

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. H. E. Gabbert

**Veränderungen in der Zellmorphologie und Zellzyklusverteilung
unter dem Einfluss einer Paclitaxel (Taxol®)
induzierten Wachstumsinhibition
im Nierenzellkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christiane Rasch, geb. Knopf

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. C. D. Gerharz

Korreferent: Prof. Dr. W. A. Schulz

Dank

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Gerharz bedanken, der mir sehr viel Geduld entgegenbrachte und somit diese Arbeit zum Gelingen brachte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Petra Reinecke für Ihre fachlich Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und Anleitung bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

Nicht zuletzt bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Joachim, durch dessen konsequentes und einfühlsames Insistieren, die Fertigstellung der Dissertation erst gelungen ist.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Lüthen bedanken, der mich stets tatkräftig und mit Nachdruck bei dem Vorhaben unterstützt hat, meine Dissertation abzuschließen.

Inhaltsangabe	V
Abkürzungen	VIII
Einleitung	11
Das metastasierende Nierenzellkarzinom	11
Definition und Klassifikation	11
Ätiologie	11
Epidemiologie	12
Klinik	13
Therapie und Resistenzproblematik	13
TAXOL[®]	17
Entdeckung und Entwicklung von Taxol [®]	17
Die chemische Struktur und Synthese von Taxol [®]	19
Wirkmechanismus	20
Effekte von Taxol [®] auf gereinigtes Tubulin in vitro	20
Effekt von Taxol [®] auf Zellen	23
Taxol [®] Resistenz von Tumorzellen	27
Merkmale zellulärer Resistenz	27
Resistenzmechanismen	28
Effekte des Lösungsvermittlers Cremophor [®] EL	30
Taxol [®] in der klinischen Anwendung	31
Taxol [®] am humanen Nierenzellkarzinom	34

Material	36
Zellen und Zellkultur	36
Tabellarische Material- und Geräteauflistung	37

Methoden	40
Zellzählung und Präparation zur Zellzählung	40
Wachstumskinetik im Monolayer	41

Bestimmung der Wachstumsinhibition	41
MTT-Assay Paclitaxel-Taxol®	41
MTT-Assay DMSO-Cremophor® EL / Äthanol	42

Morphologische Untersuchungen	43
Lichtmikroskopie und Immunfluoreszenzmikroskopie	43
Elektronenmikroskopie	44

Flow Zytometrie	45
Präparation zur DNA-Index-Bestimmung	45
Präparation zur Zellzyklus-Analyse	45
Messung am Durchfluss Cytometer	46

Statistische Auswertung	47
ANOVA (Analysis of Variance)-Modell	47
Bestimmung des Konfidenzintervalls	47
Produktmoment- Korrelationskoeffizient nach Pearson und Regression	48

Ergebnisse	49
Wachstumskinetik	49
Wachstumsinhibition	49
Mikrotubulusbündel	55
Apoptose	63

Zellzyklusverteilung unter Paclitaxel / Taxol®	68
Bestimmung des DNA-Index	68
Proliferative Aktivität	68
Ausbildung von Polyploidie und Mikronuclei	73
DNA-Synthese nach Mitosearrest und DNA-Fragmentierung	77
Einfluß von Cremophor® EL auf das Proliferationsverhalten	80

Diskussion	82
Wachstumshemmung durch Paclitaxel/ Taxol®	82
Wirkmechanismus von Paclitaxel	86
Mikrotubulusbündel nach Paclitaxel-Exposition	86
Apoptoseinduktion durch Paclitaxel	90
Effekte von Paclitaxel auf die Zellzyklusverteilung	92

Zusammenfassung	95
------------------------	-----------

Tabellarischer Anhang / Statistik	96
--	-----------

Literaturverzeichnis	119
-----------------------------	------------

Lebenslauf	135
-------------------	------------

Abkürzungen

α	Fehler 1. Art
AIDS	acquired immuno deficiency syndrome
AKKK	Arbeitsgruppe zur Koordination klinischer Krebsregister
ANOVA	Analysis of Variance
BfArM	Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte
BGA	Bundesgesundheitsamt
BrdU	5-Bromo-2`-Deoxyuridin
BSA	bovine serum albumine
c	Konzentration
Ca^{2+}	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
CO_2	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithel – Wachstumsfaktor, Epithelial Growth Factor
EGTA	Ethylen-glykol- bis (beta)-aminoethyl-ether-N-N ¹ -Tetraacetat
el. opt.	Elektronenoptische Vergrößerung
EM	Elektronenmikroskopie
F	Prüfgröße
FACS	Fluorescence absorbent cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
°C	Grad Celsius
G	Grading
G0	gap 0 ~ Ruhephase
G1	gap 1 ~ Wachstumsphase
G2	gap 2 ~ Reparatur- und Vorbereitungsphase
G-CSF	Granulozyten-Koloniebildung stimulierender Faktor
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
[H ³]	Tritium
Ho/H ₁	Null- und Alternativhypothese
H1 und H2	Histamin-1- und Histamin-2- Rezeptor
HCl	Salzsäure
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
λ	Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mitose
m ₁ / m ₂	Freiheitsgrade
MAP	Mikrotubulus assoziiertes Protein
MDR	Multidrug Resistance
Mg^{2+}	Magnesium
mg	Milligramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
min	Minute
MRP	Multidrug Resistance assoziiertes Protein
ml	Milliliter

MTT	(3- (4,5- dimethylthiazol- 2- yl)- 2,5 diphenyl) - Tetrazoliumbromid
n	normal haploider Chromosomensatz
NaCl	Kochsalz
NCI	National Cancer Institute
N ₂	Stickstoff
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-buffered saline
PDGF	Blutplättchen – Wachstumsfaktor, Plateled Derived Growth Factor
pT	pathologisches Tumorstadium
r	Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson
rpm	rounds per minute, Drehgeschwindigkeit
R ²	Bestimmtheitsmaß
S	DNA-Synthesephase
SAS	Statistical Analysis System
SEER	Surveillance, Epidemiology and end results
T	Temperatur
TNF	Tumor- Nekrose- Faktor
VEGF	Gefäßendothel – Wachstumsfaktor, Vascular Endothelial Growth Factor
x	Zufallsvariable
y	Regressionsgerade

Einleitung

Das metastasierende Nierenzellkarzinom

ICD10: C 64

Definition und Klassifikation

Das Nierenzellkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms mit immunhistochemischen Merkmalen von Tubulusepithelien (RIEDE & WEHNER, 1992). Histopathologisch wird das Nierenzellkarzinom seit 1986 üblicherweise nach THOENES klassifiziert. Es werden 6 Subtypen beschrieben, die sich in ihrer Auftretenshäufigkeit unterscheiden:

mit 73% tritt der klarzellige Typ am häufigsten auf, gefolgt vom chromophilen mit 15%, und dem chromophoben mit 4%. Gemischte Formen, der spindelförmige bzw. pleomorphe Typ und andere Untergruppen sind mit etwa 3% gleich häufig vertreten (THOENES & STÖRKELE, 1986).

Ätiologie

Die Ätiologie des humanen Nierenzellkarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Damit ein Nierenzellkarzinom entsteht, muss eine Vielzahl chromosomaler und molekularer Aberrationen zusammenwirken.

So konnten für die von THOENES et al. beschriebenen Tumortypen verschiedene Aberrationsmuster dargestellt werden (V.D.BERG & V.D.HOUT, 1993). Der häufigste Befund ist der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 3 (V.D.BERG & V.D.HOUT, 1993; ZBAR & BRAUCH, 1987). Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 ist das „Von- Hippel- Lindau“ (VHL) – Tumorsuppressorgen lokalisiert, dessen Ausfall oder Fehlfunktion für die Entwicklung eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms eine tragende Rolle spielt. In 50 – 80 % der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome bestehen VHL – Mutationen oder Gendeletionen (TURNER & MOORE, 2002).

Auch einigen Umweltnoxen wird eine tumorinduzierende Wirkung zugesprochen. Hierzu gehören die Arbeit an Hochöfen in der Eisen- und Stahl verarbeitenden Industrie, Asbest-, Benzin-, und Cadmiumexposition (MANDEL & MCLAUGHLIN,

1995), Nikotinabusus, sowie Adipositas und arterielle Hypertonie (PISCHON & LAHMANN, 2006). Die wichtigste präventive Maßnahme ist die Nikotinkarenz.

Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom wurde 1883 erstmals von GRAWITZ als das „Lipom der Niere“ beschrieben (GRAWITZ, 1883). Heute stellt dieser Tumor mit rund 85% den häufigsten aller malignen Nierentumoren dar (RIEDE & WEHNER, 1992). Aus den Daten der seit 1985 in Deutschland bestehenden „Arbeitsgruppe zur Koordination klinischer Krebsregister (AKKK)“ geht hervor, dass im Zeitraum zwischen 1987 und 1992 auf insgesamt 56.013 erfasste urologische Tumoren 11.424 Nierenzellkarzinome entfielen. Das entspricht einem Anteil von 20,4%.

Das durchschnittliche Alter der Betroffenen wird mit 61,1 Jahren angegeben. Altersbereinigt finden sich männliche wie weibliche Patienten am häufigsten in der Klasse vom 70.-75. Lebensjahr. Männer sind gegenüber Frauen häufiger betroffen (FISCHER & WÄCHTER, 1997). Diese Ergebnisse entsprechen weitgehend der im „Surveillance, epidemiology and end results (SEER) – Programm“ des vom National Cancer Institute dokumentierten Epidemiologie des metastasierenden Nierenzellkarzinoms in den USA (LYNCH & COHEN, 1995).

Studien von GUINAN et al., zur Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Tumorstadien im Zeitraum zwischen 1975-1985 ergaben, dass die prognostisch ungünstigen Tumorstadien pT3 und pT4 gegenüber den günstigeren Stadien pT1 und pT2 im Verhältnis 3:1 deutlich überwogen (GUINAN & VOGELZANG, 1995). Im von FISCHER et al. untersuchten Zeitraum zwischen 1987-1992 verschob sich dieses Verhältnis zugunsten der auf die Niere beschränkten Tumoren: das Verhältnis zwischen pT1- / pT2-Tumoren und pT3- / pT4-Tumoren wird nun mit 1,6:1 angegeben (FISCHER & WÄCHTER, 1997). Diese Entwicklung wird auf die heute mögliche Diagnostik unter Verwendung qualitativ hochwertiger bildgebender Verfahren wie Ultraschallsonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie zurückgeführt (BRETHERAU & LECHEVALLIER, 1995).

Klinik

Die oben beschriebene Entwicklung ist für den an einem Nierenzellkarzinom Erkrankten vorteilhaft, da die klinische Symptomatik des Tumors unspezifisch ist. In nur 5% der Fälle manifestiert er sich mit der klassischen Symptomtrias Hämaturie, Flankenschmerz und palpabler Abdominaltumor. Es existieren zwar eine Reihe unspezifischer Symptome wie intermittierendes Fieber, Gewichtsverlust und Leistungsabfall, sowie eine Vielzahl möglicher Laborveränderungen, die aber keineswegs pathognomonisch für das Nierenzellkarzinom sind (SCHELER & WEBER, 1992).

Trotz des Fehlens einer frühzeitig wegweisenden Symptomatik ist eine rechtzeitige Diagnosestellung notwendig, da die Prognose der Tumorpatienten umso besser ist, je frühzeitiger die Diagnose erfolgt (BRETHEAU & LECHEVALLIER, 1995). Im Wesentlichen trägt hierzu bei, dass im Falle einer frühen Diagnose noch keine ausgedehnte Metastasierung erfolgt ist. Die Metastasierung betrifft zu 30 % die Lunge, zu 26 % das Skelettsystem, zu 10% nicht regionäre Lymphknoten und zu etwa 10 % die Leber. Als prognostisch besonders ungünstig gilt der Nachweis einer Beteiligung des Skelettsystems (STAHL & WILKE, 1992).

Therapie und Resistenzproblematik

Die Resistenz des Nierenzellkarzinoms und seiner Metastasen gegenüber Chemo-, Strahlen- und Hormontherapien erklärt, warum bis heute die radikale Tumornephrektomie mit Lymphadenektomie die einzige kurative Therapie für den Patienten mit lokalisiertem Nierenzellkarzinom ist (EICHENAUER & VANHERPE, 1996, LJUNGBERG & HANBURY, 2007).

Ausgehend von der Beobachtung, dass in seltenen Fällen (0,5%) Spontanremissionen von Metastasen beobachtet werden konnten (KALLMEYER & DITTRICH, 1992) und in der Annahme, dass es sich hierbei um immunologische Phänomene handelt, wurde eine Vielzahl immuntherapeutischer Konzepte entwickelt.

Erprobt wurden verschiedene Zytokin-, Mono- und Kombinationstherapien, sowie unter dem Begriff „adoptive Therapien“ zusammengefasste Testreihen mit „lymphokin-aktivierten Killerzellen“ und „tumorinfiltrierenden Lymphozyten“. Das Ergebnis letztgenannter Testreihen rechtfertigte deren Einzug in den klinischen Gebrauch nicht.

Klinische Anwendung fanden das Interferon α und Interleukin – 2. Wobei lediglich das Interferon – α in der aktuellen Therapie - Leitlinie für das metastasierte Nierenzellkarzinom in Kombination mit dem Angiogeneseinhibitor Bevacizumab zur Erstlinientherapie empfohlen wird (LJUNGBERG & HANBURY, 2009).

Angiogeneseinhibitoren haben in den letzten Jahren Einzug in die systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms gehalten.

Rationale für die Anwendung von Angiogeneseinhibitoren am Nierenzellkarzinom war, daß die klarzelligigen Tumore, die über 80 % der malignen Tumore der Niere ausmachen, mit einer Inaktivierung des Von Hippel Lindau – Tumorsuppressorgenes assoziiert sind (PANTUCK & ZENG, 2003). Das Fehlen dieser Tumorsuppressorfunktion führt zu einer Überexpression einer Reihe von Hypoxie – induzierenden Faktoren, die zur gesteigerten Transkription Hypoxie – induzierbarer Gene, wie zum Beispiel des Gefäß – Endothel – Wachstumsfaktors („Vascular Endothelial Growth Factor“, VEGF), des Blutplättchen – Wachstumsfaktors („Platelet Derived Growth Factor“, PDGF) und des Epithel – Wachstumsfaktors („Epithelial Growth Factor“, EGF) führen. Die Signaltransduktion wird nach Bindung des jeweiligen Liganden über die Thyrosinkinasedomäne des entsprechenden Rezeptors übermittelt, an deren Ende Mechanismen der Zellproliferation, Angiogenese und Apoptoseinhibition stehen (TURNER & MOORE, 2002, KRAUSE & VAN ETTEN, 2005, STAEHLER & HASEKE, 2008).

Insofern stellt derzeit die Unterbrechung der VEGF - und PDGF – Signaltransduktionswege ein zentrales Ziel der antiangiogenetischen Therapie dar. Substanzen, die heute hierzu beim Nierenzellkarzinom Anwendung finden, sind die Rezeptor – Thyrosinkinase – Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib und der rekombinante humane monoklonale Antikörper Bevacizumab, der VEGF bindet

und so die Interaktion an dessen Rezeptor unterbindet (OUDARD & GEORGE, 2007).

Speziell das Versagen der Zytostatikatherapie am Nierenzellkarzinom wird auf eine genetisch fixierte „Multidrug-Resistance“ zurückgeführt.

Bereits im nicht maligne transformierten Nierenepithel ist eine hohe Expression von Genen bzw. Proteinen nachweisbar, die für die renale Sekretion und Metabolisierung von körperfremden Stoffen bedeutsam sind und die Zelle vor den schädigenden Einflüssen solcher Substanzen schützen. Der Nachweis erfolgte für das MDR-1-Gen (THIEBAUT & TSURUO, 1987; CORDON-CARDO & O'BRIAN, 1990; KIM & KAKEHI, 1996), die Glutathion-S-Transferase- π -, sowie die Topoisomerase II-Expression (KIM & KAKEHI, 1996).

Erhöhte Expressionslevel solcher Gene können auch in maligne transformierten Nierenepithelien gefunden werden. Besonders gut dokumentiert ist dieser Sachverhalt für das MDR-1-Gen (THIEBAUT & TSURUO, 1987; CORDON-CARDO & O'BRIAN, 1990; KIM & KAKEHI, 1996; VOLM & MATTERN, 1992), und das Glutathion- S-Tranferase- π -Gen (KIM & KAKEHI, 1996; MICKISCH & ROEHRICH, 1990; VOLM & MATTERN, 1992).

Auch in Tumoren setzt die Aktivierung dieser Gene Mechanismen in Gang, die die Zelle vor schädigenden Einflüssen schützen. Was sich für die normale Zelle des Nierenepithels als absolut notwendig erweist, erschwert den Einsatz eines Chemotherapeutikums an der maligne transformierten Zelle. Die Tumorzelle wird vor der schädigenden Wirkung des Chemotherapeutikums geschützt und zytostatikaresistent.

Studien, in denen man versuchte, die Mechanismen aufzudecken, die die Tumorzelle gegenüber dem Zytostatikum unempfindlich machen, ergaben, dass beim ausgeprägten Resistenzverhalten des Nierenzellkarzinoms vermutlich mehrere Resistenzmechanismen ineinander greifen (VOLM & MATTERN, 1992; MICKISCH & ROEHRICH, 1990; KIM & KAKEHI, 1996). So konnte von VOLM et al. gezeigt werden, dass von 30 humanen Nierenzellkarzinomen 89% zwei oder mehr Resistenzmechanismen aufweisen (VOLM & MATTERN, 1992).

Resistenzmechanismen		Exprimierende Tumoren (n=30)	
		absolut	prozentual
0		0	0
1	p – Glycoprotein	0	
	Gluthation – S - Transferase - π	0	
	Topoisomerase II	3	10
2	P – Glycoprotein / Gluthation – S – Transferase - π	8	
	P – Glycoprotein / Topoisomerase II	6	
	Gluthation – S – Transferase – π / Topoisomerase II	2	Σ 53
3	P – Glycoprotein /Gluthation – S – Transferase – π / Topoisomerase II	11	36

aus VOLM et al.:

Expression of Several Resistance Mechanisms in Untreated Human Kidney and Lung Carcinoma, Anticancer Research, 12, 1992, 1063 – 1068.

Taxol®

Entdeckung und Entwicklung von Taxol®

In den sechziger Jahren startete das „National Cancer Institute“ ein umfangreiches Projekt, in dem über 35.000 Pflanzenarten auf eine mögliche antineoplastische Wirkung hin geprüft wurden. Im Rahmen dieser groß angelegten Studie wurden 1963 Proben aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, gewonnen.

Eine Arbeitsgruppe am „Research Triangle Institute, (Durham, NC)“ konnte 1964 für einen bis dahin nicht isolierten Bestandteil dieses Gehölzes eine in vitro Aktivität gegen KB-Zelllinien und Leukämiezellen der Maus nachweisen (WANI & TAYLOR, 1971). Ermutigt durch diese Ergebnisse wurden vom „National Cancer Institute“ in vivo Studien gestartet, in denen sich das Walker 256 Karzinom, das Sarkom 180, die P 1534, P 388 und L 1210 Leukämie-Zelllinien, sowie das B16 Melanom und das humane MX-1-Mammakarzinom im Xenotransplantat-Modell als sensibel gegenüber dem Extrakt erwiesen (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991).

Erst 1971 wurde wiederum von der Arbeitsgruppe um WANI et al. die Isolierung und Strukturformel der Substanz Taxol® beschrieben, die für die anti-neoplastische Aktivität des Rohextraktes aus *Taxus brevifolia* verantwortlich ist (WANI & TAYLOR, 1971).

Taxol® wurde 1977 von der „NCI Division of Cancer Treatments Decision Network“ zur klinischen Weiterentwicklung zugelassen, aber dennoch verzögerte sich der Einsatz von Taxol® im klinischen Gebrauch um fast ein Jahrzehnt. Zum einen zeichnete sich mit der neuen Substanz gegenüber den gängigen Zytostatika keine signifikant stärkere Wirkung auf die damals verfügbaren experimentellen Tumormodelle ab (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991; ROWINSKY & ONETTO, 1992), zum anderen stellte sich die Entwicklung einer geeigneten pharmazeutischen Darreichungsform aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Taxol® als schwierig heraus. Bedeutsam war auch die geringe Verfügbarkeit der neuen Substanz: der Ertrag aus ungefähr 3kg Rinde belief sich

auf etwa 300mg Substanz. Eine solche Substanzmenge, wird für nur eine einzige Chemotherapie benötigt (HORWITZ, 1994).

Das Interesse an Taxol® wurde erneut geweckt, als erstmalig Erkenntnisse über seinen einzigartigen Wirkmechanismus veröffentlicht wurden. Man beschrieb Taxol® als Spindelgift, das seine zytotoxische Wirkung über eine verstärkte Tubulinpolymerisierung und Stabilisierung von Mikrotubuli entfaltet (SCHIFF & FANT, 1979; SCHIFF & HORWITZ, 1980). Es unterschied sich dadurch von allen bekannten Spindelgiften, wie Colchizin oder den Vinca-Alkaloiden, die an unpolymerisiertem Tubulin angreifen, und die Bildung von Mikrotubuli unterbinden (KUMAR, 1981).

1983 begannen toxikologische und klinische Phase-I-Studien, in denen Taxol® mit Cremophor® EL als Lösungsvermittler eingesetzt wurde. Das Auftreten schwerer Überempfindlichkeitsreaktionen schon bei kurzen Infusionsdauern von 1 und 3 Stunden, die auf den Lösungsvermittler Cremophor® EL zurückgeführt wurden, verzögerten den klinischen Einsatz um weitere Jahre (WEISS & DONEHOWER, 1990). Neben den Hypersensitivitätsreaktionen erwiesen sich die unter Taxol® auftretende Leukopenie und Neuropathie als dosislimitierend (ROWINSKY, 1993).

1989 entdeckten Forscher des „Johns Hopkins Oncology Center“ die hochsignifikante Wirksamkeit von Taxol® beim metastasierten, platin-resistenten Ovarialkarzinom (MCGUIRE & ROWINSKY, 1989). Im Jahre 1991 wurde von seiner Wirksamkeit beim metastasierten Mammakarzinom berichtet (HOLMES & WALTERS, 1991). Die Empfehlung einer Taxol®-Therapie zur Behandlung des metastasierten, platinresistenten Ovarialkarzinoms und des metastasierenden Mammakarzinoms nach Versagen der anthrazyklinhaltigen Standardtherapie erfolgte in Deutschland 1993 bzw. 1995 (BGA, 1993; BfArM, 1995).

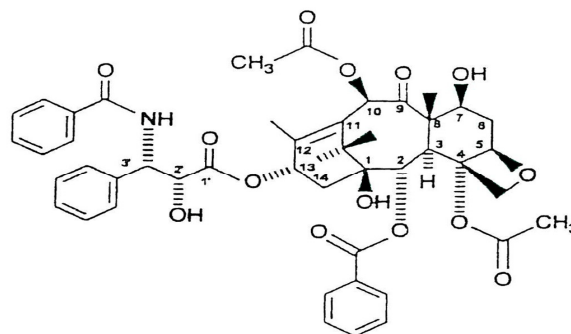
Weitere Indikationen für die Anwendung von Taxol sind heute darüberhinaus die adjuvante Therapie des nodal positiven Mammakarzinoms sequentiell zur Doxorubicin – haltigen Standardtherapie, die palliative chemotherapeutische

Erstlinien - Kombinationsbehandlung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit Taxol und Cisplatin, sowie die Zweitlinien – Therapie des AIDS – assoziierten Kaposisarkoms (FACHINFORMATION BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2007).

Die chemische Struktur und Synthese von Taxol®

Bei Taxol® handelt es sich um ein komplexes zyklisches Diterpen. Sein Grundgerüst besteht aus einem Taxanringsystem mit einem vierbindigen Oxetanring und einer veresterten Seitenkette an Position C-13 (WANI & TAYLOR, 1971). Diese C-13-Seitenkette und ein intakter Taxanring sind notwendig, damit Taxol® auf Säugetierzellen zytotoxisch wirkt (PARNES & KINGSTON, 1982). Eine Veresterung an der C-2'-Position dieser Seitenkette führt zu einem Verlust der in vitro Aktivität, lässt aber die Wirksamkeit in der Zellkultur unbeeinflusst. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Taxol® intrazellulär in einen aktiven Metaboliten umgewandelt wird (MELLADO & MAGRI, 1984).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass der 3'-Amid-Substituent der Seitenkette eine große Bedeutung für die Bindung des Medikamentes am Mikrotubulus hat (SWINDELL & KRAUSS, 1991).



Taxol® - Strukturformel

Die de novo - Synthese Taxols® gelang erst 1994, fast 30 Jahre nachdem sein antineoplastisches Wirkpotential entdeckt wurde (NICOLAOU & YANG, 1994; HOLTON & SOMOZA, 1994). Obwohl hierdurch die Entwicklung strukturverwandter

Taxane realisierbar wurde, die möglicherweise über eine größere antineoplastische Aktivität verfügen oder eine Taxol®-Resistenz überwinden können, wird die vollständige Synthese Taxols® heute aus ökonomischer Sicht nicht befürwortet (SRINIVASAN & PESTCHANKER, 1995). Aus diesem Grund wird Taxol® weiterhin semisynthetisch aus einer Vorstufe, 10-Deacetyl-Baccatin III, hergestellt, die in den Nadeln und Ästen von *Taxus brevifolia* und anderer Taxusspezies zu finden ist (BORNKESSEL, 1994).

Wirkmechanismus

Kenntnisse über die komplexen Wirkmechanismen, über die Taxol® den zellulären Stoffwechsel erreicht, basieren auf Studien, die sich intensiv mit der Wechselwirkung von Taxol® und seinem zellulären Bindungspartner, dem Tubulin, auseinandersetzen. Im Wesentlichen werden hier zwei methodische Ansätze unterschieden. Der erste Ansatz verfolgt das Ziel, den Effekt von Taxol® auf gereinigtes Tubulin unter in vitro Bedingungen, unabhängig vom Zellstoffwechsel, zu charakterisieren. Im zweiten Forschungsansatz werden diese Ergebnisse zu den in vivo beobachteten Taxol®-induzierten Veränderungen im Zellstoffwechsel in Beziehung gesetzt.

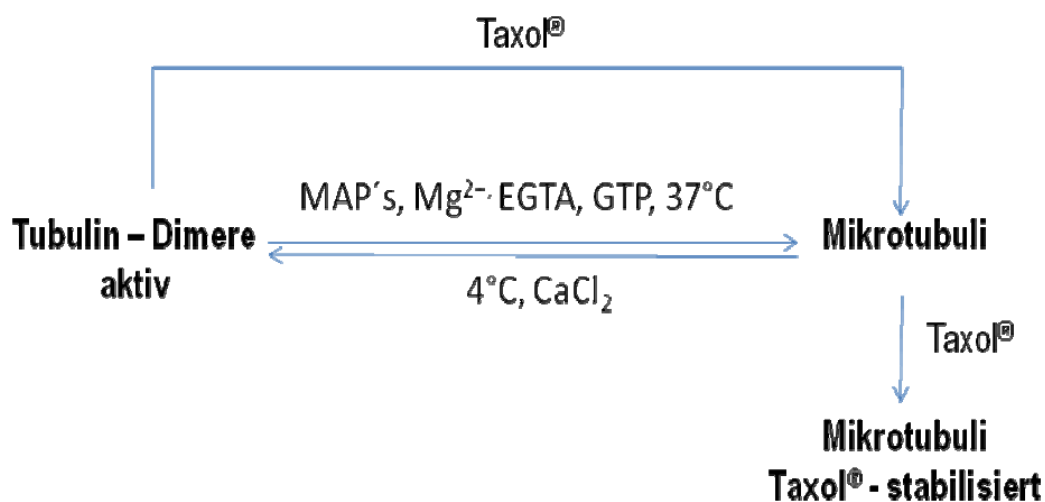
Effekte von Taxol® auf gereinigtes Tubulin in vitro

Das α - und das β -Tubulin sind die Elementarbausteine für den Aufbau des Zytoskeletts. Diese beiden Untereinheiten verbinden sich gewöhnlich zu sogenannten Tubulinheterodimeren, durch deren Polymerisation die typische Struktur der Mikrotubuli entsteht. Mikrotubuli sind Hohlzylinder mit einem mittleren Durchmesser von 24 nm. Ihre Strukturanalyse ergibt, dass die Tubulinuntereinheiten in Form von Protofilamenten zusammengelagert sind (AMOS & KLUG, 1974). Normalerweise bestehen Mikrotubuli aus 13 solcher Protofilamente, die in einer α -helikalen Struktur um eine gemeinsame Achse angeordnet sind (DUSTIN, 1984).

Damit eine Synthese von Mikrotubuli aus Tubulinuntereinheiten unter in-vitro Bedingungen stattfindet, ist neben einer Mindestkonzentration an Tubulin, der sogenannten kritischen Tubulinkonzentration (GASKIN & CANTOR, 1974; BORISY &

OLMSTED, 1974), normalerweise die Anwesenheit von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAP's), Guanosin-Triphosphat (GTP), Ethylen-glykol- bis -(beta)-aminoethyl-ether-N-N¹-Tetraacetat-Säure (EGTA), organischem Puffer und eine Temperatur von 37°C erforderlich (GASKIN & CANTOR, 1974).

Unter Zugabe von Taxol® kann eine Bildung von Mikrotubuli aus gereinigtem Tubulin auch ohne die genannten Co-Faktoren beobachtet werden. Außerdem wird durch Taxol® die kritische Tubulinkonzentration gesenkt. Die gebildeten Mikrotubuli erweisen sich ferner als beständig gegenüber niedrigen Temperaturen, 4°C und Ca²⁺, Faktoren, die normalerweise zur Depolymerisation in vitro gebildeter Mikrotubuli führen (SCHIFF & FANT, 1979; SCHIFF & HORWITZ, 1981).



*Verändert nach: Horwitz – SB et al., 1982 in Taxol®:
A new probe for Studying The Structure and Function of Microtubules.*

Neben diesen Effekten konnte gezeigt werden, dass solche Mikrotubuli bevorzugt aus nur 12 Protofilamenten aufgebaut werden, einer strukturellen Veränderung, die sich in einem verminderten queren Durchmesser niederschlägt (ANDREU & BORDAS, 1992; RAY & MEYHÖFER, 1993; ARNAL & WADE, 1995).

In in-vitro-Studien, die zum Ziel hatten, die Bindungsstelle von Taxol® genauer zu lokalisieren, stellte man fest, dass die Inkubation des Reaktionssystems mit Substanzen wie Colchizin oder Vinblastin, die zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli führen, die Taxol®-Bindung verhindern. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass der intakte Mikrotubulus ein spezifisches Ziel für Taxol® darstellt. Für die Taxol®-Bindung an den intakten Mikrotubulus fand man eine Stöchiometrie von ~ 1 (PARNES & HORWITZ, 1981). Mit Hilfe elektronenkristallographischer Analysen konnte bestätigt werden, dass im Mikrotubulus genau ein Taxol®-Molekül pro Tubulinheterodimer gebunden vorliegt (MAKOWSKI, 1995; NOGALES & GRAYER-WOLF, 1995).

Erst Studien zu Beginn der 90er Jahre erbrachten genauere Erkenntnisse über die spezifische Bindungsstelle von Taxol® am Mikrotubulus: Tests mit [H^3]-markiertem Taxol® ergaben, dass das Medikament bevorzugt kovalent an zwei spezifische Domänen der β -Untereinheit des Tubulins bindet. Als Bindungsstellen fand man die N-terminalen Aminosäuren 1 - 31 und die Aminosäuren 217 - 231. Ferner konnte festgestellt werden, dass markierte Substanz durch unmarkierte von der Bindungsstelle verdrängt wird. Ein solcher Effekt ist nur dann erklärbar, wenn man eine reversible Substanzbindung voraussetzt (RAO & HORWITZ, 1992; RAO & KRAUSS, 1994; RAO & ORR, 1995).

Andere Ergebnisse zeigten, dass vermutlich nicht nur diese Bindungsstellen im β -Tubulin für den Verbleib von Taxol® am Mikrotubulus und den hier erzeugten strukturellen Veränderungen verantwortlich sind. Vielmehr scheint die charakteristische Verankerung Taxols® zwischen den mikrotubulären Protofilamenten für diese Effekte bedeutsam zu sein. Außerdem spricht die bevorzugte Substanzbindung an polymerisierten Tubulineinheiten (MANFREDI & PARNES, 1982; ANDREU & BORDAS, 1992) und die verringerte Anzahl an Protofilamenten in Anwesenheit von Taxol® gebildeter Mikrotubuli (ANDREU & BORDAS, 1992; RAY & MEYHÖFER, 1993; ARNAL & WADE, 1995) für die Bedeutung der Kontaktstellen zwischen den Protofilamenten (MAKOWSKI, 1995; NOGALES & GRAYER-WOLF, 1995). Diese Ergebnisse stützen Hypothesen, die für Taxol® eine Verstärkung der Bindung zwischen den Protofilamenten fordern

(HOWARD & TIMASHEFF, 1988; DIAZ & MENENDEZ, 1993) und sprechen gegen die Hypothesen, die eine Abschwächung dieser Wechselwirkungen zugunsten einer Verstärkung der Bindung zwischen den Tubulindimeren voraussetzen (DYE, 1993).

Effekt von Taxol® auf Zellen

Der Einfluss von Taxol® auf die Zelle kann im Hinblick auf zwei verschiedene Effekte untersucht werden: zum einen werden unter Taxol® Veränderungen im Ablauf des Zellzyklus beobachtet, zum anderen können an Taxol®-behandelten Zellen typische morphologische Veränderungen nachgewiesen werden.

Typischerweise führt die ungewöhnliche Stabilisierung der Mikrotubuli in Taxol®-behandelten Zellen zu einem Mitoseblock, der zur Hemmung der Zellteilung führt. Die meisten Zellen werden unter Taxol® in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert (SCHIFF & HORWITZ, 1980; MANFREDI & PARNES, 1982). Der spezifische Block erfolgt am Übergang von der Meta- zur Anaphase der Mitose (JORDAN & TOSO, 1993; LONG & FAIRCHILD, 1994). Dieses Phänomen korrespondiert gut mit dem deutlichen Anstieg des Mitose-Index zu dem Zeitpunkt, an dem sich die meisten Zellen in diesem Block befinden (FUCHS & JOHNSON, 1978).

Bis heute ist der genaue Zeitpunkt des Zelltodes in Bezug auf das Fortschreiten des Zellzyklus unklar: einige Studien zeigen, dass sich die Zellen nach Substanzexposition aus dem Mitoseblock lösen können, ohne eine reguläre Zellteilung zu vollenden und in einem tetraploiden Zustand verbleiben (JORDAN & WENDELL, 1996, TAO & SOUTH, 2005). In diesem Fall gehen die Zellen in der darauffolgenden Interphase zugrunde, oder durchlaufen weitere Zellzyklen (JORDAN & WENDELL, 1996). Andere Studien weisen darauf hin, dass der Zelltod direkt während der Mitose eintritt (PANVICHIAN & ORTH, 1998), andere wiederum berichten von einer fehlerhaften Zellteilung, infolge derer der Zelltod eintritt (CHEN & HORWITZ, 2002).

Morphologisch beobachtet man in postmitotischen Interphasezellen multiple, kleine Kerne. Man bezeichnet diese deshalb auch als Micronuclei (LIEBMANN &

COOK, 1994; LONG & FAIRCHILD, 1994). Die Bildung solcher Micronuclei ist nicht Taxol®-spezifisch. Micronuclei werden auch durch Mitosehemmer wie Colchizin, Colcemid, Vinblastin und Griseofulvin und infolge von Röntgenbestrahlung induziert (RINGERTZ & SAVAGE, 1976).

Die morphologische Darstellung Taxol®-behandelter Interphase-Zellen mittels Elektronenmikroskopie oder Immunfluoreszenzmikroskopie mit monoklonalen Antikörpern gegen α - oder β -Tubulin zeigt in deren Zytoplasma eine große Anzahl paralleler, dicht gelagerter Mikrotubuli. Dieses Phänomen konnte an einer großen Anzahl unterschiedlicher Zellkulturen nachgewiesen werden (SCHIFF & HORWITZ, 1980; DEBRABANDER & GEUENS, 1982; MANFREDI & PARNES, 1982; BRENNER & BRINKLEY, 1982; TOKUNAKA & FRIEDMAN, 1983). Diese sogenannten Mikrotubulusbündel resultieren aus einer Umorganisation des tubulären Zytoskeletts durch Taxol®. Das Ausmaß dieser Bündelinduktion ist abhängig von der Substanzkonzentration und der Expositionszeit (MANFREDI & PARNES, 1982; STEARNS & WANG, 1992).

Die Möglichkeit einer Mikrotubulusbündelinduktion stellt eines der wesentlichen Kennzeichen der zellulären Taxol®-Sensitivität dar (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988; ROWINSKY & BURKE, 1989). So konnte für Leukämiezellen gezeigt werden, dass die Sensitivität leukämischer Blasten gegenüber Taxol® direkt mit dem Grad der beobachteten Bündelinduktion korreliert (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988; ROBERTS & ROWINSKY, 1989; ROBERTS & ALLISON, 1990).

Die Induktion von Mikrotubulusbündeln ist eine typische morphologische Veränderung unter Taxol® am Zytoskelett von Interphase-Zellen. Treten die Zellen unter Taxol® in den Mitosevorgang ein, können im Immunfluoreszenzpräparat sogenannte „Multiple Mitotic Asters“ beobachtet werden. Von der qualitativen Seite trifft diese Beobachtung sowohl für Taxol®-sensitive als auch für Taxol®-resistente Tumorzelllinien zu (SCHIFF & HORWITZ, 1980; ROWINSKY & DONEHOWER, 1988; ROBERTS & ROWINSKY, 1989).

Die während der Interphase gebildeten Bündel werden hierbei entweder durch sternartige Mikrotubuluskonfigurationen ersetzt oder in solche umgewandelt.

Diese gruppieren sich radial um je einen zentralen Punkt. Sie stehen weder zu Zentriolen noch zu Kinetochoren in Beziehung, von denen aus in mitotischen Zellen physiologischerweise das Wachstum der Mikrotubuli erfolgt (Witt & Ris, 1980; DEBRABANDER & GEUENS, 1982; MANFREDI & PARNES, 1982; BRENNER & BRINKLEY, 1982). DEBRABANDER et al. erklären dieses Phänomen damit, dass diese Strukturen ihre spezielle Ankerfunktion bei der Mikrotubulusbildung verlieren, da Taxol® die kritische Tubulinkonzentration, die zur Mikrotubulussynthese notwendig ist, im gesamten Zytoplasma verringert. Unter physiologischen Bedingungen findet man solche Verhältnisse nur an Zentriol und Kinetochor vor, so dass das Mikrotubuluswachstum ausschließlich von hier startet. Der Einfluss von Taxol® bewirkt also, dass eine solche Mikrotubulussynthese nicht mehr an diese Strukturen gebunden bleibt, sondern auch anderenorts erfolgen kann (DEBRABANDER & GEUENS, 1982).

Nach der Darstellung der charakteristischen Veränderungen im Zellzyklus und in der Zellmorphologie unter Taxol® stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen, die zum Zelltod unter dem Einfluss dieser Substanz führen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Zellen unter Taxol®-Einfluss dem programmierten Zelltod unterliegt. Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein energieabhängiger, gen-codierter Vorgang der zellulären Selbstdestruktion. Die Zellen zeigen die hierfür typischen Apoptosezeichen: Zellschrumpfung, Verklumpung des Chromatins, Auflösung der regulären Kernstruktur und Ausstülpungen der Plasmamembran, die als membrangebundene Apoptosekörperchen auffallen (BHALLA & IBRADO, 1993; MILAS & HUNTER, 1995; JORDAN & WENDELL, 1996). Die Apoptose ist nicht zwingend an hohe Substanzdosen gebunden, sondern wird auch dann beobachtet, wenn geringere Taxol®-Dosen über eine längere Zeit eingesetzt werden (RAY & PONNATHPUR, 1994; JORDAN & TOSO, 1993).

Es werden heute auch Formen des Zelltodes diskutiert, die nicht der klassischen Form der Apoptose entsprechen, sondern Caspase-unabhängig ablaufen sollen (NIKURA & DIXIT, 2007).

Zur zellschädigenden Wirkung Taxols® könnte auch seine Fähigkeit beitragen, den Makrophagen-Stoffwechsel zu beeinflussen (DING & PORTEU, 1990; BURKHART & BERMAN, 1994).

So imitiert Taxol® den Effekt von Lipopolysaccharid (LPS), dem Hauptmembranbestandteil gram-negativer Bakterien, indem es die Freisetzung von TNF- α aus Makrophagen provoziert, und zur Reduktion der membranständigen TNF- α -Rezeptoren dieser Zellpopulation führt. Dieser Effekt tritt unabhängig von der Beeinflussung des Mikrotubulusapparates auf. Deshalb fordert die Arbeitsgruppe um DING et al., dass vermutlich nicht Tubulin das Zielmolekül für diesen Mechanismus ist, sondern ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das sowohl das intrazelluläre Zielmolekül für LPS als auch für Taxol® darstellt (DING & PORTEU, 1990).

