Aus dem Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Erich Gabbert

Antiproliferative Effekte von Paclitaxel (Taxol[®]) auf humane Nierenzellkarzinomzelllinien und der Multidrug-Resistenz-Phänotyp

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Schmitz

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab Dekan Referent: Univ.-Prof. Dr. Gerharz Korreferent: Prof. Dr. Vögeli

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Grundlagen	2
Das Nierenzellkarzinom	2
Makroskopie	3
Zytogenetische Einteilung	3
Histogenetische Einteilung	4
Pathologische TNM-Klassifikation	5
Klinik und Diagnose	5
Therapiemöglichkeiten	8
Paclitaxel/Taxol [®]	11
Die Entdeckung des Paclitaxel/Taxol [®]	11
Die Vollsynthese des Paclitaxel/Taxol®	12
Der Wirkmechanismus des Paclitaxel/Taxol®	13
Die klinische Entwicklung des Paclitaxel/Taxol $^{\textcircled{R}}$	16
$Paclitaxel/Taxol^{ onumber {f B}}$ und das humane Nierenzellkarzinom $\ldots \ldots \ldots$	20
Resistenzmechanismen	21
P-Glykoprotein	22
Multidrug-Resistance-Related-Protein 1 (MRP1)	27

Modulatoren des P-Glykoproteins	29
Verapamil	30
Cremophor [®] EL	30
Materialien	32
Zellkultur	32
MTT-Assav	32
FACS-Analyse	32
RT-PCR-Analyse	33
	00
Methoden	34
Zelllinien und Zellkultur	34
Zelllinien	34
Zellkultur	34
MTT-Assay	36
Theoretische Grundlagen	36
Durchführung	37
Modulation der Paclitaxel-Sensibilität mit Verapamil und	
Cremophor [®] EL	38
FACS-Analyse	42
Theoretische Grundlagen	42
Bestimmung des P-Glykoproteins (P-Gp) und des Multidrug-	
resistance associated Proteins 1 (MRP1)	46
Bestimmung der Funktionalität des Effluxes	47
Modulation der Effluxmechanismen in der FACS-Analyse	50
RT-PCR-Analyse	51
Theoretische Grundlagen	51
Extraktion der RNA	53

Inhaltsverzeichnis

Integritätsprüfung der RNA	53
Reverse Transkription	54
Polymerase Kettenreaktion	55
Statistische Auswertung	57
Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient	57
Korrelationskoeffizient nach Pearson	57
Signifikanztests	58
Dose Modifying Index	59
Ergebnisse	61
Expression und Funktion von P-Glykoprotein (P-Gp) und Multidrug-	
Resistance-Related-Protein 1 (MRP1)	61
P-Gp-Expression	61
MRP1-Expression	66
Korrelation zwischen der P-Gp und der MRP1-Expression	67
Rhodamin-Efflux-Assay	68
Korrelation zwischen der P-Gp-Expression und der Rhodamin-	
Effluxeffektivität	69
Korrelation zwischen der MRP1-Expression und der Rhodamin-	
Effluxeffektivität	69
Zusammenhang der untersuchten Resistenzmechanismen mit der Paclita-	
xel und der Taxol®-Sensitivität	71
Modulation der Rhodamin-Effluxfunktion	75
Diskussion	78
Anhang	86
Abkürzungsverzeichnis	86
Erklärung	87

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf	88
Literaturverzeichnis	89
Zusammenfassung	100

Abbildungsverzeichnis

1	Strukturformel von Paclitaxel	13
2	Wirkugsmechanismus des Paclitaxel	14
3	Resistenzmechanismen	23
4	Struktur des P-Glykoproteins	27
5	Strukturformel des MTT	36
6	Kontrollplatte für die Modulationsversuche	39
7	Modulation mit Verapamil	40
8	Modulation mit Cremophor® EL	41
9	Strahlengang und Detektoren des FACS-Gerätes	43
10	Möglichkeiten der Signaldarstellung in der FACS-Analyse	45
11	Beispiel für eine FACS-Analyse für P-Gp und MRP1	48
12	Rhodamin-Efflux-Assay: Versuchsschema	49
13	Rhodamin-Efflux-Assay: Modulation	50
14	Integritätsprüfung der RNA	54
15	Berechnung der IC50	60
16	Ergebnisse der RT-PCR für P-Gp und MRP1	62
17	P-Gp-Expression	64
18	Vergleich der P-Gp-Expression bei hohen und niedrigen Passagen .	65

Abbildungsverzeichnis

19	MRP1-Expression	66
20	Korrelation von P-Gp und MRP1	67
21	Rhodamine-Efflux	68
22	Korrelation des Rhodaminefflux mit P-Gp und MRP1	70
23	Korrelation MRP1 mit Paclitaxel und Taxol $^{\textcircled{B}}$	72
24	Korrelation P-Gp mit Paclitaxel und Taxol $^{\textcircled{B}}$	73
25	Korrelation Rhodaminefflux mit Paclitaxel und Taxol $^{\textcircled{B}}$	74
26	Wachstumsinhibition bei verschiedenen Paclitaxel-Konzentrationen	
	in Kombination mit Verapamil oder Cremophor [®] EL \ldots	76
27	Abhängigkeit der Effluxfunktion von Verapamil bzw. Cremophor® EL.	77

Tabellenverzeichnis

1	Genotypen des Nierenzellkarzinoms	4
2	TNM-Klassifikation des humanen Nierenzellkarzinoms	6
3	Fünf-Jahres-Überlebensraten	7
4	Ergebnisse von Mono- und Kombinationstherapien des humanen	
	Nierenzellkarzinoms	10
5	Phase I Studien von Paclitaxel	18
6	Pharmakokinetik von Taxol $^{\textcircled{B}}$	19
7	Tumoren, an denen Paclitaxel/Taxol $^{\textcircled{B}}$ klinisch erprobt wurde $\ . \ . \ .$	21
8	Bedeutung von P-Glykoprotein als Effluxpumpe für Chemothera-	
	peutika und andere Verbindungen	24
9	Grad der P-Glykoprotein Expression in normalem Gewebe	25
10	MDR-Modulatoren	29
11	Primer für RT-PCR	52
12	Ergebnisse der FACS-Analysen	63

Einleitung

Die Therapie des humanen Nierenzellkarzinoms ist trotz vieler Fortschritte in der modernen Chemotherapie anderer Tumortypen weiterhin problematisch. Dies liegt vor allem an der hohen Resistenz der Nierenzellkarzinome gegenüber strukturell und funktionell völlig verschiedenen Chemotherapeutika. Bisher liegen noch wenige Ergebnisse zu in-vitro-Untersuchungen und noch weniger klinische Daten zum Ansprechen des humanen Nierenzellkarzinoms auf das Chemotherapeutikum Paclitaxel (Taxol[®]) vor. Für diese Arbeit wurde in diesem Zusammenhang untersucht, inwieweit die Expression und Funktion der Multidrug-Resistance-Mechanismen P-Glykoprotein und Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1 (MRP1) in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien für ihr Resistenzverhalten gegenüber Paclitaxel (Taxol[®]) verantwortlich sein können.

Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom gehört (neben Nierenadenom und Nierenonkozytom) zu den epithelialen Tumoren der Niere. Es macht 85 % der bösartigen Nierengeschwülste und 3 % aller bösartigen Tumoren überhaupt aus. Es kann sporadisch und seltener auch im Zusammenhang mit einem von-Hippel-Lindau-Syndrom, einer autosomal-rezessiven Hämangiomatose, auftreten.

Die Inzidenz des humanen Nierenzellkarzinoms beträgt 4,1 – 5,6/100000/Jahr und steigt mit jeder Lebensdekade. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der 6. Dekade [Mostofi, 1981]. Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 2:1.

Die Pathogenese des humanen Nierenzellkarzinoms ist noch nicht endgültig gesichert. Übergewicht [Chow et al., 1996] und Bluthochdruck [Muscat et al., 1995] scheinen eine Rolle zu spielen. Ob auch Nikotin kausal an der Entstehung des Nierenzellkarzinoms beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert [Fischer, 1999]. Im Rahmen der International Renal Cell Cancer Studie konnten Mandel et al. [1995] eine erhöhte Inzidenz bei Arbeitern in der Hochofen- oder Koksofen-Industrie, der

Eisen- und Stahlindustrie, sowie bei Asbest- und Lösemittelexposition nachweisen. Zudem konnten van den Berg et al. [1993] zeigen, dass charakteristische Chromosomenaberrationen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielen und mit dem histologischen Subtyp (siehe unten) des Tumors korrelieren. Dabei spielt bei klarzelligen Nierenkarzinomen vor allen Dingen eine funktionelle Beeinträchtigung oder ein Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 3 eine entscheidende Rolle. Weitere diskutierte Faktoren, die bei der Tumorprogression eine Rolle spielen, sind die Proto-Onkogene bcl-2, HER-2/neu sowie die Tumorsuppressorgene p53, Retinoblastomgen, NM23, p16, p21 u. a. Jedoch konnte bisher noch kein übergreifendes Tumormodell etabliert werden, das zytogenetische und molekularbiologische Erkenntnisse integriert und somit die Onkogenese dieses Tumors beschreiben könnte [Fischer, 1999].

Makroskopie

Häufig hat das Nierenzellkarzinom bei Diagnosestellung schon eine Größe von 3 - 15 cm im Durchmesser und nimmt einen Nierenpol ein. Speziell klarzellige Nierenkarzinome zeigen eine gelbe Eigenfarbe, die aufgrund des hohen Fettgehalts der Tumorzellen zustande kommt. Zusätzlich zeigt die Schnittfläche zahlreiche Nekrosen, Blutungen und Verkalkungen. Erst bei einem fortgeschrittenen Stadium ist ein Einbruch in die Nierenvene, in das perirenale Fettgewebe oder das Nierenbecken zu beobachten.

Zytogenetische Einteilung

Aufgrund zytogenetischer Untersuchungen lassen sich Nierenzellkarzinome in klarzellige (nicht-papilläre), papilläre und chromophobe Formen einteilen [Kovacs, 1994], mit jeweils charakteristischen zytogenetischen Phänomenen (siehe Tabelle 1).

Genotyp	Häufigkeit	Zytogenetische Phänomene	
Klarzellig	80 %	3p-Verlust, Trisomie (5q)	
Papillär	10 %	Trisomie (7,17), Y-Verlust, u. a.	
Chromophob	5 %	13-,17-,21-Verluste u. a.	

Tabelle 1: Genotypen des Nierenzellkarzinoms (nach Fischer [1999])

Die früher beschriebene onkozytäre Form wird wegen der fehlenden Metastasierung heute nicht mehr zu den Nierenzellkarzinomen gerechnet.

Histogenetische Einteilung

Nierenzellkarzinome gehen von verschiedenen Anteilen des Nephrons aus und haben entsprechende immunhistochemische Merkmale. Von den verschiedenen Klassifikationsschemata hat sich das folgende bewährt [Thoenes et al., 1986]:

Klarzelliger Typ Dies ist mit 80 % der häufigste Typ. Er entwickelt sich aus proximalen Tubulusanteilen. Die großen Zellen und das durch den hohen Anteil von Glykogen klare Zytoplasma vermitteln einen pflanzenzellartigen Aspekt. Zytogenetisch fallen zahlreiche chromosomale Veränderungen auf, insbesondere strukturelle Abnormalitäten des Chromosoms 3p [van den Berg et al., 1993]. Bei solidem Wachstumsmuster zeigt sich eine hohe maligne Potenz, bei den zystischen Formen ist die Metastasierungsneigung geringer.

Chromophilzelliger Typ. Er macht 10 % aller Nierenzellkarzinome aus und entstammt ebenfalls aus proximalen Tubulusanteilen. Man unterscheidet Formen mit basophilem und eosinophilem Zytoplasma. Das Wachstumsmuster ist überwiegend tubulo-papillär. Neben dem Primärtumor findet man häufig Vorläuferläsionen in Form von papillären Epithelverbänden, die als papilläre Adenome bezeichnet werden.

Chromophobzelliger Typ. Dieser mit 5 % seltene Typ geht von Zellen der Schaltstücke des Sammelrohrs aus, die sich von der Ureterknospe ableiten. Das Zytoplasma ist transparent und feinretikulär. Die Tumorzellen zeigen ein solides Wachstumsmuster. Das Zytoskelett ist im Gegensatz zum klarzelligen und chromophilen Typ nur zytokeratinhaltig und zeigt keine Vimentinexpression.

Die übrigen Typen des humanen Nierenzellkarzinoms (Ductus Bellini-Typ, metanephroider und neuroendokriner Typ) spielen zahlenmäßig nur eine untergeordnete Rolle, zeichnen sich aber zum Teil durch eine sehr schlechte Prognose mit geringer Überlebenswahrscheinlichkeit aus.

Pathologische TNM-Klassifikation

Die herkömmliche Einteilung nach Robson ist zugunsten der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 2) verlassen worden, weil die Robson-Einteilung keine Unterscheidung zwischen Lymphknoteninfiltration und Nierenveneninfiltration erlaubt. Anzumerken ist, dass im Vergleich zur vorangegangenen Version des TNM-Systems nun der T1-Kategorie Tumorgrößen bis 7 cm (anstatt früher 2,5 cm) zugerechnet werden, wobei bereits vorgeschlagen wurde, diese Kategorie in T1a (<4 cm) und T1b (4 – 7 cm) zu unterteilen [Fischer, 1999]. Tumorvolumen, Tumorgrad, N- und M-Kriterien korrelieren gut mit der Prognose (siehe Tabelle 3).

Klinik und Diagnose

Der klassische Trias aus Hämaturie (40 %), palpablem Tumor (30 %) und Schmerzen (40 %) wird in nur 10 % der Fälle gesehen. Weitere unspezifische Symptome

Tabelle 2: Klinische TNM-Klassifikation des humanen Nierenzellkarzinoms (5. Auflage,

1997)			
T TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden			
T0 K		Kein Anhalt für Primärtumor	
	T1	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung,	
		begrenzt auf die Niere	
	T2	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt	
		auf die Niere	
	Т3	Tumor breitet sich in größereren Venen aus oder infiltriert	
		Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über	
		die Gerota-Faszie hinaus	
	Т3а	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenale Fettkapsel,	
		aber nicht über Gerota-Faszie hinaus	
	T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in	
		Nierenvene(n) oder V. cava unterhalb des Zwerchfells	
	T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. cava	
		oberhalb des Zwerchfells	
	T4	Tumor infiltriert über Gerota-Faszie hinaus	
N	NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
	N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten	
	N2	Metastase in mehr als einem regionären Lymphknoten	
М	MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	
	MO	Keine Fernmetastasen	
	M1	Fernmetastasen	

Grun	ıdl	age	en

pT-	5-Jahres-	pN-	5-Jahres-
Stadium	Überlebens-	Stadium	Überlebens-
	rate (%)		rate (%)
T1–2	86	N0	74
T3a	64	N1	18
T3b	41	N2	20
T4	16	N3	0

Tabelle 3: Fünf-Jahres-Überlebensraten abhängig vom Tumorstadium und Lymphknotenstaging (nach Hermanek 1990)

sind Gewichtsverlust (36 %), Fieber (20 %), Hypertonie (5 %), Polyglobulie (Erythropoetin) oder Hyperkalzämie. Weiterhin finden sich gelegentlich eine hepatische Dysfunktion (Stauffer-Syndrom mit Hepatosplenomegalie, Anstieg des α_2 -Globulins, verlängerte Prothrombinzeit, Hypoprothrombinämie, erhöhte alkalische Phosphatase und erhöhtes Bilirubin), Feminisierung mit Gynäkomastie oder Virilisierung, Anämie, Neuromyopathie oder Amyloidose [Hautmann and Huland, 1997, Eichenauer and Vanherpe, 1996].

Das humane Nierenzellkarzinom metastasiert vor allem in Lunge (55 %), Lymphknoten (34 %), Leber (33 %) und Skelett (32 %). Weitere Metastasierungsorte sind kontralaterale Niere, Nebennieren und ZNS. Dabei finden sich in 97 % der Fälle multiple Metastasen.

Diagnostiziert wird das Nierenzellkarzinom mit Hilfe der Ultraschalldiagnostik (die eine gute Differenzierung zur Nierenzyste erlaubt und sich als Screeningmethode anbietet) und der Computertomografie, mit der neben der Differenzierung zur Nierenzyste auch ein zuverlässiges Staging gelingt. In der Magnetresonanztomografie kann insbesondere die sagittale Ausdehnung des Tumors ein Tumoreinbruch in die Vena cava beurteilt werden. Mit Hilfe der Ganzkörperszintigrafie können schließlich Knochenfiliae nachgewiesen werden.

Therapiemöglichkeiten

Das lokalisierte Nierenzellkarzinom, d. h. das Stadium T1 bis T3M0, wird durch eine radikale Tumornephrektomie behandelt. Dazu gehört die Exstirpation der Niere mitsamt der Fettkapsel, der Gerota Faszie und der regionären Lymphknoten. Die routinemäßige Entfernung der Nebenniere ist aufgrund der hohen Sensitivität der Computertomografie nicht mehr zwingend erforderlich [Gill et al., 1994]. Der Zugangangsweg wird je nach der Situation durch einen Rippenbogenrandschnitt retroperitoneal oder durch einen Transrektalschnitt transperitoneal gewählt. Ein eventueller Tumorthrombus in der Nierenvene oder der Vena cava wird mitentfernt, wobei wegen der höheren Operationsletalität eine Fernmetastasierung ausgeschlossen sein muss. Die Fünfjahresüberlebensrate ist in diesen Stadien trotz der radikalen Tumornephrektomie dennoch nicht besser als 50 - 80 % [Fischer, 1999]. Bei kleinen Nierentumoren (bis etwa 4 cm) werden auch mit einer Heminephrektomie befriedigende Ergebnisse erzielt, allerdings liegt die Rate der Lokalrezidive mit ca. 10 % höher als bei der radikalen Tumornephrektomie mit 2 – 3 %.

Das *metastasierende Nierenzellkarzinom* liegt heute noch bei 13 % aller Patienten bei Erstdiagnose vor [Fischer, 1999]. Dieser Anteil lag vor Einführung des Ultraschalls noch bei etwa 30 %. Dennoch werden bei etwa 30 % der Patienten mit vermeintlich kurativer Tumornephrektomie innerhalb von fünf Jahren Fernmetastasen nachge-

wiesen. Der Verlauf des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist uneinheitlich. Während mehr als 80 % der Patienten schon innerhalb eines Jahres versterben, leben andere mit Metastasen fünf Jahre oder länger. Eine Entfernung des Primärtumors erfolgt nach klinisch manifester, erfolgter Metastasierung nur aus palliativer Indikation, insbesondere bei starken Schmerzen oder Blutungen, die konservativ nicht beherrschbar sind.

