

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg
Leiter: Prof. Dr. Gudermann

Die enzymatische Inaktivierung von
Anthrazyklinen:
Ein neuer Resistenzmechanismus in der
Tumorthherapie?

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
LUTZ KOCH
aus Lich

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 27.09.2001

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. Edmund Maser

Correferent: PD. Dr. Jörg Beyer

1	EINLEITUNG	1
1.1	Krebs	1
1.2	Allgemeine Therapieprinzipien	2
1.2.1	Operation	2
1.2.2	Bestrahlung	2
1.2.3	Chemotherapie	2
1.2.4	Kombinierte Therapien	3
1.3	Gruppe der Anthrazyklinzytostatika	4
1.3.1	Wirkungsmechanismus	5
1.3.2	Toxizität	6
1.3.3	Metabolismus von Daunorubicin	7
1.3.3.1	Carbonyl-Reduktion	8
1.3.3.1.1	Aldehyd Reduktase	8
1.3.3.1.2	Carbonyl Reduktase	9
1.3.3.1.3	Dihydrodiol Dehydrogenase	10
1.3.3.1.4	Aldose Reduktase	10
1.4	Zytostatikaresistenz	11
1.4.1	„Multidrug“-Resistenz (MDR=Multidrug resistance)	11
1.4.2	Atypische „Multidrug“-Resistenz	13
1.4.2.1	„Multidrug-resistance-related protein“ (MRP)	13
1.4.2.2	„Lung-resistance-related protein“ (LRP)	14
1.4.2.3	Weitere Resistenzmechanismen	14
1.5	Mammakarzinom	16
1.5.1	Epidemiologie	16
1.5.2	Ätiologie und Pathogenese	16
1.5.3	Therapie	17
1.6	Ovarialkarzinom	17
1.6.1	Epidemiologie	17
1.6.2	Ätiologie und Pathogenese	18
1.6.3	Therapie	18
1.7	Malignes Melanom	19
1.7.1	Epidemiologie	19

1.7.2	Ätiologie und Pathogenese	19
1.7.3	Therapie	20
1.8	Pankreaskarzinom	20
1.8.1	Epidemiologie	20
1.8.2	Ätiologie und Pathogenese	21
1.8.3	Therapie	21
1.9	Magenkarzinom	22
1.9.1	Epidemiologie	22
1.9.2	Ätiologie und Pathogenese	22
1.9.3	Therapie	22
2	AUFGABENSTELLUNG	24
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Zellkultur	26
3.1.1	Zelllinien	26
3.1.2	Kulturmedien	27
3.1.2.1	Ovarialkarzinom-Zelllinie (EFO-21) und Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7)	27
3.1.2.2	Sensitive und resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181 und EPP85-181RDB), sensitive und resistente Magenkarzinom-Zelllinie (EPG85-257 und EPG85-257-RES)	27
3.1.2.3	Melanom-Zelllinie (MeWo)	28
3.1.2.4	Einfriermedien	28
3.1.3	Puffer und Lösungen	28
3.1.4	Zellkulturartikel	29
3.1.5	Geräte	29
3.1.6	Kulturhaltung	29
3.1.7	Subkultivierung	30
3.1.8	Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer	31
3.1.9	Kryokonservierung	32
3.1.10	Auftauen von Zellen	32

Inhaltsverzeichnis

3.2	Aufarbeiten der Zellen	33
3.2.1	Puffer und Lösungen	33
3.2.2	Geräte	33
3.2.3	Ernten und Aufschluss der Zellen	33
3.2.4	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation	34
3.3	Bestimmung der reduktiven Enzymaktivität	35
3.3.1	Puffer und Lösungen	35
3.3.2	Geräte	35
3.3.3	Standardinkubationsansatz	36
3.3.4	Analyse von Daunorubicin und Daunorubicinol mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	36
3.3.5	Proteinbestimmung nach Bradford	36
3.3.6	Berechnung der spezifischen Aktivität	37
3.4	Messung der mRNA-Expression	38
3.4.1	Puffer und Lösungen	38
3.4.2	Gebrauchsfertige „Kits“	38
3.4.3	Geräte	38
3.4.4	Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA)	38
3.4.5	Isolierung der RNA aus Tumorzellen	38
3.4.6	Quantifizierung der RNA und Reinheitsprüfung	39
3.4.7	„Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR)	40
3.4.8	Verwendete Primer	43
3.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.4.10	Agarosegelherstellung	45
3.4.11	Elektrophorese	45
3.4.12	Auswertung der RT-PCR-Amplifikate	46
3.5	Statistische Analyse	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Zytosolischer Daunorubicin-Metabolismus nach simulierter Chemotherapie in vitro	47

Inhaltsverzeichnis

4.1.1	Melanom-Zelllinie (MeWo)	48
4.1.2	Ovarialkarzinom-Zelllinie (EFO-21)	49
4.1.3	Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7)	49
4.2	mRNA-Expression der vier bekannten Daunorubicin-Reduktasen	51
4.2.1	Vergleich der Grund-Expression der Daunorubicin-Reduktasen	52
4.2.2	mRNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen nach simulierter Chemotherapie in vitro	54
4.2.2.1	Melanom-Zelllinie (MeWo)	54
4.2.2.2	Sensitive Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181)	56
4.2.2.3	Resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181RDB)	58
4.2.3	Langzeit-Inkubation mit Daunorubicin	61
4.2.3.1	Sensitive und resistente Magenkarzinom-Zelllinie (EPG257 und EPG257-RES)	61
4.3	mRNA-Expression von MDR1, MRP und LRP	62
4.3.1	Vergleich der Grund-Expression von MDR1, MRP und LRP	63
4.3.2	mRNA-Expression von MDR1, MRP und LRP nach simulierter Chemotherapie in vitro	65
4.3.2.1	Malignes Melanom (MeWo)	65
4.3.2.2	Sensitives Pankreaskarzinom (EPP85-181)	67
4.3.2.3	Resistentes Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB)	69
5	DISKUSSION	72
5.1	Zytosolischer Daunorubicin-Metabolismus	72
5.2	mRNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen	74
5.3	Charakterisierung weiterer, „klassischer“ Resistenz-Mechanismen und Einfluss auf die Daunorubicin-Reduktion	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	89

8	ANHANG	110
8.1	Veröffentlichungen	110
8.1.1	Veröffentlichungen in Fachzeitschriften	110
8.1.2	Kongressbeiträge / Poster	110
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	112
8.3	Danksagung	113

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für mehr als hundert verschiedener bösartiger maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers kann maligne Entartungen hervorbringen, manchmal sogar mehrere unterschiedliche Typen. Jedes der Leiden wiederum hat seine eigenen Merkmale. Trotz dieser Verschiedenartigkeit entstehen alle Tumore durch recht ähnliche grundlegende Prozesse.

Die 30 Billionen Zellen eines gesunden menschlichen Körpers leben in einer komplexen Gemeinschaft, die auf wechselseitigen Abhängigkeiten und geteilter Herrschaft beruht. Ob sich eine Zelle vermehrt oder nicht, unterliegt dem Einfluss anderer: Normalerweise teilt sie sich nur, wenn sie von benachbarten Zellen dazu eine Aufforderung erhält. Diese unaufhörliche Zusammenarbeit und Kontrolle gewährleistet, dass jedes Gewebe eine dem Körper angemessene Ausdehnung und Architektur behält.

Ganz anders Krebszellen: Sie durchbrechen die Kontrollen, beachten die üblichen Beschränkungen des Zellwachstums nicht mehr und folgen ihrem eigenen Vermehrungsprogramm. Hinzu kommt eine noch heimtückischere Eigenschaft - ihre Fähigkeit, den Ort ihres Entstehens zu verlassen, in benachbarte Gewebe einzudringen, sich abzusiedeln und selbst an weit entfernten Stellen im Körper zu neuen Wucherungen auszuwachsen. Tumoren aus bösartigen Zellen werden häufig im Verlauf ihrer Entwicklung immer aggressiver. Sie können schließlich zum Tod führen, wenn sie lebenswichtige Gewebe und Organe bis zur Funktionsunfähigkeit schädigen.

1.2 Allgemeine Therapieprinzipien

1.2.1 Operation

Die älteste und noch immer die häufigste Behandlungsmethode ist die Operation. Schnell und wirksam ist sie zudem die einzige Therapieform, bei der sich nachprüfen lässt, ob der Tumorherd vollständig beseitigt wurde: Das entfernte Gewebe sollte bei der pathologischen Überprüfung einen geschlossenen Kranz normaler Zellen zeigen.

Leider hat diese Behandlungsform entscheidende Nachteile. Die Ausräumung der für den Chirurgen sichtbaren Tumormassen garantiert nicht, dass er auch die mikroskopischen Ausläufer mit erfasst hat, die oft für Krebs typisch sind.

1.2.2 Bestrahlung

In einigen Fällen ist eine Bestrahlung der Operation vorzuziehen. Dabei setzt man den Bereich der Krebsgeschwulst intensiven Röntgen- oder Gammastrahlen aus – meist von außen, manchmal aber auch durch Einbringen winziger radioaktiver Strahlungsquellen in den Körper. Dadurch werden entweder den Zellen so schwere genetische Schäden zugefügt, dass sie absterben, oder sie werden dazu gebracht, gleichsam Selbstmord zu begehen. Weil gesundes Gewebe sich leichter von einer Bestrahlung zu erholen vermag als Krebszellen, kann eine solche Therapie die anatomischen Strukturen rings um die Geschwulst erhalten und somit den Krebs ohne bleibende Funktionseinbußen heilen.

1.2.3 Chemotherapie

Trotz vieler Vorteile erweist sich die Strahlentherapie manchmal als unzureichend, weil sie – wie der chirurgische Eingriff – nicht immer alle Zellen eines Tumors zerstört und bereits abgesiedelte nicht erfasst, die dann im Laufe der Zeit vielerorts zu Tumoren auswachsen. In solchen Fällen muss man zur Chemotherapie greifen – der Verabreichung von Medikamenten, die sich über

die Blutbahn im gesamten Körper verteilen. Chemotherapeutika wirken auf menschliche Zellen meist sehr ähnlich wie einige Antibiotika auf Bakterien – nämlich zytostatisch.

Die Wirkmechanismen von Zytostatika sind sehr unterschiedlich: Mitosegifte wie Vincristin und Vinblastin unterbrechen unter anderem die Zellteilung, alkylierende Substanzen (z. B. Cyclophosphamid, Busulfan, Cisplatin) übertragen Alkylreste auf DNA-Bestandteile und Folsäure-Antagonisten, wie z. B. Methotrexat, verhindern RNA- und DNA-Synthese. Purin- (Azathioprin) und Pyrimidin-Antagonisten (5-Fluoruracil, Cytarabin) greifen ebenfalls in den Nucleinsäurestoffwechsel ein. Weit verbreitet sind auch zytotoxisch wirkende Antibiotika wie Daunorubicin, Doxorubicin, Mitomycin C, Bleomycin und Epirubicin.

Die heute verfügbaren Medikamente versagen häufig, weil sie auch viele gesunde Zellen töten und dadurch schwere Nebenwirkungen auslösen, welche wiederum die zulässigen Dosen einschränken. Beispielsweise ruft eine Schädigung der sich schnell vermehrenden Zellen des blutbildenden Knochenmarks Anämie hervor, macht den Körper unfähig zur Infektionsabwehr und fördert die Neigung zur inneren Blutung, weil der Patient nicht genügend rote und weiße Blutkörperchen sowie die für die Blutgerinnung erforderlichen Blutplättchen zu bilden vermag. Weitere Nebenwirkungen der Behandlung sind Durchfall, Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall. Manche Zytostatika schädigen auch das Nervensystem.

1.2.4 Kombinierte Therapien

Man setzt Operation und Bestrahlung in Kombination ein, um Tumoren im Frühstadium an ihrem Ursprungsort – oder, wenn nötig, in benachbarten Lymphknoten – zu eliminieren.

Die häufigste Therapiekombination ist eine Operation oder eine Strahlenbehandlung mit nachfolgender Chemotherapie (z. B. die heutige Behandlung des Brustkrebs).

Bei der Induktionschemotherapie, einer neueren Behandlungsform, führt man zuerst eine Chemotherapie durch und erst danach eine Operation oder Bestrahlung. Auf diese Weise lassen sich die im Körper verstreuten Tumorzellen so früh wie möglich behandeln. Auch der Primärtumor verringert seine Masse, so dass in manchen Fällen weniger oder gar keine organentfernenden Operationen mehr nötig sind.

1.3 Gruppe der Anthrazyklinzytostatika

Das erste zytostatisch wirksame Antibiotikum, Actinomycin A, wurde 1940 von Waksman und Woodruff aus einer Streptomyzetenkultur isoliert. Viele verwandte Antibiotika wie Actinomycin D wurden in den Folgejahren isoliert (Meienhofer et al., 1974). Heute werden zur Gruppe der Fermentationsprodukte mit antibiotischer Wirksamkeit Mithramycin, Mitomycin C, Actinomycin, Bleomycin und die Anthrazykline gezählt. Zur Gruppe der Anthrazykline gehören Daunorubicin (Daunoblastin®), Doxorubicin (Adriblastin®), Epirubicin (Farmorubicin®) und Idarubicin (Zavedos®) (siehe Abbildung 1).

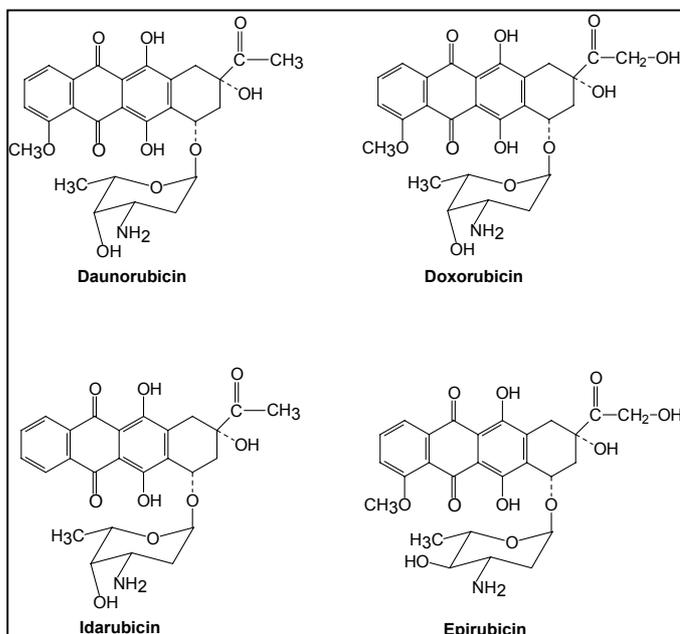


Abbildung 1: Strukturformeln verschiedener Anthrazykline

Doxorubicin ist heute das Zytostatikum mit dem breitesten Wirkungsspektrum und der weltweit häufigsten Anwendung. Daunorubicin wird in der Therapie von akuten Leukämien eingesetzt. Idarubicin, 4-Demethoxy-Daunorubicin, hat in Leukämiemodellen bei geringerer Dosierung eine Aquieffektivität mit Daunorubicin gezeigt (Milroy et al., 1987). Die höhere Lipophilie führt zu einer erhöhten zellulären Aufnahme. Idarubicin wird im Gegensatz zu Adriamycin und Daunorubicin enteral resorbiert. Klinisch wurde die Wirksamkeit bei der akuten myeloischen Leukämie und beim Mammakarzinom nachgewiesen (Dahgestani et al., 1985; Harousseau, 1988; Plezia et al., 1988). Es liegt keine komplette Kreuzresistenz gegenüber Adriamycin und Daunorubicin vor. Die klinische Effektivität von Epirubicin, dem C´4-Epimer von Doxorubicin, ist mit Doxorubicin vergleichbar, die Toxizität ist geringer ausgeprägt und das Risiko der Kardiotoxizität steigt erst bei einer höheren kumulativen Dosis an (Camaggi et al., 1988; Cersosimo et al., 1986; Torti et al., 1986). Zahlreiche weitere Anthrazyklinderivate befinden sich derzeit in klinischer Prüfung.

1.3.1 Wirkungsmechanismus

In *in-vitro*-Untersuchungen wurden verschiedene Wirkungsmechanismen der Anthrazykline nachgewiesen. Eine Interkalation in die DNA führt zu einer Inhibition der DNA-Replikation und Transkription, eine Komplexierung wurde ebenfalls für die ribosomale RNA beschrieben (Patel et al., 1978; Philips et al., 1978; 1986; 1988; Pigram et al., 1972). Intermediär auftretende Anthrazyklin-Semichinon- und Sauerstoff-Radikale reagieren mit zellulären Makromolekülen und führen zur Schädigung von DNA, Enzymen und Membranen und einer Komplexierung mit dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) (Bachur et al., 1977; Handa et al., 1975; Myers et al., 1986; Nakazawa et al., 1985; Powis, 1987). Unabhängig von der Bildung freier Radikale wurden zusätzlich Membraneffekte (Boucek et al., 1987; Sehested et al., 1976; Tritton et al., 1982), Änderungen der intrazellulären Calcium-Freisetzung (Keyes et al., 1987) und Reaktionen mit der Topoisomerase I und II beobachtet (Wassermann et al., 1990).

1.3.2 Toxizität

Neben den üblichen Nebenwirkungen von Zytostatikamedikamenten (Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, Haarausfall u.a.) führen Anthrazykline zu einer ausgeprägten Knochenmarkssuppression. Lang andauernde Anthrazyklinverabreichungen können zu hämolytischen Anämien führen, die auf der Bildung freier Radikale bei gleichzeitig vermindertem Glutathiongehalt der Erythrozyten beruhen (Amitai et al, 1996).

Doch insbesondere die Kardiotoxizität der Anthrazyklin-Therapie ist ein großes klinisches Problem (Unverferth et al., 1982; Rhoden et al., 1993). Die kardiotoxischen Nebenwirkungen der Anthrazykline können in einen akuten und einen chronischen Typ unterteilt werden. Während der Anthrazyklininjektion treten häufig passagere Rhythmusstörungen auf (Sinustachykardie, supraventrikuläre Tachykardie, Extrasystolie) ohne wesentliche klinische Relevanz auf.

Aus klinischer Sicht sind die Späteffekte der Anthrazyklintherapie von großer Bedeutung. Das Auftreten einer Kardiomyopathie ist von der verabreichten Anthrazyklingsamtdosis abhängig. Sie ist die Folge einer medikamentösbedingten Myozytenschädigung. Morphologisch manifestiert sich dies in einem Verlust der zytoplasmatischen Myofibrillen und einer vakuolären Degeneration der Myozyten. Als Risikofaktoren, die das Auftreten einer Kardiomyopathie begünstigen, werden Alter über 70 Jahre und vorbestehende Herzerkrankungen, wie abgelaufener Myokardinfarkt oder langjähriger therapierefraktärer Hypertonus, angesehen. Die klinische Symptomatik kann gelegentlich durch Digitalis und Diuretika gebessert werden. Die Anthrazyklin-Kardiomyopathie wird in Zusammenhang mit den 13-Hydroxymetaboliten (Daunorubicinol, Doxorubicinol) der Substanzen gebracht (Olson et al., 1988; Cusack et al., 1993) und der Entstehung von freien Radikalen (Olson et al., 1981).

1.3.3 Metabolismus von Daunorubicin

Bachur und Gee (1971) zeigten, dass Daunorubicin in unterschiedlichen Rattengeweiben metabolisiert werden kann. Die höchste Aktivität befindet sich in Leber, Niere und Dünndarm, geringere Aktivitäten dagegen in allen anderen verwendeten Gewebearten. Untersuchungen von Loveless et al. (1978) an Ratte, Maus, Hund und Kaninchen bestätigten die Untersuchungen des Daunorubicin-Metabolismus. Die höchste Aktivität zeigte sich auch hier wieder in Leber und Niere, geringere Aktivität in Herz und Skelettmuskulatur.

Der Metabolismus von Daunorubicin beginnt mit der Reduzierung am C13-Atom zum 13-Hydroxymetaboliten Daunorubicinol. Diese Carbonyl-Reduktion wird unter NADPH-Verbrauch vermittelt (siehe Abbildung 2).

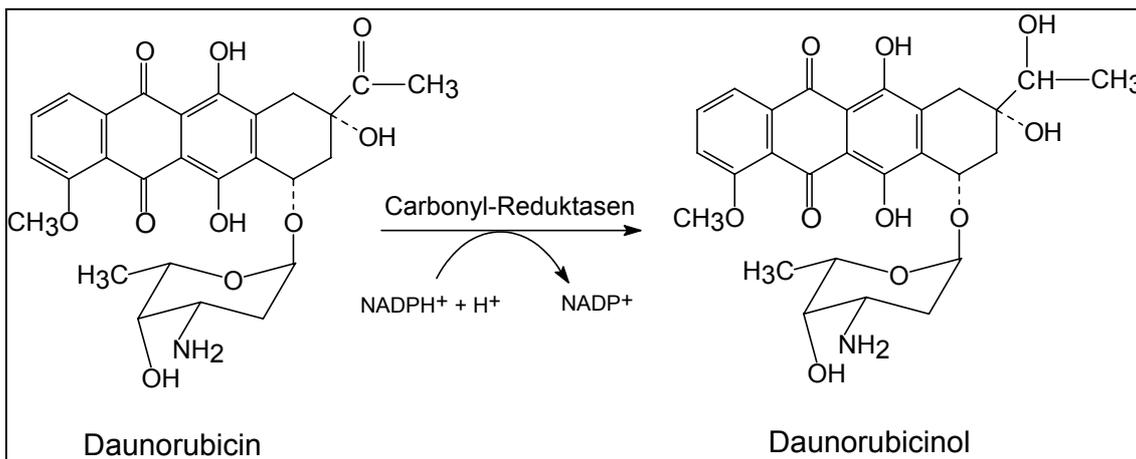


Abbildung 2: Metabolismus von Daunorubicin. Daunorubicin wird vor allem durch Carbonyl-Reduktion unter NADPH-Verbrauch am C13-Atom zu Daunorubicinol reduziert.

Untersuchungen in den subzellulären Kompartimenten zeigten, dass Daunorubicinol nur im Zytosol gebildet wird. Verantwortliche, zytosolische Enzyme sind die Carbonyl Reduktase, die Aldehyd Reduktase, die Dihydrodiol Dehydrogenase und eventuell die Aldose Reduktase (siehe 1.3.3.1.1 bis 1.3.3.1.4).

Nachfolgende, aber in sehr geringen Maßen vorkommende Metabolite sind die durch mikrosomale Cytochrom P-450 katalysierten Aglykone von Daunorubicin

und Daunorubicinol. Noch geringer ist die auch durch Cytochrom P-450 vermittelte Demethylierung am C4-Atom. Diese demethylierte C4-Gruppe wird anschließend im Phase-II-Metabolismus sulfatiert oder glucuronidiert. Außerdem kann eine Konjugation mit Glutathion stattfinden, die durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert wird (Huffmann et al., 1972).

1.3.3.1 Carbonyl-Reduktion

Die Carbonyl-Reduktion ist ein wichtiger Schritt der Phase-I-Biotransformation einer großen Anzahl unterschiedlichster xenobiotischer Verbindungen und pharmakologischer Substanzen, die eine Carbonyl-Gruppe besitzen (Felsted et al., 1980; Ikeda et al., 1981; Higuchi et al., 1993; Imamura et al., 1991; 1993).

Weiterhin ist die Carbonyl-Reduktion an der Inaktivierung verschiedener Medikamente, wie z.B. Warfarin (Moreland und Hewick, 1975; Hermans und Thijssen, 1992) und Haloperidol (Imamura et al., 1993; Chang, 1992) beteiligt. Auf der anderen Seite werden erst wirksame Medikamentenmetabolite durch Carbonyl-Reduktion gebildet, wie es z.B. bei Naloxon (Roerig et al., 1976), Pentoxyphyllin (Ward und Clissold, 1987), Metyrapon (Maser und Legrum, 1985), Propranolol (Bodor und Prokai, 1990) und Chloralhydrat (Ikeda et al., 1981) der Fall ist.

Eine weitere wichtige Funktion der Carbonyl-Reduktion ist die Beteiligung an der Detoxifizierung von Chinonen (Wermuth et al., 1986), Aflatoxin B₁ (Hayes et al., 1993; Judah et al., 1993), Aldophosphamid (Parekh und Sladek, 1993), tripeptidische Aldehyde (Inoue et al., 1993), Kepon (Binstock et al., 1992) und Daunorubicin (Soldan et al., 1996).

1.3.3.1.1 Aldehyd Reduktase

Eine dieser Carbonyl Reduktasen ist die Aldehyd Reduktase (EC 1.1.1.2), die auch als Alkoholoxidoreduktase, „high K_m“ Aldehyd Reduktase, Mevaldat Reduktase, Daunorubicin-pH 8,5-Reduktase, Hexonat Reduktase, Lactaldehyd Reduktase, Glucuronat Reduktase und ALR1 bezeichnet wird (Felsted und

Bachur, 1980; Wermuth, 1985; Flynn, 1982; Flynn und Green, 1993). Dieses Enzym aus der Aldo-Keto-Reduktase-Superfamilie konnte in bisher allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Die Aldehyd Reduktase katalysiert die Reduktion einer Reihe aliphatischer und aromatischer Aldehyde endo- wie exogener Herkunft. Der Name Daunorubicin-pH 8.5-Reduktase ergibt sich aus dem Umstand, dass das Keton Daunorubicin von einer Aldehyd Reduktase bei einem pH-Optimum von 8.5 umgesetzt wird und somit eine Ausnahme von der Regel bildet, dass Ketone ausschließlich von Keton-Reduktasen reduziert werden (Wermuth, 1985).

Weiterhin zeigten einige Studien, dass die Aldehyd Reduktase in verschiedenen Geweben als eine Hydroxysteroid Dehydrogenase fungieren kann (Pietruszko und Chen, 1976; Sawada et al., 1979). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Aldehyd Reduktase im Metabolismus von endogenen Steroiden beteiligt sein könnte.

1.3.3.1.2 Carbonyl Reduktase

Die Carbonyl Reduktase (EC 1.1.1.184), auch bekannt als Prostaglandin 9-Ketoreduktase, Daunorubicin-pH 6.0-Reduktase und ALR3 (Flynn und Green, 1993), wird entgegen früherer Meinungen nicht mehr der Aldo-Keto-Reduktasen-Superfamilie zugeordnet, sondern aufgrund struktureller Eigenschaften zur Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen gezählt.

Daunorubicin und weitere diverse xenobiotische Carbonylsubstrate werden, ebenso wie physiologische, carbonylgruppen enthaltende Substrate (z. B. Steroidhormone (Iwata et al., 1989;1990) oder Prostaglandine (Schieber et al., 1992)), von der Carbonyl Reduktase reduziert (Felsted und Bachur, 1980). Neben diesen Ketonen werden auch Chinone von der Carbonyl Reduktase umgesetzt. Dieses Enzym bildet im Menschen die Basis für die Entgiftung toxischer Chinonmetabolite, da sie etwa 50-70 % der NADPH-abhängigen Chinon-Reduktaseaktivität in der menschlichen Leber ausmacht (Wermuth et al., 1986; Jarabak und Harvey, 1993).

1.3.3.1.3 Dihydrodiol Dehydrogenase

Ein weiteres Enzym mit der Fähigkeit Daunorubicin zu reduzieren, wurde 1995 aus humanen Leberzytosol isoliert (Ohara et al., 1995). Es handelt sich dabei um ein Isoenzym der Dihydrodiol Dehydrogenase (EC 1.3.1.20), die normalerweise als NADP-Oxidoreduktase die Oxidation von *trans*-Dihydrodiolen aromatischer Kohlenwasserstoffe zum korrespondierenden Katechol katalysiert (Glatt et al., 1979; Vogel et al., 1980; Penning, 1993).

Das Enzym aus der Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen besitzt im Metabolismus von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zwei entgegengesetzte toxikologische Funktionen. Zum einen unterdrückt es die Bildung von karzinogenen Dihydrodiol-Epoxiden (Oesch et al., 1984; Smithgall et al., 1986) aber andererseits ist es an der Entstehung zytotoxischer Chinone durch Autooxidation der Katecholmetaboliten beteiligt (Penning et al., 1996; Flowers et al., 1996).

