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

<i>In vitro-Untersuchungen zur Paclitaxel-Resistenz des Nierenzellkarzinoms</i>

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

**vorgelegt von
Michael Steckstor
2004**

**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. med. Dr. Gerharz

Korreferant: Prof. Dr. med. Vögeli

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>4</u>
1.1	Multidrug-resistance im Nierenzellkarzinom	4
1.2	Paclitaxel-assoziierte Resistenzmechanismen.....	5
1.3	Aufbau und Funktion der Resistenzgene P-gp, MRP und LRP	6
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
1.5	Graphische Übersicht: Resistenzmechanismen	9
<u>2</u>	<u>Materialien.....</u>	<u>10</u>
2.1	Chemikalien	10
2.2	Zellkulturmedien, -zusätze und -lösungen	10
2.3	Puffer und Lösungen	11
2.4	Zytostatika und Modulatoren	13
2.5	Antikörper	14
2.6	Kits	14
2.7	Oligonucleotide	15
<u>3</u>	<u>Methoden</u>	<u>16</u>
3.1	Kultivierung der Nierenkarzinomzelllinien	16
3.1.1	<i>Klassifikation der verwendeten Kulturen.....</i>	<i>16</i>
3.1.2	<i>Wachstumbedingungen und Nährmedien</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>Passagierung der Zellkulturen</i>	<i>17</i>
3.1.4	<i>Zellzahlbestimmung</i>	<i>17</i>
3.1.5	<i>Etablierung der Paclitaxel-resistenten Zelllinie clearCa-21_{res}.....</i>	<i>18</i>
3.2	MTT- Cytotoxizitätstest.....	19
3.3	Durchflußzytometrie	22
3.3.1	<i>Analyse der Proteinexpression der Resistenzgene.....</i>	<i>22</i>
3.3.2	<i>Messung am Durchflußzytometer und Versuchsauswertung.....</i>	<i>23</i>
3.3.3	<i>P-gp- und MRP-Funktionsanalysen</i>	<i>24</i>
3.3.4	<i>Modulationsversuche.....</i>	<i>26</i>
3.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	26
3.4.1	<i>Präparatherstellung.....</i>	<i>26</i>
3.4.2	<i>Immunfluoreszenzreaktion</i>	<i>27</i>

3.5	RT-PCR Evaluation der mRNA-Expression.....	27
3.5.1	<i>mRNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....</i>	27
3.5.2	<i>cDNA-Synthese.....</i>	28
3.5.3	<i>PCR-Reaktion</i>	28
3.5.4	<i>Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte</i>	29
3.5.5	<i>Sequenzierung der PCR-Produkte.....</i>	31
3.6	Northern Blot	31
3.6.1	<i>RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot</i>	31
3.6.2	<i>Sondenherstellung und Markierung</i>	32
3.6.3	<i>Hybridisierungsreaktion und Autoradiographie.....</i>	32
3.7	Western Blot Tubulin-Expressionsstudien	33
3.7.1	<i>Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung.....</i>	33
3.7.2	<i>PAGE-Gelelektrophorese.....</i>	34
3.7.3	<i>Proteintransfer und Poncea-red-S-Färbung</i>	35
3.7.4	<i>Immunoblotting.....</i>	35
3.8	Statistik	37
4	<u>Ergebnisse</u>	<u>38</u>
4.1	Verhalten von P-gp, LRP und MRP bei intrinsischer Resistenz.....	38
4.1.1	<i>RT-PCR Analyse der LRP mRNA-Expression.....</i>	38
4.1.2	<i>Proteinexpression und Funktionalität von P-gp, LRP und MRP.....</i>	38
4.1.3	<i>Modulationsversuche.....</i>	42
4.1.4	<i>Kreuzresistenz Analysen zur intrinsischen Resistenz</i>	42
4.1.5	<i>Expressionsanalysen nach 120 h-Paclitaxel-Exposition.....</i>	44
4.1.6	<i>Rh-123- und Calcein-Efflux nach 120 h-Paclitaxel-Exposition.....</i>	46
4.2	Untersuchung von P-gp, LRP und MRP bei erworbene Resistenz	48
4.2.1	<i>Kreuzresistenzanalysen bei erworbener Paclitaxel-Resistenz</i>	48
4.2.2	<i>RT-PCR Analyse der mRNA für P-gp, LRP, MRP.....</i>	49
4.2.3	<i>Northern Blot-Analyse der quantitativen mRNA- Expression für P-gp.....</i>	49
4.2.4	<i>FACS-Analysen zur Proteinexpression von P-gp, LRP, MRP</i>	50
4.2.5	<i>Rhodamin- und Calcein-Efflux-Assays für P-gp und MRP</i>	50
4.2.6	<i>Modulationsversuche.....</i>	51
4.3	Tubulin-Expression bei intrinsischer und erworbener Paclitaxel- Resistenz.....	52
4.3.1	<i>RT-PCR Analysen der mRNA-Expression der Tubuline</i>	52
4.3.2	<i>Western Blot-Analysen von α-, β-, γ-Tubulin bei intrinsischer Resistenz.....</i>	55
4.3.3	<i>Western Blot-Analysen der β-Isotypen</i>	57
4.3.4	<i>RT-PCR-Analysen der β-Tubulin Isotypen bei erworbener Resistenz</i>	59
4.3.5	<i>Western Blot-Analysen der Tubuline bei erworbener Resistenz.....</i>	60

4.4	Immunfluoreszenz (IF)-Mikroskopie der Tubuline.....	63
<u>5</u>	<u>Diskussion</u>	<u>66</u>
5.1	Bedeutung von P-gp, LRP und MRP bei intrinsischer Resistenz	66
5.2	Bedeutung der Tubuline und Ihrer Isotypen für die intrinsische Resistenz	73
5.3	Resistenzmechanismen bei erworbener Paclitaxel-Resistenz.....	76
5.4	γ-Tubulin-Expression und Beziehung zur Paclitaxel-Resistenz.....	80
5.5	Ausblick	81
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>83</u>
<u>7</u>	<u>Danksagung</u>	<u>94</u>
<u>8</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>95</u>
<u>9</u>	<u>Zusammenfassung.....</u>	<u>96</u>

1 Einleitung

1.1 Multidrug-resistance im Nierenzellkarzinom

Nierenzellkarzinome sind maligne Tumoren des Tubulusepithels und stellen etwa 3% aller bösartigen Neoplasien. Histologisch werden sie in klarzellige (ca. 75% Anteil), chromophile (10%), chromophobe (5%) und einige seltene Subtypen eingeteilt. (Dörsam *et* Staehler 2001). Männer sind mit einer Inzidenz von etwa $12:10^5$ gegenüber Frauen ($6:10^5$) häufiger betroffen. In den letzten Jahren nimmt die Häufigkeit des Nierenzellkarzinom weltweit zu. In den USA ist seit 1973 eine Erhöhung der Inzidenz um 43% beschrieben (Motzer *et al.* 1996). Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnose beträgt 65 Jahren. In 20-30% der Fälle sind Fernmetastasen bei Entdeckung vorhanden. In 50-60% der Fälle entwickeln sie sich während der Therapie. Die Prognose ist stadienabhängig und mit Ausnahme des lokalisierten Stadiums ungünstig. Bei Metastasierung beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 20%. Bei Fernmetastasen liegt die Lebenserwartung unter 12 Monaten. Die Mortalität des Nierenzellkarzinoms wird mit $7,5:10^5$ für Männer und $4:10^5$ für Frauen angegeben. Nikotinabusus, Adipositas, Hypertonus, Thiaziddiuretika-Therapie und langjährige Phenacetin-Einnahme sind als Risikofaktoren einzustufen (Vogelzang *et* Stadler 1998, Dóhte *et al.* 2000).

Das Nierenzellkarzinom gilt als einer der Chemotherapie-resistentesten Tumoren mit Ansprechraten auf Zytostatika zwischen 5-15% (Yagoda *et al.* 1995, Chapman *et* Goldstein 1995). Verantwortlich dafür sind die *intrinsische* und *akquirierte Multi-Drug-Resistance (MDR)*. Diese geht mit einer Kreuzresistenz gegenüber einer großen Anzahl strukturell und funktionell verschiedener Zytostatika, wie z.B. Vincristin, Vinblastin, Doxorubicin, Mitoxantron, Etoposid, Topotecan und Paclitaxel einher. Die intrinsische MDR besteht von Beginn an, die akquirierte MDR entwickelt sich unter der Zytostatikatherapie bei initial erfolgreichem Ansprechen auf Zytostatika (Fojo *et al.* 1987, Chapman *et* Goldstein 1995, Naito *et al.* 1999). Das Nierenzellkarzinom gilt als Tumor mit intrinsischer MDR, jedoch kann hier auch die erworbene Resistenz eine Rolle spielen (Chapman *et* Goldstein 1995, Naito *et al.* 1999).

Hauptverantwortlich für den MDR-Phänotyp im Nierenzellkarzinom ist das *P-170-Glycoprotein (P-gp)*, eine Efflux-Pumpe aus der Gruppe der *ATP-binding cassette-Transporter*. P-gp ist in der Lage, Xenobiotika wie z.B. Paclitaxel, Vincristin oder Doxorubicin aus der Zelle zu befördern (Fojo *et al.* 1987, Chapman *et* Goldstein 1995, Dumontet *et* Sikic 1999, Naito *et al.* 1999, Reinecke *et al.* 2000). Das Nieren-

gewebe weist als Ausscheidungsorgan physiologisch einen hohen P-gp Gehalt auf. Tumoren solcher Ursprungsorgane nutzen diesen Mechanismus als Schutzfaktor gegenüber toxischen Zytostatika (Chapman *et al.* Goldstein 1995).

Verschiedene andere Resistenzmechanismen, z.B. ein erhöhter Gehalt weiterer Transportermoleküle wie *MRP* (*Multidrug –Resistance-Associated-Protein*), *cMOAT* *MRP2* (*Multispecific-Organic-Anion-Transporter*), *TAP* (*Transporter-of-Anorganic-Protein*), *MXR/BRCP* (*Breast Cancer-Resistance-Protein*) oder *LRP* (*Lung-Resistance-related-Protein*), ein veränderter Glutathionstoffwechsel mit erhöhtem Glutathion und GST- π sowie Topoisomerase-II sind ebenfalls mit dem MDR-Phänomen assoziiert (List *et al.* 1997, Hipfner *et al.* 1999, Naito *et al.* 1999). Die Expression einiger dieser Gene ist auch im Nierenzellkarzinom nachgewiesen und möglicherweise am MDR-Phänotyp mitbeteiligt (Volm *et al.* 1992, Kim *et al.* 1996, Naito *et al.* 1999).

1.2 Paclitaxel-assoziierte Resistenzmechanismen

Trotz hoher Chemotherapieresistenz zeigen Nierenzellkarzinome *in vitro* ein heterogenes Ansprechen auf das Zytostatikum Paclitaxel (Taxol®) (Reinecke *et al.* 1997). Paclitaxel ist ein Naturprodukt der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* und gehört zur Gruppe der *Taxane*. Es besitzt eine breite zytostatische Aktivität gegenüber ansonsten Therapie-refraktären soliden und nicht-soliden Neoplasien. Innerhalb klinischer Studien ist eine gute Aktivität gegenüber Ovarial-, Mamma-, und Bronchialkarzinomen, sowie Kopf-Hals-Tumoren bewiesen (Rowinski *et al.* Donehower 1995). Es greift am Mikrotubuli-System der Zellen an und bindet dort bevorzugt an β -Tubulin. Dadurch erfolgt eine kinetische Stabilisierung der Mikrotubuli gegenüber Depolymerisation und Förderung ihrer Polymerisation. Hierdurch wird die dynamische Instabilität der Mikrotubuli („*treadmilling*“) unterdrückt. Mitose, Zellzyklus, intrazellulärer Transport und Zellform werden so beeinträchtigt (Rowinski *et al.* Donehower 1995, Dumontet *et al.* Sikic 1999). Eine Bündelung der Interphasen-Mikrotubuli kann lichtmikroskopisch beobachtet werden (Reinecke *et al.* 1997). Klinisch relevante Plasmaspiegel liegen zwischen 0,005 μ M und 3 μ M. In diesem Bereich kommt es zu Mitose-Arrest und Zelltod (Blagoskonny *et al.* Fojo 1999).

Als wichtigster Mechanismus der erworbenen und intrinsischen Paclitaxel-Resistenz gilt die Überexpression von P-Glycoprotein. Als lipophiles Molekül ist Paclitaxel ein

bevorzugtes Substrat dieser Efflux-Pumpe (Rowinski *et* Donehower 1995, Dumontet *et* Sikic 1999). Ein weiterer gut charakterisierter Resistenzmechanismus besteht in einer veränderten β -Tubulin-Isotypen-Konstellation in der Zelle. In Säugetierzellen liegt β -Tubulin in Form von 6 Isotypen (β_I , β_{II} , β_{III} , β_{IVa} , β_{IVb} , β_V) vor (Sullivan *et* Cleveland 1986), die *in vitro* ein etwas anderes dynamisches Verhalten aufweisen (Derry *et al.* 1997). Die β -Tubulin-Isotypen werden teils konstitutiv (z. B. β_I in vielen Geweben und Blutzellen), teils gewebespezifisch (z. B. β_{III} in Neuronen) exprimiert. Insbesondere ein erhöhter β_{III} - und β_{IVa} - Isotypen-Gehalt scheint ein vermindertes Ansprechen auf Paclitaxel zu begünstigen, wobei die meisten Studien die erworbene *in vitro*-Resistenz behandeln (Burkhart *et al.* 2000). Humane Prostatakarzinom- und Ovarkarzinomzelllinien sind in diesem Zusammenhang gut untersucht. Ein erhöhter Gehalt an β_{III} -Tubulin führt in diesen Zelllinien zur Paclitaxel-Resistenz (Ranaganathan *et al.* 1996, Kavallaris *et al.* 1997).

1.3 Aufbau und Funktion der Resistenzgene P-gp, MRP und LRP

P-gp gehört zur Familie der „ATP-binding cassette“ Transporter und ist eine 170 kDa große, Energie-abhängige und Membran-gebundene Efflux-Pumpe (Gros *et al.* 1986). Resistente Zelllinien, die P-gp exprimieren, reichern intrazellulär weniger toxische Produkte an, da P-gp unter ATP-Verbrauch eine breite Palette an hydrophoben Substanzen aus der Zelle transportiert. P-gp wird vom humanen MDR1-Gen codiert. Es ist ein Glycoprotein, aufgebaut aus 12 transmembranösen Domänen und zwei ATPase-Untereinheiten. Das primäre mRNA-Transkript des MDR1-Gens ist 4,5 kb groß. Sowohl Promotorregion als auch genomische Organisation sind gut untersucht (Chen *et al.* 1990). Ein hoher P-gp-Gehalt findet sich in den Ausscheidungsorganen Leber, Niere, Jejunum und Colon, dem Pankreas und der Nebenniere. Auch Tumorgewebe dieser Organe zeigt in der Regel einen hohen P-gp-Gehalt. Geringe Mengen an P-gp finden sich meist in Tumoren, die primär sensitiv auf Chemotherapeutika reagieren (z. B. Mammakarzinom, ALL). Eine erhöhte P-gp-Expression findet man in diesen Tumoren häufig nach Behandlung mit MDR-assoziierten Zytostatika. Die physiologische Bedeutung von P-gp ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. P-gp ist an der luminalen oder apikalen Seite der Zellmembran lokalisiert. Im Gastrointestinaltrakt vermag P-gp die Aufnahme von

Xenobiotika und die Ausscheidung durch die Mukosa zu regulieren, in Leber und Nieren die Exkretion von Substanzen in Galle und Urin. Außerdem scheint P-gp an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Pazenta-Schranke beteiligt zu sein (Fojo *et al.* 1987).

1992 wurde in Doxorubicin-selektierten Bronchialkarzinomzelllinien ein nicht-P-gp vermittelter Resistenzmechanismus (MRP1) entdeckt. MRP1 wurde später auch in verschiedenen Zytostatika-resistenten Zelllinien ohne erhöhten P-gp-Gehalt nachgewiesen (Cole *et al.* 1992). Genauso wie P-gp gehört MRP1 zur Gruppe der *ATP-binding cassette*-Transporter, weist allerdings nur eine Homologie von 15% zu P-gp auf. MRP1 befördert als Membran-gebundene Efflux-Pumpe verschiedene Xenobiotika, wie z. B. Doxorubicin, Etoposid oder Vincristin aus der Zelle heraus. Im Gegensatz zu P-gp scheint MRP1 eine Rolle im Transport von Glutathion-konjugierten Substraten zuzukommen und es wird meist an der basolateralen Seite der Epithelien exprimiert (Grant *et al.* 1994). Die Expression von MRP1 ist in einer ganzen Reihe von Tumorgeweben beschrieben worden. Dazu gehören u. a. Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Urothels, Ovarialkarzinomen, Prostata und AML. Der höchste Gehalt ist in Bronchialkarziomen zu finden. Normalgewebe mit hohem MRP1-Gehalt sind Lunge, Testis und periphere mononukleäre Blutzellen (Hipfner *et al.* 1999).

1999 wurde ein weiterer nicht-P-gp assoziierter Resistenzmechanismus entdeckt und als LRP bezeichnet (Scheper *et al.* 1993). Das 110 kD Protein LRP entspricht dem *Human Major Vault Protein* (MVP) (Scheffer *et al.* 1995). Vaults sind große, ovale, zytoplasmatische Ribonucleoproteinpartikel, die evolutionär hoch-konserviert sind. Sie bestehen aus drei Proteinen, dem 110 kD LRP/MVP und den beiden *Minor Vault* Proteinen p240 und p193, sowie einer kleinen, untranslatierten vRNA. Der größte Anteil der Vaults ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, kleiner Anteile auch in der Nähe der Kernmembran (Schefer *et al.* 2000). Gewebe mit hoher chronischer Xenobiotika-Exposition, wie Bronchusepithel, Intestinum, Niere, Keratinozyten und Makrophagen besitzen einen hohen LRP-Gehalt. In Tumorgeweben ist eine hohe Expression in Nieren-, Colon- und Pankreaskarzinomen sowie AML beschrieben worden (Izquierdo *et al.* 1999). Aufgrund von Lokalisation, Aufbau und Gewebeverteilung des LRP-Proteins wird die Hypothese vertreten, daß Vaults eine entscheidene Rolle im nucleo-zytoplasmatischen Transport und Umverteilung von

Xenobiotika in der Zelle zukommt. Die genauere physiologische Bedeutung der Vaults ist allerdings bis jetzt ungeklärt (Schefer *et al.* 2000).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zwar ist in den meisten Nierenkarzinomzelllinien die Paclitaxel-Resistenz gut mit der P-gp-Expression zu erklären, doch existieren auch resistente Zelllinien ohne klassischen MDR-Phänotyp. In diesen liegt trotz hoher Paclitaxel-Resistenz ein niedriger P-gp Gehalt mit einer geringen funktionellen Aktivität vor. In wieweit hier alternative Resistenzmechanismen, wie MRP oder LRP für das Ansprechen auf Paclitaxel relevant sind, ist unklar. Für LRP existieren keine Expressionsstudien in einer größeren Anzahl von Nierenzellkarzinomen. Untersuchungen der verschiedenen β -Tubulin-Isotypen in Nierenzellkarzinomen und Beziehungen zur Paclitaxel-Sensitivität existieren nicht. Auch ist weitgehend unbekannt, ob die Überexpression von Tubulin-Isotypen auch für den Typ der intrinsischen Resistenz von Bedeutung ist, da die meisten Studien Paclitaxel-selektierte Subklone (Modell der akquirierten Resistenz) verwenden. Hinweise sind vorhanden, dass sich die Mechanismen der intrinsischen und erworbenen MDR im Nierenzellkarzinom unterscheiden können (Yu *et al.* 1998, 2000). Umfangreiche Studien fehlen hier, da das Nierenzellkarzinom zumeist im Zusammenhang der intrinsischen Resistenz analysiert wird. Schließlich ist für das Nierenzellkarzinom und für Paclitaxel unbekannt, ob eine Beeinflussung der Resistenzmechanismen, wie P-gp oder β -Tubulin-Isotypen durch Paclitaxel selbst hervorgerufen werden kann. Bekannt ist, dass Zytostatika den MDR (P-gp)-Promotor aktivieren und zur Expressionssteigerung von P-gp auf mRNA-Ebene führen können (Kohon *et al.* 1989). Nierenzellkarzinome reagieren *in vitro* z.B. auf Hitzeschock mit Steigerung der MDR-Promotor Aktivität und Expressionszunahme von P-gp-mRNA (Chin *et al.* 1990).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuerst die Expression und Funktion von P-gp, LRP und MRP in 16 Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher histologischer Subtypisierung und unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität untersucht. Danach erfolgte die Analyse der Expression dieser Proteine in 13 Linien nach 120 h Paclitaxel-Kurzzeit-Exposition. Die Tubulin-Isotypenexpression auf mRNA- und Proteinebene wurde in 9 Linien unterschiedlicher Paclitaxel-Resistenz untersucht.

Die beiden Tumorzelllinien *clearCa-15* und *chrompho-B*, die sich durch eine hohe Paclitaxel-Resistenz trotz niedriger P-gp-Expression und -Funktion auszeichneten, wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Für das Modell der erworbenen Paclitaxel-Resistenz diente die in der Langzeitkultur mit Paclitaxel selektierte Zelllinie *clearCa-21_{res}*, deren Resistenzmechanismen im Vergleich zur Ausgangszelllinie *clearCa-21_{sens}* untersucht wurden.

1.5 Graphische Übersicht: Resistenzmechanismen

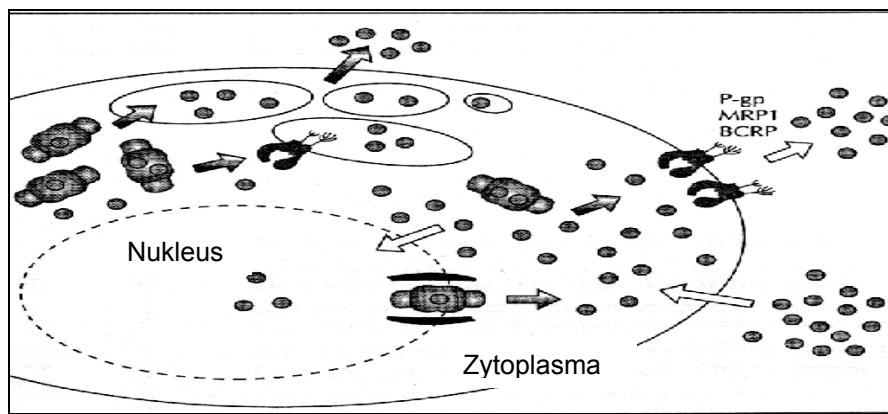


Abbildung 1: Hypothetischer Zytostatika Transport (Scheffer et al. 2000)

Lokalisation und Funktion von *Vaults* (LRP), *P-gp* und *MRP1*. In die Zelle eindringende Zytostatika werden bei Erreichen des Nukleus durch *Vaults* kompartimentiert, in das Zytoplasma transportiert und durch die membrangebundenen *ABC-Transporter-Proteine* *P-gp* oder *MRP1* aus der Zelle geschleust. So entsteht Zusammenarbeit zwischen LRP und den Membranpumpen (Abbildung modifiziert nach Scheffer et al. 2000).

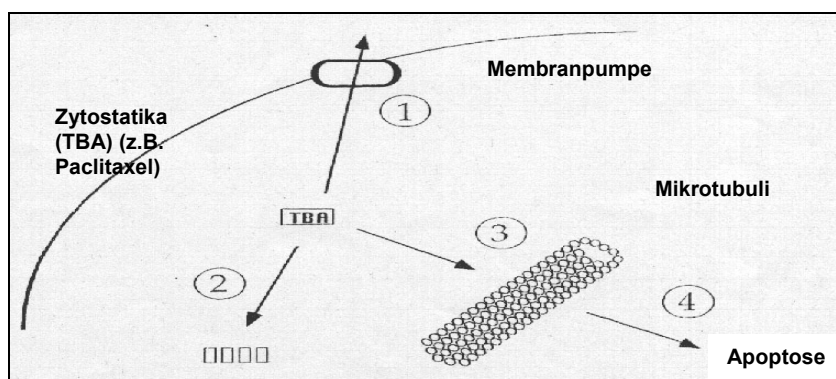


Abbildung 2: Potentielle Resistenzmechanismen gegenüber Antimikrotubuli-Zytostatika (TBA) (Dumontet et Sikic 1999)

1. Membranpumpen Efflux (P-gp, MRP1)
2. Veränderte Zytostatika-Verteilung (LRP)
3. Veränderte Interaktion mit Mikrotubuli (β-Tubulin Isotypen Veränderung)
4. Inadäquate Induktion apoptotischer Signale (p53) (Abbildung modifiziert nach Dumont et Sikic 1999)

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merk (Darmstadt, BRD), Carl Roth (Karlsruhe, BRD) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, BRD) bezogen.

2.2 Zellkulturmedien, -zusätze und -lösungen

Die Zellkulturmedien und ihre Zusätze wurden von den Firmen GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein, BRD), Seromed Biochrom KG (Berlin, BRD) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, BRD) bezogen.

➤ **Medium**

- DMEM
- 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS)
- 2 mM L-Glutamin
- 20 mg/ml L-Arginin
- 0,72 mg/ml L-Asparagin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

➤ **PBS** (w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Natriumbicarbonat)

➤ **Trypanblau** (Arbeitslösung)

- 0,2 % (w/v) Trypanblau ad PBS

➤ **Trypsin/EDTA-Lösung**

- 0,25% (w/v) Trypsin
- 0,05 (w/v) EDTA, ad PBS

➤ **EDTA-Lösung**

- 0,05% EDTA (w/v), ad PBS

➤ **Kryokonservierungs-Lösung**

- 20% (v/v) FCS
- 10% (v/v) DMSO, ad Medium

2.3 Puffer und Lösungen

- **Amonimumpersulfat** (10 % (w/v)) ad dH₂O
- **Bradfort-Lösung**
- **BSA-Stocklösung** (Bovines Serumalbumin) (100 µg/ml in dH₂O)
- **Calcein** (100 µM) ad 1M NaOH
- **Chloroform/Isoamylalkohol**
 - 24 Vol Chloroform
 - 1 Vol Isoamylalkohol
- **Denharts-Lösung**
 - 1 % (v/v) Ficoll
 - 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
 - 1 % Bovines Serum Albumin (BSA)
- **DEPC-Wasser** (Diethylpyrocarbonat)
 - 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in ddH₂O
- **DNA-Ladepuffer** (6 x) / **RNA-Ladepuffer** (6 x) mit DEPC-H₂O
 - 125 mM Tris-HCl pH 6,8
 - 2% (w/v) Sodiumdodecylphosphat (SDS)
 - 0,02% (w/v) Bromphenolblau
 - 10% (v/v) Glycerol
- **EDTA** (Ethylendiamintetraacetat)(0,5 M, pH 8,0) ad H₂O
- **FACS-Blockpuffer/IF-Blockpuffer** in PBS
 - 10% (v/v) FCS
 - 1% (w/v) BSA
- **FACS-Puffer** ad PBS
 - 0,01 % (w/v) BSA ad PBS
- **FACS-Lyselösung** (10 % (v/v)) (Becton & Dickinson, Heidelberg, BRD) in dH₂O
- **Formaldehyd** (37%)
- **Glycerol** (50% (v/v)), ad dH₂O
- **Glyoxal** (40% (v/v)) ad DEPC-H₂O
- **IF-Mounting Medium** in PBS
 - 90% (v/v) Glycerol
 - 0,2% (v/v) p-Phenylenediamin
- **Western Blot Ladepuffer** (2x) in dH₂O
 - 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
 - 2% (w/v) SDS
 - 10% (v/v) Glycerol
 - 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
 - 0,02% (w/v) Bromphenolblau
- **Northern-Blot Methylenblau-Färbelösung**
 - 0,04 % (w/v) Methylenblau
 - 0,5 M Natriumacetat, pH 5,2
- **Magnesiumchlorid (1M)** in dH₂O
- **MOPS-Puffer (1M)** (Morpholinohydroxypropansulfonylsäure) ad DEPC- H₂O
- **MTT** (Dimethylthiazol-Diphenyltetrazolium-Bromid) (5 mg/ml) in PBS

-
- **Northern Blot MOPS-Laufpuffer (5x)**
 - 0,1 M MOPS
 - 40 mM Natriumacetat
 - 5 mM EDTA, pH 8,0
 - Natriumacetat 3 M, pH 5,2
 - **Natriumchlorid (5 M)**
 - **Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0)**
 - **Northern Blot Hybridisierungslösung**
 - 50% (v/v) Formamid
 - 5x SSC, pH 7,0
 - 0,1% (w/v) SDS
 - 5% (v/v) Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
 - 2% (w/v) Denharts-Lösung (100x)
 - Lachs-Sperma-DNA (100 µg/ml)
 - 5 x Denharts-Lösung
 - **Northern Blot Waschlösung I in DEPC-H₂O**
 - 3 x SSC
 - 0,1% (v/v) SDS
 - **Northern Blot Waschlösung II in DEPC-H₂O**
 - 0,1 x SSC
 - 0,1% (v/v) SDS
 - **Northern Blot Waschlösung III in DEPC-H₂O**
 - 0,3% (v/v) SSC
 - 0,1% (v/v) SDS
 - **Western Blot Ponceau-S-Lösung**
 - 5% (v/v) Ponceau-S-Konzentrat
 - 5% (v/v) Essigsäure
 - **Western Blot Protein-Lysepuffer in dH₂O**
 - 0,1 M Natriumchlorid
 - 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6
 - 0,001 M EDTA, pH 8,0
 - 1% (v/v) Nonidet P40 (NP-40)
 - **Propidium-Jodid (Gebrauchslösung) (5 µg/ml) in dH₂O**
 - **Rhodamin (Stammlösung) (1 mg/ml) in PBS**
 - **SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat) (20 x, pH 7,0)**
 - 0,3 M Natriumcitrat
 - 3 M Natriumchlorid
 - **SDS (Natriumdodecylsulfat) (10% (v/v)), ad dH₂O**
 - **TBE (5 x) (Trisborat-EDTA)**
 - 0,45 M Tris-Borat
 - 0,01 M EDTA
 - **TE (Tris-EDTA)**
 - 10mM Tris-HCl, pH 7,6
 - 1 mM EDTA, pH 8,0
 - **Tris-HCl (1 M , pH 8,3)**
 - **Tris-HCl (1 M, pH 6,8)**
 - **Tris-HCl (1 M, pH 7,6)**
 - **Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)**

- **TE-Puffer** (pH 7,6)
 - 10 mM Tris-HCl, pH 7,6
 - 10 mM EDTA, pH 8,0
- **Tween 20** (20% (v/v)), ad dH₂O
- **Western Blot Blockpuffer** ad Western Blot Waschpuffer
 - 4% (w/v) Milchpuffer
 - 2% (w/v) BSA
- **Western Blot Elektrophoresepuffer** (1x) in dH₂O
 - 3,5 mM SDS
 - 25 mM Tris
 - 102 mM Glycin
- **Western Blot Transferpuffer** in dH₂O
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 20 % (v/v) Methanol
- **Western Blot Waschpuffer**
 - 10 mM Tris, pH 7,5
 - 150 mM Natriumchlorid
 - 0,2% (v/v) Tween 20

2.4 Zytostatika und Modulatoren

- **Bleomycin** (Cancernova GmbH, Reute, BRD)
 - Stammlösung: 15 mg in 5 ml 0,09% NaCl
- **Cremophor EL** (Sigma, Deisenhofen, BRD)
 - Stammlösung: 7,5 ml in 2,5 ml DMSO (0,75%)
- **Topotecan** (Hycamtin®) (Smith Kline Beecham, München, BRD)
 - Stammlösung: 1 mg in 1 ml dH₂O (1 mg entspricht 2,18 µM)
- **Paclitaxel** (Sigma, Deisenhofen, BRD)
 - Stammlösung: 1 mg in 150 µl DMSO (1 mg entspricht 1,17 µM)
- **Probenecid** (Sigma, Deisenhofen, BRD)
 - Stammlösung in 1 M NaOH
- **Etoposid** (Sigma, Deisenhofen, BRD)
 - Stammlösung: 20 mg/ml in Ethanol (1 mg entspricht 0,0017 µM)
- **Vincristin** (Alexis Biochemicals, Grünberg, BRD)
 - Stammlösung: 1 mg in 1 ml dH₂O (1 mg entspricht 1,21 µM)
- **Verapamil** (Sigma, Deisenhofen, BRD)
 - Stammlösung: 1 g in 101,8 ml DMSO (20 mM)

2.5 Antikörper

- **Anti- α -Tubulin**, IgG1, monoklonal (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti- β -Tubulin**, IgG1, monoklonal, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti- β_{II} -Tubulin**, IgG1, monoklonal, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti- β_{III} -Tubulin**, IgG2b, monoklonal, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti- β_{IV} -Tubulin**, IgG2b, monoklonal, (BioGenex, San Ramon, USA)
- **Anti- γ -Tubulin**, IgG1, monoklonal, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti- β -Actin**, IgG1, monoklonal, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti-P-gp**, IgG1, monoklonal, (Monosan, Uden, NL)
- **Anti-MRP** IgG1, monoklonal, (Monosan, Uden, NL)
- **Anti-LRP** IgG1, monoklonal, (Monosan, Uden, NL)
- **Anti-Maus IgG, M, A**, polyclonal, FITC-konjugiert, IgG1, monoklonal, (Monosan, Uden, NL)
- **Anti-Ratte IgG, M, A**, polyclonal, FITC-konjugiert, IgG1, monoklonal, (Monosan, Uden, NL)
- **Anti-Maus IgG1**, monoklonal, HRP-konjugiert (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti-Kaninchen IgG1**, monoklonal, HRP-konjugiert, (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- **Anti-Maus IgG1**, monoklonal, FITC-konjugiert, (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg, BRD)
- **Isotypenkontroll-Antikörper**, monoklonal, Maus IgG1, Maus IgG2b, Ratte IgG2a, (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg, BRD)

2.6 Kits

- **Omniscript RT Kit** (Quiagen, Hilden, BRD)
- **Taq PCR Core Kit** (Quiagen, Hilden, BRD)
- **High Pure PCR Product Purification Kit** (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- **RR Dyedexy Terminator Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD)
- **Rediprime DNA labelling system** (Amersham, Braunschweig, BRD)
- **QIAquick Gel Extraction Kits** (Quiagen, Hilden, BRD)
- **RNeasy Midi Kit** (Quiagen, Hilden, BRD)
- **100 bp DNA Leiter** (GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein, BRD)
- **1 Kb DNA Leiter** (GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein, BRD)
- **100 bp MassRuler DNA Leiter, low Range**, (Fermentas, ST. Leon-Rot, BRD)
- **SDS-PAGE Protein Migration Standards**, low range, (Bio-Rad, München, BRD)
- **DyeEx[®] Dye-Terminator Removal System** (Quiagen, Hilden, BRD)
- **Lumi-Light Western Blotting Substrate** (Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD)
- **Random Primers** (Promega, Madison, USA)

2.7 Oligonucleotide

Oligonucleotide als Primer für PCR oder Sequenzierreaktionen wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD) und MWG-Biotech AG (Ebersberg, BRD) in der Menge 0,01 μmol HPSF gereinigt bezogen.

3 Methoden

3.1 Kultivierung der Nierenkarzinomzelllinien

3.1.1 Klassifikation der verwendeten Kulturen

Für die Versuche dieser Arbeit dienten humane Nierenkarzinomzelllinien als Grundlage, welche aus Primärtumoren nach Nephrektomie und Präparation als permanente Zellkulturen etabliert wurden (Gerharz *et al.* 1990-96). Die Zelllinien wurden histopathologisch in klarzellige (*clearCa*), chromophile (*chromphi*) und chromophobe (*chrompho*) Typen eingeteilt (Thoenes *et al.* 1986). Für jede Zelllinie waren Histopathologie, Tumorstadium und Differenzierungsgrad des Primärtumors bekannt (s. *Tabelle 1*).

Als positive Kontrollen wurde die Zelllinie MCF7, ein humanes Mammakarzinom mit hoher Paclitaxelresistenz, Kurzzeitkulturen humaner Niere und periphere mononukleäre Blutzellen verwendet.

Linie	Stadium	grading
<i>clearCa-2</i>	pT3a	G2
<i>clearCa-3</i>	pT3a	G3
<i>clearCa-4</i>	pT2	G2
<i>clearCa-6</i>	pT3a	G3
<i>clearCa-7</i>	pT2	G3
<i>clearCa-9</i>	pT2	G1
<i>clearCa-11</i>	pT2	G1
<i>clearCa-12</i>	pT3a	G2
<i>clearCa-14</i>	pT3b	G3
<i>clearCa-15</i>	pT3a	G2
<i>clearCa-19</i>	pT2	G2
<i>clearCa-21</i>	pT3a	G2
<i>clearCa-28</i>	pT2	G3
<i>chromphi-1</i>	pT3a	G3
<i>chromphi-2</i>	pT3a	G2
<i>chromphi-3</i>	pT2	G2
<i>chromphi-4</i>	pT3a	G1
<i>chrompho-A</i>	pT3a	G2
<i>chrompho-B</i>	pT3a	G2

Tabelle 1: Klassifikation der verwendeten Nierenkarzinomzelllinien

3.1.2 Wachstumbedingungen und Nährmedien

Als Nährmedium der Zellkultur diente mit FCS, L-Glutamin, L-Arginin, L-Asparagin, Hepes-Puffer, Penicillin-G und Streptomycin frisch versetztes Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM).