Es sind mehr als 150 Studien mit über 80 verschiedenen Chemotherapeutika als Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführt worden (eine Auswahl bietet die Tabelle 4), deren Ergebnisse insgesamt ernüchternd sind. Die mittlere Ansprechrate lag insgesamt nur bei 4 %. Die Responseraten lagen nie über 25 %. Dies liegt sicherlich zu einem erheblichen Anteil an der "Multidrug-Resistance" (im Folgenden als MDR bezeichnet) als intrinsischer Eigenschaft der Nierenkarzinomzellen. Dabei sind verschiedene Mechanismen verantwortlich zu machen (siehe Seite 21). Da es bislang kein etabliertes klinisches Therapiekonzept zur Uberwindung der Multidrug-Resistenz-Mechanismen gibt [Mickisch et al., 1990], ist die alleinige Chemotherapie heute keine erfolgreiche Therapieoption. Da das Nierenzellkarzinom aber als ein sehr immunogener Tumor gilt, liegen inzwischen zahlreiche Therapieversuche mit Immuntherapeutika vor. Hier haben sich Interleukin-2 und Interferonalpha-2a als die bisher am besten dokumentierten Substanzen erwiesen. Die Ergebnisse einer Immuntherapie variieren stark mit der Selektion der Patienten. Dabei zeigen Patienten in gutem Allgemeinzustand mit Lungenmetastasen ein besseres Ansprechen als Patienten im schlechten Allgemeinzustand mit Skelettmetastasen. In Kombination mit Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil oder Vinblastin wurden durchschnittliche Ansprechraten von bis zu 42 % erreicht [Oberneder et al., 1997]. Es kann allerdings noch nicht von einer etablierten Standardtherapie gesprochen werden. Bei der adjuvanten Therapie des Nierenzellkarzinoms liegen die meisten Erfahrungen mit immuntherapeutischen Ansätzen unter Verwendung einer Vak-

Tabelle 4	: Ergebnisse von Mono- und Kombinationstherapien des humanen Nierenzellkar-
	zinoms (nach Hartmann and Bokemeyer [1999], Einzig et al. [1991], Atzpodien
	et al. [1999])

Therapie	ΡZ	Ansprechrate
Cisplatin	54	0 (0 %)
Cyclophosphamid	66	2 (3 %)
Epurubicin	39	0 (0 %)
5-FU	138	7 (5 %)
Ifosfamid	46	3 (6 %)
Teniposid	95	4 (4 %)
Taxol [®]	18	0 (0 %)
Vinblastin	135	9 (7 %)
Vinblastin + Floxuridin	11	2 (18 %)
Vinblastin + Doxorubicin	28	4 (14 %)
Vinblastin + Hydroxyurea	16	4 (25 %)
Cyclophosphamid + Metronidazol	31	1 (3 %)
IL-2	503	38 (7%)

PZ: Patientenzahl

zinierungsstrategie vor [Oberneder et al., 1997]. Prinzipiell können aber auch die Substanzen aus der palliativen Therapie (siehe oben) verwendet werden. Diese Therapiekonzepte werden in anlaufenden aufwendigen multizentrischen Protokollen geprüft.

Paclitaxel/Taxol®

Die Entdeckung des Paclitaxel/Taxol®

Das Interesse der modernen Pharmazie an Paclitaxel reicht nur bis in die sechziger Jahre zurück, obwohl Pflanzenextrakte aus der Eibe seit Jahrtausenden bekannt sind. Schon im Altertum wurde ein Sud aus Zweigen (insbesondere Nadeln) der in Europa heimischen Eibe (*Taxus baccata*) als Giftstoff genutzt. So berichtet der römische Feldherr und Staatsmann Julius Cäsar, wie er den keltischen Stamm der Eburonen vernichtend schlug und dass einer der Könige, Catuvolcus, "sich mit Eibe … entseelte". Im Nordwesten der USA verwendeten indianische Stämme wie die Quinalut Multnomah und Nez Percé die Rinde der pazifischen Eibe zum Desinfizieren, als Abtreibungsmittel und zur Behandlung von Hautkrebs.

Erst 1962 brachte der Botaniker Arthur Barclay vom amerikanischen Landwirtschaftsministerium die Eibe auf ihren Weg in die moderne Medizin. Im Rahmen eines Programms zur Suche nach neuen Wirkstoffen des amerikanischen nationalen Krebsinstituts in Bethesda (Maryland) wurden seine Proben von den Chemikern Mansukh C. Wani und Monroe E. Wall untersucht und erwiesen sich als wirksam bei der Abtötung von Leukämiezellen in Kultur. Sie konnten 1967 den Bestandteil isolieren und nannten die bislang unbekannte Verbindung 'Taxol'. Vier Jahre später veröffentlichte ihre Arbeitsgruppe auch die Struktur des Moleküls. (Den Namen hat das Pharmaunternehmen Bristol-Myers Squibb inzwischen als Warenzeichen Taxol[®] registrieren lassen.) In den Folgejahren sank das Interesse an Paclitaxel, da es sich gegenüber den anderen Zytostatika nicht besonders auszuzeichnen schien, bis Susan Horwitz 1979 den neuartigen Wirkmechanismus (siehe weiter unten) von Paclitaxel entdeckte. So begannen 1983 die ersten Phase-I-Studien an mehreren Instituten. McGuire et al. [1989] konnten zeigen, dass Paclitaxel gerade bei Patientin-

nen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, bei denen die konventionelle Chemotherapie versagt hatte, in 30 % der Fälle eine deutliche Tumorreduktion erreichte. Die Nachfrage nach Paclitaxel wuchs ständig, allerdings war es schwer, die nötige Menge aus der Eibe bereitzustellen. So ist für eine einzige Dosis im Rahmen eines Chemotherapiezyklus die etwa 3 kg schwere Rinde eines hundertjährigen Exemplars nötig. Es begannen groß angelegte Fällaktionen der Pazifischer Eibe und es war abzusehen, dass die Bestände wohl nur für fünf Jahre reichen würden, ganz abgesehen von den Einsprüchen seitens der Naturschützer. So versuchte man auf verschiedenen anderen Wegen, die Substanz zu gewinnen: Man untersuchte Faktoren, welche die Konzentration des Wirkstoffes in den Bäumen beeinflusste, legte Eibenkulturen an und entwickelte Verfahren zur Herstellung der Substanz in der Zellkultur. Und man versuchte, Paclitaxel synthetisch herzustellen.

Die Vollsynthese des Paclitaxel/Taxol®

Die Synthese des Paclitaxel stellte eine einzigartige Herausforderung dar. Die komplizierte Verbindung (siehe Abbildung 1) besteht aus zwei sechsgliedrigen Kohlenstoffringen beidseits eines achtgliedrigen Ringes. Daran gebunden sind wiederum ringtragende Seitenketten und ein seltener Viererring mit einem Sauerstoffatom (Oxetan-Ring). Besonders die Seitenkette an Position C-13 des Taxanrings ist wichtig für die Aktivität in Säugetierzellen [Parness et al., 1982]. Zwischen 1983 und 1993 mühten sich mehr als 30 Arbeitsgruppen, Paclitaxel oder zumindest einfachere verwandte Verbindungen zu synthetisieren. In den späten Achzigerjahren gelang es Portier u. a., Taxol aus einer Vorläuferverbindung (Desacetylbaccatin III), die aus der Eibe gewonnen werden konnte, zu synthetisieren. Dies war der entscheidende erste Schritt, Taxol in großen Mengen zur Verfügung zu stellen. 1994 schließlich wurde die Totalsynthese von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen (Nicolaou und Holton) publiziert. Außerdem konnten nun über Modifikationen im Syntheseweg Derivate



Abbildung 1: Strukturformel von Paclitaxel

des Taxols (Taxoide), wie z. B. das Taxotere, hergestellt werden.

Der Wirkmechanismus des Paclitaxel/Taxol®

Bei der Aufklärung des Mechanismus des Paclitaxel/Taxol[®] hat sich besonders die Biologin Susan B. Horwitz zusammen mit ihrem Doktoranden Peter B. Schiff am Albert-Einstein-College für Medizin in New York verdient gemacht. Paclitaxel/Taxol[®] greift an den für die Zellteilung unentbehrlichen Mikrotubululi an. Mikrotubuli sind Bestandteile des formgebenden inneren Zytoskeletts und spielen als Spindelfasern bei der Zellteilung eine entscheidende Rolle bei der Trennung der verdoppelten Chromosomen. Sie erfüllen zudem wichtige Aufgaben bei der Strukturgebung der Zelle, beim Stofftransport zwischen den Zellorganellen und bei der Fortbewegung von Zellen. Die feinen, hohlen Fasern sind normalerweise keine starren, statischen Konstruktionen, sondern dynamische Gebilde aus sich zusam-



Abbildung 2: Wirkungsmechanismus des Paclitaxel/Taxol[®]: Durch Bindung an polymerisierte Mikrotubuli werden diese stabiliert. Das Gleichgewicht zwischen löslichen Tubulin-Dimeren und polymerisierten Mikrotubuli wird verändert. Außerdem fördert Paclitaxel die Polymerisation von Tubulin in stabile Mikrotubuli in Abwesenheit von GTP, einem Kofaktor, der normalerweise für die Polymerisation der Mikrotubuli in vitro benötigt wird.

menfügenden und wieder lösenden Protein-Untereinheiten, den α - und β -Tubulin Dimeren.

Paclitaxel bindet kovalent an Mikrotubuli, spezifisch und in einem stöchiometrischen Verhältnis von nahezu eins an die Untereinheit β -Tubulin [Rao, 1993]. Die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt [Diaz et al., 2000]. Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung der Mikrotubuli. Sie werden kürzer und gegen eine Depolymerisierung geschützt. Sogar Kälte oder Ca²⁺-Ionen vermögen die Mikrotubuli nicht mehr zu depolymerisieren, was bei nicht Paclitaxel-gebundenen Mikrotubuli der Fall wäre. Diese Stabilisierung hat zur Folge, dass das normale Gleichgewicht zwischen den Tubulin-Dimeren und den Mikrotubuli zugunsten der Mikrotubuli verschoben wird, so dass die kri-

tische Tubulinkonzentration, die nötig ist, um Mikrotubuli zu formen, sinkt [Schiff et al., 1979]. Die Polymerisation geschieht, wie in Abbildung 2 gezeigt, sogar ohne die normalerweise nötigen Mikrotubulin-assoziierten Proteine oder dem Energieträger GTP [Schiff and Horwitz, 1981]. Die so stabilisierten Mikrotubuli formieren sich weiterhin zu einzelnen, nicht mehr auflösbaren Bündeln, was im Gegensatz zur Bindung und Polymerisation jedoch ein energieabhängiger Vorgang ist [Manfredi et al., 1982]. Dieser Einfluss auf das Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht hat vor allem zur Folge, dass sich eine normale mitotische Spindel nicht bilden kann. Die Zellteilung wird in der späten G2-Phase des Zellzyklus gehemmt. [Schiff and Horwitz, 1980]. Neuere Studien zeigen außerdem eine Bindungsfähigkeit für antiapoptotische Proteine wie bcl-2 [Rodi et al., 1999] oder Survivin [Li and Altieri, 1999]

Zusammengefasst beruht also die einzigartige Wirkung des Paclitaxel zum einen auf der Fähigkeit, Tubulin ohne weitere Kofaktoren in stabile Mikrotubuli polymerisieren zu lassen, und zum anderen darauf, eine Umformung in stabile Mikrotubulibündel zu induzieren.

Maligne, transformierte Zellen sind zwar mit ihrer unkontrollierten Vermehrung am stärksten von diesem Paclitaxel/Taxol[®]-Effekt betroffen, jedoch bleibt eine Wirkung auf gesunde, sich häufig teilende Zellen nicht aus, was die Nebenwirkungen der Behandlung mit Paclitaxel/Taxol[®] erklärt (siehe unten).

Die klinische Entwicklung des Paclitaxel/Taxol®

Präklinische antitumoröse Aktivität

In den Screeningstudien des National Cancer Institute konnte die Wirksamkeit von Paclitaxel/Taxol[®] sowohl an murinen als auch an humanen Zellkulturen gezeigt werden. Besonders auffällig war die Aktivität gegen das relativ resistente murine B16 Melanom, aber auch gegen viele andere Zelllinien, wie die humane CX-1 Kolon- und LX-1 Lungenkarzinomzellline, außerdem gegen die murine P388 und L1210 Leukämie. Jedoch zeigten sich hier schon die ausgeprägten Nebenwirkungen. Besonders die Myelosuppression dominierte bei den untersuchten Spezies (Mäuse, Ratten und Hunde). Aufgrund der hohen Lipophilität war es nötig, Paclitaxel mit Cremophor[®] EL aufzulösen. Dieses Vehikel zeigte aber im Tierversuch eine Toxizität, die sich durch Vasodilatation, Dyspnoe, Hypotension bis zum Tod auszeichnet. Aus diesem Grund wurden die klinischen Studien mit großer Vorsicht angegangen.

Phase-I-Untersuchungen - Verträglichkeit und Pharmakologie

Im Jahre 1984 begannen die ersten Phase-I-Untersuchungen mit Taxol[®] (siehe Tabelle 5). Die zahlreichen ausgeprägten Nebenwirkungen, vor allem akute Hypersensitivitätsreaktionen, bedrohten während dieser Versuche die Weiterentwicklung des Taxol[®]. Eine weitere dosislimitierende Reaktion war die Neutropenie. Außerdem spielte die Neurotoxizität und die Mukositis, besonders bei Patienten mit Leukämie und hohen Taxol[®]-Dosen (> 250 mg/m²) eine Rolle. In einigen Fällen traten zudem kardiale Rhythmusstörungen auf, von asymptomatischen Bradykardien bis hin zu einem AV-Block III[°]. Aus den Untersuchungen der Phase I konnten ferner Informationen über die pharmakologischen Eigenschaften gewonnen werden (siehe Abbildung 6). So zeigte Paclitaxel ein Clearance von 8,04 bis 23,55 1/h/m² nach einer 3 bis 24-stündigen Infusion von 15 - 275 mg/m², die nicht mit der Dosis korrelierte [Wiernik et al., 1987]. Die Ausscheidung über die Nieren ist minimal, im Vordergrund steht die hepatische Metabolisierung und Ausscheidung über den Darm, hauptsächlich über 6α -Hydroxytaxol. Da der hepatische Metabolismus im Vordergrund steht, können Substanzen, die das Cytochrome P450 (Isoenzym CYP2C) hemmen, die Eliminationszeit verlängern (z. B. Benzodiazepine, Cyclosporin, Erythromyzin, Makrolidantibiotika, Testosteron, Vinca-Alkaloide oder Tamoxifen) [Cresteil et al., 1994].

Phase-II-Untersuchungen - Therapeutisches Potential

Paclitaxel/Taxol[®] wurde zuerst an Patientinnen mit Ovarialkarzinomen [Einzig et al., 1992] untersucht, die gegenüber Cisplatin oder Carboplatin therapierefraktär waren und bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom [Reichman et al., 1993]. Nachdem die Verfügbarkeit des PaclitaxelTaxol[®] gesichert war, wurde es auch an vielen anderen Tumoren getestet, als Monotherapie oder in Verbindung mit anderen Chemotherapeutika, wie Cyclophospamid, Cisplatin, Carboplatin, Etoposid, Topotecan, Estramustin, Methotrexat, Edatrexat oder Fluoruracil. Die Responseraten und tolerierten Dosen variierten dabei stark. Die teilweise sehr ausgeprägten Hypersensitivitätsreaktionen der frühen Phase-I-Untersuchungen konnten mit einer prophylaktischen Gabe von H1- und H2-Rezeptorantagonisten (Cimetidin oder Ranitidin) und Steroiden (Dexamethason) reduziert werden [Wiernik et al., 1987]. Die Neutropeniegefahr konnte mit der kombinierten G-CSF-Gabe (Granulozytenkoloniestimulierender Faktor) von 5 µg/kg/d reduziert werden und erlaubte höhere Paclitaxel-Dosen [Schiller et al., 1994].