Die Vorstellung, dass die Freisetzung von TNF- α über einen eigenständigen Mechanismus erfolgt, wird auch von BURKHART et al. geteilt, die zeigen konnten, dass die zytotoxische Wirkung Taxols® und seine Fähigkeit, die zelluläre TNF- α -Produktion zu steigern, an unterschiedliche Bereiche der Taxanstruktur gebunden ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass hier mit großer Wahrscheinlichkeit zwei unterschiedliche Mechanismen wirksam werden (BURKHART & BERMAN, 1994).

Die therapeutische Wirkung von TNF- α seinerseits beruht nicht allein auf seiner direkten Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen, sondern auch auf der Fähigkeit, Zellen des Immunsystems zu aktivieren, die dann ihrerseits zur Tumordestruktion beitragen (BICHLER & KLEINKNECHT, 1991; PALLADINO & SHALABY, 1987). Zudem kann durch TNF- α – direkt oder indirekt – eine Koagulopathie im Gefäßsystem des Tumors verursacht werden, die zu einer hämorrhagischen Nekrose im Tumorzentrum führt und somit zu seiner Schädigung beiträgt (WATANABE & NIITSU, 1988).

Man diskutiert außerdem, ob Taxol® möglicherweise in den Wirkmechanismus von Onkogenen eingreifen kann. Für verschiedene Moleküle, die in Verbindung zur Onkogenese stehen, konnte gezeigt werden, dass sie mit dem Tubulin oder

den Mikrotubuli interagieren, die ihrerseits von wesentlicher Bedeutung für die Kontrolle von Zell- und Kernteilung, und damit der Wachstumsregulation sind.

Für das mos-Proto-Onkogen wurde gezeigt, dass es am Mikrotubulus bindet und diesen stabilisiert (ZHOU & OSKARSSON, 1991). Das mos-Proto-Onkogen wird für gewöhnlich während der Keimzellreifung exprimiert und übernimmt hier die Rolle eines zytostatisch wirksamen Faktors. Auf eine mögliche Analogie im Wirkmechanismus zwischen diesem Proto-Onkogen und Taxol® wurde von VAN DE WOUDE 1991 hingewiesen (REYNOLDS, 1991). Die Tragfähigkeit dieser Hypothese wird durch die schon viel früher publizierte Beobachtung gestützt, dass Taxol® in befruchteten Keimzellen von *Xenopus laevis* die Rolle eines zytostatisch wirkenden Faktors imitieren kann (HEIDEMANN & GALLAS, 1980).

Auf die Bedeutung einer veränderten Expression des Tumor-Suppressor-Genes p53 für die zelluläre Taxol®-Sensitivität ist anderenorts hingewiesen worden (WAHL & DONALDSON, 1996; LOWE & RULEY, 1993).

Taxol®-Resistenz von Tumorzellen

Merkmale zellulärer Resistenz

Die für Taxol® typische Induktion von Mikrotubulusbündeln kann auch an resistenten Zelllinien beobachtet werden. Im Gegensatz zur Irreversibilität dieses Vorganges bei sensitiven Zelllinien, wird die Bündelbildung hier unabhängig von der Präsenz Taxols® als reversibel beschrieben. Das Ausmaß der Bündelbildung ist bei resistenten Zelllinien schwächer ausgeprägt (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988).

Resistente Tumorzellen werden durch Taxol® auch in ihrem Zellzyklus beeinflusst. So sollen resistente Zellen vermehrt in der G2/M-Phase des Zellzyklus akkumulieren (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988), und hiernach bevorzugt in einen polyploiden Zustand übergehen (ROBERTS & ALLISON, 1990).

Resistenzmechanismen

Es existieren mehrere zelluläre Mechanismen, die entweder allein, oder synergistisch, eine Taxol®-Resistenz hervorrufen.

Eine Möglichkeit ist die Existenz einer zellulären „Multidrug-Resistance“ (MDR). Dieser Resistenz-Mechanismus ist von vielen Autoren diskutiert worden (ROY & HORWITZ, 1985; BHALLA & HUANG, 1994; BAGULEY & MARSHALL, 1995).

Mit seiner extrem hydrophoben Molekülstruktur und als Naturstoff erfüllt Taxol® die wesentlichen Voraussetzungen, um bevorzugt einer zellulären „Multidrug-Resistance“ zu unterliegen (GOTTESMANN & PASTAN, 1993).

Der „MDR-Phänotyp“ ist mit genomischen Veränderungen assoziiert, die in der Überexpression eines 170-kDa Membranglycoproteins, dem p-Glykoprotein, resultieren. p-Glykoprotein stellt einen transmembranären Kanal dar, durch den Substanzen energieabhängig aus der Zelle herausgeschleust werden. Auf diese Weise ist die Zelle in der Lage, den intrazellulären Substanzspiegel auf ein Minimum zu reduzieren, und sich so vor toxischen Konzentrationen zu schützen (LING, 1992).

Bei der Analyse der Plasmamembranfraktion resistenter Zellen konnte ermittelt werden, dass nicht allein dieses herkömmliche Genprodukt des MDR-Gens eine Taxol®-Resistenz vermittelt: es existieren weitere, dem p-Glycoprotein ähnliche Membranproteine, die zur Taxol®-Resistenz beitragen können (ROY & HORWITZ, 1985; HORWITZ & LOTHSTEIN, 1986).

Die Expression von „Multidrug-Resistance“-assoziiertem Protein (MRP) einem von der Existenz von p-Glycoprotein unabhängigen Mechanismus der „Multidrug-Resistance“ ist für die Resistenzentwicklung gegenüber Taxol® offenbar von untergeordneter Bedeutung (BREUNINGER & PAUL, 1995; LAUTIER & CANITROT, 1996).

Ein weiterer, gut dokumentierter Mechanismus, auf den eine Taxol®-Resistenz zurückgeführt werden kann, ist die Veränderung seines zellulären Zielmoleküls, des Tubulins.

BOGGS et al. zeigten, dass bei der Selektion einer resistenten Zellpopulation durch Langzeitexposition mit Taxol® solche Zellen bevorzugt werden, die Veränderungen im Tubulin aufweisen (BOGGS & GONZALES, 1992). Auch von anderen Autoren wurde im Rahmen von Resistenzstudien von solchen „Tubulin-Mutanten“ berichtet (CABRAL & ABRAHAM, 1981; CABRAL & BRADY, 1986). Man glaubt, dass diese Veränderungen im Tubulin das Gleichgewicht zwischen seiner Polymerisation zu Mikrotubuli und deren Depolymerisation zerstören, so dass das intakte Mikrotubulussystem, das als spezifischer Bindungspartner für Taxol® erforderlich ist, verloren geht. In Experimenten mit niederen Eukaryonten, wie *Aspergillus nidulans*, bedingten solche Mutationen im Tubulin eine verminderte Substanz-Tubulin-Bindung (DAVIDSE & FLACH, 1977). CABRAL et al. konnten dagegen bei Taxol®-resistenten Ovarialzellen vom Hamster, bei denen eine Alteration im Tubulin vorlag, keine von sensiblen Zellen unterschiedliche Taxol®-Bindung feststellen (CABRAL & BRADY, 1986). Heute erklärt man dieses Phänomen damit, dass in Säugetierzellen, im Gegensatz zu niederen Eukaryonten, mehrere Tubulingene exprimiert werden, und somit die Substanzbindung nicht ausschließlich an das Genprodukt eines mutierten Tubulin-Genes gebunden ist, sondern auch durch andere Tubuline erfolgen kann (MINOTTI & BARLOW, 1991). Die Bedeutung einer veränderten Tubulin-Isotypen-Expression für die Resistenzentwicklung gegenüber Taxol® wurde detailliert untersucht (HABER & BURKHART, 1995; JAFFREZOU & DUMONTET, 1995; DUMONTET & DURAN, 1996, FERGUSON & TAYLOR, 2005).

Auch eine a priori bestehende vermehrte dynamische Instabilität der Mikrotubuli einer Zelle soll eine gesteigerte Taxol®-Resistenz bedingen (GONCALVES & BRAGUER, 2001).

Neuere Untersuchungen weisen auf die Bedeutung einer Koexistenz verschiedener Resistenzmechanismen hin, die die Zelle vor der zytotoxischen Wirkung Taxols® schützen. Neben den gängigen Mechanismen wird auch auf die Bedeutung einer veränderten Expression von bcl-2, Glutathion-S-Transferase- π , Thymidylat-Synthetase und Glutathion-Peroxidase hingewiesen (LIEBMANN & HAHN, 1993; HUANG & IBRADO, 1997; MASANEK & STAMMLER, 1997). (*Tabelle 1, Anhang*).

Inzwischen werden hochkomplexe Signaltransduktionskaskaden beschrieben, die durch die Bindung von Taxol® an den Mikrotubulus aktiviert werden und mit der Apoptose der Tumorzelle enden. Die Aktivität und die Funktionstüchtigkeit der einzelnen molekularen Determinanten bestimmen, ob eine Tumorzelle zugrunde geht oder eine Resistenz aufweist. Eine Vielzahl solcher molekularer Determinanten sind bereits untersucht worden (BHALLA, 2003).

Effekte des Lösungsvermittlers Cremophor® EL

In der Klinik wird Taxol® gelöst in Cremophor® EL und Ethanol verwandt. Cremophor® EL ist ein Polyethylenoxid modifiziertes Rizinusöl, welches sich besonders gut als Lösungsvermittler für stark lipophile Substanzen, und somit auch für Taxol®, eignet. Obwohl es selbst als pharmakologisch relativ inert gilt, konnte beobachtet werden, dass in Kombination mit Cremophor® EL das zytotoxische Potential Taxols® bei Tumorzelllinien, die den „Multidrug-Resistance-Phänotyp“ exprimierten, gesteigert werden konnte (SCHUURHUIS & BROXTERMANN, 1990; WOODCOCK & JEFFERSON, 1990; WOODCOCK & LINSENMEYER, 1992; MILLWARD & MORTON 1993; NYGREN & CSOKA, 1995).

Es wurde ermittelt, dass Cremophor® EL die Funktion von membranintegriertem p-Glycoprotein, dem Genprodukt des MDR-1-Genes, behindert, indem es die zelluläre Membranfluidität verändert. Auf diese Weise wird der nach außen gerichtete Substanztransport durch p-Glykoprotein, der eine intrazelluläre Substanzakkumulation verhindert, blockiert. Darüber hinaus soll Cremophor® EL in hohen Dosierungen – $\geq 1\text{mg/ml}$ – auch über ein eigenständiges wachstumshemmendes Potential verfügen (WOODCOCK & LINSENMEYER, 1992; FJÄLLSKOG & FRII, 1993; ADLER & HERZOG, 1994).

Von LIEBMANN et al. wird betont, dass Cremophor® EL den zytotoxischen Effekt Taxols® antagonisieren kann. So wurde ermittelt, dass Cremophor® EL in hohen Konzentrationen (0,135% (v/v)) die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Ein solcher Arrest verhindert den Eintritt in die Mitose, die laut LIEBMANN die Schlüsselstellung für die Taxol®-vermittelte Zytotoxizität inne haben soll (LIEBMANN & COOK, 1993a, 1993b, 1994). Außerdem soll Cremophor® EL die Substanzaufnahme in die Zelle hemmen können (LIEBMANN & COOK, 1994).

Taxol® in der klinischen Anwendung

Eine zentrale Fragestellung bei der Einführung von Taxol® in den klinischen Gebrauch war, ob bei der Anwendung am Menschen überhaupt solche Substanzkonzentrationen im Blut erreicht werden können, von denen präklinisch eine zytotoxische Wirkung bekannt war.

Studien zur Pharmakokinetik von Taxol® zeigten, dass bei allen getesteten Applikationsmodi im „steady-state“ Plasmaspitzenkonzentrationen erreicht wurden, die bei in-vitro-Untersuchungen eine signifikante biologische und zytotoxische Wirkung gezeigt hatten (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988).

Von Bedeutung ist aber nicht nur, dass eine therapeutisch wirksame Plasmakonzentration während der Infusionszeit erreicht wird, sondern auch, dass die Substanz in ausreichend hohen Dosen über einen längeren Zeitraum nach der Infusion im Organismus verbleibt. Von Vorteil ist diesbezüglich die biphasische Elimination Taxols® aus dem Organismus, durch die trotz des schnellen Abfalls der Plasmakonzentration nach Infusionsende, ein therapeutisch wirksamer Substanzspiegel im Blut über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (WIERNIK & SCHWARTZ, 1987).

Phase I-Studien mit Taxol®: Pharmakokinetische Parameter

	Eliminationszeiten		Plasmakonzentrationen max.		Quelle
	T½α	T½β	Dosis		
Modus	[h]	[h]	[µM]	[mg/m²]	
3h Infusion	0,2	1,4	2,5-3,9	135	Huizing et al.,1993,Kearns et al. 1993, Tamura et al., 1994
3h Infusion	0,3	2,3	4,3-5,9	175	Huizing et al., 1993, Kearns et al., 1993
3h Infusion	0,2	1,5	9,2-10,0	250	Huizing et al., 1993, Schiller et al., 1994
6h Infusion	0,5	8,6	3,2	175	Wiernik et al., 1987
6h Infusion	-	4,8	2,3-4,6	175-275	Koeller et al., 1989
24h Infusion	0,1	2,2 – 17,1	0,2-0,4	135	Huizing et al., 1993, Tamura et al., 1994
24h Infusion	0,1	1,96	0,4	175	Huizing et al., 1993
24h Infusion	0,3	2,9	0,9-1,6	250	Wiernik et al., 1987, Jamis-Dow et al., 1993
96h Infusion	-	-	0,05-0,08	120-160	Younes et al., 1996, Hortobagyi et al., 1996
120h Infusion	-	-	-	5-36	Spiggs et al.,1992

Phase I-Studien mit Taxol®-Zytotoxizität an kultivierten Tumorzelllinien
eigene Darstellung 2010

Humane Tumorzelllinien		Exposition [h]	Konzentration [µM]	Untersuchter Effekt	Quelle
Karzinomzellen Astrozytom Kolon Lunge Mamma Ovar Pankreas Zervix uteri	U373 HT-29 A549 MCF7 OVG-1 PC-Zd, PC-Sh HeLa	24-72	0,002-0,02	Zytotoxizität	Liebmann et al., 1993
Ovar		4,24	0,0001-100	Zytotoxizität	Adler et al., 1994
Malignes Melanom		24,48,72,96	0,001-2	Zytotoxizität	Baguley et al., 1995
Schilddrüse		24,48,72	0,05-5	Zytotoxizität	Ain et al., 1996
Nierenzellen		120	0,01-10	Zytotoxizität	Reinecke et al., 1997
Leukämiezellen	HL-60 K562 Daudi-Zellen	2,22	0,1-10	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Rowinsky et al., 1988
Leukämiezellen	HL-60 K562	4	10	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Roberts et al., 1989
Blasten akuter Leukämien		4,24	0,1-10	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Rowinsky et al., 1989
Leukämiezellen		4,12,24	10	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Roberts et al., 1989
Prostata	PC-3 ML	6	0,5-1	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Stearns et al., 1992
Blasenkarzinom		24-60	0,02	Zytotoxizität durch Bündelinduktion	Nativ et al., 1997
Myeloische Leukämiezellen		4,24	0,1-10	Zytotoxizität durch Apoptose	Bhalla et al., 1993
Ovar		24,36	0,2	Zytotoxizität durch Apoptose	Liu et al., 1994
AML-Zellen	HL-60	24	0,01-1	Zytotoxizität durch Apoptose	Ray et al., 1994
Magen	SC-M1 NUGC	24, 72	0,01-10	Zytotoxizität durch Apoptose	Chang et al., 1996
Zervix uteri	HeLa	20	0,01-1	Zytotoxizität durch Apoptose	Jordan et al., 1996
Colon	HT-29	24, 72		Zytotoxizität durch Apoptose	Banerjee et al., 1997
Melanomzellen Leukämiezellen	SK-MEL-28 HL-60	1,12,24	0,01-1	Zytotoxizität durch Apoptose	Lieu et al., 1997

In den 1983 gestarteten Phase I-Studien wurden Therapieversuche mit Infusionsdauern zwischen 1 und 24 Stunden mit variierenden Taxol®-Dosen unternommen:

Es zeigte sich, dass die unter einer Taxol®-Therapie auftretende Neutropenie und Neuropathie dosislimitierend wirken. Zum Therapieabbruch zwangen vor allem auch mit kurzen Infusionsdauern in Verbindung stehende Hypersensitivitätsreaktionen. Durch die prophylaktische Zusatzmedikation von G-CSF und Glucokortikoiden zusammen mit H1- und H2-Blockern konnten in den sich anschließenden Phase II-Studien Neutropenie und Überempfindlichkeitsreaktionen kontrolliert werden (reviewed in: ROWINSKY & CAZENAVE, 1990; ARBUCK & CHRISTIAN, 1993; SPENCER & FAULDS, 1994).

Eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung konnte in diesen Studien nicht nachgewiesen werden, da es sich als unmöglich erwies, die applizierte Dosis beliebig zu steigern. Die hier auftretenden Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Myalgien, Arthralgien und Benommenheit erforderten bei einem Großteil der Patienten die Dosisreduktion (MCGUIRE & ROWINSKY, 1989; HOLMES & WALTERS, 1991).

Heute wird Taxol® in der Mono- wie auch in der Kombinationstherapie gängigerweise in einer Dosis von 175 mg/m^2 Körperoberfläche als 3h-Infusion eingesetzt (FACHINFORMATION BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2007). Die geringeren toxischen Auswirkungen kurzer Infusionszeiten bedingen, dass solche Schemata nur ungern zugunsten solcher mit längeren Infusionszeiten verlassen werden. Allerdings weiß man um den möglichen Vorteil längerer Infusionszeiten. In präklinischen Studien konnte nämlich gezeigt werden, dass die Antitumor-Wirkung Taxols® durch eine Verlängerung der Substanzexposition deutlich verstärkt werden kann, und dass dieser Effekt den höherer Medikamentdosen übertrifft (WILSON & KANG, 1992).

Taxol® am humanen Nierenzellkarzinom

Die erstaunlichen Therapieerfolge mit Taxol® insbesondere bei metastasierenden Ovarial- und Mammakarzinomen, die sich gegenüber der herkömmlichen Chemotherapie als resistent erwiesen hatten (MCGUIRE & ROWINSKY, 1989; HOLMES & WALTERS, 1991), macht die Substanz interessant für die Austestung am humanen Nierenzellkarzinom, einem Malignom, dem man eine genetisch fixierte „Multidrug Resistance“ zuspricht.

Im Rahmen von Phase-I-Studien, die vom „National Cancer Institut“ initiiert wurden, wurde die klinische Wirkung von Taxol® an Nierenzellkarzinompatienten getestet.

Von EINZIG et al. wurde 1991 eine Studie publiziert, in der an 18 Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom ein Therapieversuch mit Taxol® unternommen wurde. Drei Patienten waren immunologisch vorthapiert, bei neun weiteren ging eine Nephrektomie voraus. Bei keinem der Patienten dieses insgesamt vorthapierten Patientenkollektivs konnte nach durchschnittlich drei Therapiezyklen mit Taxol® in Dosen von 250mg/m² Körperoberfläche, die über 24h infundiert wurden, eine Tumorantwort beobachtet werden (EINZIG & GOROWSKI, 1991). Von einem ähnlichen Misserfolg der Taxol®-Therapie am Nierenzellkarzinom berichteten WALPOLE et al. 1993 (WALPOLE & DUTCHER, 1993). Bei der Bewertung dieser Studienergebnisse berücksichtigte man jedoch zunächst nicht, dass die Testung des Medikamentes an einem sehr kleinen Patientenkollektiv stattfand und dass die Erkrankten im Wesentlichen hinsichtlich ihrer infausten Prognose selektiert worden waren.

Erst 1997 wurden Ergebnisse zur anti-neoplastischen Aktivität Taxols® gegenüber humanen Nierenzellkarzinomen unter Kulturbedingungen veröffentlicht. Im Widerspruch zu der herkömmlichen Ansicht, dass diese Tumorgruppe resistent gegenüber einer Behandlung mit Taxol® ist, konnte nun gezeigt werden, dass sich von 20 klarzelligen humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinien 18 als ausgesprochen sensitiv erwiesen. Nur zwei Tumorzelllinien zeigten nach einer 120h Exposition mit Substanzkonzentrationen zwischen 0,1 und 10 µM eine nur unwesentliche Wachstumshemmung (REINECKE & CORVIN, 1997).

Mit dem Nachweis einer zytotoxischen Wirksamkeit Taxols® gegenüber kultivierten humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinien stellte sich die Frage, ob sich an diesen Tumorzelllinien Taxol®-induzierte Veränderungen nachweisen lassen, wie sie in ähnlicher Form auch in anderen Tumorzelllinien gezeigt werden konnten. Besonders aufschlussreich erschien hier der direkte Vergleich zwischen einer sensitiven Zelllinie (CLEAR-CA 11) und einer nur schwach reagiblen (CLEAR-CA 15).

Material

Zellen und Zellkultur

Bei den verwendeten klarzelligen Nierenzellkarzinom-Zelllinien handelt es sich um in Monolayern wachsende Adhäsivkulturen.

Zelllinie	Ursprungstumor	
	Staging	Grading
CLEAR-CA-11	pT2	G2
CLEAR-CA-15	pT 3a	G3

Als Standardwachstumsmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco Europe; Deutschland) mit 10% hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum. Zusätzlich sind zu je 1% Streptomycin, Penicillin, L-Glutamin, Asparagin, Arginin und Hepes-Puffer enthalten. Das Medium wird bei 4°C gelagert. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zur Zellexpansion werden die Zellen mit 0,05% Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Biochrom, Berlin, Deutschland) aus dem Monolayer gelöst, vereinzelt und anschließend geteilt.

Um einen Einfluss der Passagezahl auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, werden Passagen zwischen 50-75 verwendet.

Tabellarische Material- und Geräteauflistung

Substanzen		
Material	Hersteller	Herkunft
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Gibco Europe	Paisley, Schottland
EDTA; 1% (w/o) in PBS w/o Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom	Berlin, Deutschland
PBS; w/o Ca ²⁺ / Mg ²⁺ ; pH 7,3	Serag-Wiesner	Deutschland
Paclitaxel	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
	<u>Verwendung</u> Lagerung bei 4°C in Pulverform zu 1mg Zur weiteren Verarbeitung wird Paclitaxel in 150µl DMSO und 58.400µl Standardmedium gelöst. Die maximale Substanzkonzentration im Ansatz beträgt 20µM. Von hier ausgehend erfolgt die Verdünnung zu den verwendeten Endkonzentrationen 10, 1.0, 0.1, 0.01, und 0.001µM.	
DMSO	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
	<u>Verwendung</u> Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur Die Zellen sind bei maximaler Paclitaxel-Konzentration einer maximalen DMSO-Konzentration von 0,13% ausgesetzt. Gemäß der Paclitaxel-Verdünnungsreihe verringert sich der jeweilige DMSO-Gehalt um eine Zehnerpotenz	
Taxol [®]	Bristol Meyers Squibb	München, Deutschland
	<u>Verwendung</u> Gelagert bei 4°C als Durchstechflasche mit 5ml Taxol [®] . ungeöffnet mind. 24 Monate haltbar. Eine Durchstechflasche enthält 30mg Paclitaxel in 5ml = 6mg Paclitaxel / ml gelöst in: Ethanol (396mg/ml) Poly (oxyethylen)-35-Rizinusöl = Cremophor [®] EL (527mg/ml) Zu 0,1ml dieser Lösung werden 35ml Standardmedium hinzugegeben: c _{max} (Paclitaxel) = 20µM Die weitere Verdünnung erfolgt wie oben angegeben.	
Taxol [®] -Placebo	Bristol Meyers Squibb	München, Deutschland
	<u>Verwendung</u> Gelagert bei 4°C 1ml Taxol [®] -Placebo enthalten: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ethanol (396mg/ml) ▪ Poly (oxyethylen)-35-Rizinusöl = ▪ Cremophor[®] EL (527mg/ml) Die Verdünnungsreihe wird analog der von Taxol [®] erstellt. c _{max} (Cremophor [®] EL) = 1,50mg / ml c _{max} (Ethanol) = 1,13mg / ml	

Versuchsbezogene Materialauflistung

Zellzählung		
Material	Hersteller	Herkunft
Trypanblau; 0,5% in physiologischer Saline,	Gibco	Paisley, Schottland
Neubauer-Zählkammer		

Wachstumsinhibition-MTT-Assay		
Material	Hersteller	Herkunft
96-Well-Mikrotiterplatten	Nunc	Dänemark
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl)-Tetrazoliumbromid = MTT	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
	100mg MTT werden in 20ml PBS gelöst. C _{max} (MTT) = 5mg/ml Filtern erforderlich, um kleine, nicht sichtbare Farbstoffpartikel zu entfernen.	
Filter, Minisart N	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Schüttler MTS 4; IKA®	Janke & Kunkel	Deutschland
Titertek Multiskan PLUS; MK II Photometer		
EIA-3-Programm	JCN Biomedicals GmbH	Meckenheim, Deutschland

Lichtmikroskopie / Immunfluoreszenzmikroskopie		
Material	Hersteller	Herkunft
Objektträger	Menzel-Gläser	Deutschland
Petrischalen	Greiner Labortechnik	Deutschland
NaCl, 0,9%	Clintec Salvia GmbH	Homburg, Deutschland
Methanol, mind. 98%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Aceton, mind. 98%	Merck	Darmstadt, Deutschland
anti- α -Tubulin Antiserum der Maus	BioGenex	Deutschland
TBS		
Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC) konjugiertes Maus-Immunglobulin-G	DAKO	Deutschland
Lichtmikroskop	Leitz	Deutschland
Immunfluoreszenz-Mikroskop	Zeiss	Köln, Deutschland

Elektronenmikroskopie		
Material	Hersteller	Herkunft
Thermanox-Coverslips	Nunc	Dänemark
Cacodylatpuffer		
Tanninsäure		
Glutaraldehyd		
Epon		
Elektronenmikroskop	Zeiss	Deutschland

FACS - Analysen		
DNA-Index		
Material	Hersteller	Herkunft
Ethanol - absolut, mind. 98%	Riedel de Haen	Seelze, Deutschland
RNase	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Propidiumiodid; 95-98% (TLC)	Sigma	Deisenhofen, Deutschlan
Hühnererythrocyten; DNA QC Particles	Becton Dickinson	Erembodegem-Aalst Belgien

Zellzyklus-Analyse		
Material	Hersteller	Herkunft
Rauchende Salzsäure, 37%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Tween-20	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Albumin, Bovine Fraction V; 96-99%	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC) konjugierter anti-BrdU-Antikörper	dianova	Hamburg, Deutschland
Cytoron absolute Flow Cytometer	Ortho Diagnostic Systems	Neckargemünd, Deutschland
Cell Cycle 1.8C-Programm im ImmunoCount II-Programm		

Methoden

Zellzählung und Präparation zur Zellzählung

Die Zellen einer Kulturflasche werden mit 0,05% EDTA abgelöst und in Standardmedium gewaschen. 50 μ l dieser Zellsuspension werden mit 150 μ l Trypanblau (Gibco Europe, Deutschland) angefärbt.

Durch Aufbringen eines optisch plan geschliffenen Deckglases über der Bodenfläche einer Neubauerzählkammer wird ein Raum abgegrenzt, in dem die Zellen mikroskopisch ausgezählt werden. Dazu werden die Glasflächen der Zählkammern leicht angefeuchtet und das Deckglas so von der Seite aufgeschoben, dass zwischen Zählkammer und Deckglas Newton`sche Ringe entstehen. Dadurch ist gewährleistet, dass sich das Deckglas in reproduzierbarem Abstand zum Kammerboden befindet. Danach werden die Zählkammern mit der Zellsuspension gefüllt.

Die 8 Eckquadrate der Neubauerzählkammer werden so ausgezählt, dass alle Zellen, die innerhalb des Zählnetzes liegen, und solche, die sich auf der jeweils linken oder unteren Netzbegrenzung befinden, berücksichtigt werden. Bei jeder Zellzählung werden zwei Neubauer-Zählkammern mit je zwei Zählnetzen ausgewertet. Aus den bestimmten Werten wird der Mittelwert für eine Neubauer-Zählkammer berechnet und die Zellzahl pro μ l mit Hilfe der Kammerformel bestimmt:

$$\frac{\text{Mittelwert}}{\text{Verdünnung} \times 0,1 \times 8}$$

8 = Anzahl der Quadrate;
0,1 mm = Kammerhöhe

Das Verfahren ist an die von Rick beschriebene Methode zur Leukozytenzählung angelehnt (Rick: Klinische Chemie und Mikroskopie, 1990).

Wachstumskinetik im Monolayer

Je 400.000 Zellen der CLEAR-CA 11 und 200.000 Zellen der CLEAR-CA 15 werden mit 5 ml Standardmedium in 25 cm² Kulturflaschen (Nunc, Dänemark) pipettiert. Über einen Zeitraum von 144h werden nach jeweils 24h die Zellen mit 0,05% EDTA abgelöst, in Standardmedium gewaschen und ausgezählt. Für jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt werden 4 Werte bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet. Die gemittelte Zellzahl wird in einem Koordinatensystem gegen die Zeit aufgetragen. Die Verdopplungszeit wird für beide Zelllinien ermittelt.

Bestimmung der Wachstumsinhibition

MTT-Assay mit Paclitaxel und Taxol[®]

Exponentiell wachsende Zellen der CLEAR-CA 11 und CLEAR-CA 15 werden zu 100 µl/Well in einer Konzentration von 6×10^3 Zellen/ml (6000 Zellen/Well) bzw. 3×10^3 Zellen/ml (3000 Zellen/Well) in 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc, Dänemark) pipettiert. Die Zellen werden für 24h bei 37°C und 5% CO₂ in Standardmedium inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen zu ermöglichen. Dann werden 100µl Paclitaxel gelöst in DMSO oder Cremophor[®] EL / Ethanol so hinzugegeben, dass die Zellen in 0.001, 0.01, 0.1, 1 oder 10µM Substanz wachsen.

Die erste Spalte jeder Mikrotiterplatte enthält nur Standardmedium; sie dient zur Ermittlung des Blankwertes. In der zweiten Spalte wachsen die Tumorzellen in Standardmedium als interne Kontrolle.

Die Substanzexposition erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ für 1, 3, 24, 72, 96 und 120h. Der Expositionsabbruch beginnt mit der Zugabe von 100mg (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid) (MTT, Sigma, Deutschland), welches in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gelöst ist ($c_{\max}[\text{MTT}] = 5\text{mg/ml}$), in jedes Well der Mikrotiterplatte. Die Inkubation wird danach über 4 h fortgesetzt. Lebende Zellen lagern das Tetrazoliumsalz in den Mitochondrien ein und reduzieren es dort zu einem Formazanprodukt, das durch seine spezifische Lichtabsorption die photometrische Messung ermöglicht. Hiernach wird die Substanz aus den Platten entfernt und 150µl DMSO in jedes

Well gegeben, um die gebildeten Formazankristalle in Lösung zu bringen. Um eine homogene Farbverteilung zu erreichen, werden die Platten für 10 min auf einen Schüttler (IKA[®]; Schüttler MK II) gestellt. Anschließend erfolgt die photometrische Auswertung (Titertek Multiskan PLUS; MK II) bei einer Wellenlänge, $\lambda = 570\text{nm}$. Die Datenanalyse erfolgt über das EIA 3-Programm. Die Wachstumsinhibition errechnet sich aus:

prozentuale Wachstumsinhibition =

$$\left(1 - \frac{\text{Absorption des Testwertes} - \text{Absorption des Blankwertes}}{\text{Absorption des Kontrollwertes} - \text{Absorption des Blankwertes}} \right) \times 100\%$$

Für jede Medikamentkonzentration werden pro Expositionszeit 24 Testwerte bestimmt.

MTT – Assay mit Cremophor[®] EL / Ethanol

Analog der Versuchsdurchführung zur Taxol[®]-induzierten Wachstumsinhibition wird das Experiment mit dem dort verwandten Lösungsvermittler wiederholt. Es wird der Effekt von Cremophor[®] EL / Ethanol allein nach 72h und 120h überprüft. Der Lösungsvermittler enthält Cremophor[®] EL in Konzentrationen zwischen $7,5 \times 10^{-1}\text{mg/ml}$ und $7,5 \times 10^{-5}\text{mg/ml}$.

Morphologische Untersuchungen

Lichtmikroskopie und Immunfluoreszenzmikroskopie

Jeweils 1 ml Zellsuspension exponentiell wachsender Zellen werden auf sterile Objektträger pipettiert und anschließend für 4h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um es den Zellen zu ermöglichen, auf den Objektträgern adhärent zu werden. Die Zellen werden anschließend für weitere 20h in Standardmedium belassen. Nach 24h wird das Medium vollständig durch Paclitaxel in DMSO oder Cremophor[®] EL / Ethanol in den entsprechenden Konzentrationen ersetzt.

Für die Lichtmikroskopie werden für alle Konzentrationen (0.001, 0.01, 0.1, 1 und 10 µM) und Expositionszeiten (1, 3, 24, 72, 96 und 120h) Präparate angefertigt. Am Ende des Versuchsdurchganges werden die entsprechenden Objektträger mit 0,9%-iger NaCl-Lösung (Clintec Salvia GmbH, Deutschland) gewaschen und die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Fixierung erfolgt in 98%-igem Methanol (Merck, Deutschland) bei -20°C für 5 min. Durch die Behandlung mit 98%-igem Aceton (Merck, Deutschland) bei -20°C für 30 sec werden die Zellmembranen durchlässig gemacht. Anschließend werden die Präparate luftgetrocknet und mit Hämatoxilineosin gefärbt.

Auf jedem Objektträger werden 10 Gesichtsfelder mit mindestens 1.000 aufeinanderfolgenden Zellen im Hinblick auf ihre Kernmorphologie mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leitz, Deutschland) untersucht. Es werden Zellen mit einfachen Interphasekernen, Micronuclei oder apoptotischen Kernen, sowie mit Mitosefiguren unterschieden.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie werden die Zellen mit 0.001 und 1 µM Paclitaxel in DMSO oder Taxol[®] in Cremophor[®] EL / Ethanol für die oben angeführten Expositionszeiten behandelt.

Die Behandlung der Objektträger erfolgt bis zur Lufttrocknung analog dem oben beschriebenen Vorgehen. Hieran anschließend werden die Objektträger bei Raumtemperatur für 50min mit Anti- α -Tubulin-Antiserum der Maus (Klon-B-5-1-2; Verdünnung 1:2500; Bio-Genex, Deutschland) inkubiert, mit TBS gewaschen

und anschließend für 30min mit FITC-konjugiertem Maus-Immunglobulin- γ (Verdünnung 1:60; DAKO, Deutschland) behandelt. Als Eindeckmedium dient eine Lösung aus p-Phenylendiamin und Glycerol.

Auf jedem Objektträger werden 10 Gesichtsfelder mit mindestens 1.000 aufeinanderfolgenden Zellen hinsichtlich ihrer morphologischen Veränderungen im Zytoskelett ausgewertet. Unterschieden werden Zellen mit morphologisch unverändertem Zytoskelett, mit gebündelten Microtubuli, Mitosespindeln und „Multiple Mitotic Asters“ sowie Zellen, deren Zytoskelett vollständig zerstört worden ist. Das Auswertungsergebnis wird in Prozent angegeben.

Elektronenmikroskopie

Exponentiell wachsende Zellen werden auf sterile Thermanox-Coverslips (Nunc, Dänemark) übertragen. Der Versuchsablauf entspricht dem oben beschriebenen Vorgehen. Die Zellen werden mit 1 und 10 μ M Paclitaxel in DMSO oder in Cremophor[®] EL / Ethanol für 3, 24, 72, 96 oder 120h inkubiert. Nach der Exposition werden die Präparate zweimal mit Standardmedium und einmal mit 1,4%-igem Cacodylatpuffer gewaschen. Die Zellen werden mit 6%-iger Tanninsäure und 1%-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer fixiert.

Vor dem Einbettungsvorgang werden die Zellen für 1h mit 1%-iger Osmiumlösung und anschließend mit ansteigenden Ethanolkonzentrationen (50-, 70-, 80-, 90- und 98%) behandelt. Vor der endgültigen Einbettung in Epon wird ein Intermedium aus Ethanol / Epon zu 2:1 bzw. 1:2 Teilen für je 1h bei Raumtemperatur eingesetzt. Epon selbst wird für 12h bei 4°C auf den Zellen belassen. Hiernach werden auf die Thermanox-Coverslips Epon-Gelatinekapseln aufgebracht, die bei einer 48h Inkubation bei 60°C mit dem Zellmaterial auf der Oberfläche der Thermanox-Coverslips polymerisieren. Die Thermanox-Coverslips werden dann durch Erhitzen auf 80°C und anschließendes Erkalten in flüssigem N₂ abgelöst.

Zur Auswertung stehen Bilder mit einer elektronenoptischen Vergrößerung von 1100 bis 30.000 zur Verfügung. Eine zusätzliche Fotovergrößerung vom Faktor 2 muss außerdem berücksichtigt werden.

Flow Zytometrie

Präparation zur DNA-Index-Bestimmung

Die Zellen werden mit 0,05% EDTA aus dem Monolayer gelöst und zweimal in PBS gewaschen und bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellen werden dann in 70%-igem Ethanol bei -20°C fixiert. Nach Abzentrifugieren des Alkohols werden die Proben für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ mit RNase (Sigma, Deutschland) in PBS (c = 1 mg/ml) behandelt. Durch anschließendes Zentrifugieren werden die Zellen pelletiert und mit 1ml Propidiumiodid (c = 0,05 mg/ml) (Sigma, Deutschland) gefärbt. Der DNA-Gehalt der Nierenzellkarzinom-Zelllinien wird gemäß HIDDEMANN et al. gegen diploide Hühnererythrozyten (Becton Dickinson, Belgien) gemessen (HIDDEMANN & SCHUMANN, 1984).

Präparation zur Zellzyklus-Analyse

Entsprechend der Zelldichte im MTT-Assay werden Zellen der Zelllinie CLEAR-CA 11 und der CLEAR-CA 15 in 162 cm²-Kulturflaschen (Nunc, Dänemark) kultiviert. Nach 24h Vorinkubation in Standardmedium werden die Zellen für 3, 72 und 120h mit 1µM Paclitaxel in DMSO oder Cremophor[®] EL / Ethanol behandelt. Kontrollen, die entsprechend nur mit Standardmedium behandelt werden, werden mitgeführt.

Um auch hier einen möglichen Effekt des Lösungsvermittlers Cremophor[®] EL / Ethanol darstellen zu können, werden Zellen für 72 und 120h mit $7,5 \times 10^{-5}$ und $7,5 \times 10^{-1}$ mg/ml Cremophor[®] EL / Ethanol behandelt. Das entspricht der minimalen und maximalen zur Wachstumsinhibition eingesetzten Cremophor[®] EL-Konzentration.

Die Präparation zur Zellzyklus-Analyse erfolgt angelehnt an die 1983 von DOLBEARE et al. beschriebene Methode (DOLBERE & GRATZNER, 1983).

In den letzten 45 min der Expositionszeit werden die Zellen für 45 min mit 20µM 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU, Sigma, Deutschland) inkubiert. Die Zellen werden dann mit 0,05% EDTA aus dem Monolayer gelöst, zweimal in PBS gewaschen und für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das verbleibende Zellpellet

wird in PBS resuspendiert und mit 70%-igem Ethanol (Riedel - de Haen, Deutschland) bei -20°C fixiert. Um die Zellen wieder vom Alkohol zu trennen, werden sie wie zuvor zentrifugiert. Das Zellpellet wird resuspendiert und ein Aliquot von $100\mu\text{l}$ mit 1ml eines Gemisches aus 2n HCl (Merck, Deutschland) und 0,5% Triton-X-100 (Sigma, Deutschland) versetzt. Die Zellen werden so für 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Proben so oft mit 0,25%-igem Tween-20 (Sigma, Deutschland) in PBS bei -20°C gewaschen und bei 1.500 rpm für 3 min zentrifugiert, bis der pH-Wert der behandelten Zellprobe im neutralen Bereich liegt ($\text{pH} \sim 7,4$). Die Kontrolle erfolgt mit einem Indikatorstreifen.