Weiterhin ist die Dihydrodiol Dehydrogenase im Metabolismus von carbonylgruppen-tragenden Xenobiotika, Steroiden und Prostaglandinen involviert (Penning et al., 1984; Wörner und Oesch, 1984; Penning et al., 1986; Hara et al., 1986). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Dihydrodiol Dehydrogenase der Rattenleber identisch mit dem Gallensäure-bindenden Protein ist (Stolz et al., 1987).

1.3.3.1.4 Aldose Reduktase

Eine weitere Reduktase aus der Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen mit der Fähigkeit, Xenobiotika und endogene Aldehyde und Ketone zu reduzieren, ist die Aldose Reduktase (EC 1.1.1.21) (Iwata et al., 1990). Spezielle Beachtung hat die Aldose Reduktase dadurch erreicht, dass ihr eine mögliche Rolle in der Reduktion von Glukose während diabetischer Hyperglykämien und damit eine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener diabetischer Komplikationen, wie z.B. Neuropathie (Greene, 1988), Retinopathie (Stribling et al., 1990) und Katarakt (Bekhor et al., 1989), zugesagt wird. Wie die Aldose Reduktase diese Komplikationen hervorruft, ist bisher nicht vollständig geklärt. Der osmotische

Stress, der durch die intrazelluläre Akkumulation des reduktiven Metaboliten Sorbitol hervorgerufen wird, ist wohl für die Entstehung der Linsentrübung hauptverantwortlich.

Für die Aldose Reduktase ist eine Daunorubicin-Reduktase-Aktivität bisher noch nicht nachgewiesen worden. Die CHO-Reduktase, ein aus „chinese hamster ovary cells“ isoliertes und charakterisiertes Enzym, besitzt jedoch eine hohe Affinität, Daunorubicin zu reduzieren (Hyndman et al., 1997). Die Aldose Reduktase besitzt eine Sequenz-Identität von 75% zu dieser CHO-Reduktase (Jez et al., 1997), so dass eine Beteiligung der Aldose Reduktase am Daunorubicin-Metabolismus möglich ist.

1.4 Zytostatikaresistenz

Die Zytostatikaresistenz maligner Zellen ist als Hauptproblem der zytostatischen Chemotherapie maligner Tumoren anzusehen. Im Gegensatz zur primären Zytostatikaresistenz, die bei Malignomen genuin ohne chemotherapeutische Vorbehandlung vorliegen kann, bezeichnet man die durch zytostatische Behandlung induzierte Resistenz gegen Chemotherapeutika als sekundäre Zytostatikaresistenz.

Im folgenden sind neben der klassischen „Multidrug“-Resistenz auch atypische Formen der Zytostatikaresistenz beschrieben.

1.4.1 „Multidrug“-Resistenz (MDR=Multidrug resistance)

Als klassische „Multidrug“-Resistenz wird die Resistenz maligner Zellen gegen strukturell unterschiedliche Zytostatika bezeichnet, die auf ihrem energieabhängigen Export aus den Zellen durch P-Glykoprotein beruht (Ricordan und Ling, 1979).

P-Glykoprotein ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 170.000. Es besteht aus 1280 Aminosäuren und wird durch das *MDR₁*-Gen („multidrug resistance“) kodiert, das auf dem Chromosom 7q21.1 lokalisiert ist (Fojo et al., 1986). Es formt mit seinen beiden homologen Hälften, die jeweils aus sechs in der Zellmembran gelegenen hydrophoben Domänen und einer am

hydrophilen Carboxylende intrazellulär lokalisierten ATP-Bindungsstelle bestehen, einen Kanal, durch den Xenobiotika aus der Zelle exportiert werden können (Yoshimura et al., 1989) (Abbildung 3).

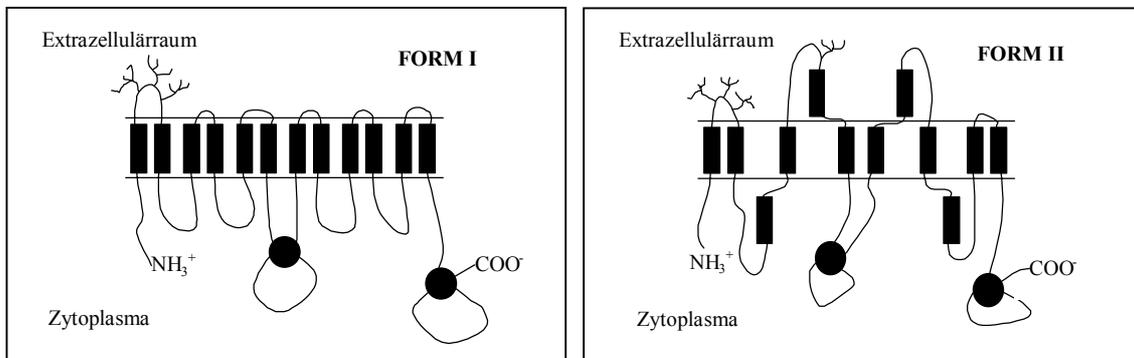


Abbildung 3: Strukturmodelle des P-Glykoproteins. Das Modell von Yoshimura et al. (1989) ist links als FORM I abgebildet, das alternative Modell von Zhang et al. (1991) rechts als FORM II. Transmembranöse Domänen sind als solide Rechtecke, ATP-bindende Regionen sind als solide Kreise dargestellt.

Entsprechend der hohen Homologie mit Transportproteinen bei Bakterien ist der durch P-Glykoprotein vermittelte Detoxifikationsmechanismus phylogenetisch alt. Dementsprechend ist seine Substratspezifität gering, und es wird in normalen Geweben exprimiert, die entweder einen hohen Fremdstoffmetabolismus haben oder denen eine besondere Schutzfunktion zukommt, wie z.B. Nebennierenrinde, proximaler Nierentubulus, Gallengangepithel und Darmschleimhaut (Cordon und O'Brien, 1991). Wahrscheinlich ist es auch ein integraler Bestandteil der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (Cordon et al., 1989).

Die Zytostatika, die Substrate für P-Glykoprotein sind, gehören verschiedenen Klassen an. Dazu gehören die Anthrazykline, die Vincaalkaloide, die Epipodophyllotoxine, die Taxane, Mitoxantron und Actinomycin D. Ihr gemeinsames Strukturmerkmal besteht in einem aromatischen oder heteroaromatischen Ringsystem. Außerdem sind die meisten dieser Substanzen bei physiologischem pH-Wert positiv geladen und haben hydrophobe Gruppen.

Seit Anfang der 80er Jahre ist aus *in-vitro*-Untersuchungen bekannt, dass der durch P-Glykoprotein vermittelte Efflux der Zytostatika durch Kalziumantagonisten vom Verapamiltyp gehemmt werden kann (Tsuru, 1989; Tsuru et al., 1981). Inzwischen ist eine Reihe von diesen Substanzen z.T. in ihrer kardiovaskulär deutlich nebenwirkungsärmeren Form der entsprechenden Enantiomeren, wie z.B. Dexverapamil oder Dexniguldipin, entwickelt und klinisch untersucht worden. Zusätzlich wurden weitere Modulatoren der verschiedenen Medikamentengruppen entdeckt und in der Klinik erprobt, wie z.B. Chinidin, Ciclosporin A und Tamoxifen.

Klasse	Beispiel
Anthrazyklin-Analoga	Cyanmorpholino-doxorubicin, N-acetyldaunorubicin
Antibiotika	Cepharanthidin, Cefoperazon, Erythromycin
Antimalaria-Mittel	Chloroquin, Chinidin, Chinin
Kalzium-Kanal-Blocker	Verapamil, Nicardapin, Diltiazem
Calmodulin-Inhibitoren	Chlorpromazin, Trifluoperazin
Kardiovaskuläre Medikamente	Propranolol, Amiodaron, Dipyrimadol
Immunsuppressoren	Cyclosporin A, FK 506, PSC 833
Steroide und Derivate	Progesteron, Tamoxifen
„Surfactants“	Tween 80, Solutol HS-15

Tabelle 1: Stoffe, die den P-Glykoprotein-vermittelten Efflux von Zytostatika hemmen.

1.4.2 Atypische „Multidrug“-Resistenz

1.4.2.1 „Multidrug-resistance-related protein“ (MRP)

Auf der Suche nach weiteren Membranpumpen, ähnlich dem P-Glykoprotein, konnte das „multidrug-resistance-related protein“ (MRP) als eine weitere bestätigt werden. Das *MRP*-Gen, lokalisiert auf dem Chromosom 16p13.1, ist fern verwandt mit dem *MDR₁*-Gen und wurde erstmals in einer „multidrug“-resistenten, humanen Lungenkrebs-Zelllinie nachgewiesen (Cole et al., 1992). Das Produkt des *MRP*-Gens ist ein 190 kDa membrangebundenes Glykoprotein (Abbildung 4). In vielen resistenten Tumorzelllinien, in denen keine Expressionssteigerung des *MDR₁*-Gens nachgewiesen werden konnte, zeigten sich eine Amplifikation und Überexpression des *MRP*-Gens (Barrand et al., 1994; Schneider et al., 1994). Die vermutete physiologische Funktion des MRP

ist es, Konjugate von lipophilen Substanzen mit Glutathion unter ATP-Verbrauch aus der Zelle oder in Vesikel zu pumpen.

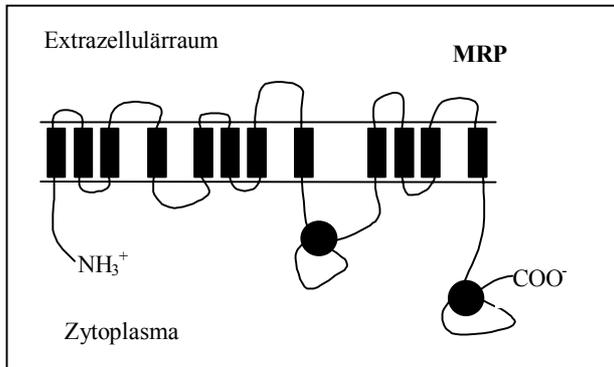


Abbildung 4: Strukturmodell des MRP. Transmembranöse Domänen sind als solide Rechtecke, ATP-bindende Regionen sind als solide Kreise dargestellt (nach Almquist et al. (1995)).

1.4.2.2 „Lung-resistance-related protein“ (LRP)

Dieses 110-kDa schwere Protein wurde erstmals 1993 in einer Lungenkrebszelllinie gefunden, in der eine nicht P-Glykoprotein-vermittelte Abnahme der Zytostatika-Akkumulation in der Zelle beobachtet wurde (Scheper et al., 1993). Weiterhin wurde es in resistenten Brust-, Myeloma- und Fibrosarkomzellen beschrieben. Bestimmung von LRP bei akuter myeloischer Leukämie und fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zeigte eine starke Korrelation zwischen LRP-Expression und Versagen der Chemotherapie (List, 1993; Izquierdo, 1994). Obwohl zum jetzigen Zeitpunkt sowohl die physiologische Rolle als auch die Resistenzvermittlung unklar sind, ist ein kausaler Zusammenhang des LRP mit Zytostatikaresistenz in Tumorzellen bewiesen.

1.4.2.3 Weitere Resistenzmechanismen

Neben den in 1.4.1 bis 1.4.2.2 genannten Phänomenen gibt es noch eine große Anzahl weiterer Resistenzmechanismen. So konnte in resistenten Zellen ein vermehrter Membran-Turnover im Sinne einer gesteigerten Exozytoseaktivität beschrieben werden (Sehested et al., 1987). Außerdem wurden beim Vergleich von sensitiven mit resistenten Tumorzellen Unterschiede in den Membranzusammensetzungen und -fluidität festgestellt (Siegfried et al., 1983), so dass z.B. das Ausmaß der Diffusion von lipophilen Anthrazyklinen in die Zelle vermindert werden kann (Leibovici et al., 1996).

Ein weiteres wichtiges Resistenzprotein ist die DNA-Topoisomerase II. Die zellulären Funktionen der Topoisomerase II sind DNA-Replikation (Snapka, 1986), Schwester Chromatid Segregation während der Mitose (Holm et al., 1985), Transkription (Brill und Sternglanz, 1988), DNA-Replikation (Bae et al., 1988) und ribosomale DNA-Rekombination (Christman et al., 1988). Zytostatika, die sich in der aktiven Phase an dieses Protein binden, verhindern die Wiederverknüpfung des DNA-Doppelstranges und führen dadurch zum Zelltod. Das erklärt auch, warum eine vermehrte Expression des Enzyms die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber Zytostatika erhöht, während eine niedrige Aktivität der Topoisomerase II zur Resistenz führt (Takeno et al., 1991).

Weiterhin können sich Tumorzellen eine verstärkte Umwandlung von Zytostatika zu untoxischen Metaboliten zu nutze machen.

In resistenten Tumorzellen konnte ein erhöhter Gehalt an Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen werden (Lau et al., 1991) - ein Enzym, das bei der Entgiftung zytotoxischer Substanzen eine große Tragweite besitzt. Substanzen wie Melfhelan, Cyclophosphamid oder Doxorubicin sind davon betroffen.

In einer Kolonkarzinom-Zelllinie zeigte sich eine erhöhte Expression einer detoxifizierenden Klasse-3-Aldehyd-Dehydrogenase, die verantwortlich für eine erworbene Resistenz gegen die zytostatisch wirksamen Oxazaphorine Mafosfamid und Cyclophosphamid war (Rekha et al., 1994). Inoue et al. konnten 1993 zeigen, dass CHO-Zellen durch Überexpression einer Aldo-Keto-Reduktase gegen ein synthetisches Tripeptid mit einer Aldehydgruppe am C-Terminus resistent wurden.

Die Reduktion des Anthrazyklins Daunorubicin zu dem weit weniger toxischen 13-Hydroxy-Alkohol Daunorubicinol mittels Carbonyl Reduktion stellt ebenfalls einen wichtigen Detoxifikationsvorgang für Tumorzellen dar (Schott und Robert, 1989). Durch Transfektion der Carbonyl Reduktase in Leukämiezellen wurde eine vermehrte Bildung von Daunorubicinol erreicht, so dass die Toxizität der

Ursprungssubstanz Daunorubicin um den Faktor 2-3 gemindert wurde (Gonzales et al., 1995). Durch Inkubation von Pankreastumorzellen mit Daunorubicin konnte eine konzentrationsabhängige Induktion von Carbonylgruppen-reduzierenden Enzymen gezeigt werden (Soldan et al., 1996). Bei Kultivierung einer Magenkarzinom-Zelllinie unter subletalen Daunorubicin-Konzentrationen und gleichzeitiger Blockade des Glykoproteins P-170 konnte eine 8fache Steigerung der Aktivität der Daunorubicin-Reduktasen beobachtet werden (Ax et al., 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, dass gesteigerte Aktivität bzw. Expression von metabolisierenden Enzymen ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Resistenzentstehung in Tumorzellen ist. Spezielle pharmakologische Interventionen – nämlich Hemmung dieser Enzyme – könnten neue Chancen der Tumorthherapie bieten.

1.5 Mammakarzinom

1.5.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau: Die Inzidenz beträgt 100/100000 pro Jahr und ist in allen westlichen Industrieländern sowie in Japan steigend. Die jährlichen Zuwachsraten liegen bei etwa 3 % (Miller, 1991). Der Altersgipfel liegt in der 7. Lebensdekade. Mehr als jede 10. Frau erkrankt während ihres Lebens an Brustkrebs, und über 3 % aller Frauen sterben an dieser Erkrankung.

1.5.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursache des Mammakarzinoms ist unbekannt. Epidemiologische Beobachtungen sprechen dafür, dass genetische, endokrine und Umweltfaktoren eine Rolle in der Pathogenese des Tumors spielen. Als Risikofaktor gilt eine familiäre Belastung. Frauen mit einer frühen Menarche haben ein höheres Risiko, Brustkrebs zu entwickeln. Eine fibrozystische

Mastopathie stellt nur dann einen Risikofaktor dar, wenn atypische Hyperplasien oder eine Familienanamnese für Brustkrebs vorliegen.

1.5.3 Therapie

Bei lokalem Tumor kann die Mastektomie (Amputation der gesamten Brust) notwendig sein; manchmal ist eine brusterhaltende Operation (Entfernung des Tumors und des umgebenden Gewebes) mit anschließender Bestrahlung vorzuziehen. Die jeweilige Operation kann durch eine Chemotherapie oder eine Hormonblockade ergänzt werden. Eine große Anzahl von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren auf den Tumorzellen ist günstig, weil eine Anti-Hormon-Therapie das Wachstum dieser Zellen dann unter Umständen besonders wirksam blockiert.

Die zytostatische Therapie wird beim Mammakarzinom heute als adjuvante Therapie (Therapie vermuteter, aber nicht nachweisbarer Mikrometastasen) insbesondere bei hormonrezeptor-negativen Tumoren angewandt. Bei nachgewiesener Metastasierung wird eine palliative Therapie durchgeführt. Die Therapie wird in der Regel in Form einer Polychemotherapie z.B. CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil), CAF-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, 5-Fluoruracil), FAC-Schema (5-Fluoruracil, Adriamycin, Cyclophosphamid) durchgeführt.

1.6 Ovarialkarzinom

1.6.1 Epidemiologie

In 4 % aller weiblichen Neoplasien handelt es sich um ein Ovarialkarzinom. Es zählt zu der sechsthäufigsten Krebserkrankung der Frau. Die Inzidenz, an einem malignen Tumor der Ovarien zu erkranken, liegt in Deutschland bei 13/100000 pro Jahr. Dies bedeutet, dass ca. 1-2 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens erkranken. Ovarialkarzinome treten auch in der Kindheit und während der Adoleszenz auf (Keimzelltumoren), ab 40 Jahren steigt die Inzidenz auf 15/100000 und erreicht zwischen 65-85 Jahren 54/10000. Das

Durchschnittsalter beim Ovarialkarzinom beträgt 55 Jahre (Parazzine et al., 1991).

1.6.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursachen des Ovarialkarzinoms sind unbekannt. Als Risikofaktoren gelten familiäre Belastung, Umweltfaktoren und Ernährung. Die Unterdrückung der Ovulation durch Schwangerschaften, Stillen und orale Kontrazeptiva hat einen protektiven Effekt gegenüber der Entstehung maligner Tumoren des Ovars. So haben Frauen, die über mehrere Jahre erfolglos eine Schwangerschaft anstreben (keine hormonale Kontrazeption, multiple Ovulation bzw. Stimulation der Ovulation), ein 8fach erhöhtes Risiko zu erkranken (Whittemore et al., 1989). Nulliparae haben im Vergleich zu einer Frau, die schon zwei Kinder geboren hat, ein um 40 % erhöhtes Erkrankungsrisiko. Nonnen haben eine zweifach höhere Inzidenz. Der protektive Effekt von oralen Kontrazeptiva ist proportional zur Dauer der Pilleneinnahme (Hankinson et al., 1992).

1.6.3 Therapie

Nur bei rein zystischen, bis 5 cm großen, sonographisch homogenen Tumoren bei Frauen während der Geschlechtsreife ist ein abwartendes Verhalten angebracht. In allen anderen Fällen muss eine operative Abklärung erfolgen. Anzustreben ist immer die möglichst radikale Operation. Die chirurgische Entfernung eines oder beider Eierstöcke, der Eileiter und der Gebärmutter ist das Standardverfahren.

Anschließend an die Operation wird eine Bestrahlung, z.B. durch Einbringen radioaktiver Flüssigkeit in die Bauchhöhle und/oder eine Polychemotherapie durchgeführt.

Ist eine Kurabilität durch eine Operation nicht erreichbar, ist die Chemotherapie von eminenter Bedeutung. Ende der 70er Jahre wurde die Effektivität von Cisplatin beim Ovarialkarzinom erstmals nachgewiesen und seit dieser Zeit

stellen platinhaltige Kombinationschemotherapien die Behandlung der Wahl dar.

Prospektive-randomisierte Studien zeigten, dass die Kombinationstherapie Cyclophosphamid/Adriamycin/Cisplatin (CAP-Schema) der Therapie ohne Cisplatin signifikant überlegen ist (Omura et al., 1986).

1.7 Malignes Melanom

1.7.1 Epidemiologie

Die Häufigkeit des malignen Melanoms liegt bei ca. 1,5-2 % aller malignen Tumoren in Deutschland, in sonnenreichen Regionen mit weißer Bevölkerung bis zu 6-10 % (Australien, Südstaaten der USA). In Deutschland muss heute von einer Melanomhäufigkeit von ca. 10-15/100000 Einwohner pro Jahr ausgegangen werden (Garbe et al., 1991). In Australien und den Südstaaten der USA beträgt die Inzidenz 30-50/100000 Einwohner pro Jahr. Epidemiologische Studien, welche die Verbindung von Sonnenexposition und Melanom untersuchen, lassen erkennen, dass sonnenempfindliche Personen (Hauttypen I und II), Kinder und Personen mit intermittierenden starken Sonnenbränden, besonders in der Jugend, ein deutlich erhöhtes Melanomrisiko aufweisen (Garbe et al., 1992).

1.7.2 Ätiologie und Pathogenese

Aus epidemiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass neben der genetisch festgelegten Disposition eines Menschen die UV-Belastung wesentlich zur Melanomentstehung beiträgt. Allerdings bleiben die molekularen Mechanismen der Melanomenstehung im Gegensatz zu anderen Tumoren, wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom, noch verborgen. Jedoch ist auch beim Melanom anzunehmen, dass eine einzige genetische Veränderung nicht ausreicht.

1.7.3 Therapie

Die Therapie des primären malignen Melanoms besteht in der operativen Exzision. Der Wert der elektiven Lymphknoten-Dissektion – die prophylaktische radikale Exzision der regionären Lymphknoten - wird unterschiedlich beurteilt. Retrospektive Studien lassen für bestimmte Patientengruppen einen prognostischen Vorteil erwarten (Drepper et al., 1993).

Ein Einsatz der Strahlentherapie ist aus palliativer oder auch kurativer Sicht nur dann gerechtfertigt, wenn operative Maßnahmen nicht zur Anwendung kommen können. Dies ist üblicherweise bei schlecht zugänglicher Lokalisation oder bei fehlender Radikalität des operativen Eingriffs der Fall.

Die Chemotherapie des malignen Melanoms kommt nur bei regionären Lymphknotenmetastasen und im Stadium der Fernmetastasierung zum Einsatz. Allgemein etablierte systemische Behandlungen gibt es zur Zeit beim metastasierten Melanom nicht. Die wichtigsten Substanzgruppen sind Nitrosoharnstoffe, Fotemustin, Vinca-Alkaloide, Dacarbazin, Hydroxyurea, Cisplatin, Taxoide und Tamoxifen. Die Ansprechraten von Monochemotherapeutika liegen bei 20 bis 25 Prozent. Mit der Polychemotherapie werden höhere Ansprechraten bis zu 50 Prozent erzielt, ohne Verlängerung der Überlebenszeit (Garbe, 1993). Insgesamt ist die alleinige Chemotherapie beim malignen Melanom unbefriedigend. Die Kombination von Chemotherapeutika mit immunmodulierenden Substanzen (Zytokine) scheint vielversprechend (Bajetta et al., 1994).

1.8 Pankreaskarzinom

1.8.1 Epidemiologie

Der Anteil des Pankreaskarzinoms an allen Malignomen liegt bei 2-3 %. Es ist das sechsthäufigste Karzinom und die fünfthäufigste tumorbedingte Todesursache. Die Inzidenz beträgt ca. 9/100000 pro Jahr (Boring et al., 1992). Der Altersgipfel liegt zwischen 56 und 79 Jahren. In den USA wird ein

häufigeres Auftreten bei der schwarzen als bei der weißen Bevölkerung beobachtet.

1.8.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist unbekannt. Neben dem Tabakabusus als einen bekannten Risikofaktor besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Protein- und Fettkonsum und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms (Lin und Kessler, 1981).

1.8.3 Therapie

Tumoren ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen sind potentiell resektabel. Therapie der Wahl ist die Pankreatoduodenektomie. Die hiermit erreichbaren 5-Jahres-Überlebensraten betragen meist 5-20 % (Trede et al., 1990). Bei Patienten mit nicht resezierbarer Erkrankung und gastroduodenaler Obstruktion ist eine palliative Gastroenterostomie indiziert.

Eine konventionelle, externe Bestrahlung kann bei Patienten mit lokalisiertem, nicht resezierbarem Tumor zu einer Symptomkontrolle führen, hat jedoch keinen oder nur geringen Effekt auf die Überlebenszeit (Whittington et al., 1981).

Bei der Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, Mitomycin, Streptozotocin, Ifosfamid und Cisplatin wurden Ansprechraten von 10-30 % beschrieben. Bei der Kombinationstherapie mit Anthrazyklin, 5-Fluoruracil und Mitomycin zeigt sich eine Ansprechraten von 38,1 % (Green et al., 1986). In randomisierten Untersuchungen hat sich eine Kombinationschemotherapie gegenüber einer zytostatischen Monotherapie bisher nicht als eindeutig überlegen gezeigt.

1.9 Magenkarzinom

1.9.1 Epidemiologie

Für das Vorkommen des Magenkarzinoms bestehen große globale und regionale Unterschiede. Besonders häufiges Auftreten registriert man in China und in Japan. Die Mortalität beträgt in Japan 46,7 Todesfälle pro 100000 Einwohner pro Jahr, in der Bundesrepublik 20,8. In den westlichen Ländern nimmt der Magenkrebs kontinuierlich ab, so dass 1975 das Kolonkarzinom den Magenkrebs als häufigsten malignen Tumor des Verdauungstrakts abgelöst hat.

1.9.2 Ätiologie und Pathogenese

Sowohl ethnische Unterschiede spielen eine Rolle als auch Ernährungsgewohnheiten, Trinkwasserqualität, Rauchen und Alkoholkonsum. Bei japanischen Emigranten in den USA sinkt die Inzidenz des Magenkarzinoms, bei Kindern unterscheidet sie sich nicht mehr von der Gesamtbevölkerung. Der Nitrosamingehalt der Nahrung und die Produktion von Nitrosaminen durch Bakterien im Magen, insbesondere durch *Helicobacter pylori*, werden als Ursache oder Kofaktor diskutiert. Als Präkanzerose gilt das Adenom, insbesondere das flache Adenom mit schwerer Dysplasie. Als Risikokonditionen sind im Gespräch: die chronisch-atrophische Gastritis Typ A, der Morbus Ménétrier, der hyperplasiogene Polyp und der resezierte Magen (Z.n. Billroth-II-Operation). Das benigne Magengeschwür gilt nicht als Risikofaktor.

1.9.3 Therapie

Die Chirurgie ist die Wahl bei lokoregionär begrenzten Tumoren. Bei lokal nicht kurativ resezierbaren Tumoren kann im Einzelfall die primäre Operation bei Vorliegen von Tumorsymptomen (Stenosen, Schmerzen, Blutungen) erwogen werden. Bei Vorliegen von Fernmetastasen ist eine palliative Tumorsektion nur sinnvoll, wenn eine Chemotherapie nicht durchgeführt werden kann, die Chemotherapie unwirksam ist oder bei notfallmäßigen Indikationen.

Kurative Behandlungsmöglichkeiten bestehen mit der alleinigen Strahlentherapie nicht. Mit einer postoperativen simultanen Strahlen-/Chemotherapie wurde vorwiegend in Phase-II-Studien eine verbesserte lokale Tumorkontrolle beobachtet. Die Überlebenszeit wurde dadurch nicht beeinflusst. Eine postoperative Strahlenchemotherapie ist außerhalb von Studien nicht indiziert.