Ovarialkarzinom Bei den Phase-II-Untersuchungen wurde Paclitaxel/Taxol[®] meist über eine kontinuierliche, 24 h andauernde und alle drei Wochen wiederholte

Institut	Schema	Empfohlende Phase-II-Dosis	Dosis-limitierende Effekte	Andere physiologische Effekte
JHOC	6 h Infusion	210 mg/m ²	Neutropenie	Neuropathie, Mucositis, Myalgie
UTSA	6 h Infusion	225 mg/m ²	Neutropenie	Myalgie Neuropathie, Mucositis, HSR
Einstein	6 h Infusion	250 mg/m ²	Neutropenie, Neuropathie	HSR, Mukositis
Einstein	24 h Infusion	250 mg/m ²	Neutropenie, Neuropathie	HSR
Mt Sinai	24 h Infusion	200 mg/m ²	Mucositis	HSR
JHOC ^a	24 h Infusion	310 mg/m ²	Mucositis	Neutropenie, HSRs, Neuropathie
NC	24 h Infusion + G-CSF	250 mg/m ² + 10 μg/kg/d	Neuropathie	Neutropenie, kardiale Beschwerden, Thrombozytopenie, Myalgie
JHOC	24 h Infusion + cisplatin	135 - 170 mg/m ² + 75 mg/m ²	Neutropenie	Myalgie, kardiale Beschwerden, HSR, Neuropathie
JHOC	24 h Infusion + cisplatin + G-CSF	250 mg/m ² + 75 mg/m ² + 5 μg/kg/d	Neuropathie, Myalgie	Neutropenie, Myopathie, Thrombozytopenie, Erbrechen
MDA ^b	24 h Infusion (d1) + Doxorubicin (48 h Infusion d2 - 3) + G-CSF	n. v.	Stomatitis	Neutropenie, Thrombozytopenie
NCI ^c	72 h Infusion von Taxol und Doxorubicin + G-CSF	n. v.	Typhlitis	Neutropenie

Tabelle 5: Phase I Studien von Paclitaxel/Taxol® aus	s Rowinsky	y et al.	[1992]
--	------------	----------	--------

JHOC: Johns Hopkins Oncology Center; UTSA: University of Texas, San Antonio; NCI: National Cancer Institute; MDA: M. D. Anderson; HSR: Hypersensitivitätsreaktion; n.v.: nicht vorhanden ^{*a*}Patienten mit refraktärer Leukämie

^bPatientinnen mit Platin-refraktärem Ovarialkarzinom

^cminimal vorbehandelte Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs

Grundlagen

Schema	Modell	T _{1/2a} (h)	T _{1/2b} (h)	CL (ml/min/m ²)	VD _{SS} (I/m ²)	C _{peak} (µM)
6 h	biphasisch	0,36	6,4	195	59	2,2 - 13,0 (170 - 275 mg/m ²)
24 h	biphasisch	0,27	3,9	993	55	0,062 - 0,94 (200 - 275 mg/m ²)
24 h	—	_	_	_	—	1,6 - 3,5 (250 - 390 mg/m ²)
24 h	_	—	—	_	_	0,21 - 3,4 (110 - 350 mg/m ²)

Tabelle 6: Pharmakokinetik von Taxol[®] (nach Rowinsky et al. [1992])

CL: Systemische Clearance; C_{peak}: höchste Plasmakonzentration; T_{1/2a}und T_{1/2b}: alpha und beta Halbwertszeit der Elimination; VD_{SS}: Verteilungsvolumen beim Steady State

Infusionstherapie durchgeführt, um die Entwicklung von Hypersensitivitätsreaktionen zu minimieren. Die objektiven Responseraten lagen zwischen 16 und 48 %. Vergleichsweise höhere Ansprechraten wurden bei Patienten erreicht, die eine Dosis von 175 mg/m² erhielten, verglichen mit 135 mg/m², und bei denen, die ein 3-h-Infusionsschema erhielten, verglichen mit dem 24-h-Schema. Die Überlebensdauer war jedoch bei den verschiedenen Therapieschemata vergleichbar. Der Median reichte von 48 bis 51 Wochen [Eisenhauer et al., 1994]. Die Zeit bis zur Ansprache bei einer Therapie mit 135 bis 300 mg/m² Paclitaxel/Taxol[®] lag bei 9,2 Wochen [Anon, 1993]. Bei simultaner G-CSF-Gabe konnten sogar Dosen von bis zu 250 mg/m² ohne Zunahme der dosislimitierenden Nebenwirkungen erzielt werden [Sarosy et al., 1992]. Auch die Kombination von Paclitaxel/Taxol[®] mit anderen Chemotherapeutika, insbesondere Cisplatin und Cyclophosphamid und Doxorubicin, wurde untersucht und brachte hohe Responseraten (bis 70 %) [McGuire et al., 1996]. Mittlerweile hat Paclitaxel/Taxol[®] einen festen Platz in der Therapie des Ovarialkarzinoms

eingenommen, wo es bei Patienten mit Platin-resistentem Tumor als second-line Option und in Kombinationstherapie mit Cisplatin oder Carboplatin als potentes Medikament der ersten Wahl empfohlen wird [Wiseman and Spencer, 1998].

Metastasiertes Mammakarzinom Die objektiven Responseraten lagen in den Studien zwischen 20 und 35 %, also vergleichbar mit den Ergebnissen der herkömmlichen Therapie mit Anthracyclinen wie Doxorubicin. In Kombination mit Doxorubicin wurden bessere Ansprechraten erreicht, wobei eine verlängerte Überlebenszeit noch nicht belegt ist. Die Vorteile liegen zum einen als Medikament der zweiten Wahl bei Resistenz gegen Anthracycline und vor allem in Kombination mit Doxorubicin als hocheffiziente Option der ersten Wahl.

Andere Tumoren Es liegen eine Reihe von Phase-II-Untersuchungen an zahlreichen weiteren Karzinomen vor, bei denen teilweise viel versprechende Ergebnisse erzielt wurden, besonders in der Kombinationstherapie mit weiteren Chemotherapeutika. Eine Übersicht über die bisher in größerem Maßstab untersuchten Tumore gibt die Tabelle 7. Herauszuheben sind im Zusammenhang mit dieser Arbeit die bisherigen Untersuchungen am humanen Nierenzellkarzinom.

Paclitaxel/Taxol[®] und das humane Nierenzellkarzinom

Hinsichtlich der Wirkung von Paclitaxel/Taxol[®] auf das humane Nierenzellkarzinom gibt es nur wenige Daten. Die einzigen bisher veröffentlichten Daten liefert die Phase-II-Studie von Einzig et al. [1991]. Hierbei wurde an 18 Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem Nierenzellkarzinom eine Taxol[®]-Therapie mit 250 mg/m² als 24-h Infusion durchgeführt, die alle 21 Tage wiederholt wurde. Die Patienten erhielten als Prämedikation Dexamethason, Diphenydramin und Cimetidin.

Ovarialkarzinom	Zervixkarzinom
Mammakarzinom	Endometriumkarzinom
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	Ösophaguskarzinom
Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)	Magenkarzinom
Pleurales Mesotheliom und maligner Pleuraerguss	Kolorektales Karzinom
Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs	Weichteilsarkom
Urothelkarzinom	Kaposi-Sarkom
Prostatakarzinom	Malignes Melanom
Nierenzellkarzinom	Maligne Lymphome
Keimzelltumoren	

Tabelle 7: Tumoren, an denen Paclitaxel/Taxol® klinisch erprobt wurde (aus Bartsch [2000])

Bei keinem der 18 Patienten konnte ein Ansprechen beobachtet werden. Jedoch handelte es sich um bereits fortgeschrittene Tumorstadien, bei denen zudem der histologische Subtyp nicht dokumentiert war. Im Gegensatz dazu konnte in vitro an Nierenkarzinomzelllinien vom klarzelligen Typ in 95 % eine signifikante Wachstumsinhibition durch Paclitaxel, das in DMSO gelöst wurde, sowie von Taxol[®], der Paclitaxel-Lösung in Cremophor[®] EL, nachgewiesen werden [Reinecke et al., 1997]. Dies macht deutlich, dass weitere Untersuchungen unabdingbar sind, um den Wirkungsmechanismus und die Wirksamkeit von Paclitaxel/Taxol[®] speziell im Nierenzellkarzinom aufzuklären.

Resistenzmechanismen

Das unterschiedliche Ansprechen von verschiedenen Tumoren auf bestimmte Zytostatika hat schon früh den Verdacht aufkommen lassen, dass bestimmte Mechanismen für diese Resistenzentwicklung verantwortlich sind. Wenn ein Tumor sogar gegen mehrere Zytostatika gleichzeitig resistent ist, spricht man von Multidrug Resistance (MDR).

Grundsätzlich kann man drei Strategien unterscheiden. Erstens, das Bestreben der Zelle, die Konzentration der toxischen Substanz zu senken, z. B. durch P-Glykoprotein (P-Gp) oder Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1 (MRP1). Zweitens, die Substanz durch Metabolisierung zu detoxifizieren, z. B. durch Oxidierung mittels Glutathion. Drittens kann die Zelle versuchen, Substanzen daran zu hindern, ihre Wirkung zu entfalten und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen, z. B. durch Veränderung an der Zielstruktur, auf die die Substanz wirkt (Tubulinisotypen, Herunterregulation der Toposiomerasen, siehe auch Diskussion) oder durch Verhinderung der ,Prodrug'-Aktivierung. In Abbildung 3 wird eine Zusammenstellung heute bekannter Mechanismen gezeigt. Im folgenden wird näher auf das P-Gp sowie auf das MRP1 eingegangen.

P-Glykoprotein

Einer der Hauptmechanismen, der mit einer 'multidrug'-Resistenz assoziiert ist, ist die Überexpression des MDR1-Gens und dessen Produkts, des energieabhängigen Transportproteins P-Glykoprotein (P-Gp), an der Oberflächenmembran [Kartner et al., 1983, Ueda et al., 1987, Gottesman and Pastan, 1993]. Dieses Protein kann die Zelle vor zytotoxischen Substanzen schützen, indem es deren Konzentration im Zellinneren senkt. Das P-gp gehört – wie das 'Multidrug resistance-associated protein 1' (MRP1) – zur größeren Familie der 'ATP-binding cassette proteins' (ABC), zu der z. B. auch der Chloridkanal gehört, der bei der zystischen Fibrose defekt ist (CFTR). Das P-gp kann die intrazelluläre Konzentration einer Reihe unterschiedlicher Substrate senken (siehe Tabelle 8). Die einzige Gemeinsamkeit dieser Substrate ist, dass sie hydrophob und nicht negativ geladen sind, jedoch können unter bestimmten Umständen auch hydrophile, anionische Substanzen, wie Methotrexat,



Abbildung 3: Resistenzmechanismen (modifiziert nach Harrison [1995])

als Substrat dienen [de Graaf et al., 1996].

Versuche von Schinkel et al. [1994] und Schuetz et al. [1996] an P-gp-knockout-Mäusen konnten zeigen, dass das P-gp nicht absolut lebensnotwendig zu sein scheint. Die Versuchstiere waren lebensfähig und fruchtbar und zeigten auch sonst keine phänotypischen Abnormalitäten außer einer Hypersensitivität gegenüber Medikamenten. Somit scheint die hauptsächliche physiologische Funktion des P-gp zu sein, den Körper vor hydrophoben, toxischen Substanzen zu schützen, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Weitere Funktionen sind die

Tabelle 8: Bedeutung von P-Glykoprotein als Effluxpumpe für Chemotherapeutika und andere Verbindungen [Chin et al., 1993]

Substr	koino Substrato		
Chemotherapeutika	Sonstige	Keine Substrate	
Vinca-Alkaloide	Colchicin	• 5-Fluorouracil	
(Vinblastin, Vincristin)	Puromycin	 Cytosinarabinosid 	
Anthracycline (Deverubicine	 Podophyllotoxin 	 Methotrexat 	
Daunorubicin.	Ethidiumbromid	 Chloroambucil 	
Mitoxantron)	Emetin	 Melphalan 	
 Epipodophyllotoxine 	Gramicidin	 Cyclophosphamid 	
(Etoposid, Teniposid)	Valinomycin	Carmustin	
 Taxane (Paclitaxel, Docetavel) 	Rhodamin	 Bleomycin 	
Mitomycin C Actinomycin D	 Proteaseinhibitoren (Indinavir, Nelfinavir, Saguinavir) 	Camptothecin	
Topotecan Mithramycin	ouquilium)		

hoch	mittel	niedrig			
Nebennierenrinde	Nebennierenmark	Haut			
Niere (prox. Tubuli)	Trachea	Skelettmuskel			
Leber	Lunge	Herz			
Plazenta	Prostata	Milz			
Kolon		Magen			
Dünndarm		Ovarien			
Gehirn		Rückenmark			
Hoden		Knochenmark			
Pankreas					
Makrophagen					

Tabelle 9: Grad der P-Glykoprotein Expression in normalem Gewebe (aus Lum et al. [1993])

Translokation von Phospholipiden, Beteiligung am Cholesterol-Metabolismus, Apoptose-Inhibition und Migration dendritischer Zellen [Johnstone et al., 2000]. P-gp wurde in Dünn- und Dickdarmepithelzellen, in Hepatozyten und proximalen Tubuluszellen der Nieren gefunden [Thiebaut et al., 1987]. Außerdem in Endothelzellen der kapillären Gefäße der Blut-Hirn- und Blut-Hodenschranke und in Trophoblastenzellen der Plazenta [Cordon-Cardo et al., 1990]. Es wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi-Apparat weiterentwickelt, von wo aus es dann an die Zelloberfläche transportiert wird.

Das P-gp wird von verschiedenen Tumoren exprimiert. So wurden im humanen Nierenzellkarzinom [Fojo et al., 1987] und im Kolonkarzinom [Weinstein et al., 1991] hohe Expressionsraten gefunden. Bei anderen Tumoren, z. B. im Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Myelom, Lymphom und bei der akuten myeloischen Leukämie, scheint die Expression erst nach Exposition von Chemotherapeutika hochreguliert zu werden [Chan et al., 1995]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Expression von P-gp im Tumor mit einer herabgesetzten Lebenserwartung korreliert [Chan et al., 1995, Fisher et al., 1996, Leighton and Goldstein, 1995, Marie, 1995].

Die 1280 Aminosäuren des P-gp [Chen et al., 1986] sind in zwei homologen Hälften organisiert, die jeweils sechs transmembrane Regionen und eine ATP-bindende Region enthalten und durch eine Linkerregion miteinander verbunden sind. Die transmembranen Helices formen einen ca. 5 nm messenden zentralen Kanal, der an der Zellinnenseite verschlossen ist und innerhalb der Zellmembran eine wassergefüllte Kammer formt [Rosenberg et al., 1997]. Für die Erkennung des entsprechenden Substrats scheinen besonders die Aminosäuren His61, Gly64 und Leu65 in der ersten transmembranen Domäne (TM1) von Bedeutung zu sein [Taguchi et al., 1997]. Die Transportfunktion ist energieabhängig. Über den genauen Mechanismus, wie das P-Glykoprotein die intrazelluläre Konzentration bestimmter Substrate senken kann, existieren verschiedene Vorstellungen. Das älteste Erklärungsmodell besagt, das P-gp die Substanzen direkt aus dem Zellinneren nach außen ,pumpt' [Dano, 1973]. Neuere Theorien sprechen von einer ,Flippase', die die hydrophoben Substanzen lediglich aus der inneren in die äußere Schicht der Zellmembran befördert, wonach der weitere Transport in Form von passiver Diffusion stattfindet. Ein drittes Modell von Roepe [2000] besagt, dass P-gp lediglich den intrazellulären pH und das Membranpotential Ψ ändert und darüber eine veränderte Membranpermeabilität und intrazelluläre Bindung der Substanz erreicht wird, so dass für den Transport ausschließlich passive Diffusionsvorgänge verantwortlich zu sein scheinen.

Schon im normalen Nierengewebe wird in hohem Maße P-gp exprimiert [Thiebaut et al., 1987]. Somit ist nicht verwunderlich, dass auch das humane Nierenzellkarzinom sehr häufig P-gp exprimiert, in der Literatur finden sich Häufigkeitsangaben von 48 – 100 % [Chapman and Goldstein, 1995]. Die Expression nimmt mit



Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des P-gp. P, wassergefüllte zur extrazellularen Seite offene Pore. TMD, Transmembrane Domänen. NBD, nukleotidbindende Domäne. Gestrichelte Linien, Ebene der Zellmembran. Balken, 1.7 nm. [Rosenberg et al., 1997]

steigender Entdifferenzierung ab [Kanamaru et al., 1989] und ist beim klarzelligen Nierenzellkarzinom im allgemeinen höher [Rochlitz et al., 1992]. Die Höhe der Pgp-Expression korreliert mit der Höhe der Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika in vitro [Mickisch et al., 1990] und der Schwere des klinischen Verlaufs [Duensing et al., 1994, Hofmockel et al., 1997].

Multidrug-Resistance-Related-Protein 1 (MRP1)

Cole et al. konnten 1992 in der Zelllinie H69AR (kleinzelliges Bronchialkarzinom) ein weiteres für MDR verantwortliches Protein nachweisen und dessen mRNA entschlüsseln. Dieses 190 kDA schwere Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1
Grundlagen

(MRP1, früher nur als MRP bezeichnet) stimmt nur zu 15 % mit der Aminosäuresequenz des P-gp überein. Es gehört ebenfalls zur ABC Superfamilie, enthält zwei Nukleotidbindungsstellen für die ATP-Spaltung und ähnelt in der Struktur dem P-Gp, nur dass es eine weitere transmembrane Domäne mit bis zu sechs transmembranen Helices enthält. Im Resistenzmuster ähnelt es ebenfalls dem P-Gp, jedoch gibt es bestimmte Unterschiede. So sind mit MRP1 transfizierte HeLa-Zellen im Vergleich zu P-Gp-transfizierten resistent gegen schwere Metalloxidanionen (Arsenit), jedoch nicht gegenüber Mitoxantron. Sie zeigen ferner nur eine geringe Colchicinund Paclitaxel/Taxol®-Resistenz [Cole et al., 1994]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien die Expression von MRP1 schon bei geringen Konzentrationen eines Zytostatikums angeregt wird, wogegen das P-Gp erst bei höheren Konzentrationen exprimiert wird [Loe et al., 1996]. MRP1 findet sich hauptsächlich auf der Plasmamembran, aber auch auf Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats. Wie beim P-Gp ist auch beim MRP1 der genaue Wirkmechanismus, über den die Konzentrationsminderung von toxischen Substanzen erreicht wird, noch nicht geklärt. Die physiologische Rolle ist noch nicht im Detail untersucht, es gibt aber Hinweise, dass MRP1 die Fähigkeit hat, das Leukotrien LT4 zu transportieren und somit eine Rolle bei der Pathogenese des Bronchialasthmas spielt. [Leier et al., 1994]. Auch andere Gluthation-konjugierte Substanzen können von MRP1 transportiert werden, so dass MRP1 einen Beitrag zum Multispezifischem organischen Anionentransport (MOAT) in der Leber und anderen Geweben zu geben scheint [Mayer et al., 1995]. MRP1-Überexpression findet sich in vielen durch Selektion in zytostatikahaltigen Medien gewonnenen Zelllinien sowie verschiedenen multiresistenten Tumoren [Loe et al., 1996].

Klasse	Substanz
Kalziumkanalblocker	Verapamil (und
	R-Stereoisomer), Niefedipin,
	Diltiazem, Flunarizin, Bepridil,
	Niterndipin, Nomodipin
Antiarrhythmika	Chinidin, Amiodaron
Neuroleptika/Antidepressiva	Trifluoperazin (Calmodulin
	Antagonist), Clomipramin
Steroide, Steroidantagonisten	Progesteron, Tamoxifen
Detergenzien	Cremophor [®] EL, Tween 80
Andere	Reserpin (Antihypertonikum),
	Cyclosporin A
	(Immunsuppressivum),
	Amphotericin B
	(Antimykotikum)

Modulatoren des P-Glykoproteins

Es sind mittlerweile mehrere Substanzen bekannt, die die P-Glykoproteinabhängige MDR aufheben können. Diese Substanzen gehören unterschiedlichen Substanzklassen an und bedienen sich demzufolge unterschiedlichen Mechanismen, über die sie die Funktion des P-Glykoproteins vermindern. Dazu gehören Kalziumkanalblocker, wie das Verapamil, und Detergenzien, wie Cremophor[®] EL. Eine Übersicht über weitere Substanzen gibt die Tabelle 10. Teilweise ist auch neben der nachgewiesenen Wirksamkeit in vitro auch eine gewisse klinische Wirksamkeit in Kombination mit Zytostatika gezeigt worden [Sikic et al., 1997]. Für diese Arbeit wurden Verapamil und Cremophor[®] EL ausgewählt, um zu untersuchen, inwieweit sich das Ansprechen auf Paclitaxel bzw. Taxol[®] von ausgewählten, Paclitaxelresistenten Nierenkarzinomzelllinien durch Modulation der P-Gp-Funktion beeinflussen lässt.