Die Zellen werden dann mit je $50\mu\text{l}$ Rinder-Serum-Albumin (Sigma, Deutschland) und $50\mu\text{l}$ Anti-Maus-IgG-Fluoreszein-Isothiocyanat-konjugiertem-anti-BrdU-Antikörper (DIANOVA, Deutschland) in PBS/Tween-20 (Verhältnis 2:3) behandelt und anschließend für 60 min auf Eis gelagert. Dann werden sie noch zweimal mit PBS/Tween-20 gewaschen und zuletzt mit Propidiumiodid ($c = 0,05 \text{ mg/ml}$) (Sigma, Deutschland) gefärbt. Die gesamte Präparation erfolgt unter Ausschluss von Lichteinfall.

Messung am Durchfluss-Cytometer

Pro Probe werden 10.000 Zellen mit einem Cytoron absolute Flow Cytometer (Ortho Diagnostic Systems, Deutschland) analysiert. Als Messstandard werden bei jeder Versuchsreihe Hühnererythrocyten (Becton Dickinson, Belgien) mitgeführt. Die Grün-Fluoreszenz (FITC), dem BrdU-Einbau entsprechend, wird durch einen 541nm-Filter analysiert, die Rot-Fluoreszenz (Propidiumiodid), dem DNA-Gehalt entsprechend, durch einen 630nm-Filter. Die Daten werden mit dem Cell Cycle 1.8C-Programm über das Ortho Immunocount II-Programm (Ortho Diagnostic Systems, Deutschland) bearbeitet.

Statistische Auswertung

ANOVA (Analysis of Variance)-Modell

Die Daten x_{ij} sind Werte, die unabhängige Zufallsvariablen X_{ij} annehmen können, für die die Normalverteilung gilt. Als Voraussetzungen werden angenommen, dass die Erwartungswerte mit den Ansätzen variieren können, und dass die verschiedenen Stufen eines Faktors die Zielvariable in den verschiedenen Ansätzen gleichsinnig beeinflussen. Es soll keine Wechselwirkung zwischen dem Ansatz und dem Faktor existieren. Im Modell prüft die Varianzanalyse folgende Hypothesen:

Zum vorgegebenen Testniveau $\alpha = 0,05$ wird das $(1 - \alpha)$ -Quantil der F-Verteilung mit $m_1 = k - 1$ und $m_2 = (n - 1) (k - 1)$ Freiheitsgraden einer Tabelle der F-Verteilung entnommen. α bezeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art. Er besagt, dass in der Grundgesamtheit H_0 zutrifft, aber aufgrund der Stichprobe verworfen wird. Ist die Prüfgröße $F_{\text{obs}} \geq F_{\alpha, m_1, m_2}$, muss H_0 verworfen werden, anderenfalls gilt H_0 .

Zur statistischen Beurteilung der Testgröße F_{obs} kann außerdem die Wahrscheinlichkeit dafür berechnet werden, den erhaltenen Wert für F_{obs} oder eine noch größere Abweichung von null zufällig zu beobachten: $P_{\text{obs}} = \{ F > F_{\text{obs}} \}$. Statistische Entscheidungsregel: Man verwirft die Hypothese H_0 dann, wenn $P_{\text{obs}} < \alpha$. Führt die Entscheidungsregel zur Ablehnung der Hypothese H_0 , so bezeichnet man die beobachtete Unterschiedlichkeit der Mittelwerte als statistisch signifikant von null verschieden zum Testniveau α . Anderenfalls wird die beobachtete Unterschiedlichkeit unter den gegebenen Bedingungen auch allein durch die zufällige Variabilität erklärt. Die entsprechenden Berechnungen erfolgen mit Hilfe des SAS-Programmes.

Bestimmung des Konfidenzintervalls

Anhand der Daten soll ein zweiseitiges Konfidenzintervall zur Konfidenzwahrscheinlichkeit $(1 - \alpha)$ konstruiert werden. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt. In diesem Fall ist das Konfidenzintervall so breit, dass es den Erwartungswert mit der Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% umfasst. Statistische Entscheidungsregel: Der Unterschied zweier beliebiger X ist dann

nicht auf zufällige Variabilität zurückzuführen, wenn sich die Konfidenzintervalle der X nicht überschneiden (MAU-J, 1994). Die hierzu notwendigen Berechnungen wurden mit Hilfe des SAS-Programms durchgeführt.

Produktmoment – Korrelationskoeffizient nach Pearson und Regression

Um zu beurteilen, wie stark der Zusammenhang zwischen Wachstumsinhibition und Bündelinduktion ist, wird der Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) berechnet. Dieses setzt voraus, dass die Daten intervallskaliert sind, beide Variablen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen und die Variablen in einer linearen Abhängigkeit zueinander stehen. Die Dimension von r ist 1. Diese Maßzahl quantifiziert skalenunabhängig den Gleichlauf der Abweichungen der Beobachtungswerte vom jeweiligen empirischen Mittelwert.

Für die Interpretation spezieller Werte von r gilt: $r = \pm 1$ besagt, dass alle Wertepaare exakt auf einer Geraden liegen. Die Bedingung $r = 0$ besagt, dass sich gleichläufige und gegenläufige Abweichungsprodukte gegenseitig aufheben, und die beiden ausgleichenden Regressionsgeraden ebenfalls die Steigung null aufweisen, in einer Graphik also im Schwerpunkt senkrecht aufeinander stehen. Die beiden Beobachtungsvariablen heißen dann statistisch unkorreliert. Die in einer Punktwolke dargestellten Daten aus denen die Korrelation errechnet wird, werden mit Hilfe einer Regressionsgeraden y beschrieben. Durch die Errechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 kann die Qualität der entsprechenden Regression bestimmt werden. Eine Regression wird als fraglich bezeichnet, wenn $R^2 < \frac{1}{3}$. Sie heißt schwach, wenn $\frac{1}{3} < R^2 < \frac{2}{3}$. Als ausgeprägt wird sie eingestuft, wenn $R^2 > \frac{2}{3}$. Im Rahmen der Beurteilungspflicht gehört die Angabe des Bestimmtheitsmaßes zu jeder Regression (MAU-J, 1994). Alle Korrelationsberechnungen wurden mittels MS Excel[®] durchgeführt.

Ergebnisse

Wachstumskinetik

Wachsen CLEAR-CA 15 und CLEAR-CA 11 in Kulturmedium ohne Paclitaxel / Taxol[®], weisen beide Zelllinien fast identische Verdoppelungszeiten auf (s. Abb.1, Anhang). Nach 51h hat sich die Zahl der CLEAR-CA 15 verdoppelt, nach 54h die der CLEAR-CA 11. Im Wesentlichen unterscheidet sich das Wachstumsverhalten der beiden Nierenzellkarzinom-Zelllinien im Monolayer dadurch, dass die CLEAR-CA 15 die Plateauphase des Wachstums früher erreicht (nach etwa 120h Inkubation).

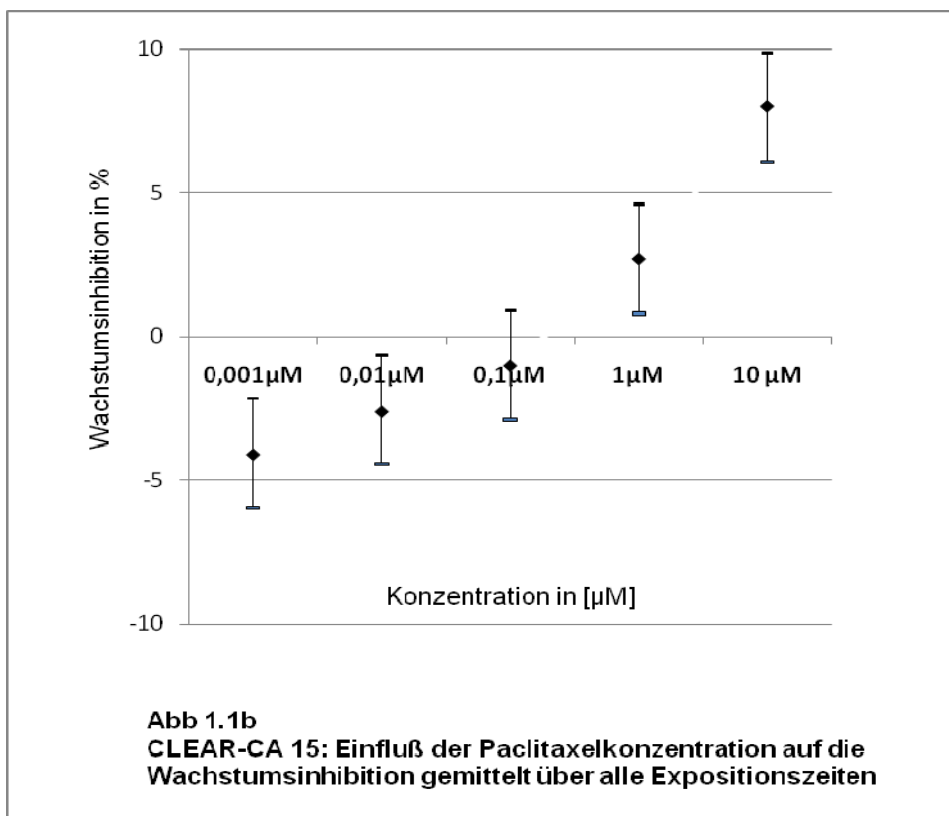
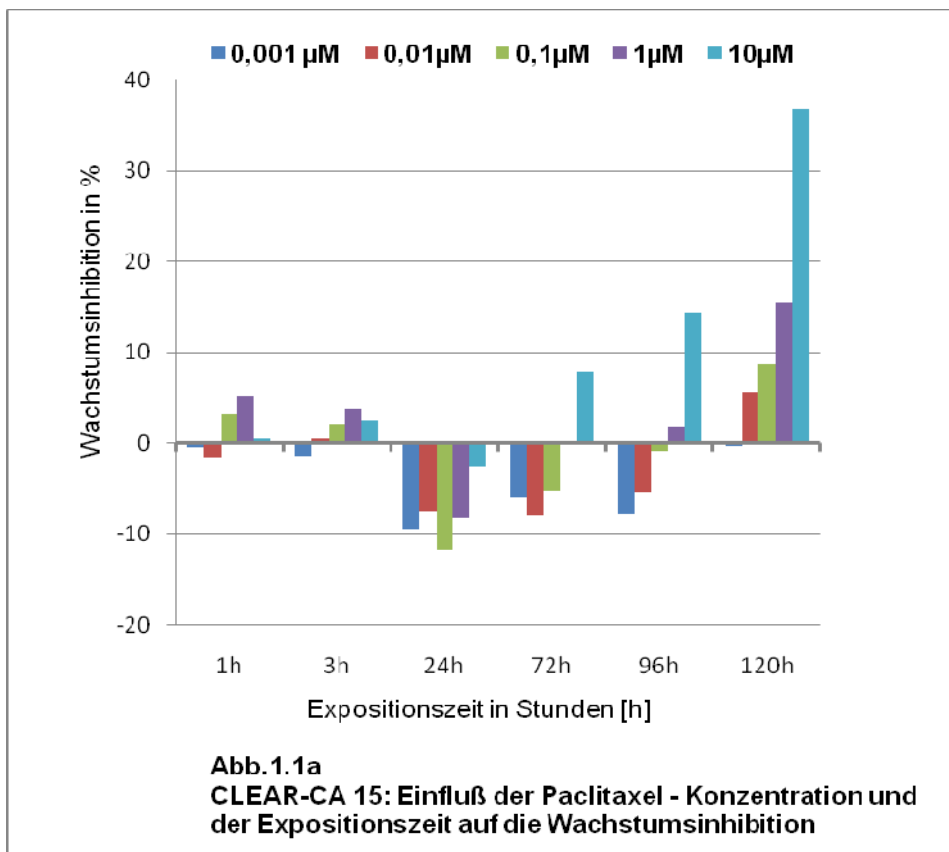
Wachstumshinhibition

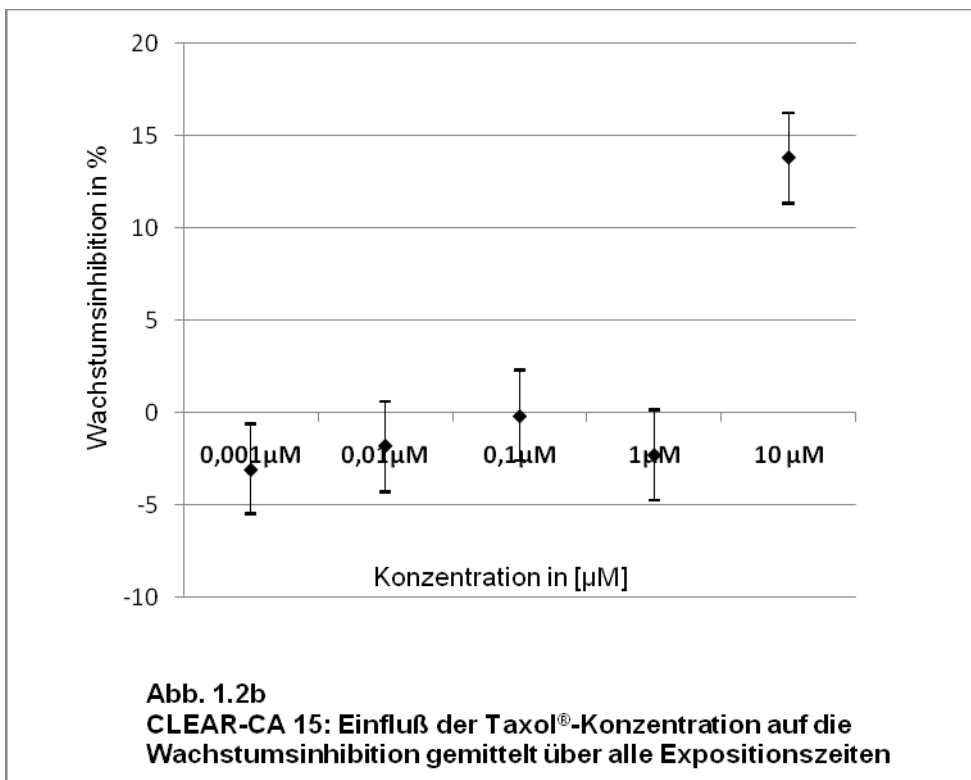
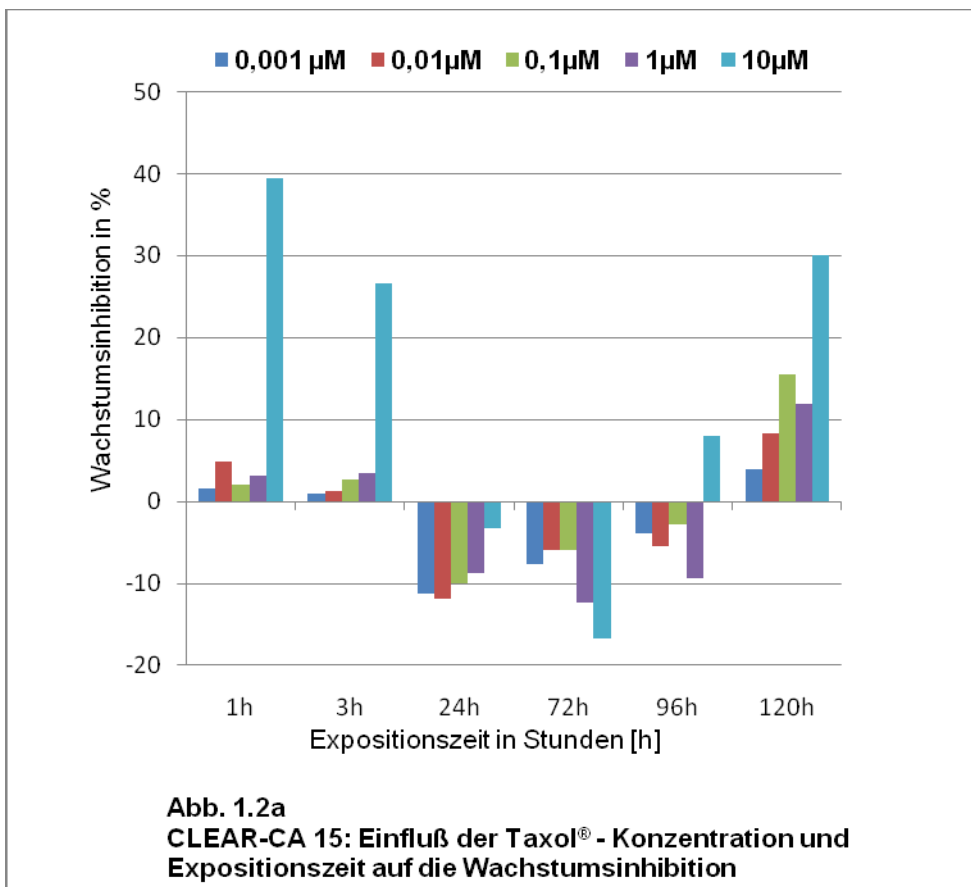
Für CLEAR-CA 15 konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel nach 120h Inkubationszeit einen wachstumshinibierenden Effekt aufweist (Abb. 1.1a). Dieser nimmt mit steigender Konzentration zu und erreicht unter 10 μM Paclitaxel mit 37% sein Maximum. Bei allen anderen getesteten Konzentrationen und Expositionszeiten wird ein geringerer Effekt beobachtet. Bei Expositionszeiten von 24h bis 72h können zum Teil auch Messwerte gefunden werden, die sogar für eine Zunahme des Zellwachstums unter Paclitaxel sprechen.

Mittelt man den Einfluss der Paclitaxel-Konzentration über alle Expositionszeiten (Abb. 1.1b), so ergibt sich ein schwacher wachstumshinibierender Effekt für Konzentrationen von 1 μM und 10 μM , während bei niedrigeren Konzentrationen sogar ein schwach proliferationssteigernder Effekt vorliegt.

Unter Taxol[®] konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden (Abb. 1.2a und b). Auffällig war hier jedoch, dass 10 μM Taxol[®] nach 1h Exposition einen deutlichen zytotoxischen Effekt aufwies, der nach 24h nicht mehr erkennbar war (Abb.1.2a).

Gemittelt über alle Expositionszeiten wurde auch hier der stärkste wachstumshinibierende Effekt für 10 μM gefunden (Abb. 1.2b).



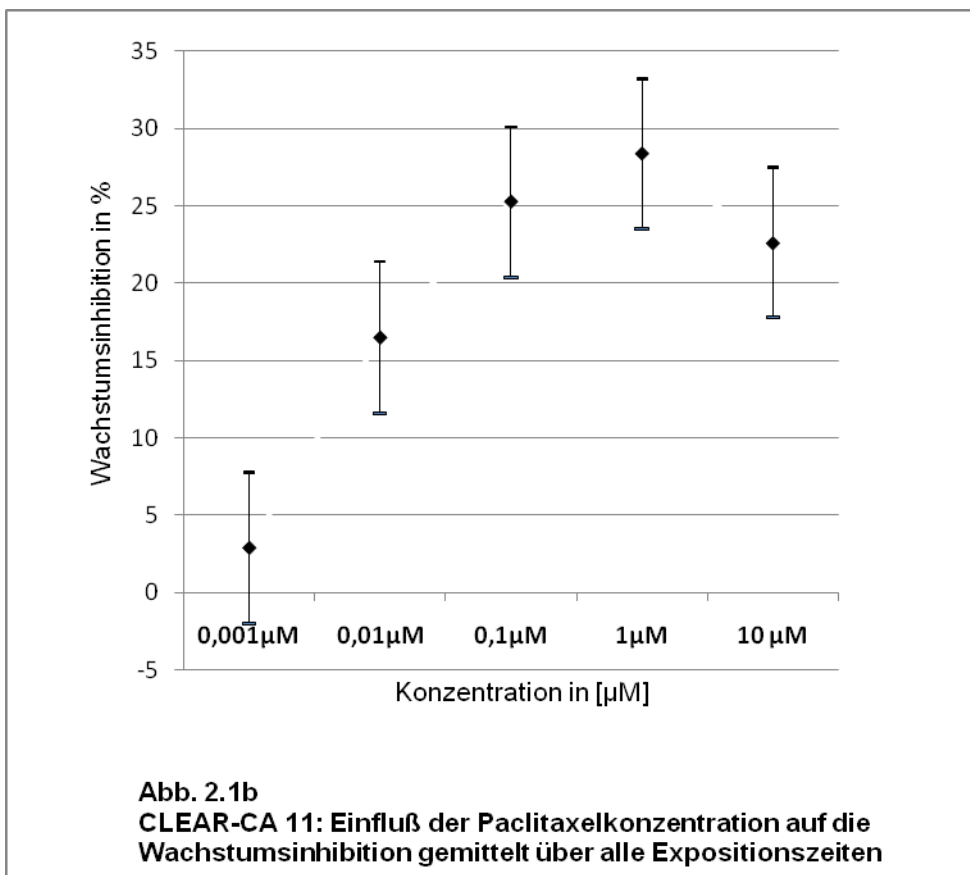
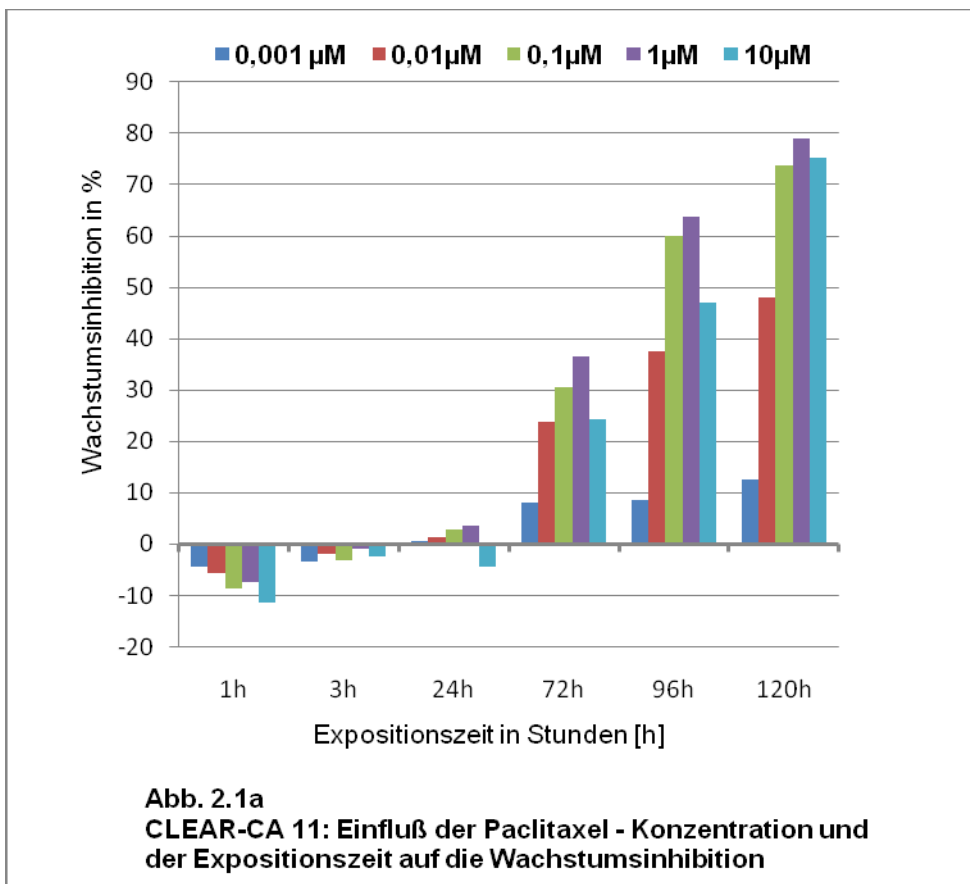


Deutlich stärker als CLEAR-CA 15 reagierte CLEAR-CA 11. Hier konnten ausgeprägte zeit- und konzentrationsabhängige Effekte gezeigt werden:

Für Paclitaxel zeigte sich zwischen 0,001 und 1 μ M ab einer 24h Exposition eine deutliche Zunahme des wachstumshemmenden Effektes (Abb. 2.1a). Das Maximum von 80% wurde nach 120h unter 1 μ M erreicht. Für alle Expositionszeiten zeigte sich unter 10 μ M eine paradoxe Effekturnkehr mit geringerer Wachstumsinhibition. Dieser Effekt ließ sich auch für den konzentrationsabhängigen Effekt gemittelt über alle Expositionszeiten darstellen (Abb. 2.1b).

Unter Taxol[®] konnten entsprechende Effekte dargestellt werden. Hier zeigte sich allerdings, dass bereit bei geringeren Taxol[®]-Konzentrationen (0,001 und 0,01 μ M) ein stärkerer wachstumshemmender Effekt auftrat als unter Paclitaxel (Abb. 2.2a). Dieser Effekt ließ sich durch höhere Taxol[®]-Konzentrationen nur unwesentlich steigern. Auch hier trat unter 10 μ M die für Paclitaxel vorgeschriebene Effekturnkehr auf.

Analog zu CLEAR-CA 15 ließ sich auch hier nach 1h Exposition mit 10 μ M Taxol[®] ein deutlicher zytotoxischer Effekt darstellen, der für Expositionszeiten ab 24h nicht reproduzierbar war.



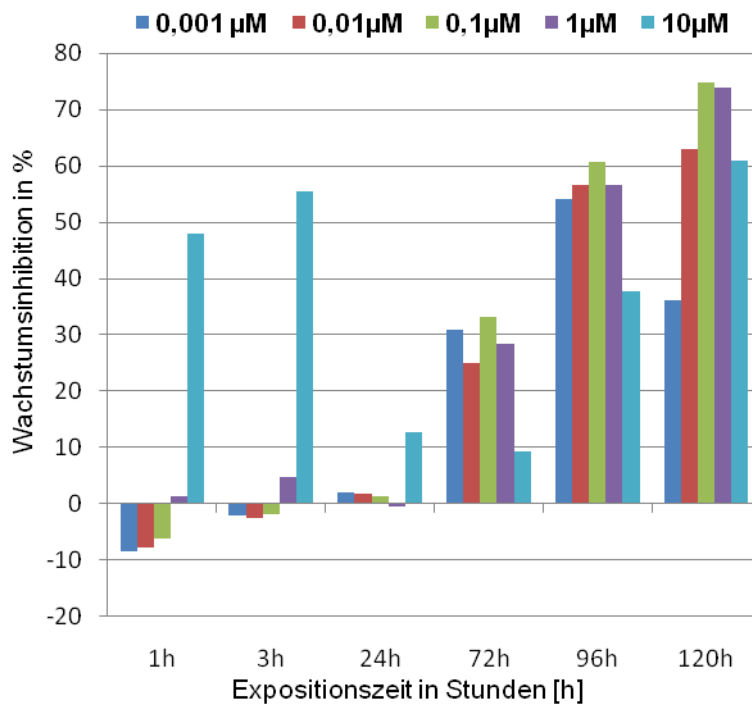


Abb. 2.2a
CLEAR-CA 11: Einfluß der Taxol® - Konzentration und Expositionszeit auf die Wachstumsinhibition

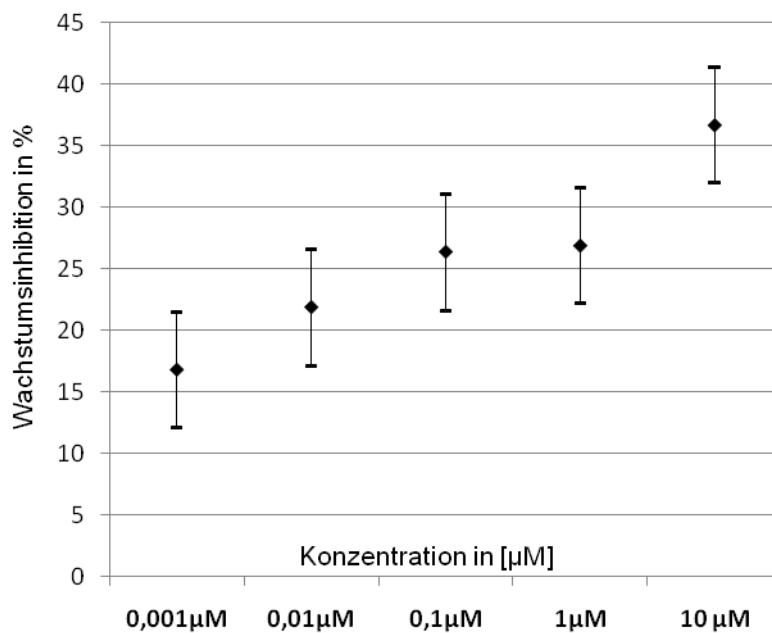


Abb. 2.2b
CLEAR-CA 11: Einfluß der Taxol®-Konzentration auf die Wachstumsinhibition gemittelt über alle Expositionszeiten

Mikrotubulusbündel

Der Nachweis zytoplasmatischer Mikrotubulusbündel gelang bereits nach 3-stündiger Substanzexposition sowohl mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie als auch durch elektronenmikroskopische Darstellung (Foto 1 – 4). Ausgetestet wurden an beiden Tumorzelllinien 0,001 und 1 μ M Paclitaxel oder Taxol[®] über einen Zeitraum zwischen 1 und 120h. Bestimmt wurde die prozentuale Häufigkeit von Zellen mit Mikrotubulusbündeln.

Dabei ließ sich für die Zelllinie CLEAR-CA 15 unter 1 μ M Paclitaxel eine schwache Bündelinduktion beobachten, die nach 3-stündiger Exposition mit 7% am stärksten war (Abb. 3a). Unter Taxol[®] stellte sich ein vergleichbarer Effekt ein, hier konnte aber auch nach 24h Exposition unter 0,001 μ M ein nennenswerter Effekt dargestellt werden (Abb. 3b).

Bei der Zelllinie CLEAR-CA 11 war die Bündelinduktion unter 0,001 μ M Paclitaxel oder Taxol[®] zu vernachlässigen (Abb. 4.1a und 4.2a).

Unter 1 μ M Paclitaxel oder Taxol[®] konnte dementsprechend mit länger werdender Expositionszeit eine stärkere Bündelinduktion beobachtet werden. Diese lag für Paclitaxel maximal bei 62% nach 120h, für Taxol[®] maximal bei 46% nach 120h (Abb. 4a und 4b). Der maximal erreichbare Wert für Zellen mit Mikrotubulusbündeln lag für Paclitaxel höher als für Taxol[®], unter Taxol[®] wurde jedoch eine stärkere Bündelinduktion bei kürzeren Expositionszeiten beobachtet.

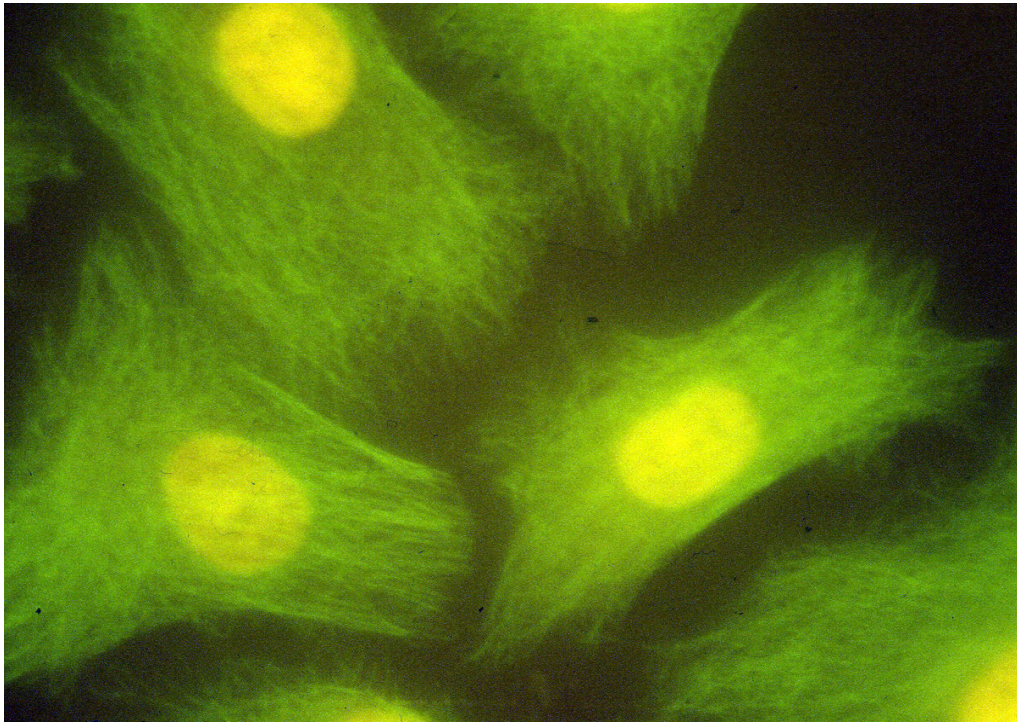


Foto 1: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung einer unveränderten Zelle der CLEAR-CA 15 nach 24h Exposition mit 1 μM Taxol[®]

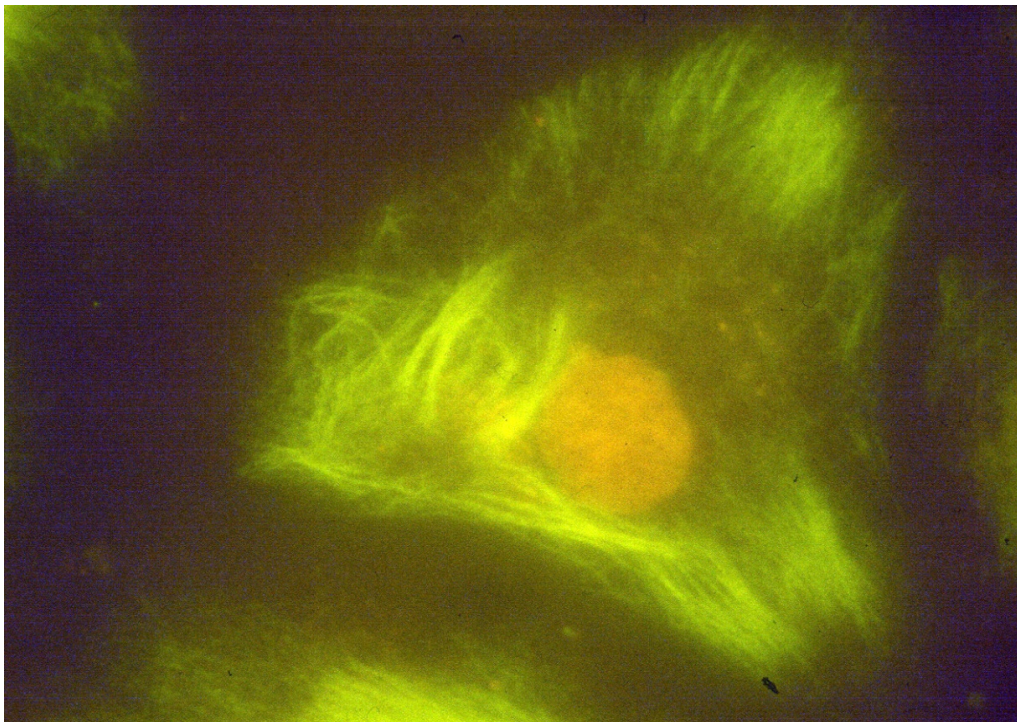


Foto 2: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Zelle der CLEAR-CA 15 mit Mikrotubulubündeln nach 24h Exposition mit 1 μM Taxol[®]

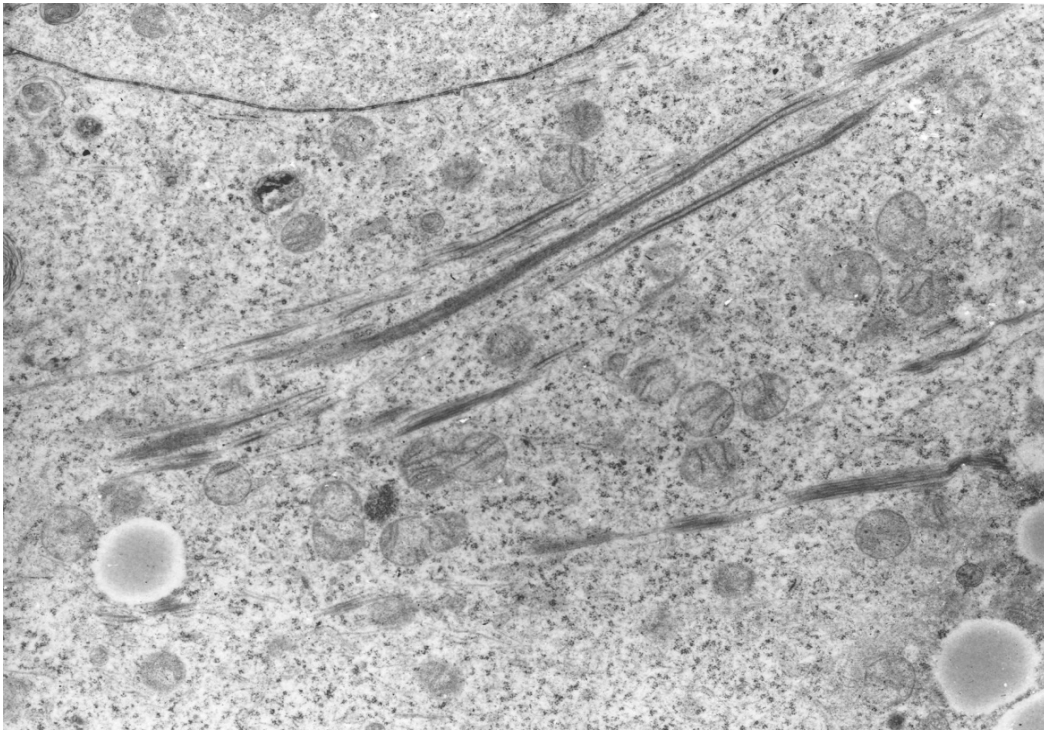


Foto 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von Mikrotubulusbündeln an der CLEAR-CA 11 nach 96h Exposition mit 10 μ M Taxol[®], el. opt. 4.400

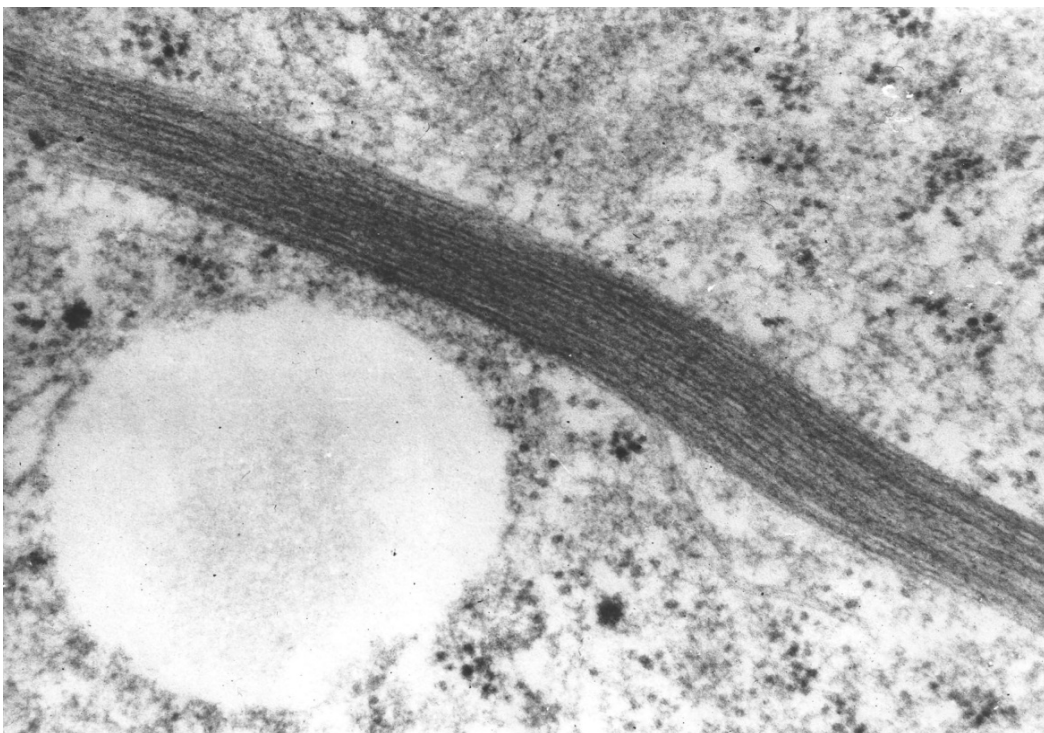


Foto 4: Elektronenmikroskopische Darstellung von Mikrotubulusbündeln an der CLEAR-CA 11 nach 96h Exposition mit 10 μ M Taxol[®], el. opt. 30.000

