene involvement in two cases of acute lymphoblastic leukemia with t(14;14)(q11;q32) identified by sequential R-banding and fluorescence in situ hybridization", *Cancer Genet.Cytogenet.*, vol. 152, no. 2, pp. 141-145.

Liu, Y., Witte, S., Liu, Y. C., Doyle, M., Elly, C., & Altman, A. 2000, "Regulation of protein kinase Ctheta function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation", *J.Biol.Chem.*, vol. 275, no. 5, pp. 3603-3609.

Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. 2007, "The biology of cancer stem cells", *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, vol. 23, pp. 675-699.

LOEWE, S. 1928, *Egern.Physiol.*, vol. 27, pp. 47-187.

LOEWE, S. 1953, "The problem of synergism and antagonism of combined drugs", *Arzneimittelforschung.*, vol. 3, no. 6, pp. 285-290.

Macounova, K., Cabrera, C. R., & Yager, P. 2001, "Concentration and separation of proteins in microfluidic channels on the basis of transverse IEF", *Anal.Chem.*, vol. 73, no. 7, pp. 1627-1633.

Maffia, A. M., III, Kariv, I., I, & Oldenburg, K. R. 1999, "Miniaturization of a Mammalian Cell-Based Assay: Luciferase Reporter Gene Readout in a 3 Microliter 1536-Well Plate", *J.Biomol.Screen.*, vol. 4, no. 3, pp. 137-142.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. 2002, "The protein kinase complement of the human genome", *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912-1934.

Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Carver, J., Chan, E., Moss, K. G., Haznedar, J. O., Sukbuntherng, J., Blake, R. A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G., & Cherrington, J. M. 2003, "In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship", *Clin.Cancer Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 327-337.

Methi, T., Ngai, J., Mahic, M., Amarzguioui, M., Vang, T., & Tasken, K. 2005, "Short-interfering RNA-mediated Lck knockdown results in augmented downstream T cell responses", *J Immunol.*, vol. 175, no. 11, pp. 7398-7406.

Meyers Lexikonverlag. Leukämie.

<http://lexikon.meyers.de/index.php?title=Leuk%C3%A4mie&oldid=182431> . 2007.

Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG.

Meyers, J., Craig, J., & Odde, D. J. 2006, "Potential for control of signaling pathways via cell size and shape", *Curr.Biol*, vol. 16, no. 17, pp. 1685-1693.

MICAD (Molecular Imaging and Contrast Agent Database). MICAD (Molecular Imaging and Contrast Agent Database). <http://micad.nih.gov> . 2006.

Ref Type: Electronic Citation

Mikrosystemtechnik Baden-Württemberg. Mikrosystemtechnik.

<http://www.mstbw.de/de/mst/mstbw/mikrosys/index.html> . 2008.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., & . 1991, "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 83, no. 11, pp. 757-766.

Mosadegh, B., Huang, C., Park, J. W., Shin, H. S., Chung, B. G., Hwang, S. K., Lee, K. H., Kim, H. J., Brody, J., & Jeon, N. L. 2007a, "Generation of stable complex gradients across two-dimensional surfaces and three-dimensional gels", *Langmuir*, vol. 23, no. 22, pp. 10910-10912.

Mosmann, T. 1983, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J.Immunol.Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.

Moyer, J. D., Barbacci, E. G., Iwata, K. K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M. J., Moyer, M. P., Neveu, M., Pollack, V. A., Pustilnik, L. R., Reynolds, M. M., Sloan, D., Theleman, A., & Miller, P. 1997, "Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase", *Cancer Res.*, vol. 57, no. 21, pp. 4838-4848.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., & Zlotnik, A. 2001, "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis", *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 50-56.

Muller, I., Jenner, A., Bruchelt, G., Niethammer, D., & Halliwell, B. 1997, "Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage", *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 230, no. 2, pp. 254-257.

Mustelin, T., Rahmouni, S., Bottini, N., & Alonso, A. 2003, "Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation", *Immunol.Rev.*, vol. 191, pp. 139-147.

Nagami, K., Kawashima, Y., Kuno, H., Kemi, M., & Matsumoto, H. 2002, "In vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils", *J.Toxicol.Sci.*, vol. 27, no. 3, pp. 191-203.