Verapamil

Verapamil gehört zu den Kalziumantagonisten und wurde zuerst von Rogan et al. [1984] in Zusammenhang mit Zytostatikaresistenz gebracht, indem er zeigte, dass Adriamycin-resistente Ovarialkarzinomzelllinien nach Verapamilgabe wieder sensibel wurden. Der Mechanismus, über den Verapamil die Funktion des P-Glykoproteins inhibieren kann, ist noch nicht komplett verstanden. Es scheint jedoch eine direkte, kompetetive Bindung und damit Blockade des P-Glykoprotein vorzuliegen [Akiyama et al., 1988]. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen sind eine Reihe Substanzen untersucht worden, die eine geringere kalziumantagonistische Wirkung bei höherer P-Glykoprotein-Inhibition besitzen [Mickisch et al., 1991]

Cremophor[®] EL

Cremophor[®] EL ist ein Umsetzungsprodukt von Rizinusöl (1 Mol) mit Ethylenoxid (35 Mol). Es stellt ein Gemisch aus ca. 83 % eher hydrophoben Verbindungen und einem ca. 17 %igen hydrophilen Anteil dar. Cremophor[®] EL dient als Hilfsstoff (Emulgator und Solubilisator) für die äußerliche und innere Anwendung. Schuurhuis et al. [1990] konnten erstmals den inhibitorischen Effekt von Cremophor[®] EL auf die Multidrug-Resistenz zeigen. Die genaue Wirkungsweise ist noch nicht geklärt, es scheint im Gegensatz zu Verapamil aber weniger die Aufnahme der Medikamente in die Zelle verhindert als die Verteilung innnerhalb der Zelle verändert zu werden. Außerdem zeigen Untersuchungen von Chuang et al. [1991] auch einen inhibitorischen Effekt auf die Proteinkinase C. Paclitaxel wird klinisch zusammen mit Cremophor[®] EL als Lösungvermittler eingesetzt. Untersuchungen konnten zeigen, dass Cremophor[®] EL an der Wirksamkeit von Taxol[®] einen erheblichen Anteil besitzt. Dabei spielt eine direkte zytotoxische Wirkung und zu einem erheblichen Teil auch eine modulatorische Wirkung in Form von Verstärkung der Paclitaxelwirksamkeit eine Rolle [Csoka et al., 1997].

Materialien

Zellkultur

Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium: 500 ml; Cat. No. 41966-029; Lot No. 3027703; GIBCO BRL; zusätzlich 50 ml fetales Kälberserum, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Glutamin, 5 ml Hepes-Puffer, 5 ml Arginin/Aspargin Ampuwa

Dulbecco's PBS: 500 ml; Cat. No. 14190-094; Lot No. 3024640; GIBCO BRL

EDTA (Versen): 1 % (w/v) in 100 ml PBS; Cat. No. 22113; Lot. No. 671S; Seromed

MTT-Assay

MTT Sigma Chemical Co., 100 mg, M-2128, Lot No. 66H5033

Paclitaxel Sigma Chemical Co., T-7402, 1 mg, Lot No. 76H0958, MR 853,92

FACS-Analyse

Lysing solution G: 10 % (v/v) BECTON & DICKINSON

FACS-Puffer: 7,5 % BSA, 0,1 % Natriumazid in PBS

- JSB-1: Aus dem MDR Sampler Pack; Cat. nr. MON 9200; SANBIO
- Sekundärantikörper Anti Mouse: Rb x Mouse IgG, M, A FITC, 1 ml, MON: PS109F; LOT.: 0947J; SANBIO
- BSA Albumin, bovine fraction, Solution 7,5 %, Lot 64A2329, Sigma

Verapamil Sigma Chemical Co., V-4629, 1 g, Lot No. 56H0925

Rhodamine 123 Sigma Chemical Co., R-8004, 25 mg, Lot No. 96H3642

RT-PCR-Analyse

- RT Kit: Stratagene Catalog No. 200420, Lot No. 126FSK3, Revision No. 017005
- **PCR Kit:** PrimeZyme DNA-Polymerase Kit; Product Code: 100-652; Lot number: 5178
- RNA-Extraction Kit: RNeasy Total RNA Kit, Cat. No. 74104, Lot PQ96002/-0495/12, QUIAGEN, Hilden

Methoden

Zelllinien und Zellkultur

Zelllinien

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Zelllinien durchgeführt, die aus humanen klarzelligen, chromophilzelligen und chromophobzelligen Nierenzellkarzinomen etabliert wurden und ausführlich charakterisiert sind [Gerharz et al., 1993, 1994, 1995, 1996]. Aus den etablierten 28 klarzelligen Nierenzellkarzinomzellinien wurden durch Randomisierung in Bezug auf Resistenzverhalten gegenüber Paclitaxel/Taxol[®] zehn Linien ausgewählt. Von den chromophilzelligen wurden alle vier und von den chromophobzelligen beide vorhandenen Zelllinien für die Untersuchungen verwendet.

Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden aus der Zellkultur umfassen die Tätigkeiten Füttern, Passagieren und Expandieren von Zelllinien sowie die Zellzahlbestimmung für die weiteren Versuche. Die Fütterung, d. h. die Versorgung der Zellen mit neuem Medium, wurde im Abstand von 3 – 4 Tagen durchgeführt, um den Zellen neue Nährstoffe zuzuführen, Stoffwechselprodukte zu reduzieren und um die Konzentrationsänderung des Mediums durch eventuelle Wasserverdunstung auszugleichen. Die mikroskopisch beurteilten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gefüttert, indem zuerst die Hälfte des Zellkulturmediums dekantiert wurde und dieses Volumen mit neuem Medium wiederaufgefüllt wurde.

Eine Passagierung der Zellen einer Zellkulturflasche ist notwendig, sobald der Flaschenboden konfluent bewachsen ist oder sich keine weiteren Zellen mehr anheften. Durch ein an die Wachstumsgeschwindigkeit angepasstes Passagevolumen wurde erreicht, dass die meisten Zelllinien einmal wöchentlich passagiert werden konnten. Zum Ablösen der Zellen wurden die Zellen für 10 – 15 Minuten mit 0,05 %iger EDTA-Lösung im Feuchtinkubator inkubiert.

Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, war es nötig, die Konzentration der Zellen einer Zellsuspension zu bestimmen. 50 μ l der Zellsuspension wurden dazu zu 50, 100 oder 150 μ l Trypanblaulösung gegeben, je nach erwarteter Zellzahl. Nach gründlichem Mischen und Auftragen auf zwei Neubauer-Zählkammern konnten lebende (ungefärbte) und abgestorbene, aufgrund der erloschenen Schrankenfunktion der Zellwand angefärbte Zellen gezählt werden. Um die Konzentration der Zellen *c* aus den gezählten Zellen *n* in den 16 Quadraten der Zählkammern und dem Verdünnungsfaktors *VF* zu ermitteln, diente folgende Formel:

$$c(\text{Zellen/ml}) = \frac{n}{16 \cdot 0.1 \cdot VF} \cdot \frac{100}{\text{ml}}$$
(1)

MTT-Assay

Theoretische Grundlagen

Das MTT-Assay basiert auf der Arbeit von Tim Mosmann [1983]. Mit Hilfe dieses nicht radioaktiven Assays lässt sich das Überleben aber auch die Proliferation von Zellen in der in-vitro-Kultur leicht bestimmen und prozentual quantifizieren. Das Prinzip beruht darauf, dass eine vorerst farblose Substanz von lebenden Zellen aufgenommen und dort innerhalb der Mitochondrien gespalten wird, so dass eine farbige Substanz entsteht, deren Konzentration mittels Extinktionsmessung bestimmt werden kann. Bei dieser Substanz handelt es sich um MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid), das in Abbildung 5 dargestellt ist.



Abbildung 5: Strukturformel des MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)

In aktiven Mitochondrien wird mit Hilfe von NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen der Tetrazoliumring des MTT gespalten, so dass ein dunkelblaues Formazan-Produkt entsteht. Daraus wird ersichtlich, dass neben der Zellzahl auch die Aktivität der Zellen gemessen wird. Weitere Untersuchungen Mosmanns zeigten, dass die Ergebnisse des MTT-Assays durchaus vergleichbar sind mit dem [³H]ThymidinInkorporations-Assay mit dem Unterschied, dass letzteres die Zahl der DNAsynthetisierenden Zellen während der letzten Stunden des Assays misst, wogegen das MTT-Assay die Anzahl und Aktivität der Zellen am Ende des Assays bestimmt.

Durchführung

Zur Bestimmung der Überlebensrate der entsprechenden Zelllinie unter einer bestimmten Substanzkonzentration wurden zunächst die Zellen einer Kulturflasche mit EDTA-Lösung abgelöst und die Zellzahl bestimmt (siehe Seite 35). Anschließend wurde so verdünnt, dass man eine Konzentration von 10000 Zellen in einem Volumen von 100 µl Zellkulturmedium erhielt bei einem Gesamtvolumen von ca. 9 ml pro 96-Wellplatte. Nun wurde mit einer Multipipette jeweils 100 µl Zellsuspension in jedes Loch einer 96-Wellplatte gegeben, wobei die erste Spalte als Leerwert nur mit 100 µl Zellkulturmedium ohne Zellen gefüllt wurde. Dann wurde die 96-Lochplatte in Aluminiumfolie verschlossen für 24 h im Feuchtinkubator belassen, um die Zellen adhärent werden zu lassen. Darauf wurde die Adhärenz in jedem Loch der 96-Wellplatte lichtmikroskopisch überprüft und sodann in jedes Well ein Volumen von 100 µl pipettiert, welches entweder nur Zellkulturmedium enthielt (Leerwertspalte und Kontrollspalte) oder die zu untersuchende Substanz oder Substanzkombination. Dabei musste bei der Konzentrationsberechnung das schon in den Wells befindliche Volumen von ebenfalls 100 µl entsprechend berücksichtigt werden. Nach der Pipettierung der Substanz wurden die Platten erneut mit Aluminiumfolie verschlossen und für 5 Tage im Feuchtinkubator belassen. Für die eigentliche Messung wurde zunächst die MTT-Lösung angesetzt. Dazu wurde 100 mg MTT in 20 ml PBS aufgelöst und steril filtriert. Nun wurde in jedes Well jeweils 50 µl MTT-Lösung pipettiert. Die Platten wurden sodann in Aluminiumfolie verpackt für 4 Stunden in den Feuchtinkubator gestellt. Dann wurden die Platten dekantiert, d. h. umgekehrt auf saugfähiges Papier gestellt, um die Lösung abfließen zu lassen. Danach wurde in jedes Well je 150 µl DMSO pipettiert, damit sich alle entstanden blauen Kristalle des Formazanproduktes auflösen konnten. Im letzten Schritt wurden die Platten im Messgerät ausgewertet, indem der Absorbtionskoeffizient für Licht der Wellenlänge 570 nm für jedes Well einzeln bestimmt wurde. Die überlebensrate P_i wurde bestimmt, indem das Verhätnis des Mittelwertes der Substanz-Spalte \bar{x}_i zur Kontrollspalte \bar{x}_2 , jeweils nach Subtraktion des Mittelwertes der Leerwertspalte \bar{x}_1 bestimmt wurde.

$$P_i = \frac{100\%}{\bar{x}_2 - \bar{x}_1} \cdot (\bar{x}_i - \bar{x}_1)$$
(2)

Aus der Überlebensrate wurde durch Subtraktion von 100 % die Wachstumsinhibitionsrate ermittelt. Zusätzlich wurde über die 8 Werte einer Spalte der Variationskoeffizient berechnet (siehe Kapitel Statistik).

Modulation der Paclitaxel-Sensibilität mit Verapamil und Cremophor[®] EL

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Modulation des Wachstumsverhalten mit Cremophor[®] EL und Verapamil bei verschiedenen Paclitaxelkonzentrationen wurde das oben beschriebene MTT-Assay an den Linien clearCa-7 und chromphi-2 durchgeführt. Eine Kontrollplatte (Abbildung 6) diente zum Vergleich mit Paclitaxel ohne Modulator und zur Austestung der Modulatoren zum Ausschluss direkter toxischer Wirkungen auf die Zelllinien.

Für die Bestimmung der isolierten Paclitaxelwirkung wurde jeweils eine Konzentrationsreihe hergestellt, die die für jede Spalte gewünschte Konzentration, allerdings in doppelter Höhe (siehe oben), enthielt. Für Paclitaxel wurden 1 mg Trockensubstanz (Molekulargewicht 853,9 g/mol) in 150 μ l DMSO aufgelöst und dann mit 58,4 ml Medium verdünnt, so dass eine Stammlösung von 20 μ M erreicht wurde. Die



Abbildung 6: Kontrollplatte für die Modulationsversuche

Konzentrationsreihen in Zehnerpotenzen abwärts bis 0,002 μ M wurden hergestellt, indem jeweils 1 ml der entsprechend höheren Konzentration mit 9 ml Medium versetzt wurden. Anschließend wurden je 100 μ l der Lösungen in die entsprechenden Wells verteilt, so dass in den Wells die gewünschte Endkonzentration erhalten wurde.

Für die Modulation wurde Paclitaxel in Kombination mit zwei potenten Modulatoren des P-Glykoproteins, Verapamil und Cremophor[®] EL, verwendet (siehe Abbildung 7, 8). Dazu wurde jeweils eine Konzentrationsreihe für Paclitaxel, Verapamil und Cremophor[®] EL in der vierfachen der gewünschten Endkonzentrationen in einem Volumen von 9 ml (siehe Abbildung 7, 8 und 6) hergestellt.

Zur Herstellung der Paclitaxel-Konzentrationsreihe wurde von der oben beschrie-





Abbildung 7: Modulation mit Verapamil

benen 20 µM Stammlösung 2 ml mit 8 ml Medium verdünnt, so dass eine Konzentration von 4 µM erreicht wurde, die dann wie oben beschrieben in Zehnerpotenzen abwärts bis auf 0,04 µM verdünnt wurde. Die Verapamil-Konzentrationsreihe wurde hergestellt, indem zunächst eine 20 mM Verapamil-Stammlösung hergestellt wurde. Dazu wurde 1 g Verapamil (Molekulargewicht 491,1 g/mol) in 1 ml DMSO aufgelöst und anschließend mit 100,8 ml Medium weiterverdünnt. Daraus ließen sich durch Verdünnung mit Zellkulturmedium die drei gewünschten Konzentrationsstufen 40 µM, 4 µM und 0,4 µM herstellen. Für die Cremophor[®] EL-Konzentrationsreihe wurde schließlich 1 g Cremophor[®] EL mit DMSO auf 2 ml aufgefüllt und dann aus 300 µl dieser Lösung mit 49,7 ml Medium eine Konzentration von 0,3 % (m/v) erreicht, aus der dann die anderen beiden Konzentrationen 0,03 % und 0,003 % gewonnen wurden. Die zu erreichende Endkonzentration von maximal 0,0075 % (m/v) entspricht dabei der Menge, die auch in 1 µM Taxol[®] enthalten ist. Methoden



Abbildung 8: Modulation mit Cremophor® EL

Bei der Verteilung auf die einzelnen Wells wurden nun jeweils 50 μ l Paclitaxel mit 50 μ l Verapamil bzw. Cremophor[®] EL kombiniert, so dass mit dem sich bereits in Wells befindlichen 100 μ l Medium die gewünschten Endkonzentrationen erreicht wurden.

Zum Ausschluss von Wirkungen des Lösungsmittels DMSO wurden Vorversuche durchgeführt, die keine toxischen oder modulativen Wirkungen zeigten.

Nach Bestimmung der Wachstumsinhibitionsraten wurde zur Veranschaulichung der *Dose Modifying Index* berechnet (Kapitel Statistik, Seite 59).

FACS-Analyse

Theoretische Grundlagen

Die Flowzytometrie ist eine Methode, die heutzutage vor allem in der Leukozytensubpopulationsbestimmung angewandt wird, die aber auch zur Bestimmung und Quantifizierung von anderen Oberflächenmarkern wie P-Glykoprotein und MRP1 geeignet ist. Daneben lassen sich aber auch Funktionsuntersuchungen durchführen. Das Prinzip der Flowzytometrie ist, dass eine Einzelzellsuspension nach entsprechender Anfärbung durch fluoresziierende Farbstoffe an einem Laser vorbeigeführt wird und gebrochenes und fluoreszierendes Licht einzelner Zellen — nach bestimmten Wellenlängenbereichen getrennt — gemessen wird. Daraus können dann Rückschlüsse auf Größe, Oberflächenbeschaffenheit der Zellen gezogen sowie quantitative Aussagen über die Dichte von Oberflächenmarkern gemacht werden.

Die Einzelzellsuspension wird dazu zusammen mit einer Trägerflüssigkeit in die Flusskammer gepresst, so dass dort ein laminarer Fluss mit einer stabilen Parabelform erreicht wird, der eine für jede Zelle getrennte Signalgebung gewährleistet. Der Lichtstrahl, der eine Wellenlänge von 488 nm hat, wird über ein Linsensystem auf einen Durchmesser von $30 - 50 \mu m$ gebracht und trifft auf die Oberfläche einer Zelle. Der Lichtstrahl und das von der Zelle zusätzlich ausgehende fluoreszierende Licht werden nun von einer Reihe von Detektoren aufgefangen und quantifiziert.

Fluoreszenzfarbstoffe

Die üblicherweise in der Flowzytometrie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind Phycoerythrin (PE) und das in dieser Arbeit verwendete Floreszin Isothiozyanat (im folgenden FITC), welches über seine Isothiozyanatgruppe leicht an Proteine gebunden werden kann und ein Emissionsmaximum von 530 nm hat.



Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines FACS-Gerätes mit Strahlengang und Detektoren

Lichtweg und Detektoren

Der schematische Aufbau des Lichtweges und der Position der einzelnen Detektoren eines FACS-Gerätes ist in Abbildung 9 dargestellt.

- **Forward Scatter (FSC):** Dieser Detektor ist in Richtung des Laserstrahls angebracht und fängt Licht auf, das im Winkel von 1 − 20 ° von der Zelle gebrochen wird. Die Intensität ist als Maß für die Größe der Zellen aufzufassen.
- Side Scatter (SSC): (auch Right Angle Scatter) Mit dessen Hilfe wird Licht aufgefangen, das aufgrund der Granuliertheit der Zelloberfläche seitlich gebrochen wird. Dazu wird das Licht des Laserstrahls (488 nm) von dem 500 nm Long-

Pass-Spiegel reflektiert und in die Lichtverstärkungsröhre geleitet.