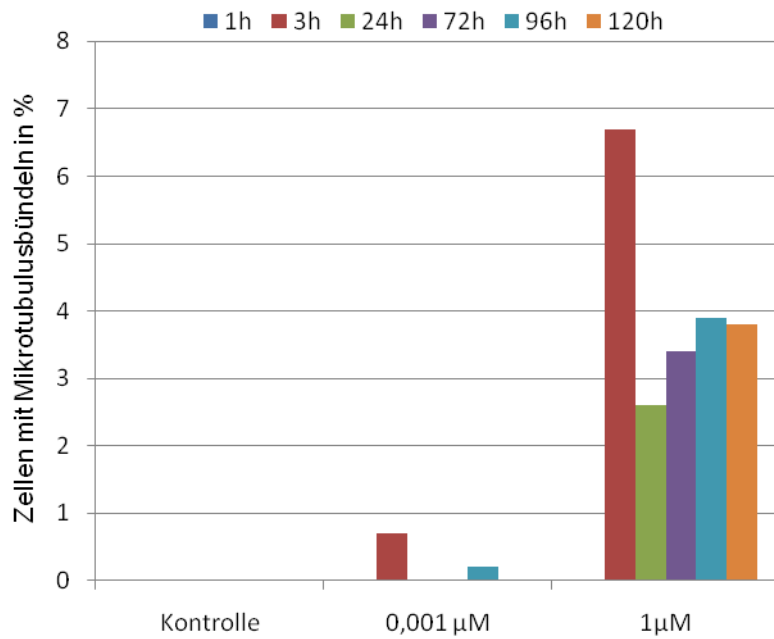


Abb. 3a
CLEAR-CA 15: Zellen mit Mikrotubulusbündeln in % unter verschiedenen Paclitaxelkonzentrationen in µM

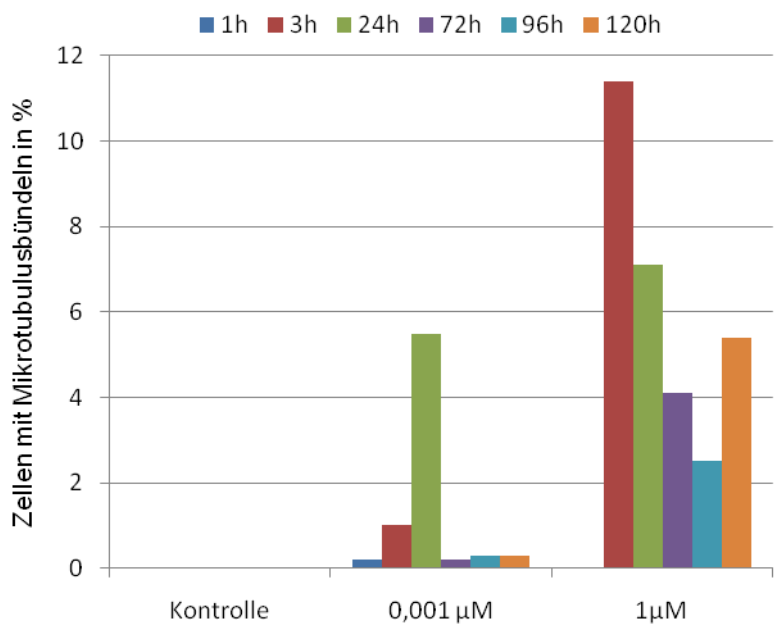
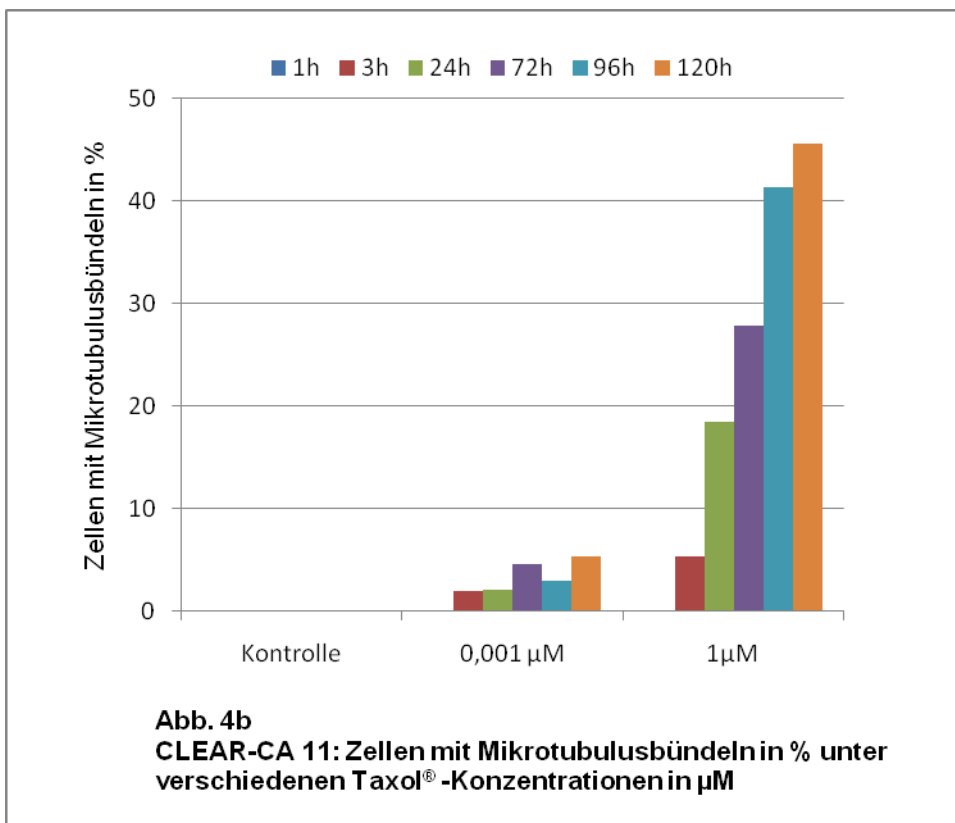
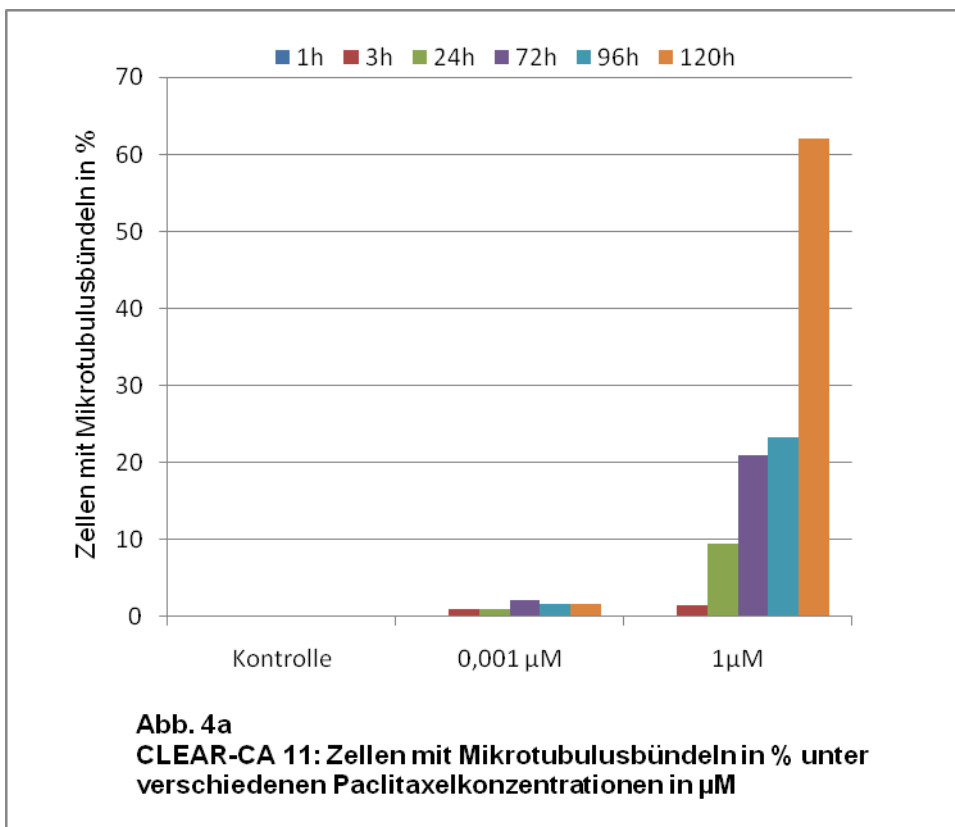
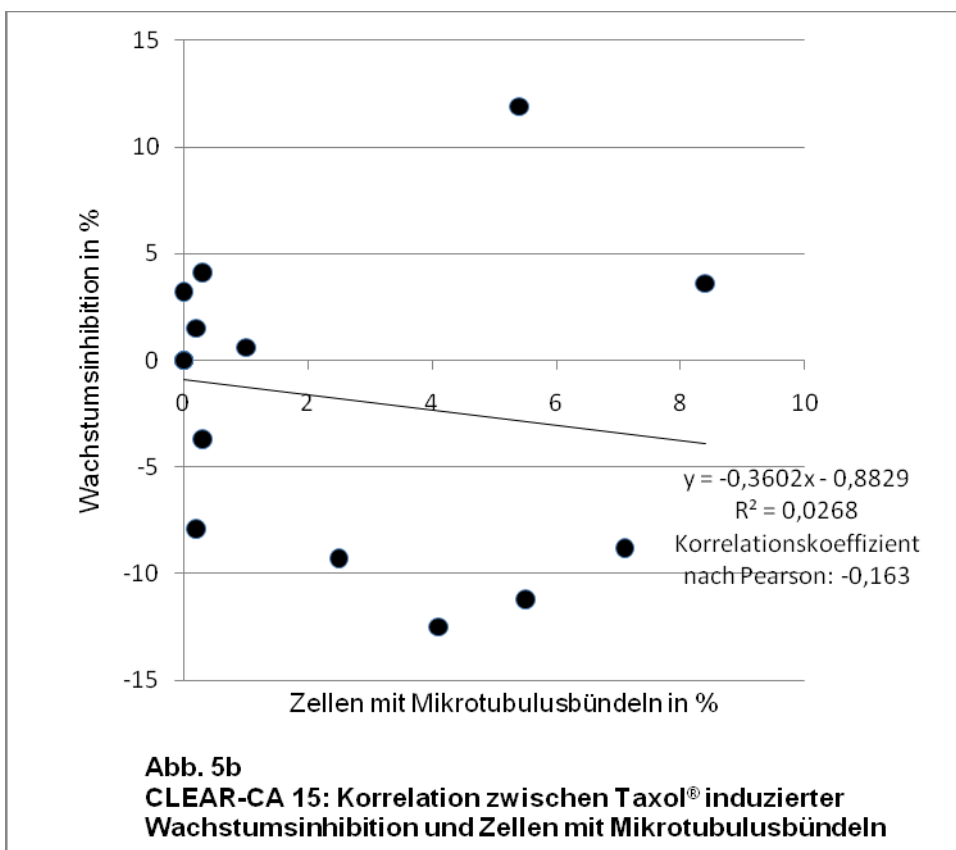
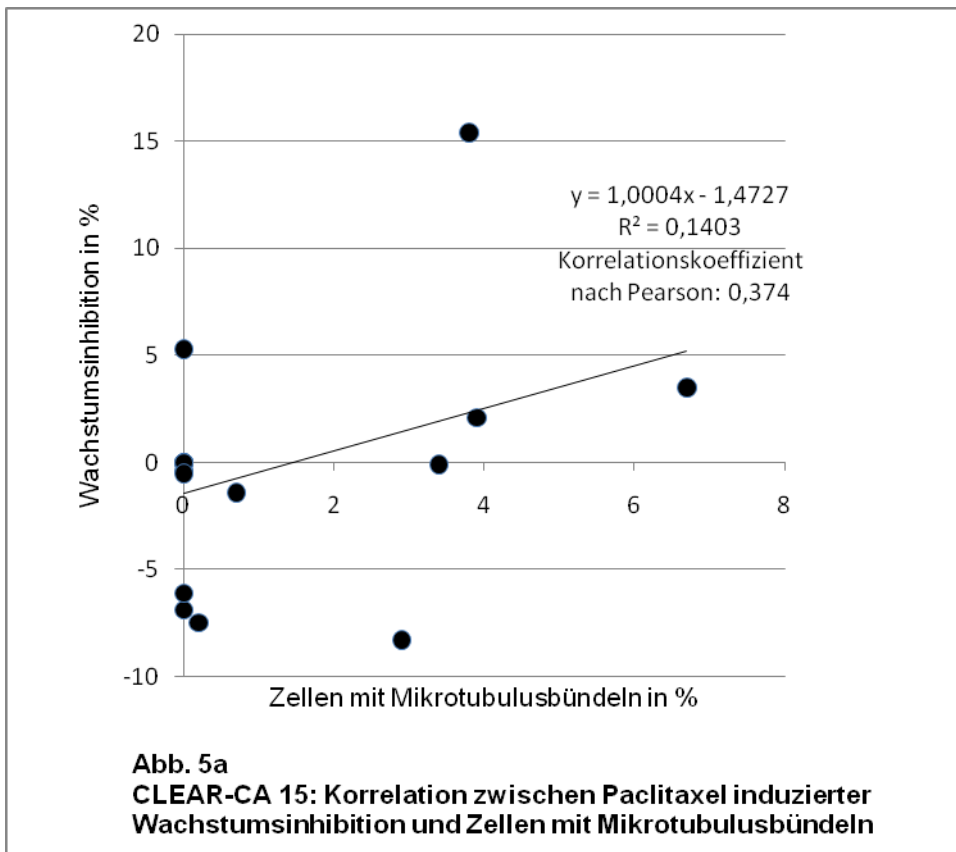


Abb. 3b
CLEAR-CA 15: Zellen mit Mikrotubulusbündeln in % unter verschiedenen Taxol®-Konzentrationen in µM



Besonders eindrucksvoll war die Analogie in der Zeitabhängigkeit von Wachstumsinhibition und Bündelinduktion. Um den Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen quantitativ zu erfassen, wurde getrennt nach Tumorzelllinie und Medikament der entsprechende Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt. Die Berechnungen ergaben, dass für CLEAR-CA 11 ein enger Zusammenhang zwischen der nach einer bestimmten Expositionsdauer und unter einer bestimmten Konzentration erreichbaren Wachstumsinhibition und der entsprechenden Häufigkeit an Zellen mit Mikrotubulusbündeln besteht (Korrelationskoeffizient nach Pearson: Paclitaxel = 0,933, Taxol[®] = 0,805) (Abb. 6a und 6b).

Aus diesen Werten kann folgende Aussage abgeleitet werden: je stärker die Wachstumsinhibition, desto höher die Frequenz an Zellen mit Mikrotubulusbündeln. Für die CLEAR-CA 15 ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht darstellen (Abb. 5a und 5b).



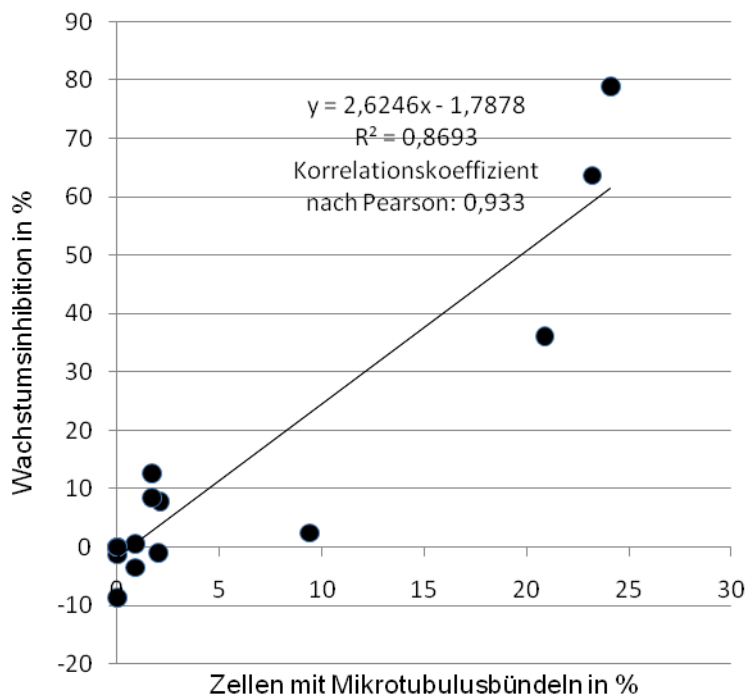


Abb. 6a
CLEAR-CA 11: Korrelation zwischen Paclitaxel induzierter Wachstumsinhibition und Zellen mit Mikrotubulusbündeln

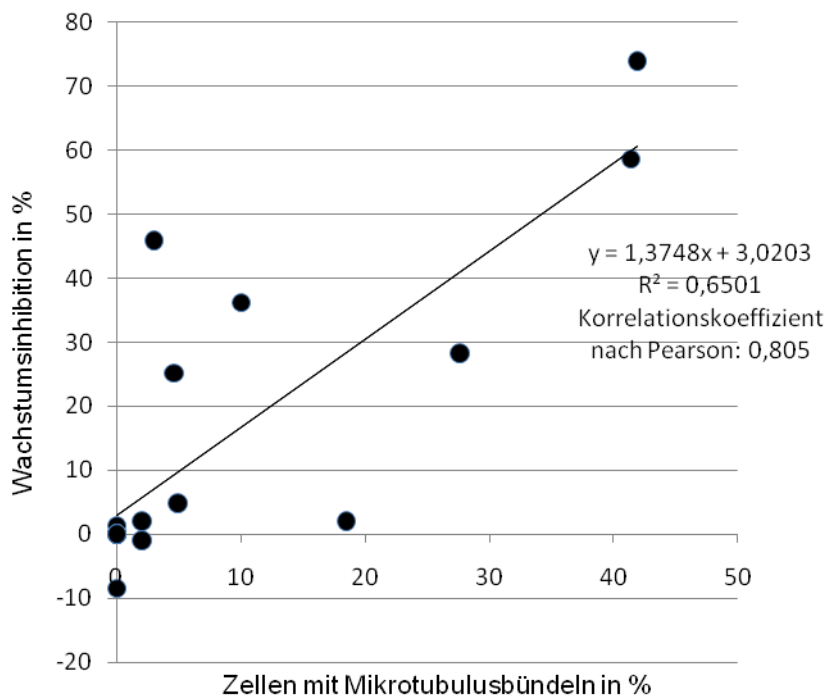


Abb. 6b
CLEAR-CA 11: Korrelation zwischen Taxol® induzierter Wachstumsinhibition und Zellen mit Mikrotubulusbündeln

Apoptose

Das zytotoxische Potential Paclitaxels bzw. Taxols[®] wird nicht nur auf die typische Induktion von Mikrotubulusbündeln zurückgeführt, sondern es wurde auch beschrieben, dass unter der Substanz vermehrt Apoptosen beobachtet werden können. Dieses Phänomen kann auch an den untersuchten Tumorzelllinien aufgezeigt werden:

Für CLEAR-CA 15 konnte gezeigt werden, dass nach Expositionsdauern von 96 und 120h unter 0,01 bis 10 μ M Paclitaxel oder Taxol[®] vermehrt apoptotische Zellen gefunden werden können (Abb. 7.1a und 7.2a).

Es wird unter Paclitaxel maximal ein Anteil von 9 % apoptotischen Zellen gefunden, unter Taxol[®] 6 %. Bei beiden Substanzen hat die Dauer der Exposition entscheidende Bedeutung für die Apoptosefrequenz: je länger die Exposition, desto höher die Apoptosefrequenz (Abb. 7.3a und 7.4a). Dieser Sachverhalt wird gut abgebildet, wenn der Einfluss der Expositionszeit über alle Konzentrationen gemittelt dargestellt wird (Abb. 7.3b und 7.4b).

Für die Zelllinie CLEAR-CA 11 konnte Entsprechendes gezeigt werden (Abb. 8.1a bis 8.4a). Insgesamt betrachtet war jedoch der maximal erreichbare Anteil apoptotischer Zellen um etwa die Hälfte niedriger als bei der Zelllinie CLEAR-CA 15.

Eine ähnlich gute Korrelation wie zwischen Wachstumsinhibition und Bündelinduktion konnte zwischen Wachstumsinhibition und Apoptosefrequenz nicht gezeigt werden (*Daten siehe Anhang*).

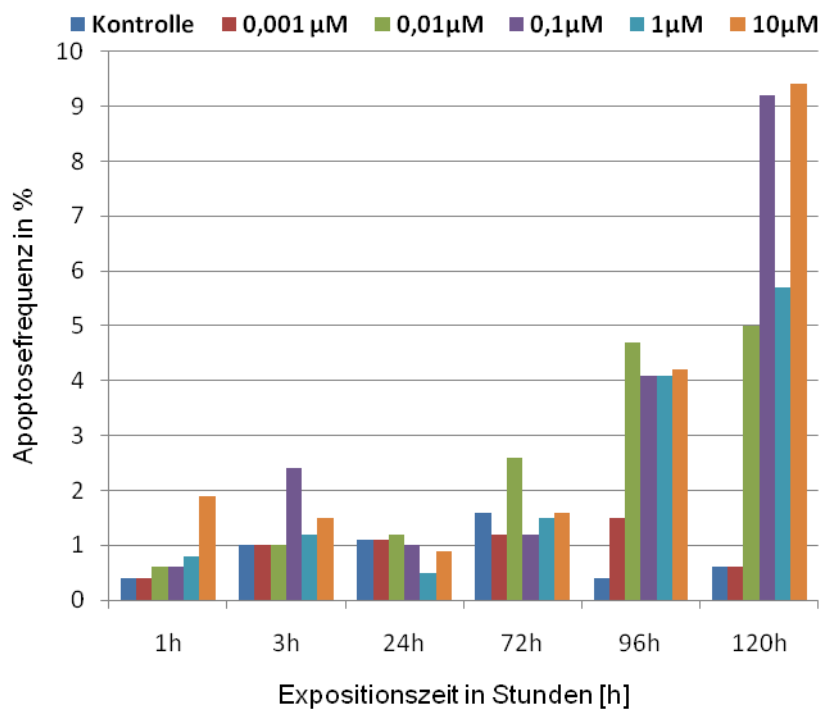


Abb. 7.1a
CLEAR-CA 15: Paclitaxel induzierte Apoptosehäufigkeit in % bei veränderten Expositionszeiten

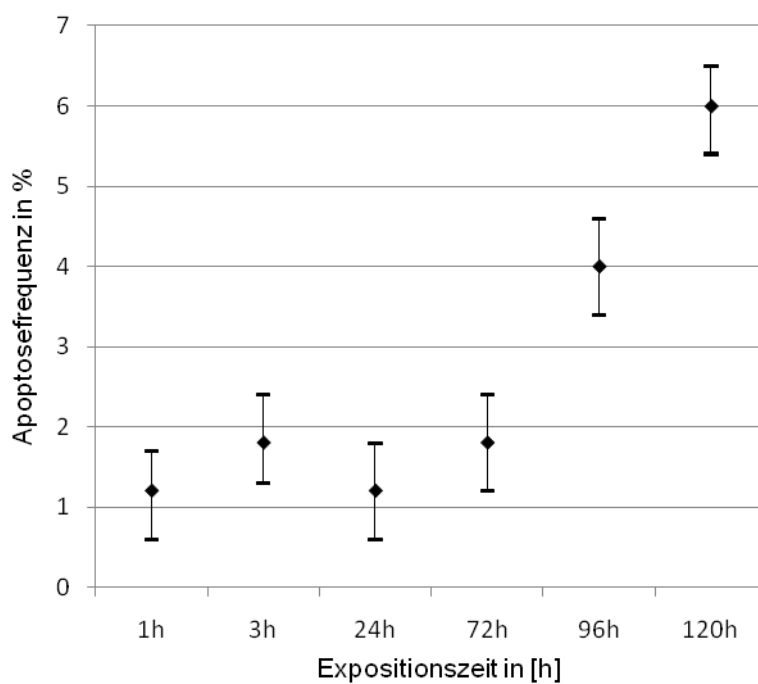
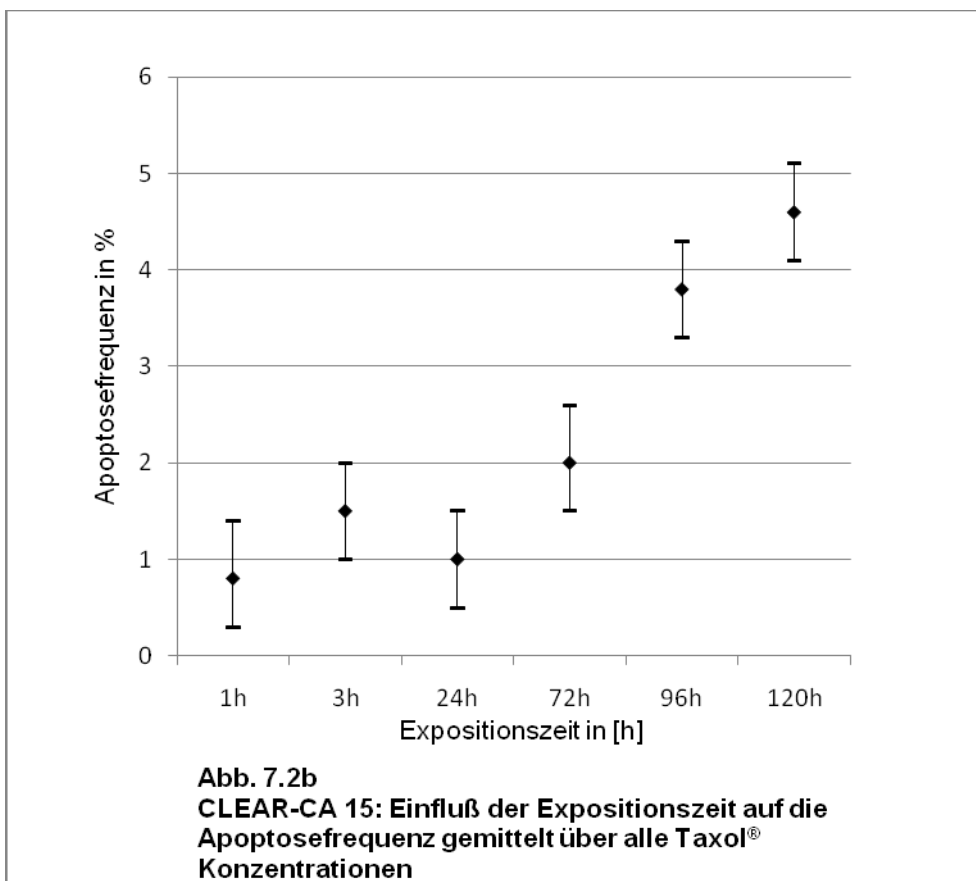
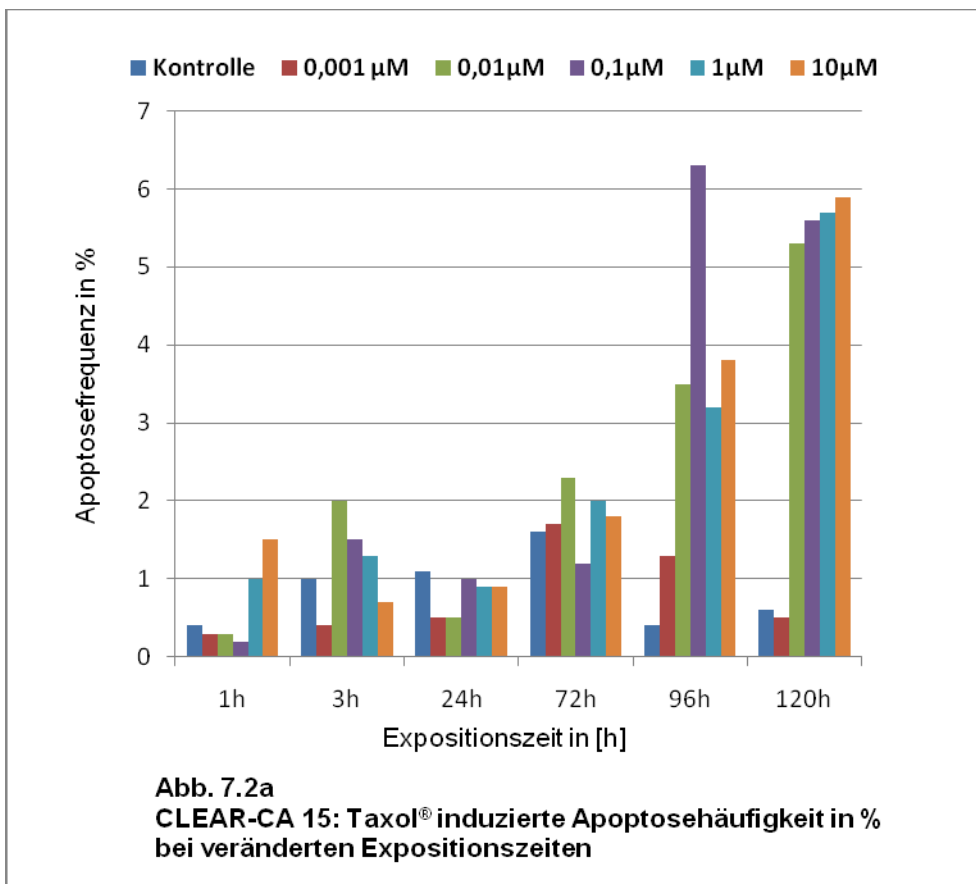


Abb. 7.1b
CLEAR-CA 15: Einfluß der Expositionszeit auf die Apoptosefrequenz gemittelt über alle Paclitaxel - Konzentrationen



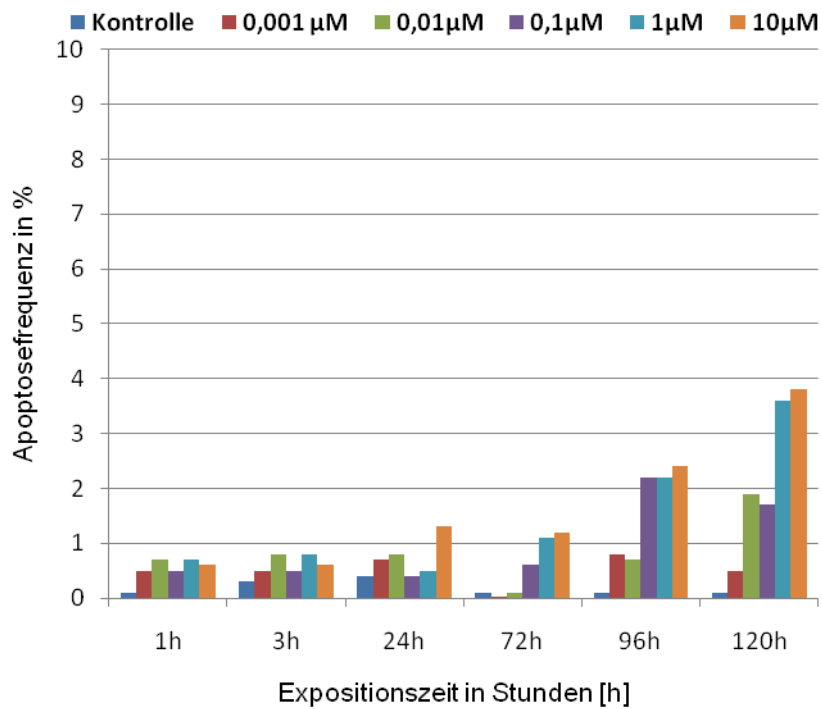


Abb. 8.1a
CLEAR-CA 11: Paclitaxel induzierte Apoptosehäufigkeit in % bei veränderten Expositionszeiten

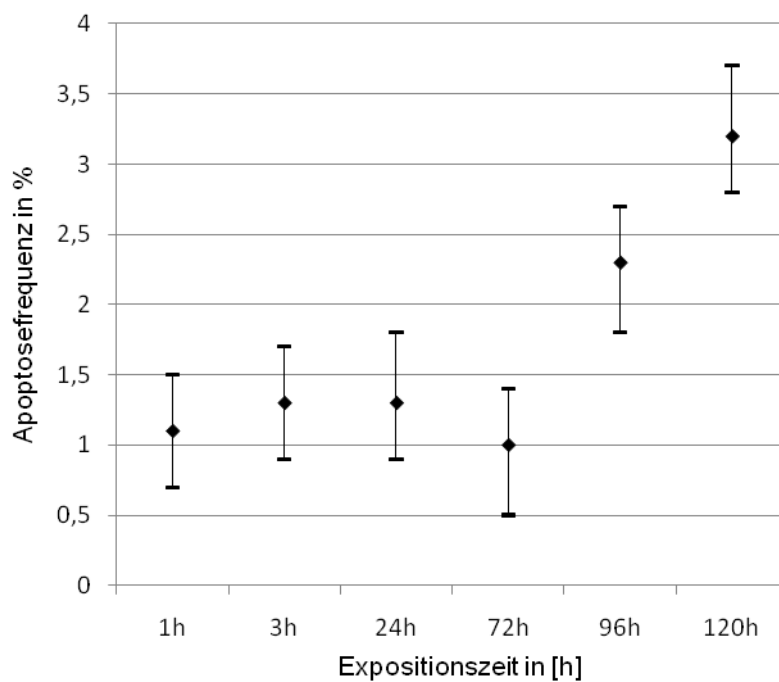
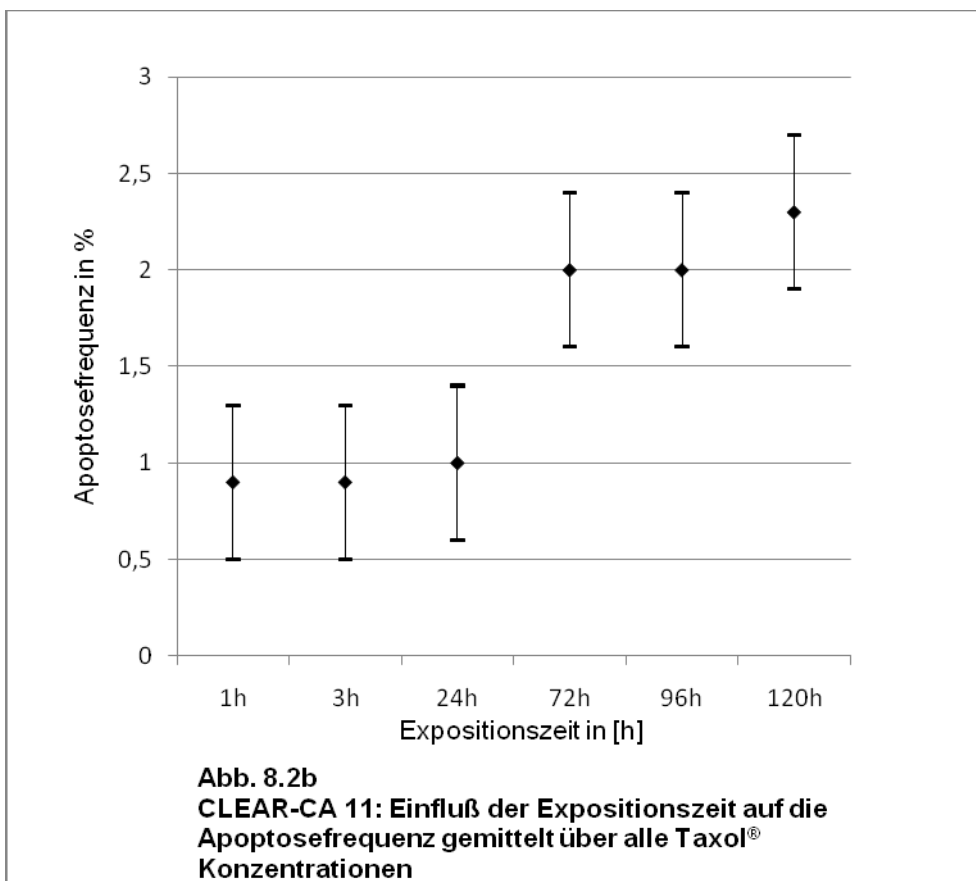
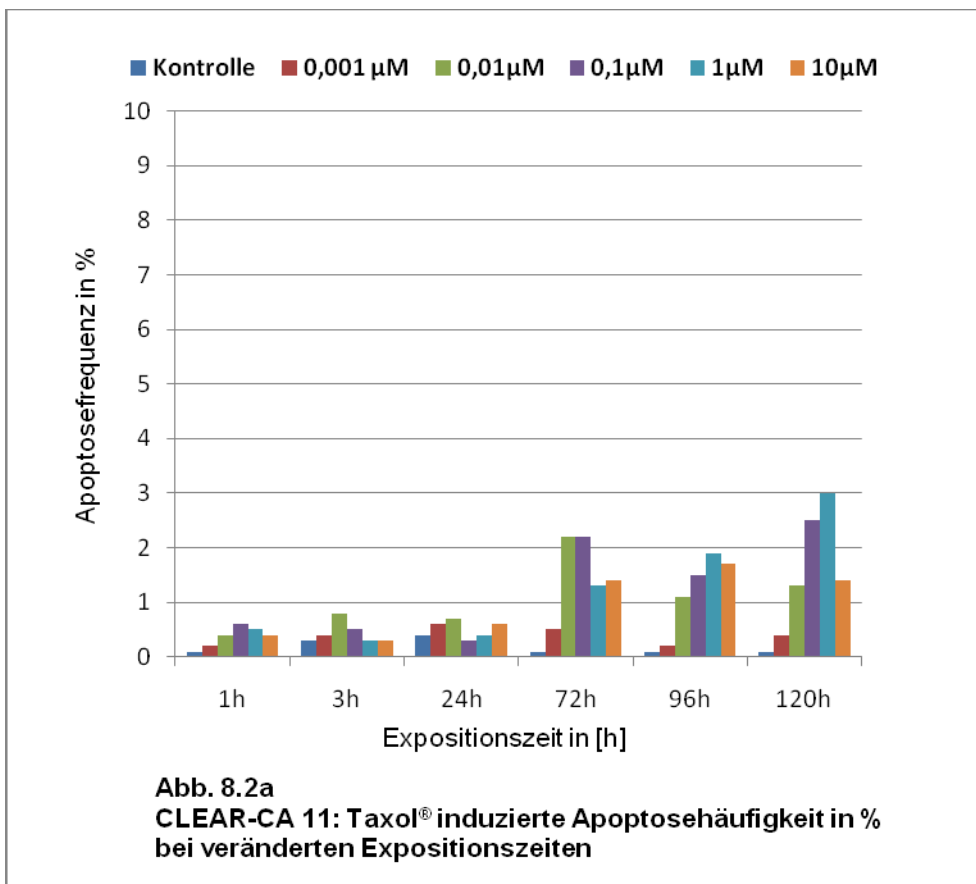


Abb. 8.1b
CLEAR-CA 11: Einfluß der Expositionszeit auf die Apoptosefrequenz gemittelt über alle Paclitaxel - Konzentrationen



Zellzyklusverteilung unter Paclitaxel / Taxol®

Bestimmung des DNA-Index

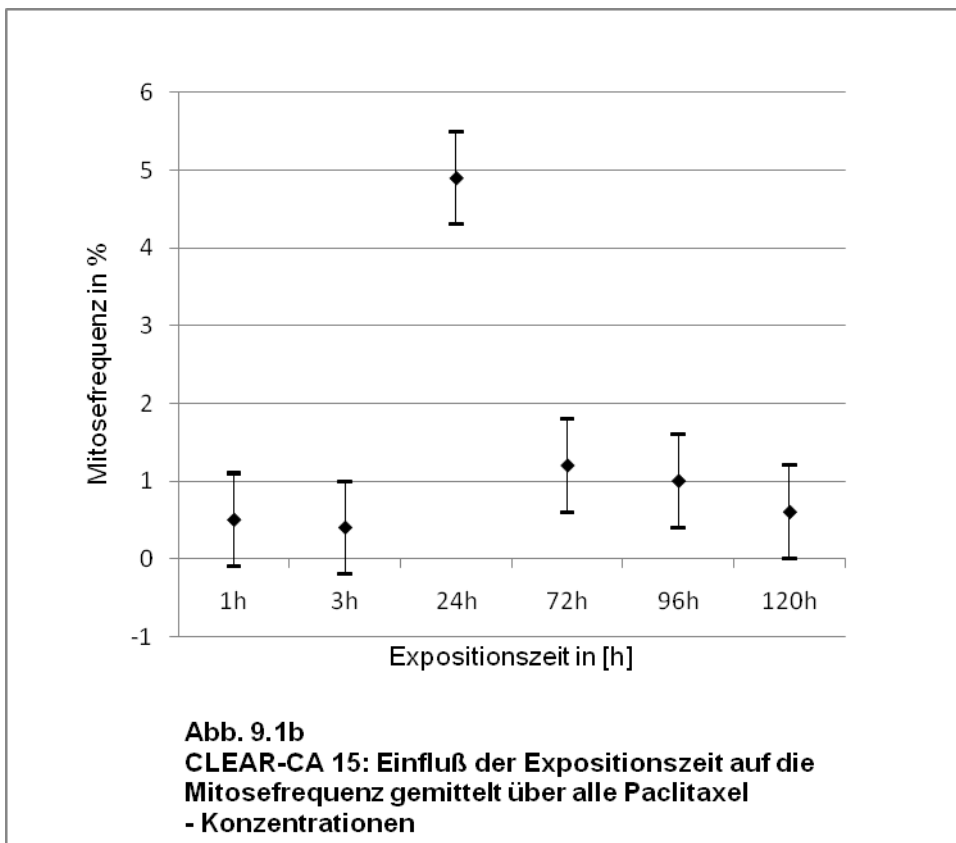
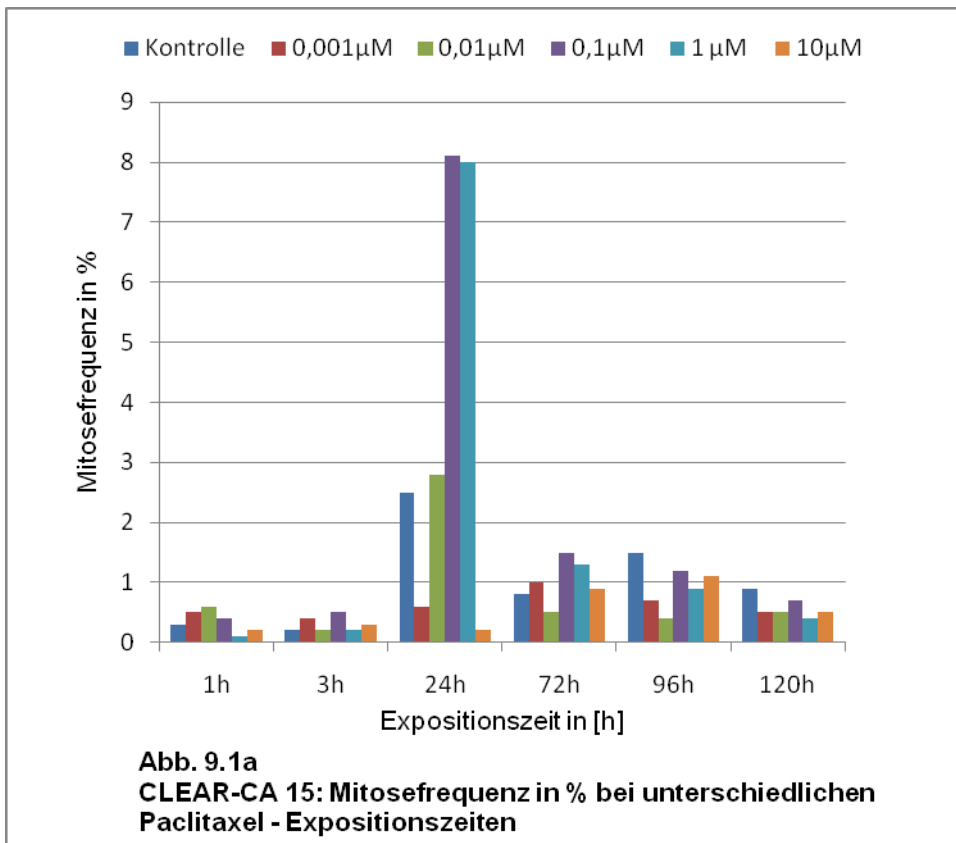
Um die Ausgangslage des G0/G1-Peaks der jeweiligen Tumorzelllinie im Histogramm näher zu charakterisieren, wurde zunächst der DNA-Index mit Hilfe einer sicher diploiden Kontrollpopulation, hier Hühnererythrozyten, bestimmt. Der DNA-Index der Zelllinie CLEAR-CA 11 betrug 1,07, einem DNA-Gehalt von $2n$ entsprechend, der der Zelllinie CLEAR-CA 15 2,31 korrespondierend zu einem aneuploid-hyperploiden DNA-Besatz von $4n + x$.