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter der Reinraumwerkbank mit sterilen Hilfsmitteln und Medien. Für die Kultivierung der Zellen fanden 30 cm², 75 cm² und 125 cm²-NuncTM – Kulturflaschen Verwendung. Bei Neubeginn einer Kultur wurden die in flüssigen Stickstoff in Kryokonservierungslösung aufbewahrten Zellen zunächst in 30 cm² Gefäßen ausgesät. Die Inkubation erfolgte in einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Konfluenz und Qualität aller Zellkulturen wurden mehrmals pro Woche unter dem Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung begutachtet. 1-2-mal pro Woche musste ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Dabei wurde das Medium zur Hälfte oder komplett dekantiert und die Zellkultur mit neuem Medium überschichtet.

3.1.3 Passagierung der Zellkulturen

Eine subkonfluente Bewachung der Flasche erforderte die sterile Passage der Kulturen. Dazu wurde das Medium dekantiert, der Flaschenboden mit 37 °C warmem 0,05 %-igem (v/v) 1 M EDTA in PBS gespült, dann überschichtet und im Brutschrank gelagert. Nach 5 min konnte der Ablösungsprozess unter dem Phasenkontrast-mikroskop beobachtet werden. Die Zellen wurden durch vorsichtiges seitliches Beklopfen der Flasche gelöst und in die doppelte Menge Medium der Ausgangskultur resuspendiert. Hiernach konnte die Suspension in größere Kulturgefäße überführt werden.

3.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der vitalen Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer diente in verschiedenen Versuchen der Standardisierung. Dazu wurden die Zellen abgelöst

und in 5 bis 15 ml Medium resuspendiert. Hiernach erfolgte eine gründliche Durchmischung der Suspension für 5 min im 50 ml Falcon-Röhrchen und eine Filterung der Zellen durch ein 125 µm Zellsieb. 50 µl dieser Einzelzellsuspension wurden in Abhängigkeit von Kultur und Konfluenz 1:2 bis 1:4 in Trypanblau-Arbeitslösung verdünnt. Die Aufbringung einiger Tropfen Suspension zwischen Deckglas und Kammer ermöglichte die Auszählung unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100 x Vergrößerung. Pro Neubauer-Zählkammer wurden 8 Quadranten mit einem Volumen von 0,1 mm³ ausgezählt. Der Mittelwert von zwei bis drei Ansätzen mit maximal 15 % Abweichung diente der endgültigen Berechnung der vitalen Zellen (s. *Formel 1*).

$VZ = \frac{ZMW}{8 \times 0,1} \times \frac{VG}{VF}$
--

Formel 1: Berechnung der Lebendzellzahl (VZ)
 ZMW (Mittelwert d. Zellzählung), VG (Gesamtvolumen d. Kultur), VF (Verdünnungsfaktor in Trypanblau-Arbeitslösung).

3.1.5 Etablierung der Paclitaxel-resistenten Zelllinie *clearCa-21_{res}*

Die Untersuchungen zur erworbenen Paclitaxel-Resistenz erfolgte an einer initial Paclitaxel-sensitiven Linie *clearCa-21_{sens}* (IC₅₀ : 0,38 µM), die schrittweise immer für definierte Zeitintervalle mit höheren Paclitaxel-Konzentrationen im Brutschrank kultiviert wurde.

Subkonfluente Kulturen wurden zunächst mit 0,0001 µM Paclitaxel überschichtet und für 96 h beobachtet. Bei erhaltener Vitalität der Kulturen erfolgten Subkultivierungen mit 0,0005 µM, 0,001 µM und mit 0,005 µM Paclitaxel für Intervalle von 72 bis 96 h. Ab einer Konzentration von 0,005 µM zeigten sich eine Wachstumshemmung und morphologischen Veränderungen. Diese konnten im Phasenkontrast-mikroskop verfolgt und mittels MTT-Assay objektiviert werden. Von nun an konnten die Dosen in Schritten von 0,001 µM bei Inkubationen von 48 bis 72 h erhöht werden. Bei höheren Paclitaxel Konzentrationen erfolgte die Kultivierung über einen längeren Zeitraum ohne Dosissteigerung, um eine stabile Resistenz zu erzeugen. Eine Kryokonservierung dieser Kulturen diente der Sicherheit, bei Problemen der weiteren Kultivierung auf diese zurückgreifen zu können. Nach ca. 15 Monaten gelang die Etablierung der Paclitaxel-resistenten Zelllinie *clearCa-21_{res}* (Paclitaxel

IC₅₀ > 1000 µM). Diese zeigte sich über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten stabil, wobei sich eine Kultivierung in Paclitaxel-haltigem und Paclitaxel-freiem Medium für jeweils 4 bis 6 Tage abwechselte. Die Mutterlinie *clearCa-21_{sens}* wurde stetig mitgeführt und in ähnlichen Passagen im Vergleich analysiert.

3.2 **MTT- Cytotoxizitätstest**

Die Analyse der Ansprechraten auf verschiedene Chemotherapeutika ermöglichte einen *in vitro*-Zytotoxizitätstest mittels 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) (Mossman 1983, Reinecke *et al.* 1997). Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen. Die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien spalten den Tetrazoliumring des gelben Farbstoffs MTT unter Produktion von blauem Formazan, welcher bei 575 nm Wellenlänge gemessen wird.

Auf 75 cm²-Gefäße expandierte Zellkulturen wurden abgelöst, gezählt (Stammlösung) und eine gut durchmischte Gebrauchslösung als Einzelzellsuspension von 10⁵ Zellen/ml hergestellt (s. *Formel 2*). Nun erfolgte die Aussaat von 10⁴ Zellen in 100 µl Volumen in eine 96-Well Microtiter-Platte (s. *Abbildung 3*) unter Verwendung einer Eppendorf-Multipette. Die erste Spalte wurde mit 100 µl Medium als Leerwert aufgefüllt, danach die Platten mit Micropoor-Tape verschlossen und über Nacht im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Begutachtung der Platten unter dem Phasenkontrastmikroskop am nächsten Tag folgte die Zytostatikainkubation. Die Chemotherapeutika wurden frisch als Verdünnungsreihe angesetzt, wobei ausgehend von der jeweils höheren Konzentration die folgenden durch 1:10 Verdünnung in vorgelegtes Medium erzeugt wurden (s. *Kapitel 2.4*). Die Reihen wurden doppelt konzentriert angesetzt und erreichten durch 1:1 Verdünnung in der Platte die Endkonzentration. Die fünf logarithmischen Dosen dienten einer breiten Abdeckung (s. *Tabelle 2*). Jeweils 100 µl Zytostatika wurde zu den vorhandenen 100 µl Medium pipettiert (s. *Abbildung 3*). Nach Versiegelung der Platten mit Micropoor-Tape schloss sich eine Inkubation für 120 h im Feuchtbrutschrank an. Danach erfolgte die unsterile Auswertung durch den Farbstoff MTT unter dem Abzug. 100 mg MTT wurden sorgfältig in 20 ml PBS gelöst. Jeweils 50 µl mussten mit dem pro Mikrowell vorhandenen 200 µl Medium gemischt

werden. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten auf Zellstoff sorgfältig dekantiert und jeder Mikrowell mit jeweils 150 µl DMSO aufgefüllt. Der Farbumschlag stellte sich während einer 10 min Inkubation auf dem Schüttler bei 100 U unter Lichtschutz ein und die jeweilige Extinktion wurde in einem 96-Well-Platten-ELISA-Reader (Titertek Multiscan Puls) bei 575 nm Wellenlänge bestimmt. Die Prozentwerte geben die Vitalität der Zellen wieder, wobei Zellen der Kontrolle (Spalte 2.) einer 100 %-igen Vitalität entsprachen und alle übrigen auf diese bezogen wurden (s. *Formel 3*). Eine Platte enthielt zwei Versuchsansätze mit jeweils acht Einzellwerten pro Zytostatika-Konzentration. Mindestens vier Versuche gingen in die Berechnung der Vitalität ein (s. *Abbildung 3*). Die Konzentration des Zytostatikums, bei der die Hälfte der Zellen abstirbt, wird als IC₅₀-Wert bezeichnet und mit Hilfe der Probit-Analyse des Statistik-Programms SPSS berechnet

$$\text{Vol.A [ml]} = \frac{100.000 \text{ Z/ml}}{\text{Konz.A /ml}}, \text{Geb.Lsg [10ml]} = \text{Vol.A [ml]} + (10\text{ml} - \text{Vol.A [ml]})$$

Formel 2: Berechnung zur Herstellung 10 ml Zellsuspension (Geb.Lsg) für eine Platte. Vol.A/ Konz.A zu entnehmendes Volumen/Zellkonzentration aus der Stammlösung. Z (Zellen).

$$\text{Prozentwert t [\%]} = \frac{\text{Ext.Test} - \text{Ext.LW}}{\text{Ext.Kont.} - \text{Ext.LW}} \times 100$$

Formel 3: Berechnung der Zellvitalität (Prozentwert) als Mittelwert aus 8 Wells/Versuchsansatz und Mittelwert aus 4 Versuchsansätzen auf 2 Platten. *Ext.Test*, *Ext.LW*, *Ext.Kont* Mittelwerte der Extinktion aus 8 Wells für exponierte Zellen (*Ext.Test*), Leerwert (*Ext.LW*) und Kontrolle (*Ext.Kont*).

Lerwert	Kontrolle	Konz. 1 [µM]	Konz. 2 [µM]	Konz. 3 [µM]	Konz. 4 [µM]	Konz. 5 [µM]	Konz. 1 [µM]	Konz. 2 [µM]	Konz. 3 [µM]	Konz. 4 [µM]	Konz. 5 [µM]
jeweils 1. – 8. Wells pro Spalte											
Kontrolle		Versuchsansatz 1.				Versuchsansatz 2.					

Abbildung 3: Belegung der 96-Well Platte.
 Konz. 1-5 Zytostatika Konzentrationen (s. *Tabelle 3.1.5-1*). Spalte 1. Leerwert, Spalte 2. Kontrolle ohne Zytostatika (100% Wachstum).

Zytostatikum	Konz.1	Konz. 2	Konz.3	Konz.4	Konz.5
Paclitaxel	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
Vincristin	0,002 µg/ml	0,02 µg/ml	0,2 µg/ml	2 µg/ml	20 µg/ml
Etoposid	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Topotecan	0,005 µg/ml	0,05 µg/ml	0,5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml
Bleomycin	0,05 µg/ml	0,5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml

Tabelle 2: Verwendete Zytostatika

Logarithmischer Konzentrationen zur Kreuzresistenz-Analyse. Die Konzentrationen liegen in klinisch relevanten Bereichen (vgl. *Kapitel 5.1.*)

3.3 Durchflußzytometrie

3.3.1 **Analyse der Proteinexpression der Resistenzgene**

Die Durchflußzytometrie (FACS®) ermöglichte die Quantifizierung der Proteinexpression der Resistenzgene P-gp, LRP und MRP (Legrand *et al.* 1998).

Dazu wurden die Zellen in 75 cm² Kulturfラスchen subkonfluent expandiert, abgelöst, in 10 ml 37°C warmen PBS resuspendiert und gezählt. Es folgte eine Pelletierung der Zellen in der Zentrifuge (1100 Upm, 5 min, Raumtemperatur). Nach Verwerfung des Überstandes gelang die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen in 3 ml einer 10%-igen (v/v) FACS Lyselösung durch vorsichtige Resuspension für 12 min bei Raumtemperatur. Nach Waschung der Zellen in 10 ml FACS-Puffer (1100 Upm, 5 min, 4°C) reduzierte eine Inkubation der Pellets in 3 ml 10%-igem (v/v) Kälberserum in FACS-Puffer für 15 min bei 4°C die unspezifischen Bindungen.

20 µl einer auf 1,0 bis 1,25 x 10⁶ pro ml Zellen eingestellten Suspension in FACS-Puffer wurden in drei Röhrchen pipettiert. Die Zugabe von 20 µl verdünnter Antikörperlösung geschah unter leichter Durchmischung, wobei in Röhrchen-II Isotypenkontroll-Antikörper, in Röhrchen-III Antikörperlösung benutzt wurde (s. *Abbildung 3*) und Röhrchen-I ohne Antikörper blieb. Nach einer 60 minütigen Inkubation im Kühlschrank bei 4°C auf Eis schloss eine zweimalige Waschung der Röhrchen mit 3 ml FACS-Puffer (1100 Upm, 3 min, 4°C) die Primärdetektion ab. Die Zugabe von 20 µl in FACS-Puffer verdünnten FITC-konjugiertem Sekundärantikörper zur verbliebene Zellsuspension (ca. 50 µl Volumen) in Röhrchen-II und III ermöglichte die Primärantikörper Detektion (s. *Abbildung 3*). Einer 60 min Inkubation im Kühlschrank bei 4°C auf Eis folgte die zweimalige Waschung aller Röhrchen mit 3 ml FACS-Puffer (1100 Upm, 3 min, 4°C). Die auf ein Volumen von ca. 150 µl FACS-Puffer eingestellten Zellsuspensionen wurden zügig im Anschluss an die Präparation gemessen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Protein	Antikörperklon	Immunglobulin-Typ	Verdünnung
P-gp	JSB-1 monoklonal	Maus Ig1	1:10 in FACS-Puffer
LRP	LRP-56 monoklonal	Maus Ig2a	1:10 in FACS-Puffer
MRP	MRPr1 monoklonal	Ratte Ig2a	1:10 in FACS-Puffer

Isotypenkontrolle	Primärantikörper	Klon	Immunglobulin-Typ	Verdünnung
DAKO X0931	P-gp	DAK-GO1	Maus IgG1	1:10 in FACS-Puffer
DAKO X0944	LRP	DAK-GO9	Maus IgG2b	1:10 in FACS-Puffer
DAKO X0000	MRP	DAK-GXX	Ratte IgG1	1:10 in FACS-Puffer

Sekundär-Antikörper	Primär-antikörper	Klon	Immunglobulin-Typ	Markierung	Verdünnung
PS109F	P-gp, LRP	PS109	polykl. IgG, M, A	FITC	1:20 in FACS-Puffer
PS110F	MRP	PS110	polykl. IgG, M, A	FITC	1:20 in FACS-Puffer

Abbildungen 3: Beschreibung der in der Durchflußzytometrie verwendeten Antikörper

3.3.2 Messung am Durchflußzytometer und Versuchsauswertung

Die Messung erfolgte an einem FACSScan[®] Durchflußzytometer (Becton & Dickinson, München), die Auswertung mit dem Programm Lysys-II am Apple Macintosh[®] Rechner.

Die Durchflußzytometrie bestimmt durch Lichtstreuung und Fluoreszenz physikalische und chemische Eigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Die Probe wird über eine Stahlkapillare durch Überdruck in eine Messküvette geführt, durch eine Trägerflüssigkeit beschleunigt und die Zellen werden sequentiell aufgetrennt („hydrodynamische Fokussierung“). Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie Fluoreszenz entstehen durch einem Argonlaser Lichtstrahl (488 nm) am Analysepunkt. Die Lichtstreuung ist abhängig von der Größe und Struktur der Zellmembran sowie von intrazellulären Bestandteilen. Der vorwärtsstreuende Lichtanteil repräsentiert die Zellgröße, der im rechten Winkel gestreute Anteil die intrazelluläre Granularität. Die Auswertung kann in Form von Histogrammen oder Punktkplots geschehen. Vor der Messung kann eine Filterung

(„gating“) der Zellen in einem gewünschten Bereich („Live-Gate“) erfolgen. Vor den ersten Messreihen musste die Einstellung der Detektors des Durchflußzytometers auf die Eigenschaften der einzelnen Zelllinien durchgeführt werden.

Jeweils 10^4 Zellen gingen in eine Einzelmessung ein. Röhrchen-I diente der Bestimmung der Eigenfluoreszenz und der Filterung einer Zellpopulation anhand Größe und Granularität im Dotplot („Live-Gate“). Zelldetritus wurde so von der Messung ausgeschlossen und immer gleich viele Zellen einer Hauptpopulation der Auswertung zugeführt. Nachfolgend wurden dann 10^4 Zellen der Isotypenkontrolle und Primärdetektion im „Live-Gate“ gemessen.

Der Vergleich der Histogrammdarstellung (*x-Achse*: Zellzahl pro Kanal, *y-Achse*: Fluoreszenzintensität) von Isotypenkontrolle und Primärantikörper Detektion erlaubte die Versuchsauswertung. Die Software berechnete u.a. die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), den Fluoreszenz-Peak und die Zellzahl bzw. den Prozentwert im Markerbereich. Die Isotypenkontrolle spiegelte in etwa die Anzahl der unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers sowie die Autofluoreszenz der Zellen wieder und eignet sich daher als Negativkontrolle. Das Messergebnis wurde als Prozent positiv gefärbter Zellen im Vergleich zur negativen Kontrolle angegeben. Diese wurde durch Markierung des Populationsendes der negativen Kontrolle bestimmt. Beim Übertragen dieses Markers auf die Messung der Primärantikörper - Detektion ergab sich die prozentuale Anzahl der über die Isotypenkontrolle hinaus gefärbten Zellen. Autofluoreszenz und unspezifische Bindungen der Antikörper konnten so ausgeschlossen werden. Die Differenz aus diesem Prozentwert und der Prozentzahl der negativen Kontrolle (1,0 bis 2,0%) stellte die Anzahl positiver Zellen da.

3.3.3 P-gp- und MRP-Funktionsanalysen

Die funktionelle Aktivität der Membranpumpen P-gp und MRP wurde durch den Rhodamin (Rh-123)- bzw. Calcein-Efflux bestimmt. Rh-123 ist ein lipophiler Farbstoff, der spezifisch durch P-gp transportiert wird. Calcein ist ein negativ geladenes Molekül, das aufgrund seiner Polarität als bevorzugtes Substrat von MRP gilt. Beider Farbstoffe fluoreszieren im FITC-Kanal nach Anregung durch den Argon-Laser (Webb *et al.* 1996, Ikeda *et al.* 1999).

Auf 75 cm² Kulturfラスchen subkonfluent expandierte Zellkulturen wurden abgelöst, in ca. 5 ml 37°C warmem PBS resuspendiert und gezählt. Es erfolgte die Einstellung auf ca. 10⁶ Zellen/ml in PBS und die Überführung von jeweils 300 µl Zellsuspension I in fünf Röhrchen. Durch die Mischung der Zellsuspensionen in Röhrchen-III und -V in 4 ml in Rh-123 (150 ng/ml) bzw. Calcein (100 µM) in DMEM und die Inkubation aller fünf Röhrchen für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ im Feuchtinkubator wurde der Influx der Farbstoffe ermöglicht. Eine zweimalige Waschung aller Röhrchen mit 4 ml 37°C warmen PBS (1100 Upm, 3 min, RT) und Resuspension im Medium leitete den Farbstoff-Efflux ein. Für den dreistündige Efflux der Farbstoff wurden die Röhrchen bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtinkubator gelagert. Nach ca. zwei Stunden und 25 min wurden die Röhrchen-II und -IV kurz pelletiert (1100 Upm, 3 min, RT), der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in 4 ml Rh-123 oder Calcein resuspendiert. Es erfolgte ein Farbstoffinflux für 30 min bei 37°C und 5 %CO₂. Nach 3 Stunden wurden alle Röhrchen zweimal mit 4 ml 4°C kaltem FACS-Puffer (1100 U, 3 min, 4°C) gewaschen und in 150 µl 4°C kaltem FACS-Puffer lichtgeschützt auf Eis resuspendiert. Somit enthielt Röhrchen-I Zellen zur Kontrolle der Eigenfluoreszenz, Röhrchen-II und -IV Zellen mit halbstündigen Influx und Röhrchen-III und -V Zellen mit 30 minütigem Influx und dreistündigem Efflux. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte sofort im Anschluss an die Präparation am Durchflußzytometer.

Ein Aliquot der Eigenfluoreszenzkontrolle diente der Filterung einer vitalen Population mittels Propidium-Jodid Färbung. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension aus Röhrchen-I mit 10 µl Propidium-Jodid Gebrauchslösung gemischt und nach 30 sec analysiert. Der Farbstoff färbt die Nukleinsäuren nicht vitaler Zellen, wodurch ein Fluoreszenzshift der toten Zellen im FITC-Fluoreszenzkanal erzielt wird. Ein dadurch erstelltes „Live-Gate“ enthielt eine homogene, vitale Population und ermöglichte eine einheitliche Messreihe ohne Zelldetritus.

10⁴ Zellen pro Messung im *Live-Gate* gingen die Auswertung ein. Als Negativkontrolle eignete sich die Eigenfluoreszenz. Alle weiteren Röhrchen wurden auf diese bezogen und die positiv gefärbten Zellen als Prozentwert berechnet.

Die Efflux-Effizienz ergab sich durch den Vergleich der beiden Prozentwerte nach 30 min Influx und 30 min Influx mit nachfolgendem 3 h Efflux (s. *Formel 4*).

$$\text{Effizienz [\%]} = 100\% - \left(\frac{\text{Influx [\%]} \times 100}{\text{Efflux [\%]}} \right)$$

Formel 4: Berechnung der Efflux-Effizienz

3.3.4 *Modulationsversuche*

Modulatoren, wie z.B. Verapamil, Cremophor® EL oder Probenecid blockieren den Efflux von Rh-123 oder Calcein spezifisch (Ikeda *et al.* 1999).

Es wurden die P-gp-Inhibitoren Verapamil und Cremophor® EL, sowie Probenecid zur Blockierung von MRP benutzt. Verapamil gehört zur Gruppe der Calciumantagonisten von Phenylalkylamin-Typ. Probenecid ist ein Urikosurikum und greift an der tubulären Reabsorption der Niere an. Cremophor® EL, ein Rizinusöl-Derivat, ist der Lösungsvermittler von Paclitaxel in der klinischen Darreichungsform Taxol®.

Vor jeder Messreihe wurden frische Lösungen mit Verapamil, Cremophor® EL und Probenecid in Rh-123-Medium sowie in Calcein-Medium erstellt. Konzentrationen von 10 µM Verapamil, 0,075% Cremophor® EL und 5 mM Probenecid in 150 ng/ml Rh-123- bzw. 100 µM Calcein-Medium erwiesen sich als effektiv. Eine Blockierung ohne Toxizität für die Zelllinien konnte erzielt werden.

Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie im *Kapitel 3.3.3*, wobei eine Messreihe zur Rh-123- und Calcein-Efflux Bestimmung ohne Modulatoren mitgeführt wurde. Ein Ansatz setzte sich zusammen aus Röhrchen-I mit 10µM Verapamil in Medium (Negativkontrolle), Röhrchen-II mit 10 µM Verapamil in Rh-123-Medium und 30 min Influx sowie Röhrchen-III mit 10 µM Verapamil in Rh-123-Medium mit 30 min Influx sowie 3 Stunden Efflux. In weiteren Ansätzen wurde als Modulator 0,075% Cremophor® EL und 5 mM Probenecid verwendet

3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Morphologie und der Einfluss von Paclitaxel auf die Tubulinstruktur wurden mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt.

3.4.1 *Präparatherstellung*

In 6-Well-Platten wurden autoklavierte Deckgläschen mit $1,5 \times 10^5$ Zellen in Medium überschichtet. Eine Inkubation im Brutschrank über Nacht führte zur Adhärenz der Zellen. Zur Fixierung und Permeabilisierung diente eine Inkubation in -20 °C kaltem Methanol für 5 min, sowie eine Überschichtung mit -20 °C kaltem Azeton für 30 sec.

3.4.2 Immunfluoreszenzreaktion

Eine Inkubation der fixierten Deckgläschen in 3ml 37°C warmen Blockierungspuffer für 15 min trug zur Verminderung unspezifischer Antikörperbindungen bei. Nach einer Spülung mit PBS erfolgte die Detektion mit den Primärantikörpern α - (1:1500 Verdünnung), β - (1:250) oder γ - (1:500) Tubulin (s. *Tabelle 6*) durch mittige Überschichtung der Deckgläschen mit 100 μ l in Blockierungspuffer verdünnten Antikörper. Nach einer Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur und Spülung wurden die Bindungen mit einem Anti-Maus FITC-markierten Sekundärantikörper (1:60, DAKO, Hamburg) detektiert. Nach einer Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur und Spülung wurden die Präparate getrocknet und in Mounting-Medium auf Objektträger invertiert eingedeckelt. Zum Ausschluß einer unspezifischen Hintergrundfärbung des Sekundärantikörpers wurden Ansätzen ohne Primärantikörper parallel mitgeführt. Die Präparate konnten bei 4°C lichtgeschützt im Kühlschrank konserviert werden.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss, BRD) unter digitaler Dokumentation repräsentativer Bildausschnitte.

3.5 RT-PCR Evaluation der mRNA- Expression

Für P-gp, LRP, MRP, die β -Tubulin Isotypen und γ -Tubulin wurde die mRNA-Expression mittels RT-PCR in ausgewählten Nierenzellkarzinomen untersucht (Kavalakis *et al.* 1997, Legrand *et al.* 1998). Die RNA-Isolation wurde zweimal aus neuen Zellkulturen wiederholt, die PCR-Reaktionen dreimal reproduziert.

3.5.1 mRNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Zelllinien wurden auf 125 cm² Kulturgefäße subkonfluent expandiert, abgelöst und in 10 ml PBS zentrifugiert (1100 Upm, 5 min, RT). Nach Resuspension der Pellets in 3,8 ml mit 14,5 M β -Mercaptoethanol (10 μ l/ml) versetzten RTL-Puffer diente eine Spritze mit 20 G Nadel der Homogenisierung. Vor Überführung der Hälfte der Suspension auf 15 ml RNeasy Midi-Säulen musste noch 3,8 ml 70%-iges Äthanol dazugegeben werden. Eine Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 min wurde mit der anderen Hälfte wiederholt. Eine Waschung mit 3,8 ml RW1-Puffer und zwei Waschungen mit jeweils 2,5 ml RPE-Puffer (4000 Upm, 5 min, RT) folgten vor der 1

bis 2 maligen Elution der mRNA mit 150 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (4000 Upm, 3 min, RT).

Die mRNA Konzentration wurde mit einem Beckman Spectrophotometer DU-630 gegen 500 µl RNase-freies Wasser als Leerwert bestimmt.

10 µl Probe und 490 µl RNase-freies Wasser (1:50) wurden in einer Glasküvette verdünnt. Konzentration und Reinheit (1,5- 1,9) errechneten sich durch die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge (s. *Formel 5*). Eine denaturierende 1%-ige RNA-Gelelektrophorese mit 2 µg der Proben eignete sich zur Qualitäts- und Konzentrationskontrolle (s. *Kapitel 3.6.1*). Die RNA Lagerung erfolgte bei – 80 °C.

$$\text{Reinheit} = \frac{\text{Ext.}_{260}}{\text{Ext.}_{280}}, \text{Konz. [ng/ } \mu\text{l]} = \text{Ext}_{260} \times 50 \times 40$$

Formel 5: Berechnung der RNA Konzentration und Reinheit

3.5.2 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription dienten 2 µg Gesamt-RNA, das reverse Transkriptase Enzym Omniscript (Quiagen, Hilden) und Random-Primer (Promega, Mannheim). Zunächst wurden 2 µg RNA mit RNase freiem Wasser abzüglich der weiteren Reagenzien auf 20 µl Reaktionsvolumen ergänzt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Jeder Ansatz enthielt 2 µl 5 mM dNTP's (0,5 mM Endkonzentration), 10 µl Random Primer (25 µg/µl), 2 µl 10 U/µl RNase-Inhibitor (5 U/µl), 2 µl 10 x RT-Puffer (1 x), 1 µl 4 U/µl reverse Transkriptase (2 U/µl). Einer Inkubation bei 37 °C für 60 min folgte die Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 93 °C. Die Proben ließen sich bei –20 °C lagern.

3.5.3 PCR-Reaktion

Ein Master-Mix enthielt pro 100 µl PCR-Reaktion 10 µl 10 x Quiagen PCR Puffer (1 x Endkonzentration), 2 µl 10 mM dNTP's (200 µM), 2,5 µl 25 pmol 5'Primer, 2,5 µl 25 pmol 3'Primer (0,25 µM) und 0,5 µl 5 U/µl Taq DNA-Polymerase (0,25 U/µl) und 77,5 µl HPLC-H₂O auf Eis. Die mitgelieferte Q-Solution, ein PCR Verstärker, erwies sich für einige PCR-Reaktionen als günstig und wurde mit 20 µl 5 x Q-Solution (1 x) eingesetzt. 95 µl Master-Mix und 5 µl cDNA wurden in 0,5 ml Eppendorf Gefäße auf Eis gemischt und im Thermocycler PTC 150(Biozyme Diagnostics) der PCR-Reaktion als „hot-start“ unterzogen (s. *Tabelle 4*).

Durch Vorversuche waren optimale PCR-Bedingungen bestimmt worden. Die Zyklenzahl lag im linearen Bereich der PCR-Reaktion. Negativkontrollen mit HPLC-H₂O anstatt cDNA und RNA schlossen DNA-Kontaminationen aus. Ein Abgleich mit GAPDH für alle verwendeten RNA Proben ermöglichte Standardisierung und Qualitätskontrolle.

3.5.4 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Auswertung der PCR-Reaktionen ließen sich 1,5 – 2,0 %-ige Agarosegele verwenden. Die in 1 x TBE Puffer in der Mikrowelle gelöste und unter Rührung handwarm abgekühlte Agarose wurden in Gelkammern mit 1mm-Gelkämmen gegossen. Die Gelelektrophorese erfolgte in mit 1 x TBE aufgefüllten Elektrophoresetanks nach Polymerisation. Zur Analyse gelangten etwa 10 bis 25 % des PCR Volumens. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 6 x DNA-Probenpuffer und auf die Gele aufgetragen. Eine 100 bp DNA-Leiter (Life-Technologie, Eggenstein) eignete sich zur Kontrolle der Bandenhöhe. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 bis 110 V für ca. 60 bis 90 min. Die Färbung der Banden gelang durch Lagerung der Gele für 15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in 1 x TBE) und kurzes Schwenken in 1 x TBE. Ein UV-Lichttisch mit einem digitalem Bildverarbeitungssystem (Fröbel Datentechnik, Deutschland) und einem Thermotransferdrucker P68E (Mitsubishi, Japan) gestattete die Sichtbarkeit und Dokumentation der PCR-Banden.

	P-gp	LRP/MVP	MRP1	β_{II}	β_{III}	β_{IVa}	β_{IVb}	γ -Tub.
GeneBank accession	M17758	NM005115	L05628	X79535	U47634	X00734	x02344	M61764
bp	471-706	941-1330	121-260	1201-1390		610-730	583-800	265-834
Produkt	258	390	140	208	141	114	215	596
3'Primer	5'TACA GTGGA ATTGG TGCTG G3'	5'ACAAC TCTGCG TGATTC TC3'	5'TCTC TCCCG ACATG ACCG AGG3'	5'CGC ATC CTC CGA AGC AGT TCA AC3'	5'CTG CTC GCA GCT GGA GTG AG3'	5'TCT CCG CCG CAT CTT CCA CC3'	5'GAG CTT GCC AGC CTC GTT CT3'	5'AGA GAA CAT CTA CCT GCT GGA3'
5'Primer	5'CCCA GTAAA AATGT TGCCA 3'	5'TCAGC ATGTAG G TGCTTC CA3'	5'CCAG GAARA TGCCC C GAC TC3'	5'TCG CCC TCC TCC TCC CGA3'	5'CAG AAA TAC TGCAGG AGG GC3'	5'CCG GCC TGG ATGTGC ACG AT3'	5'CCG ATC TGG TTG CCG CAC TG3'	5'CTG GCC ACT GAC TGG ACC3'

Tabelle 3: RT-PCR Primer und Produkte

	P-gp	LRP	MRP1	β_{II}	β_{III}	β_{IVa}	β_{IVb}	γ -Tub.
Initiale Denaturierung	3 min, 94 °C	3 min, 94 °C	4 min, 94 °C	3 min, 94 °C	3 min, 94 °C	5 min, 94°C	5 min, 94°C	3 min, 94 °C
Denaturierung	60 sec, 94°C	30 sec, 94 °C	60 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C
Anlagerung	60 sec, 56 °C	30 sec, 54 °C	60 sec, 56 °C	30 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C	60 sec, 94 °C	60 sec, 94 °C	30 sec, 94 °C
Extension	60 sec, 72 °C	60 sec, 72 °C	60 sec, 72 °C	60 sec, 72 °C	60 sec, 72 °C	90 sec, 72 °C	90 sec, 72 °C	45 sec, 72 °C
Zyklen	30	30	35	30	30	35	35	28
Q-Solution	--/--	--/--	ja	--/--	ja	ja	ja	--/--

Tabelle 4: PCR-Reaktionsbedingungen

3.5.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Reinigung der PCR-Produkte von Primern und Puffer dienten Microspin S-300 HR-Säulen (Pharmacia, Freiburg). Der Sequenzieransatz setzte sich aus 5 µl PCR-Produkt, 1 µl 10 pmol/µl 5'Primer, 4 µl Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) und 10 µl HPLC-H₂O zusammen. Das Sequenzierprogramm bestand aus 25 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 15 sec Anlagerung bei 50 °C und Extension bei 60 °C für 4 min. Der Reaktion schloss sich eine DNA Fällung an, die aus 2 µl 3M Natriumacetat pH 5,2, 50 µl Äthanol abs. und 20 µl Sequenzreaktion, Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, 4 °C) sowie zweimaliges Waschen mit 500 µl 70 %-igem Äthanol (13000 Upm, 10 min, 4 °C) bestand. Alternative war die Aufreinigung über das DyeEx[®] Dye-Terminator Removal System (Quiagen, Hilden). Die Sequenzierung erfolgte im automatischen Sequenzierer ABI-Prism 310 Sequencer (Perkin Elmer, Überlingen).

3.6 Northern Blot

Die quantitative Expression der P-gp mRNA in den Linien *clearCa-21_{sen}* und *clearCa-21_{res}* wurde durch Northern Blot Analysen verglichen (Chaudhary u. Robinson 1993). Der RNeasyMIDI Kit (Quiagen, Hilden) diente zur Gewinnung der Gesamt-RNA (s. Kapitel 3.5.1). Der Versuch wurde einmal mit neuer RNA reproduziert.

3.6.1 RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot

Eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese von 25 µg Gesamt-RNA auf 1%-igem Formaldehydgel (1% (w/v) Agarose, 18% (v/v) Formaldehyd, 1 x MOPS-Puffer, ad DEPEC- H₂O) mit einer Spannung von 50 V in 1 x MOPS-Puffer über mehrere Stunden trennte die Proben auf. Diese setzten sich aus 15 µl Gesamt-RNA, 3,5 µl 40%-igem Glyoxal, 2 µl 10 x MOPS-Puffer zusammen, die vor Zugabe von 3,5 µl RNA-Ladepuffer für 15 min bei 55 °C denaturiert wurden.

Vor dem Kapillartransfer der RNA erfolgte eine 10 min Waschung des Gels in DEPEC-H₂O, eine 10 min Inkubation in 0,05 M NaOH und eine Neutralisierung in 10 x SCC für 10 min. Der Transfer der RNA erfolgte durch einen Blotaufbau aus einer Plastikwanne mit Sockel, einer Glasplatte, 2 Lagen in die Wanne ragendes Whatman 3MM Papier, dem RNA-Gel mit den Geltaschen nach unten, der Hybond-Nylonmembran (Amersham, Braunschweig), 2 Lagen Whatman 3MM Papier von

Gelgröße und 15 cm Papiertücher. Zur Beschwerung eignete sich ein Gewicht von etwa 1 kg. Der Transfer dauerte 12 Stunden in 20 x SCC-Puffer. Die Geltaschen wurden mit Kugelschreiber auf der Membran markiert und diese 5 min in 10 x SCC-Puffer gewaschen. Zur Fixierung der RNA auf der Membran diente die UV-Bestrahlung im Spectrolinker XL-1000 UV-Crosslinker (Spectronics Corp., USA). Eine Färbung der Membran in Methylenblau und Entfärbung in 25%-igem Äthanol erlaubte die Transferkontrolle und die Markierung der 28S- und 18S-RNA.

3.6.2 Sondenherstellung und Markierung

Als Sonde zum Nachweis von P-gp dienten über Microspin S-300 HR-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgereinigte RT-PCR Produkte (s. *Kapitel 3.5.1, Tabelle 5*), die zur Kontrolle sequenziert wurden (s. *Kapitel 3.5.5*).

50 ng Sonde (Gel-abgeschätzt) wurden mit TE-Puffer auf 45 µl verdünnt, 5 min bei 95 °C denaturiert und in den Rediprime-Labeling Mix (Pharmacia, Freiburg) überführt. Nach Zugabe von 5 µl [α^{32} -P]dCTP erfolgte die radioaktive Markierung der Sonde für 45 min bei 37 °C durch die Klenow Fragment DNA-Polymerase I. Nach Reinigung der markierten Sonde über Sephadex-G50-Säulen erfolgte die Elution in sechs Fraktionen. Fraktion eins machte 600 µl, Fraktion zwei bis fünf 200 µl und Fraktion sechs 800 µl aus. Die Radioaktivität von 10 µl Aliquot der Fraktionen wurde im Beckmann LS 6000 IC Szintillationsmeßgerät gemessen und die Fraktion mit der höchsten Aktivität als Sonde eingesetzt.

Sonde	Länge (bp)	5' Primer	3' Primer	Nukleotide
P-gp	506	5'GGGGCTGGACTT CTTTATGATG3'	5'AGCAGCTGACA GTCCAAGAAC3'	608-1114

Tabelle 5: Northern Blot Sonde für P-gp

3.6.3 Hybridisierungsreaktion und Autoradiographie

Nach einer Prähybridisierung der Membran über Nacht mit 10 ml denaturierter (30 min, 80 °C) Northern Blot-Hybridisierungslösung bei 42 °C in einem Hybridisierungsgerät (Biometra, Göttingen) erfolgte die Hybridisierung durch Zugabe von zuvor in Hybridisierungslösung denaturierter (30 min, 80 °C) Sonde

(10^7 Counts/20 μ l). Die Hybridisierung dauerte 16 Stunden bei 42 °C. Mehrfache Waschschr tte der Membran für 5 min im Sch ttelbad mit Northern Blot-Waschlösung I bei Raumtemperatur und Northern Blot-Waschlösung II bei etwa 50 °C sowie Kontrolle der Membranradioaktivit t mit dem Handkontaminationsmonitor (FAG, BRD) folgten vor der Detektion mittels Autoradiographie.