Das Magenkarzinom wird mittlerweile als chemotherapiesensibler Tumor angesehen. Die wirksamsten Substanzen sind Doxorubicin, 4-Epidoxorubicin, Cisplatin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Mitomycin, Taxtor und Irinotecan (CPT-11) mit Remissionsraten von ca. 15-30 % (Preusser et al., 1988). Mit den neueren wirksamen Kombinationen (FAMTX: 5-Fluoruracil, Methotrexat, Doxorubicin; ELF: Etoposid, Folinsäure, 5-Fluoruracil; Cisplatin/5-Fluoruracil; EAP: Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin; ECF: 4-Epidoxorubicin, Cisplatin, 5-Fluoruracil als kontinuierliche Infusion über 21 Wochen) wurden vorwiegend in Phase-II-Studien ca. 40-50 % objektive Remissionen einschließlich 5-10 % klinisch kompletter Remissionen, mediane Remissionsdauern von 6-9 Monaten und mediane Überlebenszeiten von 6-11 Monaten erreicht (Wilke et al., 1991). Aufgrund dieser Ergebnisse und einer randomisierten EORTC-Studie, in der FAMTX gegenüber FAM (5-Fluoruracil, Adriamycin, Mitomycin) zu signifikant höheren Remissionsraten und signifikant längeren Überlebenszeiten führte, sind FAM oder FAM-Modifikationen nicht mehr „Standardchemotherapie“ des Magenkarzinoms (Wils et al., 1991).

2 AUFGABENSTELLUNG

Ausgangssituation dieser Arbeit waren die Untersuchungen von Soldan et al. (1996), der erstmals in Pankreaskarzinom-Zelllinien einen forcierten Metabolismus von Daunorubicin zu dem weniger toxischen Daunorubicinol nach vorherigem Kontakt der Zellen mit diesem Zytostatikum beschrieben hatte.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, diese Induktion der Biotransformation auf Ebene der bekannten Daunorubicin-Reduktasen weiter zu untersuchen.

Um zu überprüfen, ob es sich um ein verbreitetes Phänomen in malignen Karzinomen handelt und nicht nur auf die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien beschränkt ist, wurde in drei weiteren Tumor-Zelllinien der zytosolische Daunorubicin-Metabolismus untersucht. Hierzu wurde mittels Enzymassay der Metabolismus zum Hauptmetaboliten Daunorubicinol ohne vorherige Daunorubicin-Inkubation als auch nach simulierter Chemotherapie mit steigenden aber subletalen Daunorubicin-Konzentrationen in den verschiedenen Tumorzellen gemessen.

Da zu diesem Zeitpunkt keine Informationen darüber vorlagen, welche Daunorubicin-Reduktasen tatsächlich an der Reduktion des Zytostatikums in den hier untersuchten Tumorzellen beteiligt sind, war dies ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt. Die Untersuchungen wurden auf RNA-Ebene durchgeführt, da Inhibitorstudien und –kinetiken bereits bekannt waren und vor allem eine Änderung der mRNA-Expression interessant erschien. Hierzu wurde die mRNA-Expression von drei bekannten Daunorubicin-Reduktasen und von einer weiteren, möglichen Reduktase mittels RT-PCR bestimmt. Danach wurde zusätzlich, wie bei den o.g. Untersuchungen, auch hier zuerst die Expression ohne Daunorubicin-Zusatz zum Kulturmedium bestimmt, später auch nach simulierter Chemotherapie mit ansteigenden, subletalen Daunorubicin-Konzentrationen.

Um den forcierten Daunorubicin-Metabolismus als einen weiteren, möglichen Resistenzmechanismus in seiner Wichtigkeit einzuordnen, wurden in den

Tumorzellen parallel die mRNA-Expression der drei „klassischen“ Resistenzmechanismen MDR₁, MRP und LRP mittels RT-PCR unter identischen Versuchsbedingungen bestimmt. Mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression der klassischen Resistenzmechanismen und der Expression spezifischer Daunorubicin-Reduktasen sollten dadurch erkannt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Kurzbezeichnung	Beschreibung	freundlicher Weise überlassen von
Ovarialkarzinom	EFO-21	unbehandelter Tumor	Universitäts-Frauenklinik Marburg (Prof. K.D. Schulz)
Mammakarzinom	MCF-7	unbehandelter Tumor	Universitäts-Frauenklinik Marburg (Prof. K.D. Schulz)
Pankreaskarzinom sensitiv	EPP85-181	sensitiver, unbehandelter Tumor	Institut für Pathologie, Universität Kiel (Prof. M. Dietel)
Pankreaskarzinom resistent	EPP85-181RDB	über längere Zeit mit Daunorubicin behandelt, resistent gegenüber diesem Zytostatikum	Institut für Pathologie, Universität Kiel (Prof. M. Dietel)
Magenkarzinom sensitiv	EPG85-257	sensitiver, unbehandelter Tumor	Institut für Pathologie, Universität Kiel (Prof. M. Dietel)
Magenkarzinom resistent	EPG85-257RES	über Monate mit Daunorubicin behandelt, resistent gegenüber diesem Zytostatikum	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Marburg (Dr. M. Soldan)
Malignes Melanom	MeWo	unbehandelter Tumor	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

3.1.2 Kulturmedien

3.1.2.1 Ovarialkarzinom-Zelllinie (EFO-21) und Mamma- karzinom-Zelllinie (MCF-7)

- Dulbecco's DMEM (Eurobio, Raunheim) supplementiert pro 500 ml mit:

50 ml fetalem Kälberserum	Eurobio (Raunheim)
5 ml L-Glutamin (200mM)	Gibco BRL (Eggenstein)
1,25 ml D-Glucose (40 %ig in H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
6,25 ml hum.Transferrin (0,2 mg/ml)	Boehringer (Mannheim)
40 I.E. H-Insulin	Hoechst (Frankfurt)
2 ml Pipril (2 mg/ml)	Lederle (Münster)
0,5 ml Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco BRL (Eggenstein)

3.1.2.2 Sensitive und resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181 und EPP85-181RDB), sensitive und resistente Magenkarzinom-Zelllinie (EPG85-257 und EPG85-257-RES)

- Leibovits L-15 Medium (Eurobio, Raunheim) supplementiert pro 500 ml mit:

50 ml fetalem Kälberserum	Eurobio (Raunheim)
1,25 ml D-Glucose (40 %ig in H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
2,5 ml L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL (Eggenstein)
40 I.E. H-Insulin	Hoechst (Frankfurt)
10000 K.I.E. Trasylol R	Bayer (Leverkusen)
6,25 ml Fetuin (0,5 mg/ml)	Sigma (Deisenhof)
6,25 ml hum.Transferrin (0,2 mg/ml)	Boehringer (Mannheim)

5 ml MEM-Vitamine (100x)	Gibco BRL (Eggenstein)
7,5 ml NaHCO ₃ (7,5 %ig in H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
2 ml Pipril (2 mg/ml)	Lederle (Münster)
0,5 ml Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco BRL (Eggenstein)

3.1.2.3 Melanom-Zelllinie (MeWo)

- RPMI 1640 (Eurobio, Raunheim) supplementiert pro 500 ml mit:

50 ml fetalem Kälberserum	Eurobio (Raunheim)
2 ml Pipril (2 mg/ml)	Lederle (Münster)
0,5 ml Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco BRL (Eggenstein)

3.1.2.4 Einfriermedien

- normale Kulturmedien (s.o.) supplementiert mit:

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

0,5% Glucoselösung (20%ig in aqua bidest.)

3.1.3 Puffer und Lösungen

- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca- und Mg-Ionen, Eurobio (Raunheim)

Zusammensetzung [mg/ml]:

NaCl	8000
KCl	200
Na ₂ HPO ₄	1150
KH ₂ PO ₄	200

- Trypsin EDTA [Ethyldiamintetraessigsäure] (Versen) 1x, Eurobio (Raunheim)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Serva (Heidelberg)

3.1.4 Zellkulturartikel

- Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm², Sarstedt (Nümbrecht)
- Gewebekulturschalen 10 cm Ø, Sarstedt (Nümbrecht)
- Sterilfilter 0,2 µm, Sarstedt (Nümbrecht)
- sterile 15 und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Sarstedt (Nümbrecht)
- Zellschaber, Sarstedt (Nümbrecht)
- Kryoröhrchen 1,25 ml, Sarstedt (Nümbrecht)
- sterile 5 und 10 ml Einmalpipetten, Sarstedt (Nümbrecht)
- sterile Pipettenspitzen, Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.5 Geräte

- Minifuge GL, Heraeus (Hanau)
- Hämocytometer (Thoma-Zählkammer)
- Lichtmikroskop, Will (Wetzlar)
- Aufbewahrungsbehälter GT50, L'Air LIQUIDE (Frankreich)
- Umkehrphasenmikroskop Wilovert, Will (Wetzlar)

3.1.6 Kulturhaltung

Bei der Züchtung von Zellen kommt es vor allem auf die Umgebungsbedingungen an, die denen *in vivo* möglichst nahe kommen sollen. Diese Bedingungen werden einerseits durch das die Zellen umgebende

Medium simuliert, andererseits durch die Umgebungsbedingungen im Brutschrank.

Da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen, benötigen die Zellen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Wechsel des Mediums. Aus diesem Grund sollte das Kulturmedium in der Regel in einem wöchentlichen Rhythmus von Montag – Donnerstag – Montag gewechselt werden.

Der für die Kulturhaltung verwendete Brutschrank gewährleistete eine gute Temperaturkonstanz von 37°C, eine nahezu 100%ige relative Luftfeuchtigkeit sowie eine konstante CO₂-Zufuhr von 5 Vol.%.

An mehreren Tagen der Woche wurden die Zellen unter einem Umkehrphasenmikroskop auf Zelldichte und Kontaminationen durch Bakterien kontrolliert.

3.1.7 Subkultivierung

Wenn *in vitro* die Kulturschale als Substrat von den Zellen vollständig eingenommen worden ist, wachsen in der Regel strikt adhärente Zelllinien nicht mehr weiter. Tumorzellen können zwar noch weiter wachsen, allerdings übersteigt die Zellzahl dann meist eine Grenze, bei der das Medium zu oft gewechselt werden müsste. Ferner sinkt bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate stark ab. Dies kann zum Absterben der Kultur führen. Deshalb ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte zu verdünnen. Dies geschieht durch das „Passagieren“ der Zellen, d. h. die Zellen werden unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt.

Eine weit verbreitete Methode, adhärente Zelllinien zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin-EDTA. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das die Proteinbrücken zwischen Zelle und Kulturgefäßboden spaltet und so eine

Ablösung der Zelle vom Boden bewirkt. Zusätzlich bindet EDTA Calcium-Ionen, die ebenfalls für eine Verankerung der Zelle mit Gefäßboden sorgen.

Bevor man die Trypsinlösung (2-5 ml, je nach Zelllinie) einwirken ließ, wurden die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Geringe Spuren von Medium können die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen und die Zeit der Einwirkung auf die Zellen verlängern, was wiederum die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen kann. Der Trypsinierungsprozeß dauerte etwa 3-10 Minuten und wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet, um die optimale Einwirkzeit feststellen zu können. Dies ist gegeben, wenn die Mehrzahl der Zellen sich von der Unterlage abgelöst hat und abgerundet in der Trypsinierungslösung schwimmt. Medium mit Serumzusatz (FKS) stoppt den Trypsinierungsprozeß, da FKS eine sofortige Inaktivierung des Trypsins bewirkt und auch teilweise das cytotoxische EDTA zu binden vermag. Um die Reste von Trypsin und EDTA zu entfernen, wurden die Zellen bei 200 x g abzentrifugiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Das Aussäen der Zellen in neue Kulturgefäße erfolgte nun nach einer Verdünnung von 1:3 bis 1:5, je nach Zelllinie.

3.1.8 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer

Nachdem die Oberfläche der Thoma-Zählkammer mit 70%igen Ethanol gut gereinigt war, wurde ein sauberes Deckglas leicht angefeuchtet und auf die Zählkammer gepresst. Das Erscheinen von sogenannten „Newtonringen“ zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist (0,1 mm). Nun wurde die Kammer mit abtrypsinieren Zellen gefüllt. Dies geschah durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer, wobei die Kapillarkräfte die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugten. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in einem Quadrat mit einer Kantenlänge von einem Millimeter bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen von 0,1 μl . Multipliziert man die ausgezählten Zellen mit 10^4 erhält man die Zellkonzentration pro Milliliter.

3.1.9 Kryokonservierung

Wenn man eine Zelllinie im Labor nicht permanent benutzt, sie vor Kontaminationen, Variabilität durch Subkultivierung und anderem bewahren will, muss eine Kryokonservierung durchgeführt werden. Hierzu ist die Möglichkeit gegeben, die Zellen über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196°C zu halten. Diese Lagerung kann über Jahre ohne Verlust der Lebensfähigkeit durchgeführt werden. Lagerung von Zellen bei -80°C kann für kurze Zeit ebenfalls durchgeführt werden, allerdings ist die Zeit hier auf höchstens einige Monate begrenzt. Deshalb sollte eine Lagerung im flüssigen Stickstoff stets vorgezogen werden. Als Schutzsubstanz wird den Zellen Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben.

Um Zellen einzufrieren, wurden abtrypsinierte Zellen nach Zentrifugation im Normalmedium ($500 \times g$ für 5 min) mit dem Einfriermedium im Verhältnis 10:1 aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in die Tiefgefriereröhrchen (jeweils 1,8 ml) pipetiert und kurz bei $500 \times g$ für 2 min abzentrifugiert. Das Medium wurde nun bis auf ca. 1 ml abgesaugt und die Röhrchen in einem Styroporbehälter mit der Wandstärke 2 bis 3 cm in einen Tiefgefrierschrank mit -80°C gestellt. Zur kontinuierlichen Lagerung überführt man die Zellen nach ca. 12 Stunden in den Flüssigstickstoffbehälter.

3.1.10 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und sofort in ein 37°C -Wasserbad befördert. Wenn das letzte Eisklumpchen im Kryoröhrchen aufgetaut war, wurde es mit 70 %igem Ethanol kurz desinfiziert und unter die sterile Werkbank genommen. Hier wurde der Inhalt des Röhrchens in ein neues 15 ml Tube überführt. Nachdem 5 ml frisches Kulturmedium sehr langsam und weitere 5 ml etwas schneller hinzugefügt wurden, konnten die Zellen in eine neue Zellkulturflasche gegeben werden. In den nächsten 12 Stunden sollten die Zellen in Ruhe gelassen werden, damit sie sich in Ruhe an dem Boden anheften können. Nach ca. 24 Stunden ist es nötig,

die Zellen in frisches Kulturmedium zu überführen, um verbliebenes DMSO zu entfernen.

3.2 Aufarbeiten der Zellen

3.2.1 Puffer und Lösungen

- 20 mM Tris-Puffer mit KCl

1,2144 g Tris [2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol]

+ 42,787 g Saccharose

+ 5,75 g KCl

mit aqua bidest auf 500 ml auffüllen und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen

- 20 mM Tris-Puffer ohne KCl

1,2144 g Tris [2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol]

+ 42,787 g Saccharose

mit aqua bidest auf 500 ml auffüllen und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen

3.2.2 Geräte

- Sonoplus Homogenisator GM 70 (Bandelin, Berlin)
- Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)
- Ultrazentrifuge L7,55 (Beckmann, München)

3.2.3 Ernten und Aufschluss der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen und das Kulturmedium verworfen. Anschließendes, zweimaliges Spülen der Zellen mit je 2ml 20 mM Tris-Puffer mit KCl entfernt die Zellen vom restlichen Medium. Die Zellen wurden danach mit 1 ml Puffer versetzt und mit einem Zellschaber in Lösung

gebracht. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 200g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 50-100 µl Tris-Puffer ohne KCl aufgenommen. In dieser hypotonischen Umgebung dehnen sich die Zellen, da durch die hochkonzentrierten Substanzen im Zellinneren eine osmotische Wirkung erzeugt wird, die Wasser eindringen lässt. Bei der anschließenden Ultraschallbehandlung werden die so vorbehandelten Zellen leichter und schonender aufgeschlossen. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass viel Wärme freigesetzt wird. Man sollte deswegen auf möglichst kurze Beschallzeiten achten und nur kleine Volumina einsetzen. Aus diesem Grund wurden die Zellen zweimalig mit 10 Sekunden bei 50% Leistung homogenisiert. Alle hier genannten Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt, um einem Aktivitätsverlust der Enzyme entgegenzuwirken.

3.2.4 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation hat ihren Namen daher, dass sie die Unterschiede in der Sedimentationsrate der zu trennenden Partikel, die sich in einem Gemisch von Zellkomponenten (Homogenat) befinden, ausnutzt. Die Sedimentationsrate ist von der Teilchenmasse und -radius abhängig. Die Zellkerne sind am schwersten und größten und finden sich bei niedertouriger Zentrifugation im Pellet (10 Minuten bei 600 x g). Die Mitochondrien sedimentieren bei höheren Touren (10 Minuten bei 17000 x g). Mikrosomen sedimentieren erst bei Ultrazentrifugation (75 Minuten bei 105000 x g). Der jetzt klare Überstand wurde als zytosolische Fraktion verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Proben können bei -80 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

3.3 Bestimmung der reduktiven Enzymaktivität

3.3.1 Puffer und Lösungen

- Phosphatpuffer (50mM, pH 7,4)

6 g Natriumdihydrogenphosphat

mit aqua bidest auf 1000 ml auffüllen und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen

- Daunorubicin-Lösung (500 µg/ml)
- Doxorubicin-Lösung (2,5 µg/ml)
- NADPH (10mM) [Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat]
- Laufmittel zur HPLC-Analytik

700 ml Acetonitril p.A. (100%ig)

+ 2,7 ml Ameisensäure (100%ig)

+ 10,8 ml Ammoniak (25%ig)

mit aqua bidest auf 2500 ml auffüllen und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 4 einstellen

3.3.2 Geräte

- Wasserbad
- HPLC-Pumpe L-6220 Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)
- HPLC-Autosampler AS2000A (Merck-Hitachi, Darmstadt)
- spektrofluorimetrischer HPLC-Detektor (Waters-Millipore, Eschborn)
- HPLC-Integrator C-R6A (Shimadzu, Duisburg)

3.3.3 Standardinkubationsansatz

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) wurden 25 µl des Zytosols mit 10 µl Phosphatpuffer und 10 µl NADPH für eine Minute bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5 µl einer Daunorubicin-Lösung (500µg/ml). Da das Gesamtvolumen des Ansatzes 50 µl betrug, lag die Daunorubicin-Konzentration also bei 0,89 mM. Die Reaktion wurde nach 30minütiger Inkubation mit 150 µl eiskaltem Acetonitril gestoppt. Um die denaturierten Proteine zu fällen, fand eine Zentrifugation bei 4 °C und 17000 x g statt. Der nun klare Überstand wurde zur HPLC-Analyse verwendet.

3.3.4 Analyse von Daunorubicin und Daunorubicinol mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Analyse von Daunorubicin und Daunorubicinol erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) in Anlehnung an Cummings et al. (1984). Das verwendete System bestand aus einer Pumpe, einem Autosampler, einem spektrofluorimetrischen Detektor und einem Integrator. Zur chromatographischen Auftrennung der Substanzen wurde eine Merck LiChrospher 100 C₁₈ Säule (4 x 250 mm) verwendet. Als mobile Phase eignete sich ein Gemisch aus 28% Acetonitril und 72% Ammoniumformiatpuffer pH 4 (0,03%ig). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,3 ml pro Minute, die Excitationswellenlänge 470 nm und die Emissionswellenlänge 550 nm. Die integrierten Werte wurden anschließend zur Berechnung der spezifischen Aktivität benutzt (siehe 3.3.6).

3.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 bindet an Proteine und erlaubt die Extinktionsmessung des Protein-Farbstoffkomplexes bei 595 nm (Bradford, 1976).

Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 975 µl einer verdünnten (1:5), gebrauchsfertigen Farbreagenz zu 25 µl Proteinlösung gegeben. Die Extinktion (595 nm) kann nach 15 min gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen werden. Die Proteinkonzentration wurde aus einer Eichkurve, die mit Rinderserumalbumin bekannter Konzentrationen erstellt wurde, abgelesen. Der Test eignet sich für Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml.

3.3.6 Berechnung der spezifischen Aktivität

Die integrierten Werte aus der HPLC-Analyse wurden über entsprechende Eichkurven in Daunorubicin- und Daunorubicinol-Konzentrationen umgerechnet. Hierzu wurde Doxorubicin als interner Standard eingesetzt. Es besitzt die gleiche Excitations- und Emissionswellenlänge wie Daunorubicin und lässt sich durch die HPLC-Trennung klar von Daunorubicin und Daunorubicin unterscheiden. 30 µl einer Doxorubicin-Lösung (2,5 µg/ml) wurden zu 70 µl des Reaktionsansatzes zugefügt, nachdem die enzymatische Reaktion beendet und die denaturierten Proteine abgetrennt waren. Nach anschließender HPLC-Analytik konnten die Proben mit folgender Formel (Gleichung 1) ausgewertet werden:

$$\text{spezifische Aktivität} \left(\frac{\text{nmol Daunorubicinol}}{\text{mg Protein} \times 30 \text{ min}} \right) = \frac{f \times \frac{\text{Area Produkt}}{\text{Area I.S.}} \times \text{Menge I.S. im Ansatz}}{\text{Menge Gesamtprotein}}$$
$$f = \frac{\text{Steigung der Eichkurve I.S.}}{\text{Steigung der Eichkurve Produkt}}$$

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der Produkt-Menge. I.S.=Interner Standard

3.4 Messung der mRNA-Expression

3.4.1 Puffer und Lösungen

- TAE-Puffer 50x
 - 2 M Tris-Base
 - 5,7 % Essigsäure (v/v)
 - 50 mM EDTA
- DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser

3.4.2 Gebrauchsfertige „Kits“

- RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden)
- QIAshredder® (QIAGEN, Hilden)
- Ready-To-Go® RT-PCR Beads (Pharmacia Biotech, Schweden)

3.4.3 Geräte

- Thermocycler Omn-E (HYBAID, Heidelberg)

3.4.4 Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA)

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die schon in kleinsten Mengen und ohne Co-Faktoren RNA zerstören können. Aus diesem Grund ist ein sorgsamer Umgang mit RNA unvermeidbar. Dieser besteht in dem Gebrauch von RNase-freien Einmalartikeln, Vorbehandlung der Lösungen, soweit möglich, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), sowie der Reinigung aller verwendeten Apparaturen und Geräte mit 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 24 Stunden und anschließendem Spülen mit DEPC-Wasser.

3.4.5 Isolierung der RNA aus Tumorzellen

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits aus den verschiedenen Tumorzellen isoliert.

Zuerst wurden die Zellen mit Hilfe des Lysis-Puffer, der Guanidiniumthiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol enthält, aufgeschlossen und homogenisiert. GITC ist stark denaturierend und inaktiviert sofort vorhandene RNasen, um eine Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Da inkomplettes Homogenisieren der Zellen die RNA-Isolation extrem stört, wurde das Lysat mehrmals durch eine 20-G Nadel gezogen, anschließend auf eine QIAshredder®-Säule pipettiert und zentrifugiert. Beide Schritte erzeugen starke Scherkräfte, die das Lysat gut homogenisieren lassen. Anschließend wurde 70 % Ethanol hinzupipettiert, um geeignete Bindungsbedingungen zu schaffen, und die Probe auf die Silica-Säule gegeben, an der die RNA bindet. Andere Verunreinigungen (Proteine, DNA, Salze) wurden danach mit zwei verschiedenen Puffer heruntergewaschen. Die jetzt saubere RNA wurde mit DEPC-Wasser von der Säule eluiert und mit 5 % RNase-Inhibitor versetzt. Nicht sofort für Versuche benötigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.4.6 Quantifizierung der RNA und Reinheitsprüfung

Die Konzentration und die Reinheit der RNA kann mit Hilfe spektrophotometrischer Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bestimmt werden. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Menge von 40 μg RNA pro ml. Diese Beziehung ist nur gültig, wenn mit Wasser gemessen wird. Deswegen sollte die zu messende RNA mit Wasser verdünnt werden. Diese Verdünnung muss natürlich mitberücksichtigt werden, so dass man auf folgende Formel kommt:

$$\text{Konzentration RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient aus A_{260} und A_{280} ergibt die Reinheit der RNA. Saubere RNA-Präparationen besitzen eine Reinheit zwischen 1,8 und 2,1.

$$\text{Reinheit} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

3.4.7 „Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR)

Zur molekularen Analyse der Genexpression bedient man sich der „Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR).

Hierbei wird zuerst die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Gallo, 1971), ein aus RNA-Viren (Retro-Viren) isoliertes Enzym, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Eine kleine Menge RNA (1 bis 2 µg) wird mit der Reversen Transkriptase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und einem DNA-Startmolekül (Primer, engl.: prime = vorbereiten) in einem geeigneten Reaktionspuffer inkubiert. Der Primer lagert sich am 5' der komplementären RNA-Matrize an und die Reverse Transkriptase schreibt die RNA in die cDNA um.

Diese cDNA kann nun im zweiten Schritt mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987; Saiko et al., 1988) vervielfältigt werden. Die PCR-Technik wird u.a. zur Pränataldiagnostik von Erbkrankheiten eingesetzt (Handyside et al., 1989; Wong et al., 1987), in der Gerichtsmedizin (Higuchi et al., 1988), zur Untersuchung von Onkogenen (Bos et al., 1987; Farr et al., 1988), in der Mikrobiologie zum Nachweis bakterieller und viraler DNA (Kwok et al., 1987; Hart et al., 1988; Brisson-Noel et al., 1989), sowie bei der Überwachung von Krebstherapien (Roth et al., 1989). Die PCR basiert auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen unter Kontrolle einer einsträngigen DNA-Matrize ein Startmolekül (Primer) in 5' → 3'-Richtung zu verlängern. Die cDNA wird mit DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und zwei Primern im Reaktionspuffer inkubiert. Die Primer sind dabei so ausgewählt, dass sie dem 5'- bzw. dem 3'-terminalen Ende des zu vermehrenden cDNA-Segments entsprechen. Der erste Primer wird vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes des ersten Stranges abgeleitet (vorwärts) und der zweite Primer vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes des Gegenstranges (rückwärts). Jeder Reaktionszyklus besteht, wie in Abbildung 5 dargestellt, aus drei Teilschritten. Die Trennung der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix (Denaturierung) erfolgt durch Hitze (92-95°C). Während der Abkühlung auf die

Anlagerungstemperatur (40-72°C) lagern sich die Primer komplementär an ihre jeweiligen Zielstellen der Matrizen-DNA an. Die optimale Anlagerungstemperatur ist dabei abhängig von Länge und Nukleotidabfolge der Primer. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf die optimale Reaktionstemperatur der DNA-Polymerase (72°C) gebracht, um einen neuen DNA-Doppelstrang zu synthetisieren (siehe auch Abbildung 5).

Durch die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerase, der TaqTM-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976), ist die einmalige Enzymzugabe für den kompletten Reaktionsprozess ausreichend (Saiki et al., 1988). Dies ermöglicht eine Automatisierung der PCR unter Verwendung programmierbarer Thermostaten (Thermocycler). Ein Thermocycler führt ein vorgegebenes zyklisches Temperaturprofil durch, wobei die Temperaturwechsel durch ein Peltier-Element oder die Temperierung von Wasser erreicht wird. Dies erlaubt die Durchführung eines kompletten PCR-Ansatzes (20-40 Zyklen) in 2-4 h.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression der vier verschiedenen Reduktasen (siehe 1.3.3.1.1 bis 1.3.3.1.4) und der drei Resistenzmechanismen (siehe 1.4.2 bis 1.4.2.2) gemessen.