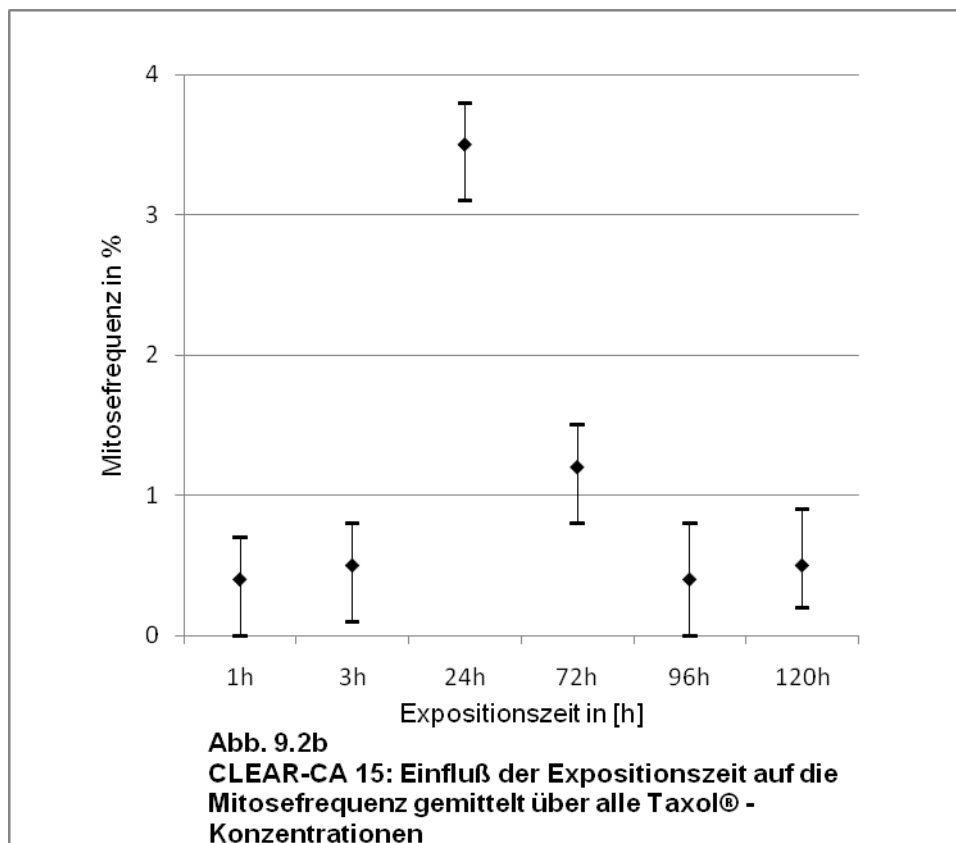
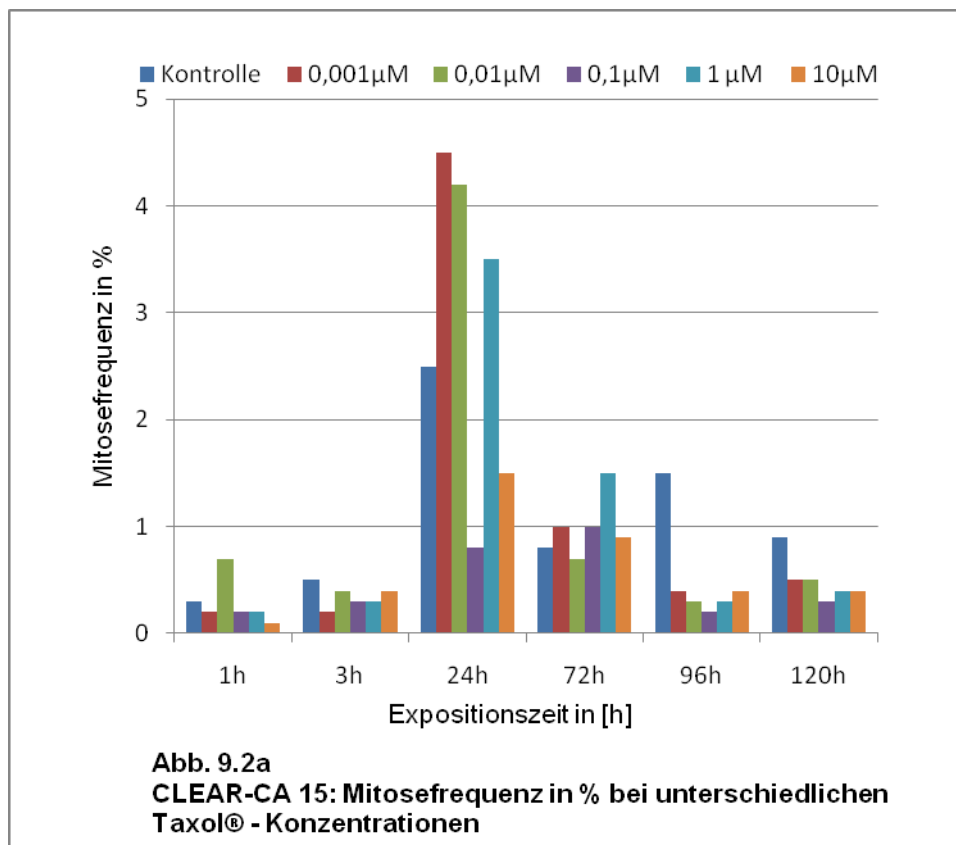
Proliferative Aktivität

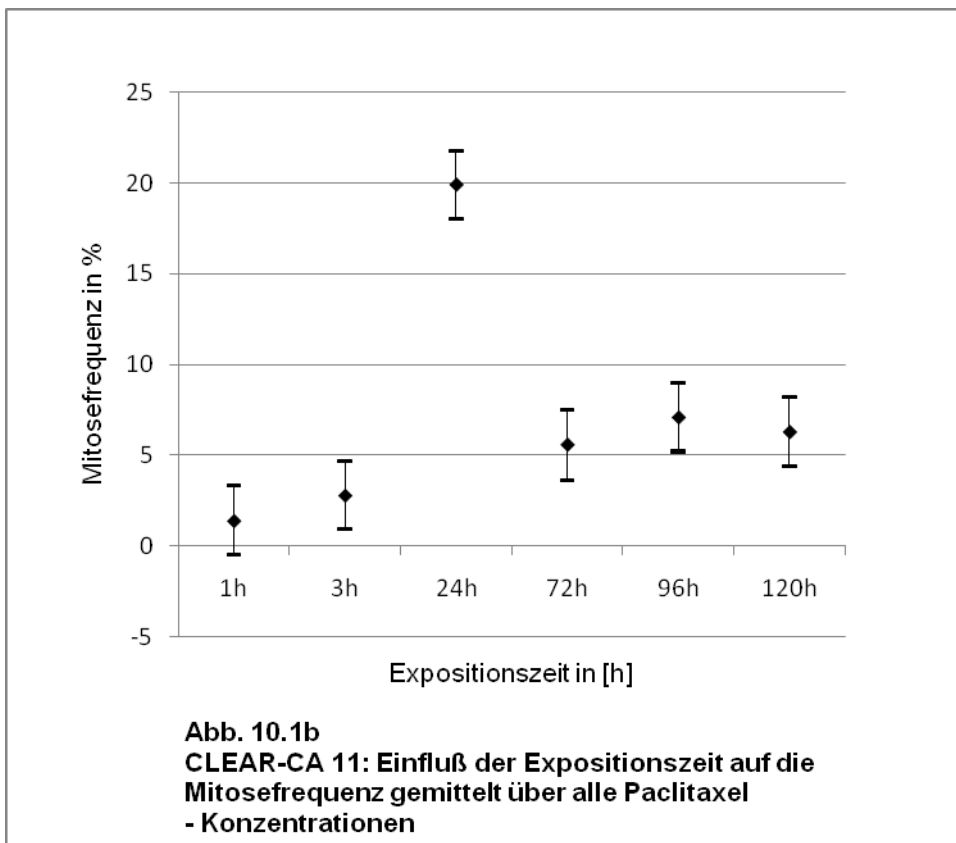
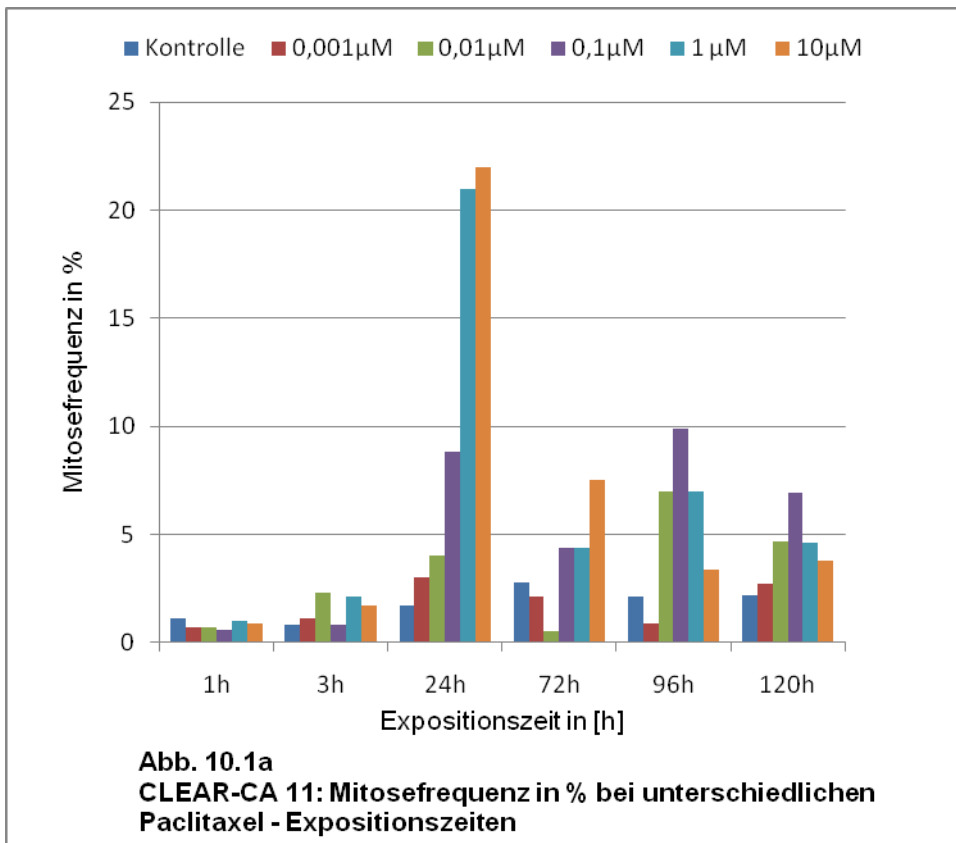
In den Untersuchungen zur Wachstumskinetik der Tumorzelllinien CLEAR-CA 11 und CLEAR-CA 15 zeigte sich, dass die Zellpopulationen in den ersten 24h kaum proliferieren. Erst danach konnte ein verstärktes Zellwachstum nachgewiesen werden (*Abb. 1, Anhang*).

Diese Beobachtung wurde durch die Ergebnisse aus Morphometrie und Zellzyklusverteilung bestätigt. Bewertete man die proliferative Aktivität der Zellpopulation anhand der vorliegenden Mitosefrequenz, so ergab sich aus den Daten der Lichtmikroskopie ein deutlicher Anstieg derselben nach 24h Versuchsdauer, einer insgesamt 48-stündigen Inkubation entsprechend (*Abb. 9.1a bis 9.2b, Abb. 10.1a bis 10.2b*).

Zellen einer diploiden Zellpopulation ($2n$), die morphologisch als mitotisch differenzierbar sind, befinden sich definitionsgemäß im tetraploiden Zustand ($4n$), diejenigen einer aneuploid-hyperploiden Population ($4n + x$) in einem entsprechend verdoppelten Zustand ($8n + 2x$). In der BrdU-DNA-Analyse akkumulierten solche Zellen nach 24-stündiger Versuchsdauer in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dieses Ergebnis stellte sich unabhängig von einer Behandlung mit Paclitaxel / Taxol® ein.







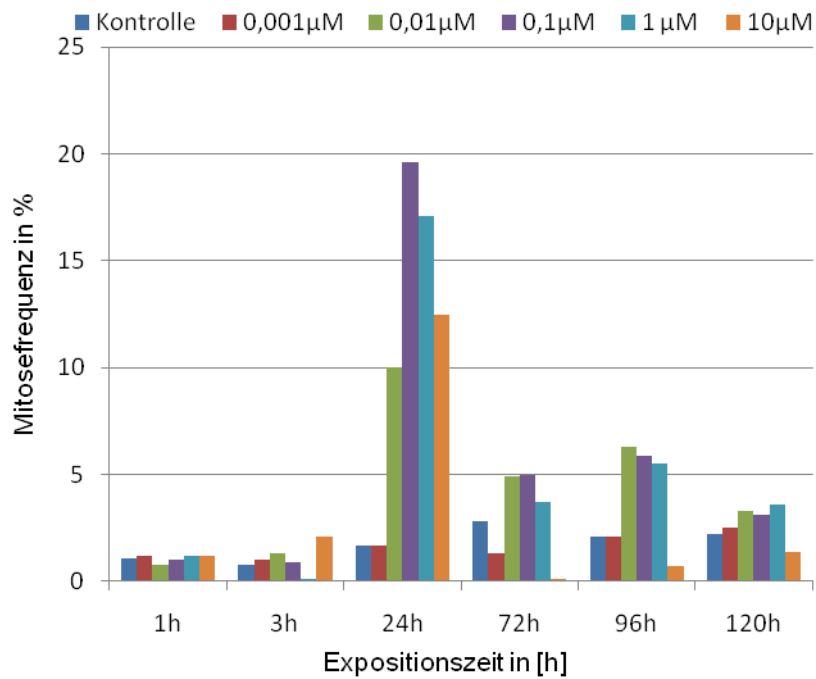


Abb. 10.2a
CLEAR-CA 11: Mitosefrequenz in % bei unterschiedlichen Taxol® - Konzentrationen

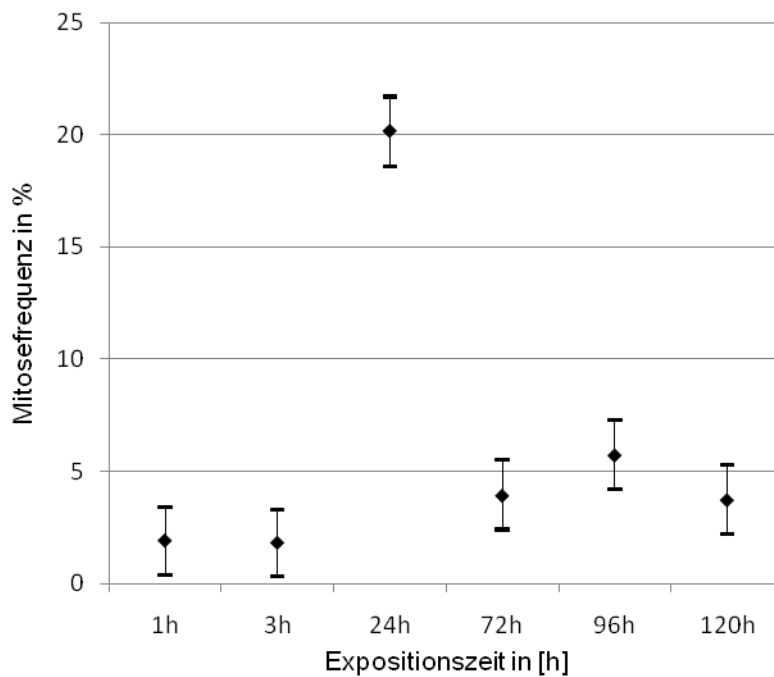


Abb. 10.2b
CLEAR-CA 11: Einfluß der Expositionszeit auf die Mitosefrequenz gemittelt über alle Taxol® - Konzentrationen

Ausbildung von Polyploidie und Micronuclei

Die Wirksubstanz Paclitaxel interferiert mit zellulären Mikrotubuli, die zur Ausbildung der regulären Mitosespindel erforderlich sind und den geordneten Ablauf der sich anschließenden Kern- und Zellteilung ermöglichen. Legt man diese beiden Angriffspunkte zugrunde, lassen sich zum einen Veränderungen nachweisen, die aus dem gestörten Aufbau der Mitosespindel resultieren, zu nennen sind die „Multiple Mitotic Asters“. Zum anderen sollte infolge der irregulär verlaufenden Kern- und Zellteilung die Ausbildung ungeteilter polyploider Tochterzellen erkennbar werden, die kleine Ersatzkerne, sogenannte Mikronuclei, enthalten.

„Multiple Mitotic Asters“ sind irreguläre Mitosefiguren. Als solche entsprach ihr Auftreten dem der zuvor beschriebenen Mitosefiguren insgesamt mit einem Maximum nach 24h Versuchsdauer und unter hohen Substanzdosen (Foto 6).

Gemäß der Wachstumskinetik beider Tumorzelllinien sollten die Zellen während 72-stündiger Versuchsdauer, zuzüglich der 24h Vorlaufzeit, den Zellzyklus zweimal durchlaufen haben. Unter der Annahme, dass die Zellen nicht in der Lage sind, unter Substanzeinfluss eine reguläre Kern- und Zellteilung zu vollenden, müssten also nach diesem Zeitraum alle Zellen einen mindestens einfach verdoppelten Genombesatz aufweisen. Die BrdU-DNA-Analyse (Abb. 13) ergab, dass tatsächlich ein Großteil der Tumorzellen einen solchen einfach verdoppelten DNA-Gehalt aufwies. Diese Beobachtung war sowohl für die Zelllinie CLEAR-CA 11, wie auch für die Zelllinie CLEAR-CA 15 gültig. Korrespondierend hierzu konnte mit Hilfe der Lichtmikroskopie und Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Tumorzellen nach dieser Expositionsdauer auch Mikronuclei enthielt (Foto 5). Unabhängig von der Substanz zeigte sich, dass die Zelllinie CLEAR-CA 15 mehr derartiger Zellen produziert als die CLEAR-CA 11. Für die CLEAR-CA 15 konnte gezeigt werden, dass unter $0,01\mu\text{M}$ Paclitaxel und Taxol[®] der Anteil an Zellen mit Mikronuclei deutlich ansteigt und dass sich dieser Effekt insbesondere unter zunehmender Taxol[®] - Konzentration nicht wesentlich verstärken lässt (Abb. 11.1 und 11.2).

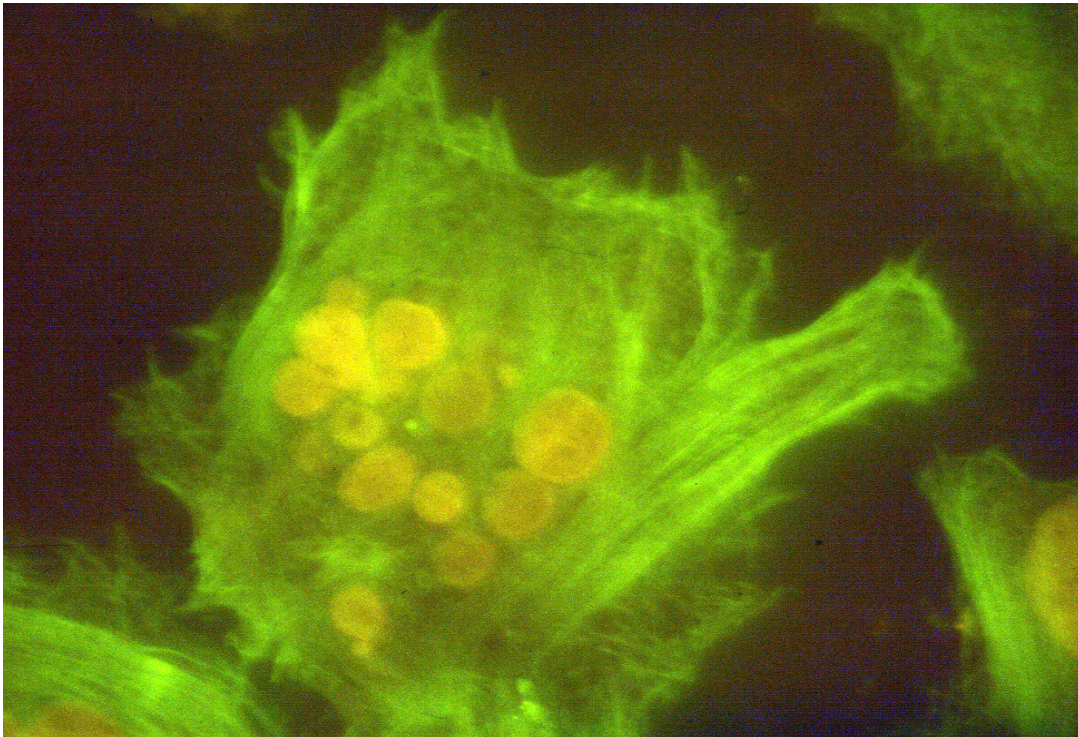


Foto 5: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Zelle der CLEAR – CA 15 mit Mikrotubulusbündeln und Micronuclei nach 96 h Exposition mit 1 μ M Taxol[®]

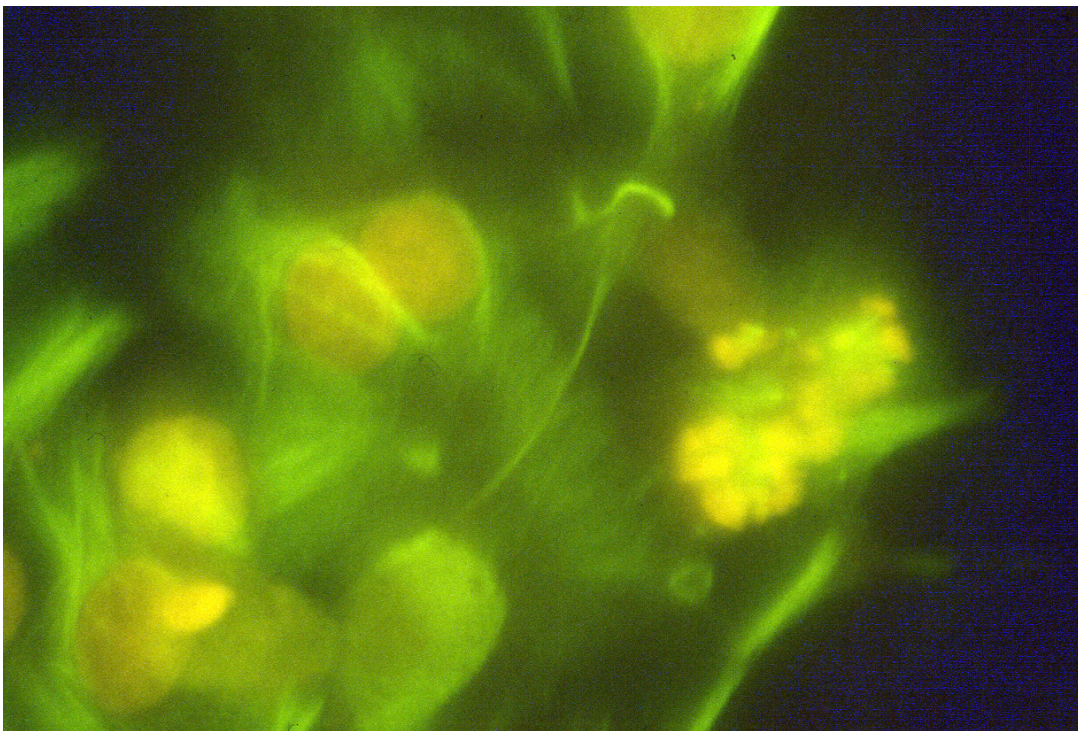
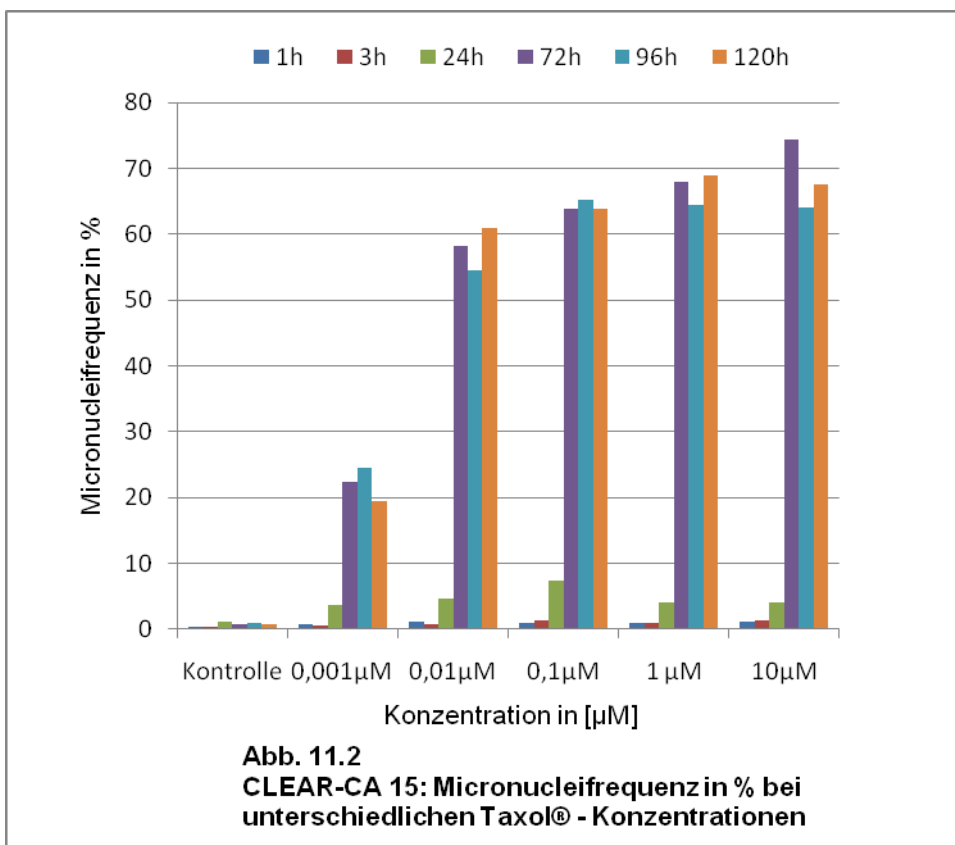
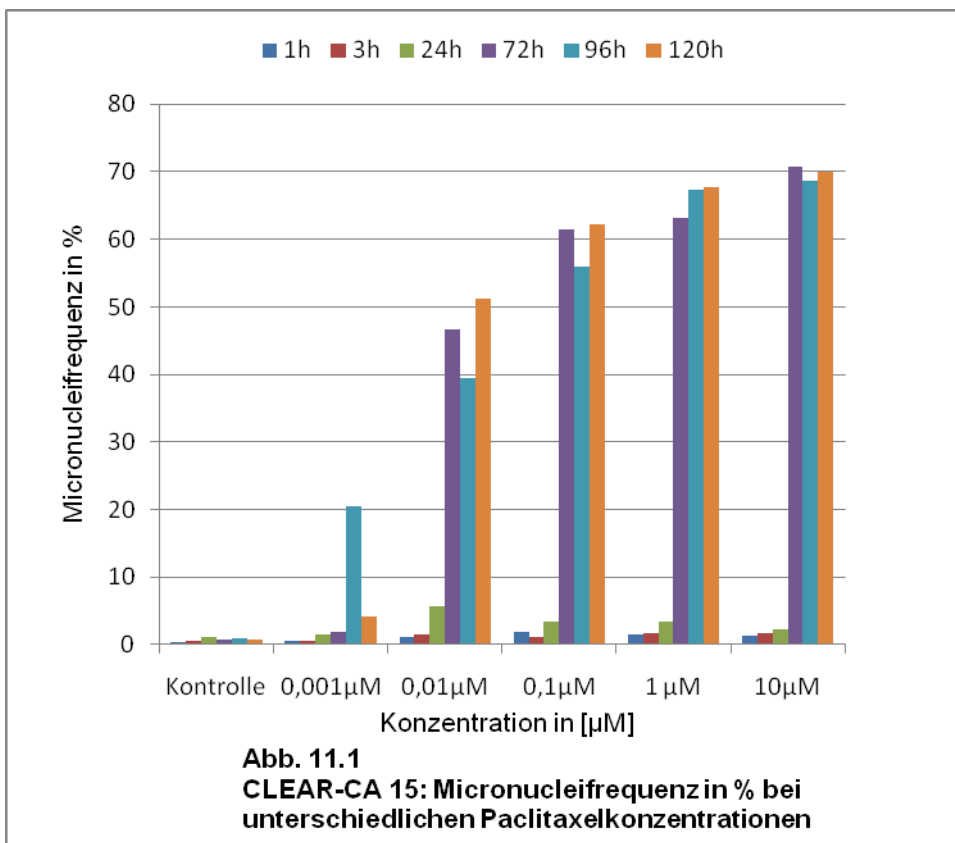


Foto 6: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Zelle der CLEAR – CA 15 mit Mikrotubulusbündeln und einem „Multiple Mitotic Aster“ nach 72 h Exposition mit 1 μ M Taxol[®]



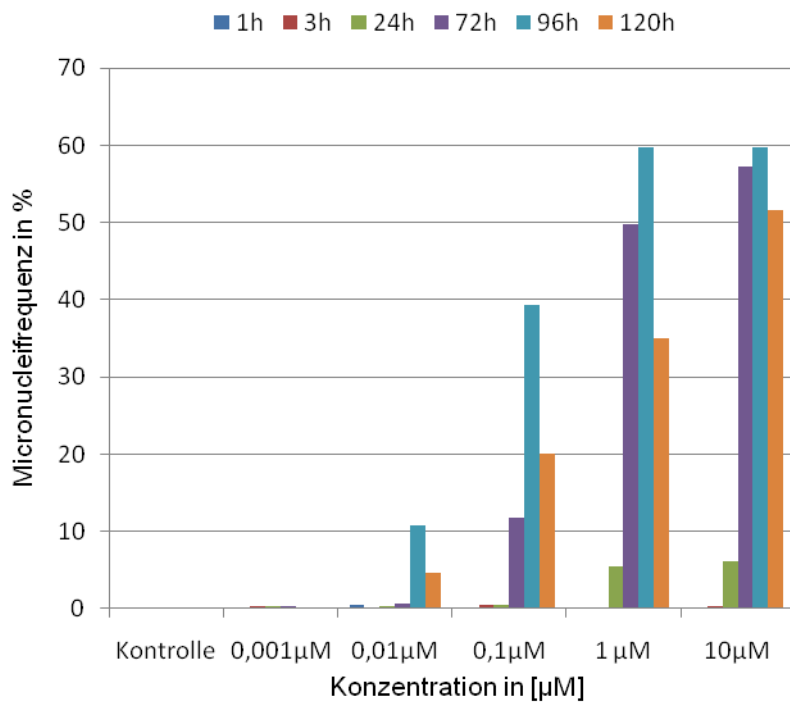


Abb. 12.1
CLEAR-CA 11: Micronucleifrequenz in % bei unterschiedlichen Paclitaxel - Konzentrationen

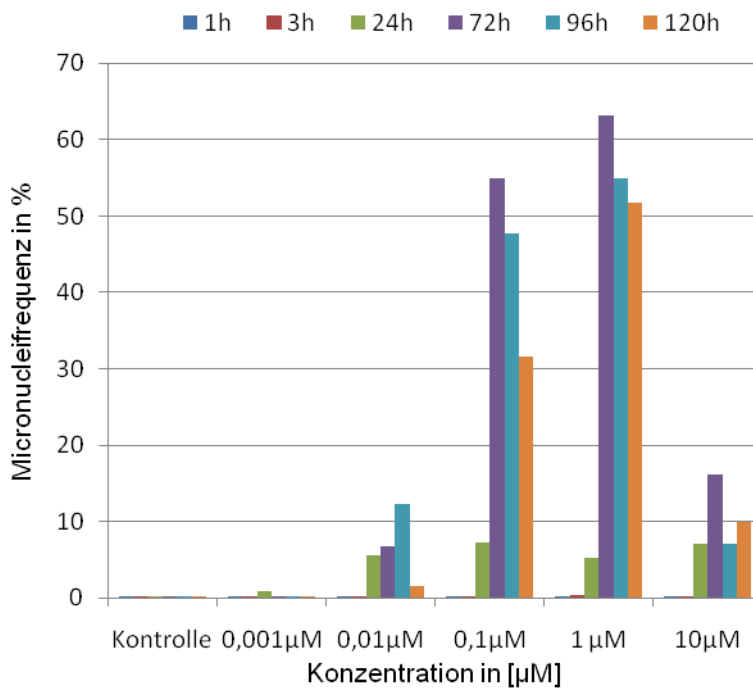


Abb. 12.2
CLEAR-CA 11: Micronucleifrequenz in % bei unterschiedlichen Taxol[®] - Konzentrationen

Der Effekt von Paclitaxel oder Taxol[®] auf die Zellen der CLEAR-CA 11 im Hinblick auf den Anteil der Zellen mit Micronuclei ließ sich deutlich mit steigenden Konzentrationen verstärken (Abb. 12.1 und 12.2). Auffällig war, dass die überlebenden Zellen der Tumorzelllinie CLEAR-CA 11 nach 120h Versuchsdauer und 10 μ M Taxol[®] kaum noch Zellen mit Mikronuclei aufwiesen (Abb. 12.2). Wie bei der Zelllinie CLEAR-CA 15 ließ sich mit zunehmender Expositionsdauer größer 72h kein wesentlich stärkerer Effekt auf die Ausbildung von Mikronuclei erzielen.

DNA-Synthese nach Mitosearrest und DNA-Fragmentierung

Die BrdU-DNA-Analyse erbrachte nicht nur den Nachweis, dass ein Großteil der Zellen in einen Zustand mit einfach verdoppeltem Chromosomensatz übergeht, sondern ermöglichte auch eine Aussage bezüglich der weiteren DNA-Synthese-Aktivität der Tumorzelllinien und einer stattfindenden Kernfragmentierung.

Für die CLEAR-CA 11 konnte gezeigt werden, dass die Zellen, nachdem sie in der G2/M-Phase des Zellzyklus akkumulieren, von dort erneut eine replikative Aktivität starten, wie aus dem kontinuierlichen BrdU-Einbau in die DNA hervorging (Abb. 14). Eine ähnlich scharfe Abgrenzung der Zellzyklusstadien gelang für die CLEAR-CA 15 nicht, aber auch hier war fortgesetzte replikative Aktivität aus einem aneuploid-hyperploiden Zustand erkennbar (Abb. 13)

Die Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung konnten außerdem die Ergebnisse der Lichtmikroskopie hinsichtlich eines vermehrten Auftretens von Apoptose unter Paclitaxel bzw. Taxol[®] untermauern. Apoptotische Zellen werden in der BrdU-DNA-Analyse als fragmentiertes zelluläres Genom mit einem DNA-Gehalt kleiner diploid sichtbar. Dieses Phänomen beobachtete man an beiden Tumorzelllinien ab einer 72-stündigen Exposition mit 1 μ M Paclitaxel oder Taxol[®].

