

**VERGLEICHENDE ANALYSE DER
EXPRESSION VON RESISTENZ-
PROTEINEN UND DEREN
FUNKTIONALITÄT AN MULTI-
ZELLULÄREN TUMORSPHÄROIDEN
UNTERSCHIEDLICHEN
URSPRUNGS**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

EDDA HOFFMANN

WVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

3-89687-695-3

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger

und

dem Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie

der Universität zu Köln

Betreuerin: PD Dr. M. Wartenberg

und

Betreuer: Prof. Dr. H. Sauer

Vergleichende Analyse der Expression von Resistenzproteinen und
deren Funktionalität an multizellulären Tumorsphäroiden
unterschiedlichen Ursprungs

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Edda Hoffmann

Tierärztin aus Bad Homburg vor der Höhe

Gießen 2004

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. R. Gerstberger

Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 12.08.2004

Für John

„Wollte man jemand auf das Blut pressen, dass er sagen sollte, was Geschwülste eigentlich seien, so glaube ich nicht, dass man irgendeinen lebenden Menschen finden würde, der in der Lage wäre, dies zu sagen“

(Virchow, 1863)

Inhaltsverzeichnis

- I-III Inhalt
IV-V Abkürzungen

1.	<u>Einleitung und Literaturübersicht</u>	1
1.1.	Kausale Pathogenese von Tumoren	2
1.2.	Das Resistenzproblem	3
1.3.	Das P-Glykoprotein (P-Gp)	4
1.3.1.	Physiologische Funktion des P-Glykoproteins	5
1.3.2.	Pharmakologie des P-Glykoproteins	7
1.4.	Das „Multidrug Resistance - associated Protein“ (MRP)	8
1.5.	Das „Lung Resistance – related Protein“ (LRP)	9
1.6.	Expression von Multidrug Resistance Proteinen - prognostische Faktoren	11
1.7.	Überwindung der Multidrug Resistance (MDR) durch revertierende Substanzen	12
1.8.	Das dreidimensionale Zellmodell – Multizelluläre Tumorsphäroide (MTS)	15
1.9.	Aufbau und Funktion der NADPH-Oxidase	19
1.9.1	Die Untereinheit gp91phox	20
1.9.2.	Funktionen von Nox1	21
1.10.	Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI)	22
1.11.	Enzyme und Antioxidantien	23
2.	<u>Aufgabenstellung</u>	25
3.	<u>Material und Methoden</u>	26
3.1.	Material	26
3.1.1.	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	26
3.1.2.	Zelllinien	27
3.1.2.1.	DU-145	27
3.1.2.2.	A-549	27
3.1.2.3.	DU-Nox	27
3.2.	Methoden	28
3.2.1.	Zellkultur	
3.2.1.1.	Adhäsive Kultur der Zellen als Monolayer	28
3.2.1.2.	Nicht-adhäsive Kultur der Zellen als MTS	28
3.2.1.3.	Enzymatische Dissoziation mit Trypsin / EDTA	28
3.2.2.	MDR Substrat	29
3.2.3.	MDR-revertierende Substanzen	30
3.2.4.	Sauerstoffradikalfänger	32
3.2.5.	Blocker der NADPH-Oxidase	33
3.2.6.	Konfokale Laserrastermikroskopie	34
3.2.7.	Wachstumsversuche	36
3.2.8.	Fluoreszenz-Immuncytochemie	36
3.2.8.1.	Primäre Antikörper	37

3.2.8.2. Sekundäre Antikörper	39
3.2.9. Molekularbiologische Techniken - Western Blotting	40
3.2.10. Physiologische Messungen	45
3.2.10.1. Efflux-Messungen	45
3.2.10.2. Efflux-Messungen mit revertierenden Substanzen	45
3.2.10.3. Messung der endogenen ROI-Produktion	46
3.2.10.4. Messung der endogenen ROI-Produktion unter Anwendung von spezifischen Blockern	46
3.2.11. Effekt von Sauerstoffradikalfängern auf die Expression von P-Gp und Hif-1 α	47
3.3. Statistik	47
4. Ergebnisse	48
4.1. Das Wachstumsverhalten von multizellulären Tumorsphäroiden (MTS) der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox	48
4.2. Expression des Proliferationsmarker Ki 67 in MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox	49
4.3. Das Expressionsmuster der Cytostatika-Transporter in MTS von DU-145, A-549 und DU-Nox	51
4.3.1. Expression von P-Gp in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox	51
4.3.2. Expression von MRP in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox	53
4.3.3. Expression von LRP in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox	55
4.3.4. Schematische Darstellung des Expressionsmuster der MDR-Proteine	57
4.3.5. Nachweis von P-Gp mittels Western Blot	57
4.4. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen	58
4.4.1. Zeitverlauf des Effluxes von Doxorubicin in DU-145 MTS	58
4.4.2. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie DU-145	59
4.4.3. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie A-549	62
4.4.4. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie DU-Nox	64
4.5. Vergleich der endogenen Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten in drei verschiedenen Zelllinien	65
4.5.1. Expression von gp91phox und Mox1	66
4.5.2. Funktionelle Untersuchungen zur endogenen ROI-Produktion in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox	68
4.6. Hemmung der endogenen ROI-Produktion in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox	71
4.7. Die Wirkung von Radikalfängern auf die Expression von P-Gp und Hif-1 α in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox	72
5. Diskussion	74
5.1. Wachstumsverhalten von unterschiedlichen Zelllinien	75
5.2. Die Expression von Multidrug-resistance Proteinen	76
5.3. Einfluss der Produktion von ROI auf die Expression von MDR-Proteinen	78
5.4. Einfluss von Antioxidantien	80

III

5.5.	Einsatz und Nutzen von revertierenden Substanzen	80
5.6.	Das Expressionsmuster von MDR-Proteinen und der Redox-Status als prognostische Faktoren	83
5.7.	MDR-Proteine, Chemotherapie und revertierende Substanzen in der Veterinärmedizin	85
5.8.	Ausblick	86
6.	<u>Zusammenfassung</u>	88
7.	<u>Summary</u>	90
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	91
9.	<u>Anhang</u>	103
9.1.	Firmenverzeichnis der verwendeten Materialien	103
9.2.	Geräte	104
10.	<u>Erklärung</u>	105
11.	<u>Im Rahmen der vorliegenden Dissertation veröffentlichte Arbeiten</u>	106
11.1.	Publizierter Abstract	
12.	<u>Danksagung</u>	107

Abkürzungen

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
A. bidest	destilliertes Wasser
AEBSF	4-(2-Aminoäthyl)-benzensulfonyl-fluorid-hydrochlorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ar	Argon
ATP	Adenosintrisphosphat
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
C	katalytische Untereinheit der PKA
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie
cMOAT	<i>Canicular multispecific organic anion transporter</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHO	Ovar des chinesischen Hamsters
DCF	Dichlorofluorescin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPI	Diphenylen iodonium
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GSH	Glutathion
H ₂ DCF	Dihydrodichlorofluorescin
H ₂ DCFDA	Dihydrodichlorofluorescin-diazetat
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
He	Helium
HEPES	N- (2-Hydroxymethyl)-N' - (2-äthansulfonsäure)
kDa	Kilo Dalton
LRP	<i>Lung resistance related protein</i>
MCS	<i>Multicellular spheroids</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>

MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i> = P-Glykoprotein
Mox1	= Nox1 <i>mitogenic oxidase</i>
MRP	<i>Multidrug resistance associated protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	Multizelluläre Tumorsphäroide
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Ne	Neon
Nox1	= Mox1 <i>mitogenic oxidase</i>
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBST	PBS und Triton X
PFA	Paraformaldehyd
P-Gp	<i>Permeability-related glycoprotein</i>
PKA	Proteinkinase A
PMT	Lichtverstärker-Röhren (<i>Photomultiplier tubes</i>)
PQA	Proteinquantifizierungs-Assay
Rac	Guanosintrisphosphat (GTP)-bindendes Protein
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	<i>Reactive oxygen intermediates</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS und Triton X
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung und Literaturübersicht

Krebserkrankungen sind nach den Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter in Deutschland. Zur Zeit stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Krankheit des Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Krebserkrankung.

Lungenkrebs ist für Männer in beiden Teilen Deutschlands mit einem Anteil von 26,5% (West) bzw. 27,6% (Ost) die bei weitem häufigste Krebstodesursache. Bei Frauen ist diese Krebsart mit Anteilen von 9,1 % (West) und 7,0 % (Ost) wesentlich seltener.

Krebs der Prostata ist nach Lungen- und Darmkrebs mit einem Anteil von 10,3 % im Westen die dritthäufigste und im Osten (nach Magenkrebs an dritter Stelle) mit einem Anteil von 8,2 % die vierthäufigste Krebstodesursache bei Männern (Deutscher Krebsatlas, 2002).

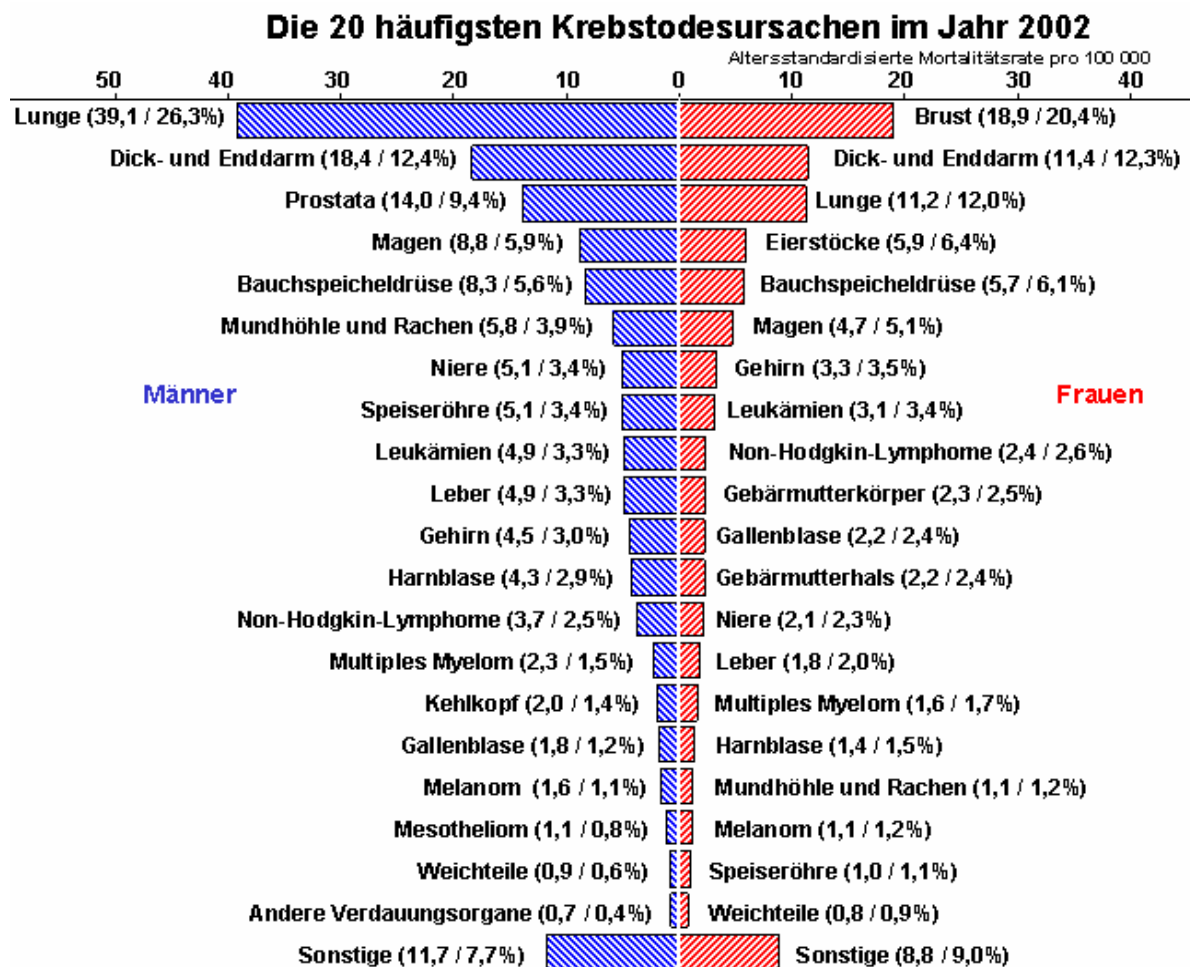


Abb. 1.1:

Mortalität der 20 häufigsten Krebserkrankungen im Jahr 2002. In Klammern Einteilung der Häufigkeit in den alten und neuen Bundesländern. Deutscher Krebsatlas, Internetseite Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (www.dkfz-heidelberg.de)

1.1. Kausale Pathogenese von Tumoren

Die meisten Tumoren entstehen durch primäre Zellteilung aus einer Mutterzelle, bei der z.B. aufgrund von Mutationen Protoonkogene inadäquat aktiviert werden und Tumorsuppressorgene sowie Differenzierungsgene inaktiviert werden, die auch das Entwicklungs- und Regenerationswachstum dirigieren. Dies erklärt, warum bei einem Tumor zum einen die Proliferation und das damit verbundene Gewebewachstum, zum anderen die Differenzierung und das daraus resultierende Gewebemuster dereguliert sind. Infolgedessen verändern sich die Tumorzellen, werden jedoch vom Immunsystem nicht als „fremd“ erkannt und eliminiert. Ist einmal ein Baustein aus dem ursprünglichen, chromosomalen Gefüge herausgebrochen, so folgen weitere Verluste an zellregulatorischer Information; die einmal chemisch, viral oder physikalisch eingeleitete Tumorigenese schreitet fort und nimmt Gestalt an. Chemische Karzinogene sind unter anderem polyzyklische aromatische oder halogenierte Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine und Mykotoxine. Viren wirken grundsätzlich über Mechanismen wie Insertionsmutagenese (z.B. DNS-Tumoviren), virale Onkogene, Apoptoseblockade und Immunsuppression auf die Tumorentstehung ein. Zu den physikalischen Auslösern der Tumorigenese gehören ionisierende Strahlung, ultraviolette Strahlen und – zumindest als Kokarzinogene – Fremdkörper. Außer diesen Faktoren erhöhen auch eine genetische Veranlagung, Ernährungs- und Genussfaktoren, hormonelle Faktoren und Umwelteinflüsse das Krebsrisiko.