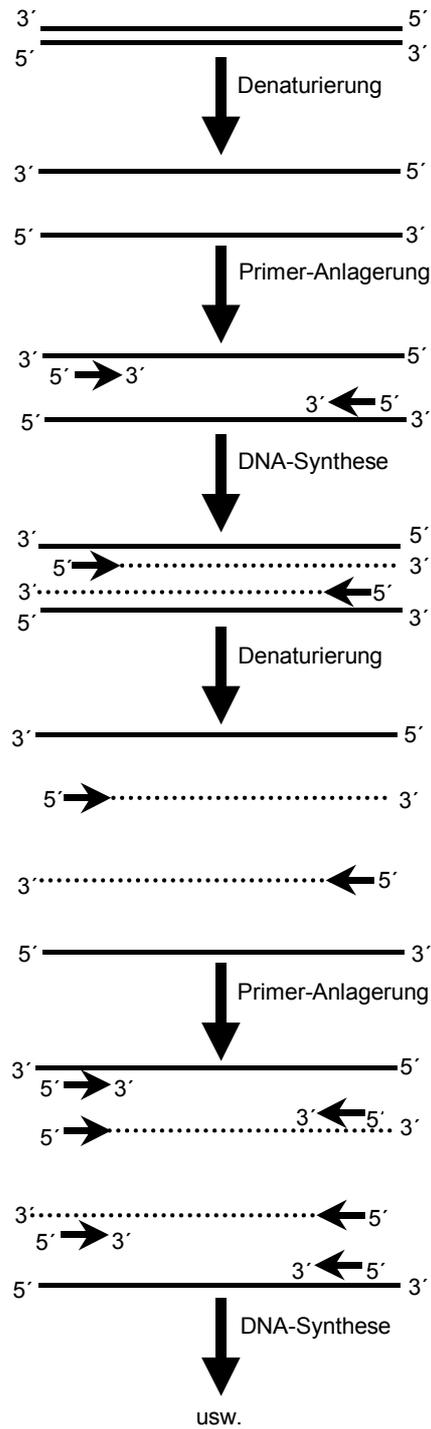


Abbildung 5: Schematische Darstellung der PCR

Hierzu wurden Ready-To-Go® RT-PCR Beads verwendet. Dabei handelt es sich um getrocknete Kügelchen, die alle nötigen Reagenzien, außer Primer und RNA-Template, für die Reverse Transkription und der Polymerase Kettenreaktion enthalten. Zu dem Reaktionsansatz (siehe Tabelle 3) wurde nur noch jeweils 1 µg Gesamt-RNA und je 15 pmol der entsprechenden 5'- und 3'-Primer hinzugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde im Thermocycler mit dem in Tabelle 4 aufgelisteten zyklischem Temperaturprogramm inkubiert.

Reaktionsansatz	
Gesamt-RNA	1 µg
Taq-Polymerase	2 U
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
KCl	60 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP-Mix	jedes 200 µM
Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase	
RNAguard®, BSA	

Tabelle 3: Reaktionsansatz der RT-PCR

Temperaturprogramm			
1 x	Reverse Transkription	37°C	30 min
1 x	Denaturierung	95°C	5 min
	Denaturierung	95°C	1 min
40 x	Primeranlagerung	65°C	1 min
	Kettenverlängerung	72°C	1 min
1 x	Kettenverlängerung	72°C	10 min

Tabelle 4: Temperaturprogramm der RT-PCR

3.4.8 Verwendete Primer

Alle zur RT-PCR verwendeten Primer (siehe Tabelle 5) wurden von der Firma MWG Biotech GmbH (Ebersberg) synthetisiert und lyophilisiert ausgeliefert. Für den Gebrauch wurden sie dann in sterilem DEPC-Wasser in Lösung gebracht (50 pmol/µl).

Material und Methoden

Gen	Richtung	Sequenz	Primer-Länge	Produkt-Länge
MDR ₁	5'	GCC TGG CAG CTG GAA GAC AAA TAC ACA AAA T	31	286
	3'	CAG ACA GCA GCT GAC AGT CCA AGA ACA GGA C	31	
MRP	5'	AGA ACC TCA GTG TCG GGC AGC G	22	527
	3'	TCG CAT CTC TGT CTC TCC TGG G	22	
LRP	5'	CCT CGA GAT CCA TTG TGC TGG	21	300
	3'	CAC AGG GTT GGC CAC TGT GCA	21	
Aldehyd Reduktase	5'	CAT TGA TTG TGC TGC TAT CTA CGG	24	309
	3'	GCC TTC CAA GTC TCC TTG TAG TGG	24	
Aldose Reduktase	5'	AGC GAC CTG AAG CTG GAC TAC CTG G	25	328
	3'	GGT CAC CAC GAT GCC TTT GGA CTG G	25	
Carbonyl Reduktase	5'	CTT TGG TAC CCG AGA TGT CTG CAC AG	26	290
	3'	AGT TTC CTG GCG TGG ATC CTG GAC AG	26	
Dihydrodiol Dehydroge- nase	5'	GTT GGT CCG ACC AGC CTT GGA AAG G	25	310
	3'	GTA AGG ATG ACA TTC CAC CTG GTT GC	25	
β ₂ -Mikro- globulin	5'	GTG GAG CAT TCA GAC TTG TCT TTC AGC	27	201
	3'	TTC ACT CAA TCC AAA TGC GGC ATC TTC	27	

Tabelle 5: Verwendete Primer

3.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Makromolekülen (DNA) erfolgt durch Elektrophorese unter Ausnützung ihrer durch negative Ladung (Phosphatgruppe) verursachten Fähigkeit im elektrischen Feld zu wandern. Elektrophoretische Trennungen werden dabei in Gelen durchgeführt, die durch die Ausbildung einer Netzstruktur als Molekularsieb dienen, durch welches die Wanderung größerer Moleküle stärker behindert wird als die kleinerer. Für die Auftrennung von PCR-Amplifikaten werden üblicherweise Agarosegele eingesetzt. Agarose ist ein lineares Polymer aus alternierenden D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-L-

Galaktoseresten. Die physikalischen Eigenschaften werden in erster Linie durch die Agarosekonzentration bestimmt.

Die so aufgetrennten Amplifikate werden unter UV-Licht durch Färbung mit Ethidiumbromid im Agarosegel als Banden sichtbar gemacht. Ethidiumbromid bindet an die Duplex-DNA durch Interkalation, d.h. dieser Farbstoff schiebt sich zwischen die gestapelten Basen, wobei Fluoreszenz im UV-Bereich im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert wird. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 50 ng DNA.

3.4.10 Agarosegelherstellung

Da die Produkte der RT-PCR eine Größe von 300-500 bp besitzen, wurde zur Auftrennung ein 2,5 %iges Agarosegel benutzt. Zu diesem Zweck wurden 2,5 g „Small-DNA Agarose“ (Biozym) in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und 100 ml 1x TAE-Puffer unter kräftigem Schwenken hinzugegeben. In einem Mikrowellengerät wurde die Agarose-Lösung bis zum vollständigen Lösen und Klären der Agarose aufgekocht. Nach Abkühlen auf unter 60°C wurde die Agarose nach Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) luftblasenfrei in den waagrecht ausgerichteten Elektrophorese-Schlitten gegossen und zwei Elektrophoresekämme zur Ausbildung der Probenaschen eingesetzt. Nach etwa einstündigem Abkühlen wurden die Kämme entfernt und der Gelschlitten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Horizontalelektrophoresekammer platziert.

3.4.11 Elektrophorese

Aus den Reaktionsgefäßen wurden 20 µl des RT-PCR-Amplifikats entnommen, mit 3 µl Probenlaufpuffer (0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 15% Ficoll) gemischt und jeweils 20 µl in die Probenaschen der Agarosegele pipettiert. Zusätzlich wurde je Probenreihe 5 µl des in Laufpuffer verdünnten 100 bp Längenstandards aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 90 Minuten bei 130 V wurden die Gele auf einen UV-Leuchttisch (310 nm) platziert und die Amplifikate als fluoreszierende Banden mit einer Video-Kamera aufgenommen.

Die Bilder der Gele wurden sowohl mit einem Thermo-Printer ausgedruckt als auch in digitaler Form zur Weiterbearbeitung am Computer abgespeichert.

3.4.12 Auswertung der RT-PCR-Amplifikate

Da unter UV-Licht die Helligkeit der Banden mit der Menge an Amplifikat korreliert, erlaubt der Helligkeitsvergleich der Banden eine Aussage über die Quantität der ursprünglichen mRNA-Menge. Um die Helligkeit der Banden zu quantifizieren, wurden die Elektrophoresegele mit dem Image Master VDS (Pharmacia Biotech, Schweden) digital abgespeichert und mit dem Programm Image Master™ VDS Software (Pharmacia Biotech, Schweden) ausgewertet. In diesem Programm werden die Bildpunkte einer angegebenen Fläche unter Berücksichtigung ihres Helligkeitswertes aufsummiert und als zweidimensionale Densitogramme sichtbar gemacht. Elektrophoresebanden erscheinen in diesen Densitogrammen als „*peaks*“ deren Fläche durch Integration quantitativ erfasst wird. Die Peakflächen sind der Bandenhelligkeit proportional und dienen somit als ein quantitatives Maß für die Menge an RT-PCR-Produkt.

3.5 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse wurden mittels Student's t-Test auf Signifikanz überprüft. Im Ergebnissteil werden jeweils die p-Werte der Analyse angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zytosolischer Daunorubicin-Metabolismus nach simulierter Chemotherapie *in vitro*

Ausgangspunkt dieser Untersuchung war die Arbeit von Soldan et al. (1996), der erstmals eine Induktion von Daunorubicin-metabolisierenden Enzymen in Pankreaskarzinom-Zelllinien nachweisen konnte.

Um dieses Induktions-Phänomen weiter zu studieren, wurde an drei zusätzlichen Tumor-Zelllinien eine simulierte Chemotherapie *in vitro* durchgeführt.

Hierzu wurden die Tumorzellen über 72 Stunden mit unterschiedlich hohen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, weil bei der klinischen Behandlung eines Patienten mit Daunorubicin eine ähnliche Zeitspanne eingehalten wird und die meisten Proteine nach 24 bis 96 Stunden ein Induktionsmaximum aufweisen. Bei einem soliden Tumor nimmt die Zytostatika-Konzentrationen vom Zentrum des Tumors zur Peripherie hin ab. Um auch diese unterschiedlichen Zytostatika-Konzentrationen zu simulieren, wurde dem Kulturmedium ansteigende, subletale Daunorubicin-Mengen hinzugefügt.

Nach dieser simulierten Chemotherapie wurde aus den Tumorzellen das Zytosol isoliert und im Standardinkubationsansatz eingesetzt (siehe 3.3).

4.1.1 Melanom-Zelllinie (MeWo)

In dem Malignen Melanom konnte ein leichter Rückgang der Daunorubicin-Reduktion beobachtet werden, wenn dem Kulturmedium niedrige Daunorubicin-Konzentrationen (0,1 µg/ml) zugeführt wurden (siehe Abbildung 6).

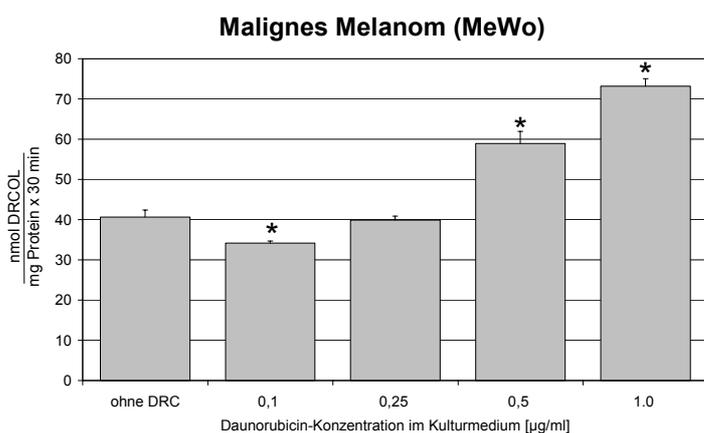


Abbildung 6: Daunorubicin-Reduktion im Zytosol des Malignen Melanom. Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Anzahl der Bestimmungen n = 6. *:p<0,05

Abkürzungen: DRC = Daunorubicin, DRCOL = Daunorubicinol

Ab einer Konzentration von 0,25 µg/ml Daunorubicin zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der metabolischen Aktivität. Eine beinahe 2fache stärkere Daunorubicin-Reduktion wurde induziert, wenn dem Medium 1 µg/ml Daunorubicin zugefügt worden war. Bei dieser hohen Konzentration zeigten sich bei der lichtmikroskopischen Beobachtung sehr starke Schädigungen der Zellen (Vakuolenbildung und Anschwellen des Zellkerns). Bei der Zugabe von 1,5 µg/ml Daunorubicin waren alle Zellen abgestorben, so dass keine Aufarbeitung des Zytosols mehr möglich war. Aus diesen Gründen ist anzunehmen, dass die Zellen ihr Induktionsmaximum bei 1 µg/ml besitzen.

Die Beobachtungen lassen vermuten, dass diese Tumorzellen sich durch Induktion von Daunorubicin-metabolisierenden Enzymen, die je nach Konzentration des Zytostatikums unterschiedlich stark ausgeprägt ist, vor diesem Zytostatikum schützen.

4.1.2 Ovarialkarzinom-Zelllinie (EFO-21)

Die Ovarialkarzinom-Zelllinie zeigte die gleiche Grundaktivität (ohne Daunorubicin-Zusatz) wie das Maligne Melanom, doch ließ sich hier nur eine leichte Steigerung der Daunorubicin-Reduktion auf das 1,3fache bei 0,1 µg/ml Daunorubicin im Medium beobachten (siehe Abbildung 7).

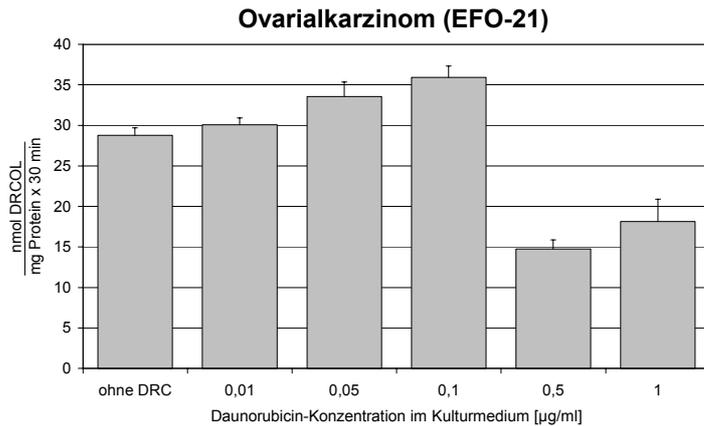


Abbildung 7: Daunorubicin-Reduktion im Zytosol des Ovarialkarzinoms. Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Anzahl der Bestimmungen n=6. p<0,05
Abkürzungen: DRC = Daunorubicin, DRCOL = Daunorubicinol

Im Vergleich zum Malignen Melanom zeigten die Ovarialkarzinom-Zellen ein ähnliches Konzentrationsspektrum, doch schienen sie empfindlicher gegen Daunorubicin zu sein, da sie schon bei sehr kleinen Daunorubicin-Mengen mit einer Induktion des Metabolismus antworteten und bei höheren Konzentrationen die Aktivität rückläufig war.

4.1.3 Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7)

Die Mammakarzinom-Zelllinie hatte das größte Konzentrationsspektrum. Auch bei sehr hohen Daunorubicin-Konzentrationen waren die Zellen noch lebensfähig. Die Zellen ließen, wie beim Malignen Melanom, einen leichten Rückgang der Aktivität bei niedrigster Konzentration erkennen (siehe Abbildung 8).

Die maximale Induktion lag bei 0,5 und 1 µg/ml Daunorubicin (je 1,4fach). Danach waren die Zellen noch lange lebensfähig, doch eine weitere Steigerung der Aktivität konnte man nicht mehr beobachten. Dies weist auf weitere

Resistenzmechanismen hin, die bei hohen Konzentrationen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

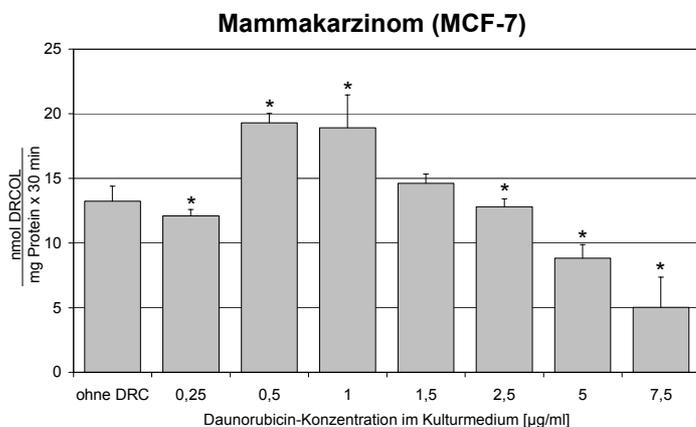


Abbildung 8: Daunorubicin-Reduktion im Zytosol des Mammakarzinoms. Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Anzahl der Bestimmungen n=6. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin, DRCOL = Daunorubicinol

Im Vergleich zum Malignen Melanom und dem Ovarialkarzinom zeigte das Mammakarzinom eine Grundaktivität, die weniger als die Hälfte der beiden anderen Tumor-Zelllinien betrug. Auch dies könnte für andere, wichtigere Resistenzmechanismen in dieser Zelllinie sprechen.

4.2 mRNA-Expression der vier bekannten Daunorubicin-Reduktasen

Um die Enzyme, die am Metabolismus von Daunorubicin zu Daunorubicinol beteiligt sind, zu identifizieren, wurde die Methode der RT-PCR angewandt (siehe 3.4.7). Hierbei wird die Menge an mRNA als Maß für die Expression des jeweiligen Gens benutzt. So lässt sich die Veränderung der Expression der vier möglichen Daunorubicin-Reduktasen nach vorheriger Daunorubicin-Exposition in den verschiedenen Zelllinien messen. Von Vorteil erscheint, wenn die Tumorzellen schon auf Proteinebene die Reduktasen induzierten, weil dann auch eine Veränderung auf mRNA-Ebene möglich war.

Da nur das Maligne Melanom eine stärkere Änderung der Enzymaktivität zeigte, wurden für die mRNA-Expressions-Messungen neben dieser Zelllinie drei weitere benutzt, bei denen eine hohe Aktivitätssteigerung bekannt war. Dies waren eine sensitive und eine resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie (Soldan et al., 1996). Der sensitive, unbehandelte Tumor (EPP85-181) zeigte eine Aktivitätssteigerung bis auf das 2 bis 3fache des Ausgangswertes.

Der resistente Abkömmling (EPP85-181RDB), ein über Monate mit Daunorubicin behandelter Tumor, verdoppelte, ähnlich dem Malignen Melanom, seine Aktivität.

Bei der dritten Zelllinie, einem Magenkarzinom (EPG257-SENS), wurde der Vergleich der Enzymaktivitäten nicht schon nach 72 Stunden, sondern erst nach mehreren Monaten gemessen (Ax et al, 1999). In diesem Zeitraum wurden ständig steigende, subletale Daunorubicin-Konzentrationen dem Kulturmedium beigelegt. Bei gleichzeitiger Blockade des Glykoproteins P-170, konnte man hier sogar eine Steigerung der Enzymaktivität um das 8fache erreichen. Diese neue Zelllinie wurde als resistente Magenkarzinom-Zelllinie (EPG257-RES) bezeichnet.

4.2.1 Vergleich der Grund-Expression der Daunorubicin-Reduktasen

In der folgenden Versuchsanordnung wurde die mRNA Expression jeder in Frage kommenden Reduktase in den drei Zelllinien MeWo, EPP85-181 und EPP85-181RDB gleichzeitig bestimmt. Da die Tumorzellen nicht mit Daunorubicin inkubiert wurden, spricht man in diesem Fall von der Grund-Expression der jeweiligen Reduktase. Die Grund-Expression gibt also die mRNA-Menge an, die von den Tumorzellen per se exprimiert wird.

Von jeder Zelllinie wurde die gleiche Menge an Gesamt-RNA eingesetzt, die RT-PCR-Amplifikate mit Hilfe der Image Master VDS Software® (siehe auch 3.4) ausgewertet und die Expression miteinander verglichen.

Die Grund-Expression der Carbonyl Reduktase lag in den beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien ungefähr bei dem gleichen Wert (siehe Abbildung 9). Die Zellen des Malignen Melanoms exprimierten die Carbonyl Reduktase um den Faktor 1,2 stärker als die beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien.

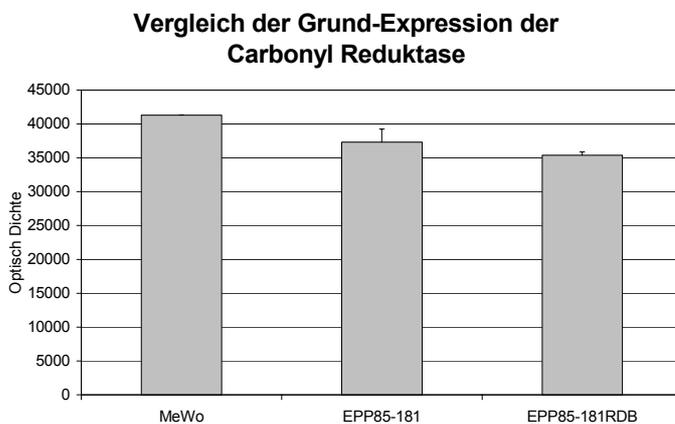


Abbildung 9: Vergleich der Grund-Expression der Carbonyl Reduktase. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensibles Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Die Grund-Expression der Aldose Reduktase war nur in den sensitiven und resistenten Pankreaskarzinom-Zellen identisch. Das Maligne Melanom hingegen zeigte eine um ca. 1,3fache niedrigere Grund-Expression der Aldose Reduktase (siehe Abbildung 10).

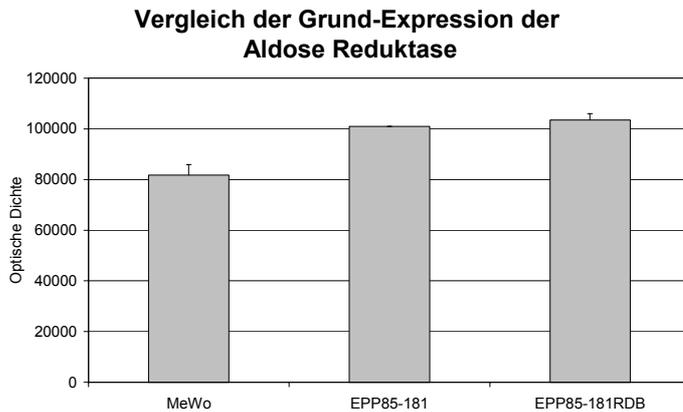


Abbildung 10: Vergleich der Grund-Expression der Aldose Reduktase. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Die Aldehyd Reduktase wurde in allen drei Zelllinien ungefähr gleich stark exprimiert, wenn dem Kulturmedium kein Daunorubicin zugeführt wurde (siehe Abbildung 11).

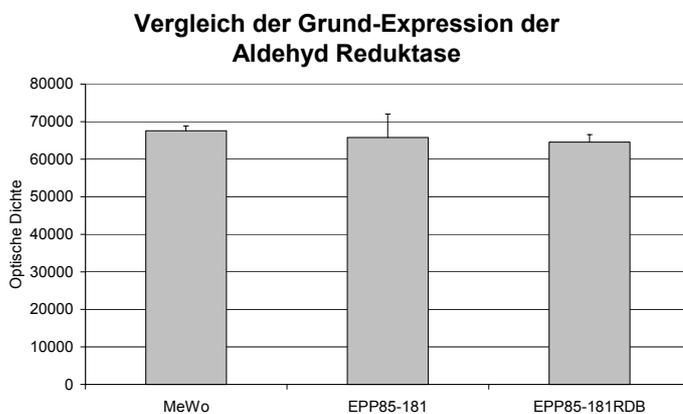


Abbildung 11: Vergleich der Grund-Expression der Aldehyd Reduktase. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Die Dihydrodiol Dehydrogenase wurde nur in dem sensitiven und resistenten Pankreaskarzinom exprimiert (siehe Abbildung 12). In dem Malignen Melanom lag die Menge der mRNA unter der Nachweisgrenze der sehr sensitiven Methode der RT-PCR. Die Grund-Expression im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-1812) lag nur unwesentlich höher (1,2fach) als im resistenten Abkömmling (EPP85-181RDB).

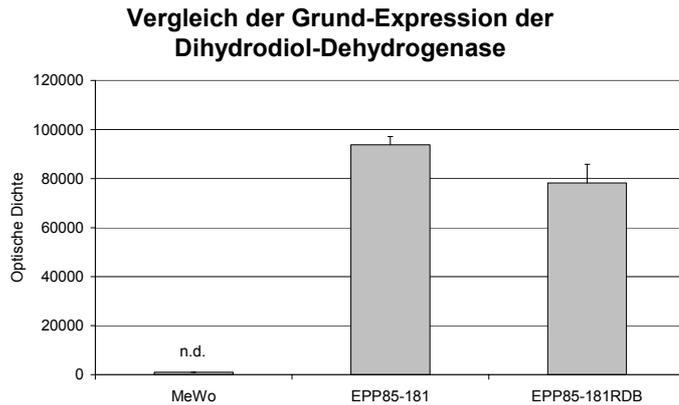


Abbildung 12: Vergleich der Grund-Expression der Dihydrodiol Dehydrogenase (DD2).

Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom; n.d.= nicht detektierbar

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien alle Daunorubicin-Reduktasen eine annähernd gleiche Grund-Expression besitzen. Das Maligne Melanom hingegen exprimiert im direkten Vergleich die Carbonyl Reduktase etwas stärker, die Aldose Reduktase schwächer und die Dihydrodiol Dehydrogenase überhaupt nicht.

4.2.2 mRNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen nach simulierter Chemotherapie *in vitro*

4.2.2.1 Melanom-Zelllinie (MeWo)

Die mRNA-Expression der Carbonyl Reduktase konnte durch Inkubation mit Daunorubicin über 72 Stunden nicht wesentlich gesteigert werden (siehe Abbildung 13).

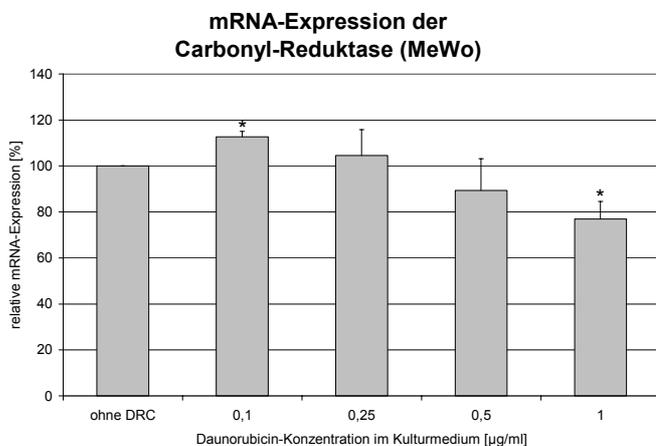


Abbildung 13: m-RNA-Expression der Carbonyl Reduktase im Malignen Melanom (MeWo).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC=Daunorubicin

Das Maximum der Induktion der Carbonyl Reduktase, eine 1,1fache Steigerung, konnte man bei niedriger Daunorubicin-Konzentration (0,1 µg/ml) messen. Danach nahm die Menge an mRNA kontinuierlich ab.

Auch die mRNA-Expression der Aldehyd Reduktase zeigte keine wesentliche Veränderung (siehe Abbildung 14).

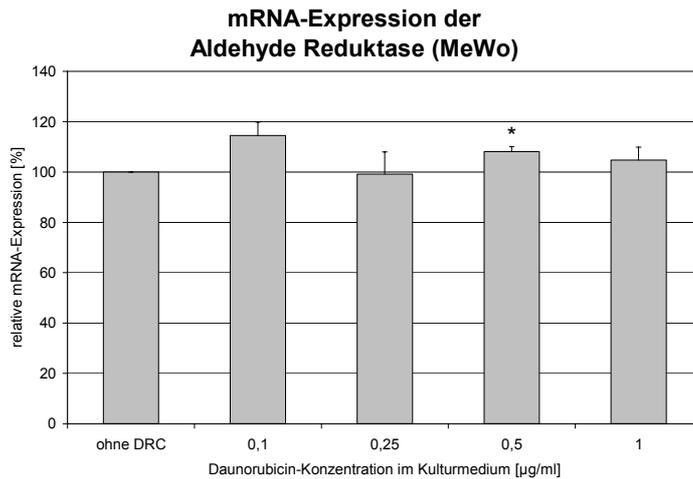


Abbildung 14: m-RNA-Expression der Aldehyd Reduktase im Malignen Melanom (MeWo).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. *: $p < 0,05$.
Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Nur bei niedrigster Daunorubicin-Konzentration (0,1 µg/ml) ließ sich eine leichte Steigerung der mRNA-Expression auf das 1,1fache beobachten. Bei höheren Konzentrationen blieb die mRNA-Expression jedoch auf dem Level des Ausgangswertes.