Die gewaschene Membran wurde in Folie gepackt und in der Dunkelkammer in eine Filmkassette mit OMAT AR-Scientific Imaging Filmen (Kodak, BRD) gelegt. Die Exposition dauerte ca. 24 h bei -80 °C, nach der der Film im Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität (Direktor: Prof. Dr. med. U. Mödder) entwickelt wurde.

3.7 Western Blot Tubulin-Expressionsstudien

Die Protein Expression von α -, β -, γ -Tubulin, sowie der Isotypen β_{II} , β_{III} und β_{IV} wurde mittels Western Blot quantitativ analysiert.

Die Isolation, die Elektrophorese und der Transfer der Proteine erfolgten am ersten Tag, um frische Lysate zu gewährleisten. Die Immunodetektion (s. *Tabelle 6*) wurde am zweiten Tag durchgeführt. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

3.7.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Kulturen wurden auf $2-5 \times 10^6$ Zellen subkonfluent expandiert, abgelöst, in 10 ml PBS resuspendiert und zweimal in 4°C kaltem PBS rezentrifugiert (1100 Upm, 5 min, 4°C). Die 20 bis 25 min andauernde Lyse der Zellen auf Eis erfolgte in Abhängigkeit der Größe der Pellets mit 50 bis 200 μ l Protein-Lysepuffer, um eine ausreichend hohe Proteinkonzentration zu erreichen. Dem Lysepuffer wurde die Proteinaseinhibitoren Aprotin (1 μ l, 1 μ g/ml), Leupeptin (1 μ l, 1 μ g/ml), Soyabean Trypsin Inhibitor (1 μ l, 10 ng/ml) und PMSF (10 μ l, 180 μ g/ml) frisch zugesetzt. Auf gründliche Resuspension und mehrfaches Aufschütteln der Pellets während der Lyse wurde geachtet. Danach erfolgte die Zentrifugation der Ansätze in der Tischzentrifuge (13000 Upm, 10 min, 4°C). Die Überführung des proteinhaltigen Überstandes ohne Bodensatz in neue Gefäße beendete die Reaktion. Zur Konzentrationsbestimmung der Lysate wurde die Methode nach Bradford angewandt. Als Standardreihe dienten

BSA-Lösungen mit BSA Konzentrationen von 50 µg/ml (390 µl dH₂O, 10 µl Lysepuffer, 400 µl BSA-Stocklösung), 10 µg/ml (590 µl dH₂O, 10 µl Lysepuffer, 200 µl BSA-Stocklösung) und 5 µg/ml (690 µl dH₂O, 10 µl Lysepuffer, 100 µl BSA-Stocklösung). Nach Mischung von 4 µl Aliquot der Lysate oder der Standardreihe, 200 µl Bradford-Lösung und 796 µl dH₂O (1:250 Verdünnung) für 3 min auf Eis erfolgte ein Farbumschlag nach blau-violett. Die Messung der Extinktionen erfolgte bei 595 nm im Beckmann Spektrophotometer als dreifachen Ansatz gegen den Leerwert aus 790 µl H₂O, 10 µl Lysepuffer und 200 µl Bradford. Aus der Standardreihe ging die Extinktion von 1 µg/ml Protein hervor (ca. 0,066) und die Konzentrationen der Lysate, sowie das Volumen welches 1 µg Protein enthielt, konnte errechnet werden (s. *Formel 6*). Zur Analyse gelangten 20 bis 35 µg Gesamtprotein gelöst in 2 x SDS-Gelladepuffer. Das Doppelte des zur Auftragungsmenge berechneten Volumens wurde 1:1 mit 2 x Gelladepuffer verdünnt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

$$\text{Proteinkonzentration}[\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{1\mu\text{g/ml}}{0,066} \times \text{Ext.Probe} \times 250$$

$$\text{Auftragsvolumen}[20\mu\text{g}] = \frac{1000}{\text{Proteinkonzentration}[\mu\text{g}/1000\mu\text{l}]} \times 20\mu\text{g}$$

Formel 6: Proteinkonzentration und Auftragsvolumen (1 x)

3.7.2 PAGE-Gelelektrophorese

Zur Elektrophorese wurden 10% SDS-Polyacrylamid-Gele in Hoefer Gelkammern für 10 x 10 cm Gele (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Sammel- und Trenngel wurden in Gelgußsystemen mit 1 mm-Spacern und 9-Loch Gelkämmen gegossen. Das 10 %-ige Trenngel (40 % (v/v) 30 %-iger Polyacrylamid-Mix, 33% (v/v) dH₂O, 25% (v/v) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 1,5% (v/v) 10% SDS) polymerisierte nach Zugabe von 1,5% (v/v) 10% APS und 0,06% (v/v) TEMED im Gelgußsystem mit der Gelfront 2 cm unterhalb der Scheiben. Der Polymerisationsprozess dauerte ca. 20 min, wobei eine Übersichtung mit 50%-igem 2-Butanol einen Wasserentzug vermied. Anschließend wurde nach Abgießen und Trocknen der Kammern das Sammelgel (17 % (v/v) 30 %-iger Polyacrylamid-Mix, 68% (v/v) dH₂O, 12,5% (v/v) 1 M Tris-HCl pH 6,8, 1% (v/v) 10 SDS) mit 1 % (v/v) 10% APS und 0,1% (v/v) TEMED gemischt, auf das Trenngel

geschichtet und mit dem Gelkamm bestückt. Die Polymerisation dauerte ca. 10 min. Die fertigen Gele wurden zwischen Glas und Scheibe gesichert in der Elektrophoresekammer befestigt und diese mit PAGE-Gellaufpuffer aufgefüllt. Das Auftragen der errechneten Lysatvolumina erfolgte nach Spülung der Slots, mit Hilfe der Hamilton-microliter Pippette. Der *low-range*-Proteinmarker (Biorad) lief im ersten Slot. Eine Stromstärke von 20 mA pro Gel wurde angelegt. Der Durchtritt des SDS-Gellaufpuffers in den PAGE-Gellaufpuffer beendet die Gelelektrophorese nach 70 bis 90 min.

3.7.3 Proteintransfer und Ponceau-red-S-Färbung

Nach Verwerfung des Sammelgels erfolgte der Blotaufbau zusammengesetzt aus einer Gelseite mit Schwamm, 2 Lagen Whatman-Papier (0,5 cm über die Gelgröße hinausragend sowie einer Nitrozellulosemembran 0,2 cm die Gelgröße übertreffend) auf der das Gel vorsichtig mit der Proteinseite nach oben luftblasenfrei angerollt wurde. Zwei Lagen Whatman-Papier und ein Schwamm bildeten die obere Schicht. Eine Kassette komprimierte den Aufbau. Der Proteintransfer fand in einem Biometra Elektrotankblotter (Biometra, Göttingen) mit Membranseite zur Anode gerichtet unter Kühlung in 4°C kaltem Western Blot-Transferpuffer statt. Die angelegte Stromstärke betrug 0,8 mA/cm² [Membranfläche/ Elektrodenabstand] für 75 min. Nach Färbung der Membran für 5 min in Ponceau red S-Arbeitslösung und Entfärbung in dH₂O erschienen die Proteinbanden und ermöglichten den Transfer zu kontrollieren. Die Banden des Markers, die Slots und die rechte obere Vorderseite wurden mit Kugelschreiber markiert.

3.7.4 Immunoblotting

Unspezifische Antikörperbindungen können durch Blockung der Membran mit Western Blot Blockierungspuffer über Nacht unter Schwenkung im Kühlschrank reduziert werden. Am nächsten Tag wurde dann die Immunodetektion durchgeführt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in einem Volumen von 6 bis 10 ml Blockierungspuffer in 50 ml Falcon-Röhrchen verdünnt, die Membran luftblasenfrei mit der Proteinseite nach innen ausgerichtet und für 60 min bei RT auf einem Rollator geschwenkt (s. *Tabelle 6*). Nach der Primär- und Sekundärantikörperreaktion erfolgte eine dreimalige Waschung der Membran in Western Blot-Waschpuffer für jeweils 10 min unter leichtem Schwenken in Plastikgefäßen. Zur Primärantikörper-

Detektion diente ein mit dem Enzym *horseradish-peroxidase*-gekoppelter Sekundärantikörper. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit dem ECL-System (Amersham, Braunschweig), wobei 3 ml der beiden 1:1 gemischten Lösungen auf die Membran geträufelt wurden. Die Inkubation dauerte 5 bis 10 min. In dieser Zeit setzte das Enzym das in der ECL-Lösung vorhandene Substrat proportional zur Menge gebundenen Sekundärantikörpers um. Die Fluoreszenz-Reaktion ließ sich durch Exposition der Membran gegenüber *Hyper-linked-ECL*-Filmen in der Dunkelkammer in einer Filmkassette für verschiedene Zeiten (5 sec. bis 12 min) sichtbar machen.

Vor Exposition wurde die Membran kurz auf Zellstoff getupft und in Safran-Folie verpackt. Die Filme wurden im Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität (Direktor: Prof. Dr. med. U. Mödder) entwickelt. Der β -Actin-Abgleich erforderte eine Inkubation der Membran über Nacht in einem hohen Volumen Western Blot-Blockierungspuffer im Kühlschrank unter Schwenken, der die vorangegangene Detektion abschwächte. Danach erfolgte der Abgleich des Blottes mit einem Antikörper gegen β -Actin. Hierdurch konnten Lade- und Transferschwankungen sowie die Proteinintegrität kontrolliert werden.

Tubulin	AK- Name	AK- Klon	Immunglobulin-Typ	Verdünnung
α -Tubulin	T9026	DM1A	monoklonal Maus IgG1	1 : 5000
β -Tubulin	T5293	2-28-33	monoklonal Maus IgG1	1 : 1000
γ -Tubulin	T6557	GTU-88	monoklonal Maus IgG1	1 : 1000
β_{II} -Tubulin	T8535	JDR.3B8	monoklonal Maus IgG2b	1 : 300
β_{III} -Tubulin	T8660	SDL.3D10	monoklonal Maus IgG2b	1 : 200
β_{IV} -Tubulin	no.178M	ONS1A6	monoklonal Maus IgG1	1 : 150
β -Actin	T5441	AC-15	monoklonal Maus IgG1	1 : 12000

Sekundär-AK	AK-Name	Verdünnung
Kaninchen anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert	A9044	1 : 2000

Tabelle 6: Verwendete Antikörper und Detektionsbedingungen

3.8 **Statistik**

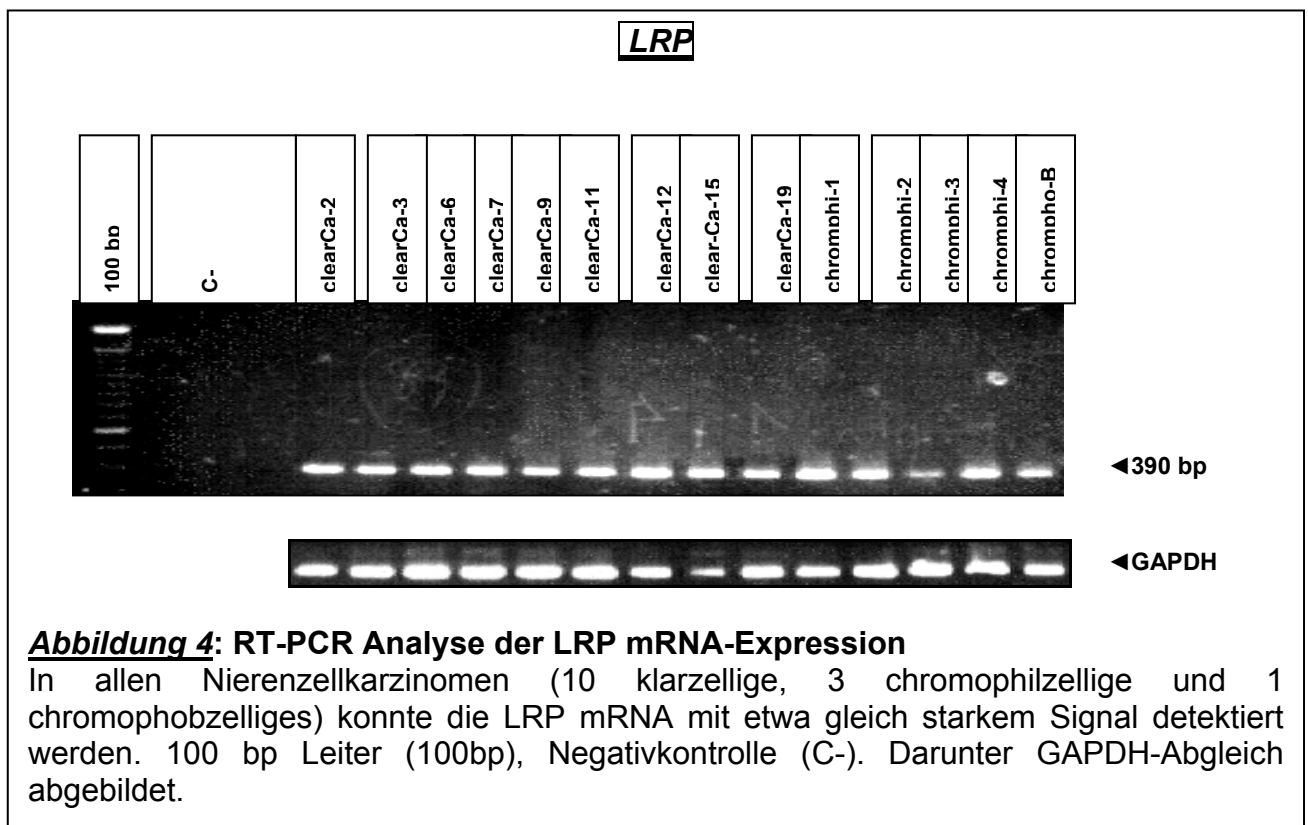
Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen SPSS (SPSS GmbH, München) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond). Es wurden Mittelwert, Standardabweichung sowie Trendlinie durch Regressionsanalyse in Excel berechnet. Mit Hilfe des Programmes SPSS konnten Korrelationen mit Korrelationskoeffizient r und Signifikanzniveau p berechnet werden, wobei ein p -Wert von kleiner oder gleich 0,05 als signifikant angenommen wurde. Außerdem wurden hier die IC_{50} -Werte durch Probit-Analyse berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Verhalten von P-gp, LRP und MRP bei intrinsischer Resistenz

4.1.1 RT-PCR-Analyse der LRP mRNA-Expression

In 14 Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher histologischer Typen und Paclitaxel-Resistenz konnte die LRP-mRNA mit etwa gleich starkem Signal nachgewiesen werden (s. *Abbildung 4*). Für die Linien *clearCa-12* und *clearCa-6* erfolgte eine Sequenzierung der PCR-Bande. Diese bestätigte das Produkt als LRP-mRNA.



4.1.2 Proteinexpression und Funktionalität von P-gp, LRP und MRP

Die Expression der Gene P-gp, LRP und MRP wurde mittels FACS-Analyse mit Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens 4 Messungen bestimmt. Ebenso erfolgte die Analyse der Funktionalität von P-gp und MRP durch den Rh-123- bzw. Calcein-Efflux (s. *Tabelle 7*). 15 Nierenkarzinomzelllinien (11 klarzellige, 4 chromophilzellige und 1 chromophobzelliges) mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität gingen in die Auswertung ein.

Für P-gp konnte in den 16 Linien eine signifikante Korrelation mit den IC₅₀-Werten gefunden werden ($r = 0,57$; $p = 0,021$) (s. *Abbildung 5 [A.]*). In der funktionellen

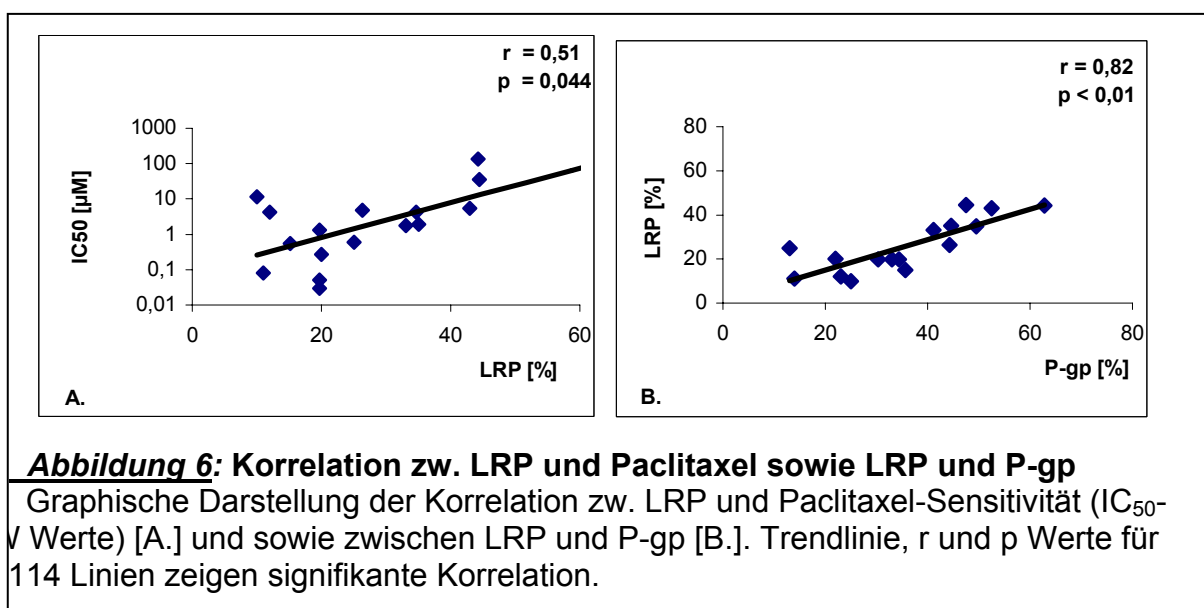
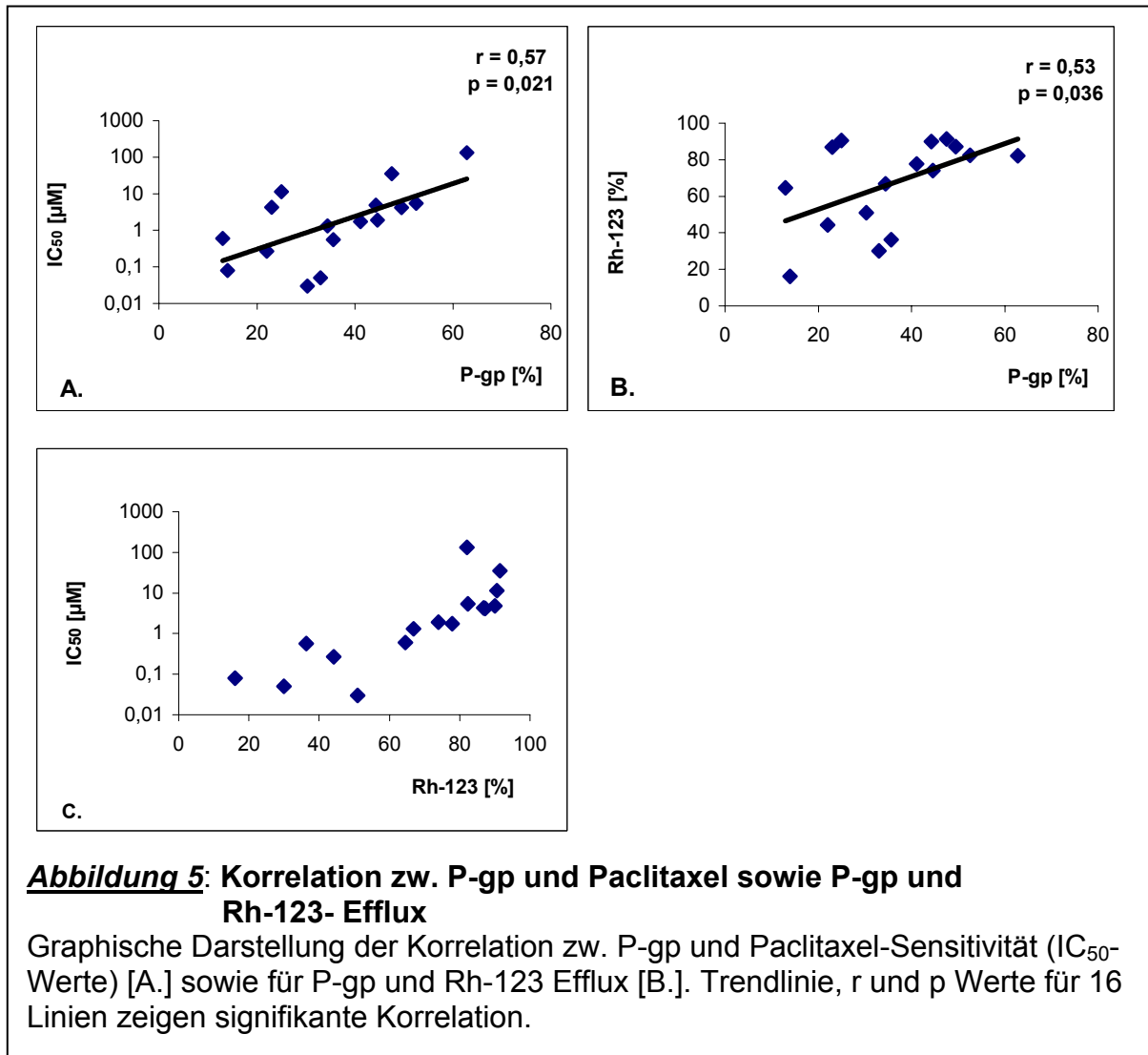
Untersuchung zeigte sich hier eine signifikante Korrelation zwischen der P-gp-Expression und dem Rh-123-Efflux ($r = 0,53$; $p = 0,036$) (s. *Abbildung 5 [B.]*). Die Gegenüberstellung der IC_{50} -Werte und des Rh-123-Effluxes ergab keine signifikante Beziehung ($r \sim 0,3$; $p = 0,3$) (s. *Abbildung 5 [C.]*).

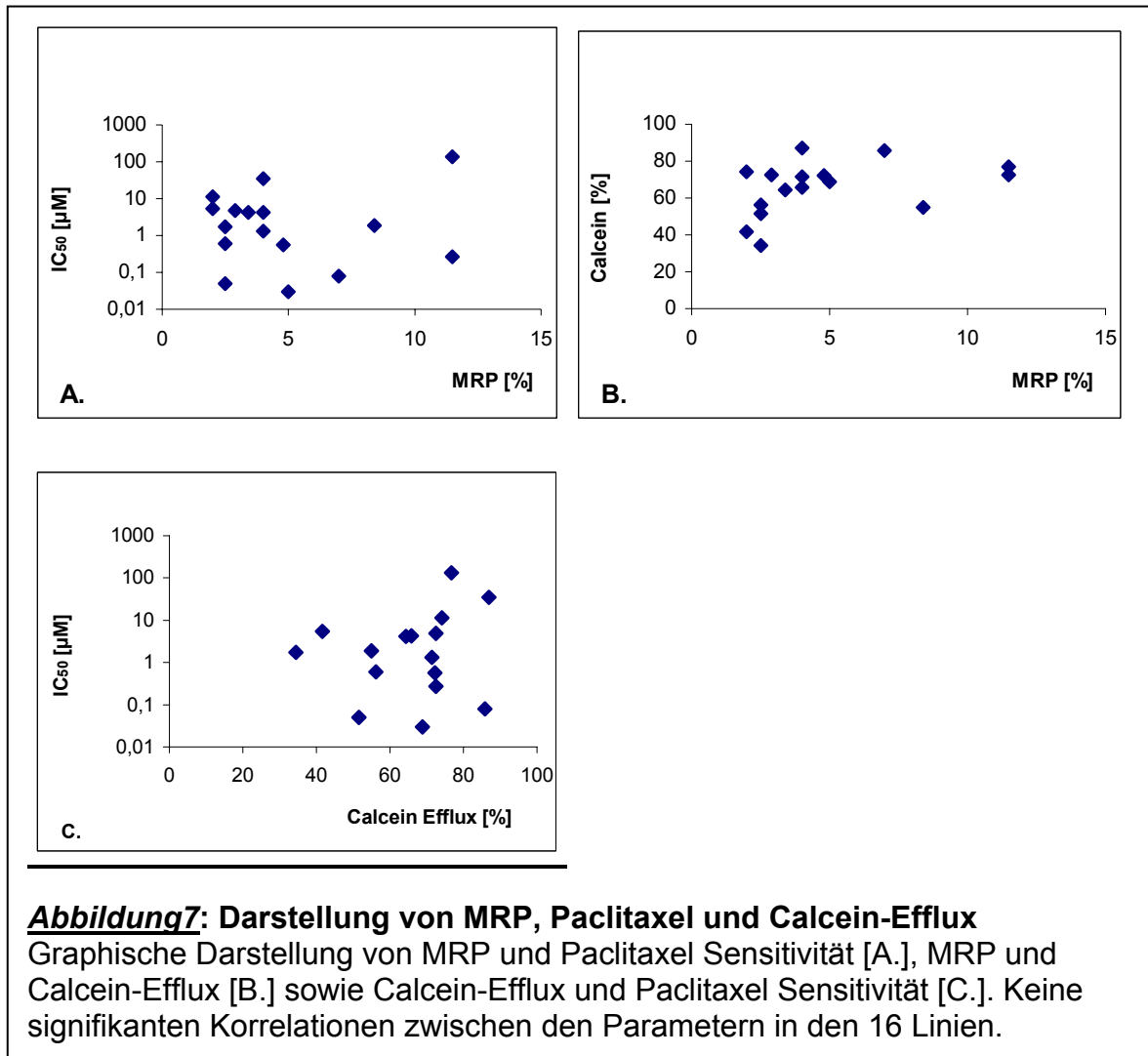
Auch zwischen der LRP-Expression und den IC_{50} -Werten für Paclitaxel konnte eine signifikante Korrelation in den 16 Zelllinien gefunden werden ($r = 0,51$; $p = 0,044$) (s. *Abbildung 6 [A.]*). Bei der Gegenüberstellung der Expression von P-gp und LRP zeigte sich hier eine hochsignifikante Koexpression zwischen den beiden Parametern ($r = 0,81$; $p < 0,01$) (s. *Abbildung 6 [B.]*).

Für MRP zeigte sich in den 16 Linien keine Beziehung zu den IC_{50} -Werten (s. *Abbildung 7 [A.]*). Genauso wenig lag eine signifikante Korrelation in der funktionellen Analyse von MRP durch den Calcein-Efflux vor (7.4.1.2-3 [B.]). Der Calcein-Efflux korrelierte auch nicht mit den IC_{50} -Werten (s. *Abbildung 7 [C.]*).

Linie	IC_{50} [μ M] Paclitaxel	P-gp [%]	MRP1 [%]	LRP [%]	Rh-123 [%]	Calcein
clearCa-2	4,26	23,0 $\pm$ 0	4,0 $\pm$ 0	12,0 $\pm$ 0	86,8 $\pm$ 2,7	65,8 $\pm$ 0,7
clearCa-3	1,31	34,3 $\pm$ 2,9	4,0 $\pm$ 3,6	19,7 $\pm$ 6,6	66,8 $\pm$ 14,2	71,4 $\pm$ 6,9
clearCa-4	1,73	41,1 $\pm$ 8,9	2,5 $\pm$ 1,1	33,1 $\pm$ 9,7	77,8 $\pm$ 4,5	34,4 $\pm$ 8,3
clearCa-6	0,05	33,0 $\pm$ 7,8	2,5 $\pm$ 2,1	19,7 $\pm$ 11,1	30,0 $\pm$ 10,9	51,6 $\pm$ 7,8
clearCa-7	35,18	47,5 $\pm$ 4,2	4,0 $\pm$ 2,0	44,5 $\pm$ 4,8	91,5 $\pm$ 2,1	87,0 $\pm$ 1,1
clearCa-9	11,34	25,0 $\pm$ 6,2	2,0 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 6,4	90,6 $\pm$ 4,7	74,2 $\pm$ 3,2
clearCa-11	0,03	30,3 $\pm$ 8,0	5,0 $\pm$ 2,9	19,7 $\pm$ 6,6	50,9 $\pm$ 4,2	68,8 $\pm$ 3,5
clearCa-12	134,17	62,8 $\pm$ 7,0	11,5 $\pm$ 4,7	44,3 $\pm$ 6,1	82,1 $\pm$ 7,2	76,8 $\pm$ 11,2
clearCa-14	5,46	52,5 $\pm$ 6,7	2,0 $\pm$ 1,6	43,2 $\pm$ 4,8	82,4 $\pm$ 6,8	41,7 $\pm$ 1,9
clearCa-19	0,56	35,6 $\pm$ 3,7	4,8 $\pm$ 1,6	15,1 $\pm$ 3,7	60,0 $\pm$ 5,0	72,3 $\pm$ 0,5
clearCa-28	1,90	44,6 $\pm$ 10,5	8,4 $\pm$ 3,7	35,0 $\pm$ 14,6	74,0 $\pm$ 0	55,0 $\pm$ 0
chromphi-1	4,84	44,3 $\pm$ 3,8	2,9 $\pm$ 2,2	26,3 $\pm$ 3,2	90,0 $\pm$ 7,0	72,5 $\pm$ 0
chromphi-2	4,20	49,5 $\pm$ 10,0	3,4 $\pm$ 0,7	34,7 $\pm$ 3,4	87,3 $\pm$ 6,4	64,4 $\pm$ 1,7
chromphi-3	0,60	13,0 $\pm$ 0	2,5 $\pm$ 0,5	25,0 $\pm$ 0	64,5 $\pm$ 6,0	56,2 $\pm$ 0,9
chromphi-4	0,27	22,0 $\pm$ 6,1	11,5 $\pm$ 6,8	20,0 $\pm$ 9,5	44,2 $\pm$ 5,5	72,5 $\pm$ 0
chrompho-A	0,08	14,0 $\pm$ 0	7,0 $\pm$ 0	11,0 $\pm$ 0	16,1 $\pm$ 0,0	85,8 $\pm$ 0,0

Tabelle 7: Zusammenfassung der FACS-Messungen

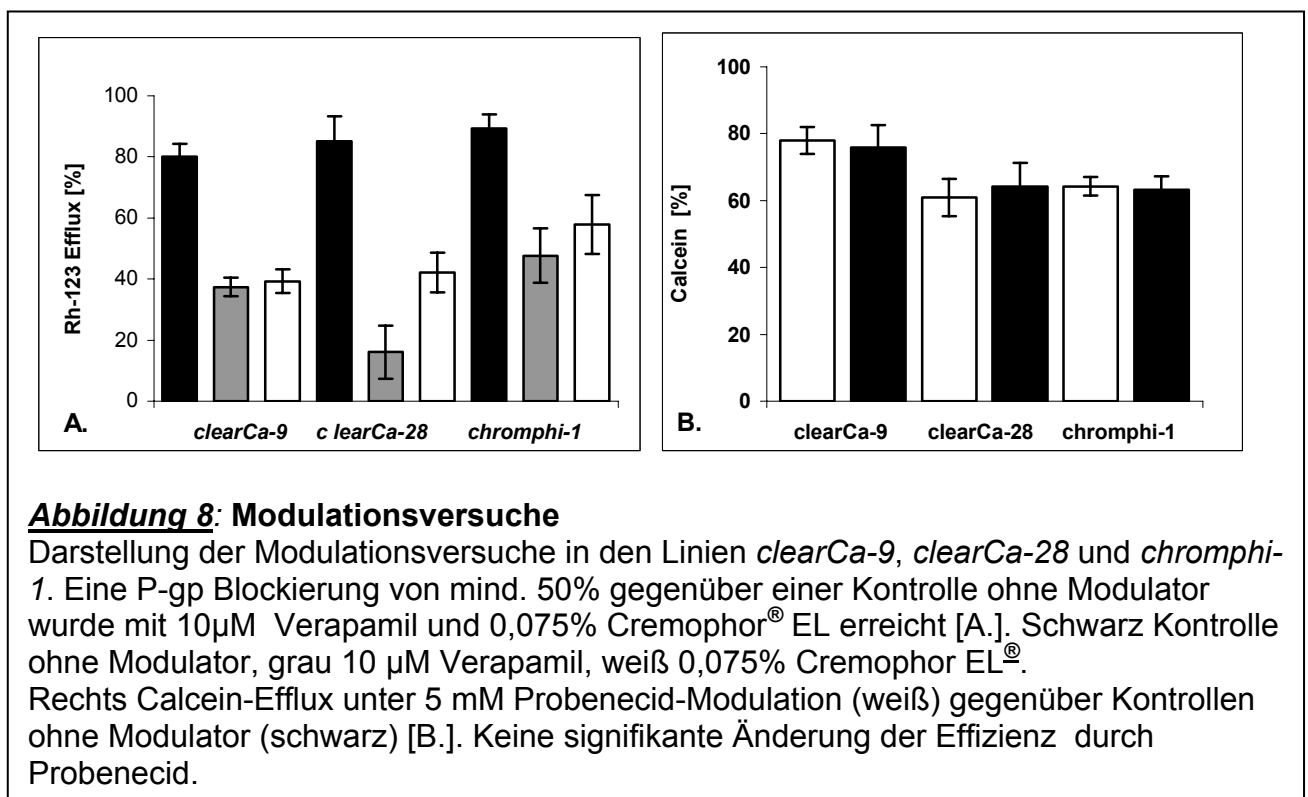




4.1.3 Modulationsversuche

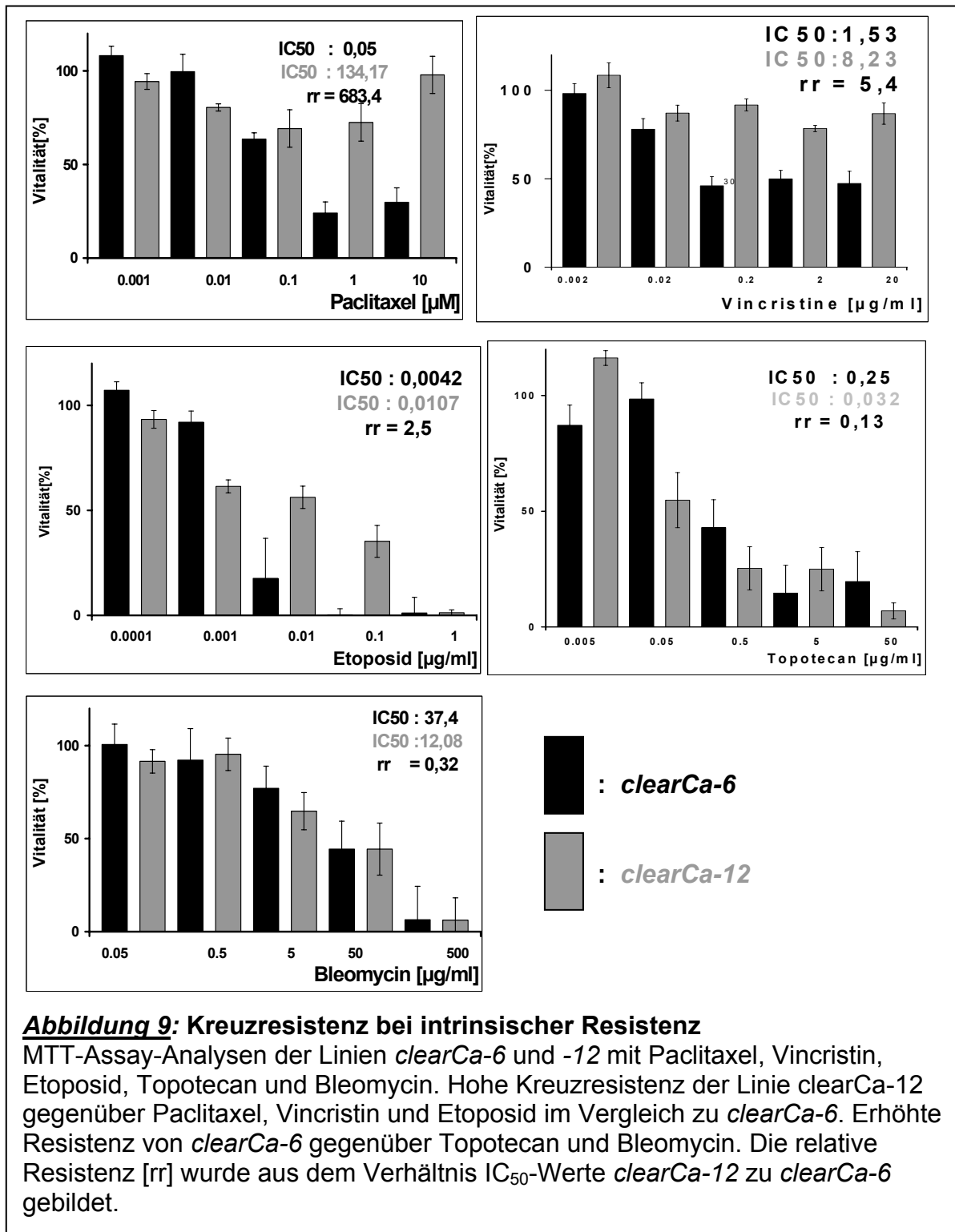
In drei Zelllinien (*clearCa-9*, *clearCa-28*, *chromphi-1*) mit hohem Rh-123-Efflux wurde P-gp durch spezifische Inhibitoren blockiert. 10 μ M Verapamil und 0,075% Cremophor[®] EL bewirkten eine effektive Reduktion des Transports. Verapamil zeigte eine Hemmung der Effizienz von 44%. Cremophor[®] EL reduzierte den Rh-123-Transport um 55%. (s. *Abbildung 8*).