Abb 13a
3 h Kontrolle

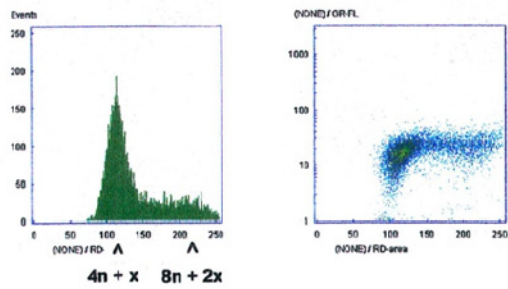
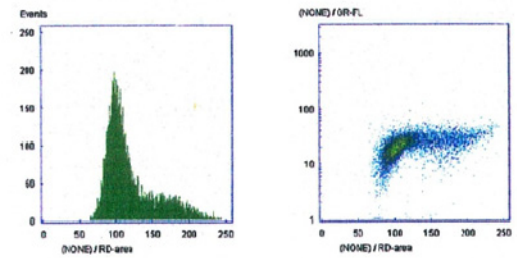
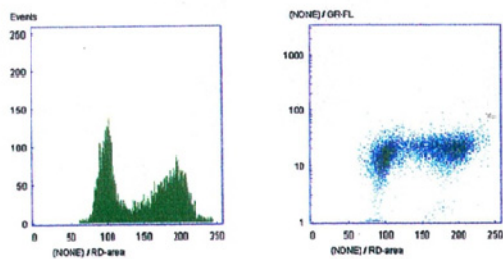


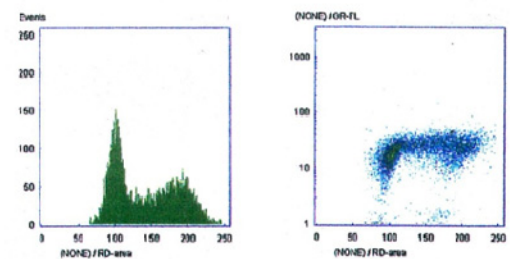
Abb 13b
3 h Exposition



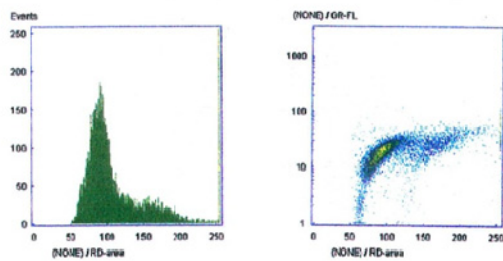
24 h Kontrolle



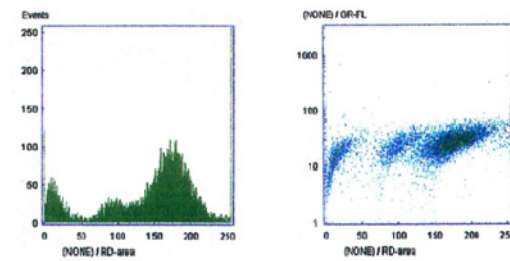
24 h Exposition



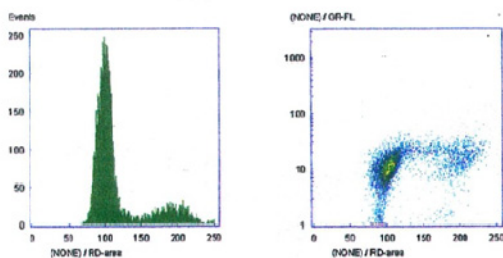
72 h Kontrolle



72 h Exposition



120 h Kontrolle



120 h Exposition

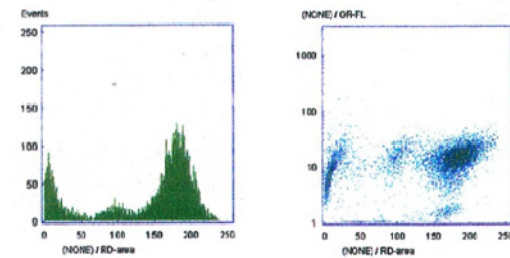


Abb. 13a und 13b
CLEAR-CA 15: Taxol[®] induzierte Zellzyklusverteilung abgebildet in Histo- und Zytogrammen für die Expositionszeiten 3h, 24h, 72h und 120h bei einer Konzentration von 1 μ M gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Abb 14a
3 h Kontrolle

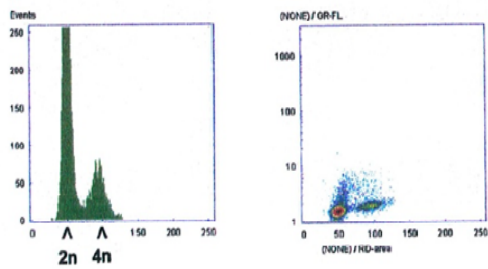
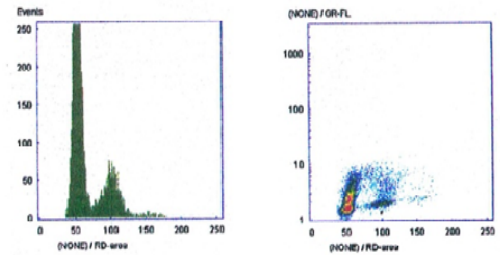
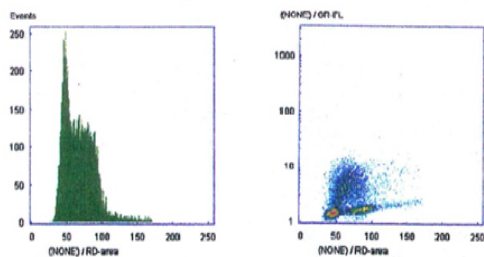


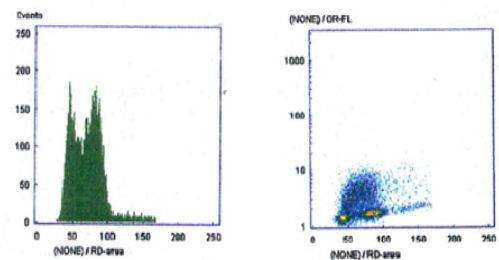
Abb 14b
3 h Exposition



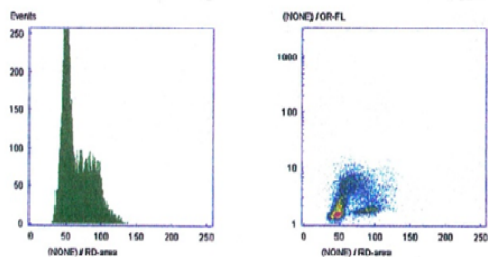
24 h Kontrolle



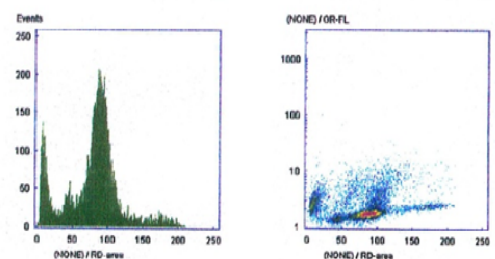
24 h Exposition



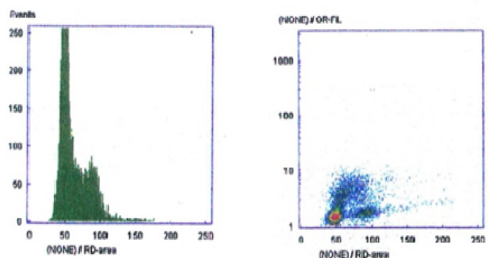
72 h Kontrolle



72 h Exposition



120 h Kontrolle



120 h Exposition

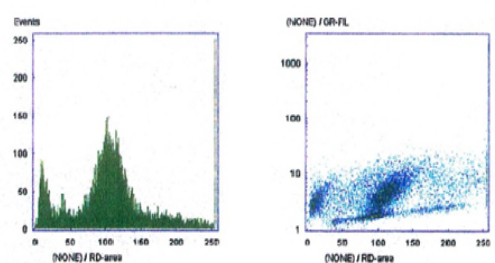
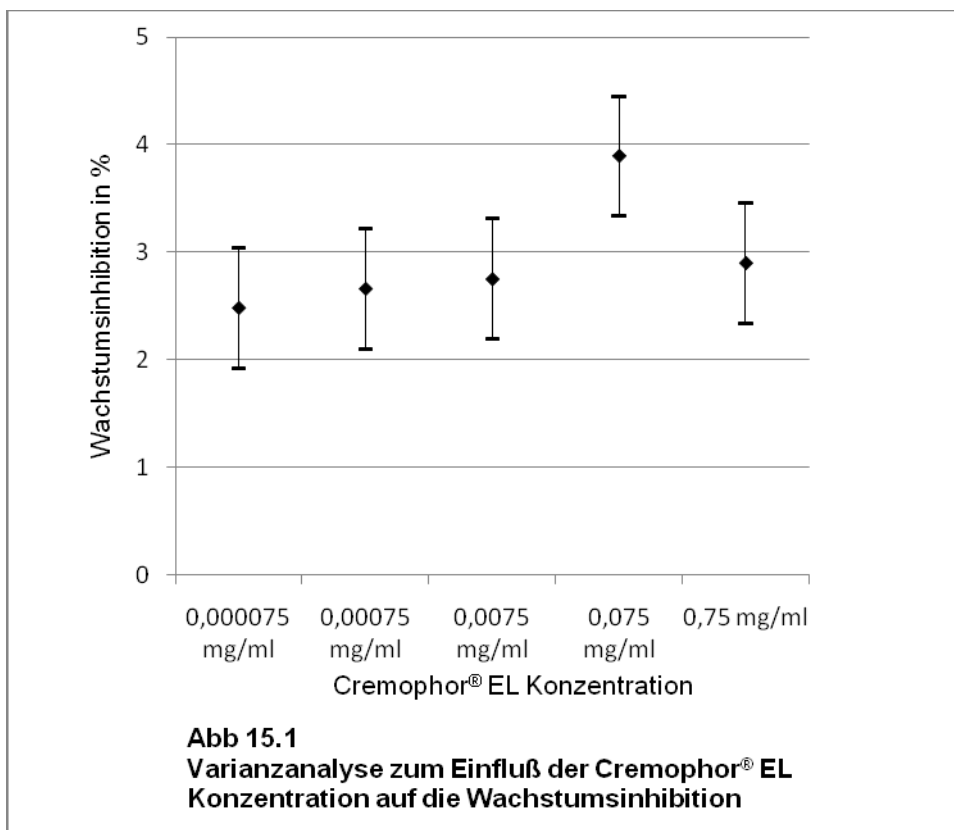
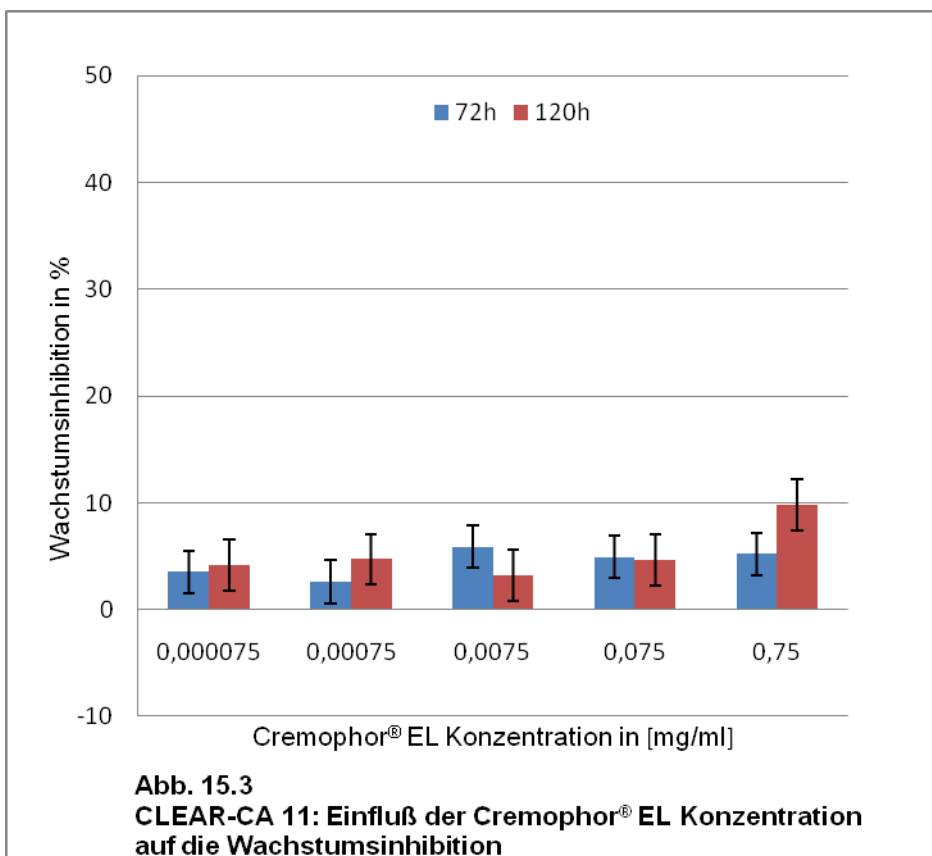
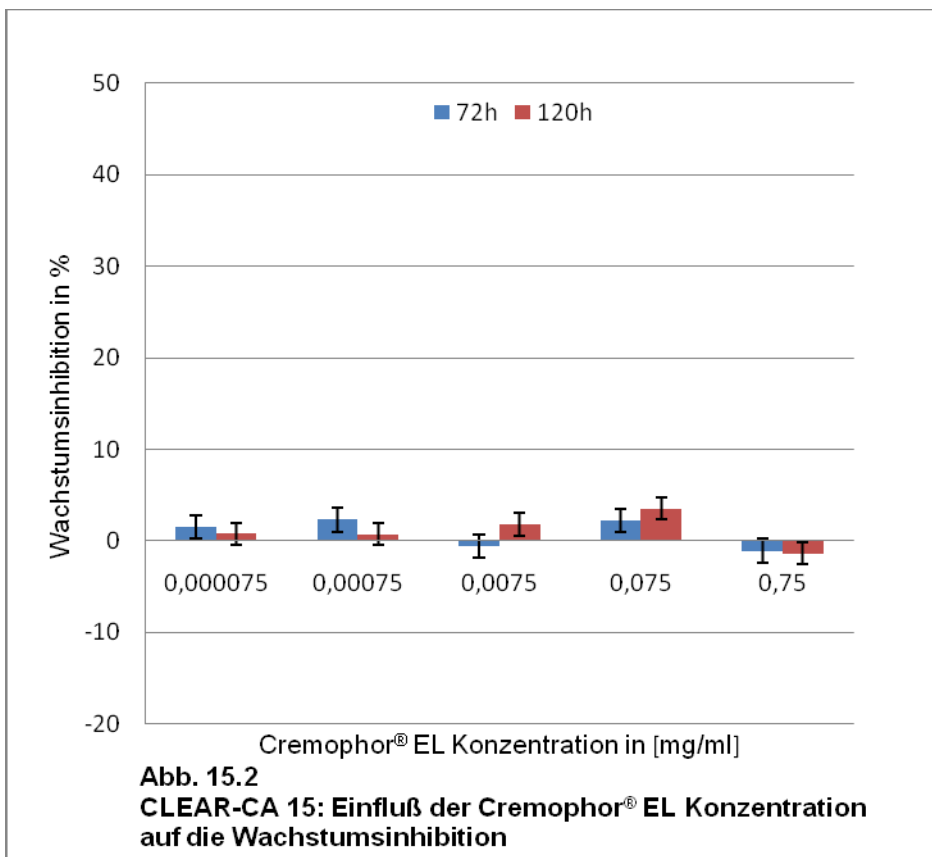


Abb. 14a und 14b
CLEAR-CA 11: Taxol[®] induzierte Zellzyklusverteilung abgebildet in Histo- und Zytogrammen für die Expositionszeiten 3h, 24h, 72h und 120h bei einer Konzentration von 1µM gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Einfluss von Cremophor® EL auf das Proliferationsverhalten

Im Vergleich der wachstumsinhibierenden Wirkung von Paclitaxel in DMSO und Taxol® in Cremophor® EL / Äthanol stellte sich Taxol® in Cremophor® EL / Äthanol als stärker wirksam dar. Um einen möglichen Effekt des Lösungsvermittlers Cremophor® EL zu erfassen, wurden für 72 und 120-stündige Exposition Parallelversuche mit Cremophor® EL allein in äquivalenten Konzentrationen durchgeführt. Das Ergebnis der Varianzanalyse zeigte, dass Cremophor® EL einen zu vernachlässigenden eigenen wachstumshemmenden Effekt auf die Tumorzellen ausübt (Abb. 15.1 – 15.3). Mit den Untersuchungen zum Effekt von Cremophor® EL auf die Zellzyklusverteilung konnte gezeigt werden, dass der Lösungsvermittler keinen Arrest der Tumorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus induziert. Ein solches Phänomen kann also nicht zur Erklärung einer beobachteten zellulären Taxol®-Resistenz herangezogen werden (Daten siehe Anhang).





Diskussion

Durch Reinecke et al. konnte in „In vitro“ - Studien an 19 von 20 verschiedenen klarzelligen Nierenzellkarzinomzelllinien ein signifikanter dosisabhängiger Effekt des Zytostatikums Paclitaxel / Taxol[®] auf die Wachstumsinhibition gezeigt werden. Es ergab sich in dieser Untersuchung kein Unterschied zwischen den Paclitaxel – sensitiven und nicht - Paclitaxel – sensitiven Zelllinien hinsichtlich der Ausbildung von Mikronuclei und Mikrotubulusbündeln, zweier morphologischer Veränderungen, die typischerweise infolge einer Paclitaxel / Taxol[®]-Exposition beobachtet werden können, so dass sich die Frage stellte, ob und inwieweit derartige zellmorphologische Veränderungen mit der beobachteten Wachstumsinhibition in Zusammenhang stehen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung sollte sein, an einer Paclitaxel – sensitiven (CLEAR-CA 11) und einer nicht Paclitaxel-sensitiven Nierenzellkarzinom-Zelllinie (CLEAR-CA 15) dosis- und expositionszeitabhängige Effekte des Zytostatikums Paclitaxel / Taxol[®] auf die Wachstumsinhibition auszutesten, sowie darunter auftretende morphologische und zellzyklische Veränderungen an den Zellen darzustellen.

Wachstumsinhibition durch Paclitaxel / Taxol[®]

Grundlegend für alle weiteren Untersuchungen war das Ergebnis, dass sich die beiden ausgewählten Nierenkarzinom-Zelllinien in ihrer Sensitivität gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Paclitaxel oder Taxol[®] hochsignifikant unterscheiden ($p = 0,0001$). Während der Anteil überlebender Zellen nach Paclitaxel-Exposition bei der Zelllinie CLEAR-CA 11 drastisch verringert war, wurde das Zellwachstum der Zelllinie CLEAR-CA 15 nur wenig beeinflusst. Die Daten des MTT-Assays zeigten sogar, dass unter der Einwirkung von Paclitaxel oder Taxol[®] von den Zellen der CLEAR-CA 15 ein photometrisches Signal erzeugt wird, das stärker ist, als das der unbehandelten Kontrolle. Nach MOSMAN gibt es für eine derartige Signalverstärkung zwei denkbare Alternativen:

1. In der Probe mit dem stärkeren Signal sind mehr Zellen vorhanden, die in ihren Mitochondrien Farbstoff einlagern können.

2. In den Zellen laufen energieverbrauchende Stoffwechselfvorgänge ab, die zu einer Aktivierung der mitochondrialen Energiegewinnung führen. Derartig aktivierte Mitochondrien generieren ein stärkeres Signal im MTT-Assay (MOSMAN, 1983).

Da das verstärkte photometrische Signal der Zelllinie CLEAR-CA 15 bereits nach ein- und drei-stündiger Substanzexposition nachweisbar war, ist es unwahrscheinlich, dass dieses Phänomen auf einem fassbaren Unterschied in der Proliferation zwischen Paclitaxel-behandelten und -unbehandelten Zellen basiert. Hinzu kommt, dass eine mitogene Aktivität für Paclitaxel bislang nicht beschrieben wurde. Es wäre dagegen durchaus denkbar, dass Paclitaxel bzw. Taxol[®] in der wenig reagiblen CLEAR-CA 15 energieverbrauchende Stoffwechselfvorgänge in Gang setzt, die zu einer mitochondrialen Aktivierung und damit Signalverstärkung führen, ohne dass sich die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle verändert hat. Dadurch, dass sich dieses Phänomen in stärkerem Maße an der nur wenig reagiblen Zelllinie nachweisen lässt, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass solche Vorgänge an der Entwicklung der zellulären Paclitaxel-Resistenz beteiligt sind.

Auffällig war außerdem, dass bei beiden Tumorzelllinien nach einer ein- und drei-stündigen Exposition mit 10 μ M Taxol[®] ein deutlicher zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden konnte, der bereits nach 24h Expositionszeit nicht mehr erkennbar war. Da dieser Effekt ausschließlich nach Taxol[®]- und nicht nach Paclitaxel-Exposition auffiel, könnte hierfür ein Effekt des Lösungsvermittlers Cremophor[®] EL / Äthanol verantwortlich sein. So wurde beschrieben, dass hohe Lösungsvermittlerkonzentrationen insbesondere bei kurzen Versuchszeiten zellschädigend wirken können (WOODCOCK & LINSENMEYER, 1992). Andere Autoren berichten von der zytotoxischen Wirkung von Cremophor[®] EL / Äthanol allein, sowie in Kombination mit Paclitaxel (FJÄLLSKOG & FRII, 1994). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass sich die im Monolayer wachsenden Zellen unter dem zytotoxischen Effekt von Paclitaxel in Cremophor[®] EL / Äthanol von der Unterlage lösen und beim Dekantieren der Versuchsplatte im MTT-Assay verloren gehen. Wenn das Ablösen der Zellen von der Unterlage ein passagerer

zytotoxischer Effekt ist, würde sich diese Beobachtung ab einer 24-stündigen Expositionsdauer nicht mehr nachweisen lassen. Für diesen Effekt ist am ehesten ein nicht-Taxol[®]-spezifischer Mechanismus anzunehmen, da er unter alleiniger Paclitaxel-Exposition nicht auftritt.

Das Phänomen, dass Tumorzelllinien der gleichen Tumorentität eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Paclitaxel bzw. Taxol[®] entfalten, ist bereits vielfach dokumentiert worden. Gleiches gilt für die pharmakodynamischen Parameter der Paclitaxel- bzw. Taxol[®]-vermittelten Zytotoxizität:

So ist bekannt, dass der zytotoxische Effekt von Taxol[®] zunächst mit steigender Substanzkonzentration größer wird, sich dann aber, ab einer für jede Zelllinie spezifischen Konzentration, nicht mehr verstärkt (LIEBMANN & COOK, 1993; ADLER & HERZOG, 1994; AIN & TOFIQ, 1996; NATIV & ARONSON, 1997). Diese Besonderheit konnte auch hier für die sensitive Nierenkarzinom-Zelllinie CLEAR-CA 11 gezeigt werden. Es stellte sich zusätzlich heraus, dass die Steigerung der Paclitaxel- bzw. Taxol[®]-vermittelte Zytotoxizität auch durch eine Verlängerung der Substanzexposition erreicht werden kann und dass die Substanzkonzentration hierfür nicht maximal gesteigert werden muss.

In dieser Studie konnte weiterhin bestätigt werden, dass Taxol[®] mit Cremophor[®] EL / Ethanol als Lösungsvermittler im Vergleich zu DMSO-gelöstem Paclitaxel auf kultivierte Tumorzelllinien eine signifikant stärkere wachstumshemmende Wirkung besitzt. Die stärkere Wirksamkeit wird insbesondere im Bereich der niedrigen Konzentration (0,001 und 0,01 μM) sichtbar, bei denen Taxol[®] im Gegensatz zu Paclitaxel bereits einen wachstumshemmenden Effekt ausübt. Der Vorteil von Taxol[®] liegt also weniger im Bereich der maximal erreichbaren Wachstumsinhibition. Manche Autoren postulieren daher für den Lösungsvermittler Cremophor[®] EL einen eigenen zytotoxischen Effekt (FJÄLLSKOG & FRII, 1993; ADLER & HERZOG, 1994). Andere konnten zeigen, dass Cremophor[®] EL den Vermittler der zellulären „Multidrug Resistance“, das p-Glycoprotein, hemmt und dadurch die stärkere Zytotoxizität von Taxol[®] bedingt (SCHUURHUIS & BROXTERMANN, 1990; WOODCOCK & JEFFERSON, 1990; WOODCOCK & LINSENMEYER, 1992; MILLWARD & MORTON, 1993; NYGREN & CSOKA, 1995).

Durch unsere Untersuchungen zur Cremophor[®] EL eigenen zytotoxischen Wirkung auf die beiden humanen Nierenkarzinom-Zelllinien konnte ausgeschlossen werden, dass ein solcher Lösungsvermittlereffekt additiv zur Paclitaxel-Wirkung ist. Hierdurch kann jedoch im Gegenzug nicht ausgeschlossen werden, dass Cremophor[®] EL über eine veränderte Funktion von p-Glycoprotein die zelluläre Resistenz moduliert und so die Taxol[®]-Wirkung verstärkt.

Die Testreihen zur konzentrationsabhängigen Wirkung von Paclitaxel und Taxol[®] zeigten, dass unter dem Einfluss der maximal applizierten Medikamentenkonzentration (10 μ M) paradoxerweise eine Effekturnkehr eintritt und vermehrt Zellen überleben (LIEBMANN & COOK, 1993a, 1993b, 1994). Aus welchem Grund dieses Phänomen unter einer Paclitaxel-Exposition auftritt ist unklar. Dagegen wird für Taxol[®] wiederum ein Einfluss des Lösungsvermittlers Cremophor[®] EL angenommen (LIEBMANN & COOK, 1993a, 1993b, 1994). Man diskutiert in diesem Zusammenhang zwei Mechanismen, über die Cremophor[®] EL den zytotoxischen Effekt von Taxol[®] antagonisieren soll:

Zum einen soll Cremophor[®] EL die Substanzaufnahme in die Zelle hemmen können (LIEBMANN & COOK, 1994) zum anderen wurde gezeigt, dass durch den Lösungsvermittler ein Arrest der Zellen im G1-Stadium des Zellzyklus induziert werden kann. Ein solcher G1-Block verhindert das Eintreten der betroffenen Zellen in die Mitose. Legt man das Durchlaufen der Mitose als Schlüsselereignis für die Induktion der zytotoxischen Medikamentenwirkung zugrunde, bedingt der G1-Block in der Konsequenz ein vermehrtes Überleben von Zellen, die diesem G1-Block unterliegen (LIEBMANN & COOK, 1993a, 1993b, 1994). Die Untersuchungen zum Effekt von Cremophor[®] EL auf die Zellzyklusverteilung ergaben jedoch, dass Cremophor[®] EL bei beiden Tumorzelllinien keinen signifikanten G1-Arrest induziert. Ein G1-Block kann also bei der Tumorzelllinie CLEAR-CA 11 nicht für die Effekturnkehr unter hohen Taxol[®]-Dosen verantwortlich gemacht werden. Von den heute für Cremophor[®] EL bekannten Wirkmechanismen könnte demzufolge nur eine Hemmung der Substanzaufnahme in die Zelle für das beobachtete Verhalten angeführt werden.

Wirkmechanismus von Paclitaxel

Im Allgemeinen werden zwei Mechanismen angeführt, die in enger Beziehung zur Taxol[®]-vermittelten Zytotoxizität stehen sollen. auf der einen Seite ist das die Taxol[®]-induzierte Bündelung von Mikrotubuli (ROWINSKY & DONEHOWER, 1988; ROWINSKY & BURKE, 1989) auf der anderen der Taxol[®]-induzierte programmierte Zelltod, die Apoptose (LIEBMANN & COOK, 1993; LOPES & ADAMS, 1993; ANDREASSEN & MARGOLIS, 1994; LONG & FAIRCHILD, 1994).

Mikrotubulusbündel nach Paclitaxel-Exposition

Normalerweise kann unter physiologischen Bedingungen keine Ausbildung zellulärer Mikrotubulusbündel beobachtet werden, wie sie unter Taxol[®] einhergehend mit der Destruktion des Zytoskeletts entstehen. Ein solches Phänomen tritt auch nicht spontan oder nach Paclitaxel-Exposition auf, wenn gereinigtes Tubulin in vitro zu Mikrotubuli polymerisiert (BORISY & OLMSTED, 1974; GASKIN & CANTOR, 1974). Daraus folgt, dass diese Taxol[®]-spezifische Fähigkeit an bestimmte zelluläre Stoffwechselforgänge gebunden ist.

TURNER et al. berichteten 1984 von der Isolierung eines zellulären mikrotubulusgebundenen Proteins, das sie aus dem Rohextrakt unbehandelten Rattenhirns isolierten. Dieses als „bundling factor“ bezeichnete Protein induzierte in Anwesenheit von Taxol[®] die Bündelung von Mikrotubuli, die in vitro durch die Polymerisation von gereinigtem Tubulin entstanden waren. Man führte das veränderte Verhalten auf die Anwesenheit eben jenes „bundling factor“-Proteins zurück, das auf gereinigtem Tubulin gewöhnlich nicht zu finden ist (TURNER & MARGOLIS, 1984). Verschiedene Autoren postulierten, dass Taxol[®] eine Konformationsänderung im Mikrotubulus verursacht, die es ermöglicht, dass der Effekt eben jenes „bundling-factors“ zum Tragen kommt (TURNER & MARGOLIS, 1984; ALBERTINI & HERMAN, 1984; WILSON & MILLER, 1985). Die Meinung, dass solche und andere zellulären Mikrotubulus-assoziierten Proteine an der Bündelung beteiligt sind, wird auch von anderen Autoren geteilt (ALBERTINI & HERMAN, 1984; CHAPIN & BULINSKY, 1991). Für die Bündelung der Mikrotubuli ist also weniger ein direkter Taxol[®]-Effekt verantwortlich, sondern vielmehr das veränderte Bindungsverhalten des Mikrotubulus infolge der Taxol[®]-Bindung.

Eine solche Medikament-vermittelte Manipulation im Mikrotubulusstoffwechsel kann auch zur Erklärung des zytotoxischen Wirkpotentials von Taxol[®] mit herangezogen werden.

Mikrotubuli sind für alle Eukaryontenzellen unentbehrlich. Neben ihrer zentralen Rolle während der Kernteilung als Hauptbestandteil der Mitosespindel, erhalten sie die Zellform, ermöglichen den intrazellulären Stofftransport zwischen den Organellen und die Zellbewegung (DUSTIN, 1984) und dienen darüberhinaus als intrazelluläre Infrastruktur für Signaltransduktionswege (WANG & WANG, 2000). All diese Funktionen setzen ein diffiziles Gleichgewicht zwischen der Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli und deren Depolymerisation voraus. Dadurch, dass Taxol[®] erheblich in dieses Gleichgewicht eingreift und eine Bündelung von Mikrotubuli induziert, werden all die Zellfunktionen, die an einen intakten Mikrotubulusstoffwechsel gebunden sind, erheblich beeinträchtigt (CARLIER, 1989).

Der schädigende Einfluss von Taxol[®] auf das mikrotubuläre System lässt sich bereits nach sehr kurzer Substanzexposition nachweisen (DEBRABANDER & GEUENS, 1982; MANFREDI & PARNES, 1982). Es wird vom Auftreten intrazellulärer Mikrotubulusbündel nach nur 4-stündiger Behandlung mit Taxol[®]-Konzentrationen zwischen 1 und 10µM berichtet (HERMAN & LANGEVIN, 1983; TOKUNAKA & FRIEDMAN, 1983; ROWINSKY & BURKE, 1989). Während dieses Zeitraumes lagern sich bis zu 20 Mikrotubuli parallel nebeneinander (HERMAN & LANGEVIN, 1983). An den Nierenkarzinom-Zelllinien konnte ein entsprechendes Verhalten beobachtet werden: nach 3-stündiger Taxol[®]-Exposition mit 1 und 10µM konnten elektronenmikroskopisch dicht gepackte, parallel angeordnete Mikrotubuli nachgewiesen werden. Diesbezüglich war kein Unterschied zwischen der Taxol[®]-sensitiven Zelllinie CLEAR-CA 11 und der wenig reagiblen CLEAR-CA 15 erkennbar. An dieser Stelle wird offensichtlich, dass die rein qualitative Beurteilung der beschriebenen morphologischen Veränderungen nicht ausreicht, um sie hinlänglich mit dem zytotoxischen Wirkpotential in Beziehung zu setzen. Zum einen lassen sich mit der Zytotoxizität assoziierte morphologische Veränderungen wie die Bündelung von Mikrotubuli schon nach einem Zeitintervall nachweisen, in dem sich die zytotoxische Wirkung selbst noch gar nicht auf das Zellwachstum ausgewirkt hat. Zum anderen kann rein qualitativ ein

möglicherweise differierendes Verhalten der unterschiedlichen sensitiven Nierenkarzinom-Zelllinien nicht erfasst werden. Aus diesen Gründen war es erforderlich, die zeitliche Dynamik der Bündelformation zu quantifizieren und anschließend in Beziehung zur Zytotoxizität zu setzen. Deshalb wurde zusätzlich immunfluoreszenzmikroskopisch mit monoklonalen Anti- α -Tubulin-Antikörpern der Effekt von Taxol[®] (0,001 und 1 μ M) untersucht.

Dabei konnte für eine Taxol[®]-Konzentration von 0,001 μ M im MTT-Assay nur bei CLEAR-CA 11 ab einer Expositionsdauer von 72h ein diskreter wachstumshemmender Effekt beobachtet werden. Dementgegen zeigte sich in der Immunfluoreszenz keine erhöhte Bündelfrequenz. An beiden untersuchten Tumorzelllinien konnte beobachtet werden, daß bei allen anderen kürzeren Expositionszeiten unter dieser Konzentration weder eine relevante Wachstumsinhibition, noch eine wesentliche Bündelinduktion auftritt. Bei einer höheren Taxol[®]-Konzentration (1 μ M) dagegen zeigte CLEAR-CA 11 nach 72 h eine deutliche Reduktion der vitalen Zellen.

Ein analoges Ergebnis erbrachte auch die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung hinsichtlich der zellulären Formation von Mikrotubulusbündeln. Bei einer Konzentration von 0,001 μ M Taxol[®] konnte bei beiden Nierenkarzinom-Zelllinien eine nur geringfügige Bündelinduktion beobachtet werden. Erste Bündel wurden, wie dies bereits die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergeben hatten, nach 3-stündiger Substanzexposition registriert. Unter 1 μ M Taxol[®] stieg die Frequenz der Zellen mit Mikrotubulusbündeln deutlich an. Die Taxol[®]-resistente Zelllinie CLEAR-CA 15 reagierte auf eine Verlängerung der Expositionszeit von 3 auf bis zu 120 Stunden nicht mit einer wesentlichen Verstärkung der Bündelformation. Im Gegensatz dazu ließ sich die Bündelinduktion bei der Taxol[®]-sensitiven Zelllinie CLEAR-CA 11 durch eine verlängerte Substanzexposition deutlich verstärken. Hier fiel auf, dass sich die zeitliche Dynamik der Bündelformation auffällig mit der wachstumshemmenden zytotoxischen Wirkung des Medikamentes auf die Tumorzellen deckte. Diese Besonderheit führte zu der Überlegung, die beobachtete zytotoxische Wirkung Taxols[®] mit der Fähigkeit der Bündel-

Induktion zu korrelieren. Für CLEAR-CA 11 ließ sich dabei mit Korrelationskoeffizienten von 0,933 (nach Pearson) bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,87$ für Paclitaxel und von 0,81 bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,65$ für Taxol[®] eine signifikante Übereinkunft zwischen der erreichbaren Wachstumsinhibition und nachzuweisender Bündelinduktion zeigen. Das etwas schlechtere Korrelationsergebnis von Taxol[®] ist wahrscheinlich durch die oben beschriebene Diskrepanz zwischen Wachstumsinhibition und Bündelinduktion bei einer Konzentration von $0,001\mu\text{M}$ zu erklären. Für die Tumorzelllinie CLEAR-CA 15 ließ sich entsprechendes nicht darstellen. Das Korrelationsergebnis bestätigte hier vielmehr, dass eine schwache Bündelformation auch unabhängig von einer nachweisbaren Wachstumshemmung auftreten kann.

Die enge Korrelation zwischen zytotoxischem Effekt und eingetretener Bündelformation in der Paclitaxel-sensitiven Zelllinie lässt vermuten, dass eine enge Beziehung zwischen diesen beiden Paclitaxel-assoziierten Variablen besteht. Wenn Paclitaxel eine deutliche zytotoxische Wirkung entfaltet, kann auch mit einer deutlichen Induktion von Mikrotubulusbündeln gerechnet werden. Diese Beobachtung könnte auch bedeuten, dass für das wenig sensitive Verhalten der CLEAR-CA 15 ein Mechanismus verantwortlich ist, der die Formation solcher Bündel unterbindet.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in der resistenten Zelllinie weniger Taxol[®] an die Mikrotubuli gebunden wird. Hierbei könnte der „Multidrug Resistance-Phänotyp“ von Nierenzellkarzinomen eine Rolle spielen (THIEBEAUT & TSURUO, 1987; CORDON-CARDO & O`BRIAN, 1990; KIM & KAKEHI, 1996; VOLM & MATTERN, 1992). So weiß man, dass auch Taxol[®] via eines energieabhängigen p-Glycoprotein-Pumpmechanismus nach außen geschleust und so die intrazelluläre Substanzakkumulation verhindert wird (ROY & HORWITZ, 1985; BHALLA & HUANG, 1993; BAGULEY & MARSHALL, 1995).

Eine weitere Möglichkeit, die Wechselwirkung zwischen Taxol[®] und dem Mikrotubulus zu unterbinden, besteht darin, dass Taxol[®] nicht regelrecht an sein Zielmolekül, den Mikrotubulus, gebunden werden kann und auf diese Weise die Interaktion mit dem „bundling factor“ verhindert wird. Einige Autoren berichten

diesbezüglich von Veränderungen im α - oder β -Tubulin, den Grundbausteinen des Mikrotubulus (CABRAL & ABRAHAM, 1981; CABRAL & BRADY, 1986). Von anderen Autoren wird dagegen in diesem Zusammenhang die Bedeutung einer veränderten Tubulin-Isotypen-Expression als Grundlage einer Taxol[®]-Resistenz in den Vordergrund gestellt (HABER & BURKHART, 1995; JAFFREZOU & DUMONTET, 1995; DUMONTET & DURAN, 1996, ORR & VERDIER-PINARD, 2003):

Dass eine veränderte β – Tubulin – Isotypenexpression in Nierenzellkarzinom – Zelllinien die Vinblastin – Sensitivität beeinflusst, konnte von Ferguson et al. gezeigt werden (FERGUSON & TAYLOR, 2005). Ob solche Veränderungen im Tubulin resistenter oder vielleicht auch sensitiver Nierenkarzinom-Zelllinien existieren und die Taxol[®] - Sensitivität beeinflussen, ist bisher abschließend nicht geklärt worden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Apoptoseinduktion durch Paclitaxel

Neben dem Paclitaxel-typischen Effekt der Bündelinduktion ist auch von einer Zunahme der Apoptosefrequenz in Taxol[®]-behandelten Zellkulturen berichtet worden (LIEBMANN & COOK, 1993; LOPES & ADAMS, 1993; ANDREASSEN & MARGOLIS, 1994; LONG & FAIRCHILD, 1994). Die Apoptosehäufigkeit ist ebenfalls mit der Zytotoxizität von Paclitaxel korreliert worden, und es konnte gezeigt werden, dass Taxol[®] tatsächlich in einer Vielzahl von leukämischen Zelllinien und Zelllinien solider Tumoren bevorzugt über diesen Mechanismus zum Zelltod führt (CHANG & LI, 1996; JORDAN & WENDELL, 1996; MILROSS & MASON, 1996; LIEU & CHANG, 1997).

Auch in unserer Studie konnte gezeigt werden, dass unter der Behandlung mit Taxol[®] eine Zunahme der Apoptosefrequenz zu verzeichnen ist. Dass rein quantitative Ausmaß der Apoptoseinduktion durch Taxol[®] war zwar insgesamt wenig ausgeprägt, aber statistisch sicher erfassbar ($\alpha = 0.05$, $P_{\text{obs}} < \alpha = 0.0001$). Überraschenderweise zeigte die Paclitaxel-resistente Zelllinie eine stärkere Apoptosesteigerung als die Paclitaxel-sensible Zelllinie CLEAR CA 11. Erwartungsgemäß wurde eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptosefrequenz unter Paclitaxel- und Taxol[®]-Einwirkung deutlich. Dieses Ergebnis stellte sich besonders deutlich in den Zellzyklus-Analysen dar, in denen

sich eine apoptotische Kernfragmentierung nach 72-stündiger Exposition und länger in Erscheinung trat. Eine derartige zeitliche Abhängigkeit wurde auch für andere Tumortypen berichtet (CHANG & LI, 1996; JORDAN & WENDELL, 1996; BANERJEE & FALLIS, 1997; LIEU & CHANG, 1997).

Die Bedeutung der Expositionszeit ließ sich anhand der Zellzyklus-Analysen unter Berücksichtigung der Wachstumskinetik näher charakterisieren. Der Versuchsaufbau bedingt, dass die Zellen nach 72-stündiger Substanzexposition bereits 96h in Kultur wachsen. Gemäß der Wachstumskinetik verdoppeln sich beide Populationen zweimal. Die BrdU-DNA-Analyse zeigte, dass beide Zelllinien unter Taxol[®] bei der Proliferation gestört werden, und in einem Zustand mit verdoppeltem Genombesatz akkumulieren, aus dem heraus sie weiter replikativ aktiv sind. Erst nach dem Auftreten dieses Phänomens ab 72-stündiger Substanzeinwirkung ließ sich auch eine deutliche apoptotische Kernfragmentierung beobachten.

Eine derartige zeitliche Abfolge von Mitosearrest und Apoptoseinduktion ist bekannt (CHANG & LI, 1996; JORDAN & WENDELL, 1996; BANERJEE & FALLIS, 1997). Auf welchem Weg Taxol[®] in einer bestimmten Zelle den programmierten Zelltod provoziert, ist jedoch noch unklar. Nach der heutigen Datenlage muß davon ausgegangen werden, daß Taxol[®] durch eine Vielzahl an Mechanismen eine Apoptose induzieren kann: im Fokus sind heute hochkomplexe Signaltransduktionskaskaden, die in enger Beziehung zur Mitosekontrolle stehen. Insbesondere spielen die Cyclin – abhängigen Kinasen, sowie die sogenannten „Mitose – aktivierten Proteinkinasen“ (MAPK`s), denen eine Funktion als Mitosespindel-Checkpoint zukommt, eine Rolle (WANG & WANG, 2000; GASCOIGNE & TAYLOR, 2009).