Auch die mRNA-Expression der Aldose Reduktase wurde kaum verändert (siehe Abbildung 15). Bei niedrigen Daunorubicin-Konzentrationen konnte ein leichter Rückgang der mRNA-Expression beobachtet werden. Ab 0,5 µg/ml Daunorubicin im Kulturmedium stieg die mRNA-Expression an. Doch wie bei der Carbonyl Reduktase und der Aldehyd Reduktase betrug die höchste Steigerung nur ca. 1,2fach (bei 1 µg/ml Daunorubicin).

Die Menge an exprimierter Dihydrodiol Dehydrogenase lag in dieser Tumorzelllinie unter der empfindlichen Nachweisgrenze der RT-PCR, so dass eine Beteiligung am induzierten Daunorubicin-Metabolismus so gut wie ausgeschlossen war.

Ergebnisse

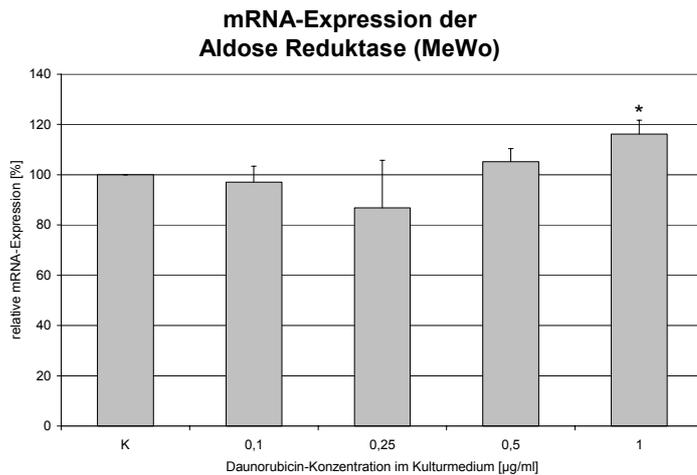


Abbildung 15: m-RNA-Expression der Aldose Reduktase im Malignen Melanom (MeWo). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p=0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Zusammenfassend lässt sich für diese Tumor-Zelllinie sagen, dass alle vier getesteten Reduktasen eine wohl untergeordnete Rolle im forcierten Metabolismus von Daunorubicin spielen und so nicht zu einer erworbenen Resistenz gegen dieses Zytostatikum beitragen.

4.2.2.2 Sensitive Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181)

Nach simulierter Chemotherapie konnte in dieser Tumor-Zelllinie eine stärkere Induktion der Carbonyl Reduktase festgestellt werden (siehe Abbildung 16).

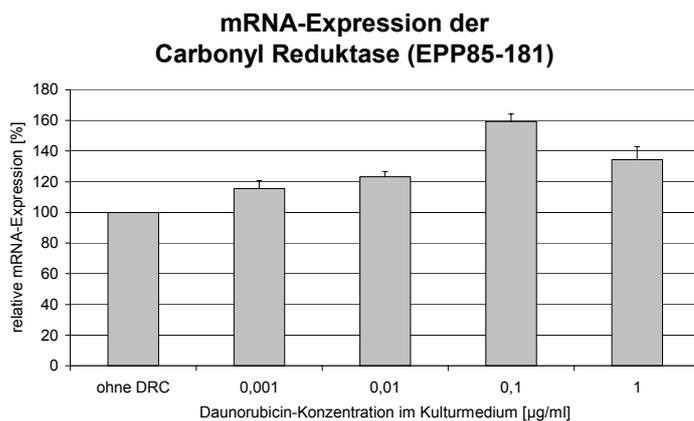


Abbildung 16: m-RNA-Expression der Carbonyl Reduktase im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Die höchste Steigerung dieser Reduktase betrug 1,6fach, wenn dem Kulturmedium 0,1 µg/ml Daunorubicin hinzugefügt wurden. Sogar bei höchster Daunorubicin-Konzentration (1 µg/ml) lag die mRNA-Expression noch 34 % über dem Ausgangswert, obwohl bei dieser Konzentration lichtmikroskopisch schon schwerste Schäden an den Zellen beobachtet werden konnten. Dies

könnte auf die Fähigkeit dieser Reduktase als protektiver Faktor gegen Daunorubicin hinweisen.

Die Aldehyd Reduktase zeigte hingegen in dem sensitiven Pankreaskarzinom keine bedeutsame Modifikation der mRNA-Expression nach vorheriger Daunorubicin-Exposition (siehe Abbildung 17).

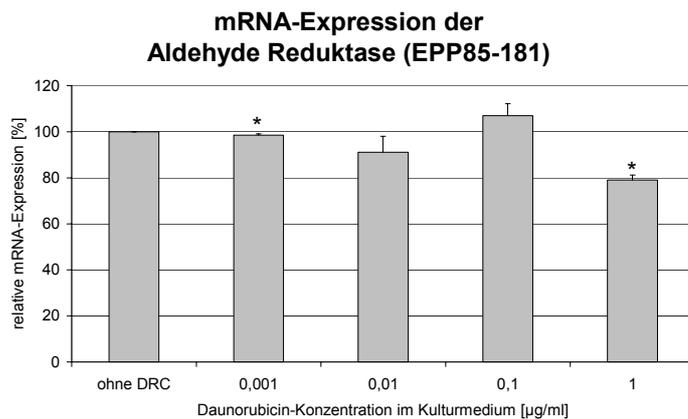


Abbildung 17: m-RNA-Expression der Aldehyd Reduktase im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Auch die Aldose Reduktase änderte ihre mRNA-Expression nur unwesentlich (siehe Abbildung 18). Nach einem leichtem Rückgang bei der niedrigsten Daunorubicin-Konzentration, pendelte sich die mRNA-Expression bei 110-120 % des Ausgangswertes ein.

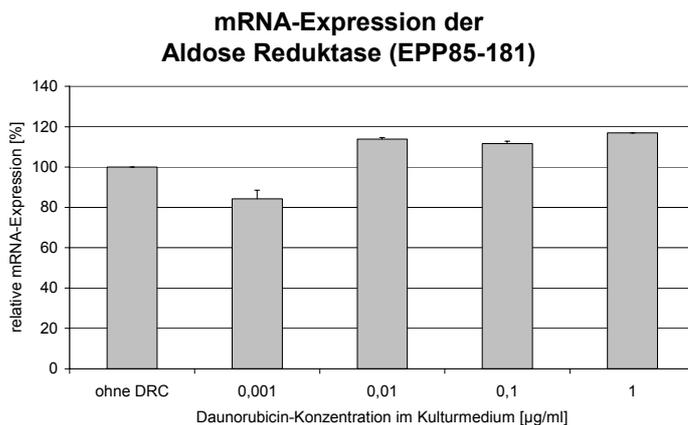


Abbildung 18: m-RNA-Expression der Aldose Reduktase im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Wie die Aldehyd Reduktase und die Aldose Reduktase zeigte die zu letzt getestete Dihydrodiol Dehydrogenase keine erhebliche Induktion der mRNA-Expression (siehe Abbildung 19).

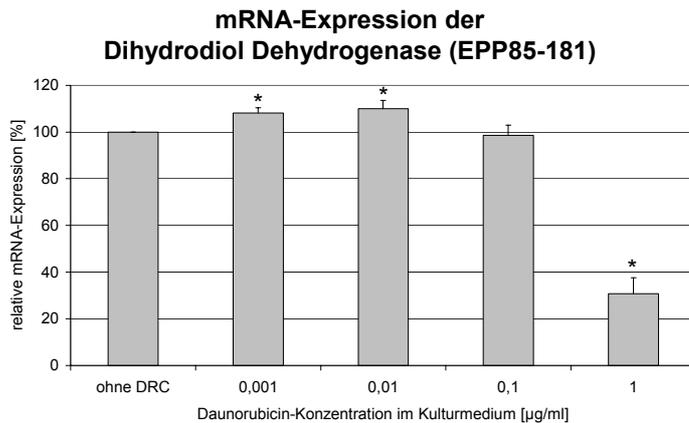


Abbildung 19: m-RNA-Expression der Dihydrodiol Dehydrogenase im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181) Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Der starke Rückgang der mRNA-Expression bei einer Daunorubicin-Konzentration von 1 µg/ml auf 40 % des Ausgangswertes deutet darauf hin, dass die Tumorzellen bei hohen Daunorubicin-Konzentrationen keinen Nutzen mehr von diesem Enzym haben und deswegen die Expression runterregeln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das sensitive Pankreaskarzinom auf eine Exposition mit Daunorubicin mit einer Induktion der Carbonyl Reduktase antwortete. Selbst bei höchster Daunorubicin-Konzentration lag die Menge an gebildeter mRNA über dem Ausgangswert. Die anderen drei Reduktasen zeigten keine Induktion und scheinen an der erworbenen Resistenz gegenüber Daunorubicin nicht beteiligt zu sein.

4.2.2.3 Resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie (EPP85-181RDB)

Die mRNA-Expression der Carbonyl Reduktase des resistenten Abkömmlings zeigte im Vergleich zur sensitiven Ausgangs-Zelllinie eine identische Steigerung auf das 1,6fache der Ausgangswertes (siehe Abbildung 20). Doch lag das Maximum der mRNA-Expression nicht bei 0,1 µg/ml, sondern erst bei der höchsten Daunorubicin-Konzentration von 1 µg/ml. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde die mRNA-Expression der Carbonyl Reduktase erniedrigt. Beide Beobachtungen weisen darauf hin, dass diese Reduktase wohl erst bei sehr hohen Daunorubicin-Mengen eine Rolle in diesen Tumorzellen spielt.

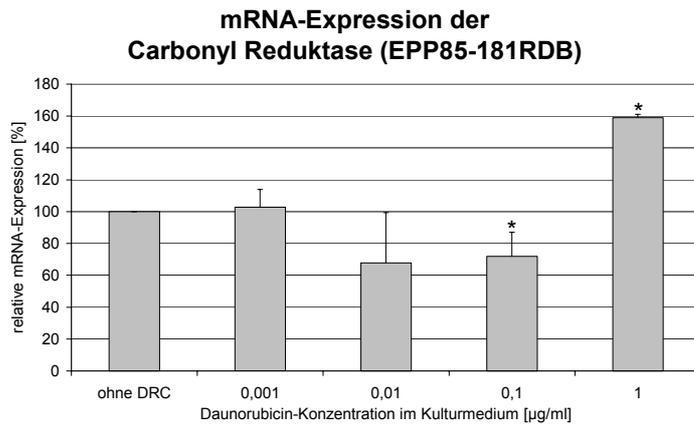


Abbildung 20: m-RNA-Expression der Carbonyl Reduktase im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Die Aldehyd Reduktase scheint dagegen nicht am forcierten Metabolismus von Daunorubicin in dieser Tumor-Zelllinie beteiligt zu sein, da die mRNA-Menge bei steigendem Daunorubicin-Zusatz stetig abnimmt (siehe Abbildung 21). Bei einer Daunorubicin-Konzentration von 1 µg/ml betrug die mRNA-Expression weniger als 40 % des Ausgangswertes.

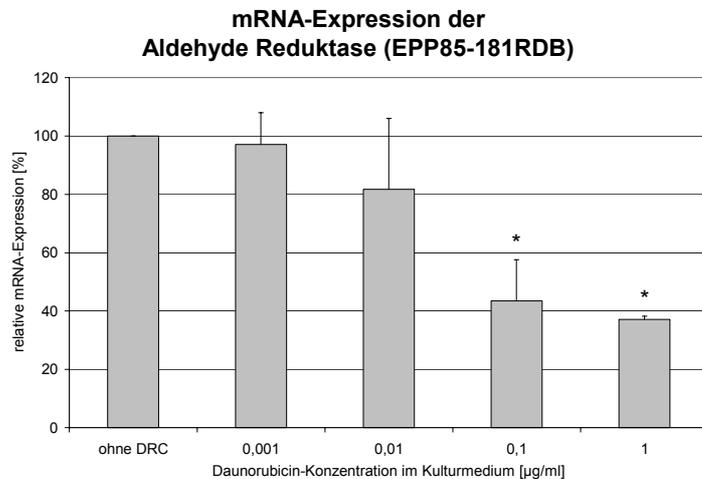


Abbildung 21: m-RNA-Expression der Aldehyd Reduktase im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC= Daunorubicin

Auch bei der Aldose Reduktase konnte keine Steigerung der mRNA-Expression (siehe Abbildung 22) nachgewiesen werden. Bei sämtlichen Daunorubicin-Konzentrationen blieb die mRNA-Expression genauso hoch wie bei dem Ausgangswert. Einen Rückgang der mRNA-Menge wie bei der Aldehyd Reduktase ließ sich hier jedoch nicht beobachten.

Ergebnisse

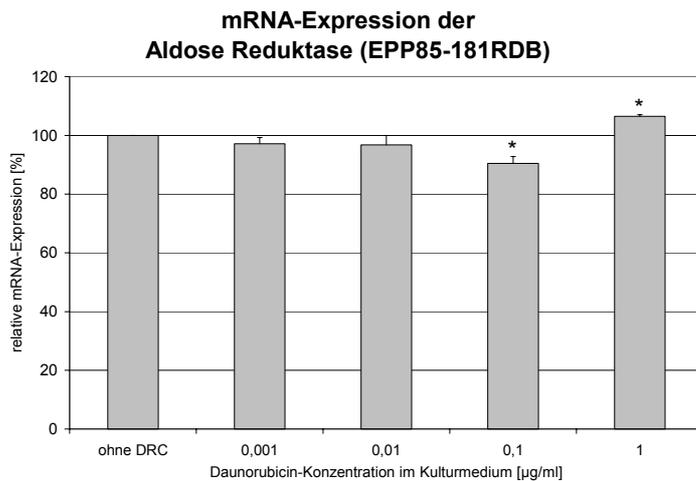


Abbildung 22: m-RNA-Expression der Aldose Reduktase im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Die zweite Reduktase, die neben der Carbonyl Reduktase in der resistenten Pankreaskarzinom-Zelllinie stärker induziert wurde, war die Dihydrodiol Dehydrogenase. Sie änderte ihre mRNA-Expression auf das 1,3fache des Startwertes, wenn dem Kulturmedium 0,001 µg/ml Daunorubicin zugefügt wurden (siehe Abbildung 23). Bei höheren Konzentrationen schienen die Tumorzellen aber keinen Nutzen mehr von dieser Reduktase zu haben, da die mRNA-Menge stetig abnahm. Bei 1 µg/ml Daunorubicin betrug die mRNA-Expression nur noch 48 %.

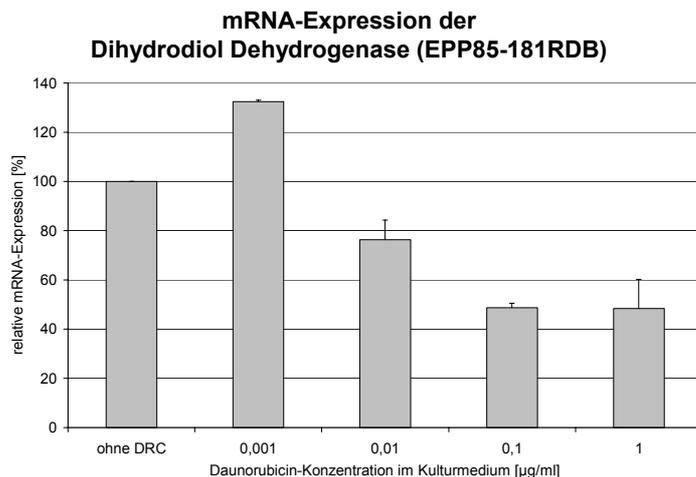


Abbildung 23: m-RNA-Expression der Dihydrodiol Dehydrogenase im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Zusammenfassend kann man für das resistente Pankreaskarzinom feststellen, dass sowohl die Carbonyl Reduktase als auch die Dihydrodiol Dehydrogenase auf mRNA-Ebene induziert werden. Die Dihydrodiol Dehydrogenase scheint bei niedrigen, die Carbonyl Reduktase bei hohen Daunorubicin-Konzentrationen

eine bemerkenswerte Rolle im forcierten Metabolismus von Daunorubicin zu spielen. Die Aldehyd Reduktase und die Aldose Reduktase hingegen sind wohl nicht an einer erworbenen Resistenz gegenüber Daunorubicin beteiligt.

4.2.3 Langzeit-Inkubation mit Daunorubicin

In dieser Versuchsreihe wurden sensitive Magenkarzinom-Zellen nicht wie bisher über 72 Stunden sondern über mehrere Monate mit subletalen, ansteigenden Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Gleichzeitig wurde durch Verapamil das Glykoprotein P-170 blockiert, um zu verhindern, dass die Zellen mit diesem Resistenzmechanismus auf die Exposition mit Daunorubicin antworten. So entstand der Daunorubicin-resistente Abkömmling der sensitiven Ausgangs-Zelllinie.

Nach diesem Zeitraum wurde die mRNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen in der unbehandelten, sensitiven Magenkarzinom-Zelllinie (EPG257) mit der nun Daunorubicin-resistenten Zelllinie (EPG257-RES) verglichen.

4.2.3.1 Sensitive und resistente Magenkarzinom-Zelllinie (EPG257 und EPG257-RES)

Die mRNA-Expression der Aldehyd Reduktase nahm in den resistenten Zellen nach mehreren Monaten ab (siehe Abbildung 24). Sie reduzierte sich auf 86 % des Wertes der sensitiven Zellen. Die mRNA-Menge der Dihydrodiol Dehydrogenase und der Aldose Reduktase hingegen wurde um 1,2fach leicht gesteigert. Jedoch die stärkste Steigerung der mRNA-Expression zeigte die Carbonyl Reduktase. Nach mehrmonatiger Daunorubicin-Exposition stieg sie auf das 1,6fache der sensitiven Ausgangszellen.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass die Carbonyl Reduktase auch bei einer längeren Exposition mit dem Zytostatikum Daunorubicin den wohl größten Anteil am forcierten Metabolismus von Daunorubicin zu Daunorubicinol besitzt. Die Aldehyd Reduktase scheint, wie in den schon betrachteten Zelllinien, keine

Rolle bei der Induktion der Carbonyl-Reduktion zu spielen. Die Dihydrodiol Dehydrogenase und die Aldose Reduktase steigerten ihre mRNA-Expression nur unwesentlich, so dass eine Beteiligung an der erworbenen Resistenz gegenüber Daunorubicin eher unwahrscheinlich ist.

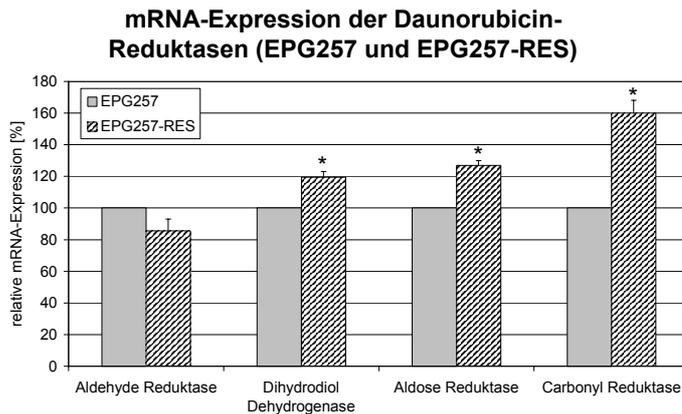


Abbildung 24: m-RNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen im sensitiven (EPG257) und resistenten Magenkarzinom (EPG257-RES). Die resistenten Zellen wurden über mehrere Monate mit subletalen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression der sensitiven Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Werte der resistenten Zellen wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05.

4.3 mRNA-Expression von MDR₁, MRP und LRP

Der häufigste Grund einer Zytostatikaresistenz gegenüber Anthrazyklinen ist die Überexpression des Glykoproteins P-170. Dieses Produkt des *MDR₁*-Gens transportiert unter anderem Daunorubicin aus der Tumorzelle und vermindert dadurch die intrazellulär-vermittelte toxische Wirkung.

Neben diesem Mechanismus wurde in vielen resistenten Tumorzellen, die keine *MDR₁*-vermittelte Resistenz zeigten, eine Amplifikation und Überexpression des *MRP*- oder *LRP*-Gens nachgewiesen. Das Produkt und die Funktion des *MRP*-Gens ist dem Glykoprotein P-170 sehr ähnlich. Es pumpt Konjugate von lipophilen Substanzen unter ATP-Verbrauch aus der Zelle oder in Vesikel. Die Resistenzvermittlung des *LRP* ist zur Zeit noch unklar, aber ein kausaler Zusammenhang mit Zytostatikaresistenz in Tumorzellen ist bewiesen.

Diese drei „klassischen“ Resistenzmechanismen sind in der Literatur vielfach beschrieben und bei der Resistenzbildung in Tumorzellen sehr oft beteiligt. Um

nun die Bedeutung der Überexpression von Daunorubicin-Reduktasen und der dadurch vermittelten Resistenz gegenüber Daunorubicin einzuschätzen, wurde vergleichend die mRNA-Expression von MDR₁, MRP und LRP mittels RT-PCR in den drei Tumor-Zelllinien (MeWo, EPP85-181 und EPP85-181RDB) gemessen.

4.3.1 Vergleich der Grund-Expression von MDR₁, MRP und LRP

In den folgenden Versuchen wurde die Grund-Expression, wie auch schon bei den Daunorubicin-Reduktasen (siehe 4.2.1), von MDR₁, MRP und LRP in den drei Tumor-Zelllinien bestimmt.

Von jeder Zelllinie wurde die gleiche Menge an Gesamt-RNA eingesetzt, die RT-PCR-Amplifikate mit Hilfe der Image Master VDS Software® (siehe auch 3.4) ausgewertet und die Expression miteinander verglichen.

Die Grund-Expression des *MDR₁*-Gens war in dem Malignen Melanom am höchsten (siehe Abbildung 25). Sie lag um 1,4fach höher als in dem sensitiven Pankreaskarzinom. Der resistente Abkömmling der Pankreas-Zelllinie exprimierte das *MDR₁*-Gen im Vergleich zur sensitiven Zelllinie nur leicht verstärkt (1,2fach) und im Vergleich zum Malignen Melanom um 1,2fach erniedrigt.

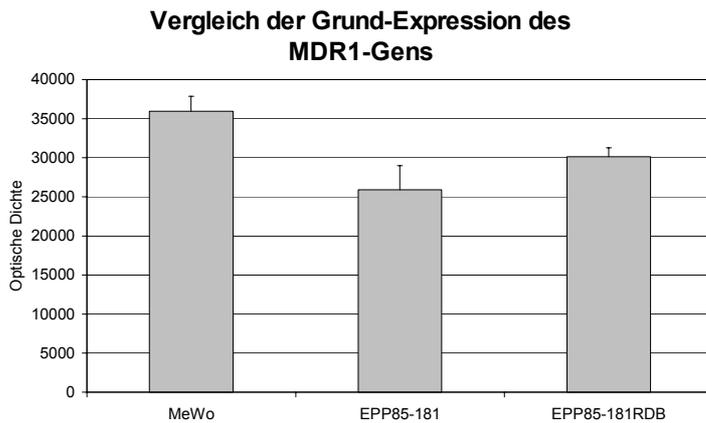


Abbildung 25: Vergleich der Grund-Expression des *MDR1*-Gens. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Die Grund-Expression des *MRP*-Gens hingegen war in dem Malignen Melanom am niedrigsten (siehe Abbildung 26). Sie war um 2fach niedriger als in der sensitiven und resistenten Pankreaskarzinom-Zelllinie, in denen die *MRP*-Expression annähernd gleich war.

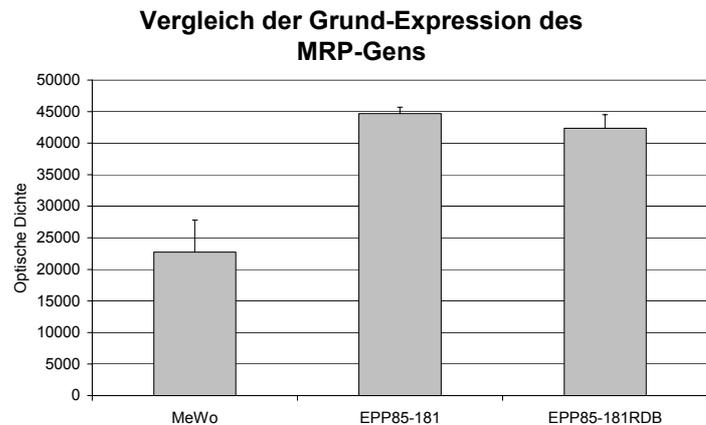


Abbildung 26: Vergleich der Grund-Expression des *MRP*-Gens. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Das *LRP*-Gen wurde in dem Malignen Melanom überhaupt nicht exprimiert (siehe Abbildung 27). Die stärkste Grund-Expression zeigte hier die resistente Pankreaskarzinom-Zelllinie. Im Vergleich zu den sensitiven Zellen exprimierte sie das *LRP*-Gen um den Faktor 1,2 unwesentlich erhöht.

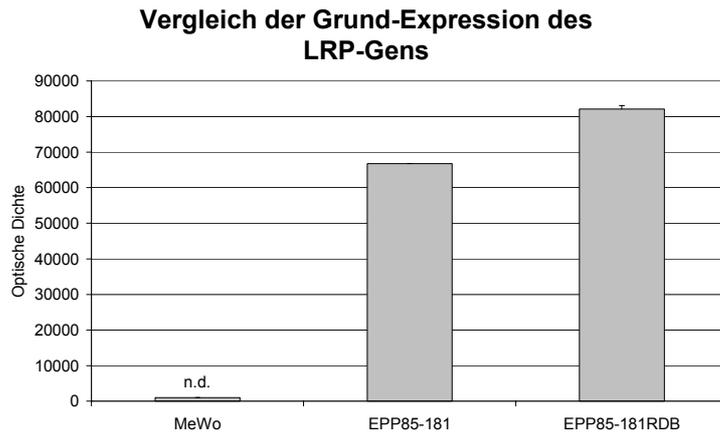


Abbildung 27: Vergleich der Grund-Expression des *LRP*-Gens. Die Zellen hatten noch keinen Kontakt mit Daunorubicin. Die Grund-Expression gibt die Menge der mRNA an, die von der Zelle per se exprimiert wird. Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. Abkürzungen: MeWo = Malignes Melanom; EPP85-181 = sensitives Pankreaskarzinom; EPP85-181RDB = resistentes Pankreaskarzinom

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in den beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien die Grund-Expression der drei klassischen Resistenz-Mechanismen MDR_1 , MRP und LRP nahezu gleich ist. Der resistente Abkömmling muss dennoch über weitere Resistenz-Faktoren verfügen, die ihn von den sensitiven Zellen unterscheiden. Im Vergleich der drei Zelllinien exprimierte das Maligne Melanom das MDR_1 -Gen am stärksten. Das MRP-Gen hingegen zeigte nur eine geringe Grund-Expression und das LRP-Gen wurde überhaupt nicht exprimiert. Anhand dieser drei Mechanismen lässt sich zeigen, dass jede Tumorart eine andere Art findet, um sich gegen die Toxizität der Zytostatika zu wehren.