Mit dem MRP-Modulator Probenecid sollte der Calcein-Efflux blockiert werden, jedoch ließ sich mit 5 mM Probenecid in keiner der Linien die Calcein-Efflux-Effizienz im Vergleich zur Kontrolle ändern (s. *Abbildung 8*).



4.1.4 Kreuzresistenz-Analysen zur intrinsischen Resistenz

Die beiden klarzelligen Karzinome *clearCa-6* und *clearCa-12* zeigten in Testreihen mit Zytostatika aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen ein abweichendes Ansprechen: Im Vergleich zu *clearCa-6* erwies sich *clearCa-12* gegenüber den Chemotherapeutika Paclitaxel, Vincristin und Etoposid, die als P-gp-Substrate bekannt sind, als wesentlich resistenter. *ClearCa-6* dagegen zeigte ein vermindertes Ansprechen auf Topotecan, ebenfalls ein P-gp-Substrat, und auf Bleomycin, das kein P-gp-Substrat ist (s. *Abbildung 9*).



4.1.5 Expressionsanalysen nach 120 h-Paclitaxel-Exposition

Nierenkarzinomzelllinien verschiedener histologischer Typen und unterschiedlicher Paclitaxel Sensitivität wurden für 120 h mit Paclitaxel-haltigem Medium kultiviert, um das Verhalten der Expression von P-gp, LRP und MRP1 auf Proteinebene zu untersuchen. Nach Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung aus den Versuchsansätzen zeigte sich für keine der 13 analysierten Zelllinien (8 klarzellige Karzinome, 4 chromophilzellige Karzinome und 1 chromophobzelliges Karzinom) eine signifikante Änderung auf Proteinebene (s. *Tabelle 8*).

Linie	IC ₅₀ [µM]	Un- behandelt	0,001 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,01 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,1 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	1 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	10 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation
<i>clearCa-2</i>	4,26	23,0 ± 0	27,0 ± 0	35,0 ± 0	32,0 ± 0	34,0 ± 0	25,0 ± 0
<i>clearCa-3</i>	1,31	34,3 ± 2,9	31,0 ± ,5	29,0 ± 7,0	34,7 ± 7,0	36,3 ± 8,3	43,3 ± 4,1
<i>clearCa-6</i>	0,05	61,7 ± 8,4	57,0 ± ,9	54,0 ± 6,7	56,3 ± 10,7	64,7 ± 9,6	61,0 ± 0
<i>clearCa-9</i>	11,34	25,0 ± 6,2	14,3 ± ,5	24,7 ± 2,9	21,0 ± 2,2	26,3 ± 5,4	19,0 ± 1,4
<i>clearCa-12</i>	134,17	55,5 ± 7,0	38,0 ± 13,5	60,5 ± 6,9	57,0 ± 11,9	59,5 ± 5,3	61,8 ± 9,1
<i>clearCa-15</i>	130,12	61,5 ± 8,5	68,5 ± 8,5	63,5 ± 6,5	53,5 ± 7,5	57,5 ± 5,5	59,5 ± 6,5
<i>clearCa-21</i>	0,39	51,0 ± 13,5	47,3 ± 5,2	49,7 ± 6,1	45,0 ± 1,6	45,3 ± 6,1	48,0 ± 8,0
<i>clearCa-28</i>	1,90	40,7 ± 12,0	31,0 ± 0	36,0 ± 2,5	36,0 ± 2,9	43,3 ± 4,9	39,3 ± 5,9
<i>chromphi-1</i>	4,84	45,0 ± 4,1	30,7 ± 8,7	31,3 ± 2,5	31,3 ± 9,0	42,0 ± 8,2	43,7 ± 1,0
<i>chromphi-2</i>	4,2	49,5 ± 10,0	49,0 ± 2,0	38,5 ± 4,0	45,8 ± 9,0	46,3 ± 3,5	49,0 ± 3,0
<i>chromphi-3</i>	0,60	13,0 ± 0	31,5 ± 19,5	11,5 ± 3,5	9,0 ± 0	14,0 ± 19,0	10,0 ± 4,0
<i>chromphi-4</i>	0,27	62,0 ± 6,4	56,8 ± 12,0	58,5 ± 9,3	56,8 ± 15,7	63,4 ± 9,1	67,0 ± 7,3
<i>chrompho-B</i>	387,50	25,5 ± 3,0	25,5 ± ,5	30,5 ± 5,0	21,0 ± 15,0	17,0 ± 5,0	25,0 ± 7,0

Tabelle 8: P-gp nach Paclitaxel-Inkubation

P-gp-Expression nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation für 13 Linien mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie in [%].

Linie	IC ₅₀ [μM]	Unbehandelt	0,001 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,01 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	10 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation
<i>clearCa-2</i>	4,26	12,0 ± 0	9,0 ± 0	9,0 ± 0	10,0 ± 0	8,0 ± 0	10,0 ± 0
<i>clearCa-3</i>	1,31	16,3 ± 2,1	17,7 ± 8,6	15,7 ± 5,3	14,3 ± 3,7	20,0 ± 5,0	18,0 ± 5,9
<i>clearCa-6</i>	0,05	42,0 ± 11,8	22,7 ± 11,4	35,0 ± 9,5	32,0 ± 19,7	36,7 ± 22,6	50,0 ± 20,4
<i>clearCa-9</i>	11,34	8,8 ± 5,9	4,3 ± 1,3	14,0 ± 0,5	7,3 ± 2,2	10,0 ± 0	12,0 ± 6,6
<i>clearCa-12</i>	134,17	55,5 ± 7,0	44,3 ± 6,1	29,0 ± 7,0	40,3 ± 12,4	39,3 ± 8,0	33,3 ± 13,2
<i>clearCa-15</i>	130,12	26,5 ± 19,5	22,5 ± 12,7	29,0 ± 25	32,0 ± 27	27,5 ± 17,5	30,5 ± 5,5
<i>clearCa-21</i>	0,39	18,8 ± 13,2	18,2 ± 8,9	20,6 ± 2,9	24,8 ± 4,3	24,2 ± 7,4	16,0 ± 0,8
<i>clearCa-28</i>	1,90	25,5 ± 10,3	19,5 ± 5,5	21,3 ± 1,4	21,3 ± 5,9	20,3 ± 1,9	23,0 ± 3,6
<i>chromphi-1</i>	4,84	29,0 ± 2,0	26,7 ± 2,9	20,7 ± 7,3	20,7 ± 1,4	18,7 ± 3	21,7 ± 2,0
<i>chromphi-2</i>	4,2	47,3 ± 7,0	48,0 ± 2,0	38,0 ± 2,0	44,5 ± 3,3	45,0 ± 5,2	41,1 ± 5,2
<i>chromphi-3</i>	0,60	25,0 ± 0	30,0 ± 21,0	19,5 ± 4,5	16,0 ± 5,0	19,0 ± 4,0	21,0 ± 15,0
<i>chromphi-4</i>	0,27	26,3 ± 17,2	11,3 ± 0,9	15,3 ± 6,9	27,8 ± 8,8	19,3 ± 6,3	32,8 ± 10,4
<i>chrompho-B</i>	387,5	19,0 ± 14,4	19,0 ± 8,2	16,0 ± 6,3	23,3 ± 16,0	20,3 ± 11,0	24,7 ± 10,2

Tabelle 9: LRP nach Paclitaxel-Inkubation

LRP-Expression nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation für 13 Linien unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie in [%].

Linie	IC ₅₀ [μM]	Unbehandelt	0,001 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,01 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	10 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation
<i>clearCa-2</i>	4,26	4,0 ± 0	22,0 ± 0	6,0 ± 0	3,0 ± 0	12,0 ± 0	9,0 ± 0
<i>clearCa-3</i>	1,31	4,0 ± 3,6	2,3 ± 1,2	2,3 ± 1,2	3,7 ± 1,2	4,7 ± 1,0	4,7 ± 0
<i>clearCa-6</i>	0,05	8,5 ± 4,5	8,0 ± 3,0	6,5 ± 5	8,0 ± 0	10,0 ± 5,0	2,0 ± 8,0
<i>clearCa-9</i>	11,34	2,0 ± 0,8	1,2 ± 0,6	2,3 ± 2	2,7 ± 0,5	16,0 ± 18,4	3,3 ± 1,2
<i>clearCa-12</i>	134,17	11,5 ± 4,7	13,7 ± 4,1	9,7 ± 1	13,0 ± 4,3	20,0 ± 13,2	3,8 ± 1,9
<i>clearCa-15</i>	130,12	4,5 ± 2,5	4,0 ± 2,0	5,5 ± 5	1,8 ± 1,25	8,0 ± 2,0	1,0 ± 0
<i>clearCa-21</i>	0,39	5,3 ± 4,7	7,3 ± 4,7	8,7 ± 3,3	15,5 ± 3,5	28,7 ± 27,3	7,7 ± 3,9
<i>clearCa-28</i>	1,90	6,3 ± 3,4	7,0 ± 3,7	5,0 ± 7	5,0 ± 0,8	9,0 ± 3,7	2,0 ± 0
<i>chromphi-1</i>	4,84	3,7 ± 2,5	3,7 ± 0	5,3 ± 5	5,3 ± 2,5	4,8 ± 1,0	8,0 ± 0
<i>chromphi-2</i>	4,2	3,4 ± 0,4	2,8 ± 1,0	2,2 ± 7	2,5 ± 1,2	3,0 ± 0,0	2,4 ± 0,9
<i>chromphi-3</i>	0,60	2,5 ± 0,5	1,5 ± 1,5	1,0 ± 0	1,5 ± 0,5	0,8 ± 0,25	0,5 ± 0,5
<i>chromphi-4</i>	0,27	9,5 ± 3,0	9,8 ± 4,8	12,5 ± 3,4	14,3 ± 5,1	14,5 ± 4,4	22,7 ± 3,7
<i>chrompho-B</i>	387,50	2,3 ± 2,2	2,3 ± 1,0	2,5 ± 5	6,7 ± 2,5	4,0 ± 0	2,3 ± 0,5

Tabelle 10: MRP nach Paclitaxel-Inkubation

MRP-Expression nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation für 13 Linien unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie in [%].

4.1.6 Rh-123- und Calcein-Efflux nach 120 h-Paclitaxel-Exposition

Zur funktionellen Analyse von P-gp und MRP nach 120 h Paclitaxel-Inkubation wurde der Rh-123- und Calcein-Efflux an 13 Linien bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Messungen wurden berechnet. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Funktionalität nach Inkubation (s. *Tabelle 11*).

Linie	IC ₅₀ [µM]	Unbehandelt	0,0 01 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,01 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,1 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	1 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation	10 µM Paclitaxel 120 h - Inkubation
<i>clearCa-2</i>	4,26	98,8 ± 4,0	92,1 ± 1,9	94,9 ± 7,8	96,1 ± ,0	95,4 ± 9,1	92,2 ± 6,2
<i>clearCa-3</i>	1,31	67,9 ± 3,5	69,1 ± 3,3	70,9 ± 2,1	60,9 ± 4,3	71,1 ± 7,2	62,1 ± 7,6
<i>clearCa-6</i>	0,05	60,9 ± 6,7	60,1 ± 3,9	65,5 ± 9,9	57,2 ± 9,7	69,8 ± 7,6	57,9 ± 8,7
<i>clearCa-9</i>	11,34	95,2 ± 3,2	86,8 ± 3,1	92,4 ± 6,9	94,1 ± 6,3	93,1 ± 8,4	93,2 ± 4,4
<i>clearCa-12</i>	134,17	62,8 ± 5,2	64,5 ± 4,5	53,3 ± 8,9	65,3 ± 7,8	60,5 ± 5,8	67,7 ± 4,1
<i>clearCa-15</i>	130,12	37,9 ± 4,5	40,1 ± 5,5	47,9 ± 8,5	37,9 ± 5,5	41,9 ± 9,8	35,3 ± 3,5
<i>clearCa-21</i>	0,39	17,1 ± 2,5	25,5 ± 5,1	13,1 ± 2,1	15,9 ± 2,6	20,9 ± 7,1	19,0 ± 5,0
<i>clearCa-28</i>	1,90	86,9 ± 9,1	79,8 ± 6,0	90,7 ± 4,4	88,1 ± 3,9	81,2 ± 6,8	82,1 ± 3,9
<i>chromphi-1</i>	4,84	97,4 ± 8,1	91,3 ± 4,7	85,9 ± 5,5	89,0 ± 8,0	96,7 ± 8,1	91,1 ± 3,4
<i>chromphi-2</i>	4,2	89,2 ± 10,1	83,4 ± 6,1	89,9 ± 1,0	93,5 ± 9,8	96,9 ± 5,5	94,8 ± 6,7
<i>chromphi-3</i>	0,60	58,9 ± 0,8	37,9 ± 0,1	43,9 ± 3,9	75,6 ± 10,9	62,1 ± 8,9	58,3 ± 4,9
<i>chromphi-4</i>	0,27	94,8 ± 7,4	94,9 ± 10,0	91,2 ± 9,3	84,9 ± 7,7	87,8 ± 9,1	91,1 ± 5,3
<i>chrompho-B</i>	387,50	13,4 ± 4,1	6,7 ± 1,5	11,1 ± 2,8	16,2 ± 5,0	16,3 ± 7,2	13,2 ± 4,1

Tabelle 11: Rh123-Efflux nach Paclitaxel-Inkubation

Rh-123-Efflux-Effizienz nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation von 13 Linien mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie.

Linie	IC ₅₀ [μM]	Unbehandelt	0,001 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,01 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	0,1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	1 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation	10 μM Paclitaxel 120 h - Inkubation
ClearCa-2	4,26	86,0 ± 0,5	83,5 ± 5,0	87,5 ± 0,0	76,0 ± 8,0	71,9 ± 2	89,4 ± 4,5
ClearCa-3	1,31	53,7 ± 9,1	58,3 ± 9,6	67,2 ± 0,9	80,1 ± 2,7	57,7 ± 5,2	59,3 ± 9,9
ClearCa-6	0,05	51,6 ± 10,8	47,9 ± 6,7	48,9 ± 0,5	52,3 ± 11,7	45,3 ± 10,6	50,2 ± 11,4
ClearCa-9	11,34	75,5 ± 6,7	81,8 ± 8,3	86,6 ± 6,5	88,9 ± 3	89,2 ± 2,0	80,7 ± 5,6
ClearCa-12	134,17	64,5 ± 3,1	75,3 ± 3,1	76,4 ± 0,0	73,1 ± 8,9	67,6 ± 7,2	68,8 ± 1,2
ClearCa-15	130,12	62,3 ± 8,9	60,0 ± 10,7	70,1 ± 3,1	59,8 ± 9,8	60,9 ± 11,5	68,1 ± 5,5
ClearCa-21	0,39	68,7 ± 10,2	55,9 ± 9,9	57,9 ± 0,9	65,2 ± 2,3	59,8 ± 7,4	70,3 ± 6,8
ClearCa-28	1,90	25,5 ± 10,3	19,5 ± 5,5	21,3 ± 1,4	21,3 ± 5,9	20,3 ± 1,9	23,0 ± 3,6
Chromphi-	4,84	65,5 ± 7,6	79,6 ± 4,9	74,1 ± 9,2	65,7 ± 9,4	66,5 ± 3	54,6 ± 3,1
Chromphi-2	4,2	62,2 ± 0,5	74,5 ± 5,0	83,7 ± 0	65,9 ± 8,0	59,5 ± 2	64,3 ± 4,5
Chromphi-3	0,60	55,1 ± 4,0	67,4 ± 11,9	62,1 ± 9,5	73,1 ± 7,0	51,9 ± 0,0	63,2 ± 7,9
Chromphi-4	0,27	40,6 ± 11,3	40,9 ± 9,9	41,3 ± 7,9	38,9 ± 0,8	39,0 ± 4,3	42,1 ± 10,1
Chrompho-B	387,50	38,5 ± 11,4	52,1 ± 9,2	60,9 ± 2,3	59,7 ± 9,0	40,6 ± 10,9	41,3 ± 8,7

Tabelle 12: Calcein-Efflux nach 120 h-Paclitaxel Inkubation

Calcein-Efflux-Effizienz nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation von 13 Linien mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie.

4.2 Untersuchung von P-gp, LRP und MRP bei erworbene Resistenz

4.2.1 Kreuzresistenzanalysen bei erworbener Paclitaxel-Resistenz

Das Ansprechen der Paclitaxel-sensitiven Zelinien *clearCa-21_{sens}* und der Paclitaxel-resistenten Zelllinie *clearCa-21_{res}* auf die Zytostatika Paclitaxel, Vincristin, Etoposid, Topotecan und Bleomycin wurde im MTT-Assay verglichen. Nach Berechnung der IC₅₀-Werte zeigte sich, dass die Paclitaxel-resistente Linie *clearCa-21_{res}* (IC₅₀>1000 µM) auch gegenüber den meisten anderen Zytostatika mit Ausnahme von Bleomycin ein deutlich vermindertes Ansprechen aufweist (s. *Abbildung 10*).

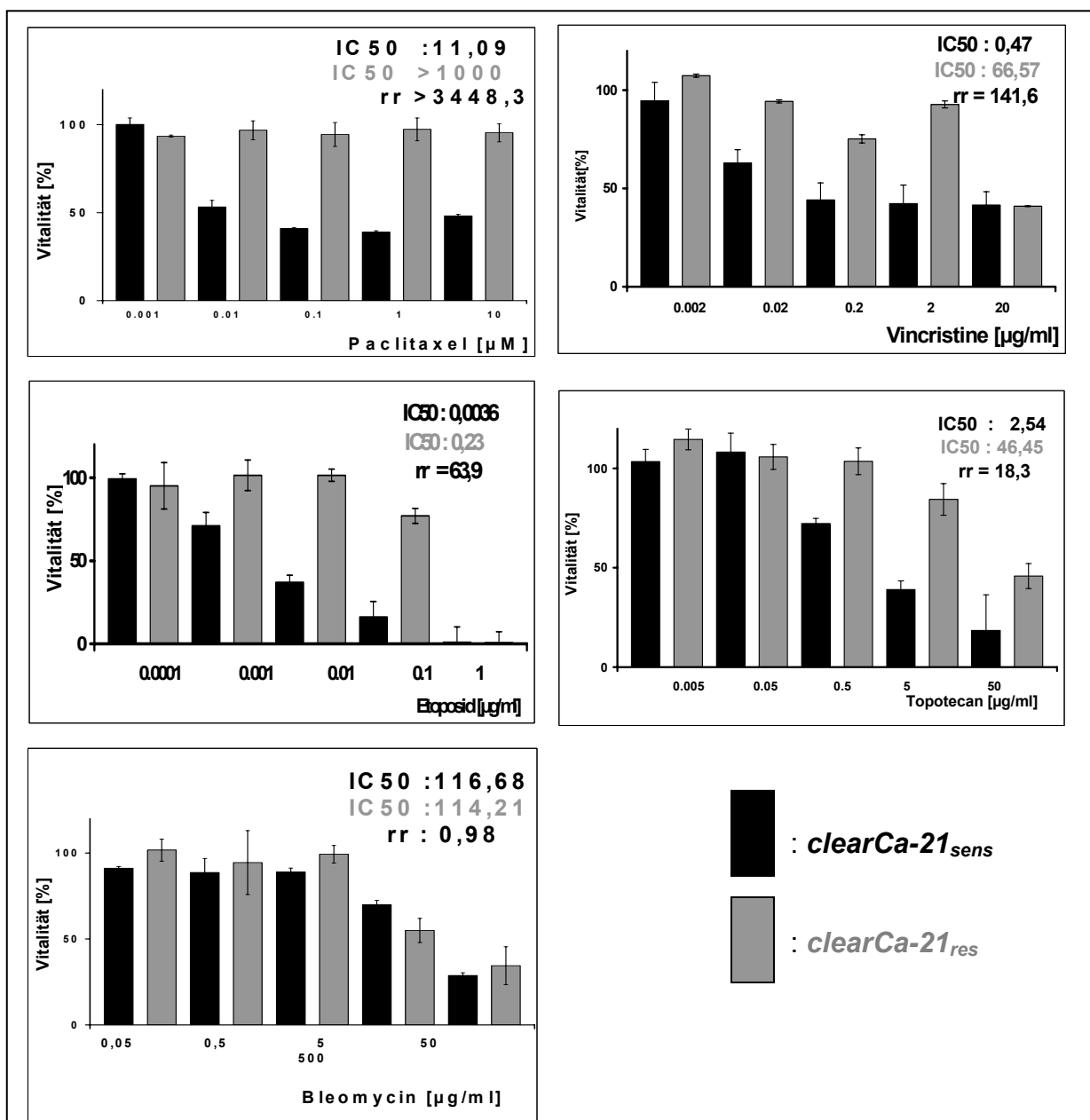
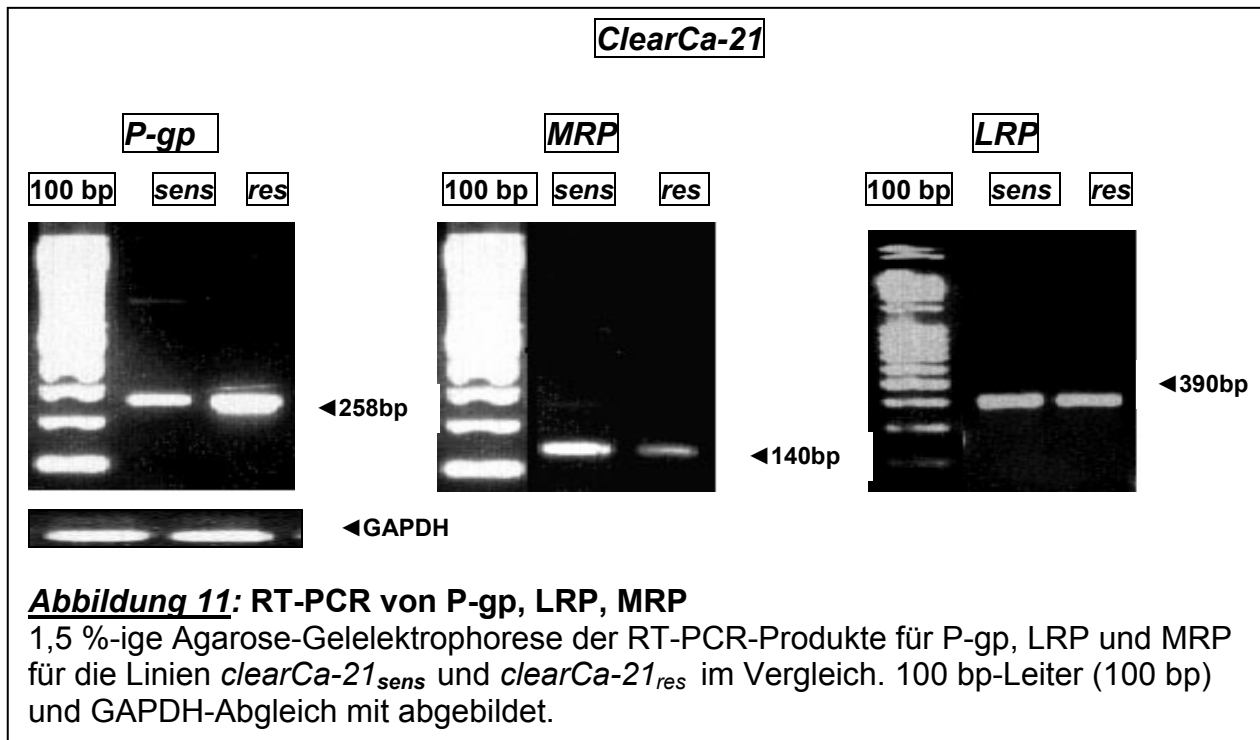


Abbildung 10: Kreuzresistenz bei erworbener Resistenz

Darstellung der Zytostatika-Toxizität in den Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* für Paclitaxel, Vincristin, Etoposid, Topotecan und Bleomycin. Deutlich erhöhte Resistenz des Subklons *clearCa-21_{res}* im Vergleich zur Mutterlinie. Für Bleomycin in etwa gleiches Ansprechen.

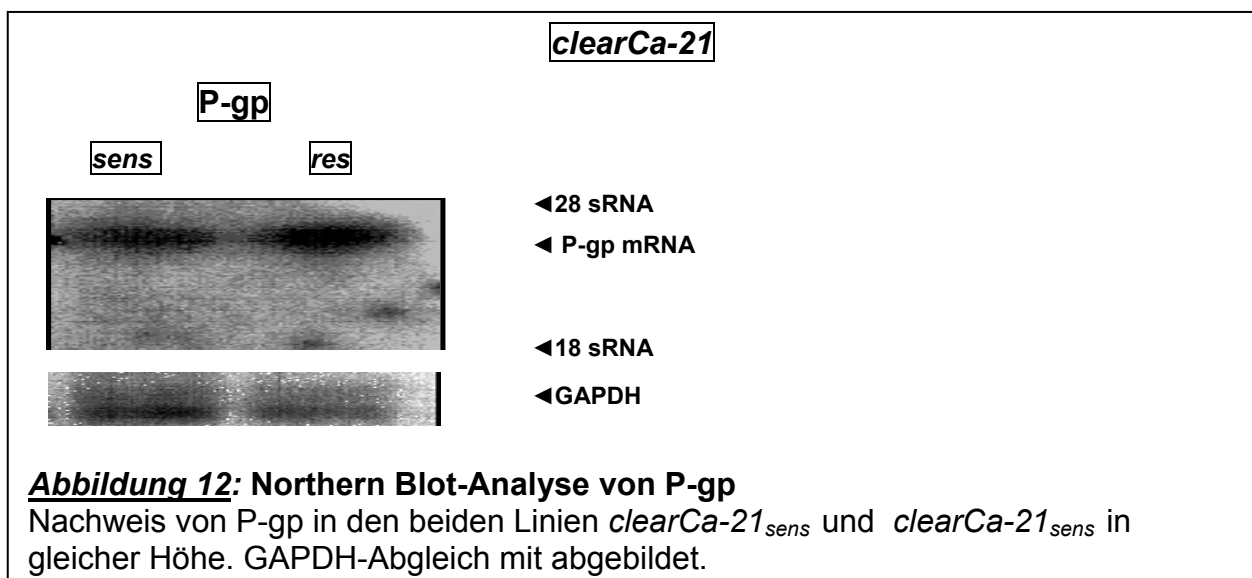
4.2.2 RT-PCR-Analyse der mRNA für P-gp, LRP, MRP

Bei der Analyse der mRNA von P-gp, LRP und MRP ließen sich alle drei Gene durch RT-PCR nachweisen. Die Bandenhöhe im Agarosegel stimmte mit der erwarteten Höhe überein. Die PCR-Produkte wurden einmal sequenziert, um die erfolgreiche Amplifikation zu bestätigen. (s. *Abbildung 11*). Die RT-PCR wurde zweimal reproduziert.



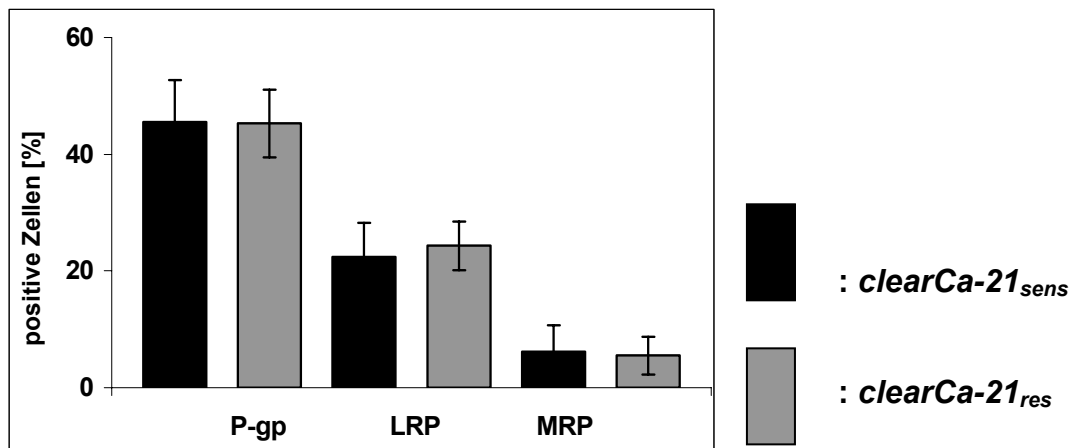
4.2.3 Northern Blot- Analyse der quantitativen mRNA-Expression für P-gp

Die direkt quantitative Analyse der mRNA-Expression von P-gp durch den Northern Blot zeigte die in etwa gleich hohe Expression in den beiden Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* (s. *Abbildung 12*).



4.2.4 FACS-Analysen zur Proteinexpression von P-gp, LRP, MRP

Bei der Proteinmessung mittels Durchflußzytometrie in den Linien *clearCa21_{sens}* und *clearCa-21_{sens}* zeigte sich eine identisch hohe P-gp-, LRP- und MRP-Expression auf Proteinebene (s. *Abbildung 13*). Mittelwerte und Standardabweichung von 10 Messungen gingen in die Bewertung ein.



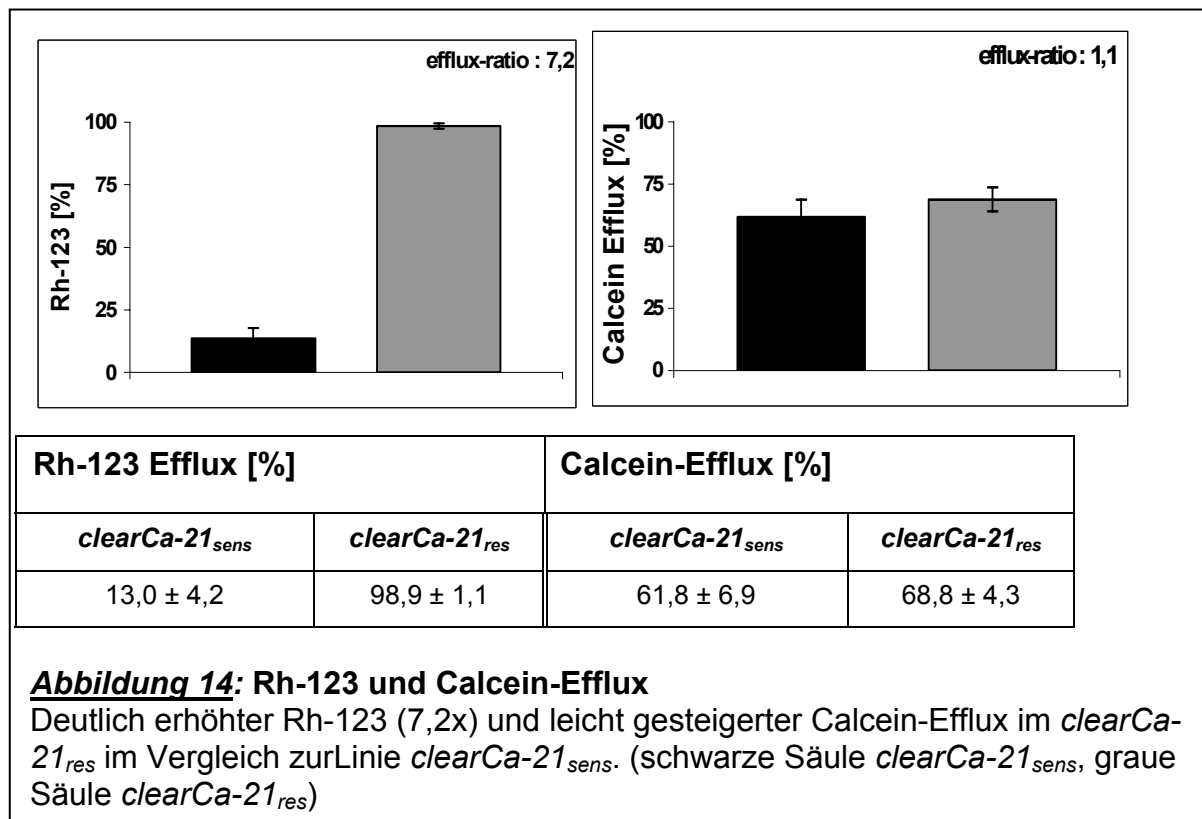
P-gp		LRP		MRP	
<i>clearCa-21_{sens}</i>	<i>clearCa-21_{res}</i>	<i>clearCa-21_{sens}</i>	<i>clearCa-21_{res}</i>	<i>clearCa-21_{sens}</i>	<i>clearCa-21_{res}</i>
45,5 ± 7,2	45,3 ± 5,8	22,4 ± 5,9	24,3 ± 4,2	6,2 ± 4,5	5,4 ± 3,0

Abbildung 13: FACS-Analysen zur Proteinexpression

Vergleich des P-gp-, LRP- und MRP-Gehalts in den Linien *clearCa-21_{sens/res}*. Gleich hohe Expression der Proteine.

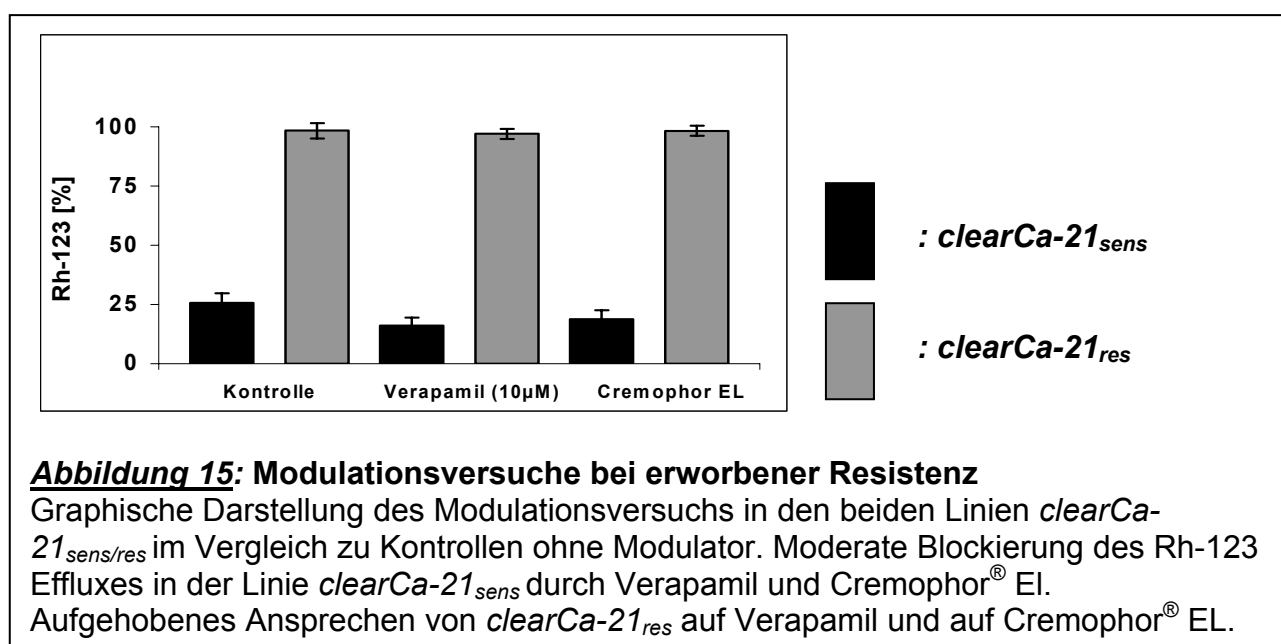
4.2.5 Rhodamin- und Calcein-Efflux-Assays für P-gp und MRP

Zur Bestimmung der funktionellen Aktivität wurden die beiden Linien *clearCa21_{sens}* und *clearCa-21_{sens}* dem Efflux-Assay unterzogen und das Verhältnis der beiden Efflux-Werte als *efflux-ratio* (Efflux *clearCa-21_{sens}*: Efflux *clearCa-21_{res}*) miteinander verglichen (s. *Abbildung 14*). Der Rh-123-Efflux zeigte eine deutlich erhöhte Aktivität von P-gp (*efflux-ratio*: 7,2) in der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}*. Der Calcein-Efflux erwies sich dagegen nur als geringfügig gesteigert (*efflux-ratio*: 1,1).



4.2.6 Modulationsversuche

Es wurde versucht, den Rh-123-Efflux mit den Inhibitoren Verapamil und Cremophor[®] EL zu modulieren. In der Linie *clearCa-21_{sens}* ließ sich durch Verapamil eine Verminderung des Rh-123-Effluxes um 37% und durch Cremophor[®] EL um 29% erreichen. In der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}* konnte keine Blockierung des Rh-123-Effluxes durch Verapamil oder Cremophor[®] EL erzielt werden (s. *Abbildung 15*).



4.3 Tubulin-Expression bei intrinsischer Paclitaxel-Resistenz

4.3.1 RT-PCR-Analysen der mRNA-Expression der Tubuline

In 8 Nierenkarzinomzelllinien mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität (IC_{50} -Werte zwischen $0,03 \mu M$ u. $134,17 \mu M$) wurde die mRNA-Expression von verschiedenen β -Tubulin-Isotypen und γ -Tubulin mittels RT-PCR untersucht. Alle untersuchten Gene konnten in den Linien in der Agarosegelelektrophorese detektiert werden und durch Sequenzierung bestätigt werden (s. *Abbildung 16 bis 20*).

Für β_{II} -, β_{Va} - und β_{Vb} -Tubulin zeigten sich in allen untersuchten Linien gleich starke Signale (s. *Abbildung 16, 18, -19*).