National Cancer Institute. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultALL/HealthProfessional/page2> . 2008a.

National Cancer Institute. Leukemia. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/leukemia> . 2008b.

National Cancer Institute. PDQ (Physician Data Query). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq> . 2008c.

NOWELL, P. C. 1962, "The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia", *Blut*, vol. 8, pp. 65-66.

Padmanabhan, S., Ravella, S., Curiel, T., & Giles, F. 2008, "Current status of therapy for chronic myeloid leukemia: a review of drug development", *Future.Oncol.*, vol. 4, no. 3, pp. 359-377.

Palacios, E. H. & Weiss, A. 2004, "Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation", *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7990-8000.

Paliwal, S., Iglesias, P. A., Campbell, K., Hilioti, Z., Groisman, A., & Levchenko, A. 2007, "MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast", *Nature*, vol. 446, no. 7131, pp. 46-51.

Parekh, H. & Simpkins, H. 1997, "The transport and binding of taxol", *Gen.Pharmacol.*, vol. 29, no. 2, pp. 167-172.

Park, J. Y., Hwang, C. M., Lee, S. H., & Lee, S. H. 2007, "Gradient generation by an osmotic pump and the behavior of human mesenchymal stem cells under the fetal bovine serum concentration gradient", *Lab Chip.*, vol. 7, no. 12, pp. 1673-1680.

Pereira, D. A. & Williams, J. A. 2007, "Origin and evolution of high throughput screening", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 152, no. 1, pp. 53-61.

Perrino, F. W., Mazur, D. J., Ward, H., & Harvey, S. 1999, "Exonucleases and the incorporation of arnucleotides into DNA", *Cell Biochem.Biophys.*, vol. 30, no. 3, pp. 331-352.

Philibert, J. 2005, "One and a half century of diffusion: Fick, Einstein, before and beyond," in *Diffusion Fundamentals*, 1 edn, J. Kärgers, F. Grinberg, & P. Heitjans, eds., Leipziger Universitätsverlag, pp. 8-17.

Piccart-Gebhart, M. J. 2006, "Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer", *N.Engl.J.Med.*, vol. 354, no. 20, pp. 2177-2179.

Pitcher, L. A. & van Oers, N. S. 2003, "T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM?", *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 10, pp. 554-560.

Pizzorno, G., Diasio, R. B., & Cheng, Y. 2003, "Pyrimidine and Purine Antimetabolites," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Holland & Frei, eds., BC Decker.

Ponz-Sarvise, M., Rodriguez, J., Viudez, A., Chopitea, A., Calvo, A., Garcia-Foncillas, J., & Gil-Bazo, I. 2007, "Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new?", *World J.Gastroenterol.*, vol. 13, no. 44, pp. 5877-5887.

Pui, C. H. & Evans, W. E. 2006, "Treatment of acute lymphoblastic leukemia", *N.Engl.J.Med.*, vol. 354, no. 2, pp. 166-178.

Pui, C. H., Schrappe, M., Ribeiro, R. C., & Niemeyer, C. M. 2004, "Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia", *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* pp. 118-145.

Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., & Cortes, J. 2007, "Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 6, no. 10, pp. 834-848.

Quist, A. P., Pavlovic, E., & Oscarsson, S. 2005, "Recent advances in microcontact printing", *Anal.Bioanal.Chem.*, vol. 381, no. 3, pp. 591-600.

Ramanujan, S., Pluen, A., McKee, T. D., Brown, E. B., Boucher, Y., & Jain, R. K. 2002, "Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium", *Biophys.J.*, vol. 83, no. 3, pp. 1650-1660.

Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D. A., Selby, M., Sausville, E. A., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. 2002, "Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway", *Cancer Res.*, vol. 62, no. 15, pp. 4316-4324.

Reisch, M., Itoh, K., Lee, T., Sakurai, T., Sansen, W. M. C., & Schmitt-Landsiedel, D. 2003b, *High-frequency bipolar transistors: physics, modeling, applications* Springer Verlag.