- **PE-Fluoreszenz-Detektor (FL2):** Er fängt Licht auf, das von aktivierten Phycoerythrinmolekülen, einem fluoreszierenden Farbstoff, der mit dem Primär- oder Sekundärantikörper konjugiert ist, ausgesandt wird. Dazu muss das Licht zuvor durch einen 560 nm Short-Pass-Spiegel, der die Wellenlängen über 560 nm reflektiert, so dass nur das von Phycoerythrinmolekülen ausgesandte Licht den Detektor erreicht.
- FITC-Fluoreszenz-Detektor (FL1): Dieser Detektor dient der Registrierung von Licht, das von aktivierten Fluoreszin-Isothiozyanatmolekülen ausgesandt wird. Das Licht hat beide halbdurchlässigen Spiegel passiert und gelangt in den entsprechenden Detektor.

Signalverarbeitung

Die Lichtverstärker liefern eine Spannung zwischen 0 und 10 V. Die Detektoren werden untereinander getriggert, um Störsignale zu verhindern. Da die Signale zu schnell hintereinander kommen, gelangt ein Impuls zunächst in einen *sample and hold circuit*, so dass zwar nicht jede Zelle gemessen wird, dies aber zufällig geschieht und somit keine Auswirkung hat, solange die Zellen nicht wie im *FACSort* sortiert werden sollen. Danach wird logarithmisch verstärkt und das Signal in einem Analog-Digital-Konvertierer (ADC) mit einer Auflösung von 10 bit (= 1024 Einheiten) digitalisiert.

Analyse und Darstellung

Die somit für eine bestimmte Anzahl von Zellen (meist 5000 bis 10000) ermittelten Daten für FSC, SSC, FL1 und FL2 lassen sich nun auf verschiedene Art und Weise,





Abbildung 10: Verschiedene Möglichkeiten der Signaldarstellung in der FACS-Analyse

wie in Abbildung 10 gezeigt, darstellen.

- Häufigkeitshistogramm: Die Intensität eines Kanals wird gegen die Anzahl der Ereignisse an der jeweiligen Intensitätsstufe aufgetragen. (Abbildung 10a)
- **Zytogramm (dot plot):** Dies ist die zweidimensionale Erweiterung des Häufigkeitshistogramms. Hierbei werden die Signale zweier ADCs gegeineinander aufgetragen, wodurch Cluster von Zellen entstehen, die, auf die beiden Kanäle bezogen, ungefähr gleiche Eigenschaften besitzen und entsprechend eingegrenzt werden können (Abbildung 10b). Für das Zytogramm existiert auch eine dreidimensionale Darstellung (Abbildung 10c).
- Kontur-Graph: Er entspricht weitgehend dem Zytogramm. Anstelle von Punktewolken erhalten jedoch Areale gleicher Häufigkeitsdichte eine Konturlinie

(Abbildung 10d). In der dreidimensionalen Darstellung wird er auch als Isometrischer Plot bezeichnet (Abbildung 10e).

Man kann nun in den verschiednen Zytogrammen Cluster, d. h. bestimmte Zellpopulationen, die sich in jeweils zwei Parametern ähnlich sind, eingrenzen und so die statistische Auswertung auf nur eine bestimmte Zellpopulation begrenzen (*gaten*), was z. B. bei der Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen sehr hilfreich ist. In dieser Arbeit beschränkt sich die Vielfalt der Möglichkeiten auf das Ausgrenzen von Zellschutt und anderen Partikeln, so dass nur die eigentliche Zellpopulation in der Auswertung der Fluoreszenz berücksichtigt wird.

Bestimmung des P-Glykoproteins (P-Gp) und des Multidrug-resistance associated Proteins 1 (MRP1)

Vorbereitend wurden die Sekundärantikörper Anti-Mouse und Anti-Rat mit humanem Serum (freundlicherweise bereitgestellt vom Institut für Hämostasiologie und Transfusionsmedizin, HHU Düsseldorf) präinkubiert, so dass unspezifische Bindungen vermindert wurden. Dazu wurde 1:1 mit humanem Serum verdünnt und bei 40 000 g für 30 min ultrazentrifugiert. Außerdem wurde in Vorversuchen mit β 2-Mikroglobulin-Antikörpern die optimale Sekundärprimerkonzentration ermittelt. Zur Bestimmung des P-Glykoproteins diente der Antikörper JSB-1 [Toth et al., 1994]. Die Bestimmung des MRP1 wurde mit dem Antikörper MRPr1 durchgeführt Cole et al. [1992]. Es wurden Primärantikörperkonzentrationen gemäß den Empfehlung des Herstellers verwendet.

Zunächst wurden die Zellen abgelöst, steril filtriert, um eine Einzelzellsuspension zu erreichen, gezählt, zweimal in PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur mit Lysing solution G fixiert. Darauf wurden sie erneut zweimal in PBS bei 4 °C gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml gebracht. Nun wurden 20 µl Primärantikörper JSB-1 (1:20) bzw. MRPr1 (1:20) in je ein FACS-Röhrchen pipettiert. Dazu kamen 20 µl der Zellsuspension ($\triangleq 10^6$ Zellen). Je ein weiteres FACS-Röhrchen, in das zunächst nur je 20 µl Zellsuspension gegeben wurde, diente für die Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C wurden die FACS-Röhrchen zweimal mit je 3 ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 225 g und 4 °C). Darauf wurden 20 µl Sekundärantikörper Anti-mouse (für JSB-1) bzw. Anti-rat (für MRPr1) hinzugegeben und erneut 1 h bei 4 °C inkubiert. Nun wurde zweimal mit je 3 ml FACS-Puffer gewaschen und eine für die eigentliche Messung bereite Zellsuspension erhalten.

Die Auswertung erfolgte mit der Software *Lysis 2.0.* Es wurde in der Histogrammansicht bei der Messung von Zellen mit Sekundärantikörpern (ohne Primärantikörper) ein Marker so gesetzt, dass sich links von ihm 98 % und rechts 2 % der Zellpopulation befand. Nun konnte anhand der Zunahme der Prozentzahl im rechten Bereich die Intensität der Fluoreszenz und damit die Expression des P-Glykoproteins bzw. MRP1 quantifiziert werden. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung an verschiedenen Tagen durchgeführt und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Abbildung 11 zeigt eine Histogrammdarstellung der Messung des P-Gp und MRP1.

Bestimmung der Funktionalität des Effluxes

Zur Untersuchung der Funktionalität der Effluxmechanismen wurde ein Rhodamin-Efflux-Assay in Anlehnung an das Protokoll von Webb et al. [1996] durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass ein reziproker Zusammenhang zwischen Rhodamine-Uptake bzw.-Efflux und der Expression von membranständigen Effluxpumpen, insbesondere des P-Glykoproteins P170 besteht [Efferth et al., 1989], so dass es als zusätzlicher *funktioneller* Parameter der



Abbildung 11: Beispiel für eine FACS-Analyse für P-Gp und MRP1

Resistenzbestimmung über Effluxmechanismen dienen kann.

Hierzu wurden wie oben beschrieben Zellen abgelöst, steril filtriert, gezählt und in einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml Zellkulturmedium resuspendiert, die Temperatur wird dabei während der gesamten Präparation und Inkubation auf 37 °C belassen. Nun wurden je 20 µl Zellsuspension in die Röhrchen 1 bis 3 (siehe Abbildung 12) gegeben. In Röhrchen 1 und 2 wurden 3 ml Zellkulturmedium gefüllt, in Röhrchen 3 dagegen wurde Rhodamin-Lösung (150 ng/ml Zellkulturmedium) gegeben und für 30 min im Feuchtinkubator inkubiert. Dann wurde Röhrchen 3 zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen (37 °C), in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert und darauf wieder inkubiert. Nach weiteren 2 h und 30 min wurde Röhrchen 2 einmal zentrifugiert, dekantiert und mit 3 ml Rhodamin-Lösung versetzt. Nach weiteren 30 min wurden alle 3 Röhrchen zweimal mit FACS-Puffer bei 4 °C gewaschen und im FACScan gemessen. Die Ergebnisse lassen sich anschaulich, wie in Abbildung 13 gezeigt, darstellen.

Aus dem Prozentsatz der positiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Rhodamin-Inkubation P_{Rhodamin} und nach Efflux P_{Efflux} wurde die Effluxeffektivität *EE* wie folgt berechnet:

$$EE = 100\% - \frac{P_{\text{Efflux}} \cdot 100\%}{P_{\text{Rhodamin}}}$$
(3)

	1 — r	2	3	
(minibut minibut for the second secon		30' Rhodamin	30' Rhodamin + 3 h Efflux	

Abbildung 12: Mit Hilfe des Rhodamin-Efflux-Assays lässt sich die Funktionalität der membranständigen Effluxpumpen nachweisen. Röhrchen 1 dient der Kontrolle, Röhrchen 2 dient der Bestimmung der Rhodamin-Aufnahme nach 30 min, aus Röhrchen 3 wird die Rhodamin-Konzentration nach 3 h Efflux im Zellkulturmedium bestimmt. Zur Modulation wurden Röhrchen 1 – 3 jeweils mit verschiedenen Verapamil- und Cremophor[®] EL-Konzentrationen kombiniert.





Abbildung 13: Dargestellt sind die Fluoreszenzen vor (Kontrolle), nach 30 min Inkubation mit Rhodamin und nach 3 h Efflux in normalem Medium. Aus den jeweils ermittelten positiven Zellen wurde die Effluxeffektivität berechnet.

Modulation der Effluxmechanismen in der FACS-Analyse

Um zu zeigen, inwieweit die Effluxeffektivität mit Hilfe von Verapamil und Cremophor[®] EL moduliert werden kann, wurde das oben beschriebene Effluxassay mit verschiedenen Konzentrationen Verapamil und Cremophor[®] EL durchgeführt, entsprechend den Konzentrationen aus dem MTT-Assay (siehe oben). Zur einfacheren Erstellung der 12 verschiedenen Lösungen wurden die Rhodamin-Lösung wie auch die Verapamil- und Cremophor[®] EL-Lösungen in der zweifachen End-

konzentration angesetzt und konnten dann leicht kombiniert werden. Vorversuche zum Ausschluss von Wirkungen des verwendeten Lösungsmittels DMSO wurden durchgeführt.

RT-PCR-Analyse

Theoretische Grundlagen

Die Methode der PCR (Polymerase Chain Reaction), von dem amerikanischen Chemiker Kary Mullis erstmals beschrieben, dient dazu, winzige Mengen von Desoxyribonukleinsäure zu vervielfältigen, so dass sie dargestellt oder weiter untersucht werden können. Das Prinzip basiert auf dem physiologischen Vorgang in einer Zelle, die vor einer Zellteilung ihr Erbmaterial verdoppelt. Schlüsselenzym dieses Vorgangs ist die DNA-Polymerase.

Im ersten Schritt werden die DNA-Moleküle bei 94 °C denaturiert, d. h. die WasserstoffSbrücSkenbindung zwischen den Nukleotiden gelöst. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer, die Startstücke für die Vervielfältigung, bei 50 - 65 °C an die DNA an (annealing). Im dritten Schritt bei 72 °C fährt die Polymerase die DNA entlang und synthetisiert dabei aus den zugegebenen Nukleotiden einen komplementären Strang. Dieser Vorgang wird je nach gewünschter Vervielfältigung 20- bis 40mal wiederholt, was automatisiert in einem Thermocycler geschehen kann.

Für die Vervielfältigung unter Laborbedingungen eignet sich besonders die Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, das in den heißen Quellen im amerikanischen Yellowstone Nationalpark beheimatet ist. Vorteil dieser so genannten Taq-Polymerase ist, dass sie hitzestabil ist und nicht nach jeder Denaturierung neu hinzugegeben werden muss. Nach erfolgreicher Vervielfältigung können die gewonnen DNA-Fragmente durch Gel-Elektrophorese dargestellt werden.

Methoden

Tabelle 11: Primer-Auswahl für die RT-PCR-Analyse					
P-Gp	5'-TAC AGT GGA ATT GGT GCT GGG-3'	[Chen et al., 1986]			
	5'-CCC AGT GAA AAA TGT TGC CA-3'				
MRP1	5'-TCT CTC CCG ACA TGA CCG AGG-3'	[Bordow et al., 1994]			
	5'-CCA GGA ATA TGC CCC GAC TTC-3'				
GAPDH	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'	[STRATAGENE,			
	5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	# 302047]			

Die RT-PCR-Analyse ist eine Erweiterung der Polymerase Kettenreaktion (PCR), da die Taq-Polymerase DNA nicht als Matrize verwenden kann. Dazu wird vor der eigentlichen Vervielfältigung eine reverse Transkription (RT) der RNA in cDNA (copy DNA) durchgeführt. Das dazu nötige Enzym, die Reverse Transkriptase, wird aus Retroviren, die RNA als Erbsubstanz besitzen, gewonnen. Zum einen können mit dieser Methode die kodierenden Bereiche selbst größerer Gene in einer Reaktion vervielfältigt werden, da durch diesen Schritt die nicht-kodierenden Introns nicht mitkopiert werden. Zum anderen kann untersucht werden, ob eine Zelle ein bestimmtes Gen auch exprimiert, d. h. in Form von mRNA vorliegen hat.

Die Primer (Tabelle 11) zum Nachweis der Expression von P-Gp und MRP1 wurden so gewählt, dass sie ein Intron, d. h. einen nicht-kodierenden Bereich der DNA, überspannen, so dass die eventuelle Amplifikation von genomischer DNA anhand des längeren Produktes deutlich wird. Zur Überprüfung der korrekten PCR-Reaktion wurde ein Primerpaar zur Amplikation des GAPDH-Gens verwendet, welches für ein Enzym kodiert, das in allen Zellen in nahezu gleich großer Menge exprimiert wird.

Extraktion der RNA

Die für die reverse Transkription benötigte RNA wurde durch Extraktion aus Zellen mit Hilfe des Kits RNeasy(TM) (QIAGEN) gewonnen. Das Protokoll wurde nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt:

- Zellen einer T150-Kulturflasche mit EDTA-Lösung ablösen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen, einmal zentrifugieren (1000 g, 5 min, RT)
- 600 µl Lysis Puffer RLT auf das Zellpellet geben und mit einer 5 ml Spritze ca. 5 min mischen (Homogenisierung)
- Lysat 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren und mit Überstand weiterarbeiten
- 600 µl Ethalol 70 % zu dem Lysat geben und mit einer Pipette mischen
- je 700 µl der Probe auf zwei Spin-Säulen verteilen und 15 sec bei 8000 g zentrifugieren, Sammelgefäß wechseln
- Waschen mit 700 µl Wasch Puffer RW1 (15 sec bei voller Geschwindigkeit), Sammelgefäß wechseln
- Waschen mit 500 µl Wasch Puffer RPE (15 sec bei voller Geschwindigkeit), Sammelgefäß beibehalten
- Waschen mit 500 µl Wasch Puffer RPE (2 min bei voller Geschwindigkeit)
- Spin-Säulen einige Minuten lufttrocknen lassen
- Elution mit 30 50 µl DEPC-behandeltem Wasser, dazu neues Sammelröhrchen benutzen und 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren

Integritätsprüfung der RNA

Die Integrität der RNA wurde überprüft, indem 1 µg RNA auf ein spezielles RNA-Gel (1 g Agarose in 72 ml Wasser, 10 ml 10X MOPS, 18 ml 12,3 M Formaldehyd)

Methoden



Abbildung 14: Integritätsprüfung der RNA durch Auftragung auf ein RNA-Gel. Zu sehen sind Banden, die der 28 S-, 5,8 S- und 5 S-Untereinheit der ribosomalen RNA entsprechen.

aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, so dass die 28S-, 5,8 S- und 5 S-Banden der ribosomalen RNA beurteilt werden konnten (siehe Abbildung 14).

Reverse Transkription

Die Überführung der RNA in amplifizierbare cDNA (d. h. reverse Transkription) wurde mit Hilfe des RT-PCR Kit von der Firma STRATAGENE durchgeführt. Entsprechend der Empfehlung des Herstellers wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

- 5 μg RNA werden mit DEPTC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 38 μl gebracht
- dazu 3 µl Random Primer (100 ng/µl)
- bei 65 °C für 5 min inkubieren und langsam bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Zugabe von 5 μl 10x first strand buffer, 1 μl RNase Block Ribonuklease Inhibitor (40 U/μl), 2 μl 100 mM dNTPs und 1 μl MMLV-RT (50 U/μl)
- bei 90 °C für 5 min inkubieren und anschließend auf Eis stellen

Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion wurde mit Hilfe des DNA Polymerase Kit der Firma BIOMETRA durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- für jede zu untersuchende Zelllinie wurden in einem Cap angesetzt:
 - 34 µl steriles Wasser
 - 1 µl cDNA-Lösung ($\hat{=}$ 100 ng RNA)
 - 1 µl dNTP (10 mM, $\hat{=}$ 200 µM im Reaktionsansatz)
 - je 0,75 µl 5'-Primer und 3'-Primer (200 ng/µl, $\hat{=}$ je 0,5 µM im Reaktionsansatz)
 - 1 µl Taq-Polymerase (2 U/ul)
 - 2,5 µl Formamid ($\hat{=}$ 5 %)
- Thermocycler-Einstellungen:

P-Gp: 1 min bei 94 °C, 1 min bei 56 °C, 1 min bei 72 °C, 30 Zyklen

MRP1: 1 min bei 94 °C, 1 min bei 56 °C, 1 min bei 72 °C, 30 Zyklen

GAPDH: 45 sec bei 94 °C, 45 sec bei 60 °C, 1,5 min bei 72 °C, 35 Zyklen

- Anfertigen eines 2 %igen Agarose Gels
 - ca. 100 ml TBE-Pufferlösung mit 2 % Agarose erhitzen, bis die Agarose vollständig gelöst ist

- Agarose in die Gelkammer gießen und Schlitten einsetzen
- Auftragen von 10 μ l Probe + 3 μ l Laufpuffer
- bei 60 90 mA ca. 2 2,5 h laufen lassen, bis die Laufmittelfront ausreichend weit gelaufen ist
- das Gel ca. 1 h in Ethidiumbromidbad legen (100 μl Ethidiumbromid auf 1,5 l TBE-Puffer)
- unter UV-Licht Beurteilung der Banden

Statistische Auswertung

Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient

Aus einer Reihe von Einzelmesswerten x_i wird das arithmetische Mittel \bar{x} nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \tag{4}$$

Zur Beschreibung des Ausmaßes der Streuung der Messwerte um diesen Mittelwert dient die Standardabweichung *s*.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \tag{5}$$

Der Variationskoeffizient vk, auch als relative Standardabweichung s_{rel} bezeichnet, gibt das Verhältnis von s in Prozent vom Mittelwert \bar{x} an.

$$vk = \frac{s \cdot 100\%}{\bar{x}} \tag{6}$$

Korrelationskoeffizient nach Pearson

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist ein dimensionsloser Index mit Werten zwischen -1 und +1 und liefert ein Maß dafür, inwieweit zwischen zwei Datensätzen eine lineare Abhängigkeit besteht. Er errechnet sich aus:

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2][n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$
(7)

Signifikanztests

Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung

Für viele parametrische Tests sind normalverteilte Variablen erforderlich. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest kann getestet werden, ob eine Reihe von Messwerten normalverteilt ist (SPSS 10.0.7). Wenn man eine Normalverteilung annehmen kann, so kann für die Überprüfung eines signifikanten Zusammenhangs der T-Test herangezogen werden. Bei nicht-normalverteilten Messwerten wird der U-Test verwendet.