Für den Isotyp β_{III} zeigte sich eine heterogene Expression, wobei in den Zelllinien *clearCa-12* und *clearCa-15* reproduzierbar das stärkste Signal zu finden war. Für die übrigen Transkripte ließen sich in etwa gleich starke bzw. keine Signale detektieren (s. *Abbildung 17*). Negativkontrollen mit Wasser anstatt RNA bzw. cDNA sowie GAPDH-Abgleich wurden für alle Proben durchgeführt.

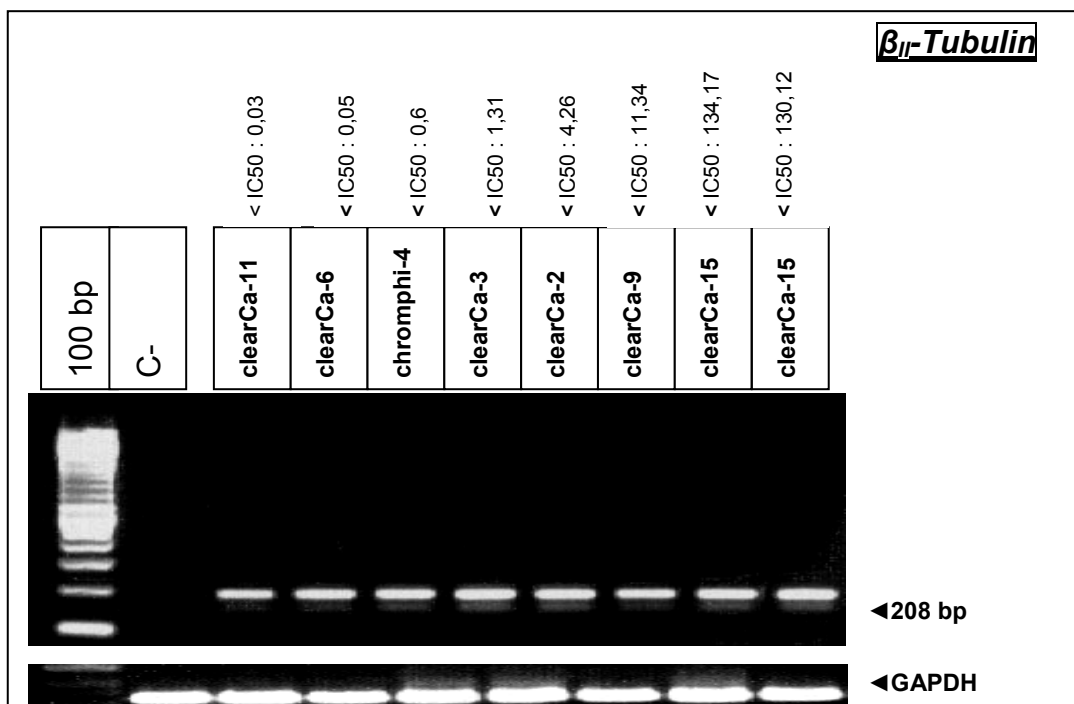
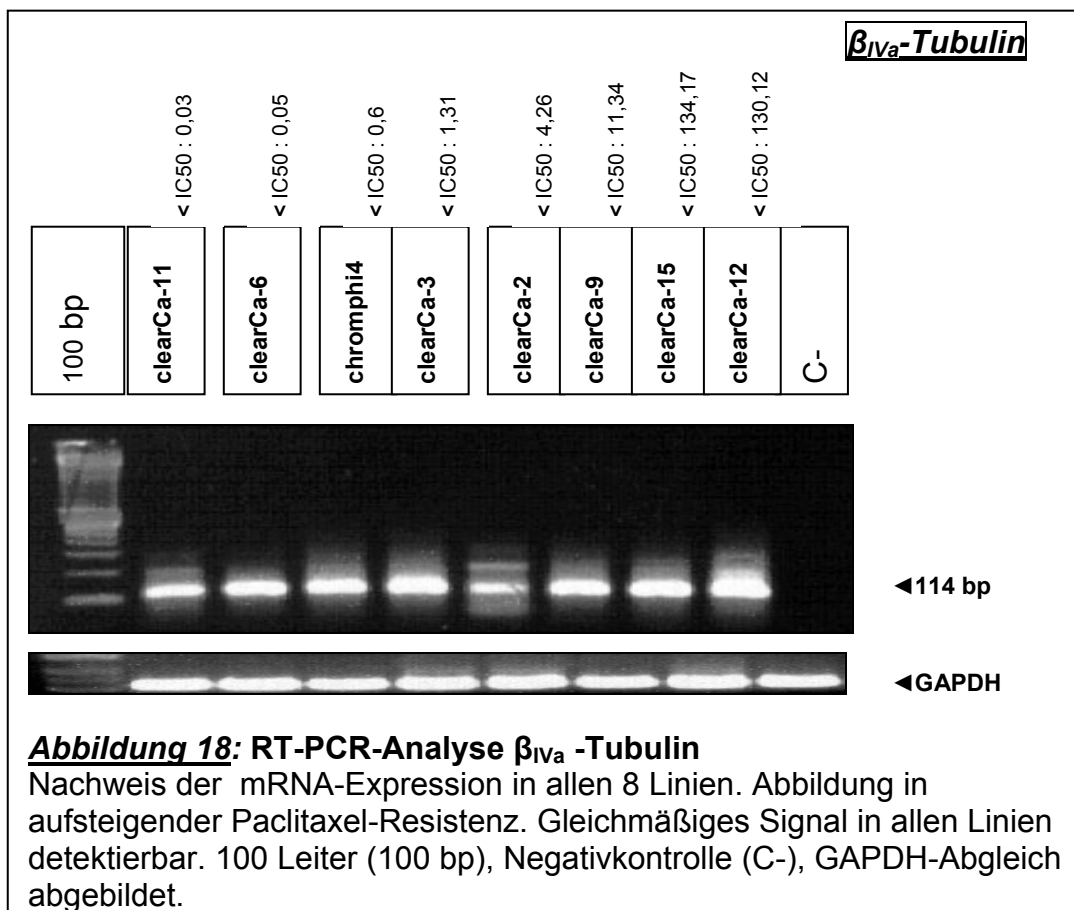
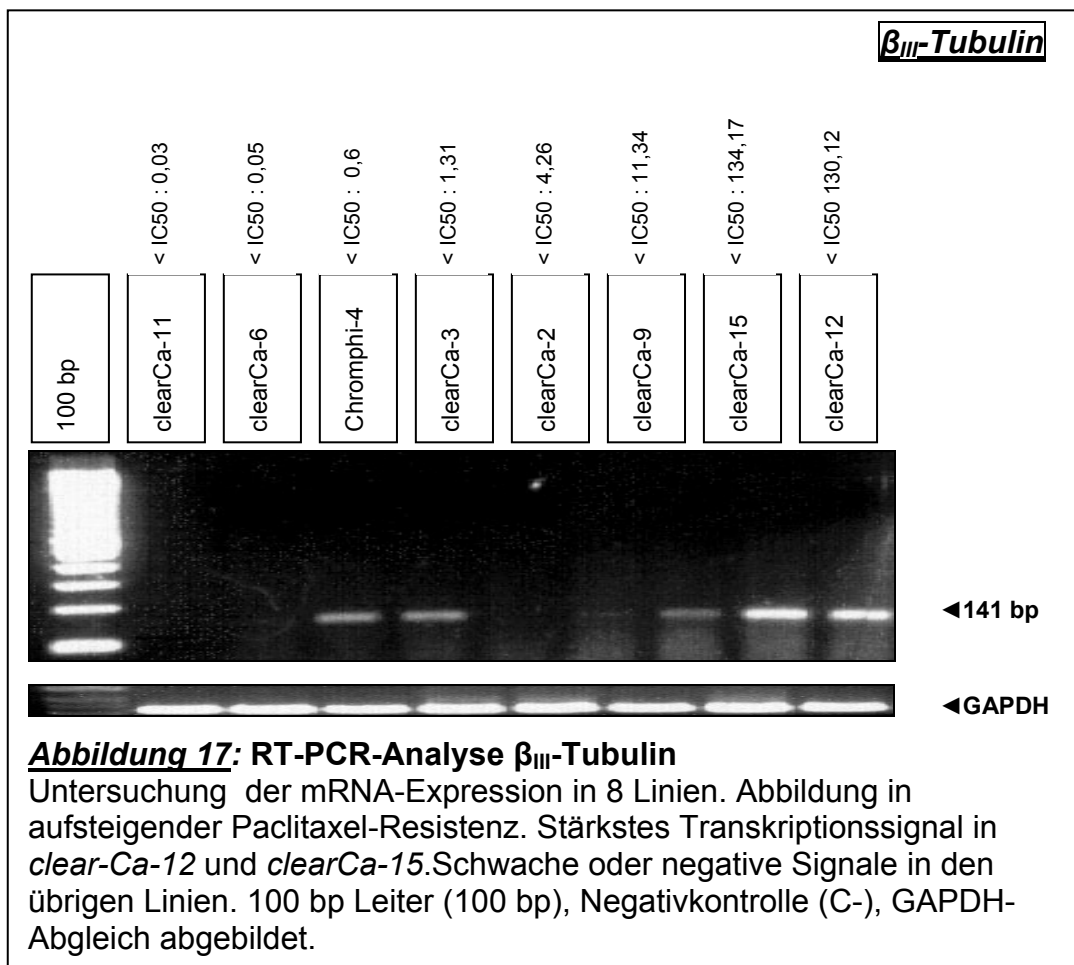
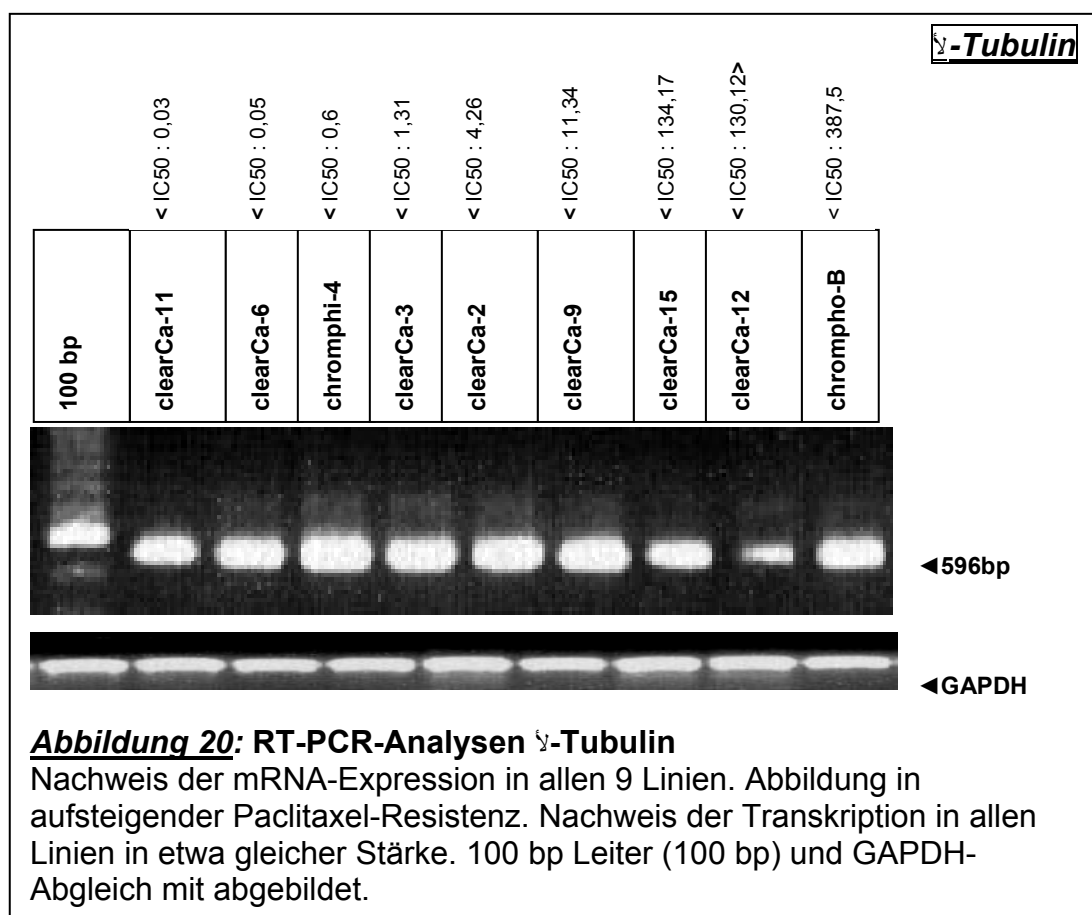
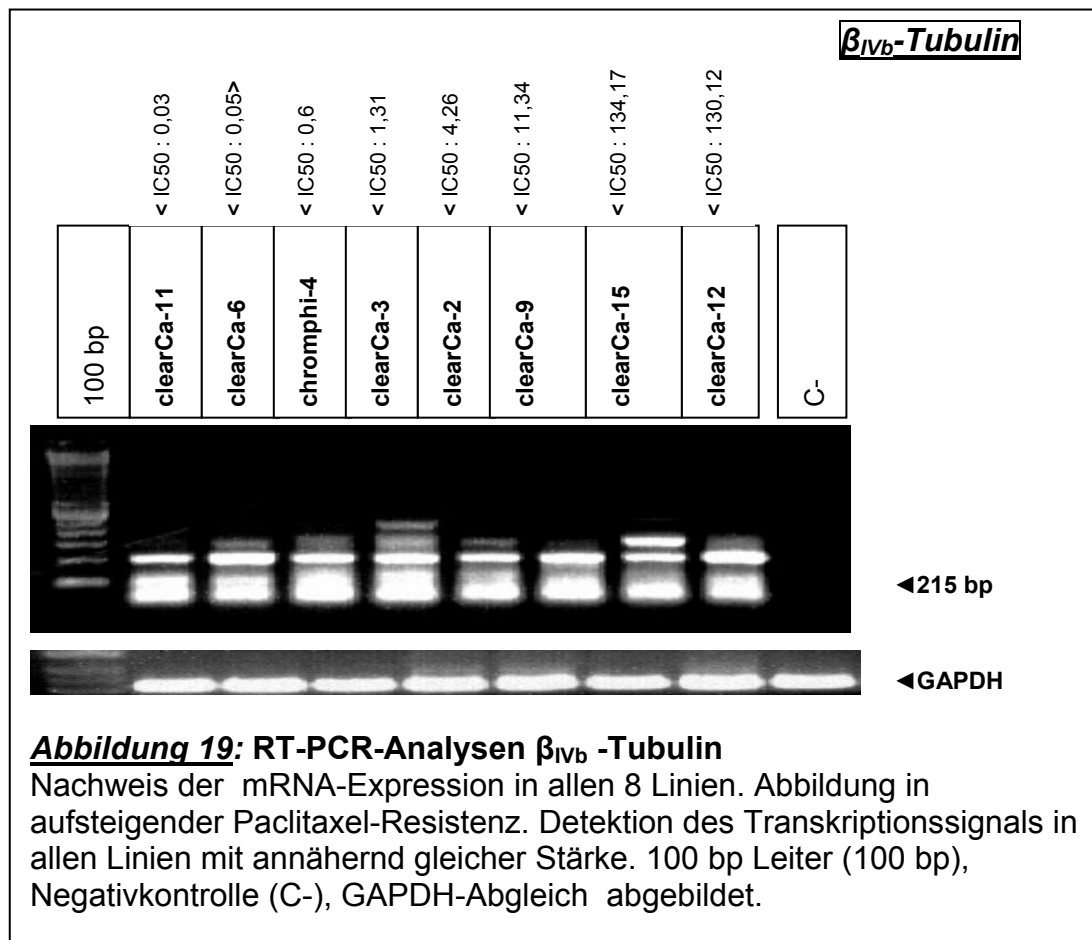


Abbildung 16: RT-PCR-Analyse β_{II} -Tubulin

Nachweis der mRNA-Expression in allen 8 Linien. Abbildung in aufsteigender Paclitaxel-Resistenz. Transkript-Nachweis in allen Linien ohne deutlichen Signalunterschied. 100 bp Leiter (100 bp), Negativ - kontrolle (C-) und GAPDH-Abgleich abgebildet.



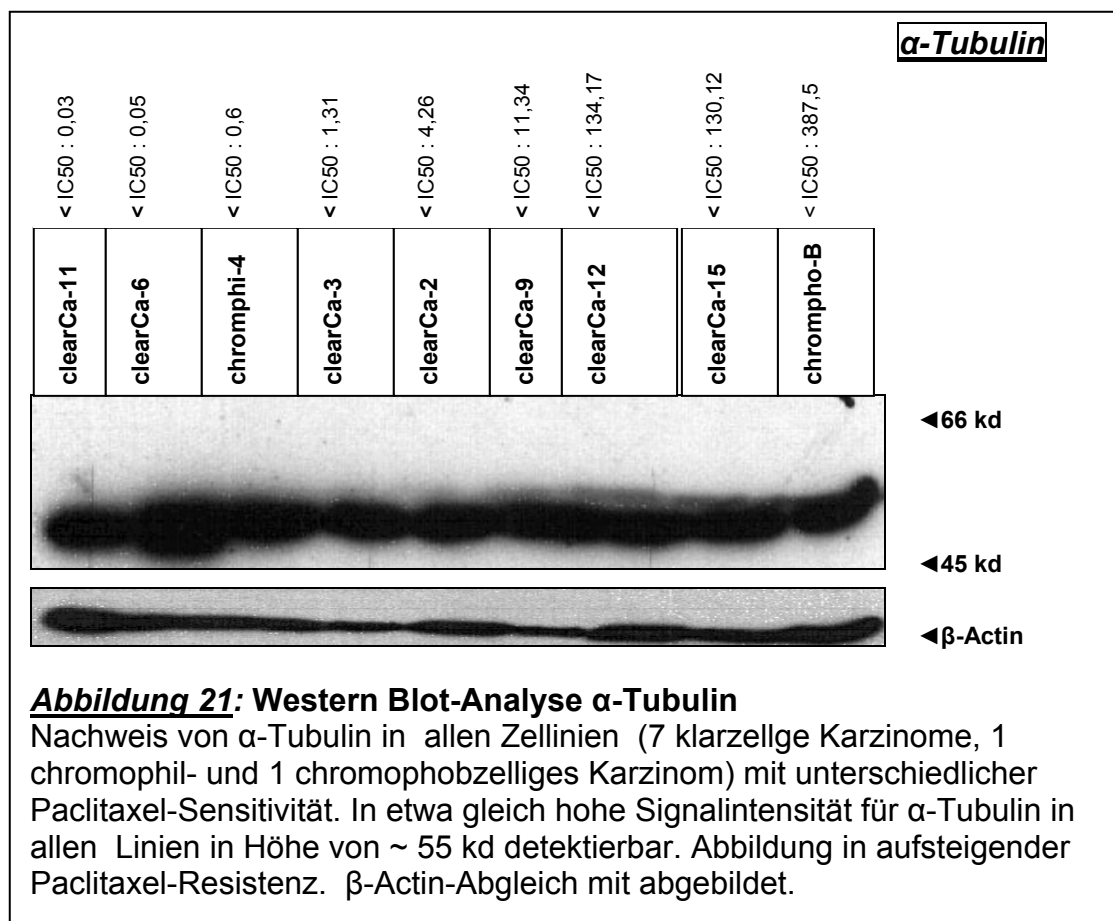


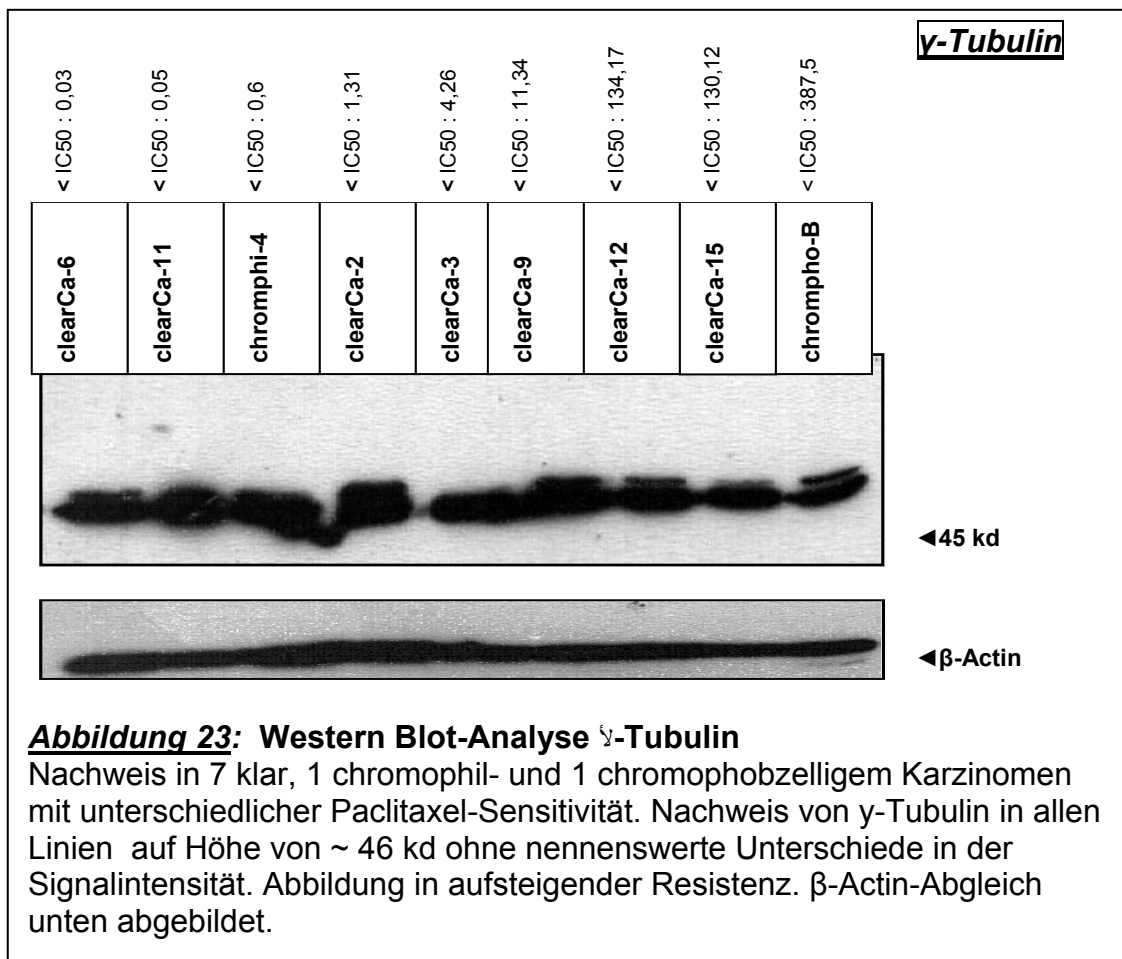
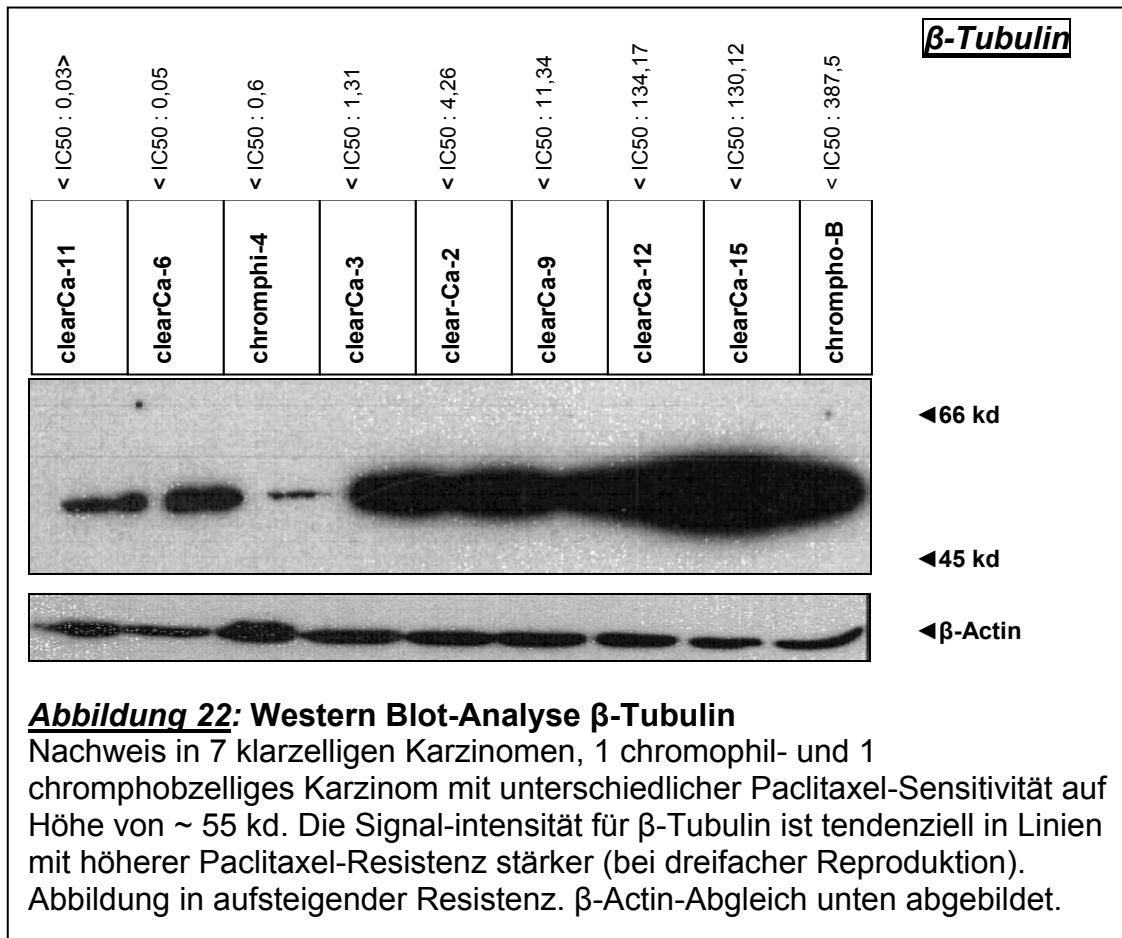
4.3.2 Western Blot-Analysen von α -, β -, γ -Tubulin bei intrinsischer Resistenz

In 9 Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Histologie (7 klarzellige Karzinome, 1 chromophil-, 1 chromophobzelliges Karzinom) und Paclitaxel-Sensitivität wurde die Expression von α -, β - und γ -Tubulin im Western Blot analysiert. Ein β -Actin-Abgleich diente der Standardisierung und Qualitätskontrolle. Für jede Linie ließen sich die Proteinbanden für alle untersuchten Tubuline detektieren.

In 3 Versuchsansätzen zeigte sich zwischen den einzelnen Zelllinien eine für α - und γ -Tubulin in etwa gleich hohe Expression (s. *Abbildung 21 und 23*).

Für β -Tubulin zeigte sich in 3 Versuchsansätzen eine heterogene Expression auf Proteinebene, wobei die resistenteren Linien tendenziell eine höhere Signalintensität aufwiesen (s. *Abbildung 22*).

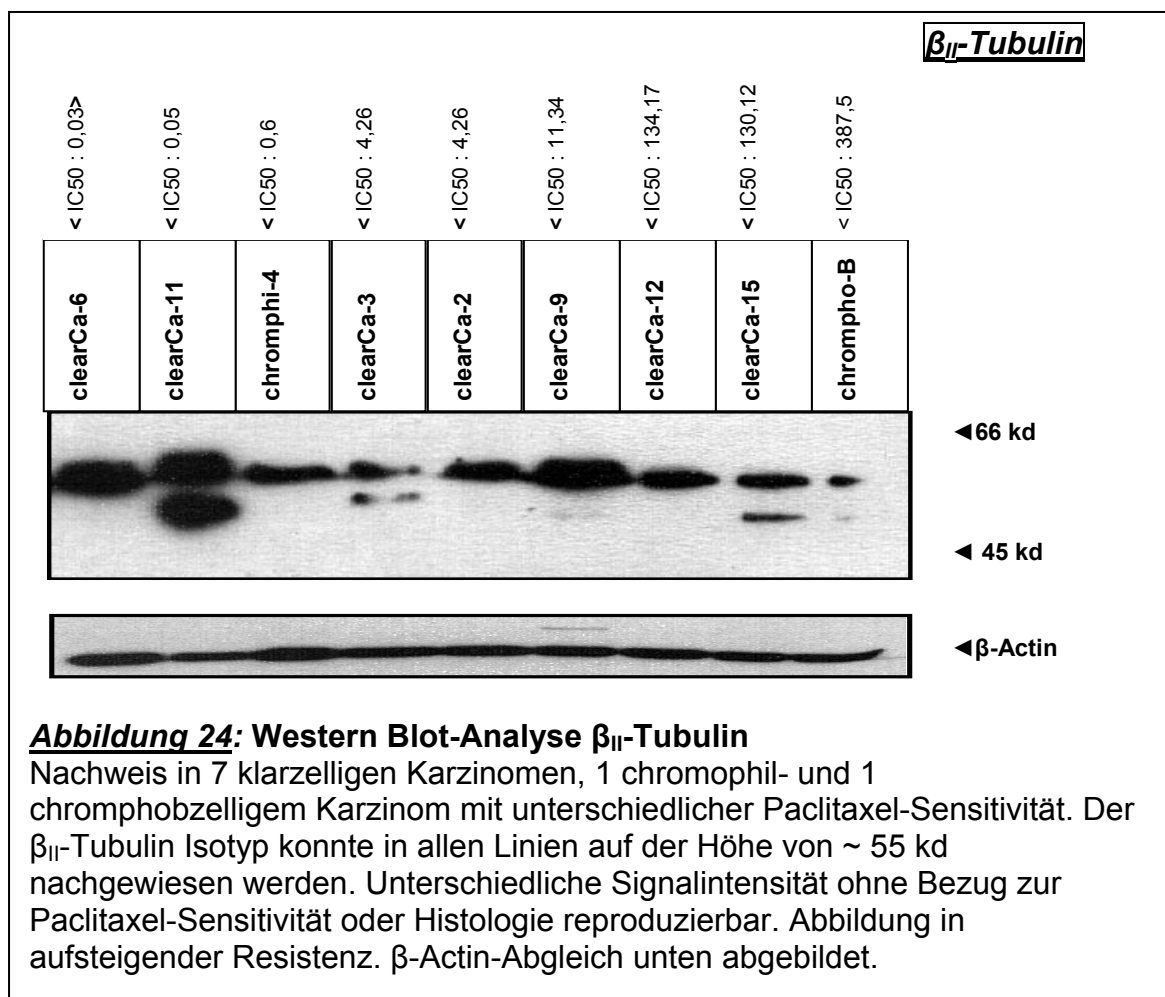


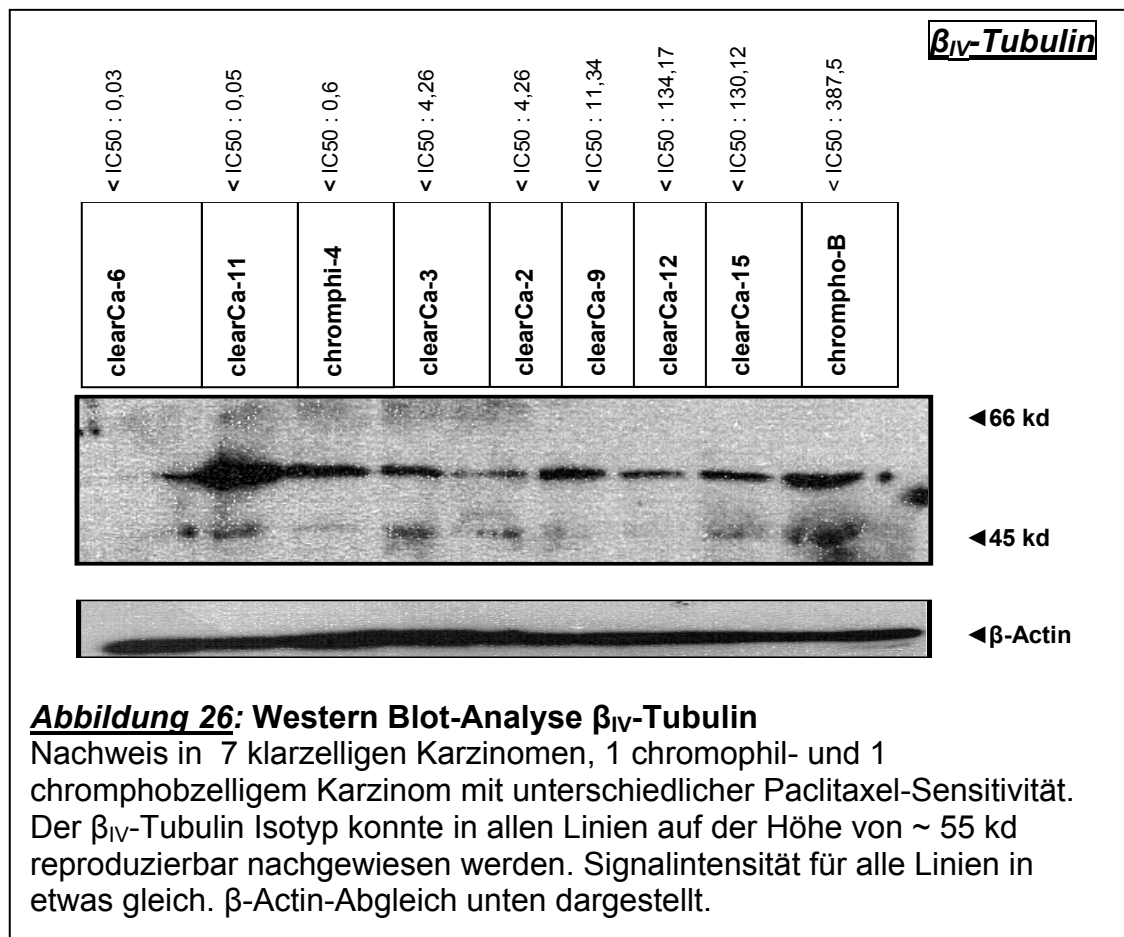
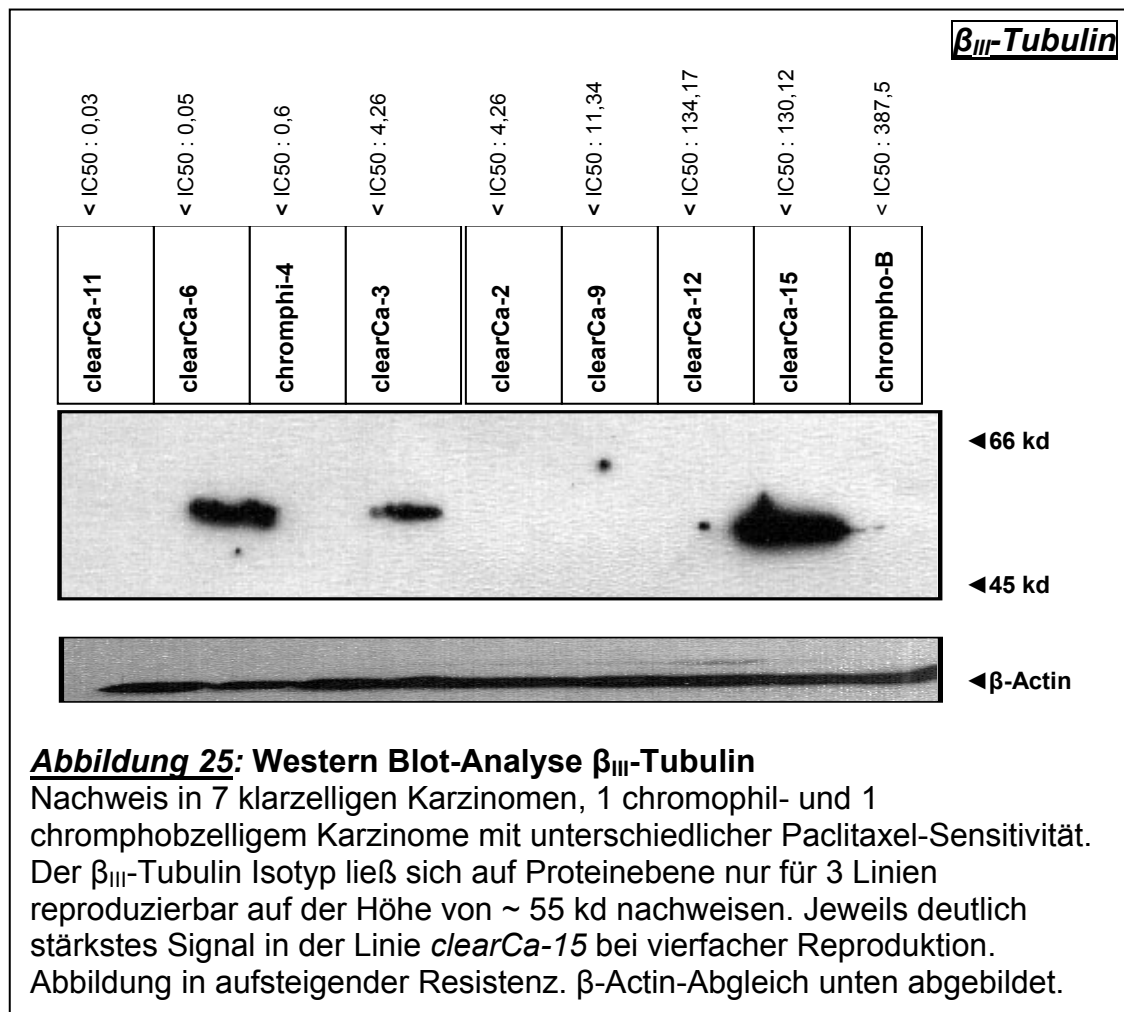


4.3.3 Western Blot-Analysen der β -Isotypen

In 9 Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Histologie (8 klarzellige Karzinome, 1 chromophil-, 1 chromophobzelliges Karzinom) und Paclitaxel-Sensitivität erfolgte mit dem Western Blot die quantitative Bestimmung der Proteinexpression für die β -Tubulin-Isotypen β_{II} , β_{III} und β_{IV} . Ein β -Actin-Abgleich wurde zur Standardisierung und Qualitätskontrolle mitgeführt. Die Auftragung der Linien erfolgte in aufsteigender Paclitaxel-Resistenz (IC_{50} -Werte). Mindestens 4 Ansätze aus neuen Proteinlysaten gingen in die Auswertung ein.