4.3.2 mRNA-Expression von MDR_1 , MRP und LRP nach simulierter Chemotherapie *in vitro*

4.3.2.1 Malignes Melanom (MeWo)

Nach simulierter Chemotherapie zeigte die mRNA-Expression des MDR_1 -Gens schon bei geringer Daunorubicin-Konzentration (0,1 $\mu\text{g/ml}$) eine beachtliche Steigerung um das 1,4fache (siehe Abbildung 28). Höhere Daunorubicin-Mengen steigerten die mRNA-Expression nur noch unwesentlich. Bei 1 $\mu\text{g/ml}$ lag sie bei 150 % des Wertes ohne Daunorubicin-Zusatz.

Ergebnisse

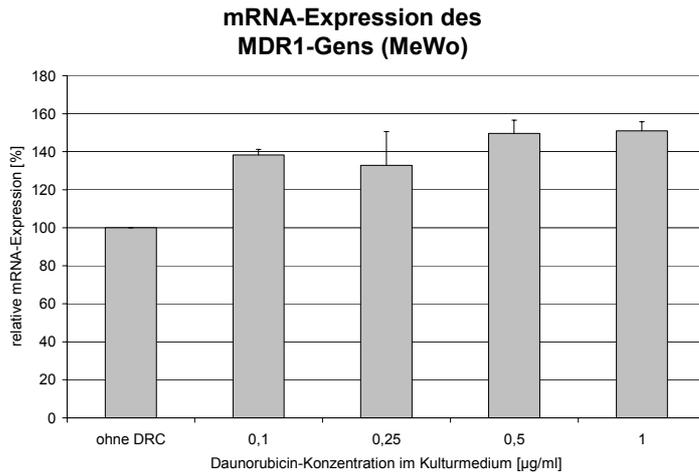


Abbildung 28: m-RNA-Expression des *MDR1*-Gens im Malignen Melanom (MeWo).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. $p < 0,05$.
Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass diese Tumorzellen das Glykoprotein P-170 zur Abwehr gegen Daunorubicin verwenden. Schon bei niedrigen Daunorubicin-Mengen sehen sich die Zellen dazu veranlasst, die mRNA-Menge des *MDR1*-Gens zu steigern, um sich so vor dem Zytostatikum zu schützen.

Die Menge des *MRP*-Gens wurde im Gegensatz zum *MDR1*-Gen bei niedrigem Daunorubicin-Zusatz stark vermindert (siehe Abbildung 29). Bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml betrug die mRNA-Expression nur noch 40 % des Ausgangswertes. Bei höheren Daunorubicin-Mengen stieg die mRNA-Expression jedoch an. Bei höchster Konzentration (1 µg/ml) betrug sie das 1,9fache des Wertes ohne Daunorubicin-Zusatz.

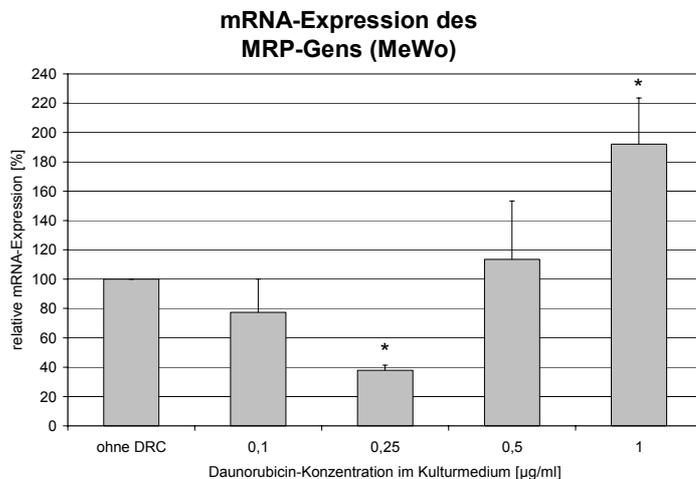


Abbildung 29: m-RNA-Expression des *MRP*-Gens im Malignen Melanom (MeWo).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. $*: p < 0,05$.

Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Die Funktion des MRP als Resistenzmechanismus scheint im Malignen Melanom erst bei hohen Daunorubicin-Konzentrationen eine Rolle zu spielen. Es ist anzunehmen, dass bei niedrigen Konzentrationen andere Mechanismen die Zellen vor Zytostatika-Toxizität schützen.

Die mRNA-Expression des *LRP*-Gens konnte in dem Malignen Melanom trotz sensitiver RT-PCR nicht nachgewiesen werden. Eine Beteiligung des LRP an der Resistenz gegenüber Daunorubicin ist demnach so gut wie ausgeschlossen.

4.3.2.2 Sensitives Pankreaskarzinom (EPP85-181)

Das sensitive Pankreaskarzinom antwortete nach einer 72stündigen Inkubation mit Daunorubicin mit einer fast 4fachen Steigerung der mRNA-Expression des *MDR1*-Gens. Diese ausgeprägte Steigerung konnte man bei der höchsten Daunorubicin-Konzentration von 1 µg/ml beobachten (siehe Abbildung 30). Schon bei einem Zusatz von 0,1 µg/ml wurde die mRNA-Expression auf das 2,7fache erhöht. Bei niedrigeren Daunorubicin-Mengen zeigten die Tumorzellen keine Veränderung der *MDR1*-Expression.

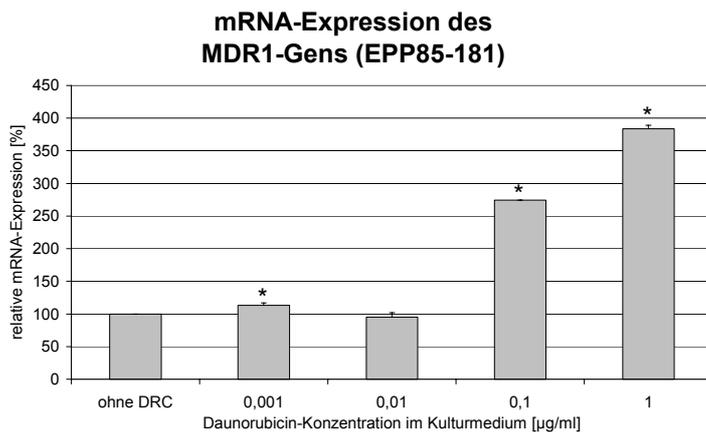


Abbildung 30: m-RNA-Expression des *MDR1*-Gens im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Überexpression des *MDR1*-Gens ein wichtiger Resistenzmechanismus im sensitiven Pankreaskarzinom ist.

Auch die mRNA-Expression des *MRP*-Gens wurde bei niedrigen Daunorubicin-Konzentrationen (0,001 und 0,01 $\mu\text{g/ml}$) nicht gesteigert (siehe Abbildung 31). Das Maximum der Induktion lag hier bei 1,7fach bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Wurde dem Kulturmedium 1 $\mu\text{g/ml}$ Daunorubicin hinzugefügt, nahm die mRNA-Expression nach 72 Stunden auf 40 % des Ausgangswertes ab. Die höchste Daunorubicin-Konzentration schädigt die Zellen wohl so stark, dass sie nicht mehr in der Lage sind, die Expression des *MRP*-Gens aufrecht zu halten. Andere Faktoren scheinen bei dieser Konzentration eine wichtigere Rolle zu spielen.

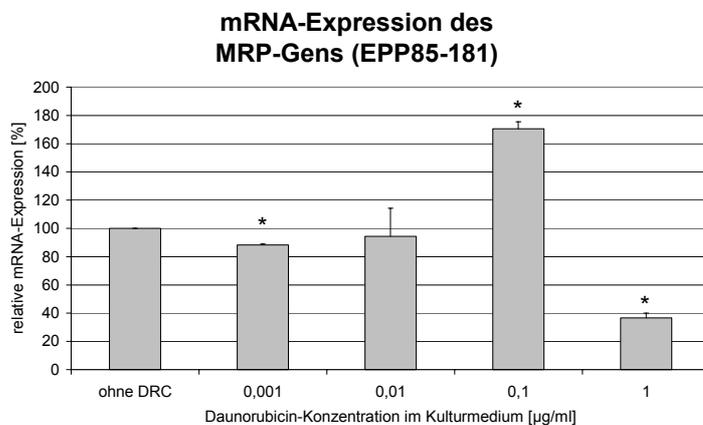


Abbildung 31: m-RNA-Expression des *MRP*-Gens im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. *: $p < 0,05$. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Auch das „lung-resistance-related protein“ (LRP) wurde in dem sensitiven Pankreaskarzinom exprimiert. Doch eine Steigerung der mRNA-Expression konnte nach Daunorubicin-Inkubation nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 32). Für eine Resistenzentstehung während einer Daunorubicin-Chemotherapie ist das LRP in diesen Tumorzellen vermutlich nicht beteiligt.

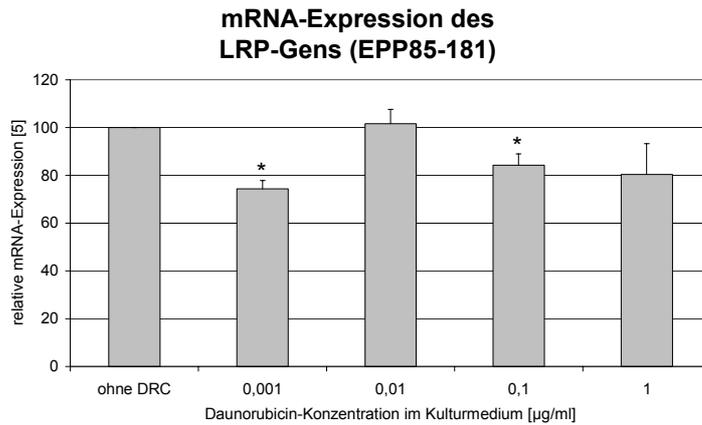


Abbildung 32: m-RNA-Expression des LRP-Gens im sensitiven Pankreaskarzinom (EPP85-181).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

4.3.2.3 Resistentes Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB)

Die MDR₁-Expression wurde, wie in der sensitiven Zelllinie, bei niedrigen Daunorubicin-Konzentrationen nicht verändert (siehe Abbildung 33). Bei der höchsten Konzentration (1 µg/ml) zeigte der resistente Abkömmling eine Induktion um das 2fache des Ausgangswertes.

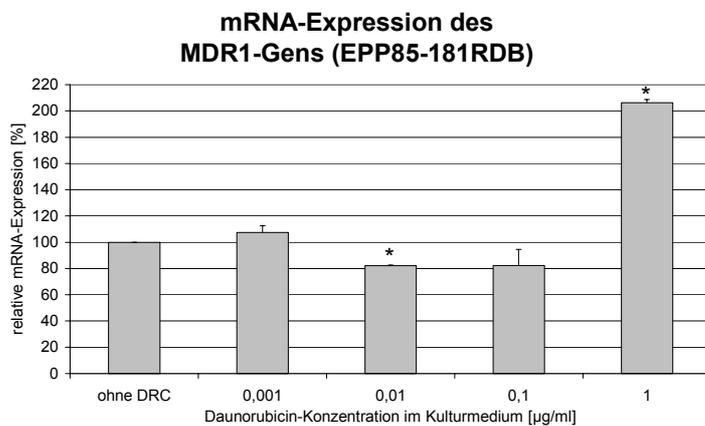


Abbildung 33: m-RNA-Expression des MDR₁-Gens im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB).

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen n = 2-4. *:p<0,05. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

In diesen Tumorzellen ist das MDR₁-Gen an einer Resistenzentstehung vermutlich erst bei sehr hohen Daunorubicin-Konzentrationen beteiligt. Bei niedrigen Konzentrationen müssen andere Resistenzfaktoren die Zellen vor dem Zytostatikum schützen.

Einer dieser Resistenzmechanismen, der bei niedrigen Daunorubicin-Konzentrationen denkbar wäre, könnte das „multidrug-resistance-related protein“ (MRP) sein. Bei einer Konzentration von 0,001 µg/ml zeigte es in diesen Zellen eine Induktion um das 2fache des Ausgangswertes (siehe Abbildung 34). Wurde die Daunorubicin-Menge im Kulturmedium erhöht, so sank die mRNA-Expression wieder auf den Level des Wertes ohne Daunorubicin-Zusatz.

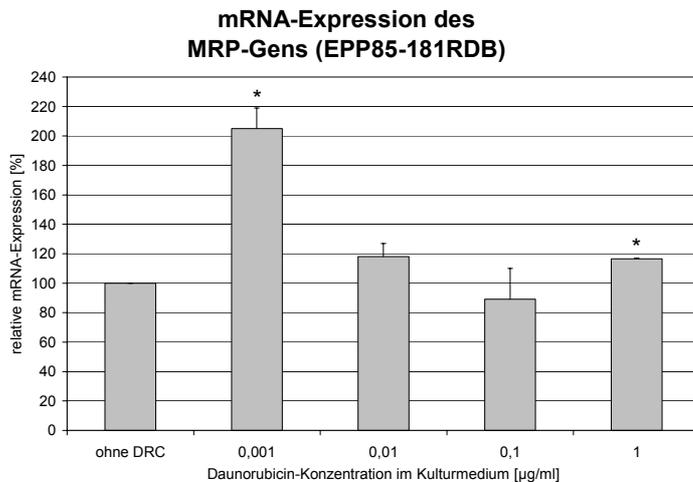


Abbildung 34: m-RNA-Expression des *MRP*-Gens im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. *: $p < 0,05$. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Es scheint so, als sei in den resistenten Pankreaskarzinom-Zellen das MRP ein wichtiger Resistenzmechanismus bei niedriger Daunorubicin-Menge und eher von untergeordneter Bedeutung bei hohen Daunorubicin-Zusatz.

Wie schon in den sensitiven Pankreaskarzinom-Zellen wurde das LRP auch in dem resistenten Abkömmling exprimiert. Doch im Unterschied zu den sensitiven Zellen unterliegt das LRP in dem resistenten Abkömmling einer leichten Induktion, wenn Daunorubicin dem Kulturmedium hinzugefügt wurde (siehe Abbildung 35). Die stärkste Induktion lag bei einer Konzentration von 0,1 und 1 µg/ml. Dort stieg die mRNA-Expression je um das 1,3fache das Ausgangswertes.

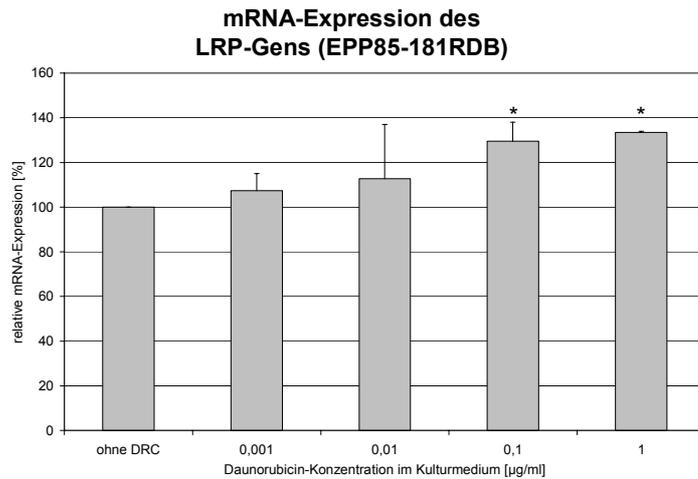


Abbildung 35: m-RNA-Expression des *LRP*-Gens im resistenten Pankreaskarzinom (EPP85-181RDB). Die Zellen wurden über 72 Stunden mit unterschiedlichen Daunorubicin-Konzentrationen im Kulturmedium inkubiert. Die mRNA-Expression ohne DRC wurde gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen Anzahl der Bestimmungen $n = 2-4$. *: $p < 0,05$. Abkürzungen: DRC = Daunorubicin

Eine Induktion des *LRP*-Gens könnte im Laufe einer Chemotherapie zu einer Resistenz beitragen.

5 DISKUSSION

Die Zytostatikaresistenz maligner Tumoren ist als klinisches Hauptproblem der zytostatischen Chemotherapie anzusehen. Selbst bei primär gegen die Chemotherapie empfindlichen Tumoren kann es im Verlauf der Behandlung zu einer Resistenzentwicklung kommen, welche die Durchführung einer kurativen Therapie unmöglich werden lässt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch weitere Untersuchungen des zytosolischen Daunorubicin-Metabolismus, Expressionsmessungen der möglichen Daunorubicin-Reduktasen und Klärung der Beteiligung „klassischer“ Resistenzmechanismen an der Daunorubicin-Resistenz einen Beitrag zur Lösung dieses Problems zu leisten.

5.1 Zytosolischer Daunorubicin-Metabolismus

Maligne Tumorzellen bedienen sich vielfältiger Resistenzmechanismen, die eine erfolgreiche Chemotherapie verhindern können. Neben der Überexpression von Transportproteinen wie Glykoprotein P-170 oder MRP existieren eine Reihe weiterer Resistenzmechanismen. Eine Möglichkeit besteht in der Überexpression von detoxifizierenden Enzyme, die an der Entgiftung der Zytostatika beteiligt sind (Dietel und Seidel, 1990; Deffie et al., 1988; Gessner et al., 1990; Volm et al., 1992).

Ob es sich bei der Reduktion des Anthrazyklins Daunorubicin zum korrespondierenden Alkohol Daunorubicinol um eine Toxifizierungs- oder Detoxifizierungsreaktion handelt, wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. Zunächst war man der Auffassung, dass die Reduktion eine Verstärkung der toxischen Wirkung darstellte (Felsted und Bachur, 1982; Gola, 1979; Greene et al., 1972; Cusack et al., 1993). Aufgrund neuerer Daten geht man heute jedoch allgemein davon aus, dass es sich eindeutig um eine Detoxifizierung handelt (Gonzalez et al., 1995; Kuffel et al., 1992; Schott und Robert, 1989)

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung des Daunorubicin-Metabolismus in den verschiedenen Tumorzellen auf die zytosolische Fraktion beschränkt. Grund

dieser Einschränkung waren die Untersuchungen von Bachur und Gee (1971), die in Rattengewebe zeigten, dass der Metabolismus von Daunorubicin fast ausschließlich im Zytosol stattfindet. Auch eine Reihe anderer Arbeitsgruppen bestätigten diese Untersuchungen (Loveless et al., 1978; Felsted und Bachur, 1982; Maser, 1995; Soldan et al., 1996)

Der zytosolische Metabolismus von Daunorubicin zum 13-Hydroxy-Metaboliten Daunorubicinol konnte in allen drei untersuchten Tumor-Zelllinien nachgewiesen werden. Daunorubicinol war in allen Zelllinien der einzig nachweisbare Metabolit. Andere mögliche Metabolite, wie z.B. die Aglykone von Daunorubicin oder Daunorubicinol (siehe 1.3.3), wurden nicht nachgewiesen.

Vergleicht man den Daunorubicin-Metabolismus der drei untersuchten Zelllinien ohne vorherigen Daunorubicin-Kontakt, zeigte sich, dass das Maligne Melanom und das Ovarialkarzinom fast identische Werte besitzen. Auch die maximale Daunorubicin-Konzentration, die über 72 Stunden toleriert wurde, war in beiden Zelllinien gleich. Doch unterschieden sich beide Zelllinien hinsichtlich ihrer Möglichkeit, Daunorubicin-Reduktasen nach Kontakt mit Daunorubicin zu exprimieren.

Das Maligne Melanom verdoppelt die Daunorubicin-Reduktion bei höheren Zytostatika-Konzentrationen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Tumorzellen die Induktion von Daunorubicin-Reduktasen als eine wichtige Detoxifikationsmöglichkeit nutzen.

Für die Ovarialkarzinom-Zellen scheint der Daunorubicin-Metabolismus nicht besonders wichtig hinsichtlich des Schutzes vor diesem Zytostatikum zu sein, denn die Daunorubicin-Reduktion erhöhte sich nur leicht (1,3fach) und war bei höheren Daunorubicin-Konzentrationen unterhalb des Ausgangswertes.

Das Mammakarzinom besaß eine Grundaktivität, die bei der Hälfte der beiden anderen untersuchten Tumor-Zelllinien lag. Sie war identisch mit den Ergebnissen von Soldan et al. (1996), der den Daunorubicin-Metabolismus in sensitiven und resistenten Pankreaskarzinom-Zellen untersuchte. Ausgehend

von diesen ähnlichen Grundaktivitäten, konnte man eventuell auch eine vergleichbare Steigerung des Daunorubicin-Metabolismus erwarten. Doch konnte im Gegensatz zu den Pankreaskarzinom-Zellen nur eine mäßige Induktion um das 1,4fache beobachtet werden. Auch in der Mammakarzinom-Zelllinie scheinen andere, für diese Zellart wichtigere Resistenzmechanismen zu existieren. Auffällig war nämlich die große Überlebensfähigkeit der Zellen. Auch bei sehr hohen Daunorubicin-Konzentrationen konnten die Zellen überleben, obwohl bei diesen Konzentrationen ein Rückgang der Daunorubicin-Reduktion zu beobachten war. Diese Ergebnisse sprechen für sehr potente Resistenzmechanismen in diesen Tumorzellen.

Abschließend kann man sagen, dass die Höhe der Grundaktivität keinen Hinweis darauf gibt, ob sich der Daunorubicin-Metabolismus in Tumorzellen durch Daunorubicin-Inkubation noch steigern lässt. Das Maligne Melanom, das schon per se eine relativ hohe Aktivität zeigte, konnte diese nochmals um das Doppelte nach Daunorubicin-Kontakt steigern. Das Ovarialkarzinom hingegen bietet bei gleicher Grundaktivität keine wesentliche Steigerung der Daunorubicin-Reduktion. Und auch das Mammakarzinom steigert den Daunorubicin-Metabolismus nach simulierter Chemotherapie nur minimal, obwohl hier die Grundaktivität im Vergleich zu den beiden anderen relativ gering war.

Weiterhin lässt sich feststellen, dass der Metabolismus von Daunorubicin ubiquitär in vielen verschiedenen Tumorzellen stattfindet. Auch eine Induktion - in manchen Zellen zwar nur sehr gering - konnte in allen bisher untersuchten Zelllinien gefunden werden. Doch lässt sich kein gemeinsames, allgemeingültiges Phänomen beobachten.

5.2 mRNA-Expression der Daunorubicin-Reduktasen

In der Literatur sind mehrere Reduktasen beschrieben, die Daunorubicin zum 13-Hydroxy-Metaboliten Daunorubicinol reduzieren können. Hierzu zählen die Carbonyl Reduktase (EC 1.1.1.184) aus der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (Feldstedt und Bachur, 1980), die Aldehyd

Reduktase (EC 1.1.1.2), das Isoenzym 2 der Dihydrodiol Dehydrogenase (EC 1.3.1.20) und eventuell auch die Aldose Reduktase (EC 1.1.1.21), alle drei aus der Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (Ohara et al., 1995).

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war es nun, herauszufinden, welche der bekannten Daunorubicin-Reduktasen tatsächlich am Metabolismus von Daunorubicin in den Tumorzellen verantwortlich sind. Geeignet für diese Untersuchungen erschienen hier solche Tumorzellen, die schon auf enzymatischer Ebene eine Steigerung der Daunorubicin-Reduktion zeigten. In diesen Zellen ist davon auszugehen, dass auch die mRNA-Mengen der jeweiligen Reduktasen ansteigen und so der Messung mittels RT-PCR zugänglich sind.

In den untersuchten Tumor-Zelllinien kam deswegen das Maligne Melanom (MeWo) in Frage, da es eine fast 2fache Steigerung der Reduktion zeigte. In den beiden anderen Tumor-Zelllinien (EFO-21 und MCF-7) ließ sich keine wesentliche Steigerung nachweisen, so dass sie für diese Versuche ausschieden. Aus diesem Grund wurde auf Tumor-Zelllinien zurückgegriffen, bei denen aus früheren Untersuchungen bekannt war, dass sie nach Daunorubicin-Kontakt eine Steigerung der Reduktion zeigten. Dies waren eine sensitive und eine resistente Pankreaskarzinom- (Soldan et al., 1999) sowie eine Magenkarzinom-Zelllinie (Ax et al., 2000). Der sensitive, unbehandelte Pankreastumor zeigte eine Aktivitätssteigerung bis auf das 2 bis 3fache des Ausgangswertes. Der resistente Abkömmling, ein über Monate mit Daunorubicin behandelter Tumor, verdoppelte, ähnlich dem Malignen Melanom, seine Aktivität. Bei der Magenkarzinom-Zelllinie konnte eine Steigerung der Enzymaktivität sogar um das 8fache erreicht werden. Hierbei wurde die Aktivität nicht schon nach 72 Stunden sondern erst nach mehreren Monaten gemessen. In diesem Zeitraum wurden ständig steigende, subletale Daunorubicin-Konzentrationen und Verapamil zur Inhibition des Glykoproteins P-170 dem Kulturmedium zugefügt.

In ersten Versuchen sollte untersucht werden, welche der vier möglichen Daunorubicin-Reduktasen überhaupt in den Tumorzellen vorhanden sind.

Hierzu wurde die Expression der vier Reduktasen gemessen, ohne dass die Tumorzellen vorher mit Daunorubicin inkubiert wurden. Mit Ausnahme der Dihydrodiol Dehydrogenase, die im Malignen Melanom nicht nachgewiesen werden konnte, wurden alle getesteten Daunorubicin-Reduktasen in den untersuchten Tumorzellen exprimiert. Dies ist auch nicht weiter erstaunlich, da alle Reduktasen eine physiologische Funktion im Zellmetabolismus besitzen bzw. ein breites Substratspektrum aufweisen. Warum die Dihydrodiol Dehydrogenase im Malignen Melanom nicht exprimiert wurde, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Interessant erschien der Vergleich der Grundexpression beider Pankreaskarzinom-Zelllinien. Da der resistente Abkömmling schon einmal über einen längeren Zeitraum Kontakt mit Daunorubicin hatte, konnte man eventuell erwarten, dass das Spektrum der Reduktasen verschieden zu den sensitiven Zellen ist. Doch es zeigte sich keine vermehrte Expression einer bestimmten Daunorubicin-Reduktase. Alle vier untersuchten Reduktasen wurden in beiden Pankreaskarzinomen annähernd gleich exprimiert. Dies könnte daran liegen, dass die Tumorzellen ihre Genexpression nur kurzfristig ändern. Wenn die resistenten Pankreaskarzinom-Zellen länger keinen Kontakt mit Daunorubicin hatten, sehen sie keine Veranlassung, die Expression von Daunorubicin-Reduktasen aufrecht zu erhalten. Sie haben keinen Nutzen von einer verstärkten Expression, da das toxische Zytostatikum nicht vorhanden ist und so eine Zellschädigung bewirken könnte. Daher war es wichtig, die Expression der Reduktasen nach simulierter Chemotherapie erneut zu untersuchen.

Aber auch nach simulierter Chemotherapie waren die Änderungen der Expression der Daunorubicin-Reduktasen in der sensitiven und resistenten Pankreaskarzinom-Zelllinie vergleichbar. Die einzige Reduktase, die eine deutliche Steigerung in beiden Zelllinien zeigte, war die Carbonyl Reduktase. So konnte sowohl in der sensitiven als auch in der resistenten Zelllinie eine Steigerung um das 1,6fache gemessen werden. Diese Steigerung der Expression der Carbonyl Reduktase scheint somit in diesen beiden Tumorzellen ein wichtiger Mechanismus zum Schutze gegen Daunorubicin zu sein.

Dieses Resultat ist vergleichbar mit den Inhibitor-Studien von Soldan et al. (1996). Wurde Rutin als diagnostischer Inhibitor der Carbonyl Reduktase eingesetzt, zeigte sich sowohl in den sensitiven als auch in den resistenten Pankreaskarzinom-Zellen die stärkste Inhibition der Daunorubicin-Reduktion.

Auch in der Studie von Ohara et al. (1995), in der aufgereinigte Carbonyl Reduktase, Aldehyd Reduktase und Dihydrodiol Dehydrogenase mit Daunorubicin inkubiert wurden, besaß die Carbonyl Reduktase die bei weitem stärkste reduktive Aktivität. Die Aldehyd Reduktase und die Dihydrodiol Dehydrogenase wiesen dagegen niedrigere Aktivitäten auf, die etwa 10-20 Prozent der Carbonyl Reduktase-Aktivität entsprachen.