T-Test

Der T-Test dient zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Mittelwerte mit gegebenener Standardabweichung sich signifikant unterscheiden. Voraussetzung ist, dass die Messwerte normalverteilt sind. Die Testgröße t errechnet sich nach:

$$t = \frac{|\bar{x_1} - \bar{x_2}|}{s_m} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$
(8)

$$s_m = \sqrt{\frac{\sum (x_{i,1} - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_{i,2} - \bar{x}_1)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$
(9)

U-Test

Anders als beim T-Test wird beim U-Test nicht von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen. Die Prüfgröße u errechnet sich nach:

$$u = \frac{|r_{1.} - r_{2.} - \frac{1}{2}(n_1 - n_2)(n_1 + n_2 + 1)|}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 \cdot \frac{n_1 + n_2 + 1}{3}}}$$
(10)

Dose Modifying Index

Zur Bestimmung des Dose Modifying Index einer bestimmten Konzentration eines Modulators für die Paclitaxelwirkung wurde zunächst für die entsprechenden beiden Wachstumskurven die mittlere letale Dosis (IC₅₀) bestimmt. Die IC₅₀ wurde mittels einer logistischen Regression mit Hilfe der Software SPSS 10.0 ermittelt. Die Prozedur Probit misst die Beziehung zwischen der Stärke eines Stimulus und dem Anteil der Fälle, die eine bestimmte Response auf den Stimulus zeigen. Diese Prozedur ermöglicht es, die Stärke eines Stimulus zu schätzen, der notwendig ist, um einen bestimmten Anteil an Responses zu erzielen, beispielsweise die mittlere effektive Dosis. Am konkreten Beispiel in dieser Arbeit wird die Ansprechrate in Prozent der humanen Nierenkarzinomzelllinien auf Paclitaxel bzw. Taxol[®] auf eine nichtlineare Kurve angepasst, woran sich die Konzentration, bei der 50 % der Zellen gestorben sind, ablesen lässt. Der Dose Modifying Index entspricht nun dem Verhältnis aus IC₅₀ vor und nach der Modulation.

Methoden



Abbildung 15: Am Beispiel von clearCa-2 wird hier gezeigt, wie die Datenwerte aus den MTT-Assays an eine Kurve angeglichen wurden, mit Hilfe derer die IC₅₀ bestimmbar war.

Ergebnisse

Expression und Funktion von P-Glykoprotein (P-Gp) und Multidrug-Resistance-Related-Protein 1 (MRP1)

P-Gp-Expression

In der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass jede der untersuchten Zelllinien mRNA exprimiert, die für das P-Gp kodiert (Abbildung 16). Die Expressionshöhe auf Proteinniveau wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (Tabelle 12). Die Werte für die durch einen P-Gp-spezifischen Antikörper (JSB-1) markierten Zellen reichen von 20 % (clearCa-6) bis 75 % (clearCa-7). Der Mittelwert (mit Standardabweichung) für die klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien lag bei 46,1 \pm 17,3 %, für die chromophilzelligen bei 48,5 \pm 26,1 % und für die beiden chromophobzelligen bei 24 \pm 8,5 %. Als Kontrolle diente eine Zelllinie von einer normalen Niere (47 \pm 10 %). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht signifikant (p > 0,06, U-Test, Abbildung 17).



Abbildung 16: Ergebnisse der PCR für P-Gp (258 bp) und MRP1 (140 bp). Als Kontrolle diente der Nachweis von GAPDH (600 bp). Zu erkennen ist, dass alle untersuchten Zelllinien auf mRNA-Niveau sowohl P-Gp als auch MRP-1 exprimieren.

7.111	IC ₅₀		FACS-Analyse		
Zellinie	Paclitaxel	Taxol®	P-glycoprotein	MRP1	Efflux ^{<i>a</i>}
	(µM)	(µM)	(%)	(%)	(%)
clearCa-2	4,26	1,53	51 ± 5	3 ± 2	94 ± 1
clearCa-3	1,31	0,3	32 ± 5	5 ± 3	49 ± 4
clearCa-6	0,05	0,02	20 ± 8	4 ± 2	12 ± 2
clearCa-7	35,18	1,47	75 ± 9	2 ± 1	93 ± 3
clearCa-9	11,34	1,93	43 ± 7	3 ± 1	89 ± 1
clearCa-11	0,03	0,01	31 ± 9	5 ± 1	23 ± 9
clearCa-12	134,17	4,71	73 ± 4	10 ± 3	73 ± 10
clearCa-15	130,12	2,64	43 ± 1	6 ± 5	5 ± 1
clearCa-19	0,56	0,11	47 ± 9	9 ± 3	58 ± 5
clearCa-28	1,90	0,76	46 ± 5	5 ± 2	77 ± 10
chromphi-1	4,84	0,17	72 ± 9	11 ± 4	87 ± 2
chromphi-2	4,2	0,38	70 ± 14	7 ± 6	88 ± 1
chromphi-3	0,6	0,04	23 ± 6	4 ± 3	24 ± 1
chromphi-4	0,27	0,03	29 ± 4	16 ± 11	31 ± 6
chrompho-A	0,08	0,03	18 ± 2	6 ± 5	11 ± 4
chrompho-B	387,5	126,68	30 ± 3	9 ± 7	16 ± 1
Normale Niere			47 ± 10		77 ± 17
MN ^b Zellen				25 ± 7	

Tabelle 12: Ergebnisse der FACS-Analyse in Zusammenschau mit den IC50-Werten für diePaclitaxel- und Taxol®-Resistenz [Reinecke et al., 1997]

^{*a*}Efflux-Effizienz im Rhodamine-Efflux-Assay

^bMononukleäre Zellen


Abbildung 17: Ergebnisse der FACS-Analyse der P-Gp-Expression. Im Vergleich der verschiedenen Tumortypen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Vergleich der P-Gp-Expression bei Zelllinien unterschiedlicher Passagezahl

Um zu untersuchen, ob sich die P-Gp-Expression bei Zelllinien in hohen Passagezahlen (50 - 70) von denen niedriger Passagezahlen (10 - 20) signifikant unterscheidet, wurden bei vier Linien jeweils eine höhere mit einer niedrigen Passagezahl verglichen. Hierbei konnte kein einheitlicher Trend (weder eine einheitliche Abnahme noch Zunahme) gezeigt werden (U-Test, p > 0,5), auch wenn Änderungen der P-Gp-Expression im Laufe der Passagierungen deutlich zu erkennen waren (Abbildung 18).



Abbildung 18: Vergleich der P-Gp-Expression bei hohen und niedrigen Passagezahlen. Es zeigt sich kein einheitlicher Trend zwischen hoher und niedriger Passagezahl.

MRP1-Expression

Ebenso wie für das P-Gp konnte auch für das MRP1 in der RT-PCR die entsprechende mRNA in allen Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 16). In der FACS-Analyse des entsprechenden Proteins ergaben sich insgesamt geringe Werte zwischen 2 (clearCa-7) und 16 % (chromphi-4) bei einem Vergleichswert von 25 ± 7 % in mononukleären Blutzellen (Tabelle 12). Der Mittelwert für die klarzelligen Nierenzellkarzinomzelllinien betrug $5,2 \pm 2,6$ %, für die chromophilzelligen ergab sich ein Wert von $9,5 \pm 5,2$ % und für die beiden chromophobzelligen ein Wert von $7,5 \pm 2,1$ %. Auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant (U-Test, p > 0,11, siehe Abbildung 19).



Abbildung 19: Ergebnisse der FACS-Analyse der MRP1-Expression. Im Vergleich der verschiedenen Tumortypen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Korrelation zwischen der P-Gp und der MRP1-Expression

Um möglichen Zusammenhang zwischen der P-Gp einen und der MRP1-Expression zu erkennen, wurde eine Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Hierbei ergab sich im Vergleich aller Zelllinien – unabhängig vom Tumortyp – kein signifikanter Zusammenhang (r = 0,066, p = 0,809, siehe Abbildung 20). Über die einzelnen Tumortypen getrennt berechnet, ergab sich für die chromophobzelligen Nierenzellkarzinome ein positiver Zusammenhang (r = 1,0), der jedoch bei nur zwei Zelllinien nicht überbewertet werden darf. Bei den klarzelligen und chromophilzelligen war der Zusammenhang nur gering (r = 0,18 bzw. r = -0,01).



Abbildung 20: Korrelation zwischen der P-Gp und der MRP1-Expression.

 \Box : klarzellige, \odot : chromophilzellige, \bigtriangleup : chromphobzellige Nierenkarzinom-zelllinien

Rhodamin-Efflux-Assay

Im Rhodamin-Efflux-Assay konnte die Effektivität der Effluxmechanismen gezeigt werden. Dabei lagen die Werte für die Effluxeffizienz zwischen 5 % (clearCa-15) und 94 % (clearCa-2). Kurzzeitkulturen von normalem Nierengewebe lieferten einen Wert von 77 ± 17 %. Im Mittel wurde bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomzelllinien ein Wert von 57,3 ± 33,8 %, bei den chromophilzelligen Zelllinien ein Wert von 57,5 ± 34,76 % und bei den beiden chromophobzelligen Zelllinien ein Wert von 13,5 ± 3,5 % gefunden. Es ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (U-Test, p > 0,18, siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Ergebnisse des Rhodamin-Efflux-Assays. Im Vergleich der verschiedenen Tumortypen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Korrelation zwischen der P-Gp-Expression und der Rhodamin-Effluxeffektivität

In Abbildung 22 a) ist grafisch der Zusammenhang zwischen P-Gp-Expression und Effluxeffektivität dargestellt. Es fand sich eine positive Korrelation mit r = 0,803 und p < 0,001.

Korrelation zwischen der MRP1-Expression und der Rhodamin-Effluxeffektivität

Abbildung 22 b) zeigt den Zusammenhang zwischen der MRP1-Expression und der Effluxeffektivität, wobei sich hier jedoch keine signifikante Korrelation ergab (r = -0,141; p = 0,603).







 \Box : klarzellige, \circ : chromophilzellige, \vartriangle : chromphobzellige Nierenkarzinom-zellinien

Zusammenhang der untersuchten Resistenzmechanismen mit der Paclitaxel und der Taxol[®]-Sensitivität

Um nun zu überprüfen, ob mit den oben gezeigten Ergebnissen zur Expression und Funktion von P-Gp sowie MRP1 ein Zusammenhang mit dem Ansprechen der Zelllinien auf Paclitaxel oder Taxol[®] hergestellt werden kann, wurden entsprechende Korrelationenskoeffizienten nach Pearson berechnet. Keine Korrelation fand sich zwischen der MRP1-Expression und der Paclitaxel- oder Taxol[®]-Sensitivität (r = 0,44, p = 0,872 bzw. r = -0,044, p = 0,870, Abbildung 23). Dagegen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der P-Gp-Expression und der Paclitaxel-Sensitivität (r = 0,551, p = 0,027, Abbildung 24) und eine positive Tendenz bei der Korrelation der P-Gp-Expression mit der Taxol[®]-Sensitivität (r = 0,393; p = 0,132, Abbildung 24). Zwischen der Rhodamineffluxeffektivität und der Paclitaxel- oder Taxol[®]-Sensitivität ließ sich keine signifikante Korrelation nachweisen (r = 0,303, p = 0,253 bzw. r = 0,278, p = 0,296, Abbildung 25).



Ergebnisse



 \Box : klarzellige, \circ : chromophilzellige, \vartriangle : chromphobzellige Nierenkarzinomzellinien







 \Box : klarzellige, \circ : chromophilzellige, \vartriangle : chromphobzellige Nierenkarzinom-zellinien



Ergebnisse



 \Box : klarzellige, \circ : chromophilzellige, \vartriangle : chromphobzellige Nierenkarzinomzellinien

Modulation der Rhodamin-Effluxfunktion

Zur Überprüfung einer möglichen Beeinflussung der Rhodamin-Effluxfunktion durch die oben beschriebenen Modulatoren Verapamil und Cremophor® EL wurden Proliferationsversuche zur Messung der Wachstumsinhibition von Paclitaxel und Taxol® in Kombination mit den Modulatoren sowie FACS-Untersuchungen zur Rhodamin-Effluxbestimmung unter Einfluss der Modulatoren durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels T-Test überprüft. Bei den ausgewählten Linien, clearCa-7 sowie chromphi-2, zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit auf Paclitaxel sowohl in Kombination mit Cremophor® EL als auch mit dem Kalziumantagonisten Verapamil (Abbildung 26). Dieser Modulationseffekt war signifikant (p < 0.05) bei niedrigen Paclitaxel-Konzentrationen (0.01 und 0.1 µM) und nicht signifikant (p > 0,05) bei der Konzentration von 1 µM Paclitaxel. Auch in der FACS-Analyse konnte eine signifikante (p < 0,05) Reduktion der Efflux-Funktion sowohl durch Verapamil als auch durch Cremophor® EL festgestellt werden. Vorversuche mit dem hier verwendeten Lösungsmittel DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zeigten weder eine direkte toxische Schädigung noch eine Modulation der Paclitaxelwirkung bzw. Effluxeffektivität.



Abbildung 26: Wachstumsinhibition bei verschiedenen Paclitaxel-Konzentrationen in Kombination mit Verapamil (◊: Kontrolle; ○: 0,1 μM; △: 1 μM; □: 10 μM) oder Cremophor[®] EL (♦: Kontrolle; ●: 0,000075 %; ▲: 0,00075 %; ■: 0,0075 %). Dargestellt ist zudem der Dose Modifying index (DMF). Erkennbar ist, dass sowohl Verapamil als auch Cremophor[®] EL die Wirkung von Paclitaxel verstärken können.



Abbildung 27: Abhängigkeit der Effluxfunktion von verschiedenen Konzentrationen von Verapamil bzw. Cremophor[®] EL. Zu sehen ist eine deutliche Verminderung der Rhodamin-Effluxfunktion als Hinweis auf eine Blockierung des P-Gp sowohl durch Verapamil als auch durch Cremophor[®] EL (*: p < 0,05).</p>

Hintergrund dieser Arbeit ist die weitgehende Resistenz des Nierenzellkarzinoms gegenüber nahezu allen bislang in der Therapie eingesetzten Zytostatika. In klinischen Untersuchungen liegt die Ansprechrate im Mittel nur bei etwa 4 %. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass das humane Nierenzellkarzinom *in vitro* sehr wohl eine deutliche Ansprechrate auf das erst seit einigen Jahren in der Chemotherapie eingesetzte Zytostatikum Paclitaxel (Taxol[®]) zeigte. Jedoch bestand eine Heterogenität der Paclitaxel/Taxol[®]-Sensitivität zwischen den verschiedenen untersuchten Zelllinien [Reinecke et al., 1997], für die eine Reihe von Resistenzmechanismen verantwortlich sein können.

Prinzipiell lassen sich drei Strategien der Zelle unterscheiden, sich gegen Toxine zu wehren.

Erstens kann die Zelle versuchen, die intrazelluläre Konzentration der toxischen Substanz zu verringern. Dazu zählen neben den beiden Transportproteinen P-Gp und MRP1 noch eine Reihe weiterer, teilweise noch wenig untersuchter Transportproteine. Zu nennen sind hier Multidrug-Resistance-Related-Proteine, wie MRP2 (nachgewiesen in verschiedenen cisplatinresistenten humanen Karzinomen

[Taniguchi et al., 1996]), MRP4 (Resistenz gegen nukleosid-basierte Virostatika [Schuetz et al., 1999]), MRP5 (Resistenz gegen Platin-Komplexe wie Cisplatin bei Lungenkrebs [Oguri et al., 2000]) und MRP6 (Anthracyclinresistenz bei einer humanen MDR-Leukämie Zelllinie [Longhurst et al., 1996]). Ein weiteres in diesem Zusammenhang bedeutsames Membranprotein, das den ,ATP-binding cassette proteins' (ABC) zugerechnet wird, ist das erst kürzlich beschriebene ,breast cancer resistance protein'(BRCP), welches in Mitoxantron-selektierten Zelllinien von Mamma-, Magen- und Kolonkarzinomen gefunden wurde [Ross et al., 1999]. Das ebenfalls noch nicht lange bekannte Lung-Resistance-related Protein (LRP) ist ein 110 kD großes Protein und entspricht dem humanen Major-Vault-Protein (MVP). Zusammen mit zwei weiteren hochmolekularen Proteinen sowie einem kurzen RNA-Fragment (vRNA) bildet es die sogenannten Vaults, die erstmals von Kedersha and Rome [1986] beschrieben wurden. Vault-Proteine (= Gewölbeproteine) scheinen eine fundamentale Rolle in verschiedensten Zellprozessen zu spielen. Außerdem konnte ein Zusammenhang der Expression von MVP (LRP) mit einer Resistenz gegen Zytostatika gezeigt werden [Dalton and Scheper, 1999], wobei der Wirkmechanismus noch völlig ungeklärt ist.

Die zweite Strategie einer Zelle, sich gegen Toxine zu wehren, ist die Detoxifizierung durch Metabolisierung. So dienen Glutathion-S-Transferasen, von denen eine Reihe von Untergruppen (α , μ , π und θ) existieren, dazu, die zu eliminierenden Substanzen mit Glutathion zu konjugieren und so leichter metabolisieren oder sezernieren zu können. Von Bedeutung bei der Resistenz gegen Zytostatika scheint vor allem das Muster der Isoformexpression [Salinas and Wong, 1999]. Besonders der Isotyp π konnte bei Ovarialkarzinomen mit einer Resistenz auf Cisplatin, Doxorubicin, Melphalan und Cyclophosphamid in Verbindung gebracht werden [Green et al., 1993]. Die Bedeutung der Glutathion-S-Transferasen im Hinblick auf die Paclitaxel-Resistenz ist jedoch noch nicht völlig geklärt.