Die entartete Zelle besitzt die Fähigkeit des autonomen und progressiven Wachstums, ist jedoch, was die Substratversorgung und auch den Abtransport von entstandenen Metaboliten angeht, auf das ursprüngliche Organ angewiesen. Der Stoffwechsel von Tumorzellen ist wesentlich höher als in anderen Zellen und von dem der Mutterzelle verschieden. Solange der Tumor in seinem ursprünglichem Gewebe verbleibt, ist er chirurgisch meistens noch relativ leicht zu entfernen. Ausnahmen für die komplikationslose Entfernung sind z.B. das Medulloblastom oder das kleinzellige Bronchialkarzinom. Entstehen durch Absiedelung von Tumorzellen Metastasen, vorwiegend bei malignen Tumorarten nachweisbar, so kann der Tumor sich im ganzen Körper ausbreiten und ist dann sehr schwer abzugrenzen.

1.2. Das Resistenzproblem

Im allgemeinen ist bekannt, dass Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, eine Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika/Chemotherapeutika besitzen, die sogenannte Resistenz. Diese schützt den Mikroorganismus vor Infektionen und Giften, verhindert somit aber auch häufig den Erfolg einer Therapie. Auch Tumorzellen besitzen Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika, die in den letzten Jahren zu einem zentralen Arbeitsgebiet der medizinischen Forschung geworden sind.

Unter anderem sind für die bakterielle Antibiotika-Resistenz ATP-bindende Kassettenproteine (ABC-Transporter) verantwortlich. Nicht nur die Ausschleusung des Antibiotikums aus der prokaryotischen Zellen, auch eine wachsende intrinsische Resistenz der eukaryotischen Körperzelle verhindert die Aufnahme von Antibiotika in den Körper und lässt Infektionskrankheiten unkontrollierbar werden (van Bambeke et al. 2000).

Chemotherapeutische Resistenz, die sich in Tumorzellen entwickelt, resultiert häufig aus der erhöhten Expression von spezifischen Resistenz-Proteinen. Solche Proteine sind unter anderem Zellmembran-Transporter, die zu einem erhöhten Efflux von cytotoxischen Substanzen aus der Tumorzelle führen und dadurch die intrazellulären Konzentrationen und Verweildauer spezifischer Cytostatika verringern. Neben der erworbenen Resistenz kommt bei manchen Tumorzellen auch eine intrinsische Resistenz vor. Diese Resistenz besteht schon vor dem Kontakt von Tumorzelle und Chemotherapeutikum (Fardel et al. 1996). Wei und Roepe (1994) versuchten die Ausbildung einer intrinsischen Resistenz durch extrazelluläres, saures pH-Milieu und hypertone Volumensituationen zu erklären. Ihre Ergebnisse könnten helfen zu erklären, warum solide Tumoren eine Cytostatika-Resistenz ausbilden, bevor eine Chemotherapie angewandt wird.

Bei Tumorzellen spricht man auch von einer sogenannten Vielfachresistenz oder Multidrug-resistance (MDR), weil hier nicht nur die Widerstandsfähigkeit gegenüber einer hohen Anzahl von eingesetzten Cytostatika besteht, sondern auch gegenüber einer nicht minderen Anzahl strukturell und funktionell sehr unterschiedlicher Substanzen. Verschiedene Mechanismen führen zur Entwicklung einer Multidrug-resistance, wie z. B. eine erniedrigte Aufnahme von Chemotherapeutika in die Zelle, die Aktivierung enttoxifizierender Enzyme, sowie apoptotische *pathways* (Gottesmann et al. 2002). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem

Ausmaß der Resistenz und der Anzahl detektierter Resistenzmechanismen im jeweiligen Tumor (Volm und Mattern, 1993). Die Entstehung der Multidrug-resistance mag multifaktoriell sein; die klassische Resistenz gegenüber cytotoxischen Substanzen ist am häufigsten mit der zellulären Überexpression von Adenosintrisphosphat abhängigen Transportern (ABC Transportern) verbunden. Diese Transporter werden auch Vielfachtransporter oder Multidrug-Transporter genannt. Der bekannteste unter ihnen ist das P-Glykoprotein.

1.3. P-Glykoprotein

Das P-Glykoprotein erhielt seinen Namen 1976 von Juliano und Ling, die eine veränderte Permeabilität der Zellmembran („permeability related protein“) an Cholchizin resistenten Zellen aus einer Zelllinie des Hamster Ovar-Karzinoms nachwies. Weiterhin konnten sie zeigen, dass der Resistenzgrad der Zellen mit der relativen Expression von P-Glykoprotein (P-Gp) korreliert.

P-Gp gehört zu der Familie der ABC-Transporter („**A**TP-**B**inding **C**assette“), zu der mehr als 200 Proteine zählen. Allen Mitgliedern gemein sind die Sequenz- und Strukturhomologien (Dean et al. 2001). P-Gp ist ein 170 kDa großes, ATP-abhängiges Membranprotein, welches als Efflux-Pumpe agiert. ATP-abhängig werden durch diese Pumpe eine hohe Anzahl amphiphiler, cytotoxischer Substanzen und Medikamente aus der Zelle hinaus transportiert (Gottesmann et al. 1993). Zu den ausgeschleusten Molekülen gehören nicht nur Chemotherapeutika wie die Antitumormedikamente, Anthrazykline, Vinca-Alkaloide oder Taxane, sondern auch immunsupprimierende Wirkstoffe wie Cyclosporin A (Saeki et al. 1993), das Herzglykosid Digoxin (Tanigawara et al. 1992), sowie Glukokortikoide wie Dexamethason (Ueda et al. 1992), aber auch Morphine (Callaghan & Riordan 1993), Antihelminthika wie Ivermektin und einige HIV-Protease-Inhibitoren (Washington et al. 2000). P-Gp unterdrückt eine intrazelluläre Akkumulation der cytotoxischen Substanzen durch aktiven Transport über die Zellmembran. Dieser kann gesättigt werden, ist osmotisch sensitiv, erfordert eine ATP-Hydrolyse und erzeugt einen Konzentrationsgradienten der Chemotherapeutika (Schlemmer & Sirotnak 1994). Das Protein scheint bifunktionell zu sein und nicht nur als Transporter sondern auch als Anionenkanal zu wirken (Valverde et al. 1992). Der exakte Mechanismus dieses unspezifischen Transporters konnte bisher noch nicht zufriedenstellend geklärt werden.

Die Transporter der ABC-Familie nutzen die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie, um aktiv verschiedenartige Moleküle durch die Zellmembran aus der Zelle zu transportieren. Für die ATP-Bindung und Hydrolyse sind zwei intrazelluläre Nukleotid-Bindungsdomänen verantwortlich, die auch mit dem unspezifischen Membrantransport der Substanzen zusammenhängen. Obwohl angenommen wird, dass die ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung bedingt, bleiben noch viele offene Fragen zur Natur und Anzahl der Substanz-Bindungsstellen (Sharom et al. 1999).

P-Gp ist das Produkt des *MDR1* Gens, ein Mitglied der *Multidrug-resistance* (MDR) Genfamilie. Beim Menschen sind auf Chromosom 7 zwei homologe Gene lokalisiert, *MDR1* und *MDR2*, die beide gut charakterisiert sind. Bei der Ausprägung einer MDR spielt jedoch nur das *MDR1* eine Rolle. P-Gp ist phosphoryliert und glykosiliert, besteht aus 1289 Aminosäuren und weist eine laterale, spiegelbildliche Symmetrie mit jeweils sechs hydrophoben Membrandurchgängen auf (Fardel et al. 1996)

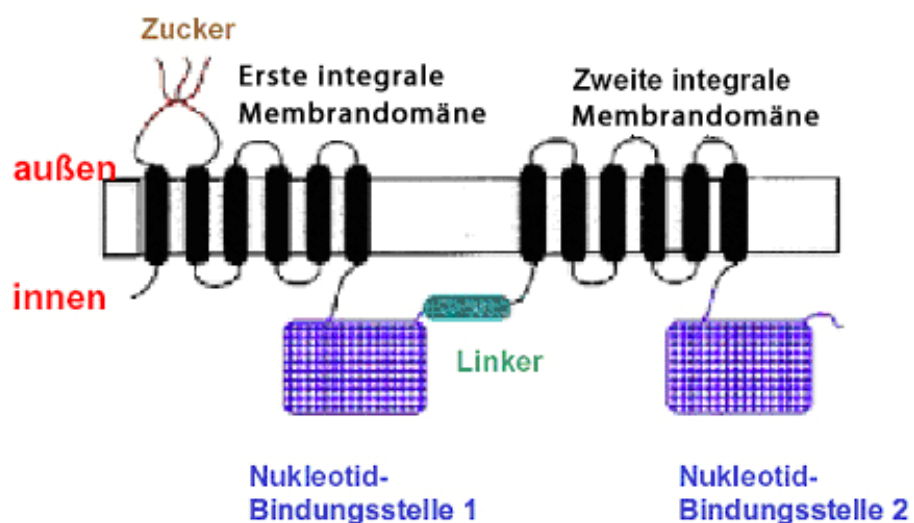


Abb.1.2:

Topologische Karte und Domänenorganisation des P-Glykoproteins. Das P-Glykoprotein besteht aus zwei identischen Hälften mit jeweils sechs transmembranen Domänen und einer Nukleotid (ATP)-Bindungsstelle, sowie einer flexiblen Bindungsstelle. Das Protein ist glykosiliert (Abbildung nach Higgins et al. 1997).

1.3.1. Physiologische Funktion von P-Glykoprotein

P-Gp findet sich nicht nur in der Zellmembran von Tumorzellen, sondern wird auch im gesunden Gewebe exprimiert. Seine physiologische Funktion liegt in Organen wie

Niere und Leber in der schnellen Exkretion von Fremdstoffen oder übernimmt, wie in Gehirn und Darmschleimhaut, die Protektion des Organismus oder dessen einzelner Kompartimente. Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über das Vorkommen von P-Gp im Körper.

Tab. 1.1:

Physiologische Funktionen von P-Gp im Körper, Paneitz A und Kroemer H, 2001, Internetseite (www.pharmazeutische-zeitung.de/pza/2001-16.htm)

Organ	Zelle	Funktion
Leber	Hepatozyt	Exkretion in den Gallengang
Niere	Tubulusepithelzellen der proximalen und distalen Tubuli	Teil der Sekretion in den Tubulus
Darmschleimhaut	Enterozyt	Exkretion zurück in das Darmlumen
ZNS: Blutgefäßsystem Plexus choroideus	Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke Epithelzelle	Exkretion zurück in das Blut

Das Vorhandensein von P-Gp in exkretorischen sowie im Bereich der klassisch pharmakologischen Barrieren schließt auf eine detoxifizierende Funktion.

P-Gp findet sich auch im Steroidhormon-produzierenden Gewebe. Seine Fähigkeit, Cortisol und andere Hormone zu transportieren, führte zur Annahme, dass P-Gp für die Sekretion dieser Hormone erforderlich ist (Gottesmann & Pastan 1993).

Die Involvierung von P-Gp im steroidal Hormontransport in Nebenniere, Uterus und in der Plazenta wurde von Wolf und Horwitz (1992) beschrieben. Interessanterweise wird das Hormon Progesteron von P-Gp nicht transportiert, sondern inhibiert das Protein (Yang et al. 1989, Ueda et al. 1992). P-Gp wird stark im adrenalen Cortex von Erwachsenen exprimiert; interessanterweise ist es jedoch nicht im fetalen und neonatalen adrenalen Gewebe nachzuweisen. Diese Beobachtung lässt auf eine enge Beziehung zur ontogenetischen Entwicklung der Nebenniere schließen (Sugawara 1990).

Intestinales P-Gp hat einen maßgeblichen Anteil am Schutz vor oral aufgenommenen Toxinen. Über einen direkten, aktiven Rücktransport durch die Darmwand, sowie eine reduzierte Rückaufnahme nach hepatobiliärer Exkretion führt es zu einer reduzierten Aufnahme eines Substrates. Ein Versuch von Sparreboom et al. (1997) unterstreicht die Funktion von P-Gp im Darm. An *knock-out* Mäusen für das *MDR*-Gen wurde im Vergleich zu Wildtypmäusen gezeigt, dass nach oraler Gabe des Cytostatikums Paclitaxel die Aufnahme ins Plasma um das Sechsfache erhöht war. Das Medikament wurde bei den Wildtypmäusen chemisch unverändert zu 90% fäkal ausgeschieden, bei den Mutanten lag die Exkretion bei 2%. Dies verdeutlicht die Verhinderung der Medikamentenaufnahme durch P-Gp bei den Wildtypmäusen.

P-Glykoprotein repräsentiert als endothelial exprimiertes Protein auch einen Bestandteil der Blut-Hirn Schranke. Versuche mit monoklonalen Antikörpern von Thiebaut et al. (1989) zeigten eine Expression in Kapillaren des Gehirns von Mensch und Ratte und in niedrigerem Ausmaß in den Endothelzellen der Testes. Es ist anzunehmen, dass das P-Gp hier den Eintritt von toxischen Substanzen aus dem Blut in das Gehirn limitiert, indem es einen aktiven Rücktransport von Substanzen in das Blut gewährleistet.

Neben der Schutzfunktion haben *MDR*-Transporter auch bedeutende metabolische Funktionen: z.B. *MDR3* für den Transport von Phospholipiden und *MRP1* für den Leukotrien-Transport (Drewe 2000).

1.3.2. Pharmakologie des P-Glykoprotein

Es gibt mehrere Hypothesen über den Wirkungsmechanismus der Multidrug-resistance. So vertreten Roepe et al. (1993) die Ansicht, dass kationische und/oder schwach basische und lipophile Substanzen schlechter in der Zelle akkumulieren, weil P-Gp den intrazellulären pH-Wert erhöht und das Membranpotential senkt. Durch den Versuch von Shapiro und Ling (1995) ist jedoch sicher, dass das P-Gp als Efflux-Pumpe für verschiedenste Substanzen agiert. Durch den Einbau des Moleküls in Liposomen als „*inside-out*“ Konfiguration wurde von ihnen gezeigt, dass unter Zugabe von ATP und Substrat eine Anreicherung des Substrates in den Liposomen erreicht wird.