Weiterhin stehen die hier dargestellten Ergebnisse im Einklang mit denen von Gonzalez et al. (1995), die durch Überexpression einer klonierten Carbonyl Reduktase die Daunorubicin-Toxizität in einer Leukämie-Zelllinie um das 2- bis 3-fache reduzieren konnten.

Außerdem konnte nach Transfektion der Carbonyl Reduktase, der Aldose Reduktase und der Aldehyd Reduktase in eine Pankreaskarzinom-Zelllinie (Soldan et al., 1999) festgestellt werden, dass zwar jede der transfizierten Reduktasen die Zellen resistenter gegenüber Daunorubicin machte, aber die Carbonyl Reduktase den weit größten Effekt besaß.

In den resistenten Pankreaskarzinom-Zellen wurde neben der Carbonyl Reduktase eine weitere Reduktase verstärkt exprimiert. Die Dihydrodiol Dehydrogenase zeigte eine transiente Induktion bei der niedrigsten zugesetzten Daunorubicin-Konzentration um das 1,3fache, danach aber mit steigenden Daunorubicin-Konzentrationen einen starken Abfall der Expression. Vermutlich ist dieses Enzym empfindlich gegenüber höheren Daunorubicin-Konzentrationen.

Beim Maligne Melanom dagegen wurde keine Steigerung einer der vier getesteten Daunorubicin-Reduktasen gesehen, obwohl auf enzymatischer Ebene eine nahezu Verdopplung der Daunorubicin-Reduktion nach simulierter

Chemotherapie gemessen wurde. In dem Malignen Melanom ist die enzymatische Aktivität der Daunorubicin-Reduktion ohne vorherigen Daunorubicin-Kontakt im Vergleich zu den Pankreaskarzinom-Zellen doppelt so hoch, obwohl die Grundexpression der Aldehyd Reduktase, Aldose Reduktase und der Carbonyl Reduktase in beiden Zelllinien nahezu identisch sind. Die Expression der Dihydrodiol Dehydrogenase konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass in dem Malignen Melanom eine oder mehrere bisher unbekannte Daunorubicin-Reduktase/n für den forcierten Metabolismus des Zytostatikas verantwortlich ist/sind. Dadurch könnte eventuell auch erklärt werden, warum keine der vier bekannten Reduktasen verstärkt exprimiert wird. Diese unbekannte/n Daunorubicin-Reduktase/n könnte/n in diesen Tumorzellen zugesetztes Daunorubicin so effektiv metabolisieren, dass keine der bekannten Reduktasen benötigt wird und so keine Expressionssteigerung stattfindet.

In der zuletzt untersuchten Magenkarzinom-Zelllinie konnte eine Steigerung von drei Reduktasen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Daunorubicin-Reduktasen erfolgte bei dieser Zelllinie nicht schon nach einer Daunorubicin-Inkubationszeit von 72 Stunden, sondern von mehreren Monaten. Die Dihydrodiol Dehydrogenase und die Aldose Reduktase zeigten einen leichten Expressions-Anstieg um das 1,2fache, die Carbonyl Reduktase jedoch wurde wieder um das 1,6fache verstärkt exprimiert. Auch dieses Ergebnis unterstützt die oben genannte Vermutung, dass die Carbonyl Reduktase an der erworbenen Resistenz gegenüber Daunorubicin in bestimmten Zelllinien eine wichtige Rolle besitzt.

Abschließend kann man sagen, dass an dem Metabolismus von Daunorubicin wohl mehrere Reduktasen beteiligt sind. Von den bisher bekannten Daunorubicin-Reduktasen scheint die Carbonyl Reduktase den weit größten Anteil am forcierten Metabolismus zu besitzen. Die Aldehyd Reduktase, die Aldose Reduktase und die Dihydrodiol Dehydrogenase hingegen spielen wohl an der Resistenzentstehung gegen das Zytostatikum Daunorubicin eine untergeordnete Rolle.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse des Malignen Melanom, dass es noch mindestens eine weitere Reduktase geben muss, die die Fähigkeit besitzt, Daunorubicin zu reduzieren. Diese Tumor-Zelllinie scheint für weitere Studien interessant zu sein, weil hier die Möglichkeit besteht, eine neue Daunorubicin-Reduktase zu entdecken.

Die klinische Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist derzeit nicht eindeutig beurteilbar. Auf der einen Seite könnte man durch spezifische Inhibitoren der Daunorubicin-reduzierenden Enzyme die antineoplastische Potenz von Daunorubicin erhöhen. Dadurch könnten die Dosen des Zytostatikums, die der onkologische Patient während einer Chemotherapie verabreicht bekommt, verringert werden und so die allgemein gefürchteten Nebenwirkungen reduziert werden. Einen weiteren positiven Effekt ergäbe sich aus der Prävention der gefürchteten Kardiomyopathie, für die der reduktive Metabolit Daunorubicinol verantwortlich gemacht wird (Olson et al., 1988; Boucek et al., 1987). Auf der anderen Seite zeigen die Ergebnisse, dass der Metabolismus des Daunorubicins nicht einheitlich von einer Reduktase bewerkstelligt wird. Es scheint so, dass mehrere Enzyme an der Detoxifizierung von Daunorubicin beteiligt sind. Dies erschwert natürlich den klinischen Einsatz spezifischer Inhibitoren, da kein allgemeingültiges Therapieregime zur Verfügung steht.

5.3 Charakterisierung weiterer, „klassischer“ Resistenz-Mechanismen und Einfluss auf die Daunorubicin-Reduktion

Um die Daunorubicin-Reduktion als möglichen Resistenzmechanismus in den untersuchten Zelllinien in seiner Wichtigkeit einordnen zu können, wurden gleichzeitig die drei „klassischen“ Resistenzmechanismen MDR₁, MRP und LRP gemessen. Eine niedrige Expression dieser Resistenzmechanismen könnte nämlich bedeuten, dass Tumorzellen sich andere, bisher weniger untersuchte Mechanismen zu nutze machen.

Obwohl weder die genaue Funktion noch das physiologische Substrat für das Glykoprotein P-170, das Proteinprodukt des *MDR₁*-Gens, bekannt sind, weiß man inzwischen, dass es sich bei diesem Protein um ein membranständiges Transportsystem handelt, das unter ATP-Verbrauch und gegen einen Konzentrationsgradienten Zytostatika aus der Zelle herausspumpt und diese so vor den zellschädigenden Eigenschaften der Chemotherapeutika schützt (Dano, 1973; Juliano und Ling, 1976; Inaba und Sakurai, 1979).

In ersten Versuchen sollte überprüft werden, welche Resistenzmechanismen in den Zellen per se exprimiert werden. Hierzu wurde die Expression von *MDR₁* ohne vorherigen Daunorubicin-Zusatz zum Kulturmedium gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das sensible als auch das resistente Pankreaskarzinom eine *MDR₁*-Expression aufwies. Dies wurde bereits in den Studien von Soldan et al. (1996) beschrieben. Doch anders als erwartet, konnte kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden, wenn sie ohne Daunorubicin-Zusatz kultiviert wurden. Auch nach simulierter Chemotherapie entsprachen sich in etwa beide Pankreaskarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer *MDR₁*-Expression. Dies könnte zum einen bedeuten, dass in dem resistenten Abkömmling weitere Resistenzmechanismen existieren, die die Zellen widerstandsfähiger gegen Daunorubicin machen. Zum anderen könnte in den sensitiven Zellen durch posttranskriptionelle Modifikation die Menge an tatsächlich produzierten Membranpumpen geringer sein als in den resistenten Abkömmlingen. Das bedeutet, dass zwar in beiden Zelllinien die gleiche Menge an mRNA gebildet wird, aber durch posttranskriptionelle Modifikation in dem sensitiven Karzinom weniger Protein translatiert wird. Diese These wird durch die Ergebnisse von Dietel et al. (1990) bestärkt, der nur in dem resistenten Abkömmling immunologisch die Existenz des Glykoproteins P-170 nachweisen konnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass in beiden Zelllinien zwar die gleiche Menge an Glykoprotein P-170 gebildet wird, aber in den sensitiven Zellen ein Teil dieser Transporter funktionsuntüchtig ist und erst im Laufe der Resistenzenstehung aktiviert wird.

Auch in der Melanom-Zelllinie konnte man eine MDR_1 -Expression nachweisen. Die Expression ohne vorherigen Daunorubicin-Zusatz war im Vergleich zu den beiden Pankreaskarzinomen etwas höher. Nach simulierter Chemotherapie konnte schon bei niedrigen Daunorubicin-Konzentrationen eine Expressionssteigerung des MDR_1 -Gens beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression des MDR_1 -Gens bzw. dessen Produkt P-Glykoprotein P-170 ein wichtiger Schutz gegen Daunorubicin zu sein scheint. Auch Goldstein et al. (1989) und Molinari et al. (1998) haben die Expression des MDR_1 -Gen in je drei menschlichen Melanomen gefunden. Ebenso Lemontt et al. (1988) beobachteten eine erhöhte MDR_1 -Gen-Expression in „multidrug“-resistenten Melanomzellen. Dagegen konnte in einer anderen Studie nur in 2 von 10 Melanom-Zelllinien eine MDR_1 -Gen-Expression nachgewiesen werden (Schadendorf et al., 1995).

Das MRP -Gen ist fern verwandt mit dem MDR_1 -Gen und wurde erstmals in einer „multidrug“-resistenten, humanen Lungenkrebs-Zelllinie nachgewiesen (Cole et al., 1992). Es gehört wie das Glykoprotein P-170 zu der Familie der ABC-Transportproteinen und ist mit einem breiten Substratspektrum an der Entstehung von Resistenzen gegen Zytostatika beteiligt. In vielen resistenten Tumor-Zelllinien, in denen keine Expressionssteigerung des MDR_1 -Gens nachgewiesen werden konnte, zeigten sich eine Amplifikation und Überexpression des MRP -Gens (Barrand et al., 1994; Schneider et al., 1994).

Über das Vorkommen des MRP -Gen in Pankreaskarzinomen ist in der Literatur nur wenig zu finden. In einer Studie von Nooter et al. (1995), in der die Expression des MRP -Gens in normalen Geweben und in Tumorzellen bestimmt wurde, konnten in normalen Pankreasgewebe niedrige Level an MRP -Expression gefunden werden. Die in dieser Studie untersuchten Pankreaskarzinomzellen exprimierten beide das MRP -Gen, auch ohne vorherigen Daunorubicin-Zusatz, auf gleichem Niveau. Hier müssen die gleichen Überlegungen wie schon beim MDR_1 -Gen gemacht werden. Entweder sind andere Resistenzmechanismen für die erhöhte Widerstandsfähigkeit des resistenten Abkömmlings verantwortlich, oder durch posttranskriptionelle

Modifikation bzw. durch funktionslose Transporter (siehe oben) wird bei dem sensitiven Karzinom die Funktion des MRPs als Resistenzschutz vermindert. Nach simulierter Chemotherapie verhalten sich die beiden Pankreaskarzinome etwas unterschiedlich hinsichtlich der MRP-Expression. Das sensitive Karzinom zeigt die stärkste Expression erst bei höherer Daunorubicin-Konzentration. Der resistente Abkömmling hingegen exprimiert das *MRP*-Gen schon bei niedrigen Daunorubicin-Zusatz. Da auch schon das *MDR*₁-Gen in dem sensitiven Pankreaskarzinom erst bei hohen Daunorubicin-Konzentrationen eine Steigerung erfährt, scheint es einen bisher unbekanntem, wichtigen Resistenzmechanismus bei niedrigeren Daunorubicin-Dosen zu geben.

Genauso wie in den beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte auch in der Melanom-Zelllinie eine MRP-Expression gesehen werden. Im direkten Vergleich mit den beiden Pankreaskarzinomen exprimierte das Maligne Melanom das *MRP*-Gen jedoch nur halb so stark, wenn dem Kulturmedium kein Daunorubicin zugesetzt wurde. Nach simulierter Chemotherapie konnte bei niedrigen Dosen ein Rückgang der MRP-Expression beobachtet werden. Bei sehr hohen Daunorubicin-Konzentrationen hingegen wurde die Expression beachtlich gesteigert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei niedrigem Daunorubicin-Zusatz die alleinige Steigerung der *MDR*₁-Expression zum Schutz ausreichend zu sein scheint. Erst bei sehr hohen Konzentrationen muss durch MRP-Expressionssteigerung ein weiterer Resistenzmechanismus die Tumorzellen schützen. Im Gegensatz zu Pankreaskarzinomen sind Maligne Melanome hinsichtlich ihrer MRP-Expression Gegenstand einiger Untersuchungen gewesen. So konnte Berger et al. (1997) in allen 40 untersuchten Melanom-Zelllinien eine Expression des *MRP*-Gens nachweisen. Auch in den Studien von Molinari et al. (1998) wurde in 3 von 3 Melanom-Zelllinien und in denen von Schadendorf et al. (1995) in 4 von 10 Melanom-Zelllinien die Expression des *MRP*-Gens mittels RT-PCR nachgewiesen. Diese Ergebnisse könnten die Tatsache erklären, warum Maligne Melanome oft mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden sind. Sehr viele Melanom-Zelllinien exprimieren nämlich das *MRP*-Gen und sind so einer zytostatischen Therapie schwer zugänglich.

Das LRP wurde erst 1983 von Scheper et al. entdeckt und zählt als vesikuläres Protein nicht zu den ABC-Transportern wie Glykoprotein P-170 und MRP. Obwohl zum jetzigen Zeitpunkt sowohl die physiologische Rolle als auch die Resistenzvermittlung unklar sind, ist ein kausaler Zusammenhang des LRP mit Zytostatikaresistenz in Tumorzellen bewiesen.

Im Vergleich zu dem sensitiven Pankreaskarzinom konnte in dem resistenten Abkömmling eine etwas stärkere Expression des *LRP*-Gens gemessen werden. Ob diese verstärkte Expression zu der erhöhten Resistenz gegenüber Daunorubicin beiträgt, ist nicht sicher zu beurteilen, aber doch möglich. Auch die Beobachtung, dass im sensitiven Karzinom die Expression nach simulierter Chemotherapie abnimmt, bei dem resistenten Karzinom jedoch gesteigert wird, spricht für die Relevanz des LRPs für den resistenten Abkömmling. Wie bedeutend die *LRP*-Expression für die Zytostatika-Resistenz in Pankreaskarzinomen ist, kann durch die wenigen Studien zur Zeit noch nicht endgültig abgeschätzt werden. In einer Studie von Izquierdo et al. (1996) konnte in 5 von 5 getesteten Pankreaskarzinomen eine hohe Expression des *LRP*-Gens nachgewiesen werden. Weitere Studien werden hier in der Zukunft neue Erkenntnisse bringen.

Das Maligne Melanom hingegen zeigte keine Expression des *LRP*-Gens. Auch nach simulierter Chemotherapie konnte keine Expression gemessen werden. Warum die Zellen keine Expression des *LRP*-Gens zeigten, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar und steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forschergruppen. So konnte von Schadendorf et al. (1995) in 10 von 10 untersuchten Melanom-Zelllinien die Expression des *LRP*-Gens mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Izquierdo et al. (1996) fanden durch immunhistochemische Methoden in 3 von 3 Melanom-Zelllinien eine Expression des *LRP*-Gens. Ein methodischer Fehler ist hier durch die Verwendung von Positiv-Kontrollen auszuschließen.

Zusammenfassend kann man sowohl für das sensitive und resistente Pankreaskarzinom als auch für das Maligne Melanom feststellen, dass eine Vielzahl von Resistenzmechanismen unterschiedlichster Art für eine

Daunorubicin-Resistenz verantwortlich sind. So konnte in allen Zelllinien eine Expression von MDR_1 und MRP, sowie der Daunorubicin-Reduktasen nachgewiesen werden. Nach simulierter Chemotherapie wurde die Expression dieser Gene noch weiter erhöht. Nur in dem Malignen Melanom konnte keine Expression des *LRP*-Gens nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind mit den schlechten Behandlungsmöglichkeiten und Prognose dieser Karzinome in der klinischen Praxis vereinbar. Das Vorhandensein vieler Resistenzfaktoren schon vor einer Chemotherapie bedeutet ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie. Werden diese aber im Laufe der Behandlung noch verstärkt exprimiert, erscheint die Chemotherapie der Karzinoms aussichtslos zu sein, was durch die niedrigen 5-Jahres-Überlebenszeiten der Patienten belegt ist. Auch die Suche nach neuen Therapieformen wird dadurch erschwert.

Weiterhin erscheint der Vergleich der beiden Pankreaskarzinome mit dem Malignen Melanom hinsichtlich der Daunorubicin-Reduktion und der „klassischen“ Resistenzmechanismen interessant.

Das Maligne Melanom zeigte nämlich eine erstaunlich hohe enzymatische Daunorubicin-Reduktion, selbst wenn es keinen Kontakt mit Daunorubicin gehabt hatte. Aber trotz dieser hohen Ausgangswerte verdoppelt sich der Daunorubicin-Metabolismus nach Inkubation mit Daunorubicin. Dies könnte bedeuten, dass in diesen Tumorzellen die Daunorubicin-Reduktion ein wichtiger Resistenzfaktor ist. Im Vergleich mit den Pankreaskarzinomen wird in den Melanom-Zellen nämlich ohne vorherige Daunorubicin-Inkubation kein LRP, MRP stark erniedrigt und das *MDR_1*-Gen nur etwas verstärkt exprimiert. Diese Resistenzfaktoren erniedrigen normalerweise die intrazelluläre Konzentration in Tumorzellen. In Zelllinien, in denen nun diese klassischen Faktoren per se niedrig exprimiert werden bzw. fehlen, wie z.B. im Malignen Melanom, müssen sich die Zellen durch andere Resistenzmechanismen vor Zytostatika schützen. Hier könnten bisher weniger untersuchte Faktoren, wie die Daunorubicin-Reduktion einen potenten Schutz darstellen.

In anderen Tumorzellen, wie z.B. in den Pankreaskarzinomen, die eine hohe Expression aller drei klassischen Resistenzmechanismen besitzen, ist die Reduktion des Anthrazyklins Daunorubicin nur ein Hilfsmechanismus bei höheren Daunorubicin-Konzentrationen. Bei diesen hohen Konzentrationen sind MDR₁, MRP und LRP eventuell so ausgelastet, dass die intrazelluläre Konzentration ansteigt und die Daunorubicin-Reduktion an Bedeutung gewinnt.

Diese Vermutungen lassen sich auch auf das Magenkarzinom übertragen. Bei der Resistenzentstehung des resistenten Abkömmlings spielen MDR₁, MRP und LRP keine Rolle, da sie entweder gar nicht oder nicht verstärkt exprimiert werden. Also müssen diese Zellen einen anderen Resistenzfaktor benutzen, um sich zu schützen. Auch hier scheint die Carbonyl Reduktion von Daunorubicin bedeutsam zu sein, da diese um das 6fache (Ax et al., 2000) und die Expression von drei der vier möglichen Daunorubicin-Reduktasen erhöht wurde (siehe Ergebnisse).

Abschließend lässt sich die These aufstellen, dass in Tumorzellen mit hoher Expression der drei klassischen Resistenzmechanismen MDR₁, MRP und LRP andere Faktoren unwichtiger erscheinen und eventuell nur „Hilfsmechanismen“ bei hohen Zytostatika-Konzentrationen sind. Bei Tumorzellen mit niedriger Expression von MDR₁, MRP und LRP sind andere Resistenzmechanismen, wie z.B. die in dieser Arbeit untersuchten Carbonyl Reduktion bedeutender. Diese sollten in der Zukunft weiter erforscht werden, um das weit verbreitete, klinische Problem der Zytostatikaresistenz zu verstehen und eventuell überwinden zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung maligner Tumoren durch Chemotherapeutika kann zu einem Problem werden, wenn Zellklone entstehen, die gegen die eingesetzten Zytostatika resistent sind. Bei gleichzeitigem Auftreten mehrerer Resistenzmechanismen in einem Tumor wird die Wirkung der Chemotherapie stark herabgesetzt oder sogar aufgehoben.

Ein wichtiger Grund dieser Zytostatika-Resistenz ist die Überexpression des Glykoproteins P-170. Dieses Produkt des *MDR1*-Gens transportiert viele strukturell unterschiedliche Zytostatika aus der Tumorzelle hinaus und verhindert dadurch die intrazellulär-vermittelte toxische Wirkung.

Neben diesem Mechanismus wurde in vielen resistenten Tumorzellen, die keine *MDR1*-vermittelte Resistenz zeigten, eine Amplifikation und Überexpression des *MRP*- oder *LRP*-Gens nachgewiesen. Das Produkt und die Funktion des *MRP*-Gens ist dem Glykoprotein P-170 sehr ähnlich. Es transportiert Konjugate von lipophilen Substanzen unter ATP-Verbrauch aus der Zelle hinaus oder in intrazelluläre Vesikel hinein. Die Resistenzvermittlung des *LRP* ist zur Zeit noch unklar. Bekannt ist, dass ein vermehrter nucleo-cytoplasmatischer Transport in Vesikeln stattfindet; ein kausaler Zusammenhang mit Zytostatika-Resistenz in Tumorzellen gilt als bewiesen.

Neben diesen „klassischen“ Resistenzmechanismen, die in der Literatur vielfach beschrieben wurden, gibt es auch noch „atypische“ Resistenzformen. Hierzu gehören u.a. metabolisch wirksame Enzyme, die nach verstärkter Expression in Tumorzellen die Zytostatika detoxifizieren und so zur Resistenzentstehung beitragen.

Soldan et al. (1996) konnte erstmals zeigen, dass eine Überexpression Carbonylgruppen-reduzierender Enzyme, welche das Anthracyclin Daunorubicin zu seinem weit weniger toxischen 13-Hydroxy-Metaboliten Daunorubicinol reduzieren, zu erhöhter Chemoresistenz führt. In der Literatur sind drei Enzyme beschrieben, die die Fähigkeit besitzen, Daunorubicin zu

reduzieren. Zu diesen Enzymen gehören die Carbonyl Reduktase (EC 1.1.1.184), die Aldehyd Reduktase (EC 1.1.1.2) und die Dihydrodiol Dehydrogenase (EC 1.3.1.20). Ein weiteres Enzym könnte die Aldose Reduktase (EC 1.1.1.21) sein, da diese zu der CHO-Reduktase, ein aus „chinese hamster ovary cells“ isolierten Enzym, eine große Identität besitzt. Diese CHO-Reduktase kann ebenfalls mit hoher Affinität Daunorubicin reduzieren.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, die Induktion des Daunorubicin-Metabolismus weiter zu untersuchen. Um sicherzustellen, dass dieses Phänomen nicht nur auf die von Soldan et al. untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinie beschränkt ist, wurde zuerst in drei weiteren Tumor-Zelllinien der zytosolische Daunorubicin-Metabolismus untersucht. Hierzu wurde mittels HPLC der Metabolit Daunorubicinol sowohl ohne vorheriger Daunorubicin-Inkubation als auch nach simulierter Chemotherapie mit subletalen Daunorubicin-Konzentrationen in den verschiedenen Tumorzellen gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Metabolismus von Daunorubicin ubiquitär in verschiedenen Tumorzelllinien stattfindet. Vorbehandlung mit Daunorubicin führte zu einer Induktion der Biotransformation in allen bisher untersuchten Zelllinien. Aufgrund der bisher geringen Anzahl untersuchter Karzinomzellarten lässt sich kein gemeinsames, allgemeingültiges Phänomen beschreiben.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, die in den Tumorzellen induzierten Enzyme auf mRNA-Ebene zu identifizieren und quantifizieren. Hierzu wurde die mRNA-Expression der vier Reduktasen mittels RT-PCR detektiert und densitometrisch quantifiziert. Von den bisher bekannten Daunorubicin-Reduktasen scheint die Carbonyl Reduktase eine wichtige Rolle zu spielen, da sie als einziges Enzym in verschiedenen Tumorzelllinien induziert wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, die ebenfalls eine Beteiligung der Carbonyl Reduktase am Daunorubicin-Metabolismus zeigten (Ohara et al., 1995; Gonzales et al., 1995; Soldan et al., 1996; 1999). Die Beobachtung, dass in einer Zelllinie (Malignes Melanom) eine Induktion auf enzymatischer Ebene stattfand, jedoch gleichzeitig keine mRNA-

Expressionssteigerung der bekannten Enzyme gemessen wurde, legt die Vermutung nahe, dass mindestens eine weitere, bisher unbekannte Daunorubicin-Reduktase existieren muss.

Um diese Änderung der Reduktasen-Expression beurteilen und in ihrer Wichtigkeit für eine Resistenzentstehung einordnen zu können, wurde in den Tumorzellen gleichzeitig die mRNA-Expression der drei „klassischen“ Resistenzmechanismen MDR₁, MRP und LRP mit derselben Methode bestimmt. In allen untersuchten Tumorzelllinien konnte eine Expression dieser drei Faktoren gefunden werden. Nur die Expression von LRP-RNA konnte in der Malignen Melanom Zellart nicht nachgewiesen werden. Einen Unterschied zwischen den Zelllinien gab es hinsichtlich der Expressionsmenge und der Induktionsstärke der „klassischen“ Resistenzfaktoren. Hier zeigte sich, dass in Zelllinien, in denen MDR₁, MRP und LRP niedrig exprimiert wurden bzw. fehlten, wie z.B. im Malignen Melanom, erstaunlicherweise der enzymatische Daunorubicin-Metabolismus verstärkt war.

Zusammenfassend lässt sich die These aufstellen, dass in Tumorzellen mit hoher Expression der drei klassischen Resistenzmechanismen MDR₁, MRP und LRP andere Resistenzfaktoren unwichtiger erscheinen und eventuell nur „Hilfsmechanismen“ bei hohen Zytostatika-Konzentrationen sind. Bei Tumorzellen mit niedriger Expression von MDR₁, MRP und LRP sind andere Resistenzmechanismen, wie z.B. die in dieser Arbeit untersuchten Carbonyl Reduktion bedeutender. Diese sollten in der Zukunft weiter erforscht werden, um das weit verbreitete, klinische Problem der Zytostatikaresistenz zu verstehen und eventuell überwinden zu können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Almquist K.C., Loe D.W., Hipfner D.R., Mackie J.E., Cole S., Deeley R.G., Characterization of the Mr 190000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. *Cancer Res.* **55**, 102-110 (1995)

Amitai Y., Bhooma T., Frischer H., Glucose-6-phosphate deficiency severely restricts the biotransformation of daunorubicin in human erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **127**, 588-598 (1996)

Ax W., Soldan M., Netter K.J., Maser E., Development of nonclassical multidrug resistance in tumor cells by induction of daunorubicin carbonyl reduction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355** (Suppl.), R19 (1997)

Bachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V., Anthracyclines antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol. Pharmacol.* **13**, 901-910 (1977)

Bae Y.S., Kawasaki I., Ideda H., Liu L.F., Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2076-2080 (1988)

Bajetta E., Di Leo A., Zampino M.G., Sertoli M.R., Comella G., Barduagni M., Giannotti B., Queirolo P., Tribbia G., Bernengo M.G., et al., Multicenter randomized trial of dacarbazine alone or in combination with different doses and schedules of interferon alpha-2a in the treatment of advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* **12**, 806-811 (1994)

Barrand M.A., Heppell-Parton A.C., Wright K.A., Rabbitts R.H., Twentyman P.R., A 190-kilodalton protein in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 110-117 (1994)

Bekhor I., Shi S., Carper D., Nishimura C., Unakar N.J., Relative abundance of aldose reductases mRNA in rat lens undergoing development of osmotic cataracts. *Curr. Eye Res.* **8**, 1299-1308 (1989)

Berger W., Hauptmann E., Elbling L., Vetterlein M., Kokoschka E.M., Micksche M., Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells. *Int. J. Cancer* **71**, 108-115 (1997)

Binstock J.M., Iyer R.B., Hamby C.V., Fried V.A., Schwartz I.S., Weinstein B.I., Southren A.L., Human hepatic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: Possible identity with human hepatic chlordecone reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 760-766 (1992)

Bodor N., Prokai L., Site- and stereospecific ocular drug delivery by sequential enzymatic bioactivation. *Pharm. Res.* **7**, 723-725 (1990)

Boring C.C., Squire T.S., Tong T., Cancer Statistics 1992. *CA* **1992** **41**,19 (1992)

Bos J.L., Fearon E.R., Hamilton S.R., Verlaan-de Vries M., van Boom J.H., van der Eb A.J., Vogelstein B., Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**,293-297 (1987)

Boucek R.J., Olson R.D., Brenner D.E., Ogunbummi E.M., Inui M., Fleischer S., The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. *J. Biol. Chem.* **262**, 15851-15856 (1987).