Drittens kann eine Zelle versuchen, die Wirkung des Toxins zu verhindern. So kann die Zielstruktur, auf die das Toxin wirkt, verändert sein. Vor allem bei Substanzen, die auf den Tubulinstoffwechsel zielen, wie es bei Paclitaxel (Taxol[®]) der Fall ist, spielt das Muster der Tubulin-Isotypenexpression und das Verhältnis von polymerisiertem Tubulin (Mikrotubuli) zu Tubulindimeren eine Rolle. Beispielsweise konnten Minotti et al. [1991] an Ovarzellen vom chinesischen Hamster zeigen, dass paclitaxelresistente Zellen weniger polymerisiertes Tubulin enthalten. Jaffrezou et al. [1995] konnten zeigen, dass ein Überwiegen von β 5-Tubulin (= Klasse IVa) mit einer Paclitaxelresistenz einhergeht.

Es kommen also mehrere vom Ansatzpunkt völlig verschiedene Mechanismen für die Erklärung der Paclitaxel(Taxol[®])-Resistenz in Frage. In den hier gezeigten Untersuchungen wurde P-Gp und MRP1 ausgewählt. P-Gp ist nachweislich im humanen Nierenzellkarzinom vorhanden [Fojo et al., 1987] und kann Paclitaxel/Taxol[®] als geeignete Substanz transportieren [Chin et al., 1993]. MRP1 wurde ebenfalls im Nierenzellkarzinom beschrieben [Kim et al., 1996], wenn auch die Affinität zu PaclitaxelTaxol[®] geringer zu sein scheint [Cole et al., 1994].

Das Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1 (MRP1) ist ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Transportprotein. Es weist strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zum P-Gp auf, zeichnet sich jedoch durch gewisse Unterschiede im Spektrum der bevorzugt transportierten Substanzen aus. Unter anderem zeigt sich eine geringere Affinität zu Paclitaxel/Taxol[®] [Cole et al., 1994]. MRP1 konnte mittels RT-PCR und FACS-Analyse bei allen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden, wobei sich jedoch im Vergleich zur Kontrolle eine nur

geringe Expression zeigte. Obwohl Kim et al. [1996] auch in Nierenzellkarzinomen eine hohe MRP1-Expression zeigen konnten, wurden in dieser Arbeit jedoch keine Untersuchungen zur Paclitaxel/Taxol[®]-Sensitivität durchgeführt. Darüberhinaus wurde die MRP1-Expression von Kim et al. [1996] nur auf dem Niveau der RNA, nicht aber auf der Protein-Ebene untersucht. In unseren Versuchen konnte kein Zusammenhang zwischen der MRP1-Expression und dem Rhodamin-Efflux gezeigt werden, wobei aufgrund der nur geringen MRP1-Expression in unseren untersuchten Zelllinien der Rhodamin-Efflux insgesamt eher die Funktion des P-Gp widerspiegelt.

In unseren Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression von MRP1 und der Paclitaxel- und Taxol[®]-Sensitivität gezeigt werden. Dies ist im Hinblick auf die niedrige Expression von MRP1 in den hier untersuchten Zelllinien nicht überraschend. Zudem spielt MRP1 auch in der Literatur für die Paclitaxel/Taxol[®]-Sensitivität eher eine untergeordnete Rolle [Cole et al., 1994, Breuninger et al., 1995]. Somit lässt sich anhand der gemessenen MRP1-Expression in den von uns untersuchten Zelllinien keine Vorhersage auf das Ansprechen auf Paclitaxel/Taxol[®] machen.

Das P-Glykoprotein (P-Gp) ist wie MRP1 ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Transportprotein. Die physiologische Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint es den Körper vor hydrophoben, toxischen Substanzen zu schützen. Es wird in verschiedenen Geweben exprimiert, unter anderem auch in den Nieren, dort vor allem in den proximalen Tubuluszellen. P-Gp vermag strukturell völlig unterschiedliche Substanzen aus den Zellen zu transportieren, unter anderem auch Paclitaxel/Taxol[®]. Mittels RT-PCR-Analyse und FACS-Analyse konnte bei allen hier untersuchten Nierenkarzinomzelllinien eine Expression von P-Gp nachge-

wiesen werden, wobei die Höhe der Expression differierte. Jedoch zeigten sich im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rochlitz et al. [1992] keine signifikanten Unterschiede zwischen der Höhe der P-Gp-Expression und dem histologischen Typ des Nierenzellkarzinoms. Im Rhodamin-Efflux-Assay ergab sich in unseren Nierenkarzinomzelllinien eine gute Korrelation zwischen der Höhe der P-Gp-Expression auf Proteinebene und des Rhodamin-Effluxes, was dafür spricht, dass in unseren untersuchten Nierenkarzinomzelllinien der größte Anteil der Effluxleistung durch P-Gp und weniger durch andere Effluxmechanismen wie MRP1 erbracht wird.

Obwohl sich zwischen der P-Gp-Expression und der Taxol[®]-Empfindlichkeit sowie der P-Gp-Expression und dem Rhodamin-Efflux keine signifikante Korrelation ergab, war jedoch ein deutlicher Trend zu erkennen, der auf einen möglichen Zusammenhang hindeutet. Hier scheinen deshalb andere, oben diskutierte Resistenzmechanismen zum Tragen zu kommen, die eine Korrelation erschweren. Man erkennt vor allem anhand der Zelllinien chrompho-B und clearCa-15, dass trotz relativ niedriger P-Gp-Expression eine deutliche Resistenz gegenüber Paclitaxel und Taxol[®] vorhanden sein kann. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Expression von P-Gp signifikant mit der Paclitaxel-Sensitivität – nicht jedoch mit der Taxol[®]-Sensitivität – korreliert. Somit ist P-Gp vermutlich ein wesentlicher Mechanismus für die Paclitaxel-Sensitivität im humanen Nierenzellkarzinom. Diese Beobachtung wird durch die in der Literatur schlechten Erfahrungen in der Therapie des humanen Nierenzellkarzinoms mit Taxol[®] gestützt [Einzig et al., 1991].

Um den oben beschriebenen Zusammenhang zwischen der Expression und Funktion von P-Gp mit der Paclitaxel-Sensitivität zu erhärten, wurden Modulationsversuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit

auf Paclitaxel sowie Taxol® bei entsprechender Erhöhung der Konzentration des Modulators signifikant zunahm. Diese Beobachtung wurde durch die Ergebnisse der FACS-Analyse noch weiter unterstützt, bei denen die gemessene Effluxeffektivität signifikant durch eine Erhöhung der Konzentration der Modulatoren gesteigert werden konnte. Kontrollexperimente mit dem hier verwendeten Lösungsmittel DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zeigten dagegen keine toxischen oder modulatorischen Effekte, was auch den Beobachtungen in der Literatur entspricht [Zhou et al., 1993, Dorr and Liddil, 1991, Fardel et al., 1992]. Für die Modulation wurde zum einen der bereits vielfach beschriebene Kalziumantagonist Verapamil eingesetzt. Zum anderen wurde der Lösungsvermittler Cremophor® EL verwendet, der im Taxol® Verwendung findet und daneben ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Paclitaxel-Resistenz zu haben scheint (siehe Kapitel Grundlagen). Dabei wurden Verapamil- und Cremophor® EL-Konzentrationen verwendet, die für sich genommen keinen zytotoxischen Effekt zeigten. Gerade bei Cremophor® EL sind bei höheren Konzentrationen neben den MDR-modulatorischen auch eigene zytotoxische Effekte beschrieben [Csoka et al., 1997]. Bei den hier verwendeten Konzentrationen hat jedoch der Modulationseffekt den entscheidenen Anteil an der viel höheren Wirksamkeit des Taxol[®] im Vergleich zu Paclitaxel, wie Kontrollexperimente zeigten, in denen Cremophor® EL wie auch Verapamil alleine keine wachstumsinhibierenden Effekte auszulösen vermochten. Ein Vorteil von Cremophor® EL als P-Gp-Modulator ist die Tatsache, dass es weniger von der Proteinkonzentration im Serum des Patienten beeinflusst wird [Schuurhuis et al., 1990]. Untersuchungen von Csoka et al. [1997] machen jedoch auf das Problem aufmerksam, dass in vivo dieser Potenzierungseffekt von Cremophor® EL auf Paclitaxel bei weitem nicht so groß ist (etwa nur ein Fünftel), wie die Untersuchungen in vitro zeigten. Eine Erklärung ist, dass das Verteilungsverhalten von Cremophor® EL im Körper nicht dem von

Paclitaxel entspricht, wodurch Cremophor[®] EL und Paclitaxel nicht im optimalen Konzentrationsverhältnis an die Tumorzelle gelangen. Einen ungewöhnlichen Effekt beschrieb Liebmann et al. [1993]. Er konnte bei höheren Cremophor[®] EL-Konzentrationen einen antagonisierenden Effekt auf die Paclitaxelwirkung zeigen, da Cremophor[®] EL in hoher Konzentration die Zellen in der G1-Phase arretierte und somit die für die Paclitaxelwirkung wichtige Mitose hemmte. Dieser paradoxe Effekt ließ sich auch teilweise an den hier untersuchten Zelllinien [Reinecke et al., 1997] nachweisen. Für die hier gemachte Beobachtung, dass bei höheren Paclitaxelkonzentrationen der Einfluss des Modulators sowohl von Verapamil als auch von Cremophor[®] EL geringer ausgeprägt ist, konnte jedoch in der Literatur keine Entsprechung gefunden werden.

Während es eine Reihe von Berichten über die Möglichkeit der MDR-Modulation *in vitro* gibt, gibt es nur wenige *klinische* Studien über den Einsatz von Modulatoren des P-Gp [Sikic et al., 1997]. Beim Einsatz von MDR-Modulatoren in der Therapie von malignen Tumoren ist zu beachten, dass die Modulatoren selbst eine signifikante Toxizität besitzen können. Desweiteren kann sich durch Hemmung der P-Gp-Funktion in gesundem Gewebe (Niere und Leber) eine erhöhte Toxizität des eingesetzten MDR-abhängigen Zytostatikums ergeben. Dafür spricht ein Bericht von Bertrand et al. [1992], der eine exzessive Vincristin-induzierte Neuropathie beim Einsatz mit dem MDR-Modulator Cyclosporin beschreibt. Ein weiterer Aspekt der MDR-Modulation ist eine mögliche Inhibierung der P-Gp-Expression. So konnten Beketic-Oreskovic et al. [1995] zeigen, dass PSC 833, ein vom Cyclosporin abgeleiteter Modulator, in vitro die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer P-Gp-vermittelten Doxorubicin-Resistenz um den Faktor 6 vermindern konnte.

Eine Erklärung für die in der Literatur insgesamt schlechten Erfahrungen mit der

Modulation von MDR ist eine zu schwache Wirksamkeit der Modulatoren in vivo. Unter kontrollierten in-vitro-Bedingungen sind zwar deutliche Effekte erzielbar, unter den wesentlich komplexeren in-vivo-Bedingungen bei möglicherweise noch weiteren Resistenzmechanismen wird jedoch die gewünschte Wirkung oft nicht mehr erreicht. Wünschenswert wäre deshalb für jeden einzelnen Tumor eine genaue Untersuchung, welche Resistenzmechanismen vorliegen, um diese Mechanismen erfolgreich umgehen zu können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass P-Gp ein Resistenzmechanismus des humanen Nierenzellkarzinoms für Paclitaxel ist. Ziel weiterer Untersuchungen wird sein, zu einem besseren Verständnis aller im Nierenzellkarzinom aktiven Resistenzmechanismen zu kommen. Dies könnte in Zukunft die Chance erhöhen, für Nierenzellkarzinome individuelle Profile der Resistenzmechanismen zu erstellen und daran die Auswahl der Zytostatikakombination zu orientieren.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

BRCP Breast-Cancer-Resistance-Protein
FACScan Fluorescence activated cell scanner
LRP Lung-Cancer-Resistance-Protein
MDR Multidrug Resistance (im Allgemeinen)
MDR1 Multidrug-Resistance-Gen, kodiert für das P-Glykoprotein
MRP1 Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1
MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
P-Gp P-Glykoprotein
RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction
CFTR Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Erklärung

Diese Arbeit habe ich unter der Anleitung von Prof. C. D. Gerharz und Frau Dr. P. Reinecke am Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität verfasst. Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit eigenhändig ohne unerlaubte Hilfe erstellt habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen medizinischen Fakultät eingereicht oder abgelehnt.

Langenfeld,

Anhang

Lebenslauf

Name	Michael Schmitz		
Adresse	Zum Stadtbad 1		
	40764 Langenfeld		
Geburtsdatum	19. Juli 1973		
Geburtsort	Kempen		
Familienstand	ledig		
Schulausbildung	1980 - 1984	Katholische Grundschule Treibstraße, Langenfeld	
	1984 - 1993	Konrad Adenauer Gymnasium, Langenfeld	
	1993	Abitur	
Studium	1993 - 2001 Humanmedizin an der Heinrich-		
	Heine-Universität, Düsseldorf		
	1995	Physikum	
	1996	I. Staatsexamen	
	1999	II. Staatsexamen	
	2001	III. Staatsexamen	
Famulaturen	Pathologie, Innere Medizin, Allgemeinmedizin		
	und Urologie		
Praktisches Jahr	Neurologie (Professor Freund, Heinrich-Heine-		
	Universität, Düsseldorf), Chirurgie (Dr.		
	Polk, University of Louisville, Kentucky)		
	und Innere Medizin (Prof. Grabensee, Heinrich-		
	Heine-Universität, Düsseldorf)		
Fremdsprachkenntnisse	Englisch fließend in Wort und Schrift		

Literaturverzeichnis

- S. Akiyama, M. M. Cornwell, M. Kuwano, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of p-glycoprotein by a vinblastine analog. *Mol Pharmacol*, 33(2):144–7, 1988.
- Anon. Taxol (paclitaxel) for injection concentrate. in advanced ovarian cancer after failure of first-line or subsequent vchemotherapy. *Princeton: Bristol-Myers Squibb Company*, 1993.
- J. Atzpodien, J. Buer, S. Sel, J. Janssen, and K. Oevermann. Chemoimmunotherapy in the systemic treatment of advanced renal carcinoma. *Urologe A*, 38(5):474–8, 1999.
- Bartsch. Das Taxol-Buch. Thieme Verlag, Stuttgart, 2000.
- L. Beketic-Oreskovic, G. E. Duran, G. Chen, C. Dumontet, and B. I. Sikic. Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of mdr1 gene activation by the cyclosporin psc 833. J Natl Cancer Inst, 87(21):1593–602., 1995.
- Y. Bertrand, R. Capdeville, N. Balduck, and N. Philippe. Cyclosporin a used to reverse drug resistance increases vincristine neurotoxicity. *Am J Hematol*, 40(2):158–9., 1992.
- S. B. Bordow, M. Haber, J. Madafiglio, B. Cheung, G. M. Marshall, and M. Norris. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) gene correlates with amplification and overexpression of the n-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res.*, 54(19):5036–40, 1994.
- L. M. Breuninger, S. Paul, K. Gaughan, T. Miki, A. Chan, S. A. Aaronson, and G. D. Kruh. Expression of multidrug resistance-associated protein in nih/3t3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res*, 55(22):5342–7., 1995.

- H. S. Chan, G. DeBoer, G. Haddad, B. L. Gallie, and V. Ling. Multidrug resistance in pediatric malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 9(2):275–318, 1995.
- A. E. Chapman and L. J. Goldstein. Multiple drug resistance: biologic basis and clinical significance in renal-cell carcinoma. *Semin Oncol*, 22(1):17–28, 1995.
- C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (p-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47(3):381–9, 1986.
- K. V. Chin, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res*, 60:157–80, 1993.
- W. H. Chow, J. K. McLaughlin, J. S. Mandel, S. Wacholder, S. Niwa, and Jr. Fraumeni, J. F. Obesity and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5(1):17–21, 1996.
- L. F. Chuang, M. Israel, and R. Y. Chuang. Cremophor el inhibits 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (tpa)- induced protein phosphorylation in human myeloblastic leukemia ml-1 cells. *Anticancer Res*, 11(4):1517–21., 1991.
- S. P. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan, and R. G. Deeley. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258(5088):1650–4, 1992.
- S. P. Cole, K. E. Sparks, K. Fraser, D. W. Loe, C. E. Grant, G. M. Wilson, and R. G. Deeley. Pharmacological characterization of multidrug resistant mrp-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, 54 (22):5902–10, 1994.
- C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, J. Boccia, D. Casals, J. R. Bertino, and M. R. Melamed. Expression of the multidrug resistance gene product (p-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem, 38(9):1277–87, 1990.
- T. Cresteil, B. Monsarrat, P. Alvinerie, J. M. Treluyer, I. Vieira, and M. Wright. Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome p450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res*, 54(2):386–92, 1994.
- K. Csoka, S. Dhar, H. Fridborg, R. Larsson, and P. Nygren. Differential activity of cremophor el and paclitaxel in patients' tumor cells and human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer*, 79(6):1225–33., 1997.

- W. S. Dalton and R. J. Scheper. Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance [editorial; comment]. *J Natl Cancer Inst*, 91(19):1604–5, 1999.
- K. Dano. Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 323(3):466–83, 1973.
- D. de Graaf, R. C. Sharma, E. B. Mechetner, R. T. Schimke, and I. B. Roninson. P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3t6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3):1238–42, 1996.
- J. F. Diaz, R. Strobe, Y. Engelborghs, A. A. Souto, and J. M. Andreu. Molecular recognition of taxol by microtubules: Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J Biol Chem*, 2000.
- R. T. Dorr and J. D. Liddil. Modulation of mitomycin c-induced multidrug resistance in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 27(4):290–4, 1991.
- S. Duensing, I. Dallmann, J. Grosse, J. Buer, E. Lopez Hanninen, M. Deckert, S. Storkel, H. Kirchner, H. Poliwoda, and J. Atzpodien. Immunocytochemical detection of p-glycoprotein: initial expression correlates with survival in renal cell carcinoma patients. *Oncology*, 51(4):309–13, 1994.
- T. Efferth, H. Lohrke, and M. Volm. Reciprocal correlation between expression of p-glycoprotein and accumulation of rhodamine 123 in human tumors. *Anticancer Res*, 9(6):1633–7., 1989.
- R. Eichenauer and H. Vanherpe. Urologie. Klinikleitfaden. Gustav Fischer Verlag, 1996.
- A. I. Einzig, E. Gorowski, J. Sasloff, and P. H. Wiernik. Phase ii trial of taxol in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Invest*, 9(2):133–6, 1991.
- A. I. Einzig, P. H. Wiernik, J. Sasloff, C. D. Runowicz, and G. L. Goldberg. Phase ii study and long-term follow-up of patients treated with taxol for advanced ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 10(11): 1748–53, 1992.
- E. A. Eisenhauer, W. W. ten Bokkel Huinink, K. D. Swenerton, L. Gianni, J. Myles, M. E. van der Burg, I. Kerr, J. B. Vermorken, K. Buser, N. Colombo, and et al. European-canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. J *Clin Oncol*, 12(12):2654–66, 1994.