Rosoff, W. J., McAllister, R., Esrick, M. A., Goodhill, G. J., & Urbach, J. S. 2005, "Generating controlled molecular gradients in 3D gels", *Biotechnol.Bioeng.*, vol. 91, no. 6, pp. 754-759.

Rosoff, W. J., Urbach, J. S., Esrick, M. A., McAllister, R. G., Richards, L. J., & Goodhill, G. J. 2004, "A new chemotaxis assay shows the extreme sensitivity of axons to molecular gradients", *Nat.Neurosci.*, vol. 7, no. 6, pp. 678-682.

Rowinsky, E. 2003, "Microtubule-Targeting Natural Products," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Holland & Frei, eds..

Rubin, E. H. & Hait, W. N. 2003, "Anthracyclines and DNA Intercalators/Epipodophyllotoxins/ Camptothecins/DNA Topoisomerases," in *Cancer Medicine*, 6 edn, Hollan & Frei, eds., BC Decker.

Saadi, W., Wang, S. J., Lin, F., & Jeon, N. L. 2006, "A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis", *Biomed.Microdevices.*, vol. 8, no. 2, pp. 109-118.

Sandstrom, P. A. & Buttke, T. M. 1993, "Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 90, no. 10, pp. 4708-4712.

Sausville, E. A. & Shoemaker, R. H. 2001, "Role of the National Cancer Institute in acquired immunodeficiency syndrome-related drug discovery", *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* no. 28, pp. 55-57.

Savitskiy, V. P., Shman, T. V., & Potapnev, M. P. 2003, "Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques", *Cytometry B Clin.Cytom.*, vol. 56, no. 1, pp. 16-22.

Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., & Kuriyan, J. 2000, "Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase", *Science*, vol. 289, no. 5486, pp. 1938-1942.

Schneider, H. & Rudd, C. E. 2008, "CD28 and Grb-2, relative to Gads or Grap, preferentially co-operate with Vav1 in the activation of NFAT/AP-1 transcription", *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 369, no. 2, pp. 616-621.

Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., & Kunick, C. 1999, "Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 42, no. 15, pp. 2909-2919.

Seethala, R. & Menzel, R. 1998, "A fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases", *Anal.Biochem.*, vol. 255, no. 2, pp. 257-262.

Seggewiss, R., Lore, K., Greiner, E., Magnusson, M. K., Price, D. A., Douek, D. C., Dunbar, C. E., & Wiestner, A. 2005, "Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner", *Blood*, vol. 105, no. 6, pp. 2473-2479.

Shikata, Y., Rios, A., Kawkitinarong, K., DePaola, N., Garcia, J. G., & Birukov, K. G. 2005, "Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells", *Exp.Cell Res.*, vol. 304, no. 1, pp. 40-49.

Shoemaker, R. H. 2006, "The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen", *Nat.Rev.Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 813-823.

Shoemaker, R. H., Scudiero, D. A., Melillo, G., Currens, M. J., Monks, A. P., Rabow, A. A., Covell, D. G., & Sausville, E. A. 2002, "Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery", *Curr.Top.Med.Chem.*, vol. 2, no. 3, pp. 229-246.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. 1990, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 82, no. 13, pp. 1107-1112.

Skvortsov, S., Skvortsova, I., Sarg, B., Loeffler-Ragg, J., Lindner, H., Lukas, P., Taberner, J., & Zwierzina, H. 2005, "Irreversible pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 induces caspase-independent apoptosis in colorectal cancer DiFi cell line", *Apoptosis.*, vol. 10, no. 5, pp. 1175-1186.

Slavik, J. M., Lim, D. G., Burakoff, S. J., & Hafler, D. A. 2001, "Uncoupling p70(s6) kinase activation and proliferation: rapamycin-resistant proliferation of human CD8(+) T lymphocytes", *J.Immunol.*, vol. 166, no. 5, pp. 3201-3209.

Smith, M. A., Gloeckler Ries, M. A., Gurney, J. E., & Ross, J. A. Leukemia. National Cancer Institute. 17-35. 1999. SEER Pediatric Monograph.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Sorg, G., Schubert, H. D., Buttner, F. H., & Heilker, R. 2002, "Automated high throughput screening for serine kinase inhibitors using a LEADseeker scintillation proximity assay in the 1536-well format", *J.Biomol.Screen.*, vol. 7, no. 1, pp. 11-19.