β_{II} -Tubulin konnte in allen untersuchten Linien mit wechselnder Signalintensität detektiert werden. Eine Beziehung zur Paclitaxel-Sensitivität ließ sich nicht nachweisen (s. *Abbildung 24*). β_{III} -Tubulin konnte in 3 der 9 untersuchten Zelllinien gefunden werden. In allen 4 Ansätzen zeigte die Linie *clearCa-15* eine besonders hohe Signalintensität (s. *Abbildung 25*), ähnlich wie auf mRNA-Ebene, wo die Linie *clearCa-15* mit starkem Signal nachzuweisen ist (vgl. *Abbildung 17*). Für β_{IV} -Tubulin ließen sich in allen analysierten Linien Signale in ähnlicher Stärke finden (s. *Abbildung 26*).





4.3.4 RT-PCR Analysen der β -Tubulin-Isotypen bei erworbener Resistenz

In der Paclitaxel-resistenten Zelllinie *clearCa-21_{res}* und der Paclitaxel-sensitiven Zelllinie *clearCa-21_{sens}* wurde mittels RT-PCR-Reaktion die mRNA-Expression der β -Tubulin-Isotypen im Vergleich analysiert. Alle Isotypen konnten mit gleicher Signalintensität durch Agarosegelelektrophorese detektiert werden (s. *Abbildung 27 A.-D.*). Eine Sequenzierung der PCR-Produkte zur Bestätigung der Amplifikation erfolgte einmal im Anschluss. Ein GAPDH-Abgleich zur Standardisierung und Qualitätskontrolle wurde mitgeführt.

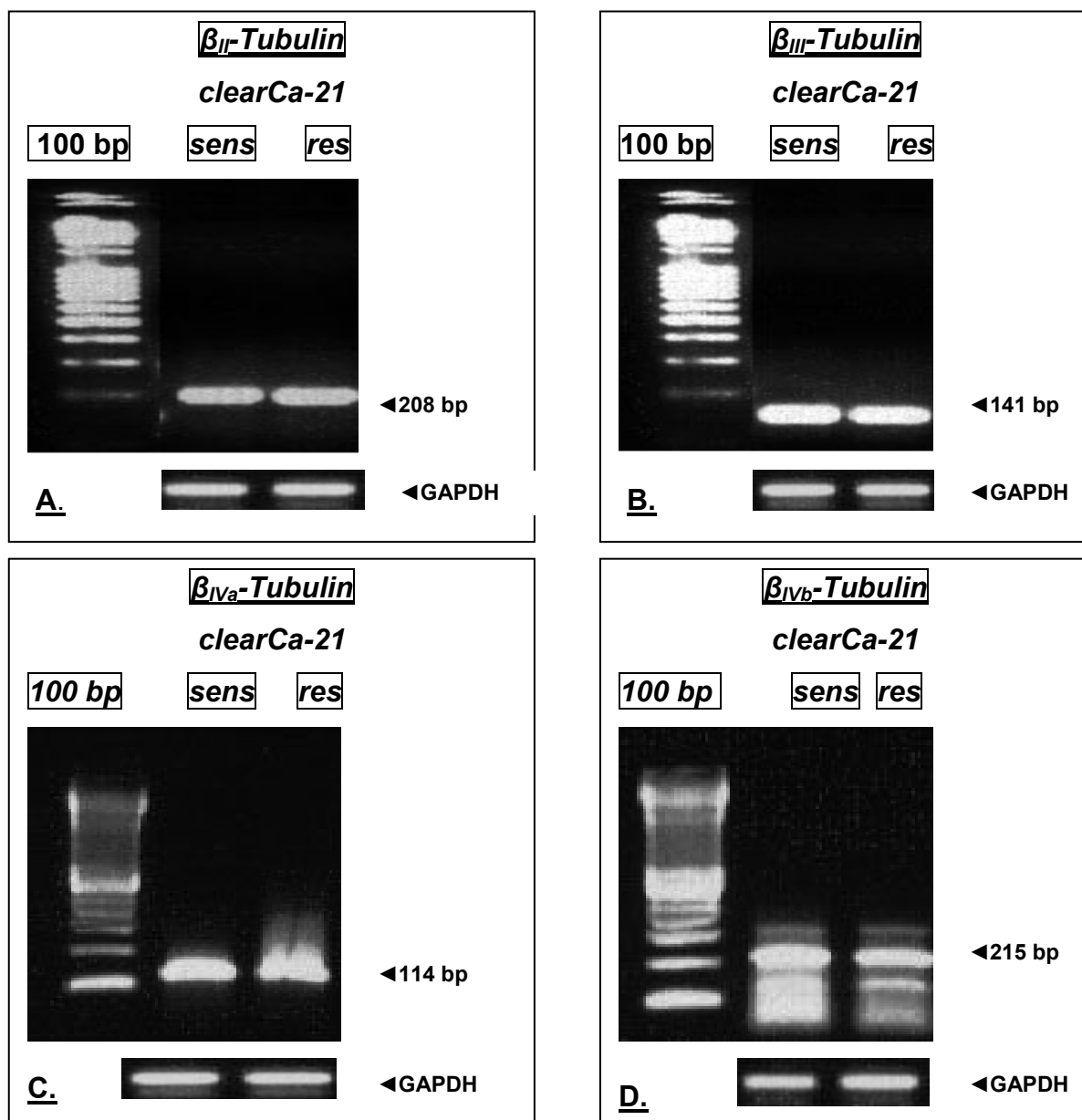


Abbildung 27: RT-PCR-Analysen der β -Tubulin-Isotypen

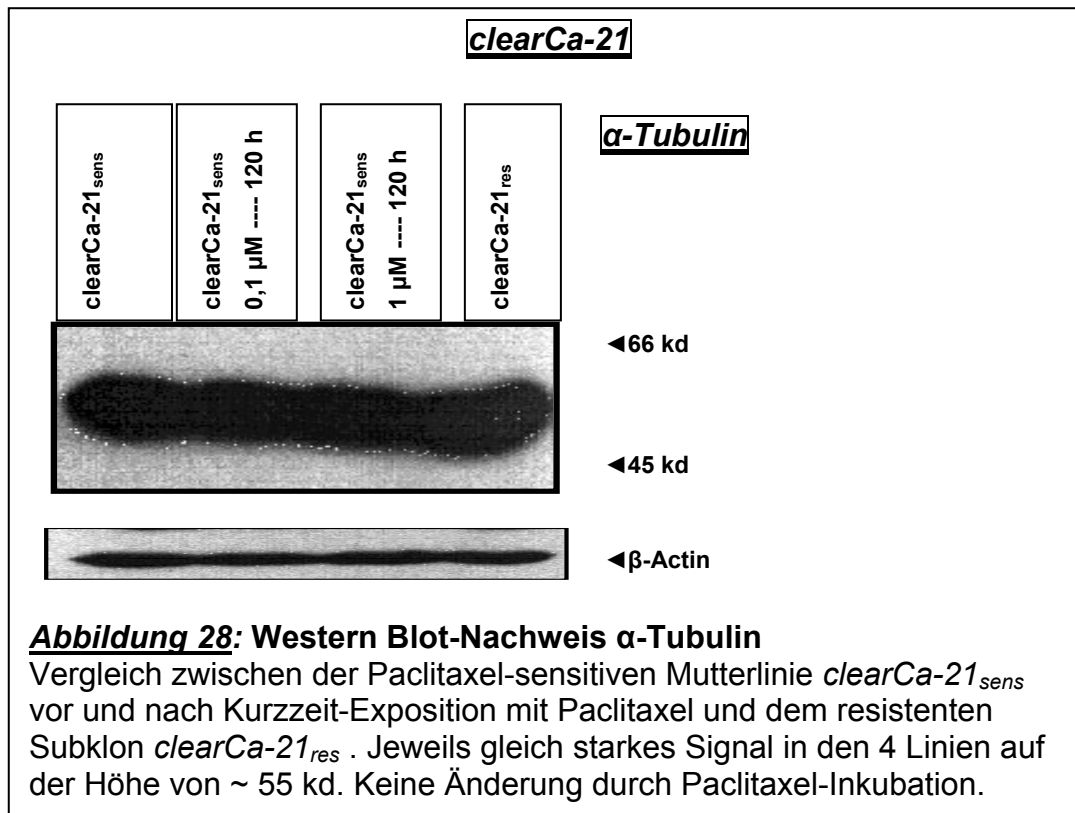
Nachweis aller Isotypen in beiden Linien in gleicher Signalintensität. GAPDH-Abgleich unten abgebildet. 100 bp Leiter (100 bp) linker Rand.

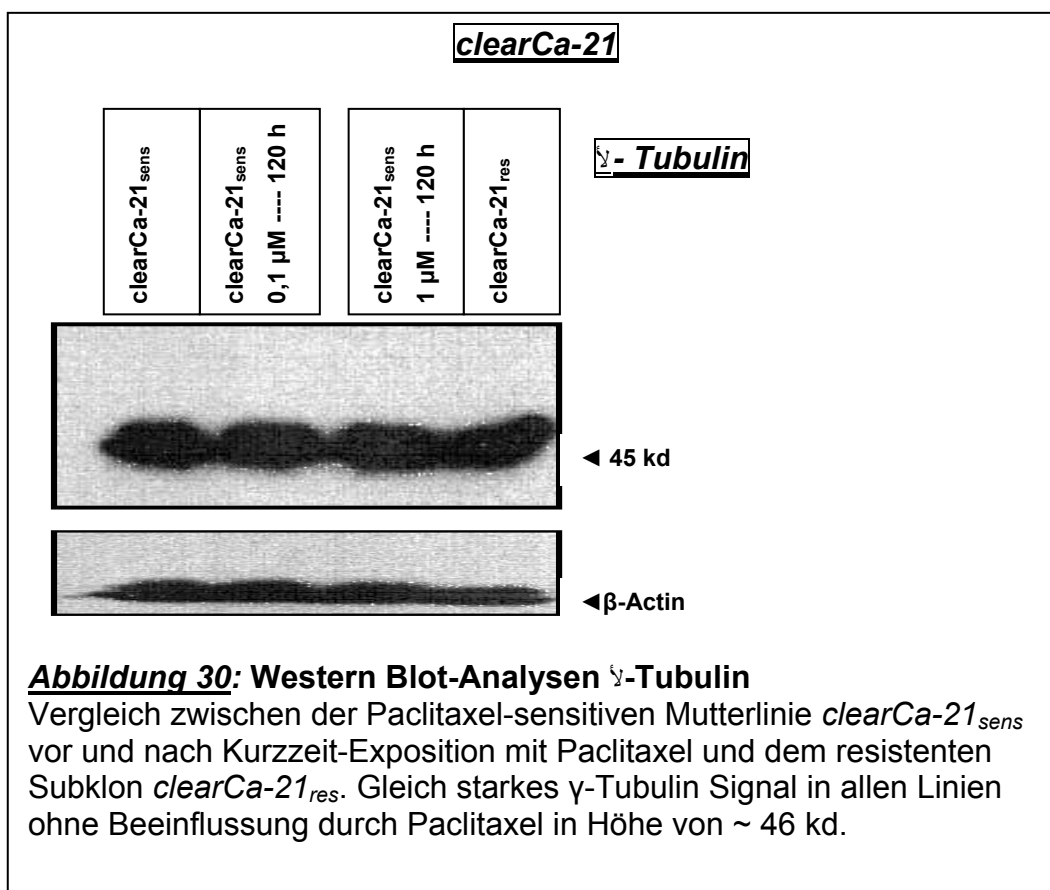
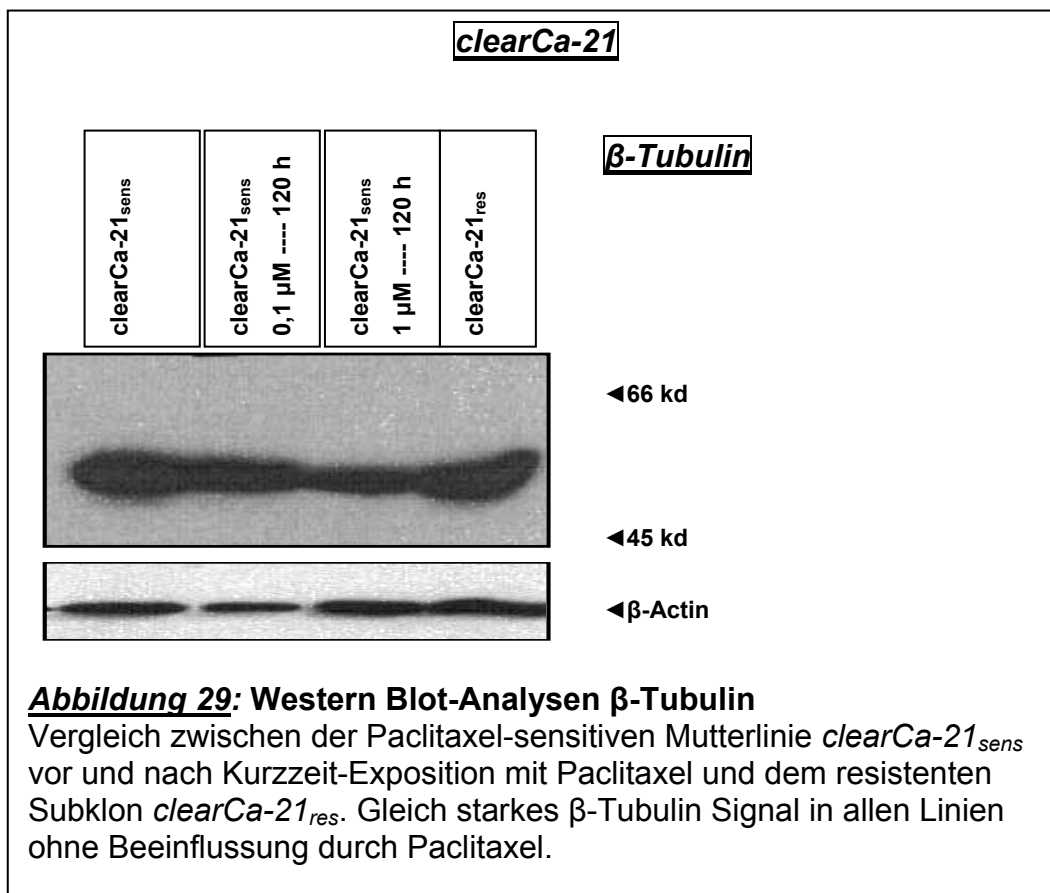
4.3.5 Western Blot-Analysen der Tubuline bei erworbener Resistenz

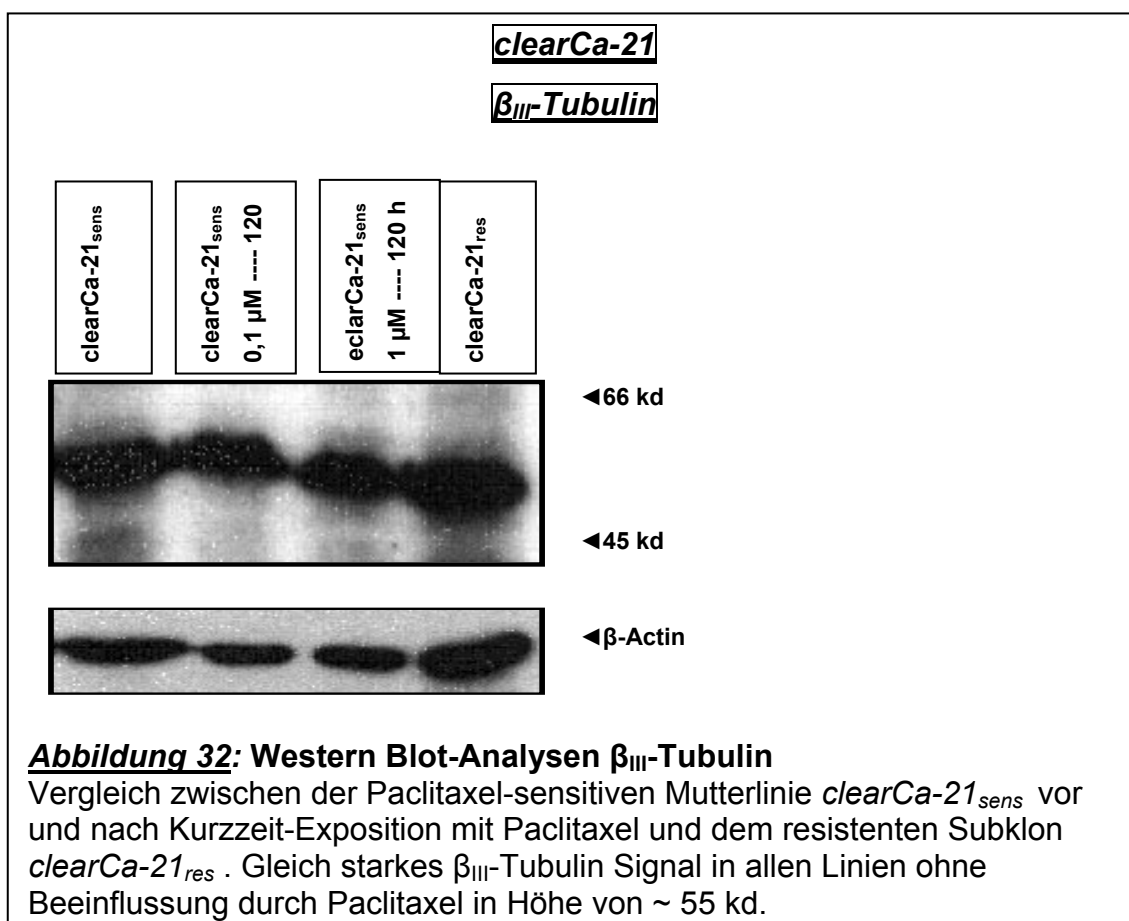
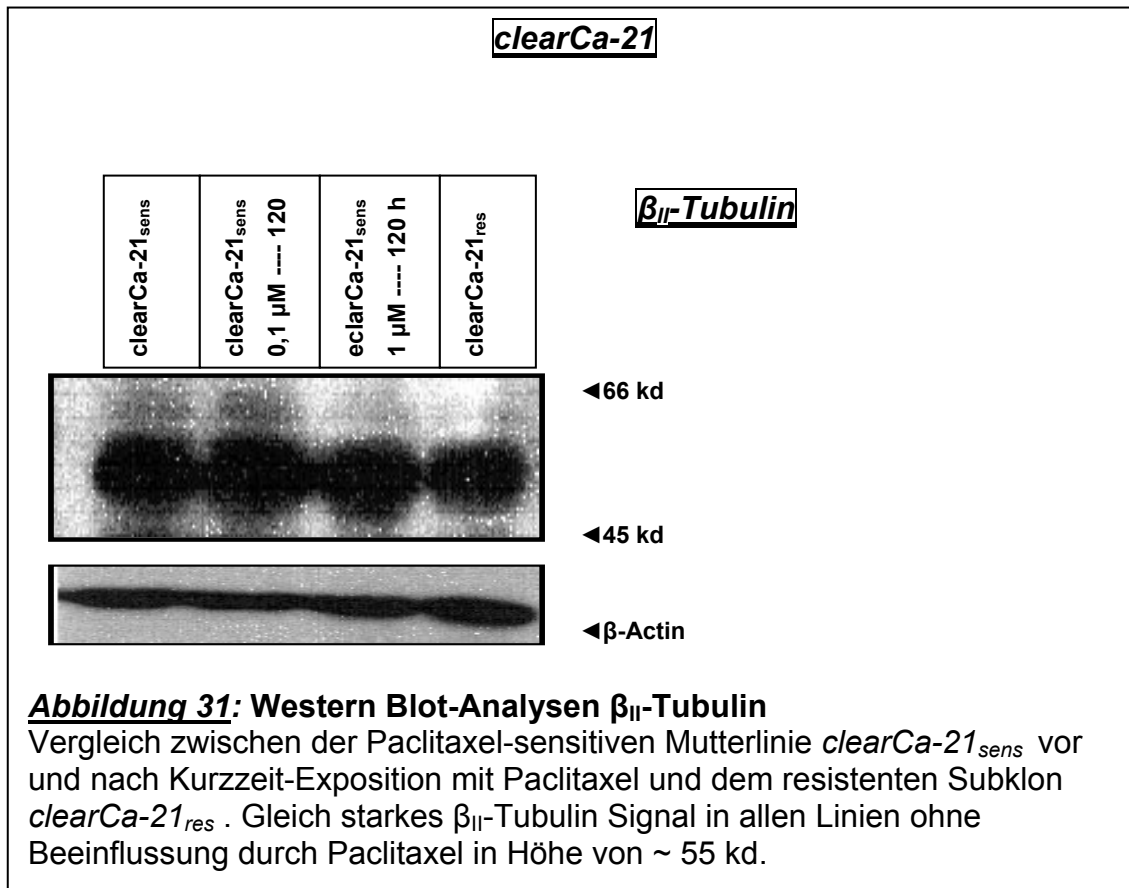
Der Western Blot diente dem quantitativen Nachweis der Proteinexpression von α -, β - und γ -Tubulin in den Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}*. Die Versuche wurden mindestens dreimal mit neuen Lysaten reproduziert (s. Abbildungen 28 bis -33).

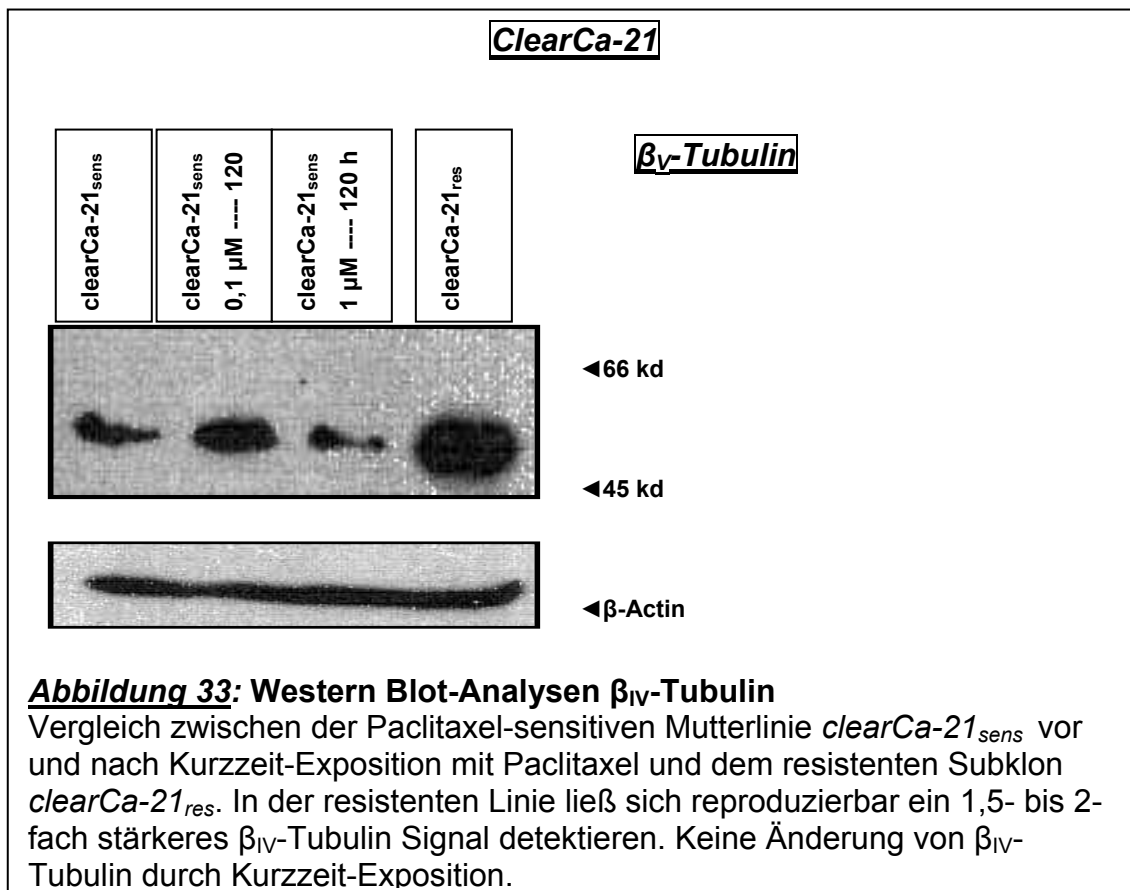
Alle untersuchten Tubuline konnten in beiden Linien nachgewiesen werden. Für α -, β - und γ -Tubulin zeigte sich in beiden Linien eine etwa gleiche Signalintensität. Eine Änderung der Expression in der für 120 h mit Paclitaxel-exponierten Linie *clearCa-21_{sens}* oder der Paclitaxel-resistenten Zelllinie konnte nicht gefunden werden (s. Abbildung 28 bis 30). Bei den β -Tubulin-Isotypen zeigten sich für β_{II} - und β_{II} -Tubulin keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Linien. Änderungen durch Paclitaxel-Exposition konnten nicht gefunden werden (s. Abbildung 30 bis 32).

Für β_{IV} -Tubulin zeigte sich in 4 unabhängigen Ansätzen eine Erhöhung der Proteinexpression in der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}*. Diese schwankte im Vergleich zur Zelllinie *clearCa-21_{sens}* zwischen 1,5- bis 2-facher Signalintensität. Nach einer Paclitaxel-Kurzzeit-Exposition für 120 h bleibt die β -Tubulin-Expression im Vergleich zur Kontrolle unverändert.









4.4 Immunfluoreszenz (IF)-Mikroskopie der Tubuline

Zur morphologischen Darstellung der Tubuline und Dokumentation ihrer Strukturveränderungen nach Paclitaxel-Exposition wurde exemplarisch eine IF-Mikroskopie der Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* sowie der Linien *clearCa-6*, *clearCa-12* und *clearCa-15* durchgeführt (s. *Abbildungen 34 bis 37*).

Nach 120 h-Paclitaxel-Exposition kam es zur Mikrotubuli-Bündelung in der Linie *clearCa-21_{sens}*. Dieser Effekt war in der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}* aufgehoben (s. *Abbildung 34*)

In der Linie *clearCa-15* war im Vergleich zu den anderen untersuchten Linien, ähnlich wie in der Western blot-Versuchsreihe, eine deutlich intensivere Anfärbung für β_{III} -Tubulin zu verzeichnen (s. *Abbildung 36*, vgl. *Abbildung 25*).

γ -Tubulin zeigte sich in Form von fleckförmigen, zytoplasmatischen und nukleären Inseln in allen untersuchten Zelllinien (s. *Abbildung 37*)

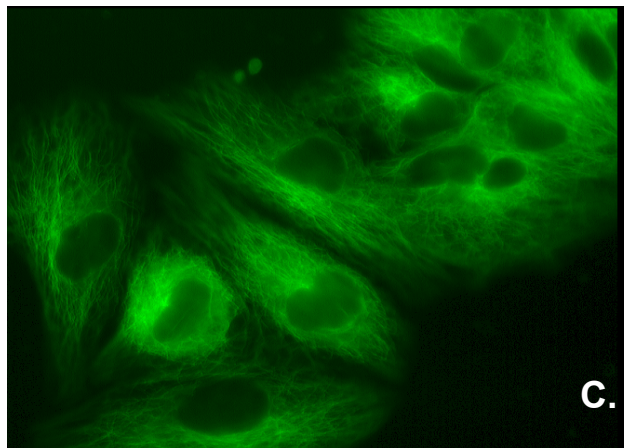
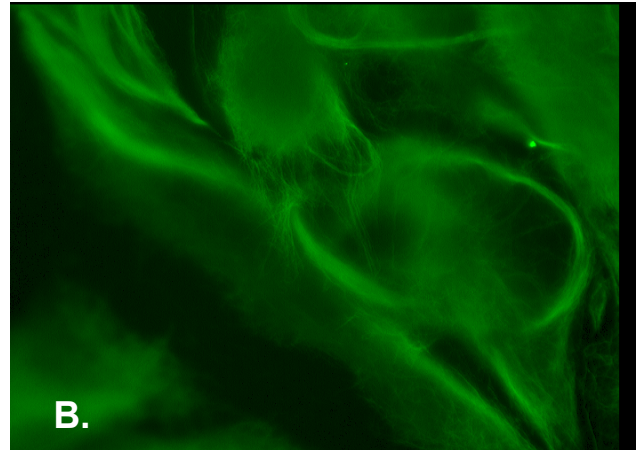
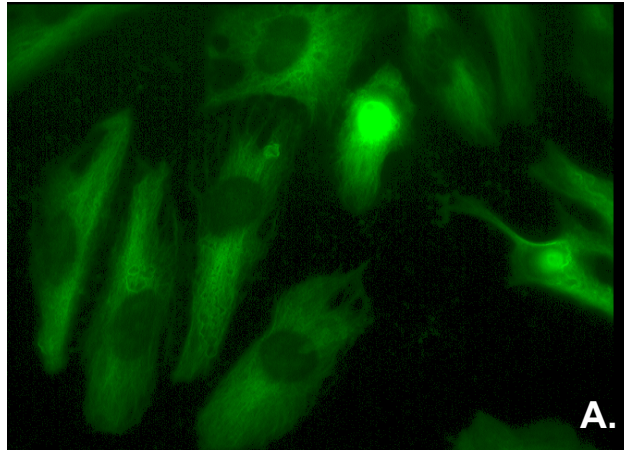


Abbildung 34:

α -Tubulin in den Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* nach Paclitaxel-Exposition

A. *clearCa-21_{sens}* unbehandelt, B. *clearCa-21_{sens}* nach 120 h Paclitaxel-Inkubation (Mikrotubuli-Bündel), C. *clearCa-21_{res}* nach 120 h Paclitaxel-Exposition (keine Mikrotubuli-Bündel).

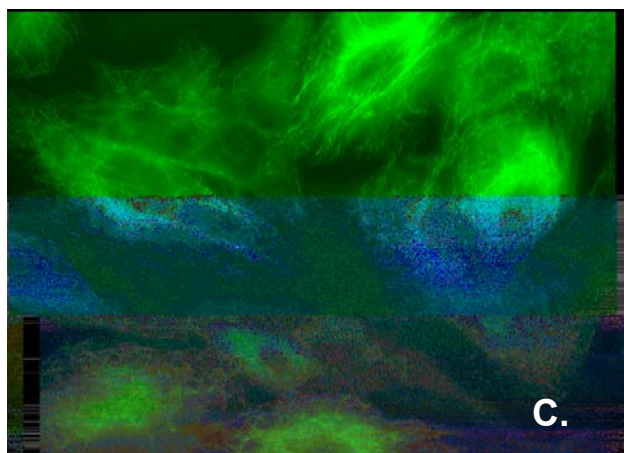
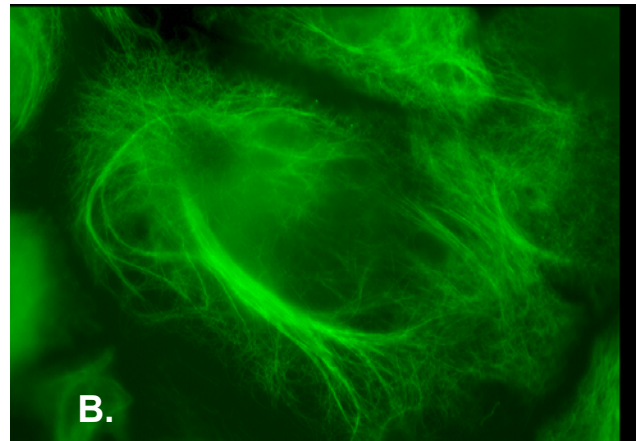
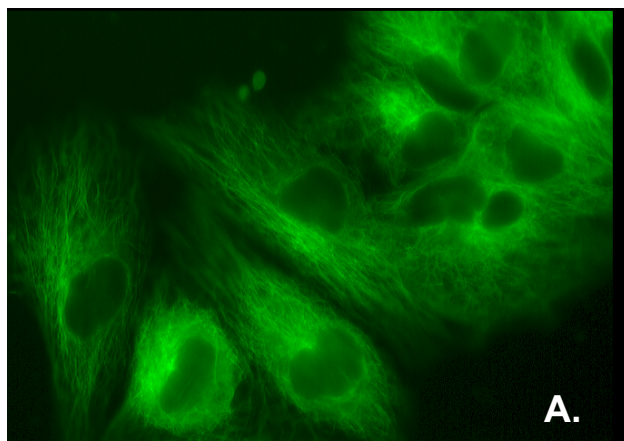


Abbildung 35:

β -Tubulin in den Linien *clearCa-21_{sens}* und *ClearCa-21_{res}* nach Paclitaxel-Exposition

A. *clearCa-21_{sens}* unbehandelt, B. *clearCa-21_{sens}* nach 120 h Paclitaxel-Inkubation (Mikrotubuli-Bündel), C. *clearCa-21_{res}* nach 120 h Paclitaxel-Exposition (keine Mikrotubuli-Bündel).

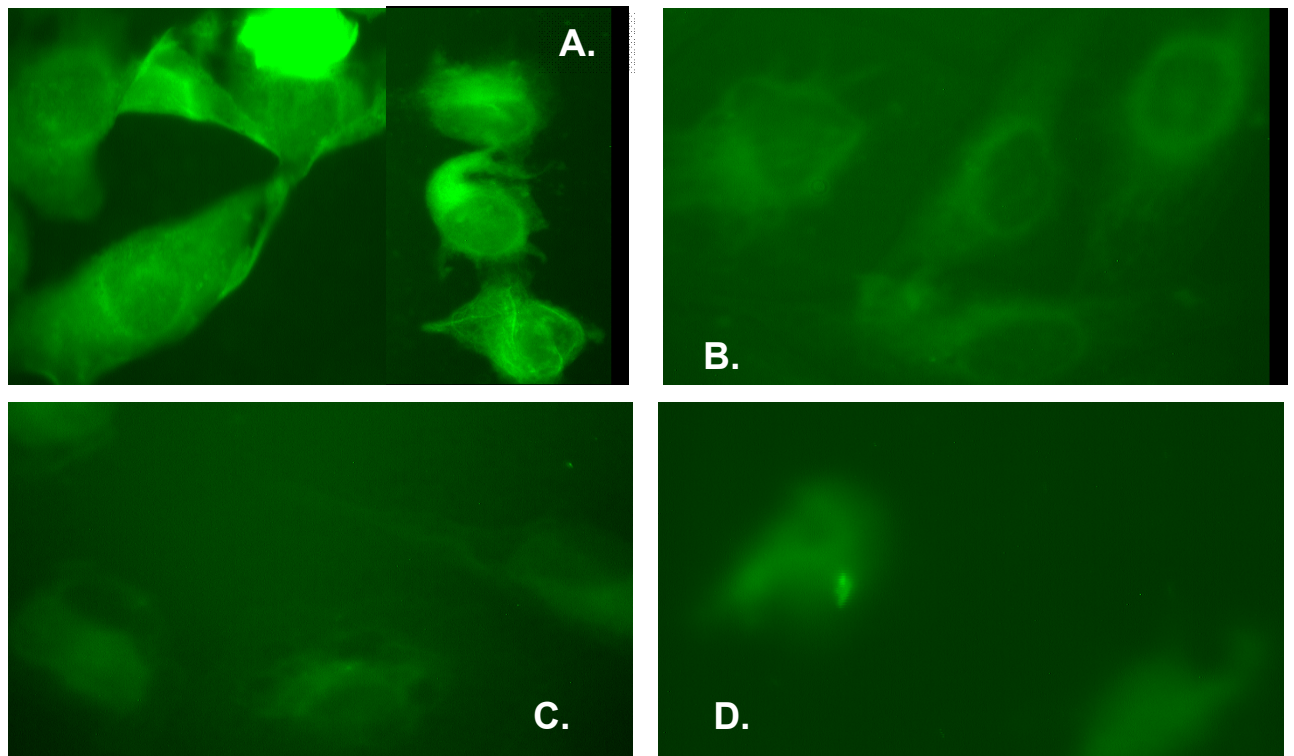


Abbildung 36: IF-Mikroskopie von β_{III} -Tubulin exemplarisch in 4 *clearCa*-Linien

A. *clearCa-15* (Paclitaxel-resistent, P-gp-Expression niedrig), B. *clearCa-12* (Paclitaxel-resistent, P-gp Expression hoch), C. *clearCa-6* (Paclitaxel sensitiv, P-gp Expression niedrig), D. *clearCa-21_{sens}* (Paclitaxel sensitiv, P-gp Expression mittelhoch). Hohe Expression von β_{III} -Tubulin im *clearCa-15*, ähnlich der Western blot-Untersuchung.