1.4. Das „Multidrug-resistance – associated protein“ (MRP)

Ein weiteres Protein, welches verantwortlich für die Multidrug-resistance in Tumorzellen ist und ebenfalls zur ABC-Familie gehört, stellt das „Multidrug-resistance – associated Protein“ dar. Humanes MRP1 hat mindestens fünf Homologe (MRP 2-6), die alle zur Familie der MRP-Proteine gehören (Borst et al. 1999). Im Jahr 1992 bekam das Protein durch Susan Cole und Roger Deeley seinen Namen. Sie klonierten das Gen und nannten das Protein MRP1 (Cole et al. 1992). Die anderen Mitglieder der MRP-Familie wurden erst später gefunden, das letzte (MRP 6) 1998 (Kool et al. 1996).

Das MRP-Gen des humanen Genoms ist auf Chromosom 16 (genauer: 16p13.1) lokalisiert und kodiert für MRP, welches 190 kDa groß ist und in der Plasmamembran als Transmembran-Transporter zu finden ist (Krishnamachary & Center 1993).

Mit dem P-Glykoprotein hat MRP trotz ähnlicher Substrate nur geringe morphologische Ähnlichkeiten; auch die Transportmechanismen unterscheiden sich grundlegend voneinander. MRP transportiert Substrate nur aus der Zelle, wenn diese mit Glutathion konjugiert sind (van der Kolk et al. 1999). Ein Versuch von Renes et al. (1999) zeigt, dass MRP1 im direkten Vergleich zu P-Gp Substrate wie Vincristin und Daunorubicin nur in der Präsenz von Glutathion transportiert. P-Gp vermittelt eine MDR, die eine Kreuzresistenz gegenüber Taxol und Mitoxantron zeigt, wohingegen MRP eine sehr niedrige Kreuzresistenz zeigt (Cole et al. 1994). Die Substratspezifität von MRP gilt für amphiphile Anionen oder Glutathion-, Glucuronat- oder Sulfatkonjugierte Chemotherapeutika wie z.B. Anthrazyklin, Vinca-Alkaloide und Etoposide (Eijdemans et al. 1995, Jedlitschky et al. 1996).

Die physiologischen Funktionen rangieren - ähnlich wie bei P-Gp – von der Vermittlung einer Entzündungsantwort bis hin zur Elimination verschiedener Xenobiotika (Cole et al. 1994). MRP ist in gesundem Gewebe wie Niere, Nebenniere, Lunge, Pankreas, Muskel, Darm, Schilddrüse und Prostata zu finden (Sugawara et al. 1997). Neueste Studien belegen, dass schon sehr niedrige MRP- oder P-Gp – Expressionsniveaus in Fibroblasten einen verstärkten Effekt auf die Sensitivität gegenüber einer großen Anzahl klinisch wichtiger, cytotoxisch wirkender Medikamente haben. Auch eine sehr niedrige Expression von Transportern könnte somit Zellen vor Medikamenten „schützen“ (vgl. Wijnholds 2002).

Die klinische Relevanz dieses Proteins zeigt sich durch eine Studie von Lorico et al. (1996), die in Gen-knock-out Versuchen darstellt, dass eine erhöhte Expression von MRP zu einer eineinhalb- bis zweifachen intrinsischen Resistenz gegenüber relevanten antineoplastischen Substraten führt. MRP ist somit maßgeblich an der Ausbildung einer MDR beteiligt.

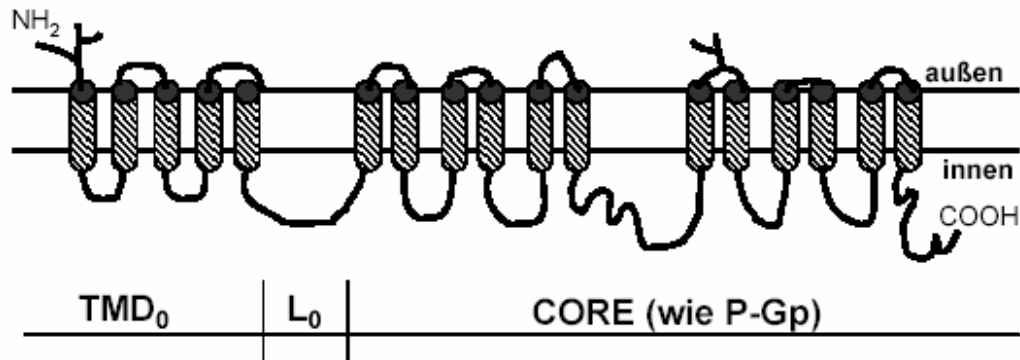


Abb. 1.3:

Modell der Membrantopologie für MRP1 (Bakos et. al 1998) – Die Struktur von MRP1 wird charakterisiert durch eine extra N-terminale Domäne mit fünf transmembranen Regionen (TMD₀), die durch einen cytoplasmatischen Linker (L₀) mit dem P-Gp ähnlichen CORE (Kern) verbunden wird.

1.5. Das „Lung resistance – related protein“ LRP

Das „Lung resistance – related protein“ (LRP) ist ein weiteres Protein, welches für die Ausbildung des MDR Phänotyps verantwortlich ist. Ganz im Gegensatz zu P-Gp stellt LRP jedoch kein ABC-Transporterprotein dar und wird unabhängig von P-Gp und MRP reguliert. Das für LRP kodierende Gen liegt zentromerisch zum MRP Gen und nahe des Gens der Proteinkinase C-β, auf Chromosom 16 (genauer: 16p11.2). Obwohl sich das LRP-Gen wie auch das MRP-Gen beide auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 befinden, werden sie normalerweise nicht koamplifiziert und nicht im gleichen Amplikon lokalisiert (Slovak et al. 1995). LRP wird auch als humanes *major vault protein* (MVP) bezeichnet, welches seinerseits 90% Sequenzhomologie mit dem MVP-α der Ratte aufweist (Scheffer et al. 1995).

„Vaults“ sind Proteine, die sogenannte „barrel-like“ (aus dem Englischen: Tonnenartige) Strukturen ausbilden. Sie bestehen aus einem mehrere Untereinheiten großen Ribonucleinprotein-Komplex, welcher in den Transport zwischen Nukleus und Cytoplasma der Zelle einbezogen ist. LRP ist entweder in unmittelbarer Nähe der Kernmembranporen oder in enger Verbindung mit Aktinfilamenten im Cytoplasma lokalisiert. Die Struktur und Lokalisation von vaults unterstützen eine Transport-

funktion für Partikel, die eine ganze Reihe von verschiedenen Substraten mit einbeziehen. Vaults könnten deshalb eine Rolle in der Ausbildung von MDR spielen, weil sie den nukleocytoplasmatischen Transport von Medikamenten regeln (Izquierdo et al. 1996). Eine schematische Darstellung eines Vaults zeigt Abbildung 1.4.

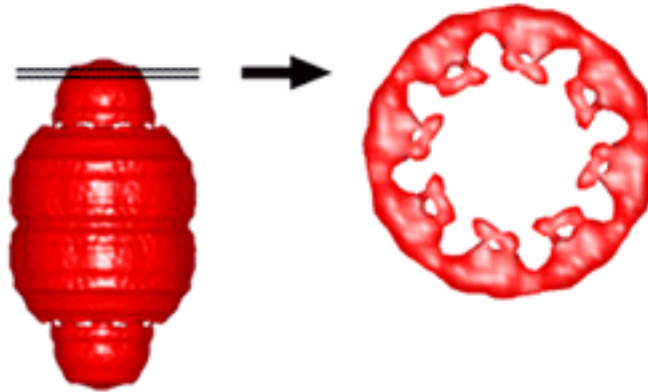


Abb.1.4:

Schematische Darstellung eines vaults, Internetseite (www.vaults.arc.ucla)

Das 110 kDa große LRP-Protein wird in MDR Tumorzelllinien exprimiert, die kaum P-Gp und MRP enthalten, und kann durch LRP56, einen monoklonalen Antikörper, immunocytochemisch nachgewiesen werden (Futscher et al. 1994; Scheper et al. 1993). Izquierdo et al. (1996) untersuchten 61 verschiedene humane Tumorzelllinien, von denen 78% LRP exprimierten. Das Protein trat in diesen Zelllinien entweder alleine oder mit anderen Resistenzproteinen auf. LRP könnte auch bei der Ausprägung einer intrinsischen Resistenz eine Rolle spielen, da es auch im tumorösen Gewebe von Menschen gefunden wird, die noch nicht chemotherapeutisch behandelt wurden. Dies bestätigt auch eine Untersuchung von Laurencot et al. (1997), die auf eine erhöhte LRP mRNA Expression in intrinsisch resistenten Tumor-Zelllinien hinweist.

Aber auch die sekundäre, therapieinduzierte Resistenz spielt bei LRP eine Rolle (Komarov et al. 1998). Eine Kurzzeit-Exponierung (16h) mit subtoxischen Konzentrationen von Daunomycin und Bleomycin in 16 verschiedenen NSCLC-Zelllinien erhöhte die Expression von LRP bis zu einem Vierfachen in 2/4 der Zelllinien (Berger et al. 2000).

Obwohl der erste direkte Hinweis auf eine kausale Beziehung zwischen der LRP-Expression und MDR gefunden wurde, müssen noch sehr viele funktionelle Aspekte von Vaults in der normalen Physiologie und auch bei der Ausbildung einer MDR geklärt werden (Scheffer et al. 2000).

1.6. Expression von MDR Proteinen – prognostische Faktoren

Alle drei MDR-Transporter sind an der Ausbildung des MDR-spezifischen Phänotyps beteiligt. Ihr Vorkommen und ihre Expressionsmuster unterscheiden sich jedoch bei zahlreichen Krebsarten und Zelllinien, sowie auch ihre Brauchbarkeit als prognostische Faktoren für den weiteren Verlauf einer Krebserkrankung und Chemotherapie. Bei vielen Krebserkrankungen bedeutet eine hohe Expression von P-Gp und somit ein schlechtes Ansprechen auf eine Chemotherapie eine schlechte Prognose. Als Beispiel dient hier eine Studie von Baekelandt et al. (2000), der bei 73 Patientinnen mit Ovarial-Krebs vor und nach dem Einsatz von Chemotherapeutika Tumorgewebe immunohistochemisch untersuchte. Das Vorhandensein von P-Gp bedeutete eine schlechte Prognose, wohingegen die P-Gp-negativen Fälle wesentlich besser auf eine Chemotherapie ansprachen. So werden auch bei anderen Krebserkrankungen mit hoher P-Gp Expression die Prognosen als negativ beschrieben, wie z.B. bei Blasenkrebs, Osteosarkomen und Leukämiezellen (Diestra et al. 2003, Pakos et al. 2003, Sauerbrey et al. 1998).

Andere Studien negieren die Möglichkeit, MDR-Proteine als prognostische Faktoren einzusetzen. Arts et al. (1999) beschreibt in seiner Studie einen positiven Krankheitsverlauf bei Expression des MDR-Proteins LRP. In seiner zentralen Aussage erklärt er, dass die Expression von P-Gp, MRP1, MRP2 und LRP eine Vorhersage für das Ansprechen und den weiteren Verlauf bei Patienten mit Ovarialkarzinomen nicht erlaubt.

Generell kann gesagt werden, dass P-Gp bisher am häufigsten untersucht und im Hinblick auf das Ansprechen einer Therapie als prognostischer Faktor am besten genutzt werden kann. Die Transportproteine MRP und LRP als prognostische Indikatoren für einen Krankheitsverlauf bzw. das Ansprechen auf eine bestimmte Chemotherapie zu nutzen, wird bisher noch kontrovers diskutiert. Zusammenfassend gilt jedoch, dass eine vermehrte Expression von verschiedenen Transportern und anderen negativen Faktoren, wie z.B. Glutathion-S-Transferase oder Topoisomerase II, eine höhere Resistenz provoziert und damit natürlich auch einen negativeren Krankheitsverlauf der Krebserkrankung bedingt. Auf jeden Fall hilft das Wissen über das Expressionsmuster der MDR-Proteine einer Krebsart dazu, eine Therapie mit einem bestimmten Chemotherapeutikum besser zu planen (Yeh et al. 2003).

1.7. Überwindung der MDR durch revertierende Substanzen

Wie schon beschrieben, sind alle drei MDR-Transporter in der Lage, sehr effektiv Liganden unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle zu transportieren und damit eine niedrige, intrazelluläre Ligandenkonzentration zu erhalten. Dieser Mechanismus verhindert den cytotoxischen Effekt, der doch bei der Chemotherapie erwünscht wäre.

Viele Liganden von P-Gp enthalten aromatische Gruppen, jedoch werden auch Moleküle mit zyklischen, linearen und nicht-aromatischen Komponenten transportiert. Meist scheint es von Vorteil zu sein, wenn die Liganden elektrisch neutral oder basisch sind, es werden jedoch auch Liganden mit negativer Ladung beschrieben. Die nachfolgende Tabelle 1.2 zeigt einen Überblick über die unterschiedlichen Stoffgruppen und Liganden, die durch P-Gp, MRP und LRP transportiert werden und in der Human-, und teilweise auch Veterinärmedizin, von Bedeutung sind.

Die Erkenntnis, dass mehrere Transportproteine für die Entwicklung einer MDR bei Neoplasien verantwortlich sind, führte zur Annahme, dass eine Hemmung dieser Proteine zur Überwindung der Resistenz führen könnte.

In den 80er Jahren wurden die ersten Substanzen gefunden, die in der Lage waren P-Gp Transporter zu modulieren, sprich seine Funktion als Multidrug-resistance Protein zu revidieren. Tsuruo et al. (1981) entdeckte, dass Verapamil in der Lage war, den Austransport von Vincristin aus der Zelle zu stoppen und damit die Sensitivität gegenüber diesem Medikament zu erhöhen. Weitere Substanzen waren Cyclosporin A, Tamoxifen und einige Calmodulin Antagonisten (Krishna et al. 2000). Der Wirkungsmechanismus ist nur für wenige der MDR-revertierenden Substanzen geklärt. Safa fand 1988 heraus, dass der Ca^{2+} -Kanal Blocker Verapamil kovalent an P-Gp bindet und somit die Bindung von anderen Substrat-Molekülen an den Transporter verhindert.