Sridhar, R., Hanson-Painton, O., & Cooper, D. R. 2000, "Protein kinases as therapeutic targets", *Pharm.Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 1345-1353.

Steff, A. M., Fortin, M., Arguin, C., & Hugo, P. 2001, "Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: an assay amenable to high-throughput screening technologies", *Cytometry*, vol. 45, no. 4, pp. 237-243.

Stewart, P. S. 1996, "Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms", *Antimicrob.Agents Chemother.*, vol. 40, no. 11, pp. 2517-2522.

- Strauss, G., Osen, W., & Debatin, K. M. 2002, "Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs", *Clin Exp.Immunol.*, vol. 128, no. 2, pp. 255-266.
- Strick, R., Zhang, Y., Emmanuel, N., & Strissel, P. L. 2006, "Common chromatin structures at breakpoint cluster regions may lead to chromosomal translocations found in chronic and acute leukemias", *Hum.Genet.*, vol. 119, no. 5, pp. 479-495.
- Strumberg, D., Clark, J. W., Awada, A., Moore, M. J., Richly, H., Hendlisz, A., Hirte, H. W., Eder, J. P., Lenz, H. J., & Schwartz, B. 2007, "Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors", *Oncologist.*, vol. 12, no. 4, pp. 426-437.
- Su, Y. W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., & Wienands, J. 1999, "Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases", *Eur.J.Immunol.*, vol. 29, no. 11, pp. 3702-3711.
- Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., & Littman, D. R. 2000, "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes", *Nature*, vol. 404, no. 6776, pp. 402-407.
- Surveillance Epidemiology and End Results program. Age-Adjusted SEER Incidence Rates
By Age At Diagnosis/Death
For Leukemia, All Races, Both Sexes
2000-2005 (SEER 17). <http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php#Output> . 2008.
- Takada, A., Takada, Y., & Minowada, J. 1974, "Immunological functions of human T-lymphoid cell line (MOLT). I. Release of immunosuppressive factors from the mixture of MOLT-4 cells and sheep red blood cells", *J.Exp.Med.*, vol. 140, no. 2, pp. 538-548.
- Tomizaki, K. Y., Usui, K., & Mihara, H. 2005, "Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements", *ChemBiochem.*, vol. 6, no. 5, pp. 782-799.
- Trusheim, M. R., Berndt, E. R., & Douglas, F. L. 2007, "Stratified medicine: strategic and economic implications of combining drugs and clinical biomarkers", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 6, no. 4, pp. 287-293.
- Tucker, K. A., Lilly, M. B., Heck, L., Jr., & Rado, T. A. 1987, "Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity", *Blood*, vol. 70, no. 2, pp. 372-378.
- Ulrike Honisch, R. H. J. S. Microplatten für die Zukunft: Neue Formate und Einsatzgebiete. *Biospektrum* [9], 656-657. 2003.
- Vainshtein, I., Silveria, S., Kaul, P., Rouhani, R., Eglen, R. M., & Wang, J. 2002, "A high-throughput, nonisotopic, competitive binding assay for kinases using nonselective inhibitor probes (ED-NSIP)", *J.Biomol.Screen.*, vol. 7, no. 6, pp. 507-514.

van der Merwe, P. A. & Davis, S. J. 2003, "Molecular interactions mediating T cell antigen recognition", *Annu.Rev.Immunol.*, vol. 21, pp. 659-684.

Van Etten, R. A. 2007, "Oncogenic signaling: new insights and controversies from chronic myeloid leukemia", *J.Exp.Med.*, vol. 204, no. 3, pp. 461-465.

Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. 2000, "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB", *Biochem.J.*, vol. 346 Pt 3, pp. 561-576.

Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., & Dustin, M. L. 2006, "T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster", *Immunity.*, vol. 25, no. 1, pp. 117-127.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. 1995, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V", *J.Immunol.Methods*, vol. 184, no. 1, pp. 39-51.