- O. Fardel, P. Loyer, F. Morel, D. Ratanasavanh, and A. Guillouzo. Modulation of multidrug resistance gene expression in rat hepatocytes maintained under various culture conditions. *Biochem Pharmacol*, 44(11):2259–62., 1992.
- C. G. Fischer. Etiology, pathogenesis and therapy of renal cell carcinoma. Radiologe, 39(5):343–9, 1999.
- G. A. Fisher, B. L. Lum, J. Hausdorff, and B. I. Sikic. Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer*, 32A(6):1082–8., 1996.
- A. T. Fojo, D. W. Shen, L. A. Mickley, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. J Clin Oncol, 5(12):1922–7, 1987.
- C. D. Gerharz, B. Hildebrandt, R. Moll, U. Ramp, M. Sarbia, S. Storkel, P. Koldovsky, and H. E. Gabbert. Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterisation of four permanent cell lines. *Br J Cancer*, 74(10):1605–14, 1996.
- C. D. Gerharz, R. Moll, S. Storkel, U. Ramp, B. Hildebrandt, G. Molsberger, P. Koldovsky, and H. E. Gabbert. Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 146(4):953–62, 1995.
- C. D. Gerharz, R. Moll, S. Storkel, U. Ramp, W. Thoenes, and H. E. Gabbert. Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro. *Am J Pathol*, 142(3):851–9, 1993.
- C. D. Gerharz, U. Ramp, J. Olert, R. Moll, S. Storkel, N. Marx, and H. E. Gabbert. Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows Arch*, 424(4):403–9, 1994.
- I. S. Gill, B. L. McClennan, K. Kerbl, J. M. Carbone, M. Wick, and R. V. Clayman. Adrenal involvement from renal cell carcinoma: predictive value of computerized tomography. *J Urol*, 152(4):1082–5, 1994.
- M. M. Gottesman and I. Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 62:385–427, 1993.
- J. A. Green, L. J. Robertson, and A. H. Clark. Glutathione s-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer*, 68(2):235–9., 1993.

- D. J. Harrison. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours [see comments]. *J Pathol*, 175(1): 7–12, 1995.
- J. T. Hartmann and C. Bokemeyer. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 19(2C): 1541–3, 1999.
- R. E. Hautmann and H. Huland. Urologie. Springer-verlag edition, 1997.
- G. Hofmockel, I. D. Bassukas, A. Wittmann, and J. Dammrich. Is the expression of multidrug resistance gene product a prognostic indicator for the clinical outcome of patients with renal cancer? *Br J Urol*, 80(1):11–7, 1997.
- J. P. Jaffrezou, C. Dumontet, W. B. Derry, G. Duran, G. Chen, E. Tsuchiya, L. Wilson, M. A. Jordan, and B. Sikic. Novel mechanism of resistance to paclitaxel (taxol) in human k562 leukemia cells by combined selection with psc 833. *Oncol Res.*, 7(10-1):517–27, 1995.
- R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, and M. J. Smyth. Multiple physiological functions for multidrug transporter p- glycoprotein? *Trends Biochem Sci*, 25(1):1–6, 2000.
- H. Kanamaru, Y. Kakehi, O. Yoshida, S. Nakanishi, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Mdr1 rna levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J Natl Cancer Inst*, 81(11):844–9, 1989.
- N. Kartner, J. R. Riordan, and V. Ling. Cell surface p-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221(4617):1285–8, 1983.
- N. L. Kedersha and L. H. Rome. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small rna. *J Cell Biol*, 103(3):699–709, 1986.
- W. J. Kim, Y. Kakehi, H. Kinoshita, S. Arao, M. Fukumoto, and O. Yoshida. Expression patterns of multidrug-resistance (mdr1), multidrug resistance-associated protein (mrp),glutathione-stransferase-pi (gst- pi) and dna topoisomerase ii (topo ii) genes in renal cell carcinomas and normal kidney. J Urol, 156(2 Pt 1):506–11, 1996.
- G. Kovacs. The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours. *World J Urol*, 12(2):64–8, 1994.
- I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz, S. P. Cole, R. G. Deeley, and D. Keppler. The mrp gene encodes an atp-dependent export pump for leukotriene c4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem*, 269 (45):27807–10, 1994.

- Jr. Leighton, J. C. and L. J. Goldstein. P-glycoprotein in adult solid tumors. expression and prognostic significance. *Hematol Oncol Clin North Am*, 9(2):251–73, 1995.
- F. Li and D. C. Altieri. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res*, 59(13):3143– 51., 1999.
- J. Liebmann, J. A. Cook, and J. B. Mitchell. Cremophor el, solvent for paclitaxel, and toxicity [letter; comment]. *Lancet*, 342(8884):1428, 1993.
- D. W. Loe, R. G. Deeley, and S. P. Cole. Biology of the multidrug resistance-associated protein, mrp. *Eur J Cancer*, 32A(6):945–57, 1996.
- T. J. Longhurst, G. M. O'Neill, R. M. Harvie, and R. A. Davey. The anthracycline resistance-associated (ara) gene, a novel gene associated with multidrug resistance in a human leukaemia cell line. *Br J Cancer*, 74(9):1331–5, 1996.
- B. L. Lum, G. A. Fisher, N. A. Brophy, A. M. Yahanda, K. M. Adler, S. Kaubisch, J. Halsey, and B. I. Sikic. Clinical trials of modulation of multidrug resistance. pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer*, 72(11 Suppl):3502–14, 1993.
- J. S. Mandel, J. K. McLaughlin, B. Schlehofer, A. Mellemgaard, U. Helmert, P. Lindblad, M. McCredie, and H. O. Adami. International renal-cell cancer study. iv. occupation. *Int J Cancer*, 61(5):601–5, 1995.
- J. J. Manfredi, J. Parness, and S. B. Horwitz. Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol*, 94(3): 688–96, 1982.
- J. P. Marie. P-glycoprotein in adult hematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 9(2): 239–49, 1995.
- R. Mayer, J. Kartenbeck, M. Buchler, G. Jedlitschky, I. Leier, and D. Keppler. Expression of the mrp gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport- deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol*, 131(1):137–50, 1995.
- W. P. McGuire, W. J. Hoskins, M. F. Brady, P. R. Kucera, E. E. Partridge, K. Y. Look, D. L. Clarke-Pearson, and M. Davidson. Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase iii randomized trial in patients with suboptimal stage iii/iv ovarian cancer (from the gynecologic oncology group). *Semin Oncol*, 23(5 Suppl 12):40–7, 1996.

- W. P. McGuire, E. K. Rowinsky, N. B. Rosenshein, F. C. Grumbine, D. S. Ettinger, D. K. Armstrong, and R. C. Donehower. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med*, 111(4):273–9, 1989.
- G. H. Mickisch, J. Kossig, R. K. Tschada, G. Keilhauer, E. Schlick, and P. M. Alken. Circumvention of multidrug resistance mediated by p-170 glycoprotein using calcium antagonists in primary human renal cell carcinoma. *Urol Int*, 47(3):118–25, 1991.
- G. H. Mickisch, K. Roehrich, J. Koessig, S. Forster, R. K. Tschada, and P. M. Alken. Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma [see comments]. J Urol, 144(3):755–9, 1990.
- A. M. Minotti, S. B. Barlow, and F. Cabral. Resistance to antimitotic drugs in chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *J Biol Chem*, 266(6):3987–94., 1991.
- Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Mathods*, 65:55–63, 1983.
- F. K. Mostofi. Histological typing of kidney tumors. In F. K. Mostofi, editor, *International histological classification of tumors*, volume 25. WHO, Geneva, 1981.
- J. E. Muscat, D. Hoffmann, and E. L. Wynder. The epidemiology of renal cell carcinoma. a second look. *Cancer*, 75(10):2552–7, 1995.
- K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and et al. Total synthesis of taxol. *Nature*, 367(6464):630–4, 1994.
- R. Oberneder, M. Kriegmair, M. Staehler, and A. Hofstetter. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. is clinical use justified in view of outcome, side effects and costs? *Urologe A*, 36(2):130–7, 1997.
- T. Oguri, T. Isobe, T. Suzuki, K. Nishio, Y. Fujiwara, O. Katoh, and M. Yamakido. Increased expression of the mrp5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer*, 86(1): 95–100, 2000.
- J. Parness, D. G. Kingston, R. G. Powell, C. Harracksingh, and S. B. Horwitz. Structure-activity study of cytotoxicity and microtubule assembly in vitro by taxol and related taxanes. *Biochem Biophys Res Commun*, 105(3):1082–9, 1982.

- K. V. Rao. Taxol and related taxanes. i. taxanes of taxus brevifolia bark. Pharm Res, 10(4):521-4, 1993.
- B. S. Reichman, A. D. Seidman, J. P. Crown, R. Heelan, T. B. Hakes, D. E. Lebwohl, T. A. Gilewski, A. Surbone, V. Currie, C. A. Hudis, and et al. Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 11(10): 1943–51, 1993.
- P. Reinecke, J. Corvin, H. E. Gabbert, and C. D. Gerharz. Antiproliferative effects of paclitaxel (taxol) on human renal clear cell carcinomas in vitro. *Eur J Cancer*, 33(7):1122–9, 1997.
- P. Reinecke, M. Schmitz, E. M. Schneider, H. E. Gabbert, and C. D. Gerharz. Multidrug resistance phenotype and paclitaxel (taxol) sensitivity in human renal carcinoma cell lines of different histologic types. *Cancer Invest*, 18(7):614–25, 2000.
- C. F. Rochlitz, H. Lobeck, S. Peter, J. Reuter, B. Mohr, E. de Kant, D. Huhn, and R. Herrmann. Multiple drug resistance gene expression in human renal cell cancer is associated with the histologic subtype. *Cancer*, 69(12):2993–8, 1992.
- D. J. Rodi, R. W. Janes, H. J. Sanganee, R. A. Holton, B. A. Wallace, and L. Makowski. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human bcl- 2 as a taxol-binding protein. *J Mol Biol*, 285(1):197–203, 1999.
- P. D. Roepe. What is the precise role of human mdr 1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des*, 6(3):241–60, 2000.
- A. M. Rogan, T. C. Hamilton, R. C. Young, Jr. Klecker, R. W., and R. F. Ozols. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*, 224(4652):994–6, 1984.
- M. F. Rosenberg, R. Callaghan, R. C. Ford, and C. F. Higgins. Structure of the multidrug resistance p-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem*, 272(16):10685–94, 1997.
- D. D. Ross, W. Yang, L. V. Abruzzo, W. S. Dalton, E. Schneider, H. Lage, M. Dietel, L. Greenberger, S. P. Cole, and L. A. Doyle. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger rna expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 91(5):429–33, 1999.
- E. K. Rowinsky, N. Onetto, R. M. Canetta, and S. G. Arbuck. Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol*, 19(6):646–62, 1992.

- A. E. Salinas and M. G. Wong. Glutathione s-transferases–a review. *Curr Med Chem*, 6(4):279–309., 1999.
- G. Sarosy, E. Kohn, D. A. Stone, M. Rothenberg, J. Jacob, D. O. Adamo, F. P. Ognibene, R. E. Cunnion, and E. Reed. Phase i study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 10(7):1165–70, 1992.
- P. B. Schiff, J. Fant, and S. B. Horwitz. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277(5698):665–7, 1979.
- P. B. Schiff and S. B. Horwitz. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(3):1561–5, 1980.
- P. B. Schiff and S. B. Horwitz. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 20(11):3247–52, 1981.
- J. H. Schiller, B. Storer, K. Tutsch, R. Arzoomanian, D. Alberti, C. Feierabend, and D. Spriggs. A phase i trial of 3-hour infusions of paclitaxel (taxol) with or without granulocyte colony-stimulating factor. *Semin Oncol*, 21(5 Suppl 8):9–14, 1994.
- A. H. Schinkel, J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele, and et al. Disruption of the mouse mdr1a p-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77(4):491–502, 1994.
- E. G. Schuetz, A. H. Schinkel, M. V. Relling, and J. D. Schuetz. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome p4503a in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S* A, 93(9):4001–5, 1996.
- J. D. Schuetz, M. C. Connelly, D. Sun, S. G. Paibir, P. M. Flynn, R. V. Srinivas, A. Kumar, and A. Fridland. Mrp4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside- based antiviral drugs. *Nat Med*, 5(9):1048–51, 1999.
- G. J. Schuurhuis, H. J. Broxterman, H. M. Pinedo, T. H. van Heijningen, C. K. van Kalken, J. B. Vermorken, E. C. Spoelstra, and J. Lankelma. The polyoxyethylene castor oil cremophor el modifies multidrug resistance. *Br J Cancer*, 62(4):591–4, 1990.

- B. I. Sikic, G. A. Fisher, B. L. Lum, J. Halsey, L. Beketic-Oreskovic, and G. Chen. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of p- glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40 (Suppl):S13–9., 1997.
- Y. Taguchi, M. Morishima, T. Komano, and K. Ueda. Amino acid substitutions in the first transmembrane domain (tm1) of p- glycoprotein that alter substrate specificity. *FEBS Lett*, 413(1):142–6, 1997.
- K. Taniguchi, M. Wada, K. Kohno, T. Nakamura, T. Kawabe, M. Kawakami, K. Kagotani, K. Okumura, S. Akiyama, and M. Kuwano. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cmoat) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*, 56(18):4124–9., 1996.
- F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product p- glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7735–8, 1987.
- W. Thoenes, S. Störkel, and H.J. Rumpelt. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol. Res. Pract.*, 181:125–143, 1986.
- K. Toth, M. M. Vaughan, H. K. Slocum, M. A. Arredondo, H. Takita, R. M. Baker, and Y. Rustum. New immunohistochemical sandwich staining method for mdr1 p-glycoprotein detection with jsb-1 monoclonal antibody in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues. *Am J Pathol.*, 144(2): 227–36, 1994.
- K. Ueda, C. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan. Expression of a full-length cdna for the human "mdr1"gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(9):3004–8, 1987.
- E. van den Berg, A. H. van der Hout, J. W. Oosterhuis, S. Störkel, T. Dijkhuizen, A. Dam, H. M. M. Zweers, H. J. A. Mensink, C. H. C. M. Buys, and B. de Jong. Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. *Int. J. Cancer*, 55:223–227, 1993.
- M. Webb, C. L. Raphael, H. Asbahr, W. N. Erber, and B. Meyer. The detection of rhodamine 123 efflux at low levels of drug resistance. *Br J Haematol.*, 93(3):650–5, 1996.

- R. S. Weinstein, S. M. Jakate, J. M. Dominguez, M. D. Lebovitz, G. K. Koukoulis, J. R. Kuszak, L. F. Klusens, T. M. Grogan, T. J. Saclarides, I. B. Roninson, and et al. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (p-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res*, 51(10):2720–6, 1991.
- P. H. Wiernik, E. L. Schwartz, A. Einzig, J. J. Strauman, R. B. Lipton, and J. P. Dutcher. Phase i trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 5(8):1232–9, 1987.
- L. R. Wiseman and C. M. Spencer. Paclitaxel. an update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers. *Drugs Aging*, 12(4):305–34, 1998.
- Ch. Wittekind and R. Wagner. Tnm klassifikation maligner tumoren. pages 171–3. Springer, 5. auflage edition, 1997.
- D. C. Zhou, J. P. Marie, L. Maisonneuve, A. M. Faussat-Suberville, and R. Zittoun. Effect of differentiating agents on modulation of mdr1 gene expression in multidrug-resistant hematopoietic hl60/dnr cell line. *Exp Hematol*, 21(6):779–84., 1993.
Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Expression von Multidrug-Resistance-Protein (P-Glykoprotein P-170) und Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1) mittels FACS-Analyse und RT-PCR bei Nierenkarzinomzellinien unterschiedlichen histologischen Typs. Außerdem wurde die Funktionalität des P-Glykoprotein-Systems mittels des Rhodamin-Efflux-Assays in der FACS-Analyse überprüft. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Ansprechen auf Paclitaxel/Taxol® und der Expression und Funktion von P-Gp bzw. MRP1 wurden Modulationsversuche sowohl im Proliferationsassay (MTT-Assay) als auch in der FACS-Analyse durchgeführt. Die MRP1-Expression war gering und zeigte keine Korrelation mit der Paclitaxel/Taxol®-Sensitivität. Dagegen zeigte die Expression von P-Gp eine positive Korrelation mit der Paclitaxel/Taxol®-Sensitivität, die allerdings nur für Paclitaxel statistisch signifikant war. In den Modulationsversuchen konnte eine signifikante Beeinflussung sowohl der Paclitaxel- bzw. Taxol®-Sensitivität als auch der Rhodamin-Effluxeffektivität mit Hilfe der Multidrug-Modulatoren Verapamil und Cremophor® EL erzielt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die P-Gp-Expression von Nierenzellkarzinomen ursächlich an der Paclitaxel/Taxol[®]-Sensitivität beteiligt ist, dass offensichtlich aber auch noch andere Resistenzmechanismen eine Rolle spielen. Somit sind noch weitere Untersuchungen an den vorhandenen Zelllinien nötig, um andere, zusätzlich wirksame Zytostatika-Resistenzmechanismen des Nierenzellkarzinoms zu identifizieren.

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Professor Claus Dieter Gerharz und bei meiner Betreuerin Frau Dr. Petra Reinecke besonders herzlich für die ausgesprochen gute Betreuung und Hilfe bedanken. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors und des Zellkulturlabors des Pathologischen Instituts, insbesondere Frau Anja Florange-Heinrichs, sowie des Immunologischen Labors des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, dort insbesondere Frau Professor Dr. Marion Schneider, Frau Dr. Harms und Frau Dr. Lorenz bedanken, die mich in die Methoden eingearbeitet haben und mir bei Fragen immer zur Seite standen. Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Freundin Justine für die große Unterstützung und das Verständnis danken.