Tab.1.2:

Liganden mit Spezifität für P-Gp, MRP und LRP

P-Gp		MRP	LRP
Chemotherapeutika	Doxorubicin Daunorubicin Vinblastin Vincristin Actinomycin D Paclitaxel Teniposid Etoposid Mitoxantron	Doxorubicin Daunorubicin Vinblastin Vincristin Etoposid	Doxorubicin Daunorubicin Mitoxantron
Immunsuppressiva	Cyclosporin A FK 506		
Antihistaminika	Terfenadin		
Steroide	Aldosteron Hydrocortison Cortisol Corticosteron Dexamethason		
Dopamin Antagonisten	Domperidon		
HIV Protease-Inhibitoren	Amprenavir Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir		
Herzmedikamente	Digoxin Quinidin		
Antiemetika	Ondansetron		
Antibiotika	Erythromycin		
Ca²⁺-Kanal Blocker	Verapamil Diltiazem Nifedipin		

Das Problem der ersten P-Gp revertierenden Substanzen waren die enttäuschenden Resultate *in vivo*, bedingt durch ihre niedrige Bindungsaffinität. Dies führte zu einer sehr hohen Dosierung, was wiederum in einer inakzeptablen Toxizität resultierte (Ferry et al. 1996).

Viele der ersten revertierenden Substanzen waren selbst Substrate von P-Gp, die mit den cytotoxischen Komponenten um den Efflux durch P-Gp konkurrierten. Dadurch waren hohe Konzentrationen der revertierenden Substanz nötig, um eine adäquate intrazelluläre Konzentration des Chemotherapeutikums zu garantieren, welche wiederum zur gewünschten Cytotoxizität führte (Ambudkar et al. 1999). Zusätzlich

waren die ersten revertierenden Substanzen auch bei anderen MDR-Transportern oder Enzymsystemen wirksam, was zu nicht vorhersagbaren, pharmakokinetischen Interaktionen in der Präsenz von Chemotherapeutika führen konnte. Um die ungewünschten Nebeneffekte dieser ersten revertierenden Substanzen zu verhindern, wurden verschiedene neue Analoga schon erprobter Substanzen getestet und entwickelt. Mittlerweile gibt es eine zweite und dritte Generation von P-Gp revertierenden Substanzen. Tabelle 1.3 zeigt für die drei hier beschriebenen MDR-Proteine einige relevante Inhibitoren.

Tab. 1.3:

Revertierende Substanzen für die MDR-Proteine: P-Gp, MRP, LRP

P-Gp	MRP	LRP
Akridinorange	Actinomycin	PAK-104P
Aldosteron	Arsenat	
Amiodaron	Cyclosporin A	
Bepidil	Dipyridamol	
Biricodar (VX-710)	Furosemid	
Chinidin	Glutathion	
Chinin	2K112993 (Steroid)	
Chloroquin	LTC4	
Chlorpromazin	MS209 (Quinolon Derivat)	
Cyclosporin A	PAK-104P	
Dexamethason	Penicillin G	
Diltiazem	Quinidin	
FK 506	Rifampicin	
Ivermektin	RU486	
Ketokonazol	Sodiumvanadat	
Kortison	Sulfinpyrazon	
Nifedipin	Vinblastine	
PGP 4008	Biricodar (VX-710)	
PKC-Inhibitoren	Brefeldin A	
Progesteron	Genistein	
Reversin 121	Indomethazin	
RU 486	MK 571	
Tamoxifen	Probenecid	
Thioridazin	Verapamil	
Tiapamil	Vincristin	
Toremifin		
Trifluoperazin		
Valspodar (PSC 833)		
Verapamil		

Auch für MRP gibt es mittlerweile eine hohe Anzahl an verschiedenen Inhibitoren, die teilweise auch P-Gp inhibieren. Für MRP spezifische revertierende Substanzen sind z.B. Probenecid (Sirotnak et al. 2000), Indomethazin und Vincristin (Feller et al. 1995). Der Leukotrien LTD4 Rezeptorantagonist MK 571 stellt einen weiteren MRP-spezifischen Inhibitor dar, der in einem Versuch von Gekeler et al. (1995) die chemotherapeutische Resistenz gegenüber Vincristin in den MDR-Zelllinien HL60/AR und GLC4/ADR komplett revertieren konnte. Ein ähnlicher Effekt, wie mit MK571,

wurden in diesem Versuch mit dem Glutathion-Synthese-Inhibitor Buthionin Sulfoximin erreicht. Dieser ist in der Lage, das Glutathionreservoir der Zellen zu entleeren und so die MRP-vermittelte Resistenz zu überwinden.

Weitere neue Substanzen, wie trizyklische Isoxazole, sind in der Lage, selektiv eine MRP-Resistenz zu inhibieren und dabei eine sehr niedrige Cytotoxizität aufzuweisen. Ein solches Isoxazol ist LY402913, welches jedoch auch eine Selektivität gegenüber P-Gp zeigt (Norman et al. 2002).

Im Gegensatz zu P-Gp und MRP sind für LRP bisher noch keine spezifischen Substanzen beschrieben worden, die in der Lage wären, die MDR vollständig zu revertieren. Für das Pyridin-Analog PAK-104P wird zumindest eine partielle Eignung als revertierende Substanz beschrieben. Kitazono et al. (2001) untersuchten an der Colonkarzinoma Zelllinie SW-620 die durch LRP induzierte MDR. PAK-104P und ein LRP-Antikörper erhöhten die Akkumulation von Adriamycin in isolierten Zellkernen von SW-620 Zellen, die zuvor mit Natriumbutyrat behandelt worden waren. Zudem inhibierte das Pyridin-Analog den verstärkten Efflux von Adriamycin aus dem Zellkern.

1.8. Das dreidimensionale Zellmodell – Multizelluläre Tumorsphäroide (MTS)

Zahlreiche Untersuchungen zur Chemotherapeutikaresistenz wurde bisher *in vitro* an klassischen Monolayer-Kulturen etablierter Zelllinien (zweidimensionale Modelle) durchgeführt. Um resistente Zelllinien zu erzeugen, behandelt man die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen eines Chemotherapeutikums und erzeugt so eine erworbene Resistenz. Bei der intrinsischen Resistenz handelt es sich um eine Resistenzlage, die schon vor dem Einsatz von Chemotherapeutika vorhanden war.

Um die physiologischen Bedingungen eines Tumors jedoch so real wie möglich untersuchen zu können, eignet sich die Monolayer-Kultur eher wenig. Tumorzellen in einer zweidimensionalen Kultur sind nicht in der Lage, die Entstehung von Proliferations- und Diffusionsgradienten für Chemotherapeutika, die Ausbildung hypoxischer Bereiche etc. widerzugeben. Tumorzellen in Monolayer-Kulturen befinden sich durch die ständige homogene Versorgung von Sauerstoff und Nährstoffen darüber hinaus immer in der exponentiellen Wachstumsphase.

Ein geeignetes *in vitro* Modellsystem zur Analyse der physiologischen Bedingungen von Tumorzellen wurde 1970 durch Sutherland et al. entwickelt. Aus der

zweidimensionalen Zellkultur entstanden dreidimensionale Zellaggregate, die in speziellen Flaschen (Spinner-Flaschen) bei kontinuierlicher Agitation kultiviert wurden. Da diese Aggregate eine nahezu sphärische Form besitzen, werden sie auch multizelluläre Sphäroide genannt (MCS). Seit dieser Zeit nehmen multizelluläre Tumorsphäroide (MTS) eine sehr wichtige Rolle in der Krebsforschung ein, vor allen Dingen hinsichtlich der Zellantwort auf verschiedene Behandlungsmodalitäten. Zusätzlich zu therapeutisch orientierten Untersuchungen ergab sich der experimentelle Einsatz von MTS in weiteren Arbeitsfeldern der Zellbiologie und Pathophysiologie, z.B. zur Untersuchung der interzellulären Kommunikation, Zellinvasion, Angiogenese und Neovaskularisation. Obwohl dreidimensionale Kultursysteme, wie MTS, das Mikromilieu von kleinen, avaskulären Tumoren *in vivo* nachahmen können, geht dennoch viel von der biologischen Komplexität der *in vivo* Situation verloren (Kunz-Schughart et al. 1998). Trotzdem besitzen Tumorsphäroide *in vitro* und Tumoren *in vivo* eine Reihe von Gemeinsamkeiten, die für Untersuchungen an diesem Zellmodell sehr wichtig sind (vgl. auch Sutherland 1988, Sutherland & Durand 1973).

Görlach und Acker (1994) zeigten, dass maligne Tumoren *in vivo* und MTS deutliche Gradienten in der Sauerstoffversorgung und des pH-Wertes, sowie eine hohe Ähnlichkeit im zellulären Metabolismus besitzen. Die Eigenheiten des Sauerstoffverbrauchs und der Sauerstoffdiffusion sind in MTS abhängig von der Zelllinie (Mueller-Klieser et al. 1984).

Das wohl wichtigste gemeinsame Merkmal ist der Proliferationsgradient in MCS und Tumoren. Der Gradient bzw. die räumliche Verteilung der Zellproliferation in Sphäroiden entsteht durch die unterschiedliche Verteilung von Glukose und Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Zellaggregate. Während in der äußeren Region der Sphäroide eine adäquate Versorgung gewährleistet ist, fällt diese in Richtung des Aggregatzentrums ab, und bedingt so das Entstehen von Mikroregionen (Fischer et al. 2001). Die Ausbildung dieser Mikroregionen ist vom Alter und Wachstum der MTS abhängig und soll am Beispiel der Zelllinie DU-145 erklärt werden. Das Wachstum kann hier in drei Phasen eingeteilt werden:

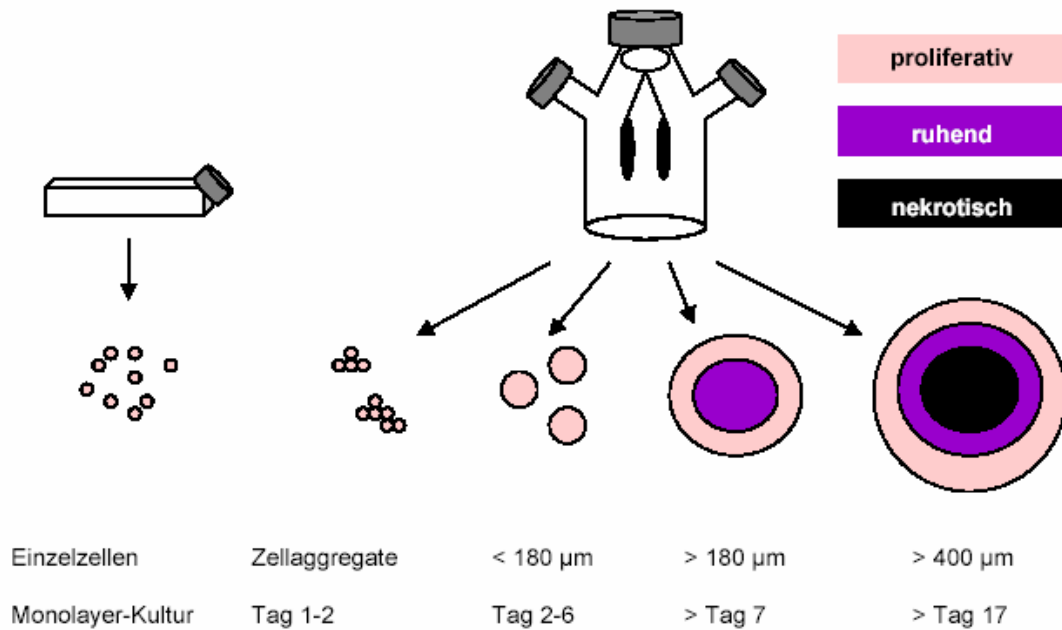
In der ersten Phase formieren sich kleine Zellaggregate, die in ihrer Größe zwischen 50-150 μm variieren. Die Zellen befinden sich in einer exponentiellen Wachstumsphase und sind dementsprechend stark proliferativ.

In der zweiten Phase (150-200 μm Durchmesser), entsteht eine neue Mikroregion von ruhenden bzw. dormanten Zellen. Diese Region liegt im Inneren der Sphäroide und bedingt ein lineares Wachstum, da sich die Dauer des Zellzyklus verlängert und die Zellen sich in einem nicht-proliferativen Zustand befinden. Luk et al. (1986) zeigte, dass ruhende Zellen, die aus dem Zellverband gelöst werden und unter optimalen Bedingungen kultiviert werden, wieder proliferieren und eine Teilungsrate aufweisen, die im Gegensatz zu der Teilungsrate normaler Zellen nahezu verdoppelt ist. Diese „schlafenden“ Zellen besitzen zudem eine Reduktion in ihrer mitochondrialen Funktion, was erklären könnte, warum diese Zellen so lange brauchen, bis sie wieder in den Zell-Zyklus einsteigen (Freyer 1998).

In der dritten Wachstumsphase kommt eine weitere Mikroregion dazu, die in der Tiefe der MTS liegt und aus nekrotischen Zellen besteht. In dieser Phase steigt das Volumen der Sphäroide kaum mehr an; der Durchmesser liegt bei ca. 500 μm . Experimentelle Befunde und theoretische Überlegungen weisen darauf hin, dass die Nekrosen im Zentrum der Sphäroide durch das Fehlen von Sauerstoff und/oder Glukose entstehen. Zentrale Nekrosen können jedoch auch trotz suffizienter Sauerstoff- und Glukose-Versorgung auftreten, was darauf hinweist, dass der zelluläre Metabolismus und die Lebensfähigkeit eines Tumors durch eine komplexe Interaktion verschiedener Faktoren bestimmt wird (Mueller-Klieser et al. 1986, Hamilton 1998). Zu diesen Faktoren gehören sicherlich auch der Mangel an verschiedenen Substraten und die Akkumulation von Abfallprodukten, die nicht mehr so schnell abtransportiert werden können (Gröbe & Möller-Klieser 1996).

Die Unterteilung in verschiedene Mikroregionen in multizellulären Tumorsphäroiden wird durch eine Studie von Wartenberg und Acker (1995) belegt, die mit Fluorazetat und Calcein als Lebendfärbung und Lucifer-Yellow als Totfärbung die verschiedenen Sphäroidareale sichtbar machten.

Abbildung 1.5 zeigt schematisch die Verteilung der Mikroregionen in den drei Wachstumsphasen bei MTS der Zelllinie DU-145.