Vogt, A., Cooley, K. A., Brisson, M., Tarpley, M. G., Wipf, P., & Lazo, J. S. 2003, "Cell-active dual specificity phosphatase inhibitors identified by high-content screening", *Chem.Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 733-742.

Wakeling, A. E., Guy, S. P., Woodburn, J. R., Ashton, S. E., Curry, B. J., Barker, A. J., & Gibson, K. H. 2002, "ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy", *Cancer Res.*, vol. 62, no. 20, pp. 5749-5754.

Wang, Y. S. N. 2007, "VX-680/MK-0457. Aurora kinase inhibitor, Oncolytic.", *drugs of the Future*, vol. 32, no. 2, p. 144.

Webb, C. P., Hose, C. D., Koochekpour, S., Jeffers, M., Oskarsson, M., Sausville, E., Monks, A., & Vande Woude, G. F. 2000, "The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network", *Cancer Res.*, vol. 60, no. 2, pp. 342-349.

Weislow, O. S., Kiser, R., Fine, D. L., Bader, J., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. 1989, "New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 81, no. 8, pp. 577-586.

Widmann, D., Mader, H., & Friedrich 2000a, *Technology of integrated circuits* Springer Verlag, Berlin.

Widmann, D., Mader, H., & Friedrich, H. 2000b, *Technology of integrated circuits* Springer Verlag.

Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, L. E., Bollag, G., & Trail, P. A. 2004, "BAY 43-9006

exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis", *Cancer Res.*, vol. 64, no. 19, pp. 7099-7109.

Wisniewski, D., Lambek, C. L., Liu, C., Strife, A., Veach, D. R., Nagar, B., Young, M. A., Schindler, T., Bornmann, W. G., Bertino, J. R., Kuriyan, J., & Clarkson, B. 2002, "Characterization of potent inhibitors of the Bcr-Abl and the c-kit receptor tyrosine kinases", *Cancer Res.*, vol. 62, no. 15, pp. 4244-4255.

Wolf, D., Tilg, H., Rumpold, H., Gastl, G., & Wolf, A. M. 2007, "The kinase inhibitor imatinib--an immunosuppressive drug?", *Curr.Cancer Drug Targets.*, vol. 7, no. 3, pp. 251-258.

Wood, K. V. 2007, "An interview with Keith V. Wood", *Assay.Drug Dev.Technol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-6.

Woodcock, J. 2007, "The prospects for "personalized medicine" in drug development and drug therapy", *Clin Pharmacol.Ther.*, vol. 81, no. 2, pp. 164-169.

Wu, G., Irvine, J., Luft, C., Pressley, D., Hodge, C. N., & Janzen, B. 2003, "Assay development and high-throughput screening of caspases in microfluidic format", *Comb.Chem.High Throughput.Screen.*, vol. 6, no. 4, pp. 303-312.

Wu, H., Huang, B., & Zare, R. N. 2006, "Generation of complex, static solution gradients in microfluidic channels", *J.Am.Chem.Soc.*, vol. 128, no. 13, pp. 4194-4195.

Yasui, H., Hideshima, T., Ikeda, H., Jin, J., Ocio, E. M., Kiziltepe, T., Okawa, Y., Vallet, S., Podar, K., Ishitsuka, K., Richardson, P. G., Pargellis, C., Moss, N., Raje, N., & Anderson, K. C. 2007, "BIRB 796 enhances cytotoxicity triggered by bortezomib, heat shock protein (Hsp) 90 inhibitor, and dexamethasone via inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp27 pathway in multiple myeloma cell lines and inhibits paracrine tumour growth", *Br.J.Haematol.*, vol. 136, no. 3, pp. 414-423.

Ye, N., Qin, J., Shi, W., Liu, X., & Lin, B. 2007, "Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device", *Lab Chip.*, vol. 7, no. 12, pp. 1696-1704.

Yeo, W. S., Min, D. H., Hsieh, R. W., Greene, G. L., & Mrksich, M. 2005, "Label-free detection of protein-protein interactions on biochips", *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, vol. 44, no. 34, pp. 5480-5483.

Yong, W. P., Innocenti, F., & Ratain, M. J. 2006, "The role of pharmacogenetics in cancer therapeutics", *Br.J.Clin.Pharmacol.*, vol. 62, no. 1, pp. 35-46.