Welcher Mechanismus für das Auftreten der Taxol[®]-induzierten Apoptose an Nierenkarzinom-Zelllinien verantwortlich ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Fest steht jedoch, dass bei beiden untersuchten Tumorzelllinien das vermehrte Auftreten von apoptotischen Zellen erst nach 72 Stunden nachweisbar ist, sich also zeitlich nach dem in der Zellzyklus-Analyse darstellbaren Mitoseblock manifestiert. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen der oben zitierten Autoren (CHANG & LI, 1996; JORDAN & WENDELL, 1996; BANERJEE & FALLIS, 1997)

und stützt die These von WILLINGHAM et al., die besagt, dass ein solcher Mitosearrest die Taxol[®]-induzierte Apoptose begünstigt (WILLINGHAM & BHALLA, 1994). Des Weiteren ist offensichtlich, dass sich das Ausmaß der Apoptoseinduktion in Taxol[®]-sensitiven CLEAR-CA 11-Zellen nicht wesentlich von dem in Taxol[®]-resistenten CLEAR-CA 15-Zellen unterscheidet.

Effekte von Paclitaxel auf die Zellzyklusverteilung

Der Effekt Taxols[®] auf den Zellzyklus ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Um den Einfluss auf den Zellzyklus zu erklären, werden unterschiedliche Thesen diskutiert. Allen Thesen liegt die Annahme zu Grunde, dass Taxol[®] entscheidend in den regulären Ablauf der Mitose eingreift:

Bei der regulären Mitose ist der Beginn der Anaphase durch das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden und einen Abfall von Cyclin-B gekennzeichnet. Der Abfall des Cyclin-B's wird durch die Aktivität des sogenannten Spindel-Checkpoints inhibiert. Das Signal dieses Spindel-Checkpoints wird durch verschiedene Proteine, wie MAD 1 und MAD 2, vermittelt, die sich an ungebundenen Kinetochoren befinden und dort inhibierende Komplexe bilden, die das Fortschreiten der Anaphase solange behindern, bis alle Chromatiden regulär an den Kinetochoren des Spindelapparates gebunden sind (BRITO & YANG, 2008).

In Taxol[®]-sensitiven Zelllinien konnte man reduzierte Level an MAD2 nachweisen. Die daraus abgeleitete Hypothese besagt, dass ein Defekt im Kontrollmechanismus, der den geordneten Ablauf der Mitose überwacht, die Sensitivität der Zelle gegenüber Spindelgiften erhöht. Eine Zelle mit defekter Mitosekontrolle ist nicht in der Lage, auf die fehlerhafte Ausbildung des Spindelapparates unter Taxol[®] zu reagieren, und durchläuft einen unvollkommenen Teilungszyklus, der zur Entstehung einer genomisch anders strukturierten Zelle führt, die dann zugrunde geht (LI & BENEZRA, 1996). Es ist bisher jedoch unbekannt, ob Taxol[®] möglicherweise deshalb zytotoxisch auf Zellen wirkt, weil diese über eine ungenügende Mitosekontrolle verfügen, die sie

gegenüber Taxol[®] sensibilisiert, oder ob durch Taxol[®] eine intakte Mitosekontrolle im Sinne eines sogenannten „mitotic slippage“ umlaufen wird (KUNG & SHERWOOD, 1990; ANDREASSEN & MARGOLIS, 1994; BRITO & RIEDER, 2006). Für das Ergebnis ist es letztlich unerheblich: in beiden Fällen resultieren genomisch alterierte Zellen, von denen man annimmt, dass sie nicht unbegrenzt lebensfähig sind.

Nachgewiesen ist allerdings, dass unter Taxol[®] im Vergleich zu Kontrollbedingungen der Anaphase-Beginn deutlich verzögert wird. Außerdem bleibt in Taxol[®] behandelten Zellen das Anaphase-typische Auseinanderdriften der Schwesterchromatiden aus. Das Chromatin beginnt zu dekondensieren, und die Zelle startet eine ungerichtete Teilungsaktivität, ohne eine Zell- oder Kernteilung vollenden zu können. Dabei spreiten die zur Mitose abgerundeten Zellen wieder auf dem Untergrund aus und es bilden sich um dekondensierte tetraploide Chromatinfäden neue Kernmembranen aus, so dass die Zellen zahlreiche Ersatzkerne, sogenannte Micronuclei, enthalten (RINGERTZ & SAVAGE, 1986; DEBRABANDER & GEUENS, 1986; LIEBMANN & COOK, 1994; RIEDER & SCHULTZ, 1994; JORDAN & WENDELL, 1996). Viele Autoren nehmen für diese irreguläre Interphase einen erneuten Replikationszyklus an, so dass in der ungeteilten Zelle ein polyploider Chromosomensatz entsteht (ROBERTS & ROWINSKY, 1989; LOPES & ADAMS, 1993; LONG & FAIRCHILD, 1994). Die daraus resultierende, für die einzelne Zelle unverhältnismäßig hohe Gendosis soll dann als Letalfaktor wirken (Long & Fairchild, 1994).

Da durch Taxol[®] beide untersuchten Nierenzellkarzinom-Zelllinien ohne Berücksichtigung ihrer Taxol[®]-Sensitivität in einen hyperploiden Zustand übergehen und in beiden Tumorzelllinien in gleichem Maße irreguläre Interphasezellen mit Micronuclei gefunden werden, ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht für das unterschiedlich sensitive Verhalten der Zellen verantwortlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Taxol[®]-Sensitivität der beiden klarzelligen humanen Nierenkarzinom-Zelllinien lediglich mit der Taxol[®]-charakteristischen Bündelung von Mikrotubuli korreliert. Alle anderen untersuchten Paclitaxel-induzierten Veränderungen werden dementsprechend unabhängig von der zellulären Taxol[®]-Sensitivität beobachtet.

Obwohl ein enger Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Mikrotubulusbündeln und der Wachstumsinhibition bei der Taxol[®]-sensitiven CLEAR-CA 11 vorliegt, verbleibt der Mechanismus, der letztendlich zum Zelltod führt, unklar.

Auch wenn Zytostatika, im engeren Sinne Taxol[®] in der systemischen Therapie des Nierenzellkarzinoms heute eine untergeordnete Rolle spielen, so wäre es doch sinnvoll, zum einen den molekularen Mechanismen auf den Grund zu gehen, die bei den Taxol[®]-sensiblen Nierenzellkarzinom-Zelllinien den Zelltod herbeiführen, und zum anderen die Mechanismen aufzudecken, die eine Taxol[®]-Resistenz bedingen. Nach den hier vorgefundenen Ergebnissen könnte im Hinblick auf die Resistenzproblematik eine Untersuchung der Tubulin-Isotypen-Expression sinnvoll sein.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde an 2 humanen Nierenkarzinom-Zelllinien der zeit- und konzentrationsabhängige zytotoxische Effekt von Paclitaxel gelöst in DMSO und Taxol[®] gelöst in Cremophor[®] EL / Äthanol mit dem MTT-Assay untersucht. Elektronen-, licht- und immunfluoreszenzmikroskopische Studien dienten der Darstellung substanzinduzierter morphologischer Veränderungen, die BrdU-DNA-Analyse erfasste den Effekt auf die Zellzyklusverteilung. Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Zelllinien aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Paclitaxel ein geeignetes Modell für Resistenzstudien und damit verbundene Fragestellungen darstellen. So wurde bei der resistenten Zelllinie keine signifikante Wachstumsinhibition beobachtet, während in der sensiblen Zelllinie eine konzentrations- und zeitabhängige Wachstumsinhibition für Paclitaxel / Taxol[®] mit einer maximalen Reduktion der Zellzahl auf 79% / 75% der Kontrolle gezeigt werden konnte. Die Dauer der Substanzexposition war für die erreichbare Zytotoxizität der entscheidende Faktor. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Substanz-induzierte Zytotoxizität bei der sensitiven Zelllinie nahezu ideal mit der Paclitaxel-spezifischen Induktion von Mikrotubulusbündeln korreliert ($r(\text{Paclitaxel}) = 0,93$; $r(\text{Taxol}^{\text{®}}) = 0,81$). Bei beiden Tumorzelllinien konnte mit zunehmender Expositionszeit eine gesteigerte Apoptosefrequenz nachgewiesen werden. Es konnte eine schwache Korrelation zwischen Apoptoseinduktion und Wachstumsinhibition dargestellt werden. Mit Hilfe der BrdU-DNA-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen beider Zelllinien nach 72h Paclitaxel-Exposition in der G2/M-Phase des Zellzyklus akkumulieren. Die Zellen überwinden den Mitosearrest ohne reguläre Kern- und Zellteilung und treten in ein so genanntes „Pseudo-G1-Stadium“ mit verdoppeltem DNA-Gehalt ein, der auf zahlreiche Mikronuclei verteilt wird. Von den erwähnten Effekten, die nach Paclitaxel- / Taxol[®]-Exposition beobachtet werden, eignete sich nur die Induktion von Mikrotubulusbündeln als Indikator für den zu erwartenden zytotoxischen Effekt. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, über welche Mechanismen die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber Paclitaxel entwickeln und auf welche Weise eine solche Resistenz möglicherweise durchbrochen werden kann.

Tabellarischer Anhang

WACHSTUMSKINETIK

A.

CLEAR - CA 11 Zellichte entsprechend 6000 Zellen / Well im MTT - Assay

Anzahl der Beobachtungswerte pro Wachstumszeit : 4

$\alpha = 0,05$, Konfidenzintervall = 0,95 ; $\frac{1}{2}$ Konfidenzintervall = 2

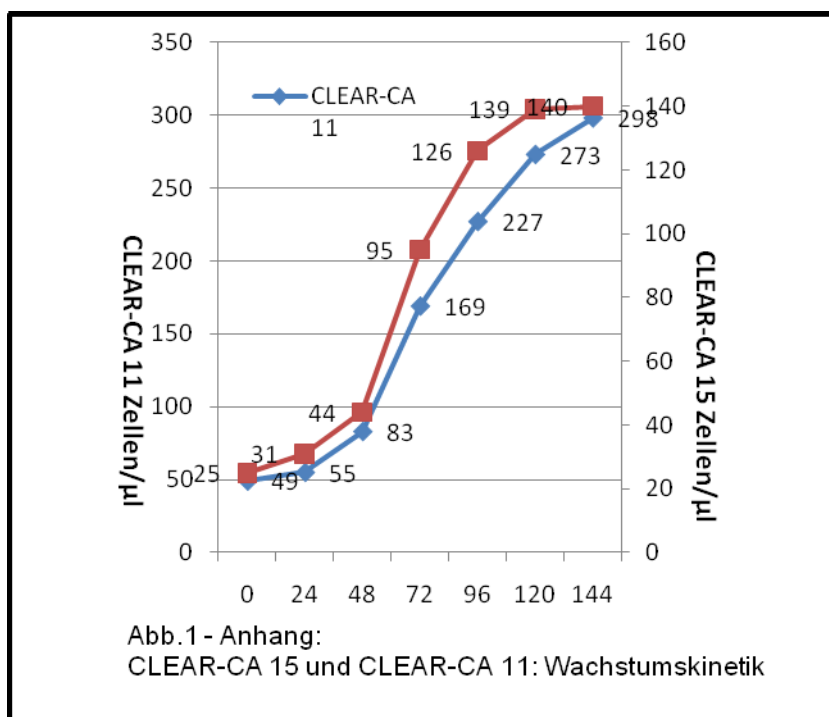
Wachstumszeit	Zellen / μ l	
24 h	55	Verdopplungszeit 1 : 53,94 h
48 h	83	Verdopplungszeit 2 : 29,52 h
72 h	169	
96 h	227	
120 h	273	
144 h	298	

CLEAR - CA 15 Zellichte entsprechend 3000 Zellen / Well im MTT - Assay

Anzahl der Beobachtungswerte pro Wachstumszeit : 4

$\alpha = 0,05$, Konfidenzintervall = 0,95 ; $\frac{1}{2}$ Konfidenzintervall = 3

Wachstumszeit	Zellen / μ l	
24 h	31	Verdopplungszeit 1 : 51 h
48 h	44	Verdopplungszeit 2 : 26,03 h
72 h	95	
96 h	126	
120 h	139	
144 h	140	



WACHSTUMSINHIBITION (eingehende Messwerte insgesamt : 2880)**Einfluß der Hauptfaktoren auf die Wachstumsinhibition [%]****Nierenkarzinom - Zelllinie**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Zelllinie = 1440

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $P_{obs} < \alpha = 0,0001$; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,96

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
CLEAR-CA 11	21,4699	22,4299	23,3899
CLEAR-CA 15	-0,0198	0,9402	1,9002

Medikament

Anzahl der Beobachtungswerte pro Medikament = 1440

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95; $P_{obs} < \alpha = 0,0001$ $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,96

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
PACLITAXEL	8,90667	9,86667	10,82667
TAXOL®	12,5434	13,5034	14,4634

Konzentration

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 576

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $P_{obs} < \alpha = 0,0001$ $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 1,5179

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	1,6231	3,1413	4,6592
0,01 μ M	6,9837	8,5016	10,0195
0,1 μ M	11,0898	12,6077	14,1256
1 μ M	12,3871	13,905	15,4229
10 μ M	18,7518	20,2697	21,7876

Expositionszeit

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 480

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $P_{obs} < \alpha = 0,0001$; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 1,6627

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	0,2076	1,8703	3,533
3 h	2,2834	3,9461	5,6088
24 h	-5,5637	-3,901	-2,2383

72 h	7,3437	9,0064	10,6691
96 h	21,6116	23,2743	24,937
120 h	34,2515	35,9142	37,5769

EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION AUF DIE WACHSTUMSINHIBITION BEI DEN EXPOSITIONSZEITEN

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 24

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	-4,4758	-5,5993	-8,6073	-7,3753	-11,4342	0,0443
3h	-3,4456	-1,9944	-3,0886	-1,0089	-2,3126	0,0123
24h	0,515	1,3798	2,8454	3,5255	-4,4035	0,0288
72h	7,9887	23,7834	30,5542	36,5111	24,171	0,2339
96h	8,5303	37,6088	59,901	63,8124	46,975	0,4319
120h	12,5799	47,8863	73,7647	79,0327	75,2645	0,5631

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 24

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	-0,4766	-1,4802	3,2135	5,1199	0,5488	0,029
3h	-1,3665	0,4942	2,0693	3,6522	2,5944	0,0315
24h	-9,4083	-7,5877	-11,8234	-8,2312	-2,627	0,047
72h	-6,0439	-7,9297	-5,2206	-0,069	7,7871	0,0425
96h	-7,777	-5,4376	-0,9122	1,9462	14,3784	0,0886
120h	-0,3555	5,7151	8,6839	15,4967	36,8448	0,178

EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION AUF DIE WACHSTUMSINHIBITION GEMITTELT ÜBER ALLE EXPOSITIONSZEITEN

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 144

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 4,8688; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-1,9808	2,888	7,7568
0,01 μ M	11,5872	16,546	21,4148
0,1 μ M	20,3822	25,251	30,1198
1 μ M	23,4812	28,35	33,2188
10 μ M	17,7742	22,643	27,5118

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 144

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 1,8981; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-5,9706	-4,0725	-2,1744
0,01 μ M	-4,4652	-2,5671	-0,669
0,1 μ M	-2,9161	-1,018	0,8801
1 μ M	0,7896	2,6877	4,5858
10 μ M	6,0615	7,9596	9,8577

EINLUSS DER TAXOL[®]-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE WACHSTUMSINHIBITION**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 24

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	-8,3718	-7,7375	-6,3332	1,3591	47,8754	0,3156
3h	-1,9789	-2,6463	-1,9401	4,7881	55,471	0,3282
24h	2,0664	1,6637	1,4392	-0,4027	12,6164	0,0377
72h	30,8365	25,0291	33,0953	28,4726	9,2067	0,2484
96h	54,1869	56,7163	60,6702	56,7424	37,762	0,627
120h	36,2448	63,1164	74,7679	74,0218	60,8754	0,5656

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 24

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	1,4587	4,8021	2,0581	3,1918	39,3992	0,2065
3h	0,9266	1,2432	2,6871	3,4901	26,5539	0,0908
24h	-11,188	-11,8478	-9,9947	-8,8217	-3,1686	0,0505
72h	-7,7365	-6,0301	-5,9841	-12,3361	-16,669	0,0834
96h	-3,8728	-5,4887	-2,8466	-9,33	7,9618	0,0672
120h	3,9689	8,3206	15,5475	11,8989	30,1066	0,1656

EINFLUSS DER TAXOL®-KONZENTRATION AUF DIE WACHSTUMSINHIBITION GEMITTELT ÜBER ALLE EXPOSITIONSZEITEN**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 144

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 4,7303; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	12,0807	16,811	21,5413
0,01 μ M	17,1397	21,87	26,6003
0,1 μ M	21,6207	26,351	31,0813
1 μ M	22,1627	26,893	31,6233
10 μ M	31,9647	36,695	41,4253

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 144

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 2,4458; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-5,5068	-3,061	-0,6152
0,01 μ M	-4,2888	-1,843	0,6028
0,1 μ M	-2,5998	-0,154	2,2918
1 μ M	-4,7568	-2,311	0,1348
10 μ M	11,3362	13,782	16,2278

LÖSUNGSMITTELEFFEKTE (eingehende Meßwerte insgesamt 240)

Einfluß der Hauptfaktoren auf die Wachstumsinhibition [%]

A.

Konzentration / CREMOPHOR® EL

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 96

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $P_{obs} < \alpha = 0,421$; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,5591

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
7,5 x 10 ⁻⁵ mg/ml	1,922	2,4811	3,0402
7,5 x 10 ⁻⁴ mg/ml	2,1014	2,6605	3,2196
7,5 x 10 ⁻³ mg/ml	2,1936	2,7527	3,3118
7,5 x 10 ⁻² mg/ml	3,3359	3,895	4,4541
7,5 x 10 ⁻¹ mg/ml	2,3427	2,9018	3,4609

Expositionszeit / CREMOPHOR® EL

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 240

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $P_{obs} < \alpha = 0,336$; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,5591

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
72 h	2,1187	2,6778	3,2369
120 h	2,6395	3,1986	3,7577

EINLUSS DER CREMOPHOR®-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE WACHSTUMSINHIBITION

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 96

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 2,2

	0,000075 mg/ml	0,00075 mg/ml	0,0075 mg/ml	0,075 mg/ml	0,75 mg/ml
72h	3,4765	2,5691	5,8965	4,9269	5,2395
120h	4,1912	4,7012	3,2225	4,5995	9,7916

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 96

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 2,4

	0,000075 mg/ml	0,00075 mg/ml	0,0075 mg/ml	0,075 mg/ml	0,75 mg/ml
72h	1,519	2,3423	-0,6156	2,1782	-1,1484
120h	0,8283	0,7233	1,7866	3,487	-1,3566

IMMUNFLUORESZENZ (eingehende Messwerte insgesamt : 480)

BÜNDELINDUKTION

EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE BÜNDELINDUKTION

CLEAR CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	1 μ M	½-Konfidenz
1h	0	0	0	0
3h	0	0,8966	1,5378	0,07898
24h	0	0,9135	9,3736	0,10335
72h	0	2,1253	20,8772	0,2323
96h	0	1,7238	23,1833	0,28521
120h	0	1,7091	61,9524	0,54807

CLEAR CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	1 μ M	½-Konfidenz
1h	0	0	0	0
3h	0	0,6914	6,7094	0,25953
24h	0	0	2,6091	0,18831
72h	0	0	3,3809	0,18154
96h	0	0,1826	3,8632	0,2274
120h	0	0	3,7899	0,19534

EINFLUSS DER TAXOL[®]-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE BÜNDELINDUKTION

CLEAR CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	1 μ M	½-Konfidenz
1h	0	0	0	0
3h	0	1,9807	5,2568	0,11802
24h	0	2,0766	18,5025	0,28045
72h	0	4,6329	27,8537	0,27207
96h	0	3,0088	41,4435	0,40149
120h	0	5,297	45,6376	0,57143

CLEAR CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	1 μ M	½-Konfidenz
1h	0	0,2	0	0,04132
3h	0	1,0143	11,3615	0,51729
24h	0	5,473	7,0927	0,36439
72h	0	0,2359	4,1071	0,19297
96h	0	0,2776	2,4868	0,16935
120h	0	0,2816	5,4097	0,31287

MULTIPLE MITOTIC ASTERS**EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE FREQUENZ AN MULTIPLE MITOTIC ASTERS UNTER 0,001 μ M PACLITAXEL****CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 0,066; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,06601	0	0,06601
3 h	0,01464	0,08065	0,14665
24 h	-0,06601	0	0,06601
72 h	-0,06601	0	0,06601
96 h	-0,06601	0	0,06601
120 h	-0,06601	0	0,06601

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 0,0; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	0	0	0
3 h	0	0	0
24 h	0	0	0
72 h	0	0	0
96 h	0	0	0
120 h	0	0	0

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE FREQUENZ AN MULTIPLE MITOTIC ASTERS UNTER 1 μ M PACLITAXEL**CLEAR -CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,2729; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,2729	0	0,2729
3 h	-0,2729	0	0,2729
24 h	1,6286	1,9014	2,1743
72 h	-0,05	0,2229	0,4958
96 h	-0,2729	0	0,2729
120 h	-0,2729	0	0,2729

CLEAR -CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,8338; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,8338	0	0,8338
3 h	-0,8338	0	0,8338
24 h	3,4924	4,3261	5,1599
72 h	-0,0287	0,805	1,6388
96 h	-0,3065	0,5273	1,361
120 h	0,0487	0,8825	1,7163

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE FREQUENZ AN MULTIPLE MITOTIC ASTERS UNTER 0,001 μ M TAXOL[®]**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,0; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	0	0	0
3 h	0	0	0
24 h	0	0	0
72 h	0	0	0
96 h	0	0	0
120 h	0	0	0

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,3813; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,3813	0	0,3813
3 h	-0,3813	0	0,3813
24 h	0,9489	1,3302	1,7115
72 h	-0,3813	0	0,3813
96 h	-0,3813	0	0,3813
120 h	-0,3813	0	0,3813

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE FREQUENZ AN MULTIPLE MITOTIC ASTERS UNTER 1 μ M TAXOL[®]**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,4702; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,4702	0	0,4702
3 h	-0,4702	0	0,4702
24 h	5,4642	5,9344	6,4046
72 h	-0,0821	0,3881	0,8582
96 h	-0,1101	0,3601	0,8302
120 h	-0,4702	0	0,4702

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,7497; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,7497	0	0,7497
3 h	-0,7497	0	0,7497
24 h	5,4751	6,2248	6,9744
72 h	-0,2412	0,5084	1,2581
96 h	-0,1162	0,6224	1,3831
120 h	-0,1352	0,6145	1,3641

HE - MORPHOMETRIE (eingehende Messwerte insgesamt : 1200)

MITOSEFREQUENZ

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE MITOSEFREQUENZ UNTER VERSCHIEDENEN PACLITAXEL-KONZENTRATIONEN

CLEAR-CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	1h	3h	24h	72h	96h	120h	½-Konfidenz
Kontrolle	1,1282	0,8416	1,6642	2,7811	2,0673	2,2478	0,1278
0,001 μ M	0,6772	1,0983	2,9917	2,0739	0,9229	2,6977	0,0986
0,01 μ M	0,7182	2,2726	3,9332	0,5385	7,0106	4,6934	0,111
0,1 μ M	0,5583	0,7691	8,8218	4,3999	9,8738	6,926	0,109
1 μ M	0,9797	2,1482	20,7036	4,4297	6,9782	4,6229	0,1891
10 μ M	0,9048	1,7158	22,1006	7,4621	3,3904	3,8472	0,092

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	1h	3h	24h	72h	96h	120h	½-Konfidenz
Kontrolle	0,3165	0,2339	2,4824	0,7958	1,4711	0,8734	0,1234
0,001 μ M	0,4863	0,4226	0,5501	0,952	0,6603	0,4943	0,082
0,01 μ M	0,6329	0,2573	2,8209	0,5169	0,4302	0,4964	0,0847
0,1 μ M	0,4284	0,5392	8,0943	1,4524	1,1761	0,695	0,1091
1 μ M	0,1416	0,1998	8,0368	1,252	0,9135	0,4165	0,1073
10 μ M	0,162	0,3025	0,2253	0,9115	1,1394	0,4646	0,0793

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE MITOSEFREQUENZ GEMITTELT ÜBER ALLE PACLITAXEL-KONZENTRATIONEN

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 50

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95 ; ½ - Konfidenzintervall = 1,924198; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,5242	1,4	3,3242
3 h	0,8958	2,82	4,7442
24 h	17,9758	19,9	21,8242
72 h	3,6358	5,56	7,4842
96 h	5,1958	7,12	9,0442
120 h	4,3758	6,3	8,2242

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 50

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,576716; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	-0,0567	0,52	1,0967
3 h	-0,1567	0,42	0,9967
24 h	4,3033	4,88	5,4567
72 h	0,6033	1,18	1,7567
96 h	0,4433	1,02	1,5967
120 h	0,0233	0,6	1,1767

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE MITOSEFREQUENZ UNTER VERSCHIEDENEN TAXOL®-KONZENTRATIONEN**CLEAR-CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	1h	3h	24h	72h	96h	120h	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
Kontrolle	1,1282	0,8416	1,6642	2,7811	2,0673	2,2478	0,1278
0,001 μ M	1,2048	0,9605	1,6722	1,2655	2,1051	2,5344	0,091
0,01 μ M	0,81622	1,3465	10,0149	4,9228	6,28155	3,3416	0,1159
0,1 μ M	0,979	0,8707	19,6121	4,9937	5,864	3,0686	0,1049
1 μ M	1,1973	0,0987	17,0971	3,7314	5,5369	3,5686	0,0668
10 μ M	1,1535	2,0916	12,5249	0,1285	0,7387	1,4126	0,086

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	1h	3h	24h	72h	96h	120h	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
Kontrolle	0,3165	0,5137	2,4824	0,7958	1,4711	0,8734	0,1234
0,001 μ M	0,2207	0,2472	4,4541	0,9675	0,414	0,5123	0,0885
0,01 μ M	0,7284	0,4193	4,1857	0,6992	0,3404	0,4608	0,1217
0,1 μ M	0,171	0,2991	0,8337	0,9824	0,2477	0,3478	0,0789
1 μ M	0,2084	0,3067	3,5229	1,5399	0,2577	0,4337	0,1246
10 μ M	0,1443	0,4199	1,4842	0,8726	0,4086	0,4193	0,1309

EINFLUSS DER EXPOSITIONSZEIT AUF DIE MITOSEFREQUENZ GEMITTELT ÜBER ALLE TAXOL®-KONZENTRATIONEN**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 50

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 1,545037; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	0,355	1,9	3,445
3 h	0,255	1,8	3,345
24 h	18,615	20,16	21,705
72 h	2,395	3,94	5,485
96 h	4,175	5,72	7,265
120 h	2,195	3,74	5,285

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Expositionszeit = 60

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,369399; Angaben in [%]

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
1 h	0,0106	0,38	0,7494
3 h	0,1106	0,48	0,8494
24 h	3,0906	3,46	3,8294
72 h	0,7906	1,16	1,5294
96 h	0,0306	0,4	0,7694
120 h	0,1506	0,52	0,8894

ZELLEN MIT MICRONUCLEI**EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION AUF DIE HÄUFIGKEIT AN ZELLEN MIT MICRONUCLEI BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN****CLEAR-CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	0,17467	0,15252	0,54687	0,2362	0,0867	0,04695	0,0339
3h	0,1068	0,2884	0,1384	0,4284	0,2275	0,3361	1,053
24h	0,10661	0,31448	0,27629	0,47177	5,4267	6,06108	0,14106
72h	0,10532	0,29899	0,56426	11,6615	49,82563	57,32955	0,0774
96h	0,11904	0,13575	10,842	25,42811	39,31375	59,73552	0,1722
120h	0,08536	0,12755	4,69397	19,99412	34,96794	51,56896	0,10519

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	½-Konfidenz
1h	0,29205	0,57834	1,05716	1,84622	1,36508	1,28564	0,10119
3h	0,5172	1,6483	1,3889	1,198	1,6044	1,6425	0,5258
24h	1,16123	1,43148	5,73162	3,33961	3,25872	2,34001	0,11806
72h	0,73471	1,76658	46,61681	61,40683	63,11524	70,66636	0,46356
96h	0,9774	20,47241	39,4816	55,95798	97,36414	68,61364	0,49586
120h	0,82111	4,13407	51,32346	62,29533	67,79967	69,91219	0,33686

EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION AUF DIE HÄUFIGKEIT AN ZELLEN MIT MICRONUCLEI GEMITTELT ÜBER ALLE**EXPOSITIONSZEITEN****CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 5,434185

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-5,084	0,35	5,784
0,01 μ M	-1,401	4,033	9,468
0,1 μ M	7,099	12,533	17,968
1 μ M	23,432	28,867	34,301
10 μ M	30,816	36,25	41,684

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 7,261458

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-1,595	5,667	12,928
0,01 μ M	18,722	25,983	33,245
0,1 μ M	24,472	31,733	38,995
1 μ M	28,239	35,5	42,761
10 μ M	28,372	35,633	42,895

EINFLUSS DER TAXOL®-KONZENTRATION AUF DIE HÄUFIGKEIT AN MICRONUCLEI BEI VERSCHIED. EXPOSITIONSZEITEN**CLEAR-CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	½-Konfidenz
1h	0,17467	0,09525	0,10311	0,09629	0,11637	0,10143	0,0280829
3h	0,1267	0,2491	0,1045	0,0992	0,3227	0,2368	0,1553
24h	0,10661	0,93953	5,4923	7,23765	5,33201	6,98005	0,08879
72h	0,10532	0,14618	6,71313	54,92895	63,12123	16,09651	0,14728
96h	0,11904	0,08911	12,316	47,84914	55,03987	7,11687	0,18654
120h	0,08536	0,14142	1,52369	31,64864	51,72744	10,02607	0,10089

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	½-Konfidenz
1h	0,29205	0,70994	1,09831	0,98505	1,02753	1,13088	0,10996
3h	0,452	0,5183	0,7925	1,3034	1,021	1,3056	0,6382
24h	1,16123	3,60573	4,71097	7,31692	4,08291	4,45324	0,13261
72h	0,73471	22,42662	58,16711	63,83699	67,85091	74,42952	0,80503
96h	0,9774	24,52091	54,550405	65,3151	64,38844	64,05933	0,46479
120h	0,82111	19,52327	60,85428	63,82308	69,4377	67,57501	0,31582

EINFLUSS DER TAXOL®-KONZENTRATION AUF DIE HÄUFIGKEIT AN ZELLEN MIT MICRONUCLEI GEMITTELT ÜBER ALLE EXPOSITIONSZEITEN**CLEAR - CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 5,037036

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	-4,52	0,517	5,554
0,01 μ M	1,496	6,533	11,57
0,1 μ M	23,313	28,35	33,387
1 μ M	29,23	34,267	39,304
10 μ M	4,913	9,95	14,987

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

 $\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 7,58988

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	5,077	12,667	20,257
0,01 μ M	24,227	31,817	39,407
0,1 μ M	25,96	33,55	41,14
1 μ M	28,543	36,133	43,723
10 μ M	26,827	34,417	42,007

APOPTOSEINDUKTION**EINLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE APOPTOSEFREQUENZ****CLEAR-CA 11**

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	0,10448	0,54896	0,72051	0,50324	0,65145	0,60851	0,070052
3h	0,26794	0,51317	0,80045	0,51252	0,84505	0,63528	0,0830679
24h	0,35756	0,68376	0,75177	0,4145	0,50301	1,28837	0,0781185
72h	0,09174	0,03861	0,13791	0,5664	1,07566	1,19842	0,0659545
96h	0,10568	0,75322	0,67785	2,24428	2,23288	2,42017	0,1058168
120h	0,11579	0,51865	1,87757	1,7468	3,58245	3,76981	0,0873541

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

 $\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	0,36186	0,35255	0,55239	0,64096	0,81733	1,92542	0,08044
3h	0,98596	1,01805	1,01319	2,38333	1,24087	1,50691	0,21201
24h	1,1455	1,06448	1,22033	0,97708	0,50621	0,91649	0,10289
72h	1,63712	1,16298	2,60329	1,16999	1,51596	1,57726	0,13265
96h	0,39752	1,51381	4,74821	4,08031	4,14697	4,18034	0,11577
120h	0,61482	0,62925	5,02571	9,23441	5,65894	9,405815	0,15762

EINFLUSS DER PACLITAXEL-KONZENTRATION AUF DIE APOPTOSEFREQUENZ GEMITTELT ÜBER ALLE EXPOSITIONSZEITEN

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,420647

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	0,5627	0,9833	1,404
0,01 μ M	1,046	1,4667	1,8873
0,1 μ M	1,096	1,5167	1,9373
1 μ M	1,896	2,3167	2,7373
10 μ M	1,8127	2,2333	2,654

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; $\frac{1}{2}$ - Konfidenzintervall = 0,655885

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	0,6274	1,2833	1,9392
0,01 μ M	2,2441	2,9	3,5559
0,1 μ M	2,5274	3,1833	3,8392
1 μ M	1,8774	2,5333	3,1892
10 μ M	2,7441	3,4	4,0559

EINFLUSS DER TAXOL[®]-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN EXPOSITIONSZEITEN AUF DIE APOPTOSEFREQUENZ

CLEAR-CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	$\frac{1}{2}$ -Konfidenz
1h	0,10448	0,23527	0,42703	0,63283	0,50598	0,44701	0,0607638
3h	0,26794	0,35388	0,78521	0,54007	0,33769	0,34856	0,0905713
24h	0,35756	0,55862	0,69148	0,27926	0,37428	0,60787	0,0631947
72h	0,09174	0,48121	2,16438	2,1755	1,270595	1,43393	0,1030402
96h	0,10568	0,18216	1,10018	1,5025	1,93168	1,69218	0,0873541
120h	0,11579	0,40316	1,2709	2,5356	2,95044	1,41259	0,075786

CLEAR-CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration und Expositionszeit = 10

$\alpha = 0,05$; Vertrauensintervall = 0,95; Angaben in [%]

	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	½-Konfidenz
1h	0,36186	0,28405	0,27882	0,16418	0,96687	1,46944	0,08352
3h	0,98596	0,37826	1,98121	1,45145	1,30518	0,73062	0,10965
24h	1,1455	0,49951	0,53543	1,00265	0,8534	0,93251	0,10216
72h	1,63712	1,66788	2,34961	1,21805	1,96896	1,76791	0,15794
96h	0,39752	1,26476	3,45307	6,25564	3,24168	3,80293	0,16359
120h	0,61482	0,47854	5,25717	5,5564	5,65645	5,93217	0,11016

EINFLUSS DER TAXOL®-KONZENTRATION AUF DIE APOPTOSEFREQUENZ GEMITTELT ÜBER ALLE EXPOSITIONSZEITEN

CLEAR - CA 11

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 0,359181

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	0,3575	0,7167	1,0758
0,01 μ M	1,2408	1,6	1,9592
0,1 μ M	1,4408	1,8	2,1592
1 μ M	1,2908	1,65	2,0092
10 μ M	1,3742	1,7333	2,0925

CLEAR - CA 15

Anzahl der Beobachtungswerte pro Konzentration = 60

$\alpha = 0.05$; Vertrauensintervall = 0.95 ; ½ - Konfidenzintervall = 0,567192

	untere Ver - trauensgrenze	Mittelwert	obere Ver - trauensgrenze
0,001 μ M	0,3661	0,9333	1,5005
0,01 μ M	2,0495	2,6167	3,1839
0,1 μ M	2,1495	2,7167	3,2839
1 μ M	1,9995	2,5667	3,1339
10 μ M	2,0995	2,6667	3,2339

KORRELATION WACHSTUMSINHIBITION UNTER PACLITAXEL - BÜNDELINDUKTION**CLEAR - CA 11**Regressionsgerade : $y = 2,6241x - 1,7849$;

Bestimmtheitsmaß = 0,8702

Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,933

Bündel	Inhibition
0	0
0	-1,3
0	-8,7
0	0
0,89656	-3,5
1,98136	-1
0	0
0,91353	0,5
9,37372	2,4
0	0
2,12529	7,8
20,87722	36,1
0	0
1,65082	8,5
23,23224	63,6
0	0
1,70913	12,6
24,13665	78,9

CLEAR - CA 15Regressionsgerade : $y = 1,0005x - 1,4688$;

Bestimmtheitsmaß = 0,1401

Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,374

Bündel	Inhibition
0	0
0	-0,4
0	5,3
0	0
0,69141	-1,4
6,70941	3,5
0	0
0	-6,9
2,90908	-8,3
0	0
0	-6,1
3,38133	-0,1
0	0
0,18256	-7,5
3,86317	2,1
0	0
0	-0,5
3,78998	15,4

KORRELATION WACHSTUMSINHIBITION UNTER TAXOL® - BÜNDELINDUKTION**CLEAR - CA 11**Regressionsgerade : $y = 1,3706x - 3,0276$;

Bestimmtheitsmaß = 0,6486

Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,805

Bündel	Inhibition
0	0
0	-8,5
0	1,31
0	0
1,98136	-1
4,9124	4,8
0	0
1,97656	1,9
18,50249	1,9
0	0
4,63286	25,2
27,85389	28,3
0	0
3,00882	45,9
41,4435	58,6
0	0
9,9	36,2
41,93718	73,9

CLEAR - CA 15Regressionsgerade : $y = -0,3588x - 0,8863$;

Bestimmtheitsmaß = 0,0266

Korrelationskoeffizient nach Pearson : -0,163

Bündel	Inhibition
0	0
0,17998	1,5
0	3,2
0	0
1,0143	0,6
8,40893	3,6
0	0
5,47301	-11,2
7,09267	-8,8
0	0
0,23587	-7,9
4,10711	-12,5
0	0
0,27764	-3,7
2,48677	-9,3
0	0
0,28162	4,1
5,4095	11,9

KORRELATION ZWISCHEN WACHSTUMSINHIBITION UNTER PACLITAXEL UND DER APOPTOSEFREQUENZ				KORRELATION ZWISCHEN WACHSTUMSINHIBITION UNTER TAXOL® UND DER APOPTOSEFREQUENZ			
CLEAR - CA 11		CLEAR - CA 15		CLEAR - CA 11		CLEAR - CA 15	
Regressionsgerade : $y = 18,653x - 0,6644$;		Regressionsgerade : $y = 2,0923x - 3,7774$;		Regressionsgerade : $y = 26,942x - 3,7092$;		Regressionsgerade : $y = 1,9283x - 2,3579$;	
Bestimmtheitsmaß = 0,4646		Bestimmtheitsmaß = 0,4308		Bestimmtheitsmaß = 0,5766		Bestimmtheitsmaß = 0,0862	
Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,682		Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,656		Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,759		Korrelationskoeffizient nach Pearson : 0,294	
Apoptose [%]	Inhibition [%]	Apoptose [%]	Inhibition [%]	Apoptose [%]	Inhibition [%]	Apoptose [%]	Inhibition [%]
0,10449	0	0,36186	0	0,10449	0	0,36186	0
0,49904	-1,3	0,35255	-0,4	0,23527	-8,5	0,28404	1,5
0,7205	-5,7	0,55238	1,4	0,42703	-7,8	0,27882	4,7
0,50524	-7,4	0,64095	3,28	0,63283	-6,5	0,16418	2
0,72383	-8,7	0,81732	5,3	0,50599	1,31	0,96686	3,2
0,60852	-11,7	3,54704	-0,007	0,47701	47,9	1,46944	39,4
0,26794	0	1,47733	0	0,26794	0	1,47733	0
0,46317	-3,5	1,01805	-1,4	0,35389	-1,9	0,37826	0,6
0,80045	-2,01	1,08352	0,25	0,78522	-2,7	1,98403	1,1
0,61252	-3,1	1,41558	2,1	0,54007	-1,9	1,45145	2,5
0,84505	-1	1,24088	3,5	0,33768	4,8	1,30517	3,6
0,63527	-2,3	1,50691	2,64	0,34855	55,5	0,7306	27,3
0,35756	0	1,14549	0	0,35756	0	1,14549	0
0,68577	0,5	1,06447	-6,9	0,55862	1,9	0,49953	-11,2
0,74178	1,6	1,22031	-7,6	0,69146	1,5	0,53543	-11,9
0,4145	2,9	0,97707	-8,5	0,27929	1,2	1,00265	-9,9
0,48338	2,4	0,5062	-8,3	0,37428	1,9	0,8734	-8,8
1,1333	-4,8	0,91647	-2,5	0,60787	12	0,9325	-3,2
0,09174	0	1,73711	0	0,09174	0	1,73711	0
0,03861	7,8	1,16297	-6,1	0,48121	25,2	1,66787	-7,9
0,13791	23,8	2,6033	-8,1	2,16437	30,4	2,34961	-6
0,54107	30,4	1,16999	-5,4	2,17559	33,2	1,37678	-6,1
1,07566	36,1	1,51595	-0,1	1,27058	28,3	1,96895	-12,5
1,18459	24,1	1,57726	7,57	1,43392	8,6	1,768	-16,9
0,75322	0	0,39752	0	0,75322	0	0,39752	0
0,67784	8,5	1,51381	-7,5	1,10018	45,9	1,26475	-3,7
2,07605	37,6	4,54822	-5,1	1,50249	56,6	3,45307	-5,3
2,23287	59,8	4,08029	-0,8	1,93167	60,6	6,25563	-2,6
4,20233	63,6	4,14695	2,1	1,76068	58,6	3,24168	-9,3
0,18215	58,3	4,48032	14,6	1,47022	37,6	3,80293	8,1
0,11579	0	0,61482	0	0,11579	0	0,61482	0
0,51865	12,6	0,62925	-0,5	1,27089	36,2	0,59903	4,1
1,6482	60,3	5,02569	5,7	2,28513	62,9	5,25802	8,2
3,55042	73,7	9,23443	8,6	2,95043	74,7	5,72589	15,3
3,76982	78,9	5,65892	15,4	1,41259	73,9	5,65644	11,9
0,40316	75,2	9,40581	26,8	2,30448	60,8	5,93217	29,8