**Abb.1.5:**

Schematische Darstellung der Vitalitätsmuster in multizellulären Tumorsphäroiden am Beispiel von MTS der Zelllinie DU-145

In der dritten Wachstumsphase setzt bei einem Tumor *in vivo* die Angiogenese, ausgehend vom umgebenden, gesunden Gewebe ein, die eine weitere Volumenzunahme der Tumoraggregate möglich macht. Findet diese nicht statt, so hat der Tumor im Gewebe keine Möglichkeit, größer zu werden. MTS in Suspensionskultur haben, genau wie ein avaskulärer Tumor, ebenfalls nicht die Möglichkeit, unbegrenzt zu wachsen. Sie sind mehrere Wochen in der Spinner-Flaschen Kultur haltbar, zeigen aber von der oben beschriebenen Größe an kaum zusätzliche Volumenzunahme, auch unabhängig davon wie häufig das Medium gewechselt wird (Inch et al. 1970, Landry et al. 1982, Sutherland & Durand 1976).

Freyer stellte (1988) die Hypothese auf, dass die Sättigung des Wachstums in Sphäroiden durch Faktoren beeinflusst wird, die während des Nekrose-Prozesses produziert, freigesetzt oder aktiviert werden. Zudem räumte er diesen toxischen Faktoren einen potentiellen therapeutischen Gebrauch ein.

Der Einsatz von dreidimensionalen Zellmodellen, wie den MTS, macht vor allen Dingen in der Krebstherapie Sinn, da Sphäroide auch hier in ihrem Verhalten soliden Tumoren ähneln. Am Anfang der experimentellen Krebstherapie standen in den siebziger Jahren Versuche im Rahmen der Radiobiologie (Sutherland & Durand 1976, Dertinger et al. 1982). Dass Zellen von Tumorsphäroiden wesentlich resistenter als Zellen zweidimensionaler Monolayer-Kulturen sind (Olive & Durand

1994), zeigt z.B. eine Studie von Erlichmann und Wu (1991). Zellen der Blasenkarzinomzelllinie MGH-U1 zeigten sich in der Monolayer-Kultur sehr sensitiv gegenüber 5-Fluoruracil, wohingegen Sphäroide der gleichen Zelllinie in der Tiefe immer resistenter gegenüber dieses Pyrimidinanalogen wurden. Neuere Studien, die das Verhalten von MTS einer Ovarialkarzinom-Zelllinie gegenüber Taxol (Xing et al. (2003) oder die Reaktion von Sphäroiden des Ovars des Chinesischen Hamsters (CHO) auf den Topoisomerase II Inhibitor Etoposid untersuchten, belegen eindeutig die Unterschiede zwischen der zwei- und dreidimensionalen Kultur (Oloumi et al. 2000). Wartenberg et al. (1998) zeigte für die Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145, dass Sphäroide gegenüber der Substanz Doxorubicin wesentlich resistenter waren als Zellen in der Monolayer-Kultur.

Der genaue Resistenzmechanismus der Sphäroide ist noch nicht geklärt. Gründe für die Resistenz basieren auf Unterschieden in der Zellzyklus-Verteilung, ein schlechtes Penetrationsvermögen von chemotherapeutisch eingesetzten Substanzen im Sphäroid oder die Präsenz hypoxischer Zellen. Diese Mechanismen erklären aber nicht die Resistenz gegenüber allen Substanzen. Weitere Vermutungen sind, dass der enge, dreidimensionale Kontakt der Zellen im Sphäroid, zu Veränderungen in der Genexpression und Chromatin-Verpackung führt (Olive & Durand 1994).

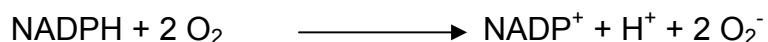
Weiterhin werden MTS erfolgreich in Versuchen zur Radioimmun- und photodynamischen Therapie genutzt (Dubessy et al. 2000) und eignen sich auch hier besser als Tumorzellen aus Monolayer-Kulturen. Mueller-Klieser (2000) verlangt sogar, dass Sphäroide ein obligatorisches Testsystem für therapeutische Screening-Programme werden sollten.

1.9. Aufbau und Funktion der NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von Plasmamembran-assoziierten Enzymen, die in einer Vielzahl von Zellen gefunden werden. Sie katalysieren die Produktion von Superoxid durch eine Elektronenreduktion von Sauerstoff, wobei NADPH als Elektronendonator dient (Kikuchi et al. 2000). Neutrophile, Gewebemakrophagen und andere phagozytierende Zellen produzieren Superoxid im Bereich ihres Phagolysosoms als Teil ihrer Fähigkeit, Bakterien abzutöten. Ähnliche Enzyme in anderen Geweben produzieren Superoxid und Hydrogenperoxid. In nicht-phagozytierenden Geweben könnten diese Enzyme als Signalmoleküle an der

Regulation von Transkription, Apoptose und Zellteilung beteiligt sein (Lambeth et al. 1995). Die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) in der Zelle kann zu einer erhöhten Mutationsrate und veränderten Enzym- und Proteinfunktionen führen (Ohshima et al. 2003). ROI sind cytotoxisch und mutagen, da sie in der Lage sind, wichtige Biomoleküle wie DNA und Lipide zu modifizieren und zu zerstören (Lambeth et al. 2000).

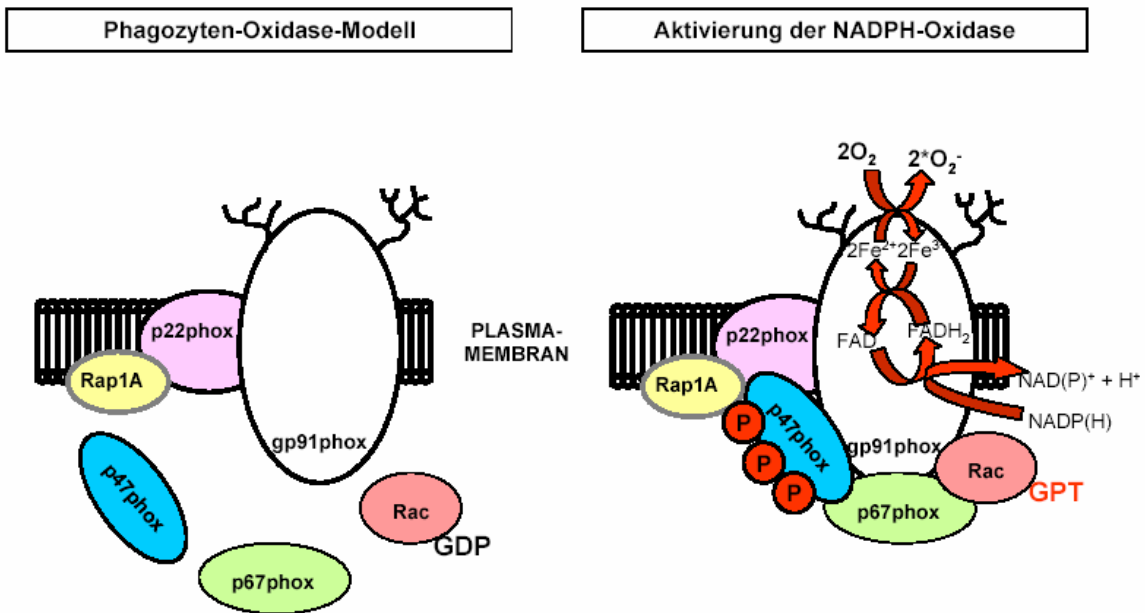
Die Aktivierung der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxid-Produktion erfordert die Beteiligung von verschiedenen cytosolischen Untereinheiten, zu denen p47phox, p67phox, und Rac gehören. Das membranständige Cytochrom b558 besteht aus zwei Untereinheiten, gp91phox und p22phox. Die Aktivierung wird durch eine Verbindung der cytosolischen Faktoren mit dem Cytochrom b558 zu einem Komplex in der Plasmamembran initiiert. Diese beginnt mit einem Austausch von GDP gegen GTP am kleinen G-Protein Rac. Durch eine Phosphorylierung von p47phox durch die Proteinkinase C (PKC) bindet P-p47phox an p67phox. Dies führt zu einer Konformationsänderung und Bindung an Cytochrom b558 und damit zur Enzymaktivierung. NADPH bindet an gp91phox, dadurch werden zwei e⁻ an FAD und Häm-Moleküle weitergegeben. FAD ist wegen der reversiblen Bindungsfähigkeit von Wasserstoff als prosthetische Gruppe zahlreicher Flavinenzyme wichtig für biologische Redoxreaktionen. Ein e⁻ wird an zwei aufeinanderfolgende O₂ abgegeben und bedingt so die Entstehung von Superoxid (siehe Abbildung 1.6):



Zum elektrischen Ausgleich erfolgt gleichzeitig ein nach außen gerichteter Protonentransport.

1.9.1. Die Untereinheit gp91phox

gp91phox ist die katalytische Hälfte des membranständigen Cytochroms b558 der NADPH-Oxidase in Phagozyten. Für gp91phox ist die cDNA von fünf humanen Homologen molekularbiologisch kloniert worden. Zusätzlich wurden Homologe dieser Untereinheit in Nagetieren, *C. elegans* und *Drosophila* identifiziert. Diese Homologen können, basierend auf evolutionären Beziehungen, in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: eine gp91phox-ähnliche Gruppe (Nox 1,2 und 3), Nox 4 und die Duox-Gruppe. Die Proteine Nox 1-4 sind 65-66 kDa groß, wohingegen die Duox-Proteine bei einer Größe von 175-180 kDa liegen.

**Abb.1.6:**

Schematische Darstellung der Aktivierung der NADPH-Oxidase. Durch die Verbindungen der cytosolischen Untereinheiten p47phox, p67phox und Rac mit dem membranständigen Cytochrom b558, welches aus den beiden Untereinheiten p22phox und gp91phox besteht, erfolgt die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die Bindung von NADPH mit gp91phox führt zur Abgabe von zwei Elektronen an FAD und Häm-Moleküle. Ein Elektron wird an zwei Sauerstoffmoleküle weitergegeben und führt zur Entstehung von Superoxid.

Das erste Homolog, von dem berichtet wurde, war die „mitogenic oxidase“ oder Mox1 (Suh et al. 1999). Weil die Funktion der anderen Homologe noch nicht beschrieben worden ist und Mox genutzt wurde, um auch andere Gene zu benennen, hat man sich einheitlich auf den Terminus Nox für NADPH-Oxidase geeinigt.

1.9.2. Funktionen von Nox1

Nox1 ist an der mitogenen Regulation und an der Zelltransformation in Tumorzellen beteiligt (Suh et al. 1999). In der glatten Gefäßmuskulatur korrelierte eine durch Antisens-DNA verursachte, erniedrigte Expression von endogenem Nox1 mit einer erniedrigten Produktion von ROI und zugleich herabgesetztem Wachstum. Dies indiziert eine Rolle von Nox1 beim normalen Zellwachstum. Dementsprechend zeigten Fibroblasten, die Nox1 überexprimierten, eine erhöhte Zellteilungsrate und einen veränderten Phänotyp. Die Fibroblasten waren sehr teilungsaktiv und verhielten sich wie Tumorzellen in thymuslosen Mäusen. Sie produzierten nachweisbare Neoplasien innerhalb von drei Wochen (Lambeth et al. 2000).

Obwohl es gegenwärtig noch nicht sicher ist, ob Nox-Enzyme eine Rolle bei der Krebsentstehung im humanen Organismus spielen, werden interessanterweise hohe ROI-Level in Krebszellen gefunden (Szatrowski & Nathan 1991). Die Funktion von Nox1 zeigt sich auch in einer Studie von Arnold und Mitarbeitern (2001), in der Nox1-exprimierende NIH 3T3 Fibroblasten 10-fach erhöhte H_2O_2 Konzentrationen aufwiesen. H_2O_2 selbst fungiert schon in niedrigen Konzentrationen als intrazelluläres Signal, welches Zellwachstum vermittelnde Genprogramme steuern kann.

Nox1 transformiert nicht nur NIH 3T3 Zellen, sondern erhöht auch die Kanzerogenität von epithelialen DU-145 Prostatazellen. Arbiser et al. zeigten (2002), dass die mRNA des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) durch Nox1 in kultivierten Zellen und Tumoren auffallend hochreguliert wird. Die Rezeptoren 1 und 2 von VEGF sind in den vaskulären Zellen Nox1-exprimierender Tumore hoch exprimiert.

Nox1 ist ein potenter Stimulator des angiogenen „Schalters“, der die Vaskularität von Tumoren erhöht und in der Lage ist, molekulare Marker der Angiogenese zu induzieren (Arbiser et al. 2002).

1.10. Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI)

Phagozytierende Zellen wie Makrophagen, Neutrophile sowie maligne Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, endogen reaktive Sauerstoff-Intermediate zu produzieren. Bittinger und Mitarbeiter (1998) konnten anhand einer spektrophotometrischen Methode die basale Produktion von Superoxid-Anionen durch Melanomzellen ohne vorherige Stimulation zeigen. Die Produktion von Superoxid erhöhte sich zeitabhängig und wurde durch Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 reduziert. Diese Studie unterstützt frühere Beobachtungen, die die Beteiligung von Superoxid Anionen am Mechanismus der Metastasierung beschreiben. Dass Tumoren ROI produzieren, bewies auch eine Untersuchung von Szatrowski und Nathan (1991), die dieses Phänomen durch Chemilumineszenz an sieben verschiedenen Tumorzelllinien zeigten.

Moleküle, die ungepaarte Elektronen oder gepaarte Elektronen mit antiparallelem Spin enthalten, werden Radikale bezeichnet. Diese Radikale entstehen z.B. im Körper als oxidative Nebenprodukte des normalen Stoffwechsels, wobei physiologisch in erster Linie Radikalbildung im Zusammenhang mit Sauerstoff von

Bedeutung ist. Der Singulett Sauerstoff entsteht durch eine physikalische Aktivierung, wie z.B. durch UV- oder Röntgenstrahlen. ROI wie Superoxid Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^\cdot) entstehen durch chemisch-reduktive Aktivierung.

Stickoxide (NO_x) aus Zigarettenrauch sowie Schwermetalle und manche Pflanzenphenole aus der Nahrung sind weitere Faktoren für die Entstehung von ROI im Körper. Es gibt Hinweise darauf, dass der oxidative Schaden an DNA, Proteinen und Lipiden durch ROI entscheidend zur Alterung und zu degenerativen Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Leiden, Immunschwäche, Funktionsstörungen des Gehirns (z.B. Alzheimersche Krankheit) und grauem Star beiträgt.