You, B., Tranchand, B., Girard, P., Falandry, C., Ribba, B., Chabaud, S., Souquet, P. J., Court-Fortune, Trillet-Lenoir, V., Fournel, C., Tod, M., & Freyer, G. 2008, "Etoposide pharmacokinetics and survival in patients with small cell lung cancer: A multicentre study", *Lung Cancer.*

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., & Samelson, L. E. 1998, "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation", *Cell*, vol. 92, no. 1, pp. 83-92.

Zhu, M. & Fahl, W. E. 2000, "Development of a green fluorescent protein microplate assay for the screening of chemopreventive agents", *Anal.Biochem.*, vol. 287, no. 2, pp. 210-217.

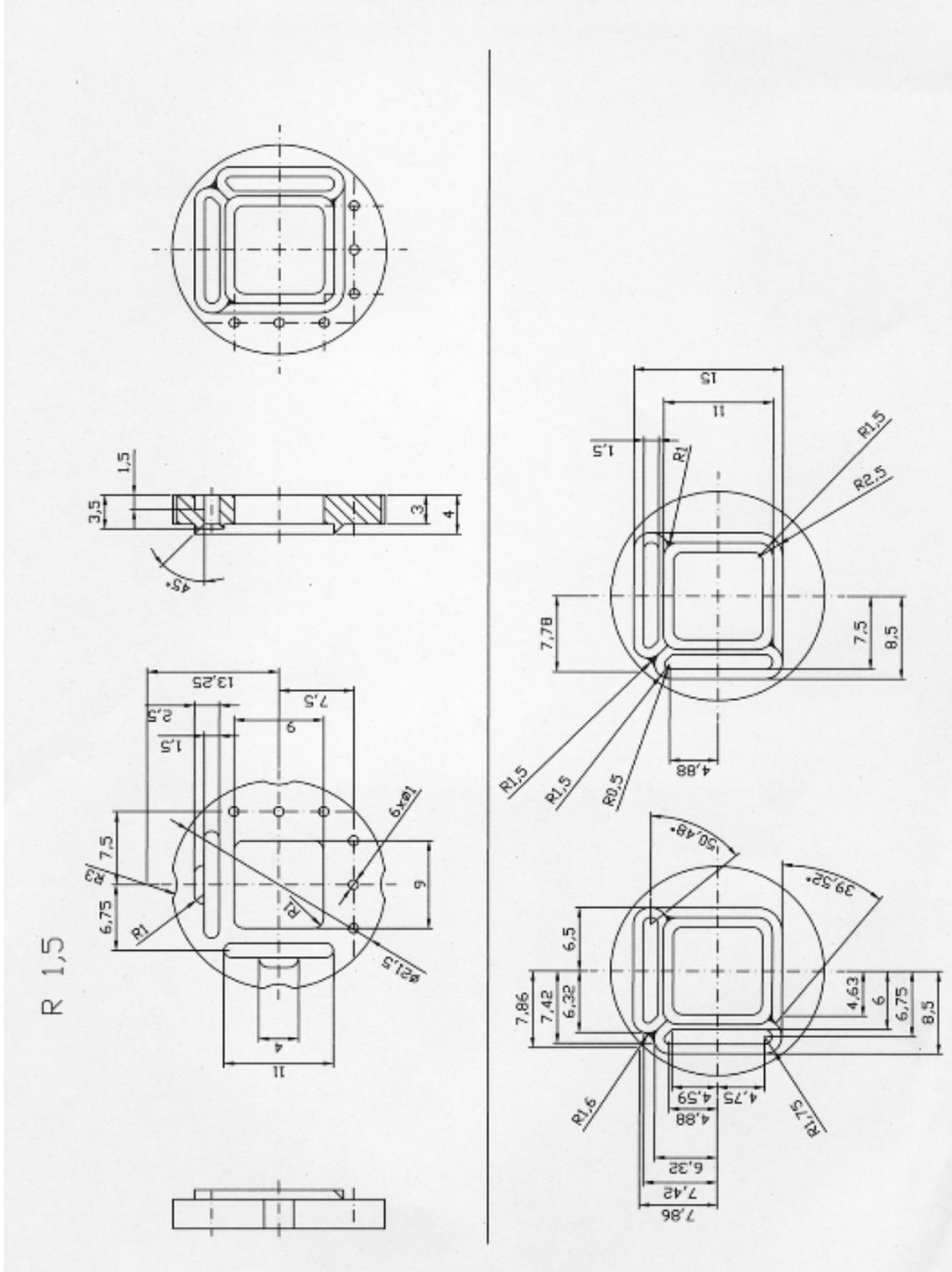
Zicha, D., Dunn, G., & Jones, G. 1997, "Analyzing chemotaxis using the Dunn direct-viewing chamber", *Methods Mol.Biol.*, vol. 75, pp. 449-457.