EINFLUSS VON CREMOPHOR® EL AUF DIE ZELLZYKLUSVERTEILUNG**PHASENAUFTEILUNG IM ZELLZYKLUS NACH 72 STUNDEN****CLEAR - CA 11
KONTROLLE**

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		49,44	33,1	15,61
mean	x	53,62	80,12	103,93
	y	20,17	79,96	24,79
peak	x	55	62	110
	y	0	91	0
SD	x	4,91	18,54	9,45
	y	14,54	14,05	16,52
CV %	x	8,83	23,15	9,09
	y	72,08	17,57	66,62

CREMOPHOR® EL / ETHANOL c min = 7,5 x 10⁻⁵ mg / ml

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		41,48	46,63	11,31
mean	X	48,7	74,78	93,49
	y	45,93	89,16	54,5
peak	X	49	54	97
	y	0	91	0
SD	X	4,75	19,52	6,53
	y	17,49	11,72	16,52
CV %	X	9,74	26,11	6,99
	y	38,07	13,14	30,32

CREMOPHOR® EL / ETHANOL c max = 7,5 x 10⁻¹ mg / ml

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		57,46	32,46	11,08
mean	x	45,19	67,07	86,83
	y	23,76	72,95	29,08
peak	x	46	49	90
	y	0	77	0
SD	x	4,82	17,72	6,03
	y	15,18	12,62	16,7
CV %	x	10,67	26,43	6,94
	y	63,89	17,3	57,42

ZELLYKLUSVERTEILUNG NACH 120 STUNDEN**CLEAR - CA 11****KONTROLLE**

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		54,12	36,13	10,27
mean	x	45,14	66,22	87,26
	y	23,19	75,29	28,52
peak	x	46	48	91
	y	0	85	0
SD	x	3,61	17,69	6,26
	y	15,27	13,44	16,99
CV %	x	8	26,71	7,18
	y	65,86	17,85	58,88

CREMOPHOR® EL / ETHANOL c min = 7,5 x 10⁻⁵ mg / ml

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		54,55	39,03	7,6
mean	x	39,55	59,02	76,74
	y	29,88	71,77	36,62
peak	x	39	41	76
	y	0	56	0
SD	x	3,73	16,55	5,85
	y	13,71	12,73	14,26
CV %	x	9,43	28,03	7,62
	y	45,9	17,74	38,96

CREMOPHOR® EL / ETHANOL c max = 7,5 x 10⁻¹ mg / ml

		G1 / G0	S	G2 / M
gated %		41,73	46,58	13,29
mean	x	44,28	70,32	82,47
	y	43,52	79,67	42,45
peak	x	45	50	84
	y	0	79	0
SD	x	3,96	17,69	6,66
	y	17,15	9,57	22,19
CV %	x	8,94	25,15	8,07
	y	39,4	12,01	52,28

Literaturverzeichnis

1. ADLER - LM, HERZOG - TJ, WILLIAMS - S, RADER - JS, MUTCH - DG: Analysis of exposure times and dose escalation of paclitaxel in ovarian cancer cell lines. *Cancer* 74, 1994, 1891-1898
2. AIN - KB, TOFIQ - S, TAYLOR - KD: Antineoplastic activity of taxol against human anaplastic thyroid carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81, 1996, 3650-3653
3. ALBERTINI - DF, HERMAN - B, SHERLINE - P: in vivo and in vitro studies on the role of HMW - MAP's in taxol-induced microtubule bundling. *European Journal of Cell Biology* 33, 1984, 134-143
4. AMOS - LA, KLUG - A: Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *Journal of Cell Science* 14, 1974, 523-549
5. ANDREASSEN - PR, MARGOLIS - RL: Microtubule dependency of p34^{cdc2} inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 127, 1994, 789-802
6. ANDREU - JM, BORDAS - J, DIAZ - JF, GARCIA DE ANCOS - J, GIL - R, MEDRANO - FJ: Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X - ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from pure tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *Journal of Molecular Biology* 226, 1992, 169-184
7. ARBUCK - SG, CHRISTIAN - MC, FISHERMAN - JS, CAZENAVE - A, SAROSY - G, SUFFNESS - M, ADAMS - J, CANETTA - R, COLE - KE, FRIEDMANN - MA: Clinical development of taxol. *Monograph of the National Cancer Institute* 15, 1993, 11-24
8. ARNAL - I, WADE - RH: How does taxol stabilize microtubules? *Current Biology* 5, 1995, 900-908
9. BAGULEY - BC, MARSHALL - ES, WHITTAKER - MC, DOTCHIN - MC, NIXON - J, MCCRYSTAL - MR, FINLAY - GJ, MATTHEWS - JHL, HOLDAWAY - KM, VAN ZIJL - P: Resistance mechanisms determining the in vitro sensitivity to paclitaxel of turnout cells cultured from patients with ovarian cancer. *European Journal of Cancer* 31A, 1995, 230-237
10. BANERJEE - S, FALLIS - AG, BROWN - DL: Differential affects of taxol on two human cancer cell lines. *Oncological Research* 9, 1997, 237-248
11. BHALLA - K: Microtubule - targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22, 2003, 9075 - 9086

12. BHALLA - K, HUANG - Y, TANG - C, SELF - S, RAY - S, MAHONEY - MA, PONNATHPUR - V, TOURKINA - E, IBRADO - AM, BULLOCK - G: Characterization of human myeloid leukemia cell line highly resistant to taxol. *Leukemia* 8, 1994, 465-475
13. BHALLA - K, IBRADO - AM, TOURKINA - E, TANG - C, MAHONEY - ME, HUANG - Y: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 7, 1993, 563-568
14. BICHLER - KH, KLEINKNECHT - S, NELDE - HJ, STROHMAIER - WL: TNF in benign and malign tissue of the kidney. *Urological Research* 19, 1991, 367-373
15. BOGGS - BA, GONZALEZ-GARAY - ML, O'BRIAN - WE: Mechanisms of resistance to drugs that target microtubules. Proceedings of the Second interface of Clinical and Laboratory Responses to Anticancer Drugs: Drugs and Microtubules [abstract] Marseilles, France, April 2-4, 1992, 13
16. BORISY - GG, OLMSTED - JB, MARCUM - JM, ALLEN - C: Microtubule assembly in vitro. *Federal Proceedings of the Federal American Society of Experimental Biology* 33, 1974, 167-174
17. BORNKESSEL - B: Paclitaxel: Chemie und Gewinnung. *Arzneimitteltherapie extra* 16, 1994, 1-8
18. BRENNER - SL, BRINKLEY - BR: Tubulin assembly sites and the organization of microtubule arrays in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 46, 1982, 241-254
19. BRETHEAU - D, LECHEVALLIER - E, EGHAZARIAN - C, GRISONI - V, COULANGE - C: Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. *European Urology* 27, 1995, 319-323
20. BREUNIGER - LM, PAUL - S, GAUGHAN - K, MIKI - T, CHAN - A, AARONSON - SA, KRUEH - GD: Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Research* 55, 1995, 5342-5347
21. BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, Fachinformation, Princeton, NJ 08543, USA. Rev July 2007. FDA rev date: 3/5/2003
22. BRITO - DA, RIEDER - CL: Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint, *Current Biology* 16, 2006, 1194 - 1200

23. BRITO – DA, YANG – Z, RIEDER – CL: Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied, *Journal of Cell Biology* 182, 2008, 623 - 629
24. BURKHART - CA, BERMAN - JW, SWINDELL - Cs, HORWITZ - SB: Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor- α gene expression and cytotoxicity. *Cancer Research* 54, 1994, 5779-5782
25. CABRAL - RC, BRADY - RC, SCHIEBLER - MJ: A mechanism of cellular resistance to drugs that interfere with microtubule assembly^a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 466, 1986, 745-756
26. CABRAL - F, ABRAHAM - I, GOTTESMAN - MM: Isolation of a taxol-resistant chinese hamster ovary cell mutant that has an alteration in α -tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78, 1981, 4388-4391
27. CARLIER - MF: Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. In: *International Review of Cytology*, Bd. 115, BOURNE - GH, JEON - KW, FRIEDLANDER - M, Hrsg., Academic Press, 1989, 143-170
28. CHANG - YF, LI - LL, WU - CW, LIU - TY, LUI - WY, P'ENG - FK, CHI - CW: Paclitaxel - induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. *Cancer* 77, 1996, 14-18
29. CHAPIN - SJ, BULINSKI - JC, GUNDERSEN - GG: Microtubule bundling in cells. *Nature* 349, 1991, 24
30. CHEN – JG, HORWITZ – SB: Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and – destabilizing drugs, *Cancer Research* 62, 2002, 1935 - 1938
31. CORDON-CARDO - C, O'BRIAN - JP, BOCCIA - J, CASALS - D, BERTINO - JR, MELAMED - MR: Expression of the multidrug resistance gene product (p-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38, 1990, 1277-1287
32. DAVIDSE - LC, FLACH - W: Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology* 72, 1977, 174-193
33. DEBRABANDER - MG, GEUENS - G, NUYDENS - R, WILLEBRORDS - R, AERTS - F, DEMEY - J, MCINTOSH - JR: Microtubule dynamics during the cell cycle: The effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of PtK2 cells at different stages of the mitotic cycle. *International Review of Cytology* 101, 1986, 215-274

34. DE BRABANDER - MG, GEUENS - G, NUYDENS - R, WILLERBRORDS - R, DEMEY - J: Microtubule stability and assembly in living cells: The influence of metabolic inhibitors, taxol and pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78, 1982, 5608-5612
35. DIAZ - JF, MENENDEZ - M, ANDREU - JM: Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* 32, 1993, 10067-10077
36. DING - AH, PORTEU - F, SANCHEZ - E, NATHAN - CF: Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science* 248, 1990, 370-372
37. DOLBEARE - F, GRATZNER - H, PALLAVICINI - MG, GRAY - JW: Flow cytometry measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1983, 5573
38. DUMONTET - C, DURAN - GE, STEGER - KA, BEKETIC-ORESKOVIC - L, SIKIC - BI: Resistance mechanisms in human sarcoma mutants derived by single-step exposure to paclitaxel (taxol). *Cancer Research* 56, 1996, 1091-1097
39. DUSTIN - P: *Microtubules*, DUSTIN - P, Hrsg., 2. Aufl., Springer Verlag: Berlin, New York, Heidelberg, 1984
40. DYE - RB, FINK - SP, WILLIAMS - RC: Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and tau. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 1993, 6847-6850
41. EICHENAUER - R, VANHERPE - H: Nierenzellkarzinom. In: *Leitfaden Urologie*. SCHAFFLER - A, RENZ - U, Hrsg. 2 Aufl., Lübeck, Stuttgart, Jena, Ulm, Gustav Fischer Verlag, 1996, 243-247
42. EINZIG - AI, GOROWSKY - E, SASLOFF - J, WIERNIK - PH: Phase II trial of taxol in patients (pts) with renal cell carcinoma. *Cancer Investigation*, 9, 1991, 133-136
43. FERGUSON - RE, TAYLOR - C, STANLEY - A, BUTLER - E, JOYCE - A, HARNDEN - P, PATEL - PM, SELBY - PJ, BANKS - RE: Resistance to the tubulin-binding agents in renal cell carcinoma: no mutations in the class I beta-tubulin gene but changes in tubulin isotype protein. *Clinical Cancer Research* 11 (9), 2005, 3439 - 3445
44. FISCHER - CG, WÄCHTER - W, FUENTECILLA-PEREZ - E, MILLER - J, WEIDNER - W, DUDECK - J: Urologische Tumoren in Deutschland. *Urologe [A]* 36, 1997, 143-150
45. FJÄLLSKOG - ML, FRII - L, BERGH - J: Is cremophor EL solvent for paclitaxel cytotoxic? *Lancet* 342, 1993, 873

46. FJÄLLSKOG - ML, FRII - L, BERGH - J: Paclitaxel - induced cytotoxicity - the effects of cremophor EL (castor oil) on two human breast cancer cell lines with acquired multidrug resistant phenotype and induced expression of the permeability glycoprotein. *European Journal of Cancer* 30A, 1994, 687-690
47. FUCHS - DA, JOHNSON - RK: Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer Treatment Reports* 62, 1978, 1219-1222
48. GASCOIGNE - KE, TAYLOR - SS: How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?, *Journal of Cell Science* 122, 2009, 2579 - 2585
49. GASKIN - F, CANTOR - CR, SHELANSKY - ML: Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *Journal of Molecular Biology* 89, 1974, 737-755
50. GONCALVES - A, BRAGUER - D, KAMATH - K, MARTELLO - L, BRIAND - C, HORWITZ - S, WILSON - L, JORDAN - MA: Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (20), 2001, 11737 - 11742
51. GOTTESMAN - MM, PASTAN - I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review in Biochemistry* 62, 1993, 385-427
52. GRAWITZ - P: Die sogenannten Lipome der Niere, *Virchows Archiv, Pathological anatomy and histopathology* 93, 1883, 39
53. GUINAN - PD, VOGELZANG - NJ, FREMGEN - AM: Renal cell carcinoma tumor size, stage and survival. *The Journal of Urology* 153, 1995, 901-903
54. HABER - M, BURKHART - CA, GEGL - DL, MADAFIGLIO - J, NORRIS - MD, HORWITZ - SB: Altered expression of M β 2, the class II β -tubulin isotype, in a murine J774.2 cell line with a high level of taxol resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 52, 1995, 31269-31275
55. HEIDEMANN - SR, GALLAS - PT: The effect of taxol on living eggs of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 80, 1980, 489-494
56. HERMAN - B, LANGEVIN - MA, ALBERTINI - DF: The effects of taxol on the organization of the cytoskeleton in cultured ovarian granulosa cells. *European Journal of Cell Biology* 31, 1983, 34-45
57. HIDDEMANN - W, SCHUMANN - J, ANDREEFF - M: Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 13, 1984, 181-183

58. HOLMES - FA, WALTERS - RS, THERIAULT - RL, FORMAN - AD, NEWTON - LK, RABER - MN, BUZDAR - AU, FRYE - DK, HORTOBAGYI - GN: Phase II trial of taxol: An active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 1991, 1797-1805
59. HOLTON - RA, SOMOZA - C, KIM - HB, LIANG - F, BIEDIGER - RJ, BOATMAN - PD, SHINDO - M, SMITH - C, KIM - S, NADIZADEH - H, SUZUKI - Y, TAO - C, VU - P, TANG - S, ZHANG - P, MURTHI - KK, GENTILE - LN, LIU - JH: First total synthesis of taxol. *Journal of the American Chemistry Society*. 116, 1994, 1597-1598
60. HORTOBAGYI - GN, HOLMES - FA: Single-agent paclitaxel for the treatment of breast cancer: an overview. *Seminars in Oncology* 23 (1 Suppl. 1), 1996, 4-9
61. HORWITZ - SB: How to make taxol from scratch. *Nature* 367, 1994, 593-394
62. HORWITZ - SB, LOTHSTEIN - L, MANFREDI - JJ, MELLADO - W, PARNES - J, ROY - SN, SCHIFF - PB, SORBARA - L, ZEHEB - R: Taxol: Mechanisms of action and resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 466, 1986, 733-744
63. HORWITZ - SB, PARNES - J, SCHIFF - PB, MANFREDI - JJ, Taxol: A new probe for studying the structure and function of microtubules. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology* 46, 1982, 219-226
64. HOWARD - WD, TIMASHEFF - SN: Linkages between the effects of taxol, colchicine, and GTP on tubulin polymerization. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 1988, 1342-1346
65. HUANG - Y, IBRADO - AM, REED - JC, BULLOCK - G, RAY - S, TANG - C, BHALLA - K: Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells. *Leukemia* 11, 1997, 253-257
66. HUIZING - MT, KEUNG - ACF, ROSING - H: Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 11, 1993, 2127-2135
67. JAFFREZOU - JP, DUMONTET - C, DERRY - WB, DURAN - G, CHEN - G, TSUCHIYA - E, WILSON - L, JORDAN - MA, SIKIC - BI: Novel mechanism of resistance to paclitaxel (taxol) in human K562 leukemia cells by combined selection with PSC 833. *Oncology Research* 7, 1995, 517-527
68. JAMIS-DOW - CA, KLECKER - RW, SAROSY - G: Steady-state plasma concentrations and effects of taxol for a 250 mg/m² dose in combination with granulocyte-colony stimulating factor in patients with ovarian cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33, 1993, 48-52

69. JORDAN - MA, TOSO - JR, THROWER - D, WILSON - L: Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations Proceedings of the National Academy of Science USA 90, 1993, 9552-9556
70. JORDAN - MA, WENDELL - K, GAEDINER - S, DERRY - WB, COPP - H, WILSON - L: Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. Cancer Research 56, 1996, 816-825
71. KALLMEYER - JC, DITTRICH - OC: Spontaneous regression of metastases in a case of bilateral renal cell carcinoma. The Journal of Urology 148, 1992, 138-140
72. KEARNS - C, GIANNI - L, VIGANO - L: Non-linear pharmacokinetics of taxol in humans [abstract 341], Proceedings of the American Society of Clinical Oncology, 12, 1993, 135
73. KIM - WJ, KAKEHI - Y, KINOSHITA - H, ARAO - S, FUKUMOTO - M, YOSHIDA - O: Expression patterns of multidrug-resistance (MDR1), multidrug resistance-associated protein (MRP), glutathion-S-transferase- π (GST- π) and DNS topoisomerase II (Topo II) genes in renal cell carcinomas and normal kidney. The Journal of Urology 156, 1996, 506-511
74. KOELLER - J, BROWN - T, HAVLIN - K: A phase I/ pharmacokinetic study of taxol given by a prolonged infusion without premedication. Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 8, 1989, 82
75. KRAUSE - DS, VAN ETTEN - RA: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy, New England Journal of Medicine 353, 2005, 172 - 187
76. KUMAR - N: Taxol-induced polymerization of purified tubulin. The Journal of Biological Chemistry 256, 1981, 10435-10441
77. KUNG - AL, SHERWOOD - SW, SCHIMKE - RT: Cell line specific difference in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 87, 1990, 9553-9557
78. KURIYAMA - R, BORISY - GG: Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole mount electron-microscopy. Journal of Cell Biology 91, 1981, 814-821
79. LAUTIER - D, CANITROT - Y, DEELEY - RG, COLE - SPC: Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. Biochemical Pharmacology 52, 1996, 967-977
80. LI - Y, BENEZRA - R: Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. Science 274, 1996, 246-248

81. LIEBMANN - JE, HAHN - SM, COOK - JA, LIPSCHULTZ - C, MITCHELL - JB, KAUFMANN - DC: Glutathione depletion by L-buthionine sulfoximine antagonizes taxol cytotoxicity. *Cancer Research* 53, 1993, 2066-2070
82. LIEBMANN - JE, COOK - JA, LIPSCHULTZ - C, TEAGUE - D, FISCHER - J, MITCHELL - JB: Cytotoxic studies of paclitaxel (taxol[®]) in human tumour cell lines. *British Journal of Cancer* 68, 1993a , 1104-1109
83. LIEBMANN - JE, COOK - JA, LIPSCHULTZ - C, TEAGUE - D, FISCHER - J, MITCHELL - JB: The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol[®]) in human tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 33, 1994, 331-339
84. LIEBMANN - J, COOK - JA, MITCHELL - JB: Cremophor EL, solvent for paclitaxel and toxicity. *The Lancet* 342, 1993b, 1428
85. LIEU - CH, CHANG - YN, LAI - YK: Dual cytotoxic mechanisms of submicromolar taxol on human leukemia HL60 cells. *Biochemical Pharmacology* 53, 1997, 1587-1596
86. LING - V: p-Glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer* 69, 1992, 2603-2609
87. LIU Y, BHALLA K, HILL C, PRIEST DG: Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation in taxol-induced apoptosis in a human ovarian tumor cell line. *Biochemical Pharmacology*, 48 (6), 1994, 1265-72
88. LONG - BH, FAIRCHILD - CR: Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. *Cancer Research* 54, 1994, 4355-4361
89. LOPES - NM, ADAMS - EG, PITTS - TW, BHUYAN - BK: Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 32, 1993, 235-242
90. LOWE - SW, RULEY - HE, JACKS - T, HOUSMAN - DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 1993, 957-967
91. LJUNGBERG - B, HANBURY - DC, KUCZYK - M, MERSEBURGER - AS, MULDER - PFA, PATARD - JJ, SINESCU - IC: Renal Cell Carcinoma Guideline, *European Urology* 51, 2007, 1502 - 1510
92. LYNCH - CF, COHEN - MB: Urinary system. *Cancer* 75, 1995, 316-329
93. MAKOWSKI - L: Electron crystallography Taxol bound on tubulin. *Nature* 375, 1995, 361-362

94. MANDEL - JS, MCLAUGHLIN - JK, SCHLEHOFER - B, MELLEMGARD - A, HELMERT - U, LINDBLAD - P, MCCREDIE - M, ADAMI - HO: International renal-cell cancer study . IV. occupation. *The International Journal of Cancer* 61, 1995, 601-605
95. MANFREDI - JJ, PARNES - J, HORWITZ - SB: Taxol binds to cellular microtubules. *The Journal of Cell Biology* 94, 1982, 688-696
96. MASANEK - U, STAMMLER - G, VOLM - M: Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin, taxol and cisplatin. *Anticancer-Drugs* 8, 1997, 189-198
97. MAU - J: Deskription von Assoziationen in empirischen Verteilungen bivariater Beobachtungen. In: *Grundlagen – Methodologie, Deskription und statistische Modelle. Klinische Statistik, Scriptum zur Hauptvorlesung Biomathematik in der Medizin, WS 1994/95, Teil 1*, 1994, 31-40
98. MAU - J: Die (einfaktorielle) Varianzanalyse (ANOVA). In: *Methoden - Analyse von Daten und Planung von Versuchen. Klinische Statistik, Scriptum zur Hauptvorlesung Biomathematik in der Medizin, WS 1994/95, Teil II*, 1994, 66-72
99. MCGUIRE - WP, ROWINSKY - EK, ROSENSHEIN - NB, GRUMBINE - FC, ETTINGER - DS, ARMSTRONG - DK, DONEHOWER - RC: Taxol: A unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Annals of Internal Medicine* 111, 1989, 273-279
100. MELLADO - W, MAGRI - NF, KINGSTON - DGI, GARCIA-ARENAS - R, ORR - GA, HORWITZ - SB: Preparation and biological activity of taxol acetates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 124, 1984, 329-336
101. MICKISCH - GH, ROEHRICH - K, KOESSIG - J, FORSTER - S, TSCHADA - RK, ALKEN - PM: Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma. *The Journal of Urology* 144, 1990, 755-759
102. MILROSS - CG, MASON - KA, HUNTER - NR, CHUNG - WK, PETERS - LJ, MILAS - L: Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 1996, 1308-1314
103. MILAS - L, HUNTER - NR, KURDOGLU - B, MASON - KA, MEYN - RE, STEPHENS - LC, PETERS - LJ: Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 35, 1995, 297-303

104. MILLWARD - M, MORTON - C, BISHPO - J, WOODCOCK - D: Cremophor is sufficient to inhibit p-glycoprotein activity in vitro. *Journal of the National Cancer institute* 85, 1993, 1685-1690
105. MINOTTI - AM, BARLOW - SB, CABRAL - F: Resistance to antimetabolic drugs in chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 1991, 3987-3994
106. MOSMAN - T: Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 1983, 55-63
107. NATIONAL CANCER INSTITUTE: Taxol Clinical Brochure, (NSC 125973) Bethesda, Md. Division of Cancer Treatment, NCI, 1991
108. NATIV - O, ARONSON - M, MEDALIA - O, MOLDAVSKY - T, SABO - E, RINGEL - I, KRAVTSOV - V: Anti-neoplastic activity of paclitaxel on experimental superficial bladder cancer: in vivo and in vitro studies. *International Journal of Cancer* 70, 1997, 297-301
109. NICOLAOU - KC, YANG - Z, LIU - JJ, UENO - H, NANTERMET - PG, GUY - RK, CLAIBORNE - CF, RENAUD - J, COULAODUROS - EA, PAULVANNAN - K: Total synthesis of taxol [see comments]. *Nature* 367, 1994, 630-634
110. NIIKURA - Y, DIXIT - A, SCOTT - R, PERKINS - G, KITAGAWA - K: BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *The Journal of Cell Biology* 178, 2007, 283 - 296
111. NOGALES - E, GRAYER-WOLF - S, KHAN - IA, LUDEÑA - RF, DOWNING - KH: Structure of tubulin at 6.5Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 375, 1995, 424-427
112. NYGREN - P, CSOKA - K, JONSSON - B, FRIDBORG - H, BERGH - J, HAGBERG - H, GLIMELIUS - B, BRODIN - O, THOLANDER - B, KREUGER - A, LÖNNERHOLM - G, JAKOBSSON - A, OLSEN - L, KRISTENSEN - J, LARSSON - R: The cytotoxic activity of taxol in primary cultures of tumor cells from patients is partly mediated by cremophor EL. *British Journal of Cancer* 71, 1995, 478-481
113. OUDARD - S, GEORGE - D, MEDIONI - J & R.: Treatment options in renal cell carcinoma: past, present and future, *Annals of Oncology* 18 (Supplement 10), 2007, x25 - x31
114. ORR - GA, VERDIER-PINARD - P, MCDAID - H, HORWITZ - SB: Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22, 2003, 7280 - 7295

115. PANTUCK – AJ, ZENG - G, BELLDEGRUN – AS: Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia- induced pathway. *Clinical Cancer Research* 9, 2003, 4641 – 4652
116. PANVICHIAN – R, ORTH – K, DAY – ML, DAY – KC, PILAT – MJ, PIENTA – KJ: Paclitaxel-associated multimicronucleation is permitted by the inhibition of caspase activation: a potential early step in drug resistance. *Cancer Research* 58, 1998, 4667 – 4672
117. PALLADINO - JR, SHALABY - MR, KRAMER - SM, FERRAILOLO - BL, BAUGHMAN - RA, DELEO - AB, CRASE - D, MARAFINO - B, AGGARWAL - BB, FIGARI - IS, LIGGIT - D, PATTON - JS: Characterisation of the antitumor activities of human TNF α and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *The Journal of Immunology* 138, 1987, 4023-4032
118. PARNES - J, HORWITZ - SB: Taxol binds to polymerised tubulin in vitro. *The Journal of Cell Biology* 91, 1981, 479-487
119. PARNES - J, KINGSTON - DGI, POWELL - RG, HARRACKSINGH - C, HORWITZ - SB: Structure-activity study of cytotoxicity and microtubule assembly in vitro by taxol and related taxanes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 105, 1982, 1082-1089
120. PISCHON – T, LAHMANN – PH, BOEING – H: Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer* 118, 2006, 728 – 738
121. RAO - S, HORWITZ - SB, RINGEL - I: Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *Journal of the National Cancer Institute* 84, 1992, 785-788
122. RAO - S, KRAUSS - NE, HEERDING - JM, SWINDELL - Cs, RINGEL - I, ORR - GA, HORWITZ - SB: 3'-(p-Azidobenzamido-)taxol phototag the N-terminal 31 amino acids of β -tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 1994, 3132-3134
123. RAO - S, ORR - GA, CHAUDHARY - AG, KINGSTON - DGI, HORWITZ - SB: Characterization of the taxol binding site on the microtubule. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 1995, 20235-20238
124. RAY - S, MAYHÖFER - E, MILLIGAN - RA, HOWARD - J: Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *The Journal of Cell Biology*, 121, 1993, 1083-1093
125. RAY - S, PONNATHPUR - V, HUNAG - Y, TANG - C, MAHONEY - ME, IBRADO - AM, BULLOCK - G, BHALLA - K: 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone- and paclitaxel-induced apoptosis in H L-60 cells: Improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 34, 1994, 365-371

126. REINECKE - P, CORVIN - J, GERHARZ - CD, GABBERT - HE: Antiproliferative effects of paclitaxel (taxol) on human renal clear cell carcinomas in vitro. *European Journal of Cancer* 33, 1997, 1122-1129
127. REYNOLDS - T: Laboratory scientists mount intensive probe of taxol's mechanism of action. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 1991, 904-906
128. RICK - W: Leukozytenzählung. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Rick, Hrsg., 6. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1990, 35-38
129. RIEDE - UN, WEHNER - H, FREUDENBERG - N: Neoplastische Läsionen der Niere. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. RIEDE - UN, SCHAEFER - HE, Hrsg., 3.Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 1992, 828-833
130. RIEDER - CL, SCHULTZ - A, COLE - R, SLUDER - G: Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *Journal of Cell Biology* 127, 1994, 1301-1310
131. RINGERTZ - NR, SAVAGE - RE: Fusion with cell fragments (VIII), C. Properties of Cell fragments, 4. Microcells in: *Cell Hybrids*. Academic Press, London, UK, 1976, 130-134
132. ROBERTS - JR, ALLISON - DC, DONEHOWER - RC, ROWINSKY - EK: Development of polyploidization in taxol-resistant human leukemia cells in vitro. *Cancer Research* 50, 1990, 710-716
133. ROBERTS - JR, ALLISON - DC, DOOLEY - WC: Effects of taxol on cell cycle traverse: Taxol-induced polyploidization as a marker for drug resistance. *Cancer Research* 50, 1990, 710-716
134. ROBERTS - JR, ROWINSKY - EK, DONEHOWER - RC: Demonstration of the cell cycle positions of the taxol-induced "asters" and "bundles" by sequential measurements of tubulin immunofluorescence, DNA content, and autoradiographic labeling of taxol-sensitive and -resistant cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37, 1989, 1659-1665
135. ROWINSKY - EK: Clinical pharmacology of Taxol. Monograph of the National Cancer Institute 15, 1993, 25-37
136. ROWINSKY - EK, BURKE - PJ, KARP - JE, TUCKER - RW, ETTINGER - DS, DONEHOWER - RC: Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Research* 49, 1989, 4640-4647
137. ROWINSKY - EK, CAZENAVE - LA, DONEHOWER - RC: Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1990, 1247-125

138. ROWINSKY - EK, DONEHOWER - RC, JONES - RJ, TUCKER - RW: Microtubule changes and cytotoxicity in leucemic cell lines treated with taxol. *Cancer Research* 48, 1988, 4093-4100
139. ROWINSKY - EK, ONETTO - N, CANETTA - RM, ARBUCK - SG: Taxol: The first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in Oncology* 19, 1992, 646-662
140. ROY - SN, HORWITZ - SB: A phosphoglycoprotein associated with taxol-resistance in J774.2 cells. *Cancer Research* 45, 1985, 3856-3863
141. SCHELER - F, WEBER - MH, BRAUN - N: Bösartige Nierentumoren. In: *Lehrbuch der Inneren Medizin*, SIEGENTHALER - W, KAUFMANN - W, HORNBORSTEL - H, WALLER - H, Hrsg., 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York 1992, 493-497
142. SCHIFF - PB, FANT - J, HORWITZ - SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 1979, 665-667
143. SCHIFF - PB, HORWITZ - SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77, 1980, 1561-1565
144. SCHIFF - PB, HORWITZ - SB: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous GTP or microtubule associated proteins. *Biochemistry* 20, 1981, 3247-3252
145. SCHILLER - JH, STORER - B, TUTSCH - K: Phase I trial of 3-hour infusion of paclitaxel with or without granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 12, 1994, 241-248
146. SCHUURHUIS - GJ, BROXTERMAN - JH, PINEDO - HM, VAN HEIJNINGEN - THHM, VAN KALKEN - CK, VERMORKEN - JB, SPOELSTRA - EC, LANKELMA - J: The polyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance. *British Journal of Cancer* 62, 1990, 591-594
147. SPENCER - CM, FAULDS - D: Paclitaxel: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potentials in the treatment of cancer. *Drugs* 48, 1994, 794-847
148. SPIGGS - DR, TONDINI - C: Taxol administered as a 120h infusion. *Investigation New Drugs* 10, 1992, 275-278
149. SRINIVASAN - V, PESTCHANKER - L, MOSER - S, HIRASUNA - TJ, TATICEK - RA, SCHULER - ML: Taxol production in bioreactors: kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspensions of *taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering* 47, 1995, 666-676

150. STAHL - M, WILKE - HJ, SEEBER - S, SCHMOLL - HJ: Cytokines and cytotoxic agents in renal cell carcinoma: a review. *Seminars in Oncology* 19 Suppl. 4, 1992, 70-79
151. STAEHLER – M, HASEKE – N, ZILINBERG – K, STADLER – T, KARL – A, STIEF – CG: Systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Urologe* 47, 2008, 1357 – 1367
152. STEARNS - ME, WANG - M: Taxol blocks processes essential for prostate tumor cell (PC-3 ML) invasion and metastases. *Cancer Research* 52, 1992, 3776-3781
153. SWINDELL - CS, KRAUSS - NE, HORWITZ - SB, RINGEL - I: Biologically active analogues with deleted A-ring side chain substituents and variable C-2 configurations. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 1991, 1176-1184
154. TAMURA - T, SASAKI - Y, EGUCHI - K, SHINKAI - T, OHE - Y, NISHIO - M, KUNIKANE - H, ARIOKA - H, KARATO - A, OMATSU - H, NAKASHIMA - H, SAIJO - N: Phase I and pharmacokinetic study of taxol administered by a 24-hour intravenous infusion. *Japanese Journal of Cancer Research* 85, 1994, 1057-1062
155. TAMURA - T, SASAKI - Y, NISHIWAKI - Y: Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel administered by 3-hour infusion [abstract 322], *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 12, 1993, 132
156. TAO – W, SOUTH – VJ, ZHANG – Y, DAVIDE – JP, FARRELL – L, KOHL – NE, SEPP-LORENZINO – L, LOBELL – RB: Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8, 2005, 49 – 59
157. THIEBAUT - F, TSURUO - T, HAMADA - H, GOTTESMANN - MM, PASTAN - I, WILLINGHAM - MC: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product p-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84, 1987, 7735-7738
158. THOENES - W, STÖRKEL - S, RUMPELT - HJ: Histopathology and classification of renal cell tumors. *Pathology, Research and Practice* 181, 1986, 125-143
159. TOKUNAKA - S, FRIEDMAN - TM, TOYAMA - Y, PACIFICI - M, HOLTZER - H: Taxol induces microtubule-rough endoplasmic reticulum complexes and microtubule-bundles in cultured chondroblasts. *Differentiation* 24, 1983, 39-47
160. TURNER - PF, MARGOLIS - RL: Taxol-induced bundling of brain - derived microtubules. *The Journal of Cell Biology* 99, 1984, 940-946

161. TURNER – KJ, MOORE – JW, JONES – A, TAYLOR – CF, CUTHBERT – D: Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cell cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Cancer Research* 62, 2002, 2957 – 2961
162. VAN DEN BERG - E, VAN DER HOUT - AH, OOSTERHUIS - JW, STÖRKEL - S, JONG - B: Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. *International Journal of Cancer* 55, 1993, 223-227
163. VOLM - M, MATTERN - J, EFFERTH - T, POMMERENKE - EW: Expression of several resistance mechanisms in untreated human kidney and lung carcinoma. *Anticancer Research* 12, 1992, 1063 – 1068
164. WAHL - AF, DONALDSON - KL, FAIRCHILD - C, LEE - FYF, FOSTER - SA, DEMERS - GW, GALLOWAY - DA: Loss of normal p53 function confers sensitization to taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Medicine* 2, 1996, 72-79
165. WALEPLOE - ET, DUTCHER - JP, SPARANO - J, GUCALP - R, EINZIG - A, PAIETTA - E, CIOBANU - N, GRIMA - K, CALIENDO - G, CAVASOTTO - G: Survival after phase II treatment of advanced renal cell carcinoma with taxol or high dose interleucin-2. *Journal of Immunology* 13, 1993, 275-281
166. WANI - MC, TAYLOR - HL, WALL - ME, COGGON - P, MCPHAIL - AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileucemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*^{1 2}. *Journal of the American Chemical Society* 93, 1971, 2325-2327
167. WANG – TH, WANG – HS, SOONG – YK: Paclitaxel – induced cell death. Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88, 2000, 2619 – 2628
168. WATANABE - N, NIITSU - Y, UMENO - H, KURIYAMA - H, NEDA - H, YAMAUCHI - N, URUSHIZAKI - I: Toxic effects of TNF on tumor vasculature in mice. *Cancer Research* 48, 1988, 2179-2183
169. WEISS - R, DONEHOWER - RC, WIERNIK - PH: Hypersensitivity reactions from taxol. *Journal of Clinical Oncology* 8, 1990, 1263-1268
170. WIERNIK - PH, SCHWARTZ - EL, EINZIG - AL: Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: Responses observed in metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 5, 1987, 1232-1239
171. WIERNIK - PH, SCHWARTZ - EL, STRAUMAN - JJ, DUTCHER - JP, LIPTON - RB, PAIETTA - E: Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Research* 47, 1987, 2486-2493

172. WILLINGHAM - MC, BHALLA - K: Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42, 1994, 441-450
173. WILSON - L, MILLER - HP, FARRELL - KW, SNYDER - KB, THOMPSON - WC, PURICH - DL: Taxol stabilization of microtubules in vitro: Dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends. *Biochemistry* 24, 1985, 5254-5262
174. WILSON - WH, KANG - YK, BRYANT - G: Phase I/II study of 96-hour infusional Taxol in refractory lymphomas and breast cancer. *Proceedings of the Second National Cancer Institute Workshop on Taxol and Taxus, Alexandria [abstract]*, 1992, 23-24
175. WITT - PL, RIS - H, BORISY - GG: Origin of kinetochore microtubules in chinese hamster ovary cells. *Chromosoma* 81, 1980, 483
176. WOODCOCK - DM, JEFFERSON - S, LINSENMEYER - ME, CROWTHER - PJ, CHOJNOWSKY - GM, WILLIAMS - B, BERTONCELLO - I: Reversal of the multidrug resistance phenotype with Cremophor EL, a common vehicle for water - insoluble vitamins and drugs. *Cancer Research* 50, 1990, 4199-4203
177. WOODCOCK - DM, LINSENMEYER - ME, CHOJNOWSKY - GM, KRIEGLER - AB, NINK - V, WEBSTER - LK, SWAYER - WH: Reversal of multidrug resistance by surfactants. *British Journal of Cancer* 66, 1992, 62-88
178. YOUNES - A, AYOUB - JP, HAGEMEISTER - FB, MCLAUGHLIN - P, SARRIS - A, RODRIGUEZ - MA, SWAN - F JR, ROMAGUERA - JE, MARTIN - J, CABANILLAS - F: No effect of 96-hour paclitaxel infusion in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma refractory to a 3-hour infusion schedule. *The Journal of Clinical Oncology* 14, 1996, 543-548
179. ZBAR - B, BRAUCH - H, TALMAGDE - C: Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 327, 1987, 721-724
180. ZHOU - R, OSKARSSON - M, PAULES - S: Ability of the amos product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science* 251, 1991, 671-675

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Christiane Rasch, geborene Knopf
Geburtstag: 09.09.1972 in Neuss
Familienstand: verheiratet, ein Sohn

Schulbildung

1979 – 1983 Grundschule „Don Bosco“, Neuss
1983 – 1992 Gymnasium „Marienberg“, Neuss

Ausbildung

1992 – 2000 Studium der Humanmedizin, an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

August 1994 Physikum
August 1996 1. Staatsexamen mit der Note „sehr gut“
März 1999 2. Staatsexamen, schriftlich mit der Note „sehr gut“,
mündlich mit der Note „gut“
Mai 2000 3. Staatsexamen mit der Gesamtnote „sehr gut“
(1,2)

Beruflicher Werdegang

2000 – 2001 Ärztin im Praktikum an der Klinik für
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf, Herr Direktor
Prof. Dr. D. Häussinger

2002 – 2005 Assistenzärztin der Inneren Medizin an der Klinik
für Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie und
Infektiologie des Klinikums Maria Hilf
Mönchengladbach, Herr Prof. Dr. H. E. Reis, dann
Herr PD Dr. U. Graeven

seit April 2005 Assistenzärztin der Inneren Medizin an der Klinik
für Innere Medizin und internistische
Intensivmedizin des Marienhospitals Düsseldorf,
Herr Prof. Dr. R. Lüthen

Juni 2008 Fachärztin für Innere Medizin

Neuss, den 16.05.2010