1.11. Enzyme und Antioxidantien

Der Körper verfügt über verschiedene Mechanismen, um die Schäden durch freie Sauerstoffradikale so gering wie möglich zu halten. Die Strategie von antioxidativen Schutzsystemen ist es, potenziell gefährliche Intermediate auf verschiedenen Stufen ihrer Entstehung oder ihre Reaktion mit anderen Substanzen zu neutralisieren. Zu diesen Schutzsystemen zählen sogenannte Radikalfänger, die in Enzyme und Antioxidantien eingeteilt werden können.

Oxydierte DNA wird von Enzymen repariert, welche die oxydierte Base herausschneiden und ersetzen; oxydierte Proteine werden von Proteasen abgebaut. Hydroperoxide von Fettsäuren werden von Glutathionperoxidase degradiert und das Oxidans Hyperperoxid wird durch das Enzym Hyperoxid-Permutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Wasserstoffperoxid selbst ist ebenfalls ein Oxidans und wird durch das Enzym Katalase neutralisiert und zu H_2O reduziert.

Neben der Schutzwirkung durch die enzymatischen Mechanismen sind die mit der Nahrung aufgenommenen, pflanzlichen Antioxidantien von großer Bedeutung bei der Vermeidung von Schädigungen durch ROI. Antioxidantien sind Stoffe, welche die Oxidation anderer Verbindungen verzögern oder gar verhindern können. Ein vielseitiges und fast ubiquitär vorkommendes antioxidatives Schutzsystem stellen Ascorbinsäure und α -Tocopherol dar. Die beiden Vitamine stehen über die Ascorbinsäure-Dehydrogenase und über das Schlüsselenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit dem NADPH- und dem NADH-Pool in Verbindung. Beide sind in der Lage, Metall-enthaltende Katalysatoren zu reduzieren. Aufgrund seiner lipophilen

Eigenschaften ist Vitamin E auf Membranstrukturen beschränkt, an denen es die Bildung von Lipid-Peroxiden verhindert. Weitere Beispiele für Antioxidantien sind Coenzym Q, Liponsäure, Harnsäure, Thiole, Carotinoide und andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.

2. Aufgabenstellung

Die zellulären Mechanismen, die hinter der Regulation und dem Zusammenwirken von ABC-Transportern wie P-Glykoprotein, MRP und auch LRP stecken, sind bisher nur wenig verstanden. Diesen Proteinen kommt bei Krebserkrankungen eine sehr wichtige Rolle zu, da sie in der Lage sind, einen effektiven Einsatz von Chemotherapeutika zu verhindern. Es besteht die Möglichkeit, durch revertierende Substanzen diese Funktion zu blockieren und eine Resistenz zu überwinden.

Ziel dieser Arbeit war es, vor einem therapeutischen Einsatz von revertierenden Substanzen deren Effektivität am *in vitro* Modell multizellulärer Tumorsphäroide zu überprüfen. Drei verschiedene Tumorzelllinien (Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145, mit Nox1 transfizierte Prostatakarzinom-Zelllinie DU-Nox, Lungenadenokarzinom-Zelllinie A-549) sollten zunächst in Monolayer-Kultur angezüchtet und als dreidimensionale Zellkultur (MTS) in Spinner-Flaschen überführt werden.

Die herangewachsenen MTS sollten dann zunächst hinsichtlich einer differentiellen Expression der ABC-Transporter wie P-Gp, MRP und LRP überprüft werden. Mittels immunocytochemischer Nachweismethoden sollte eine Analyse der Resistenzproteine inklusive detaillierter Expressionsmuster der jeweiligen Zelllinie dargestellt werden. Zudem sollte die Funktionalität der MDR-Transporter anhand von Transportstudien überprüft werden. Für diese Studien sollte das Chemotherapeutikum Doxorubicin in Efflux-Versuchen angewendet werden. Weiterhin sollten in den Versuchen mit Doxorubicin verschiedene revertierende Substanzen eingesetzt werden, um deren Effektivität gegenüber den MDR-Transportern in den drei Zelllinien zu überprüfen.

In einem abschließenden Versuchsansatz sollte der Frage nachgegangen werden, ob die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten maßgeblich an einer gesteigerten Resistenz beteiligt ist. Die drei genannten Zelllinien sollten auf die Radikalproduktion hin überprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

136,9 mM NaCl [34]
 2,7 mM KCl [34]
 10,1 mM Na₂HPO₄ [23]
 1,8 mM KH₂PO₄ [23]
 in Aq. bidest, pH auf 7,4 mit HCl einstellen

PBS + Triton X-100 [34] (PBST) 1%; 0,5%; 0,1% bzw. 0,01%

PBS + 1% (v/v) Triton X-100
 PBS + 0,5% (v/v) Triton X-100
 PBS + 0,1% (v/v) Triton X-100
 PBS + 0,01% (v/v) Triton X-100

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

50 mM Tris [23]
 150 mM NaCl [34]
 in Aq. bidest, pH auf 7,5 mit HCl einstellen

TBS + Triton X-100 [34] (TBST) 1%; 0,1%; 0,5% bzw. 0,01%

TBS + 1% (v/v) Triton X-100
 TBS + 0,1% (v/v) Triton X-100
 TBS + 0,05% (v/v) Triton X-100
 TBS + 0,01% (v/v) Triton X-100

E 1-Lösung

135 mM NaCl [34]
 5,4 mM KCl [34]
 1,8 mM CaCl₂ x 2 H₂O [23]
 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O [23]
 10 mM Glukose x 1 H₂O [31]
 10 mM HEPES [34]
 in Aq. bidest, pH auf 7,5 mit NaOH [34] einstellen

Ablösepuffer (Trypsin / EDTA)

0,1% (w/v) Trypsin [15]
 685 µM EDTA [34]
 in PBS

Paraformaldehyd 4%

1g Paraformaldehyd [34] in 25 ml PBS lösen und erhitzen, pH auf 7,2-7,4 mit NaOH [34] einstellen, Filtration, auf Eis lagern

Methanol / Azeton

70% (v/v) Methanol
 30% (v/v) Azeton

Zellkulturmedien

Ham's F10-Medium [15] bzw.
 Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium [15]
 (DMEM) High Glucose
 in Aq. bidest komplettiert mit

10% (v/v)	fötales Kälberserum (FCS) [15]
1% (v/v)	nicht essentielle Aminosäurelösung (NEA) [4]
2 mM	L-Alanyl-L-glutamin [4]
100 µM	β-Mercaptoäthanol [34]
50 µg/ml	Penicillin und Streptomycin [4]

3.1.2. Zelllinien

3.1.2.1. DU-145

Die humane Prostata-Zelllinie DU-145 wurde von Stone et al. (1978) etabliert. Die aus einem 69-jährigen Patienten entnommenen Zellen stammen aus einer intrazerebralen Metastase. Ursprünglich handelt es sich um ein Prostatakarzinom epithelialen Ursprungs (Adenokarzinom). Die Zelllinie ist weder hormon-sensitiv noch -abhängig. Die DU-145 Zellen wurden in komplettiertem F10-Medium kultiviert. Die verwendeten Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Carlsson, Uppsala, Schweden, zur Verfügung gestellt.

3.1.2.2. A-549

Die humane Zelllinie A-549 ist eine Lungenkarzinom-Zelllinie. Die Zellen stammen aus einem Lungenkarzinom, die einem 58-jährigen männlichen Patienten entnommen wurden. Die MTS von A-549 wurden genau wie die DU-145 Zellen in komplettiertem F10-Medium kultiviert. Die Zellen wurden über Cell Lines Service, Heidelberg bezogen.

3.1.2.3. DU-Nox

Die humane Zelllinie DU-Nox wurde 2002 von David Lambeth etabliert. Die oben beschriebene Prostata Zelllinie DU-145 wurde von ihm mit Nox1, einem Homolog von gp91phox (Untereinheit der Sauerstoffradikal produzierenden NADPH-Oxidase), transfiziert (vgl. Arbiser et al. 2002).

Die DU-Nox Zellen wurden ebenfalls in komplettiertem F10-Medium kultiviert. Freundlicherweise wurden uns die Zellen von David Lambeth, Atlanta, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Adhäsive Kultur der Zellen als Monolayer

Die drei Zelllinien wurden als Monolayer in 25 cm² Kulturflaschen mit komplettiertem F10-Medium bei täglichem Medienwechsel kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Zellen enzymatisch mit Trypsin / EDTA vom Boden der Flaschen abgelöst und auf zwei Flaschen verteilt, um zu verhindern, dass die Zellen bis zur Konfluenz wachsen. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank [13] [16] bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% und 95% relativer Luftfeuchte.

3.2.1.2. Nicht-adhäsive Kultur der Zellen als multizelluläre Tumorsphäroide

Dissoziierte A-549, DU-Nox und DU-145 Zellen aus Monolayer-Kulturen (siehe 3.2.1.3.) wurden in Spinner-Flaschen mit 250 ml Medium kultiviert, in welchen sie zunächst kleine Zellaggregate bildeten und später zu Sphäroiden mit zunehmendem Durchmesser heranwuchsen. Die Spinner-Flaschen [20] wurden vor ihrem Einsatz mit Sigmacote [34], einer Silikon-haltigen Substanz beschichtet, damit die Zellen nicht an der Flaschenwand anheften konnten. Zwei magnetische Glaspindel in der Spinner- Flasche, die von einem Cellspin Rührsystem [20] bewegt wurden, drehten sich mit insgesamt 16 Umdrehungen pro Minute (alternierend viermal im und viermal gegen den Uhrzeigersinn). Die ständige Bewegung verhinderte ein Anheften der Zellen an der Flaschenwand und sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Nährstoffe innerhalb der Suspension. Das Medium wurde täglich zur Hälfte gewechselt. Die Kultivierung erfolgte unter den gleichen Konditionen wie für die Monolayer-Kulturen.

3.2.1.3. Enzymatische Dissoziation mit Trypsin / EDTA

Um die Zellen enzymatisch zu lösen, wurden die Monolayer-Kulturen mit auf 37°C angewärmten Trypsin / EDTA für höchstens eine Minute gewaschen. Danach wurden 3-4 ml der Trypsinlösung zu der Kulturflasche gegeben und es folgte eine fünfminütige Inkubation der Zellen im Brutschrank [13] [16] bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte. Nach der Inkubation lösten sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche, unterstützt durch vorsichtiges Pipettieren mit der Trypsinlösung. Die proteolytische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von Medium unterbunden.

3.2.2. MDR Substrat

Doxorubicin [34], früher auch Adriamycin genannt, gehört mit 14 weiteren Hydroxy-Derivaten des Daunorubicins, zur pharmakologischen Gruppe der Anthrazykline welche sämtlich von dem Pilz *Streptomyces peucetius* produziert werden. Doxorubicin ist durch Interkalation der Anthrazyklin-Fraktion, Chelation von Metallionen oder durch die Produktion freier Radikale in der Lage, DNA zu zerstören. Es wurde gezeigt, dass Doxorubicin die Fähigkeit, besitzt die DNA-Topoisomerase II zu inhibieren, welche wichtig für die DNA-Funktion ist.

Eine hohe Anzahl von Tumoren erweist sich mittlerweile als Doxorubicin-resistent. Daher wird das Zellgift vermehrt in der Krebsforschung als Substrat für MDR-Transportproteine wie P-Gp, MRP und LRP eingesetzt (z.B. David-Beabes et al. 2000).

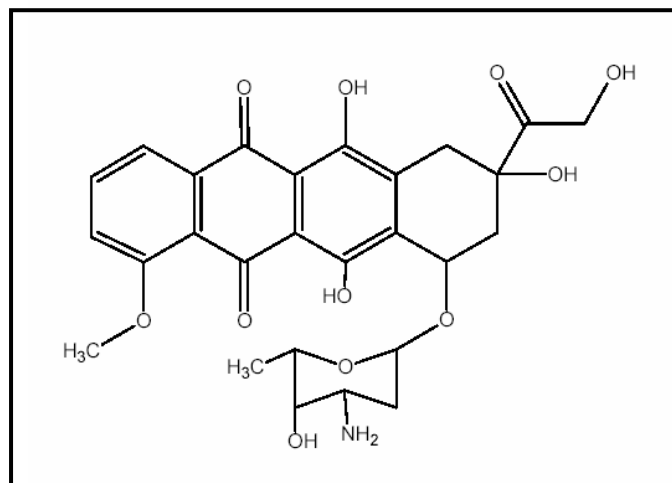


Abb. 3.1: Strukturformel Doxorubicin

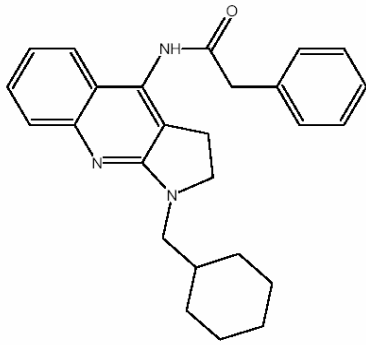
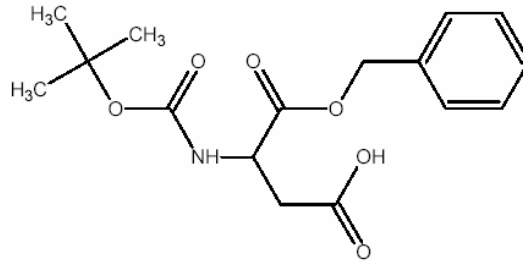
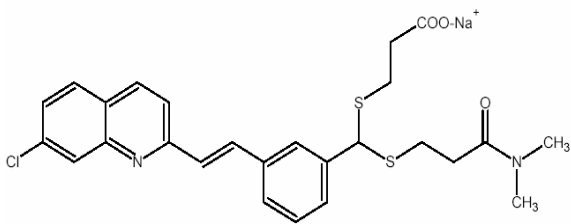
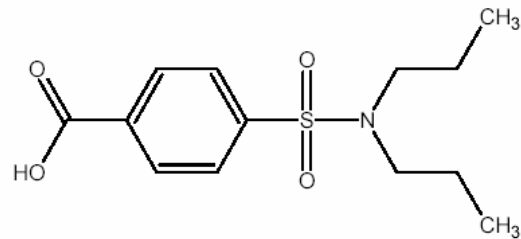
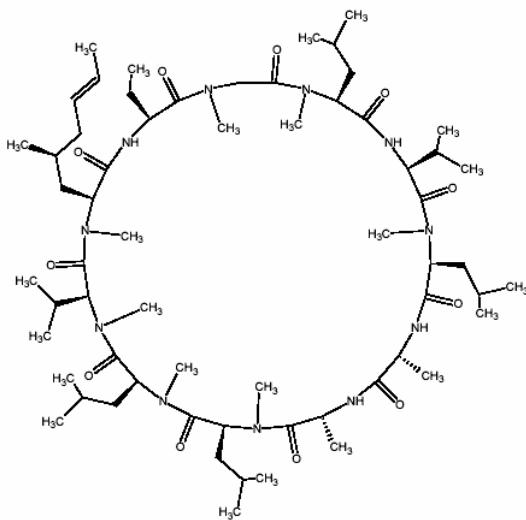
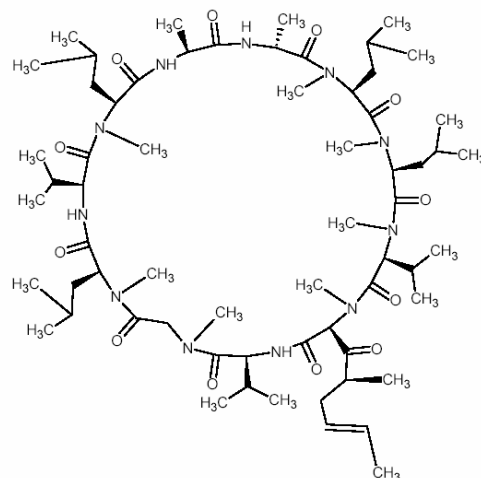
3.2.3. MDR-revertierende Substanzen