Zigmond, S. H. 1977, "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors", *J.Cell Biol.*, vol. 75, no. 2 Pt 1, pp. 606-616.

Zimmermann, G. R., Lehar, J., & Keith, C. T. 2007, "Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts", *Drug Discov.Today*, vol. 12, no. 1-2, pp. 34-42.

ANHANG

Anh. 1 Technische Zeichnung des Diffusion Device



Anh. 2 Macroprogrammierung zur Bildauswertung in ImagePro Plus

Option Explicit

```
Dim aoiform() As String
Dim aoiwahl As Integer
Dim aoinummer As Integer
Dim aoianzahl As Integer
Dim bildnummer As Integer
Dim bildanzahl As Integer
Dim zeile As Integer
Dim spalte As Integer
Dim xlapp As Object
Dim xlbook As Object
Dim xlSheet As Object
Dim xlRange As Object
```

Sub Arrayauswertung()

```
'<c>A
```

```
    bildanzahl = 0
    excel_erstellung
    ret = lpAppSelectDoc(0)
    ret = lpAppSelectDoc(DOCSEL_PREVID)
    ret = lpAppWindow("", bildanzahl, 1)
    ret = lpStGetInt("Wieviele AOIs sollen ausgewertet werden?", aoianzahl, 1, 1, 99)
    If ret = 0 Then Exit Sub
    formblatt(aoianzahl, bildanzahl)
    zeile = 7
    spalte = 3
    ReDim aoiform(aoianzahl) As String
    For aoinummer = 1 To aoianzahl
        aoiform(aoinummer) = "Box"
        aoiform(aoinummer) = aoiform(aoinummer) + LTrim$(Str$(aoinummer))
    Next aoinummer
    For bildnummer = 0 To bildanzahl
        ret = lpAppSelectDoc(bildnummer)
        zeile = 7
        For aoinummer = 1 To aoianzahl
            ret = lpAoiManager(AOISSET, aoiform(aoinummer))
            If ret < 0 Then
                ret = lpMacroStop(aoiform(aoinummer) + " wurde nicht definiert!",
MS_MODAL+MS_STOP)
            End If
            End If
            tropfenauswertung
            zeile = zeile + 2
        Next aoinummer
        spalte = spalte + 1
    Next bildnummer
    ret = lpAppCloseAll()

    If aoianzahl > 1 Then excel_auswertung Else xlsheet.Range(xlapp.Cells(1,1),
xlapp.Cells(1,1)).Select

    xlapp.Visible = True
```

```
xlbook.ActiveSheet.Visible = True
xlapp.WindowState = xlMaximized
Set xlSheet = Nothing
Set xlBook = Nothing
Set xlapp = Nothing
End Sub
```

```
Sub Platform_Intensitätsgradient_2()
ret = IpWsConvertImage(IMC_GRAY16, CONV_SCALE , 0, 0, 0, 0)
ret = IpAppSelectDoc(0)
' The image signature for the active image is: 2159-518D-2B24-715C-3ADD-342A-E49A-
1BAB
ret = IpWsConvertImage(IMC_GRAY16, CONV_SCALE , 0, 0, 0, 0)
Call Arrayauswertung()
End Sub
```