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)

Brill S.J., Sternglanz R., Transcription dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* **54**, 403-411 (1988)

Brisson-Noel A., Gicquel B., Lecossier D., Levy-Frebault V., Nassif X., Hance A.J., Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* **2**, 1069-1071 (1989)

Camaggi C.M., Comparsi R., Strocchi E., Testoni F., Angelelli B., Pannuti F., Epirubicin and doxorubicin comparative metabolism and pharmacokinetics. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **21**, 221-228 (1988)

Cersosimo R.J., Hong W.K., Epirubicin: A review of the pharmacology, clinical activity, and adverse effects of an adriamycin analogue. *J. Clin. Oncol.* **4**, 425-439 (1986)

Chang W.H., Reduced haloperidol: A factor in determining the therapeutic benefit of haloperidol treatment? *Psychopharmacology (Berlin)* **106**, 289-296 (1992)

Chien A., Edgar D.B., Trela J.M., Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557 (1976)

Christman M.F., Dietrich F.S., Fink G.R., Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerase I and II. *Cell* **55**, 413-425 (1988)

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-54 (1992)

Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R., Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 695-98 (1989)

Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., The multidrug resistance phenotype in human cancer. In: *Important Advances in Oncology* (Eds. DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., 19-38, Philadelphia (1991)

Coutelle C., Williams C., Handyside A., Hardy K., Winston R., Williamson R., Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *BJM* **299**, 22-24 (1989)

Cummings J., Stuart J.F., Calman K.C., Determination of adriamycin, adriamycinol and their 7-deoxyaglycones in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **311**, 125-133 (1984)

Cusack B.J., Mushlin P.S., Voulelis L.D., Li X., Boucek R.J., Olson R.D., Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role for daunorubicinol? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **118**, 177-185 (1993)

Dahgestani, A.N., Arlin Z.A., Leyland-Hones B., Gee T.S., Kempin S.J., Mertelsmann R., Budman D., Schulman P., Baratz R., Williams L., Clarkson B.D., Young C.W., Phase I and II clinical and pharmacological study of 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) in adult patients with acute leukemia. *Cancer Res.* **45**, 1408-1412 (1985)

Dano, K., Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **323**, 466-483 (1973)

Deffie A.M., Batra J.K., Goldenberg G.J., Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and –resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res.* **49**, 58-62 (1989)

Dietel M., Seidel A., Morphologic alterations in drug sensitive vs drug resistant cells due to cytostatic application. *Cancer Treat. Rev.* **17** (suppl. A), 3-10 (1990)

Drepper H., Kohler C.O., Bastian B., Breuninger H., Brocker E.B., Gohl J., Groth W., Hermanek P., Hohenberger W., Lippold A., et al., Benefit of elective node dissection in subgroups of melanoma patients – results of a multicenter study in 1616 patients. *Cancer* **72**, 741-749 (1993)

Farr C.J., Marshall C.J., Easty D.J., Wright N.A., Powell S.C., Paraskeva C., A study of ras gene mutations in colonic adenomas from familial polyposis coli patients. *Oncogene* **3**, 673-8 (1988)

Felsted R.L., Bachur N., Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab. Rev.* **11**,1-60 (1980)

Felsted R.L., Bachur N.R., Ketone reductases. In: *Enzymatic basis of detoxification*, Ed. W. B. Jackoby, Academic Press, New York, 281-293 (1980)

Flowers L., Bleczynski W.F., Burczynski M.E., Harvey R.G., Penning T.M., Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* **35**, 13664–13672 (1996)

Flynn T.G., Aldehyde reductases: Monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2705-2712 (1982)

Flynn T.G., Green N.C., The aldo-keto reductases: An overview. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* **4** (Eds. Weiner H., Crabb D.W., Flynn T.G.), 251-257, Plenum Press, New York (1993)

Fojo A., Lebo R., Shimizu N., Chin J.E., Roninson I.B., Merlino G.T., Gottesman M.M., Pastan I., Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **12** (1986)

Gallo R.C., Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* **234**, 194-198 (1971)

Garbe C., Chemotherapy and chemoimmunotherapy in disseminated malignant melanoma. *Melanoma Res.* **3**, 291-299 (1993)

Garbe C., Sonne und malignes Melanom. *Hautarzt* **43**, 251-257 (1992)

Garbe C., Thiess S., Nurnberger F., Ehlers G., Albrecht G., Lindlar F., Bertz J., Incidence and mortality of malignant melanoma in Berlin (West) from 1980 to 1986. *Acta. Derm. Venerol.* **71**, 506-511 (1991)

Gessner T., Vaughan L.A., Beehler B.C., Bartels C.J., Baker R.M., Elevated pentose cycle and glucuronyltransferase in daunorubicin-resistant P388 cells. *Cancer Res.* **50**, 3921-3927 (1990)

Glatt H.R., Vogel K., Bentley P., Oesch F., Reduction of benz(a)pyrene mutagenicity by dihydrodiol dehydrogenase. *Nature* **277**, 319-320 (1979)

Gola A., Daunorubicin reductase activity in leukemia leukocyte homogenates. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **27**, 815-818 (1979)

Goldstein L.J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S.-L., Gazdar A., Pirker R., Green A., Christ W., Brodeur G.M., Lieber M., Cossmann J., Gottesmann M.M.,

Pastan I., Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 116-124 (1989)

Gonzales B., Akman S., Doroshov J., Rivera H., Kaplan W.D., Forrest G.L., Protection against daunorubicin cytotoxicity by expression of a cloned human carbonyl reductase in K562 leukemia cells. *Cancer Res.* **55**, 4646-4650 (1995)

Green M.D. Lindblad A.S., Phase II trial in pancreatic cancer of triazinate (TZT), adrianyl benzoquinone (AZQ) and 4'epidoxorubicin (4'EPI). *Proc. ASCO* **5**, 87 (1986)

Greene D., The pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy and nephropathy. *Metabolism* **37**, 25-29 (1988)

Greene W., Huffman D., Wiernik P.H., Schimpff S., Benjamin R., Bachur N., High dose daunorubicin therapy for acute nonlymphocytic leukemia: correlation of response and toxicity with pharmacokinetics and intracellular daunorubicin reductase activity. *Cancer* **30**, 1419-1427 (1972)

Handa K., Sato S., Generation of free radicals of quinone group containing anticancer chemicals in NADPH-microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann.* **66**, 43-47 (1975).

Handyside A.H., Pattinson J.K., Penketh R.J., Delhanty J.D., Winston R.M., Tuddenham E.G., Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1**, 347-349 (1989)

Hankinson S.E., Colditz G.A., Hunter D.J., Spencer T.L., Rosner B., Stampfer M.J., A quantitative assessment of oral contraceptive use and risk of ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* **80**, 708-714 (1992)

Hara A., Hasebe K., Hayashibara M., Matsuura K., Nakayama T., Sawada H., Dihydrodiol dehydrogenases in guinea pig liver. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 4005–4012 (1986)

Harousseau J.L., Idarubicin in the treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Cancer Treat. Rep.* **71**, 991-992 (1987)

Hart C., Schochetman G., Spira T., Lifson A., Moore J., Galphin J., Sninsky J., Ou C.Y., Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. *Lancet* **2**, 596-599 (1988)

Hayes J.D., Judah D.J., Neal G.E., Resistance to aflatoxin B₁ is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. *Cancer Res.* **53**, 3887-3894 (1993)

Hermans J.J.R., Thijssen H.H.W., Stereoselective acetyl side chain reduction of warfarin and analogs. Partial characterization of two cytosolic carbonyl reductases. *Drug Metab. Dispos.* **20**, 268-274 (1992)

Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A., DNA typing from single hairs. *Nature* **332**, 543-546 (1988)

Higuchi T., Imamura Y., Otagiri M., Kinetic studies on the reduction of acetohexamide catalyzed by carbonyl reductase from rabbit kidney. *Biochem. Biophys. Acta.* **1158**, 23-28 (1993)

Holm C., Goto T., Wang J., Bolstein D., DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* **41**, 553-556 (1985)

Huffman D.H., Bachur N.R., Daunorubicin metabolism by human hematological components. *Cancer Res.* **32**, 600-605 (1972)

Hyndman D.J., Takenoshita R., Vera N.L., Pang C.P., Flynn TG, Cloning, sequencing, and enzymatic activity of an inducible aldo-keto reductase from chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 268-291 (1997)

Ikeda M., Ezaki M., Koikeguchi S., Ohmori S., Studies on NADPH-depent chloral hydrate reducing enzymes in rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1931-1939 (1981)

Imamura Y., Higuchi T., Nozaki Y., Sugino E., Hibino S., Otagiri M., Purification and properties of carbonyl reductase from rabbit kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 570-576 (1993)

Imamura Y., Nozaki Y., Higuchi T., Otagiri M., Reactivity for prostaglandins and inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs of rabbit liver befunolol reductase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **71**, 49-57 (1991)

Inaba M., Sakurai Y., Enhanced efflux of actinomycin D, vincristine, and vinblastine in adriamycin-resistant subline of P388 leukemia. *Cancer Lett.* **8**, 111-115 (1979)

Inoue S., Sharma R.C., Schimke R.T., Simoni R.D., Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase. *J. Biol. Chem.* **268**, 5894-5898 (1993)

Iwata N., Inazu N., Satoh T., The purification and properties of NADPH-dependent carbonyl reductases from rat ovary. *J. Biochem.* **105**, 556-564 (1989)

Iwata N., Inazu N., Satoh T., The purification and properties of aldose reductase from rat ovary. *Arch. Biochem. Biophys.* **282**, 70-77 (1990)

Iwata N., Inazu N., Takeo S., Satoh T., Carbonyl reductases from rat testis and vas deferens. Purification, properties and localization. *Eur. J. Biochem.* **193**, 75-81 (1990)

Izquierdo M.A., Prognostic significance of the drug resistance associated protein LRP in advanced ovarian carcinom. *Ann. Oncol.* **5** (suppl. 1), 98 (1994)

Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Giaccone G., Broxterman H.J., Meijer C.J.L.M., van der Valk P., Scheper R.J., Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *A.J.P.* **148**, 877-887 (1996)

Jarabak J., Harvey R.G., Studies on three reductases which have polycyclic aromatic hydrocarbon quinones as substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 294-301 (1993)

Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M., Penning T.M., Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**: 625-36 (1997)

Judah D.J., Hayes J.D., Yang J.-C., Lian L.-Y., Roberts G.C.K., Farmer P.B., Lamb J.H., Neal G.E., A novel aldehyde reductase with activity towards a metabolite of aflatoxin B₁ is expressed in rat liver during carcinogenesis and following the administration of an anti-oxidant. *Biochem. J.* **292**, 13-18 (1993)

Juliano R.L., Ling V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**, 152-162 (1976)

Keyes S.R., Hickman J.A., Sartorelli A.C., The effects of adriamycin in intracellular calcium concentrations of L1210 murine leukemia cells. *Eur. J. Clin. Oncol.* **23**, 295-302 (1987)

Kuffel M.J., Reid J.M., Ames M.M., Anthracyclines and their C-13 alcohol metabolites: growth inhibition and DNA damage following incubation with human tumor cells in culture, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 51-57 (1992)

Kwok S., Mack D.H., Mullis K.B., Poiesz B., Ehrlich G., Blair D., Friedman-Kien A., Sninsky J.J., Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virol.* **61**, 1690-1694 (1987)

Lau D.H., Lewis A.D., Ehsan M.N., Sikic B.I., Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res.* **51**, 5181-5187 (1991)

Leibovici J., Klein O., Wollman Y., Donin N., Mahlin T., Shinitzky M., Cell membrane fluidity and adriamycin retention in a tumor progression model of AKR lymphoma. *Biochem. Biophys. Acta.* **1281**, 182-188 (1996)

Lemonnt N., Azzaria M., Gros P., Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in multidrug-resistance human melanoma cells. *Cancer Res.* **48**, 6348-6353 (1988)

Lin R.S., Kessler I.I., A multifactorial model for pancreatic cancer in man. Epidemiologic evidence. *J. Am. Med. Assoc.* **245**, 147-152 (1981)

List A.F., Non-P-glycoprotein (PgP) mediated multidrug resistance (MDR): Identification of a novel drug resistance phenotype with prognostic relevance in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **82** (suppl. 1), 43a (1993)

Maser E., Legrum W., Alteration of the inhibitory effect of metyrapone by reduction to metyrapol during the metabolism of methacetin in vivo in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **331**, 283-289 (1985)

Maser E., Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 421-440 (1995)

Meienhofer J., Frei E., Selman A. Waksman, Conference on Actinomycins: their potential for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep.* **58**, 1-3 (1974)

Miller A.B., Epidemiological approaches to primary and secondary prevention of cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **117**, 177-185 (1991)

Milroy R., Cummings J., Kaye S.B., Banham S.W., Phase II clinical and pharmacological study of oral 4-demethoxydaunorubicin in advanced non-pretreated small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **20**, 75-77 (1987)

Molinari A., Calcabrini A., Meschini S., Stringaro A., Del Bufalo D., Cianfriglia M., Arancia G., Detection of P-glycoprotein in the golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells. *Int. J. Cancer* **75**, 885-893 (1998)

Moreland T.A., Hewick D.S., Studies on a ketone reductase in human and rat liver and kidney soluble fraction using warfarin as a substrate. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1953-1957 (1975)

Mullis K.B., Faloona F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350 (1987)

Myers C.L., Gianni L., Zweier J., Muindi J., Sinha B.K., Eliot H., Role of iron in adriamycin biochemistry. *Fed. Proc.* **45**, 2792-2797 (1986).

Nakazawa H., Andrews P.A., Callery P.S., Bachur N.R., Superoxide radical reactions with anthracycline antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 481-490 (1985)

Nooter K., Westerman A.M., Flens M.J., Zaman G.J.R., Scheper R.J., van Wingerden K.E., Burger H., Oostrum R., Boersma T., Sonneveld P., Gratama J.W., Kok T., Eggermont A.M.M., Bosman F.T., Stoter G., Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin. Canc. Res.* **1**, 1301-1310 (1995)

Oesch F., Glatt H.R., Vogel K., Siedel A., Plitrovic P., Platt K.L., In: *Biochemical Basis of Carcinogenesis* (Eds. Greim, H., Jung, R., Kramer, M., Marquardt, H. and Oesch, F.), 23–31, Raven Press, New York (1984)

Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura H., Hara A., Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 221-227 (1995)

Olson R.D., Boerth R.C., Gerber J.G., Nies A.S., Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress, *Life Sci.* **29**, 1393-1401 (1981)

Olson R.D., Mushlin P.S., Brenner D.E., Fleischer S., Cusack B.J., Chang B.K., Boucek R.J.(Jr), Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite doxorubicinol. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 3585-3589 (1988)

Omura G., Blessing J.A., Ehrlich C.E., Miller A., Yordan E., Creasman W.T., Homesley H.D., A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. *Cancer* **57**, 1725-1730 (1986)

Parazzine F., Franceschi S., La Vecchia C., Fasoli M., The epidemiology of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **43**, 9-23 (1991)

Parekh H.K., Sladek N.E., NADPH-dependent enzyme-catalyzed reduction of aldophosphamide, the pivotal metabolite of cyclophosphamide. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1043-1052 (1993)

Patel, D.J., Canuel L.L., Anthracycline antitumor antibiotic nucleic acid interactions. Structural aspects of the daunomycin-DNA complex in solution. *Eur. J. Biochem.* **90**, 247-254 (1978)

Penning T.M., Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **89**, 1-34 (1993)

Penning T.M., Mukharji I., Barrows S., Talalay P., Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochem. J.* **222**, 601–611 (1984)

Penning T.M., Ohnishi S.T., Ohnishi T., Harvey R. G., Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 84–92 (1996)

Penning T.M., Smithgall T.E., Askonas L.J., Sharp R.B., Rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* **47**, 221–247 (1986)

Phillips D.R., Crothers D.M., Kinetics and sequence specificity of drug-DNA interactions: an in vitro transcription assay. *Biochemistry* **25**, 7355-7362 (1986).

Phillips D.R., DiMarco A., Zunino F., The interaction of daunomycin with polydeoxynucleotides. *Eur. J. Biochem.* **85**, 487-492 (1978)

Phillips D.R., Greif P.C., Boston R.C., Daunomycin-DNA dissociation kinetics. *Mol. Pharmacol.* **33**, 225-230 (1988)

Pietruszko R., Chen F.F., Aldehyde reductase from rat liver is a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2721-2725 (1976)

Pigram W.J., Fuller W., Hamilton L.D., Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature New Biol.* **235**, 17-19 (1972)

Plezia P.M., Alberts D.S., McDonald L., McCloskey T., Peng Y.M., Oral idarubicin (I): Evaluation of food effects and consistency of absorption. *Clin. Pharm.* **43**, 161 (1988)

Powis G., Anthracycline metabolism and free radical formation. In: *Metabolism and action of anti-cancer drugs*, Powis G., Progh R.A. (eds.), Taylor, Francis, London, 211 (1987)

Preusser P., Achterrath W., Wilke H., Lenaz L., Fink U., Heinicke A., Meyer J., Bunte H., Chemotherapy of gastric cancer. *Cancer Treat. Rev.* **15**, 257-277 (1988)

Rekha G.K., Sreerama L., Sladek N.E., Intrinsic cellular resistance to oxazaphosphorines exhibited by a human colon carcinoma cell line expressing relatively large amounts of a class-3 aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1943-1952 (1994)

Rhoden W., Hasleton P., Brooks N., Anthracyclines and the heart. *Brit. Heart J.* **70**, 499-502 (1993)

Riordan J.R., Ling V., Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.* **254**, 12701-12705 (1979)

Roerig S., Fujimoto J.M., Wang R.I.H., Pollock S.H., Lange D., Preliminary characterization of enzymes for reduction of naloxone and naltrexone in rabbit and chicken liver. *Drug Metab. Dispos.* **4**, 53-58 (1976)

Roth M.S., Antin J.H., Bingham E.L., Ginsburg D., Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **74**, 882-885 (1989)

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988)

Sawada H., Hara A., Hayashibara M., Nakayama T., Guinea pig liver aromatic aldehyde-ketone reductases identical with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes. *J. Biochem.* **86**, 883-892 (1979)

Schadendorf D., Makki A., Stahr C., van Dyck A., Wanner R., Scheffer G.L., Flens M.J., Scheper R., Henz B.M., Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. *A.J.P.* **147**, 1545-1552 (1995)

Scheper R.J., Broxterman H.J., Scheffer G.L., Kaaijk P., Dalton W.S., van Heijningen T.H., van Kalken C.K., Slovak M.L., de Vries E.G., van der Valk P., et al, Overexpression of a M(r) 110.000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **53**, 1475-79 (1993)

Schieber A., Frank R.W., Ghisla S., Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase. *Eur. J. Biochem.* **206**, 491-501 (1992)

Schneider E., Horton J.K., Yang C.-H., Nakagawa M., Cowan K.H., Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced sensitivity of Topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res.* **54**, 152-58 (1994)

Schott B., Robert J., Comparative activity of anthracycline 13-dihydrometabolites against rat glioblastoma cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 4069-4074 (1989)

Sehested M., Skovsgaard T., van Deurs B., Winther-Nielsen H., Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil. *Br. J. Cancer* **56**, 747-751 (1987)

Sehested M., Skovsgaard T., Van Deurs B., Winter-Nielsen H., Increase in non-specific adsorptive endocytosis in anthracycline- and vinca alkaloid-resistant Ehrlich ascites tumor cell lines. *J.Natl. Cancer Inst.* **78**, 171-179 (1976)

Siegfried J.A., Kennedy K.A., Sartorelli A.C., Tritton T.R., The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 339-343 (1983)

Smithgall T.E., Harvey R.G., Penning, T. M., Regio- and stereospecificity of homogenous 3α -hydroxysteroid dehydrogenase for *trans*-dihydrodiol metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbony. *J. Biol. Chem.* **261**, 6184–6191 (1986)

Snapka R.M., Topoisomerase II inhibitors can selectively interfere with different stages of simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4221-4227 (1986)

Soldan M, Ax W, Plebuch M, Koch L, Maser E, Cytostatic drug resistance. Role of phase-I daunorubicin metabolism in cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 529-38 (1999)

Soldan M., Netter K.J., Maser E., Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.* **51**, 117-123 (1996)

Stolz A., Takikawa H., Sugiyama Y., Kuhlenkamp J., Kaplowitz N., 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the Y' bile acid binders in rat liver cytosol. Identification, kinetics, and physiologic significance. *J. Clin. Invest.* **79**, 427-434 (1987)

Stribling D., Armstrong F.M., Hardman M., Perkins C.M., Smith J.C., Aldose reductase in the etiology of diabetic complications: 4. Retinopathy. *J. Diabetic. Complications* **4**, 102-107 (1990)

Takeno H., Kohono K., Ono M., Uchida Y., Kuano M., Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res.* **51**, 2951-2957 (1991)

Torti F.M., Bristow M.M., Lum B.L., Carter S.K., Howes A.E., Aston D.A., Brown B.W., Hannigan J.F., Meyers F.J., Mitchell E.P., Billingham M.E., Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: Assessment by endomyocardial biopsy. *Cancer Res.* **46**, 3722-3727 (1986)

Trede M., Schwall G., Saeger H.D., Survival after pancreatoduodenectomy. *Ann. Surg.* **211**, 458-477 (1990)

Tritton T.R., Yee G., The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* **217**, 248-250 (1982)

Tsuro T., Circumvention of drug resistance with calcium channel blockers and monoclonal antibodies. *Cancer Treat. Res.* **48**, 73-95 (1989)

Tsuro T., Lida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y., Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **41**, 1967-1972 (1981)

Unverferth D.V., Magorien R.D., Leier C.V., Balcerzak S.P., Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat. Rev.* **9**: 149-64, 1982

Vogel K., Bentley P., Platt K.L., Oesch F., Rat liver cytoplasmic dihydrodiol dehydrogenase. Purification to apparent homogeneity and properties. *J. Biol. Chem.* **255**, 9621-9635 (1980)

Volm M., Mattern J., Efferth T., Pommerenke E.W., Expression of several resistance mechanisms in untreated human kidney and lung carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 1063-1067 (1992)

Waksman S.A., Woodruff H.B., Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil Actinomyces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **45**, 609 (1940)

Ward A., Clissold S.P., Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* **34**, 50-97 (1987)

Wassermann K., Markovits J., Jaxel C., Capranico G., Kohn K.W., Pommier Y., Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II, *Mol. Pharmacol.* **38**, 38-45 (1990)

Wermuth B., Aldo-keto reductases. In: *Enzymology of Carbonyl Metabolism: Aldehyde Dehydrogenase, Aldo/Keto Reductase, and Alcohol Dehydrogenase* (Eds. Flynn TG and Weiner H), 209-230, Alan R. Liss, New York (1985)

Wermuth B., Platt K.L., Seidel A., Oesch F., Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxification in man. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1277-1282 (1986)

Whittemore A.S., Wu M.L., Paffenbarger R.S. Jr, Sarles D.L., Kampert J.B., Grosser S., Jung D.L., Ballon S., Hendrickson M., Mohle-Boetani J., Epithelial ovarian cancer and the ability to conceive. *Cancer Res.* **49**, 4047-4052 (1989)

Whittington R., Dobelbower R.R., Mohiuddin M., Rosato F.E., Weiss S.M., Radiotherapy of unresectable pancreatic carcinoma: a six-year experience with 104 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **7**, 1639 (1981)

Wilke H., Preusser P., Fink U., Meyer H.J., Schmoll H.J., Stahl M., Seeber S., Modern therapeutic strategies in stomach cancer. *Z. Gastroenterol. Verh.* **26**, 217-218 (1991)

Wils J.A., Klein H.O., Wagener D.J., Bleiberg H., Reis H., Korsten F., Conroy T., Fickers M., Leyvraz S., Buyse M., et al., Sequential high-dose methotrexate and fluoruracil combined with doxorubicin – a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the european organization for research and treatment of cancer gastrointestinal tract cooperative group. *J. Clin. Oncol.* **9**, 827-831 (1991)

Wong C., Dowling C.E., Saiki R.K., Higuchi R.G., Erlich H.A., Kazazian H.H. Jr., Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* **330**, 384-386 (1987)

Wörner W., Oesch F., Identity of dihydrodiol dehydrogenase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat but not in rabbit liver cytosol. *FEBS Lett.* **170**, 263–267 (1984)

Yoshimura A., Kuwazuru Y., Sumizawa T., Ichikawa M., Ikeda S., Uda T., Akiyama S., Cytoplasmic orientation and two-domain structure of the multidrug transporter, p-glycoprotein, demonstrated with sequence-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **264**, 16282-16291 (1989)

Zhang J.T., Ling V., Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. *J. Biol. Chem.* **266**, 18224-18232 (1991)

8 ANHANG

8.1 Veröffentlichungen

Folgende Arbeiten wurden unter folgenden Titeln publiziert:

8.1.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Soldan M, Ax W, Plebuch M, Koch L, Maser E, Cytostatic drug resistance. Role of phase-I daunorubicin metabolism in cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 529-38 (1999)

Koch L, Maser E, Soldan M, Alterations in the expression of daunorubicin phase-I metabolising enzymes in different carcinoma cell lines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 545-51 (1999)

Ax W., Soldan M., Koch L., Maser E., Development of daunorubicin resistance in tumor cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 293-300 (2000)

8.1.2 Kongressbeiträge / Poster

Koch L., Maser E., Netter K.J., Soldan M., Alterations in the expression of daunorubicin reducing enzymes in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *6th European ISSX Meeting, Schweden* (1997)

Koch L., Maser E., Soldan M., Modification in the mRNA expression of phase-I-metabolising enzymes after simulated chemotherapy in vitro. *4th International Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Berlin* (1997)

Koch L., Maser E., Soldan M., Detoxification of the anthracycline daunorubicin via carbonyl reduction in different carcinoma cells after simulated chemotherapy in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, (Suppl.)* **357**, R11 (1998)

Soldan M., Ax W., Plebuch M., Koch L., Maser E., Cytostatic drug resistance: role of phase-I-daunorubicin metabolism in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, (Suppl.)* **357**, R131 (1998)

Koch L., Maser E., Soldan M., Alterations in the expression of daunorubicin-phase-I-metabolising enzymes in different carcinoma cell lines., *9th Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Italy* (1998)

Soldan M., Ax W., Plebuch M., Koch L., Maser E., Cytostatic drug resistance: role of phase-I-daunorubicin metabolism in cancer cells. *9th Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Italy* (1998)

Möller A., Maser E., Koch L., Soldan M., Alterations in the protein expression patterns of tumor cells after first exposition to daunorubicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, (Suppl.)* **395**, R13 (1999)

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Arnold, Basler, Baum, Beato, Daut, Engel, Fruhstorfer, Ganz, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Kälble, Kern, Klenk, Krieg, Lenartz, Netter, Oertel, Pohlen, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz, Seyberth, Steiniger, Thomas, Werner, von Wichert

8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen:

- Bei Prof. Dr. Edmund Maser für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotion in seiner Arbeitsgruppe.
- Bei Dr. Michael Soldan, der mich während dieser vier Jahre hervorragend betreut hat und in dem ich einen guten Freund gewonnen habe.
- Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Maser.
- Bei allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts.
- Bei der Alfred und Ursula Kulemann-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Forschungsarbeit.
- Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Sabine für das stets aufgebrachte Verständnis und das geduldige Ertragen zahlreicher, einsamer Stunden.