Cyclosporin A [8] ist ein zyklisches, unpolares Oligopeptid, welches aus *Trichoderma polysporum* isoliert wurde. Zu seinen Eigenschaften gehören Immunsuppression und Interaktion mit dem intrazellulären Protein Cyclophilin. Durch die Verbindung mit diesem Protein entsteht ein Cyclophilin-Cyclosporin A Komplex, welcher sich als Inhibitor der Protein-Phosphatase Aktivität des Calcineurin erwies (Gooch et al. 2004). Cyclosporin A verhindert die durch bakterielle Lipopolysaccharide, Interleukin 1 α und Tumor Nekrose Faktor- α induzierte Synthese von Stickstoffmonoxid. Als revertierende Substanz inhibiert es die Funktion von P-Gp als Efflux-Pumpe durch kompetitive Hemmung (Saito et al. 2004). In den Versuchen wurde es in einer Konzentration von 30 μ M, in Äthanol gelöst, verwendet.

Reversin 121 [2] gehört zur Gruppe der Peptid-„Chemosensitizer“. Reversin 121 ist hydrophob und bindet mit hoher Affinität an P-Gp. Es induziert eine Stimulation der ATPase-Aktivität von P-Gp, führt in höheren Konzentrationen jedoch zu dessen Inhibition (Sharom et al. 1999). Reversin 121 wurde in 0,1% DMSO [23] gelöst und in einer Konzentration von 20 μ M/L eingesetzt.

Eine selektive Antagonisierung von P-Gp wird auch durch **PGP 4008** [2] gewährleistet. PGP 4008 ist ein Indoloquinolalin und revertierte effektiv eine durch P-Gp hervorgerufene MDR in NCI/ADR Zellen; es hatte jedoch keinen Effekt auf die Sensitivität für Therapeutika in MCF-7/VP Zellen, die MRP1 überexprimieren (Smith et al. 2000, Lawrence et al. 2001). In den Versuchen wurde es, wie Reversin 121, in 0,1% DMSO [23] gelöst und in einer Konzentration von 20 μ M/L eingesetzt.

Valspodar oder **PSC 833** [27] gehört zur zweiten Generation der P-Gp Modulatoren. Es handelt sich um ein nicht-immunsupprimierendes Analog von Cyclosporin D, welches laut Studien von te Boekhoerst et al. (1992) und Twentyman et al. (1991) in der Lage ist, P-Gp 10-20fach stärker zu inhibieren als Cyclosporin A. PSC 833 ist nicht spezifisch P-Gp revertierend, sondern auch in der Lage, MRP zu inhibieren (Krishna & Mayer 2000). Als revertierende Substanz wurde Valspodar in 0,1% DMSO [23] gelöst und in einer Konzentration von 30 μ M/L angewendet.

**PGP-4008****Reversin 121****MK-571****Probenecid****Cyclosporin A****PSC 833****Abb. 3.2:** Strukturformeln der verwendeten revertierenden Substanzen

Probenecid [34] ist ein uricosurisches Agens, das die Harnstoffexkretion in den Urin erhöht. In den Nieren reduziert es die tubuläre Ausscheidung von vielen Substanzen und erhöht somit ihre Plasmakonzentration. Probenecid ist MRP-spezifisch und vollzieht seinen revertierenden Effekt durch eine Inhibition der cMOAT/MRP-ähnlichen ATPase (Sirotnak et al. 2000). Für die Versuche wurde es in 0,1% DMSO [23] gelöst und in einer Konzentration von 200 µM/L eingesetzt.

Der selektive Leukotrien D4-Rezeptor Antagonist **MK 571** [2] ist in der Lage, spezifisch die MDR von MRP zu revertieren (Gekeler et al. 1995). In 0,1% DMSO [23] gelöst wurde es in den Versuchen in einer Konzentration von 50 µM/L (Williams et al. 2002) verwendet.

Wie in früheren Versuchen bestätigt wurde, hat DMSO keinen Einfluss auf die Efflux-Kinetik von Doxorubicin (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. H. Sauer).

3.2.4. Sauerstoffradikalfänger

Trolox [34] ist ein zell-permeables, wasserlösliches Derivat von α -Tocopherol (**Vitamin E**). Alle Formen von Vitamin E bestehen aus einem aromatischen Ringsystem, das als Antioxidans wirkt, und einer aliphatischen Strukturkomponente, mittels welcher das Vitamin in den Phospholipid- und Lipoproteinmembranen der Zelle sowie intrazelluläre Fetttröpfchen (Fettgewebe) verankert ist. Für die Versuche wurde es in H₂O gelöst und in einer Konzentration von 100 µM/L eingesetzt.

Ein weiteres Antioxidans ist **Vitamin C** [34]. Ascorbinsäure spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Kollagen und ist für die Synthese der Katecholamin-Hormone erforderlich. Ascorbinsäure ist zusammen mit Dehydroascorbinsäure ein wichtiges Redoxsystem und dient als Cofaktor für Enzyme, die als Katalysatoren bei Hydroxylierungen und Hydrierungen mitwirken. Es wurde in H₂O gelöst und im Versuch in einer Konzentration von 30 µM/L angewendet.

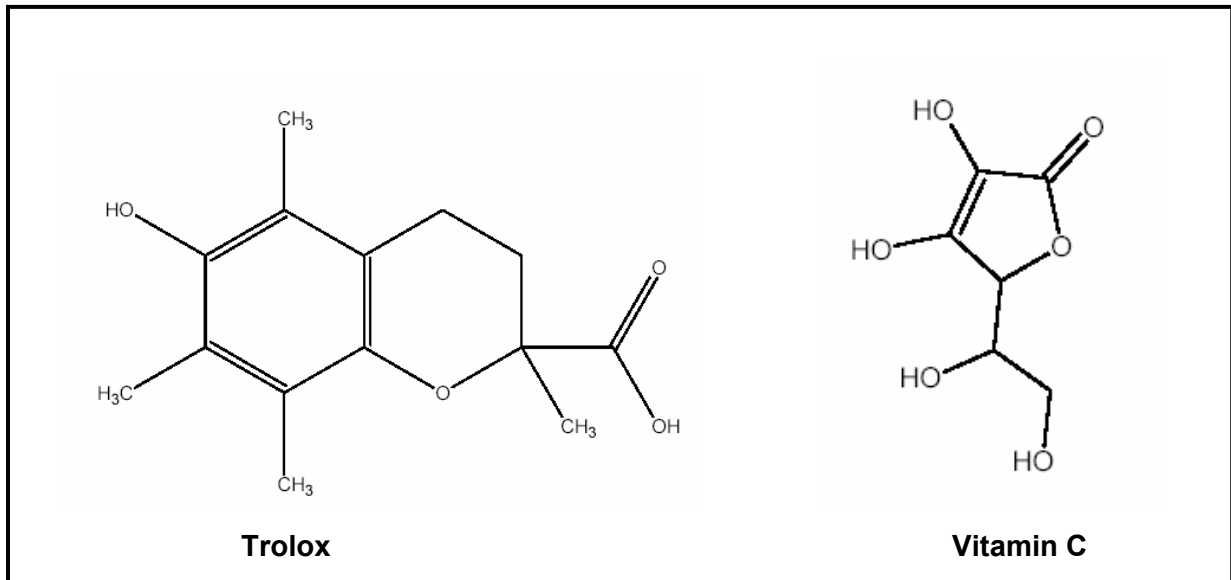


Abb. 3.3: Strukturformeln der eingesetzten Sauerstoffradikalfänger

3.2.5. Blocker der NADPH-Oxidase

Die beiden eingesetzten Substanzen sind gängige Hemmstoffe der NADPH-Oxidase.

DPI

Diphenylen idonium (DPI) [34] ist ein potenter und reversibler Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) von Makrophagen und Endothelzellen. DPI ist außerdem in der Lage, andere Flavoenzyme, wie die NADPH-Oxidase von Neutrophilen zu inhibieren (O'Donnell 1993). In den Versuchen wurde es in einer Konzentration von 10 μM in 0,1% DMSO [23] gelöst angewendet.

AEBSF

4-(2-Aminoäthyl)-benzensulfonyl-fluorid-hydrochlorid (AEBSF) [34] ist ein Serinprotease Inhibitor. Es wurde gezeigt, dass AEBSF fähig ist, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin zu inhibieren (Mintz 1993). Es hat eine sehr niedrige Toxizität und wurde – in H_2O aufgelöst – in einer Konzentration von 100 μM verwendet.

Präparates selbst) angeregt. Das dabei emittierte Licht (Fluoreszenz) ist energieärmer und hat eine größere Wellenlänge als das anregende Licht. Das Fluoreszenzlicht nimmt seinen Weg durch das Objekt ins Objektiv und durch die Strahlablenkung zum Strahlenteiler. Dieser lenkt das Licht durch eine zweite Lochblende und Emissionsfilter auf die empfindliche Fläche eines Photomultipliers (PMT). Das angeregte Präparat fluoresziert jedoch auch unter- und oberhalb der Fokusebene im Lichtkegel des anregenden Lichts. Damit werden auch Bereiche erfasst, die im optischen Schnitt gar nicht erscheinen sollen. Die zweite, in ihrem Durchmesser veränderbare Lochblende, wird so verschoben, dass sie genau zu in einer zur abgebildeten Objektebene konjugierten Ebene der Fokusebene abgebildet wird (konfokales Prinzip).

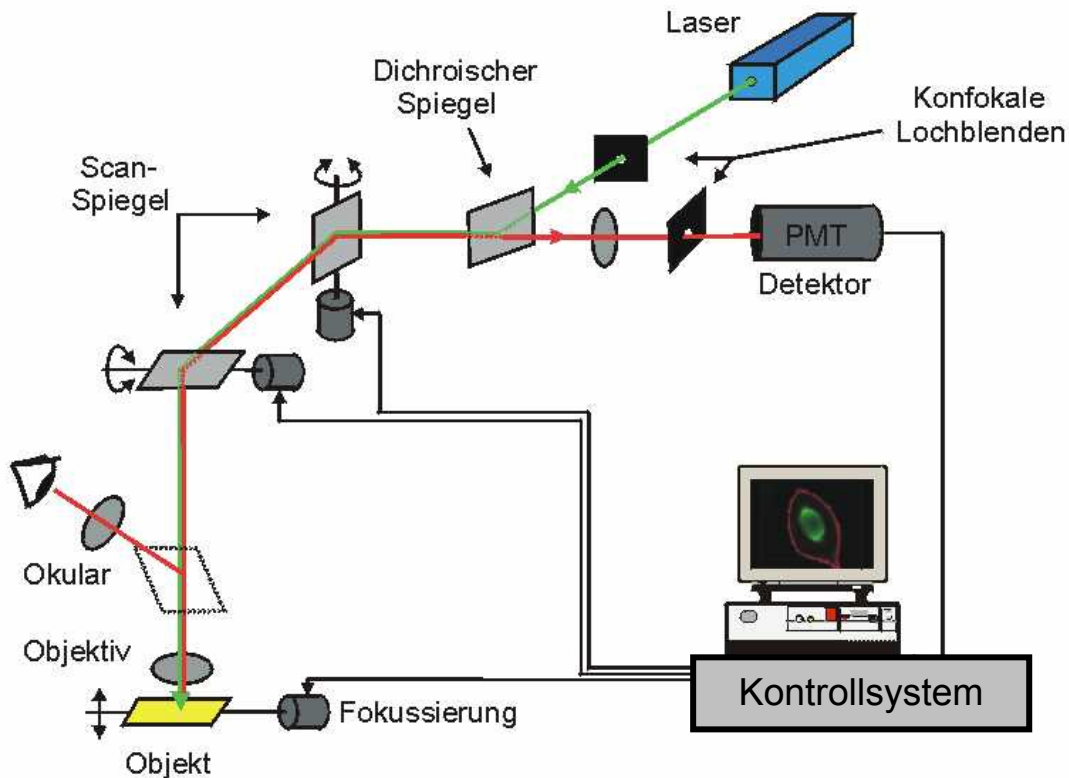


Abb. 3.5:

Aufbau des CLSM in schematischer Darstellung nach Pawley JB 1995, Internetseite (www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/scannl.htm)

Sie dient dadurch als „Raumfilter“. Licht aus Bereichen ober- bzw. unterhalb der Fokusebene trifft zwar auch die zweite Lochblende, hat seinen Brennpunkt aber entweder davor oder dahinter, wodurch sich auf der Blende ein Lichtfleck bildet, von dem nur ein kleiner Teil den Empfänger trifft. Deshalb wird nur das Licht aus der Fokusebene gemessen, was zu einer erheblichen Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des Streulichts aus einer nicht im Fokus liegenden Ebene führt.

Der PMT wandelt das einfallende Licht je nach Intensität in einen proportionalen Strom um, der auf elektronischem Weg erfasst wird und als Bilddaten in 255

Grauwertstufen (Counts) abgespeichert wird. Die Counts werden mit Falschfarbentechnik auf dem Bildschirm des Mikroskops dargestellt und können gemessen werden.