LEBENS LAUF

BERUFSERFAHRUNG IN INDUSTRIE UND FORSCHUNG

Oktober 2008 - dato **Postdoc**

EMC microcollections GmbH, Tübingen

Chemische Substanzbibliotheken, Screeningverfahren

November 2002 –
Januar 2005

Technischer Mitarbeiter (Dipl.-Ingenieur Biotechnologie)

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Biotechnologie, Stuttgart

Abteilung Biomimetische Grenzflächen

Herstellung, Biofunktionalisierung und Analyse von silikabasierten nanopartikulären Systemen

September 2000 –
März 2001

Praxissemester

Bayer AG, Wuppertal

Pharma-Operations, Abteilung Biotechnologie

Titel der Praxissemester-Arbeit:

»Acarbose, Chromatographie und Nebenkomponenten«

Oktober 1998 –
März 1999

Praxissemester

Eichbaum-Brauereien, Mannheim

Bereich Qualitätswesen

Mikrobiologische und chemisch-technische Qualitätssicherung

AUSLANDSAUFENTHALTE

März 2007-
Juli 2008

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen der Dissertation

Nijmegen Centre for Molecular Life Science (NCMLS),

Nijmegen, Niederlande

AUSBILDUNG

Promotion

Februar 2005 –
September 2008

Promotion

Durchführung der experimentellen Arbeiten und Erstellung der Dissertation am
Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, sowie
Nijmegen Centre for Molecular Life Science (NCMLS), Niederlande

Titel der Dissertation:

»Kombinatorische Wirkstofftestung – Entwicklung eines neuartigen diffusionsgestützten Bioassays & Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die T-Zell-Signaltransduktion«

8. Dezember 2008

Rigorosum (Mündliche Prüfung)
Abschluss mit »Magna Cum Laude«

Studium

Oktober 1997 –
September 2002

Studium der Biotechnologie
Fachhochschule für Technik und Gestaltung, Mannheim
Note 2,0

März 2002 –
September 2002

Diplomarbeit
Roche Diagnostics, Mannheim
Abteilung Analytik im Bereich Forschung und Entwicklung
»Near Patient Testing«

Titel der Arbeit:

»Imaging von selektiv aufgebauten Proteinstrukturen auf ausgewählten Oberflächen mittels Ultramikroskopie«

Note 1,2

Studienarbeit

»Darstellung und Simulation eines biotechnologischen Prozesses mittels SuperPro Designer 4.0«

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Publikationen

Ganser Alexander, **Roth** Günther, **van Galen** Joost, **Hilderink** Janneke, **Wammes** Joost J. G., **Müller** Ingo, **van der Leeuwen** Frank **Wiesmüller** Karl-Heinz, **Brock** Roland:

A diffusion-driven device for a high-resolution dose-response profiling of combination chemotherapy, *Analytical Chemistry* 2009 81 (13), 5233-5240

Köhler Karsten, **Ganser** Alexander, **Andre** Thomas, **Grosse-Hovest** Ludger, **Jung** Gundram, **Brock** Roland:

Stimulus-dependence of the action of small molecule inhibitors in the CD3/CD28 signaling network, *ChemMedChem*, 2008, 3(9), 1404-11

Heeren Andreas, **Luo** C.-P., **Roth** Günter, **Ganser** Alexander, **Brock** Roland, **Wiesmüller** Karl-Heinz, **Henschel** Wolfgang, **Kern** Dieter:

Diffusion along microfluidic channels, *Microelectron. Eng.*, 2006, 83, 1669-1672

Ganser Alexander

Neues Werkzeug für kombinatorisches Wirkstoffscreening, *Biotech Regional*, 2008, 4, 2

Präsentationen

Ganser Alexander, **Roth** Günter, **Kern** Dieter, **Wiesmüller** Karl-Heinz, **Brock** Roland (2007):

A diffusion-based device for multicomponent drug screening, Posterpresentation im Rahmen des Statusseminar Chiptechnologien der Dechema, Frankfurt

Ganser Alexander, **Roth** Günter, **Heeren** Andreas, **Henschel** Wolfgang, **Kern** Dieter, **Brock** Roland, **Wiesmüller** Karl-Heinz (2005):

DECODE, Diffusion enabled combinatorial device, Posterpresentation im Rahmen des NanoBio-Europe Kongress, Münster