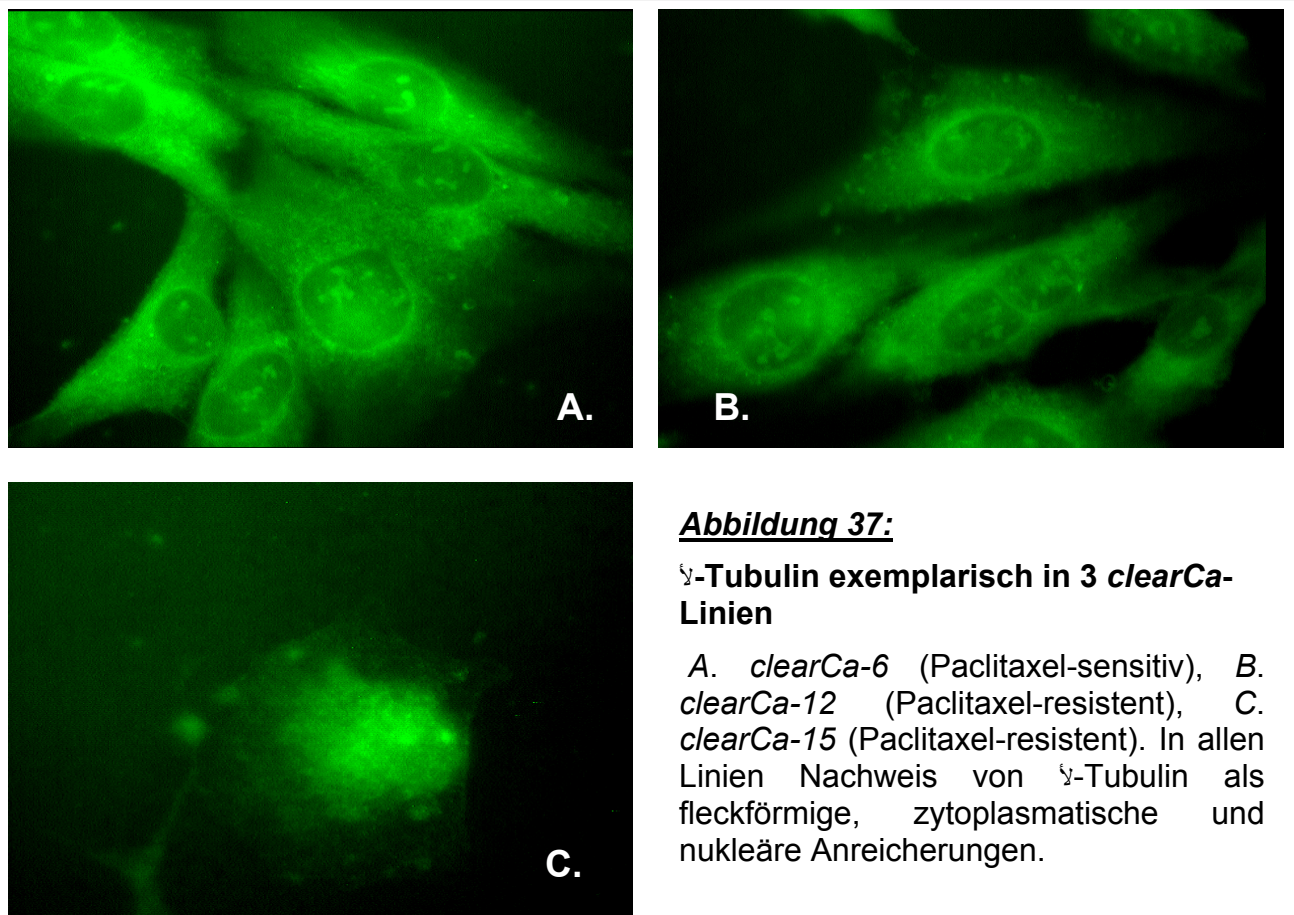


Abbildung 37:

γ -Tubulin exemplarisch in 3 *clearCa*-Linien

A. *clearCa-6* (Paclitaxel-sensitiv), B. *clearCa-12* (Paclitaxel-resistent), C. *clearCa-15* (Paclitaxel-resistent). In allen Linien Nachweis von γ -Tubulin als fleckförmige, zytoplasmatische und nukleäre Anreicherungen.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von P-gp, LRP und MRP bei intrinsischer Resistenz

Das Nierenzellkarzinom gilt als einer der Chemotherapie-resistentesten Tumoren (Yagoda *et al.* 1995, Chapman *et al.* Goldstein 1995). Auf das Zytostatikum Paclitaxel zeigten humane Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher histologischer Typen ein heterogenes Ansprechen mit IC₅₀-Werten von 0,03 bis 387,5 µM (Reinecke *et al.* 1997). Eine Reihe verschiedene Resistenzmechanismen kommen für diese Sensitivitätsunterschiede in Frage, möglicherweise mit unterschiedlicher Gewichtung in verschiedenen Tumorklinen (Volm *et al.* 1992).

Bedeutung von P-Glycoprotein

Für P-gp konnte in den 16 Linien eine signifikante Korrelation ($r = 0,57$, $p = 0,021$) zu den IC₅₀-Werten für Paclitaxel auf Proteinebene gefunden werden (s. *Abbildung 5*). Unterstützt wurde diese Beobachtung durch den Rh-123 Efflux. Dieser spiegelt spezifisch die funktionelle Aktivität von P-gp wieder und weist hier eine signifikante Korrelation ($r = 0,53$, $p = 0,03$) zur P-gp-Expression auf (s. *Abbildung 5*). Verapamil und Cremophor® EL als „klassische“ P-gp-Inhibitoren ermöglichten eine Reduktion der Efflux-Effizienz in 6 Linien um durchschnittlich 50% (s. *Abbildung 8*). Auch konnte eine Erhöhung der Zellmortalität nach Paclitaxelexposition in Kombination mit den Inhibitoren *in vitro* nachgewiesen werden (Mickisch *et al.* 1991).

Durch Kreuzresistenzanalysen sollte exemplarisch an zwei Linien überprüft werden, für welche Zytostatika und in welchem Ausmaß ein MDR-Phänotyp vorliegt. Dazu wurden die Linie *clearCa-6* und *clearCa-12* gewählt. *ClearCa-6* stellte den Prototyp einer Paclitaxel-sensitiven Linie mit niedriger P-gp-Expression und -Funktion da. *ClearCa-12* repräsentierte ein Paclitaxel-resistente Nierenkarzinomzelllinie mit hoher P-gp-Expression und -Funktion (vgl. *Tabelle 7*). Die Zytostatika Paclitaxel, Vincristin (Anti-Mikrotubuli-Gruppe), Etoposid und Topotecan (DNA-Topoisomerase-II-Hemmer) als Substrate von P-gp, sowie das nicht mit P-gp-assoziierte Chemotherapeutikum Bleomycin (DNA-Interkalation) wurden überprüft. Die ausgewählten Dosierungen der Zytostatika lagen im Bereich klinisch relevanter Spitzen-Plasmaspiegel. Für Paclitaxel liegt dieser bei 2 bis 10 µM, für Bleomycin bei 0,15 µg/ml, für Topotecan bei 0,012 µM, für Vincristin im Bereich um 0,35 µg/ml, und für Etoposid bei etwa 1,4 bis 4,5 µg/ml

(Brought *et al.* 1977, Haas *et al.* 1994, Nannan *et al.* 1999, Krishna *et al.* 2001, Sprinz *et al.* 2001). Die relative Resistenz (rr) zeigte eine Resistenz von *clearCa-12* im Vergleich zu *clearCa-6* für Paclitaxel (rr: 638,4), Vincristin (rr: 5,4) und Etoposid (rr: 2,5). Für das Zytostatikum Topotecan sowie für Bleomycin lag keine Kreuzresistenz vor (rr: 0,13 bzw. rr:0,32) (s. *Abbildung 9*). Somit bestand für die Linie *clearCa-12* Kreuzresistenz für die klassischen Zytostatika mit Affinität zu P-gp. Die erhöhte P-gp-Expression und -Funktion führte somit zu einem MDR-Phänotyp. Für das Zytostatikum Topotecan als Substrat von P-gp lag keine Kreuzresistenz vor, was z.B. durch einen alternativen Resistenzmechanismus zu erklären ist. Für Bleomycin spielt der MDR-Phänotyp keine Rolle. Da hier die Linie *clearCa-6* wesentlich resistenter war, besteht die Kreuzresistenz möglicherweise bevorzugt für Zytostatika, die Substrate von P-gp sind.

Die Einzelergebnisse zusammen genommen zeigen, dass der Expression von P-gp für das Ansprechen auf Paclitaxel im Nierenzellkarzinom *in vitro* eine bedeutende Rolle zukommt. Das Zytostatikum Paclitaxel ist als Substrat für P-gp bekannt. P-gp wiederum gilt als der am besten charakterisierte Resistenzmechanismus für Paclitaxel und Hauptverursacher des MDR-Phänotyps (Sikic *et al.* 1997, Dumontet u. Sikic 1999). Das Nierenzellkarzinom ist reich an P-gp und der Gehalt korreliert in verschiedenen Untersuchungen mit der Resistenz gegenüber einer Reihe von MDR-Zytostatika, wie z.B. Vincristin, Vinblastin, Doxorubicin, Epirubicin oder Etoposid (Takehi *et al.* 1988, Goldstein *et al.* 1989, Kanamaru *et al.* 1988, Mickisch *et al.* 1990, Goldstein und Chapman 1995, Gamelin *et al.* 1999). Allerdings scheint P-gp nicht der einzige Mediator des MDR-Phänotyps zu sein, da im Nierenzellkarzinom eine Reihe weiterer Resistenzgene exprimiert werden (Volm *et al.* 1992, Kim *et al.* 1996). Im Einzelnen werden u.a. MRP, cMOAT, Glutathion-S-Transferase, DNA-Topoisomerase-II und LRP für den MDR-Phänotyp im Nierenzellkarzinom verantwortlich gemacht, allerdings ohne konkreten Bezug zu Paclitaxel (Volm *et al.* 1992, Kim *et al.* 1996, Naito *et al.* 1999). In den durchgeführten Untersuchungen für P-gp zeigten sich zwei Linien (*clearCa-15* und *chrompho-B*), die trotz hoher Paclitaxel-Resistenz (IC_{50} : 130,12 μ M bzw. 387,5 μ M) eine niedrige P-gp-Proteinexpression und Rh-123-Efflux-Effizienz aufwiesen.

Bedeutung von MRP

Um die Bedeutung der angesprochenen alternativen Resistenzmechanismen für die Paclitaxel-Sensitivität des Nierenzellkarzinoms zu klären, wurden die Proteine MRP und LRP analysiert. Ähnlich wie P-gp ist MRP ein Mitglied der *ATP-binding cassette* Transporterfamilie und reduziert als membrangebundene Effluxpumpe die Xenobiotikakonzentration in der Zelle. Substratspezifität und Beeinflussung durch Inhibitoren variieren zwischen P-gp und MRP. So spielt MRP eine entscheidende Rolle im Transport von organischen Anionen, Leukotrienen und Gluthationkonjugaten.

Der Transport der Zytostatika Doxorubicin, Epirubicin und Vincristin ist für MRP dokumentiert (Grant *et al.* 1994). Im humanen Nierengewebe ist der Gehalt an MRP hoch. Auch im Tumoren der Niere wird MRP teilweise höher als im Ursprungsgewebe exprimiert (Kim *et al.* 1996). MRP kann bei Überexpression Resistenzen gegen verschiedene Zytostatika vermitteln und einen MDR-Phänotyp hervorrufen (Hipfner *et al.* 1999, Naito *et al.* 1999). Trotzdem ist seine Bedeutung für das Nierenzellkarzinom umstritten und für die Paclitaxel-Resistenz konnte bisher keine Korrelation zur Höhe der MRP-Expression gezeigt werden. (Grant *et al.* 1994). In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich insgesamt ein niedriger Gehalt in allen Tumorzelllinien mit Werten von 2,0% bis 11,5% ohne Korrelation zum Ansprechen auf Paclitaxel (s. *Tabelle 7*). Der Calcein-Efflux wurde zur Bestimmung der funktionellen MRP-Aktivität herangezogen und es wurde versucht, den Calcein-Efflux durch Probenecid, einen spezifischen MRP-Inhibitor, zu blockieren (Ikeda *et al.* 1999). Die Calcein-Efflux-Effizienz zeigte sich im Gegensatz zur niedrigen MRP-Expression mit Werten bis max. 87% (s. *Tabelle 7*). Geht man davon aus, dass Calcein spezifisch durch MRP transportiert wird (Feller *et al.* 1995, Ikeda *et al.* 1999), könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass in einigen Nierenzellkarzinomen eine hohe Aktivität von MRP bei niedriger Proteinexpression vorliegt. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch auch die eingesetzte Calcein-Konzentration, die relativ hoch ist. So wurden in den Versuchen 50 μM Calcein benötigt, um einen aussagekräftigen Influx in die Zellen zu erzielen. Bei anderen Tumoren, wie z. B. kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen oder T-Zell-Leukämien wurden unter Verwendung der Acetoxymethylesterform (Calcein-AM) Konzentrationen von 0,25 μM bis 0,5 μM benutzt (Feller *et al.* 1995, Ikeda *et al.* 1999, Gamelin *et al.* 1999). Calcein-AM diffundiert als unpolare Substanz besser in die Zellen, wird aber sowohl von P-gp und MRP1 transportiert. Die Calcein-Form

entsteht nach Spaltung durch unspezifische Esterasen der Zelle. Nur diese Form ist als polare Substanz ausschließlich Substrat von MRP1 (Essodaigui *et al.* 1998). Die 100-fach erhöhte Calcein-Konzentration in unseren Versuchen kann Zellkultur spezifisch sein oder an der anderen chemischen Form des Calceins liegen. Mit Probenecid lässt sich der Calcein-Efflux durch MRP-Blockade inhibieren (Ikeda *et al.* 1999). In den vorliegenden Untersuchungen ließ sich eine Blockierung des Calcein-Effluxes durch Probenecid in Konzentrationen von 5 mM bis 10 mM jedoch nicht nachweisen (s. *Abbildung 8*). Eine Erklärung könnte die zu niedrige Probenecid Konzentration von 10 mM sein, da ja auch die Calcein-Konzentration 100-fach über der anderer Versuchsreihen lag (Feller *et al.* 1995). Da die Lösung von Calcein in 1 M NaOH bei höheren Konzentrationen als 10 mM Calcein aufgrund des dann zu hohen NaOH-Gehaltes toxisch auf die Zellen wirkte, konnten jedoch höhere Dosen von Probenecid nicht getestet werden. Eine andere Erklärung wäre, dass Calcein entweder passiv oder durch andere Anionen-Transporter aus der Zelle gelangt (Pritchard *et al.* 1993). In einer Studie mit 5 Nierenkarzinomzelllinien bestand keine Korrelation zwischen dem Calcein-Efflux und der MRP-Expression (Gamlin *et al.* 1999). Auch in einer Untersuchung an 60 unselektierten Tumorzelllinien zeigte sich keine Beziehung zwischen der MRP-Expression und dem Calcein-Efflux, wohl aber bei ausgewählten hoch-resistenten Zelllinien mit MRP-Überexpression (Alvarez *et al.* 1994).

Insofern scheinen unter bestimmten Voraussetzungen MRP-Expression und Calcein-Efflux zusammenzuhängen und eine Zytostatika-Resistenz zu bedingen. Abschließend konnte also die Bedeutung von MRP im Nierenzellkarzinom für die Paclitaxel-Resistenz nicht befriedigend geklärt werden, obwohl Hinweise für eine Beteiligung, insbesondere durch den relativ hohen Calcein-Efflux, vorhanden sind. Die hohe Paclitaxel-Resistenz der beiden Linien *clearCa-15* und *chrompho-B* ist also nicht mit einer Überexpression von MRP oder erhöhtem Calcein-Efflux zu begründen, da beide Parameter in den Linien im Durchschnitt liegen (MRP: 5,7% bzw. 4,0%; Calcein: 36,3% bzw. 16,9%).

Bedeutung von LRP

Deshalb wurde ergänzend die Expression von LRP untersucht, einem Protein, welches in der Lage ist, einen MDR-Phänotyp in verschiedenen Tumorzelllinien mit intrinsischer Resistenz zu vermitteln (Laurencot *et al.* 1997). LRP zeigte sich auf mRNA-Ebene in allen Linien mit etwa gleicher Intensität (s. *Abbildung 4*). Die Expressionshöhe auf Proteinebene war mit 10,0% bis 48,0% ähnlich hoch wie P-gp und deutlich höher als MRP (s. *Tabelle 7*). Eine signifikante Korrelation des LRP-Gehaltes mit den IC₅₀-Werten für Paclitaxel ergab sich für die 16 untersuchten Linien ($r = 0,51$ und $p = 0,044$) (s. *Abbildung 6*). Eine starke Beziehung zwischen der P-gp- und LRP-Expression konnte in den 16 Linien nachgewiesen werden ($r = 0,82$ und $p < 0,01$) (s. *Abbildung 6*).

Einfache Funktionsuntersuchungen analog zum Farbstoff-Efflux der Membranpumpen existieren für LRP aufgrund seines noch weitgehend ungeklärten Wirkungsmechanismus nicht. Das 110 kD-Protein LRP entspricht dem *Human Major Vault Protein* (MVP). Vaults sind große, ovale, zytoplasmatische Ribonucleoproteinpartikel die zwischen den Arten hochkonserviert sind. Bei Säugetieren bestehen sie aus drei Proteinen, dem 110 kD LRP/MVP und den beiden *minor vault* Proteinen p240 und p193, sowie einer untranslatierten 88-141 bp langen vRNA. Das LRP/MVP-Protein macht mit ca. 70% der Masse den Hauptteil aus. Der größte Anteil der Vaults sind im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, kleinere Anteile allerdings auch in der Nähe der Kernmembran bzw. Kernmembrankomplex (Tan *et al.* 2000). Vaults vermitteln als Ribonucleoproteinpartikel einen nucleo-zytoplasmatischen Transport von Xenobiotika (Scheffer *et al.* 2000). Komplexere indirekte Funktionsstudien beruhen auf der Messung des Doxorubicin-Gehaltes getrennt nach Zellkernen und Zytoplasma (Kitazone *et al.* 1999). Auch kann kein direkter Nachweis einer Resistenzvermittlung durch erhöhte LRP-Expression durch einfache Transfektion in Tumorzelllinien ähnlich wie bei P-gp oder MRP geliefert werden, da LRP nur ein Bestandteil des aus mehrere Partikel zusammengesetzten, Resistenz-vermittelnden Vaults ist (Scheffer *et al.* 2000).

Für das Nierenzellkarzinom fehlten bis dato systematische Studien zur Bedeutung von LRP für die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie z. B. Paclitaxel. Eine Studie zur Expression von LRP schloss eine Nierenkarzinomzelllinie mit ein und fand eine hohe LRP-Expression auf mRNA-Ebene (Laurencot *et al.* 1997). Normale Niere besitzt als Exkretionsgewebe einen hohen Gehalt an LRP und P-gp. (Sugawara *et al.*

1997). Insofern wäre der mit P-gp vergleichbare Gehalt in den untersuchten Nierentumorzelllinien zu erklären. Als relativ gut im Zusammenhang mit der LRP-Expression untersuchte Tumortypen gelten das maligne Melanom, Bronchialkarzinome, Kolonkarzinome sowie die akute myeloische Leukämie (AML). In letzterer korrelierte der LRP-Gehalt mit der Chemotherapie-Resistenz oder einer schlechten Prognose (Scheffer *et al.* 2000). Auch die Beziehung der Paclitaxel-Resistenz zum LRP-Gehalt ist unklar, da systematische Studien mit mehreren Zelllinien für diese Fragestellung fehlen. In einer Kolonkarzinomzelllinie ging eine erhöhte LRP-Expression u.a. mit erhöhter Paclitaxel-Resistenz einher (Kitazone *et al.* 1999). Weitere Zytostatika mit Beziehung zu LRP sind insbesondere die Anthracycline Doxorubicin und Mitoxantron, möglicherweise auch Vincristin und Gramicidin D (List 1997, Dalton *et al.* 1999, Kitazone *et al.* 1999). Die hier gezeigte starke Koexpression von P-gp und LRP in den 16 Nierenkarzinomzelllinien (s. *Abbildung 6*) zeigte sich auch in manchen AML-Zellen (6%-24% Anteil) und korrelierte in diesen mit besonders schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie (Borg *et al.* 1998).

Möglicherweise könnte die hier in den Nierenkarzinomzelllinien vorhandene Koexpression von P-gp und LRP eine zusätzliche Ursache der Zytostatikaresistenz sein und den MDR-Phänotyp mit bedingen. Vom Wirkungsmechanismus und Expressionsmuster her wäre denkbar, dass sich die Proteine LRP und P-gp beim Transport der Zytostatika ergänzen. So transportiert LRP Xenobiotika nucleocytoplasmatisch, P-gp diese dann vom Zytoplasma aus der Zelle (Scheffer *et al.* 2000, vgl. *Abbildung 1*).

Zusammengefasst konnte hier erstmalig bei einer größeren Anzahl humaner Nierenkarzinomzelllinien gezeigt werden, dass eine hohe LRP-Expression auf mRNA- und Proteinebene besteht. Diese konnte in einer Beziehung zur Paclitaxel-Resistenz gebracht werden (s. *Abbildung 6*). Die funktionelle Aktivität von LRP konnte nicht bestimmt werden. Ebenso wenig war in diesem Zusammenhang eine Überwindung mit LRP-Inhibitoren durchführbar, so dass der kausale Zusammenhang zwischen LRP, Paclitaxel-Sensitivität und MDR-Phänotyp offen bleiben muß. Die Paclitaxel-Resistenz in den beiden Linien *clearCa-15* und *chrompho-B* konnte nicht durch besonders hohe Expression von LRP begründet werden, da in beiden Linien nur ein mittlerer LRP-Gehalt bestand (19,7% bzw. 17,0%).

Expression und Funktion von P-gp, MRP und LRP nach Paclitaxel-Exposition

Der MDR-Promotor des P-gp-Gens gilt als gut charakterisiert und enthält Regionen, die durch Hitzeschock-Proteine oder verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. SP1, aktiviert werden können (Chin *et al.* 1990, Cornwell u. Smith 1993). Auch diverse Zytostatika mit Affinität zu P-gp sind in der Lage, die Expression von P-gp durch Aktivierung des MDR-Promotors auf mRNA-Ebene zu erhöhen. Die Chemotherapeutika Vincristin, Adriamycin, Colchicin, Daunorubicin und Etoposid führen nach 24 h-Exposition in der Zellkultur zur direkten Aktivierung des MDR1 Gens auf Promotor-Ebene (Kohon *et al.* 1989). In Kolonkarzinomzelllinien führte eine 24 h-Inkubation mit Vincristin zu einer erhöhten Aktivität des MDR-Promotors (Stein *et al.* 1996). Auch das humane Nierenzellkarzinom reagiert *in vitro* auf unspezifische Reize wie z.B. Hitzeschock oder Arsenit mit Erhöhung von P-gp auf mRNA- und Protein-Ebene (Chin *et al.* 1993).

Eine Änderung der Expression von P-gp, aber auch von MRP oder LRP nach Paclitaxel-Exposition in humanen Nierenzellkarzinomen oder anderen Tumorentitäten ist bis jetzt nicht beschrieben. Es wäre jedoch denkbar, dass auch eine Paclitaxel-Exposition in bestimmten Zelllinien zu einer Hoch- oder Herunterregulation von P-gp, LRP oder MRP führen und so das unterschiedliche Ansprechen dieser Linien begründen könnte.

Die hohe Paclitaxel-Resistenz in den Linien *clearCa-15* und *chrompho-B* mit niedriger basaler Expression von P-gp, LRP und MRP konnte jedoch nicht durch eine Hochregulation dieser Gene nach Kurzzeit-Paclitaxel-Exposition erklärt werden. Auch zeigten sich nach der Inkubation mit verschiedenen Paclitaxel-Konzentrationen in 13 Nierenkarzinomzelllinien keine signifikanten Änderungen der Expression von P-gp, LRP oder MRP (s. *Tabelle 8 bis 10*). Da der Proteingehalt von P-gp und MRP nicht unbedingt mit der funktionellen Aktivität der Membranpumpen einhergehen muss, wurden zusätzlich Funktionsstudien mittels des Rh-123- bzw. des Calcein-Efflux nach Paclitaxel-Inkubation durchgeführt. Denkbar wäre ein gesteigerter Efflux im Sinne einer gesteigerten Pumpleistung ohne direkte Erhöhung der Proteinkonzentration. In keiner der untersuchten Zelllinie ließen sich jedoch funktionelle Änderungen nach Paclitaxel-Exposition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erzielen. Somit blieb die Paclitaxel-Kurzzeitexposition ohne Einfluss auf die Membranpumpenaktivität (*vgl. Tabellen 8 bis 10*). Zusammengefasst lässt sich in den hier untersuchten humanen Nierenkarzinom-zelllinien keine Beeinflussung der

P-gp-, MRP- oder LRP-Expression auf Protein- oder Funktionsebene durch Paclitaxel Kurzzeiteexposition erkennen. Im Vergleich mit einigen anderen Studien, die häufig die mRNA- oder Promotorebene wählen (Kohon *et al.* 1989, Stein *et al.* 1996), wurde hier auf Proteinebene untersucht. Erhöhte mRNA-Expression resultiert nicht immer in einem erhöhten Proteingehalt, der aber letztlich ausschlaggebend für die Vermittlung der Resistenz scheint. Eine hier nicht untersuchte Hochregulation der mRNA oder gesteigerte Promotoraktivität durch Paclitaxel-Exposition in den untersuchten Nierenzellkarzinomen kann also nicht ausgeschlossen werden. Viele der Studien zur P-gp-Regulation wurden an nicht-humanen Zelllinien, wie den häufig untersuchten COS-Zellen (Affennierenzellen) durchgeführt (Kohon *et al.* 1989, Licht *et al.* 1991). Die Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf humane Tumorzelllinien erscheint fraglich.

5.2 Bedeutung der Tubuline und ihrer Isotypen für die intrinsische Resistenz

Das Ansprechen auf Paclitaxel wird in einer Reihe von Studien mit dem MDR-Phänotyp und der Expression von P-gp begründet. Gleichzeitig liegt meistens eine Kreuzresistenz zu einer Reihe weiterer Zytostatika, die Substrate von P-gp sind, vor (s. Kapitel 5.1.). Paclitaxel greift bevorzugt an der β -Tubulin-Untereinheit des polymerisierten Tubulin an und verhindert dadurch die Dynamik der Mikrotubuli („*dynamische Instabilität*“, „*treadmilling*“). Wichtige Prozesse in der Zelle wie Mitose, intrazellulärer Transport, Zytoskelettkonstitution und Zellform werden so beeinflusst (Hortwitz *et al.* 1993, Blagosklonny *et al.* 1999, Dumontet *et al.* 1999). Durch Veränderungen dieses Angriffspunktes kann das Ansprechen gegenüber Paclitaxel *in vitro* vermindert oder erhöht werden, ohne einen MDR-Phänotyp mit erhöhter P-gp zu benötigen (Dumontet *et al.* 1999, Nicoletti *et al.* 2001, Burkhart *et al.* 2001).

In Verbindung mit der Paclitaxel-Resistenz sind Veränderungen des α - und β -Tubulin-Gehalts (Schibler *et al.* 1986, Han *et al.* 2000), eine unterschiedliche β -Tubulin-Isotypen-Expression (Burkhart *et al.* 2001) sowie Mutationen von β -Tubulin (Giannakakou *et al.* 1997, Monzó *et al.* 1999) beschrieben. Die meisten Studien benutzen den durch „*single-step*“ Selektion erzeugten Mechanismus der erworbenen Resistenz als Versuchsgrundlage. Nur wenige Arbeiten untersuchen die intrinsische Paclitaxel-Resistenz im Zusammenhang mit der Tubulin-Expression. In den vorliegenden Untersuchungen wurde an 9 Nierenkarzinomzelllinien unterschiedlicher

Paclitaxel-Sensitivität und Histologie die Expression von α - und β -Tubulin sowie der β -Tubulin-Isotypen β_{II} -, β_{III} - und β_{IVa} - und β_{IVb} - Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht (s. *Abbildungen 16 bis 26*). Der α -Tubulin-Gehalt zeigte sich in allen untersuchten Linien etwa gleich stark (s. *Abbildung 21*). Die Expression von β -Tubulin auf Proteinebene schien tendenziell in resistenteren Linien zuzunehmen, wobei die Linie *clearCa-15* reproduzierbar den höchsten Gehalt aufwies (s. *Abbildung 22*).

Die β -Tubulin-Isotypen II, IVa und IVb ließen sich in allen Linien auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR nachweisen (s. *Abbildungen 16, 18, 19*). Die Detektion gelang mit deutlichem, in allen Linien etwa gleich starkem Signal. Der Nachweis auf Proteinebene durch Western Blot gelang ebenfalls für alle Linien. Der β_{II} -Tubulin-Isotyp zeigte sich zumeist mit deutlichem Signal ohne Beziehung zur Paclitaxel-Sensitivität oder Histologie (s. *Abbildung 16*). Auch β_{IV} -Tubulin konnte in allen Linien detektiert werden. Der Nachweis ergab allerdings nur schwächere Signale, ohne deutliche Abweichungen zwischen den Linien (s. *Abbildung 26*).

Der β_{III} -Tubulin-Isotyp-Nachweis gelang auf mRNA-Ebene für 5 von 8 Linien mit schwachem Signal. Das stärkste Signal zeigte sich reproduzierbar in der Linie *clearCa-15*, welche eine hohe Paclitaxel-Resistenz bei niedriger P-gp-Expression und Funktion aufweist (s. *Abbildung 25*). Auf Proteinebene konnte der β_{III} -Tubulin-Isotyp nur in 3 bis 4 von 9 Linien reproduzierbar nachgewiesen werden. Das mit Abstand deutlichste Signal zeigte sich auch hier in der Linie *clearCa-15*. Im morphologischen Vergleich durch IF-Mikroskopie wies auch hier die Linie *clearCa-15* im Vergleich zu drei anderen *clearCa*-Linien die stärkste Fluoreszenz auf (s. *Abbildung 37*). Zusammengefasst zeigte sich in den 9 untersuchten Linien ein leicht erhöhter β -Tubulin-Gehalt in den Paclitaxel-resistenteren Zelllinien, sowie eine deutliche Überexpression von β_{III} -Tubulin und ein leicht erhöhter β -Tubulin-Gehalt in der Linie *clearCa-15*.

Im Zusammenhang mit der (MDR-Phänotyp-unabhängigen) Paclitaxel-Resistenz untersuchen die meisten Studien Änderungen in der β -Tubulin-Isotypen-Konstellation (Burkhart *et al.* 2001). Humanes β -Tubulin besteht aus 6 verschiedenen Isotypen, die eine starke Homologie aufweisen und konstitutiv oder gewebs-spezifisch exprimiert werden. Die Einteilung erfolgt nach den letzten 15 Aminosäuren, an denen die deutlichsten Abweichungen zu verzeichnen sind (Sullivan *et al.* Cleveland 1986).

Die verschiedenen β -Tubulin-Isotypen sind funktionell gleichwertig, können aber in bestimmten Fällen eine unterschiedliche Expression und Reaktion mit zellulären Proteinen wie *MAPs* (*Mikrotubuli assoziierte Proteine*) oder unterschiedliches Polymerisationsverhalten zeigen (Derry *et al.* 1997, Dumontet *et al.* 1999, Burkhart *et al.* 2001). In der Literatur finden sich Studien zur β -Tubulin-Isotypen-Expression und Paclitaxel-Sensitivität insbesondere an humanen Zelllinien von Ovarialkarzinomen (Kavallaris *et al.* 1997, Nicoletti *et al.* 2001), Prostatakarzinomen (Ranganathan *et al.* 1996, 1998), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Kavallaris *et al.* 1997), Sarkomen (Dumontet *et al.* 1996) sowie Leukämien (Jaffrezou *et al.* 1995). Dabei zeigen sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. In mehreren Studien war eine erhöhter β_{III} -Tubulin-Gehalt, oft in Kombination mit einer β_{IVa} -Tubulin-Überexpression, mit einer *in vitro* erhöhten (erworbenen) Paclitaxel-Resistenz verknüpft (Kavallaris *et al.* 1997, Ranganathan *et al.* 1996, 1998, Nicoletti *et al.* 2001). Allerdings liegen auch Studien mit reduziertem β_{III} - und β_{IVa} -Tubulin-Gehalt in Paclitaxel-resistenten Subklonen vor (Dumontet *et al.* 1996).

Weitere Arbeiten berichten im Zusammenhang mit einer Paclitaxel-Resistenz von einer erhöhten β_{II} -Tubulin-Expression, allerdings in murinen Zelllinien (Haber *et al.* 1995). Auch ein erhöhter α - und β -Tubulin-Gehalt ist in einzelnen Fällen mit vermindertem Ansprechen auf Paclitaxel assoziiert (Han *et al.* 2000).

In den hier durchgeführten Untersuchungen ist in der Linie *clearCa-15* die hohe Paclitaxel-Resistenz (IC_{50} : 130,12 μ M) mit einer Überexpression von β_{III} -Tubulin assoziiert (vgl. *Abbildung 4.3.3-2*). Eine erhöhte β_{IVa} - bzw. β_{IV} - Gehalt fand sich nicht, allerdings eine leicht erhöhte β -Tubulin-Menge (vgl. *Abbildungen 24 bis 26*). Die Zelllinie *chrompho-B* zeigte keine deutlichen Tubulin-Überexpressionen. Die hohe Paclitaxel-Resistenz (IC_{50} : 387,5 μ M) ließ sich hier durch eine Tubulinanalyse nicht erklären. Insgesamt scheint der vermehrten Expression des β_{III} -Tubulin-Isotyps eine entscheidende Rolle in der Paclitaxel-Resistenz zuzukommen (Burkhart *et al.* 2001). Dies wird durch zwei weitere Beobachtungen gestützt. Zum einen führt die Ausschaltung der β_{III} -Tubulin-Isotypen-Expression durch „*antisense*“-Oligonucleotide zu einer erhöhten Paclitaxel-Sensitivität in kleinzelligen Bronchialkarzinomen *in vitro* (Kavallaris *et al.* 1999), zum anderen reagieren reine $\alpha\beta_{III}$ -Tubuline (sowie reine $\alpha\beta_{IVa}$ -Tubuline) *in vitro* wesentlich weniger sensitiv auf Paclitaxel als unfraktioniertes Tubulin (Derry *et al.* 1997).

Untersuchungen zur Expression der β -Tubulin-Isotypen in humanen Nierenzellkarzinomen mit intrinsischer Resistenz fehlten bis dato. Erstmals konnte die Expression der β_{II} -, β_{IVa} - und β_{IVb} -Isotypen in mehreren unselektierten Nierenzellkarzinomen auf mRNA- und Proteinebene *in vitro* gezeigt werden. Den kausalen Zusammenhang zwischen der β_{III} -Tubulin-Isotypen-Expression und Paclitaxel-Resistenz in der Zelllinie *clearCa-15* müsste durch eine Transfektion in andere sensible Nierenzellkarzinome mit damit verbundener Erhöhung der Resistenz oder die Verwendung von „*antisense*“-Oligonucleotiden und damit verbundener Reduktion der Paclitaxel-Resistenz untermauert werden (Kavallaris *et al.* 1999). Der Mechanismus der β -Tubulin-Isotypen-vermittelten Paclitaxel-Resistenz erscheint insgesamt als komplex und durch verschiedene Faktoren beeinflussbar. Transfektionsexperimente mit β -Tubulin-Isotypen führen nicht zwangsläufig zur Überexpression, da die zelluläre Tubulinsynthese einer Autoregulation unterliegt. Auch die posttranskriptionelle Modifikation und unterschiedliche Interaktionen mit MAPs sind in die Überlegungen mit einzubeziehen. Weiterhin können Mutationen der β -Tubulin-Isotypen mit einer Paclitaxel-Resistenz assoziiert sein (Giannakakou *et al.* 1997, Monzo *et al.* 1999). Möglicherweise bedingen einige dieser Mechanismen die hohe Paclitaxel-Resistenz in der Zelllinie *chrompho-B*.

5.3 Resistenzmechanismen bei erworbener Paclitaxel-Resistenz

Als erworbene MDR versteht man die Kreuzresistenz zwischen Zytostatika aus verschiedenen Gruppen, die sich erst nach Kontakt mit diesen bei initialem Ansprechen einstellt. *In vitro* kann eine erworbene Resistenz durch eine Inkubation mit einer schrittweise erhöhte Zytostatika-Konzentration („*single-step*“) in der Langzeitkultur akquiriert werden. Klinisch kann ein MDR-Phänotyp durch ein Rezidiv nach einer initial erfolgreichen Chemotherapie auffallen (Goldstein *et al.* 1989, 1995, Naito *et al.* 1999). Eine Reihe Studien erzeugten durch „*single-step*“-Inkubation humaner Tumorzelllinien mit Zytostatika mit P-gp-Affinität kreuzresistente Subklone und untersuchten die Expression und Funktion von P-gp, MRP, LRP, GSH- π , Topoisomerase-II, β -Tubulin-Isotypen sowie Mutationen im Vergleich zur Ausgangslinie (Licht *et al.* 1991, Dumontet *et al.* 1996, Kavallaris *et al.* 1997, Suto *et al.* 1998, Ranaganathan *et al.* 1998, Chen *et al.* 1999, Yu *et al.* 1998, 2000). Auch für die erworbene Resistenz scheint bei Verwendung der meisten Zytostatika mit

Affinität zu P-gp die Überexpression von P-gp der dominierende Mechanismus zu sein (Goldstein *et al.* 1989, 1995, Sikic *et al.* 1997, Dumontet *et al.* 1999). Bei der Verwendung bestimmter Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubicin kann ein nicht-P-gp-vermittelter MDR-Phänotyp entstehen, der durch MRP oder LRP verursacht wird (Cole *et al.* 1992, Scheffer *et al.* 1993).

In den hier durchgeführten Untersuchungen zur erworbenen Paclitaxel-Resistenz wurde durch „single-step“-Inkubation mit Paclitaxel in der Langzeitkultur aus der sensiblen Linie *clearCa-21_{sens}* (IC₅₀: 0,38 µM) die resistente Zelllinie *clearCa-21_{res}* (IC₅₀ > 1000 µM) selektiert. Kreuzresistenz sowie die Expression von P-gp, LRP, MRP, der Tubuline und ihrer Isotypen wurden vergleichend analysiert (s. *Abbildungen 10 ff.*).

Die Paclitaxel-resistente Linie *clearCa-21_{sens}* wies eine Kreuzresistenz gegenüber den Zytostatika mit P-gp-Assoziation auf, nämlich Paclitaxel (relative Resistenz [rr] > 3448,3), Vincristin (rr = 141,6), Etoposid (rr = 63,9) und Topotecan (rr = 18,3). Auf Bleomycin, welches kein Substrat von P-gp ist, zeigte sich ein gleiches Ansprechen zwischen *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* (rr = 0,98) (s. *Abbildung 10*).

Die Expression von P-gp zeigte sich auf mRNA-Ebene in der Paclitaxel-resistenten Zelllinie allenfalls leicht erhöht. Auf Proteinebene fand sich eine gleich hohe Expression von P-gp (s. *Abbildungen 10 und 12*).

Der deutlichste Unterschied zeigte sich beim Rh-123-Efflux, der in *clearCa-21_{res}* um den Faktor 7,2 gesteigert war und mit fast 100%-iger Effizienz ablief (s. *Abbildung 14*). Die Paclitaxel-Selektion führte somit zu einer deutlich gesteigerten funktionellen Aktivität von P-gp ohne die Proteinexpression zu verändern.

Die mRNA- und Proteinexpression von MRP und LRP erwies sich in Vergleich beider Linien ebenfalls als unverändert. Der Calcein-Efflux war in der Paclitaxel-resistenten Linie leicht um den Faktor 1,1 gesteigert (s. *Abbildungen 13 und 14*). Eine Reduzierung des Rh-123-Effluxes mit Verapamil und Cremophor® EL konnte in der sensiblen Zelllinie *clearCa-21_{sens}* um 37% bzw. 29% erreicht werden. Im Gegensatz dazu entzog sich die Zelllinie *clearCa-21_{sens}* einer nennenswerten Modulation. (s. *Abbildung 15*).

Bei den Untersuchungen der Tubulin-Expression auf Proteinebene wurden die Zelllinie *clearCa-21_{sens}* vor und nach 120 h-Paclitaxelexposition sowie die resistente Linie *clearCa-21_{res}* miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die mRNA der

β -Tubulin-Isotypen mittels RT-PCR in beiden Linien miteinander verglichen (s. *Abbildungen 28 ff.*). Die mRNA-Studien der β -Tubulin-Isotypen zeigten keine unterschiedliche Expression. Der Proteingehalt an α - und β -Tubulin sowie der Isotypen β_{II} , β_{III} erwies sich in der Linie *clearCa-21_{sens}* und in der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}* als fast identisch. Für β_{IV} -Tubulin zeigte sich auf Proteinebene reproduzierbar ein leicht erhöhter Gehalt im Vergleich zur Paclitaxel-sensitiven Linie (s. *Abbildung 33*).

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich das Tubulin-Netzwerk in der Linie *clearCa-21_{sens}* fein verzweigt. Nach 120 h-Paclitaxel-Inkubation formten sich deutliche Mikrotubuli-Bündel mit Veränderung der Zellform, die für Paclitaxel typisch sind (Rowinskiy *et al.* 1988, Reinecke *et al.* 1997). In der resistenten Linie *clearCa-21_{res}* führte die Paclitaxel-Inkubation im Gegensatz dazu zu keiner Veränderung der Mikrotubuli oder Zellform im Vergleich zur Mutterlinie (s. *Abbildung 34 und 35*).

Zusammengefasst lässt sich die gesteigerte Paclitaxel-Resistenz und Kreuzresistenz in der Zelllinie *clearCa-21_{res}* am besten durch einen P-gp vermittelten MDR-Phänotyp erklären. Durch die Selektion wurde die Inhibition von P-gp durch Verapamil und Cremophor® EL, die in der Mutterlinie noch uneingeschränkt funktionierte, aufgehoben. Erklärung dafür könnte eine erworbene Mutation des P-gp-Gens während der Langzeit-Kultur mit Paclitaxel sein. In humanen Uterussarkomzelllinien wurde eine P-gp-Genmutation durch Koselektion mit Doxorubicin und PSC 833 (Valspodar, Cyclosporinderivat u. P-gp-Inhibitor) über mehrere Monate beschrieben. Eine Mutation in der sechsten transmembranösen Domäne führte dort zu einem verminderten Ansprechen auf den Modulator PSC 833 (Valspodar), Cyclosporin sowie auch auf Verapamil (Chen *et al.* 1997). Auch ein geändertes Verhalten von MRP1 in Bezug auf Funktionalität oder Substratspezifität durch Mutationen müsste in Betracht gezogen werden. Bekannt ist, dass Mutationen von MRP zu einer geänderten Transportfähigkeit von Anthrazyklinen oder Vincristin führen können (Zhang *et al.* 2001, Ito *et al.* 2001).

Verschiedene Studien zur erworbenen MDR zeigten einen Anstieg des P-gp Gehaltes in resistenten Subklonen im Vergleich zur Mutterlinie auf mRNA- und/oder Proteinebene. In initial P-gp-negativen humanen Pleuramesotheliom-Zelllinien, die in der Langzeitkultur mit Vinca-Alkaloiden oder Doxorubicin selektiert wurden, zeigte sich ein Anstieg der P-gp-Konzentration auf Proteinebene. Mit dem P-gp-Inhibitor Verapamil konnten die resistenten Subklone wieder sensibilisiert werden (Licht *et al.*

1991). In Vinblastin-selektierten humanen Uterussarkom-Zelllinien zeigte sich ein erworbener MDR-Phänotyp mit erhöhter Expression und Funktion von P-gp. Der LRP- und MRP-Gehalt blieb dort unverändert (Chen *et al.* 2000). Auch humane Osteosarkome reagierten mit einem P-gp-Anstieg auf mRNA- und Proteinebene bei Selektion durch Doxorubicin *in vitro* und *in vivo* (Suto *et al.* 1998).

In einer Reihe verschiedener humaner Tumoren mit ursprünglich niedrigem oder negativem P-gp-Gehalt konnte ein Anstieg nach Zytostatika-Therapie mit Chemotherapeutika, wie Vincristin oder Anthrazyklinen festgestellt werden (Fojo *et al.* 1987, Goldstein *et al.* 1989).

Die erworbene Paclitaxel-Resistenz durch *in vitro* Selektion oder klinische Therapie wird zum größten Teil durch P-gp vermittelt (Chapman *et al.* 1995, Rowinski *et al.* 1995, Dumontet *et al.* 1999). Ein weiterer, durch verschiedene Studien gefestigter Mechanismus der erworbenen Paclitaxel-Resistenz ist die veränderte β -Tubulin-Isotypen-Expression (vgl. Kapitel 5.2, Ranaganathan *et al.* 1996, 1998, Dumontet *et al.* 1999, Burkhart *et al.* 2001). Die Selektion resistenter Subklone durch Paclitaxel führte in mehreren Arbeiten zu einem erhöhten Gehalt an β_{III} - und β_{IVa} -Tubulin-Isotypen (Ranaganathan *et al.* 1998, 1996, Kavallaris *et al.* 1997). In der hier untersuchten Linie *clearCa-21_{res}* konnte allerdings kein veränderter Tubulin- oder Isotypen-Gehalt im Vergleich zur Mutterlinie ausgemacht werden.

Ein ähnliches Phänomen einer gesteigerten P-gp-Aktivität ohne Erhöhung der Proteinexpression ist in der Literatur unbeschrieben. Da das Nierenzellkarzinom als resistenter Tumor mit hoher basaler P-gp-Expression bekannt ist, dient es zumeist als Versuchsgrundlage der intrinsischen MDR. Nur wenige Studien verwenden Nierenzellkarzinome für Versuche zur erworbenen Resistenz.

Trotzdem ist auch die akquirierte Resistenz im Nierenzellkarzinom nicht ohne Bedeutung (Chapman *et al.* 1995). In zwei Studien zur erworbenen Resistenz wurden Nierenkarzinomzelllinien mit dem Zytostatikum Adriamycin, einem Substrat von P-gp, in der Langzeitkultur selektiert und ein resistenter Subklon erzeugt (Yu *et al.* 1998, 2000). Dieser zeigte Kreuzresistenz gegenüber den Zytostatika Epirubicin, Vinblastin, 5-FU, Cisplatin und 6-Thioguanin. Mittels RT-PCR fand sich dort ein erhöhter P-gp-mRNA-Gehalt. Auf Proteinebene stellte sich P-gp allerdings als erniedrigt dar. Funktionsstudien durch den Rh-123 Efflux wurden nicht durchgeführt. Weitere Parameter wie MRP und Topoisomerase-II Gehalt waren im Vergleich nicht

signifikant verändert, dagegen lag ein erhöhter Gehalt an GSH- π und G-6-PDH im selektierten Subklon vor. (Yu *et al.* 1998, 2000).

Ähnlich wie die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie *clearCa-21_{res}* zeigte sich bei Yu *et al.* (1998, 2000) ein erhöhter P-gp-mRNA-Gehalt, welcher nicht zu einer gesteigerten Proteinexpression führte. Da Funktionsanalysen dort nicht durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass auch dort das Phänomen der gesteigerten Funktionalität mit unveränderter Proteinexpression vorlag. Möglicherweise ist gerade das Nierenzellkarzinom in der Lage, unter Zytostatika-Selektionsdruck mit einer P-gp-Funktionssteigerung zu reagieren, die nicht unbedingt eines vermehrten P-gp-Proteingehalts bedarf.

5.4 γ -Tubulin- Expression und Beziehung zur Paclitaxel-Resistenz

Die Polymerisation der α - und β -Tubulin-Heterodimere zu Mikrotubuli wird in der Zelle durch *Mikrotubuli-Organisationszentren (MOTC)* gesteuert. γ -Tubulin bindet am Minus-Ende der Mikrotubuli und vermittelt die Verbindung am Zentrosom. Sein Gehalt macht weniger als 1% im Vergleich zu α - oder β -Tubulin aus und ist diesen zu ca. 30% homolog. Es ist in vielen Organismen wie Pflanzen, Pilzen, Säugetierzellen und Tumorgeweben nachgewiesen und wahrscheinlich in allen eukaryotischen Zellen vorhanden (Stearns *et al.* 1994, Oakley 1992).

Ob Antimikrotubuli-Zytostatika wie Paclitaxel an γ -Tubulin angreifen, ist ungeklärt. Auch ist die Frage unbeantwortet, ob eine veränderte γ -Tubulin-Expression eine Paclitaxel-Resistenz vermitteln kann. Nur wenige Untersuchungen zur γ -Tubulin-Expression in humanen Tumorzelllinien sind bekannt. Seine Funktion scheint für die Vitalität der Zellen essentiell zu sein, da die Ausschaltung des Gens zur Inhibition der Zellteilung führt (Oakley 1992). Insofern könnte ein Angriff von Chemotherapeutika an γ -Tubulin ihre Toxizität erhöhen.

In einer humanen Mammakarzinomzelllinie konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie im unbehandelten Zustand γ -Tubulin in Form weniger, kleinfleckiger Punkte ausgemacht werden. Durch Inkubation mit Cisplatin oder Mafosfamid bildeten sich Anreicherungen dieses Tubulins in Form von großfleckigen Klumpen (Wolf *et al.* 1995). In mehreren Paclitaxel-selektierten Subklonen humaner Uteruskarzinomzelllinien war der γ -Tubulin-Gehalt auf mRNA-Ebene gegenüber der Mutterlinie unverändert (Dumontet *et al.* 1996).

In unseren Untersuchungen wurde die Expression von γ -Tubulin bei Nierenkarzinomzelllinien mit intrinsischer und erworbener Paclitaxel-Resistenz auf mRNA- und Proteinebene analysiert. In allen 9 untersuchten Tumorklinen mit unterschiedlicher Paclitaxel-Sensitivität und Histologie zeigte sich mittels RT-PCR und Western Blot eine hohe und etwa gleich starke Expression (s. *Abbildung 20 und 23*). In der Zelllinie *clearCa-21_{res}* war der γ -Tubulin-Gehalt gleich hoch wie in der Linie *clearCa-21_{sens}*. Nach 120 h-Kurzzeit-Inkubation mit Paclitaxel (0,1 μ M, 1 μ M) konnte keine Änderung der Menge dieses Tubulins in der Linie *clearCa-21_{sens}* detektiert werden (s. *Abbildung 30*). Ähnlich wie in der Arbeit von Wolf *et al.* lag γ -Tubulin in Form von flächigen Ansammlungen im Zytoplasma und im Nukleus vor (s. *Abbildung 37*).

5.5 Ausblick

In den meisten intrinsisch-resistenten Nierenkarzinomzelllinien konnte das Ansprechen auf Paclitaxel gut durch den P-gp-Gehalt erklärt werden. Da allerdings Linien existieren, in denen sowohl die Expression von P-gp als auch der Gehalt an MRP, LRP sowie der Tubuline keine Erklärung der erhöhten Resistenz möglich machen, müssen noch andere Mechanismen in Betracht gezogen werden. Dazu könnten z.B. die Membrantransporter *cMOAT* (*human Multispecific-Organic-Anion-Transporter*), *cMOAT3/MRP3*, *TAP* oder *BRCP/MXR* (*Breast-Cancer-Protein*) gehören, welche ebenfalls zur Gruppe der *ABC-Transporter* gehören. Ihre Expression ist in einigen humanen Tumorklinen mit MDR assoziiert (List 1997, Naito *et al.* 1999, Tan *et al.* 2000). Untersuchungen hierzu könnten weiteren Aufschluss über den MDR-Phänotyp von Nierenzellkarzinomen bringen.

Die bessere Kenntnis möglichst vieler Resistenzmechanismen im Nierenzellkarzinom ist auch von klinischer Bedeutung. Zur Blockierung von P-gp stehen einer Reihe Substanzen zu Verfügung, die *in vitro* zum verstärkten Ansprechen auf Zytostatika wie Paclitaxel führen (Mikisch *et al.* 1991, Sikic *et al.* 1997, Reinecke *et al.* 2000, Tan *et al.* 2000). Der therapeutische Durchbruch ist diesen Substanzen im Nierenzellkarzinom bis jetzt jedoch nicht gelungen, da in klinischen Studien keine chemosensibilisierende Wirkung auftrat und die Toxizität der Modulatoren erheblich war (Sikic *et al.* 1997, Naito *et al.* 1999). Untersuchungen mit

anderen, weniger toxischen Substanzen zur Überwindung der P-gp-Resistenz wie z.B. PSC 833 (Valspodar) sind deshalb wichtig. Auch müssen die alternativen Resistenz-mechanismen in diese Überlegung mit einbezogen werden. Diese könnten bei Blockierung von P-gp dessen Rolle übernehmen. So sind Studien zur Blockierung von MRP und LRP im Nierenkarzinomzelllinien wichtig. Brauchbare Substanzen dazu wären z.B. Genistein, Butathionin oder VX710 (Biricodar) (List 1997, Tan *et al.* 2000). Für LRP müsste nach genauerer Kenntnis seiner Funktion in diesen Zusammenhang ein einfacher Funktionstest etabliert werden.

Im Zusammenhang mit der intrinsischen Resistenz sind die β -Tubulin-Isotypen seltener Gegenstand von Studien. Hier zeigte sich, dass die hohe Paclitaxel-Resistenz in der Linie *clearCa-15* mit einem erhöhten β_{III} -Tubulin-Isotypen-Gehalt assoziiert ist. Solche P-gp- bzw. MDR-unabhängigen Resistenzmechanismen können eine Therapie mit Paclitaxel scheitern lassen, gerade dann, wenn therapeutisch mit P-gp-Inhibitoren behandelt und somit koselektiert wird (Ranaganathan *et al.* 1998). Ein Nachweis dieses Mechanismus auch in anderen Nierenzellkarzinomen und Blockierung desselben z.B. mit „*antisense*“-Oligonucleotiden wäre wichtig (Kavallaris *et al.* 1998).

Auch bei der erworbenen Resistenz im Nierenzellkarzinom dominiert P-gp. Trotzdem scheint die Langzeit-Selektion resistenter Zelllinien im Vergleich zur intrinsischen Resistenz besondere Veränderungen zu bewirken (Yu *et al.* 1999). So scheint die Funktionalität von P-gp wichtiger als seine Proteinexpression sein. Die Blockierung durch Modulatoren kann hier z.B. durch Mutationen von P-gp eingeschränkt werden (Chen *et al.* 1997). Auch Mutationsanalysen von P-gp und MRP wären deshalb wichtig. Die gesteigerte Funktionalität von P-gp in der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-21_{res}* könnte dadurch mit bedingt werden. Schließlich ist auch der p53-Mutationstatus der Nierenkarzinomzelllinien in die Überlegungen miteinzubeziehen. Mutationen des p53-Gens sind in einigen der verwendeten Nierenzellkarzinomen dokumentiert (Ramp *et al.* 2000). Beschrieben ist, dass p53-Mutationen zu einer verstärkten MDR-Promotoraktivität und gesteigerten P-gp-Expression führen können (Zastawny *et al.* 1993). Auch die erhöhte MRP-Expression scheint mit einem mutierten p53-Status assoziiert zu sein (Sullivan *et al.* 2001). In einer Studie an humanen Paclitaxel-selektierten Ovarialkarzinomzelllinien lagen Mutationen des p53-Gens vor, die zum Verlust von funktionellem p53-Gen führten und gleichzeitig mit Mutationen des β -Tubulin-Gens einhergingen (Giannakakou *et al.* 2000).

6 Literaturverzeichnis

Alvarez M, Robey R, Sandor V, Nishiyama K, Matsumoto Y, Paull K, Bates S, Fojo T (1998): *Using the national cancer institute anticancer drug screen to assess the effect of MRP expression on drug sensitivity profiles*. Mol Pharmacol 54: 802-814

Blagoskonny MV, Fojo T (1999): *Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review)*. Int J Cancer 83: 151-156

Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA. (1998): *Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival*. Br J Haematol 103: 1083-1091

Broughton A, Strong JE, Holoye PY, Bedrossian CW (1977): *Clinical pharmacology of bleomycin following intravenous infusion as determined by radioimmunoassay*. Cancer 40: 2772-2778

Burkhart CA, Kavallaris M, Band Horwitz S (2001): *The role of β -tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs*. Biochim Biophys Acta 1471: O1-9

Chapman AE, Goldstein LJ (1995): *Multiple drug resistance: biologic basis and clinical significance in renal-cell carcinoma*. Semin Oncol 22: 17-28

Chaudhary PM, Roninson IB (1993): *Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs*. J Natl Cancer Inst: 85:632-649

Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. (1990): *Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of p-glycoprotein*. J Biol Chem. 265:506-514

Chen G, Duran GE, Steger KA, Lacayo NJ, Jaffrezou JP, Dumontet C, Sikic BI (1997): *Multidrug-resistant human sarcoma cells with a mutant P-glycoprotein, altered phenotype, and resistance to cyclosporins*. J Biol Chem 272: 5974-5982

Chen GK, Durán GE, Mangili A, Beketic-Oreskovic L, Sikic BI (2000): *MDR1 activation is the predominant resistance mechanism selected by vinblastine in MES-SA cells.* Br J Cancer 83: 892-898

Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM (1990): *Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells.* J Biol Chem 265: 221-226

Cornwell MM, Smith DE (1993): *SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity.* J Biol Chem 268:19505-19511

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992): *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance human lung cancer cell line.* Science 258: 1650-1654

Dalton WS, Scheper RJ (1999): *Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance.* J Natl Cancer Inst 91: 1604-1605

Derry WB, Wilson L, Khan IA, Luduena FR, Jordan MA (1997): *Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes.* Biochemistry 36: 3554-3562

Dhôte R, Pellicer-Coeuret, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trean G (2000): *Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention.* BJU Int 86: 20-27

Dörsam J, Staehler G (2001): *Pathologie und Staging des Nierenzellkarzinoms.* Onkologe 7:707-714

Dumontet C, Duran GE, Steger KA, Beketic-Oreskovic L, Sikic BI (1996): *Resistance mechanisms in human sarcoma mutants derived by single-step exposure to paclitaxel(Taxol).* Cancer Res 56: 1091-1097

Dumontet C, Sikic B (1999): *Mechanisms of action and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death.* J Clin Oncol 17: 1061-1076

Essodaigui M, Broxtermann HJ, and Granier-Suillerot A (1998): *Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein.* Biochemistry 37: 2243-2250

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I (1987): *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.* Proc Natl Acad Sci USA: 84: 265-269

Gamelin E, Mertins SD, Regis JT, Mickley L, Abati A, Worrell RA, Linehan WM, Bates SE (1999): *Intrinsic drug resistance in primary and metastatic renal cell carcinoma.* J Urol 162: 217-224

Gerharz CD, Moll R, Störkel S, Ramp U, Thoenes W, Gabbert HE (1993): *Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro.* Am J Pathol 142: 851-859

Gerharz CD, Ramp U, Olert J, Moll R, Störkel S, Marx N, Gabbert HE (1994): *Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type.* Virchows Arch 424: 403-409

Gerharz CD, Moll R, Störkel S, Ramp U, Hildebrandt B, Molsberger G, Koldovsky P, Gabbert BE (1995): *Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma.* Am J Pathol 146: 953-962

Gerharz CD, Hildebrandt B, Moll R, Ramp U, Sarbia M, Störkel S, Koldovsky P, Gabbert HE (1996): *Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterisation of four permanent cell lines.* Br J Cancer 74: 1605-1614

Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JT, Fojo T, Poruchynsky MS (1997): *Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have a mutant β -tubulin that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerisation*. J Biol Chem 272: 17118-17125

Giannakakou P, Poy G, Zhan Z, Knutsen T, Blagosklonny MV, Fojo T (2000): *Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer*. Oncogene 19: 3078-3085

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, Lieber M, Crossman J, Gottesman MM, Pastan I (1989): *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers*. J Natl Cancer Inst: 81: 116-124

Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG (1994): *Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs*. Cancer Res 54: 357-361

Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE (1986): *Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance*. Nature 323:728-731

Haber M, Burkhart CA, Regl DL, Madafiglio J, Norris MD, Horwitz SB (1995): *Altered expression of M beta 2, the class II beta-tubulin isotype, in a murine J774.2 cell line with a high level of taxol resistance*. J Biol Chem 270: 31269-31275

Han EK, Gehrke L, Tahir SK, Credo RB, Sham H, Rosenberg SH, Ng SC (2000): *Modulation of drug resistance by α -tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines*. Euro J Cancer 36: 1565-1571

Haas NB, LaCreta FP, Walczak J, Hudes GR, Brennan JM, Ozols RF, O'Dwyer PJ (1994): *Phase I/pharmacokinetic study of topotecan by 24-hour continuous infusion weekly*. Cancer Res 54: 1220-1226

Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP (1999): *Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1*. Biochim Biophys acta 1461: 359-376

Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP (1993): *Taxol[®]: Mechanisms of action and resistance*. J Natl Cancer Inst Monogr 15: 55-61

Ikeda K, Oka M, Yamada Y, Soda H, Fukuda M, Kinoshita A, Tsukamoto K, Noguchi Y, Isomoto H, Takeshima F, Murase K, Kamihira S, Tomonaga M, Kohno S (1999): *Adult T-cell leukemia cells over-express the multidrug-resistance-protein (MRP) and lung-resistance-protein (LRP) genes*. Int J Cancer 82:599-604

Ito K, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, Cole SP (2001): *Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport* J Biol Chem 276: 15616-15624

Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, v.d. Valk P, Scheper RJ (1996): *Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors*. Am J Pathol 148:877-887

Jaffrezou JP, Dumontet C, Derry WB, Duran G, Chen G, Tsuchiya E, Wilson L, Jordan MA, Sikic BI (1995): *Novel mechanisms of resistance to paclitaxel (Taxol[®]) in human K652 leukemia cells by combined selection with PSC 833*. Oncol Res 7: 517-527

Kanamaru H, Kakehi Y, Yoshida O, Nakanishi S, Pastan I, Gottesman MM (1988): *MDR1 RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidin in tumor explants*. J Natl Cancer Inst: 81: 844-849

Kakehi Y, Kanamaru H, Yoshida O, Ohkubo H, Nakanishi S, Gottesman MM, Pastan I (1988): *Mesurement of multidrug resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinomas is associated with intrinsic drug resistance*. J Urol 139: 862-865

Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB (1999): *Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol*. Br J Cancer 80: 1020-1025

Kavallaris M, Kuo DYS, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, Horwitz SB (1997): *Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes*. J Clin Invest 100: 1282-1293

Kim WJ, Kakehi Y, Kinoshita H, Aroa S, Fukumoto M, Yoshida O (1996): *Expression patterns of multidrug-resistance (MDR1), multidrug resistance-associated protein (MRP), glutathione-S-transferase pi (GST-pi) and DNA topoisomerase-II (Topo II) genes in renal cell carcinoma and normal kidney*. J Urol 156: 506-511

Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, Chen ZS, Furkuawa T, Nagayama S, Tani A, Takoa S, Aikou T, Akiyama S (1999): *Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells*. J Natl Cancer Inst 91: 1647-1653

Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M (1989): *The direct activation of human multidrug resistance (MDR1) gene by anticancer agents*. Biochem Biophys Res Commun 165: 1415-1421

Krishna R, Webb MS, Stonge G, Mayer LD (2001): *Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposomal-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties* . J Pharmacol Exp Ther 298: 1206-1212

Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH (1997): *Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines*. Int J Cancer 72:1021-1026

Legrand O, Simonin G, Zittoun R, Marie JP (1998): *Lung resistant protein (LRP) gene expression in adult acute myeloid leukemia: a critical evaluation by three techniques*. Leukemia 12: 1367-1374

Licht T, Fiebig HH, Bross KJ, Hermann F, Berger DP, Shoemaker R, Mertelsmann R (1991): *Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro*. In J Cancer 49: 630-637

List AF (1997): *Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance*. Semin Hematol 34: 20-24

Mickisch GH, Koessig J, Tschad RK, Keilhauer G, Schlick E, Alken PM (1991): *Circumvention of multidrug resistance mediated by P-170 glycoprotein using calcium antagonists in primary human renal cell carcinoma*. Urol Int 47: 118-125

Mickisch GH, Roehrich K, Koessig J, Forster R, Tshada RK, Alken PM (1990): *Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma*. J Urol 144: 755-759

Monzo M, Rosell R, Sánchez JJ, Lee JS, O'Brate A, González-Larriba JL, Alberola V, Lorenzo JC, Nunez L, Ro JY, Martin C (1999): *Paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations*. J Clin Oncol 17: 1786-1793

Mosmann T (1983): *Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods 65: 55-63

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996): *Renal-cell carcinoma*. N Engl J Med 335: 865-875

Naito S, Yokomizo A, Koga H (1999): *Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma*. Int J Urol 6: 427-439

Nannan PVR, de Wit R, Schornagel JH, Schot M, Rosing H, Lieverst J, ten Bokkel HWW, Schellens JH, Beijnen JH (1999): *Pharmacokinetics of paclitaxel administered in combination with cisplatin, etoposide and bleomycin in patient with advanced solid tumors*. Cancer Chemother Pharmacol 44: 349-353

Nicoletti MI, Valoti G, Giannakakou P, Zhan Z, Kim JH, Lucchini V, Landoni F, Mayo JG, Giavazzi R, Fojo T (2000): *Expression of beta-tubulin istoypes in human ovarian carcinoma xenografts and in a sub-panel of human cancer cell lines from the NCI-Anticancer drug screen.* J Clin Cancer Res 7: 2912-2922

Oakley BR (1992): *γ -tubulin: the microtubule organizer?*. Trends Cell Biolog 2: 1-6

Ramp U, Dejosez M, Mahotka C, Czarnotta B, Kalinski T, Wenzel M, Lorenz I, Muller M, Krammer P, Gabbert HE, Gerharz CD (2000): *Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma.* Br J Cancer 82: 1851-1859

Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR (1998): *Altered beta-tubulin expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells.* Br J Cancer 77: 562-566

Ranganathan S, Dexter DW, Benetatos CA, Chapman AE, Tew KD, Hudes GR (1996): *Increase of beta(III)- and beta(IVa)- tubulin isotypes in human prostate carcinoma cells as a result of estramustine resistance.* Cancer Res 56: 2584-2589

Reinecke P, Corvin J, Gabbert HE, Gerharz CD (1997): *Antiproliferative effects of paclitaxel (Taxol®) on human renal clear cell carcinomas in vitro.* Eur J Cancer 33: 1122-1129

Rowinsky EK, Donehower RC (1995): *Paclitaxel (Taxol).* N Eng J Med 332: 1004-1010

Rowinsky EK, Donehower RC, Jones RJ, Tucker RW (1988): *Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol.* Cancer Res 48: 4093-4098

Pritchard JB, Miller DS (1993): *Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations.* Physiol Rev 73: 765-769

Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ (1995): *The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein*. Nat Med. 1:578-582

Scheffer GL, Anouk MS, Schroeijers B, Izquierdo MA, Wiemer EAC, Scheper RJ (2000): *Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistance cancer*. Curr Opin Oncol 12: 550-556

Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, et al.. (1993) *Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. Cancer Res 53:1475-9

Schibler MJ, Cabral F (1986): *Taxol-dependent mutants of Chinese hamster ovary cells with alterations in alpha- and beta-tubulin*. J Cell Biol 102: 1522-1531

Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G (1997): *Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein*. Cancer Chemother Pharmacol 40: 13-19

Sprinz E, Caldas AP, Mans DR, Cancela A, DiLeone L, Dalla Costa T, Schwartzmann G (2001): *Fractionated doses of oral etoposide in the treatment of patients with aids-related kaposi-sarcoma: a clinical and pharmacology study to improve therapeutic index*. Am J Clin Oncol 24: 177-184

Stearns T, Kirschner M (1994): *In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of γ -tubulin*. Cell 76: 623-637

Stein U, Walther W, Shoemaker RH (1996): *Vincristin induction of mutant and wild-type human multidrug-resistance promotor is cell-type-specific and dose dependent*. J Cancer Res Clin Oncol 122: 275-282

Sullivan KF, Cleveland DW (1986): *Identification of conserved istotype-defining variable region sequences for four vertebrate β tubulin polypeptide classes.* Proc Natl Acad Sci USA 83: 4327-4331

Sullivan GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN (2001): *Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells.* J Clin Invest 105:1261-1267

Suto R, Abe Y, Nakamura M, Ohnishi Y, Yoshimura M, Lee YH, Imanishi T, Yamazaki H, Kijima H, Tokunaga T, Oshika Y, Hiraoka N, Tamaoki N, Fukuda H, Ueyama Y (1998): *Multidrug resistance mediated by overexpression of P-glycoprotein in human osteosarcoma in vitro.* Int J Oncol 12: 287-291

Tan B, Piwnica-Worms, Ratner L (2000): *Multidrug resistance transporters and modulation.* Curr Opin Oncol 12: 450-458

Thoenes W, Störkel ST, Rumpelt HJ (1986): *Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncozytomas and carcinomas).* Pathol Res Pract 181: 125-143

Vogelzan NJ, Stadler WM (1998): *Kidney cancer.* Lancet 352: 1691-1696

Volm M, Mattern J, Efferth T, Pommerenke EW (1992): *Expression of several resistance mechanisms in untreated human kidney and lung carcinomas.* Anticancer Res 12: 1063-1068

Wepp M, Raphael CL, Asbahr H, Erber WN, Meyer BF (1996): *The detection of rhodamin 123 efflux at low levels of drug resistance.* Br J Haematol 93: 650-655

Wolf KW, Mendonza A, Mentzel M, Wößmann W, Joshi H (1995): *Effects of cisplatin and mafosfamid on the interphase microtubular cytoskeleton of a human breast cancer cell line, MX-1, in vitro: A fine-structure and anti-tubulin immunofluorescence study.* Int J Oncol 7: 593-602

Yagoda A, Abi-Rached B, Petraylak D (1995): *Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993.* Semin Oncol 22:142-160

Yu DS, Chang SY, Ma CP (1998): *The expression of mdr-1-related gp-170 and its correlation with anthracycline resistant in renal cell carcinoma cell lines and multidrug-resistance sublines.* Br J Urol 82: 544-547

Yu DS, Ma CP, Chang SY (2000): *Establishment and characterization of renal cell carcinoma cell lines with multidrug resistance.* Urol Res 28: 86-92

Zastawny RL, Salvino R, Chen J, Benchimol S, Ling V (1993): *The core promoter region of the P-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53.* Oncogene 8: 1529-1535

Zhang DW, Cole SP, Deeley RG (2001): *Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines.* J B I Chem 276 :13231-13239

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Gerharz und meiner Betreuerin Frau Dr. med. Reinecke für Bereitstellung des interessanten Themas und die intensive Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Neben Anregung und Ideen standen sie mir jeder Zeit für Fragen, Ratschläge und Diskussion der Ergebnisse zu Verfügung.

Großen Dank schulde ich auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pathologie, die mich in die molekularbiologischen Methoden eingearbeitet haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Großeltern, die mir das Studium der Medizin und diese Doktorarbeit ermöglicht haben und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

8 Lebenslauf

Name: Michael Steckstor

Geburtsdatum: 26. Juni 1975

Geburtsort: Essen

Schulbildung: 1982 – 1985 Grundschule in Essen
1985 – 1994 Helmholtzgymnasium Essen
6. Juni 1994 Abitur

Zivildienst: November 1994 – Januar 1996

Studium der Medizin: SS 1996 – WS 2000/01 Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

31. März 1998 Ärztliche Vorprüfung
15. April 1999 I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9. April 2001 II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2001 – März 2002 Praktisches Jahr
am Universitätsklinikum Essen

24. Juni 2002 III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit: 1. Juli 2002 bis 31. Dezember 2004 AIP im Zentrum für
Innere Medizin im Universitätsklinikum Essen
Seit dem 01. Januar 2004 Assistenzarzt in der
Medizinischen Universitätsklinik des
Knappschaftskrankenhauses Bochum
(Direktor Prof. Dr. med. Schmiegel)

Promotionsarbeit: August 1998 bis September 2004 am Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor Prof. Dr. med. H. E. Gabbert)

9 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom gilt insbesondere aufgrund seiner erhöhten P-gp-Expression und Funktion als chemotherapieresistent. Trotzdem zeigt sich *in vitro* ein heterogenes Ansprechen der Tumoren auf Paclitaxel mit IC_{50} -Werten zwischen 0,03-387,5 μ M. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *in vitro*-Resistenzmechanismen in 16 Nierenzellkarzinomen mit intrinsischer Paclitaxel-Resistenz analysiert. Eine durch Paclitaxel-Langzeitkultur selektierte Zelllinie *clearCa-21_{res}* diente im Vergleich zur Paclitaxel-sensitiven Ausgangslinie *clearCa-21_{sens}* als Model der „erworbenen“ Resistenz.

Sowohl bei intrinsischer als auch bei „erworbener“ Resistenz spielte P-gp die entscheidende Rolle. In den 16 Linien bestand eine Korrelation zwischen den IC_{50} -Werten für Paclitaxel und der P-gp-Expression und Funktion im Rh-123 Efflux ($r = 0,57$, $p = 0,021$ bzw. $r \sim 0,53$, $p = 0,036$). In der resistenten Linie *clearCa-21_{res}* ($IC_{50} > 1000 \mu$ M) zeigte sich im Vergleich zur Linie *clearCa-21_{sens}* (IC_{50} : 0,38 μ M) ein 7,2-fach gesteigerter Rh-123-Efflux bei gleich starker P-gp-Expression (45,3% vs. 45,5%). In 6 Linien, darunter die Linie *clearCa-21_{sens}*, gelang eine ca. 50%-ige P-gp-Blockierung mit Verapamil und Cremophor EI®. Im Gegensatz dazu war eine Modulation in der Zelllinie *clearCa-21_{res}* nicht möglich. In den Linien *clearCa-15* und *chrompho-B* konnte die hohe Paclitaxel-Resistenz nicht durch P-gp erklärt werden. Deshalb wurden MRP und LRP als alternative Resistenzmechanismen untersucht. Der MRP-Gehalt erwies sich als niedrig, die LRP-Expression als mit P-gp vergleichbar. Der Calcein-Efflux, Indikator der MRP-Funktion, war hoch und in 5 Linien nicht durch den Modulator Probenecid blockierbar. Es fanden sich keine Beziehungen zwischen der MRP-Expression, dem Calcein-Efflux und der Paclitaxel-Sensitivität. LRP wurde erstmals in einer größeren Anzahl von Nierenkarzinomzelllinien ($n=16$) untersucht, wobei sich eine Korrelation zur Paclitaxel-Sensitivität ergab ($r = 0,51$, $p = 0,044$). Eine hohe Koexpression zwischen LRP und P-gp konnte für allen Linien gefunden werden ($r = 0,82$, $p < 0,01$), sodaß eine gleichsinnige Wirkungsverstärkung zwischen P-gp und LRP denkbar wäre. Eine 120 h-Paclitaxel-Kurzzeitexposition konnte in 13 Linien keine Änderung der Proteinexpression und Funktion von P-gp, LRP und MRP bewirken. Unterschiede in der MRP- und LRP-Expression sowie im Calcein-Efflux konnten bei der erworbenen Resistenz für die Linien *clearCa-21_{sens}* und *clearCa-21_{res}* nicht gefunden werden. Ein veränderter Gehalt an β -Tubulin-Isotypen könnte in einem Zusammenhang mit der Paclitaxel-Resistenz stehen. In der Paclitaxel-resistenten Linie *clearCa-15* (IC_{50} : 130,17 μ M, P-gp: 34,7%, Rh-123: 36,3%) ließ sich ein deutlich erhöhter Gehalt an β_{III} -Tubulin detektieren. Im Model der erworbenen Resistenz zeigte die resistenten Line *clearCa-21_{res}* im Vergleich zur sensitiven Linie *clearCa-21_{sens}* einen leicht erhöhten β_{IV} -Tubulin-Gehalt.