3.2.7. Wachstumsversuche

Um das Größenwachstum der Sphäroide nach der Überführung aus der Monolayer-Kultur zu bestimmen, wurden die drei Zelllinien täglich bis jeden zweiten Tag mit dem CLSM [37] mikroskopisch untersucht. Dafür wurde aus den Spinner-Flaschen eine kleine Anzahl von MTS entnommen. Von den sich bildenden Sphäroiden wurden Transmissionsbilder mit dem CLSM aufgenommen und mittels eines Bildauswertung-programmes quantifiziert. In Transmissions-Technik können die MTS wie gewohnt im Durchlicht mikroskopiert werden.

3.2.8. Fluoreszenz-Immuncytochemie

Zunächst wurden die entnommenen Sphäroide für alle immuncytochemischen Antigennachweise fixiert. Dies geschah im Falle eines immuncytochemischen Antigennachweises von P-Gp und LRP mit Paraformaldehyd [34] bei 4°C. Eine Fixation für einen immuncytochemischen Nachweis von MRP erfolgte mit Methanol / Azeton bei -20°C. Die Fixation dauerte eine Stunde bei stetiger Lagerung auf Eis. Nach dieser Zeit mssten die Sphäroide permeabilisiert werden, damit die Antikörper die Zellen durchdringen konnten. Nach der Permeabilisierung erfolgte eine Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Danach wurde der primäre Antikörper appliziert und für zwei Stunden mit den Zellen inkubiert. Die Sphäroide wurden dann gründlich gewaschen, der sekundäre Antikörper wurde appliziert und für eine Stunde belassen. Eine Auflistung für die verwendeten Lösungen zur Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung, sowie die verwendeten Antikörper mit Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen für alle durchgeführten Färbungen ist durch die nachfolgende Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2:

Fixierung, Permeabilisierungs- und Blockierungslösungen, primäre und sekundäre Antikörper, Inkubationszeiten und -bedingungen aller durchgeführten Antikörperfärbungen

	Fixierung	Permeabilisieren	Blocken	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Anti P-Gp Kaninchen [8]	4% PFA 1h, 4°C	1% PBST 10 min, RT	10% Milch in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 10% Milch in 0,01% PBST, 2h, RT	1:50 Cy 3 Anti- Kaninchen, 1h, RT [11]
Anti MRP Ratte [2]	Methanol/ Azeton 7/3 1h, -20°C	1% PBST 10 min, RT	10% Milch in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 10% Milch in 0,01% PBST, 2h, RT	1:100 Cy 3 Anti- Ratte 1h, RT [11]
Anti LRP-56 Maus [8]	4% PFA 1h, 4°C	1% PBST 10 min, RT	10% Milch in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 10% Milch in 0,01% PBST, 2h, RT	1:100 Cy 3 Anti- Maus 1h, RT [11]
Anti Ki 67 Maus [31]	4% PFA 1h, 4°C	1% PBST 10 min, RT	10% Milch in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 10% Milch in 0,01% PBST, über Nacht, 4°C	1:100 Cy 5 Anti- Maus 1h, RT [11]
Anti Mox 1 Ziege [28]	4% PFA 1h, 4°C	1% PBST 10 min, RT	1% Serum in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 1% Serum in 0,01% PBST, über Nacht, 4°C	1:100 Cy 5 Anti- Ziege 1h, RT [11]
Anti Hif1- α Maus [1]	4% PFA 1h, 4°C	1% PBST 10 min, RT	1% Serum in 0,01% PBST 1h, RT	1:100 in 1% Serum in 0,01% PBST, 2h, RT	1:100 Cy 2 Anti- Maus 1h, RT [11]

3.2.8.1. Primäre Antikörper

In den folgenden Abschnitten ist die Spezifität aller verwendeten Antikörper beschrieben.

anti-P-Gp Antikörper

Zur Familie der ABC-Transporter gehörend, ist P-Gp ein ATP-abhängiges Membranprotein, welches als Efflux-Pumpe agiert. Der Antikörper mdr (Ab-1) [8] ist ein polyklonales Kaninchen anti- P-Gp Antiserum, das spezifisch an ein aus 21 Aminosäure bestehendes Peptidfragment in der C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne von humanem wie auch murinem P-Gp bindet. P-Gp, das Produkt des humanen *mdr-1* Gens, ist ein intrinsisches Plasmamembranprotein, welches von Tumorzelllinien überexprimiert wird, die eine Kreuzresistenz gegenüber einer hohen Anzahl von chemotherapeutischen Substanzen ohne erkennbare funktionelle oder

strukturelle Beziehung zeigen. P-Gp ist in der Lage, ATP-abhängig z.B. Xenobiotika aus der Zelle zu exocytieren.

anti-MRP Antikörper

MRP, auch ein Mitglied der Familie der ABC-Transporter, transportiert Substanzen nur aus der Zelle, wenn diese an Glutathion gebunden vorliegen. Der polyklonale Ratten anti- MRP Antikörper (MRPr1) [2] reagiert mit einem Epitop von MRP, einem 189-195 kDa transmembranen Transporterprotein, dass in verschiedenen humanen P-Gp negativen MDR-Tumorzelllinien überexprimiert wird. Dieses Transporterprotein wird von verschiedenen humanen MDR Tumorzelllinien überexprimiert, die P-Gp nicht enthalten. MRPr1 weist keine Kreuzreaktion mit den humanen Genprodukten MDR1 und MDR3 auf.

anti-LRP Antikörper

LRP ist kein ABC-Transporter, liegt in der Nähe von Kernporen und regelt möglicherweise den Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma (Izquierdo et al. 1996). Der monoklonale Maus anti- LRP Antikörper (LRP-56) [8] erkennt ein 110 kDa großes Protein (p110), welches in vielen P-Gp-negativen MDR-Zelllinien und Tumoren überexprimiert wird. Die Verteilung des p110 Antigens zeigt enge Parallelen mit der Verteilung von P-Glykoprotein (170 kDa) in humanem Gewebe, Zelllinien und Tumoren. Trotzdem ist das Muster der immuncytochemischen Antigennachweise unterschiedlich. Während die Färbung von P-Gp an der Plasmamembran stattfindet, ist die LRP-56 Färbung primär intracytoplasmatisch lokalisiert.

anti-Ki 67 Antikörper

Ki 67 wird in normalem, reaktivem und neoplastischem Gewebe exprimiert und besitzt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation. Der monoklonale Maus anti- Ki 67 [34] Antikörper bindet an das im Zellkern vorkommende Protein Ki 67, welches in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Es kann in allen Zyklusphasen, mit Ausnahme der G₀-Phase, nachgewiesen werden. Ki-67 kommt in mindestens zwei Formen mit Größen von 345 und 395 kDa vor. Es wurden aber auch andere nukleäre Proteine, die nahe mit Ki 67 verwandt sind und deren Molekulargewichte in der Größenordnung von 40 – 100 kDa liegen, beschrieben.

anti-gp91phox Antikörper

gp91phox bildet zusammen mit p22phox Cytochrom b558, eine Untereinheit der NADPH-Oxidase. Der polyklonale Kaninchen anti- gp91phox [35] Antikörper bindet an die Aminosäuren 548-560 des humanen, 75 kDa großen gp91phox Protein. Eine Kreuzreaktion mit Protein-Analoga der Maus ist wahrscheinlich.

anti-Mox1 Antikörper

Mox 1 alias Nox1 ist ein Homolog von gp91phox. Der polyklonale Ziege anti- Mox1 [28] Antikörper bindet spezifisch an ein Peptid in der Nähe des C-Terminus von Mox1. Mox1 und gp91phox sind eng verwandte essentielle Komponenten der NADPH-Oxidase. Anti-Mox1 reagiert mit Mox1 von Maus, Ratte und Mensch. Mox1 ist ein Synonym für Nox1.

anti-Hif 1- α Antikörper

Unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert das Protein Hif-1 α schnell im Nukleus von Zellen. Der monoklonale Maus anti- *Hypoxia Inducible Factor 1 α* (HIF-1 α) [2] Antikörper bindet spezifisch an die Aminosäuren 530-826 des humanen 116 kDa großen Hif-1 α . Der Antikörper besitzt keine Kreuzreaktion mit dem verwandten Hif-2 α , jedoch eine Spezies-Kreuzreaktion mit HIF-ähnlichen Proteinen von nicht-humanen Primaten, Schwein und Rind.

3.2.8.2. Sekundäre Antikörper

Alle verwendeten, sekundären Antikörper waren an ein Fluorochrom gekoppelt. Die Anregungs- und Emissionsmaxima der benutzten Fluorochrome, sowie die verwendeten Laser und Emissionsfilter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1:

Anregungs- und Emissionsmaxima, Laser und Emissionsfilter der verwendeten sekundären Antikörper

Fluorochrom	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum	Laser	Emissionsfilter
Cy3™	552 nm	565 nm	He-Ne 543 nm	LP 570
Cy5™	650 nm	670 nm	He-Ne 633 nm	RG 665
Cy2™	489 nm	667 nm	Ar 488 nm	LP 515

Cy 3™-konjugierte Ziege anti-Kaninchen, anti-Maus und anti-Ratte Antikörper

Die Cy3™-Antikörper [11] reagieren spezifisch mit den schweren und leichten Ketten der Immunglobuline G von Kaninchen, Maus oder Ratte. Der anti-Kaninchen und der anti-Ratte Antikörper zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Spezies. Der anti-Maus Antikörper zeigt minimale Kreuzreaktionen mit Serumproteinen von Ratte, Rind, Pferd und Mensch.

Cy5™-konjugierte Schaf anti-Maus und Kaninchen anti-Ziege Antikörper

Die Cy5™-Antikörper [11] reagieren mit schweren und leichten Ketten der Immunglobuline G von Maus und Ziege. Der anti-Maus Antikörper besitzt minimale Kreuzreaktionen mit den Serumproteinen von Mensch, Rind und Pferd. Der anti-Ziege Antikörper hingegen besitzt keine Kreuzreaktionen.

Cy2™-konjugierte Ziege anti-Maus Antikörper

Der Cy2™-Antikörper [11] reagiert mit schweren und leichten Ketten der Immunglobuline G und M der Maus. Er weist keine Kreuzreaktionen mit anderen Serumproteinen auf.

3.2.9. Molekularbiologische Techniken - Western Blotting

Western Blotting ist eine immunologische Technik, mit deren Hilfe man geringe Mengen eines bestimmten Proteins in extrahierter Form nachweisen und einige seiner physikochemischen Eigenschaften (Ladung, Größe) bestimmen kann. Hierfür wird ein Proteingemisch zunächst einer Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen unterzogen, die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und teilweise Ladung aufgetrennt. Die Proteine werden unter exakter Beibehaltung des gelelektrophoretischen Trennpunktes nachfolgend aus dem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Nitrozellulose-Membran [30] übertragen – dies ist das Blotting im eigentlichen Sinn, wodurch sie für die Reaktion mit spezifischen Anti-

körpern leichter zugänglich sind. Auf die Nitrozellulose-Membran wird ein spezifischer primärer Antikörper appliziert, der an das nachzuweisende Protein bindet. Danach wird ein sekundärer Antikörper aufgetragen. Durch eine Reaktion die von einem an den sekundären Antikörper gebundenen Enzym katalysiert wird, kann das gesuchte Protein als Bande auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Proteinbestimmung

Zum Aufschluss der Proteine wurden die MTS der Zelllinien DU-145 und A-549 mehrmals mit PBS gereinigt und anschließend abzentrifugiert (1,5 Minuten; 1000 U/min) [16]. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet im Verhältnis 1+3 mit Laemmli-Puffer [36] und 10 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) gemischt.

Laemmli-Puffer [36]:

50 mM Tris-HCl pH 6,8	0,5 ml
4 M Harnstoff [34]	2,4 g
1% SDS (10%) [34]	1 ml
15% Glycerin [9]	1,5 ml
0,01% Bromphenol Blau (0,2%) [9]	0,5 ml
entionisiertes Wasser	auf 10 ml aufgefüllt

Die Proben wurden solange gemischt [31], bis sich das Pellet löste. Für die Hitze-denaturierung wurden die Proben in Eppendorfgläsern für fünf Minuten in ein 95°C warmes Wasserbad [12] gegeben, danach konnte zur Unterstützung des Zellaufschlusses Ultraschall [3] appliziert werden.

Für die Proteinbestimmung wurden die Proben 1:1000 mit einem Proteinquantifizierungs-Assay (PQA) [6] verdünnt.

1 ml= 900 µl PQA-Verdünnung (200 µl PQA + 700 µl H₂O) +
100 µl Probe 1:100 in H₂O verdünnt

Zusätzlich wurde eine Standard-Reihe mit BSA [15] hergestellt.

1 ml= 900 µl PQA-Verdünnung (200 µl PQA + 700 µl H₂O) +
100 µl BSA (0,2,4,6,8,10 µl BSA-Lösung ad 100,98,96,94,92,90 µl mit H₂O)

Alle Messansätze wurden gemischt und für 10 Minuten auf Eis gesetzt. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Absorptions-Spektrophotometer gemessen. Hierfür wurden je

Probe 200 µl auf Mikrotiterplatten appliziert. Durch die resultierenden Werte des BSA-Standards lässt sich eine Regressionsgerade legen, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben nach folgender Formel berechnet werden kann:

$$\text{Proteingehalt } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{E595} - \text{y-Achsenabschnitt})/\text{Steigung}$$

Die Nachweisgrenze dieser Proteinbestimmung (Bradford-Methode) liegt bei optimalen Bedingungen unter 1 µg Protein (Spector 1978).

Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Page)

<u>Elektrodenpuffer</u>	<u>Trenngel (8%)</u>	<u>Sammelgel (4%)</u>
247,7 mM Tris-Base [36]	26,95 ml Aq. bidest.	15,6 ml Aq. bidest.
1,9 M Glyzin [5]	12,5 ml Trenngel-Puffer (4x)	6 ml Sammelgel-Puffer
3,5 mM SDS [34]	10 ml Acrylamid 40% [9]	2,4 ml Acrylamid 40% [9]
in Aq. bidest.	50 µl TEMED [9]	24 µl TEMED [9]
	500 µl APS 10% [9]	120 µl APS 10% [9]
<u>Lauf-Puffer (10x)</u>	<u>Trenngel-Puffer (4x)</u>	<u>Sammelgel-Puffer (4x)</u>
250 mM Tris-Base [36]	1,5 M Tris-Base [36]	0,5 M Tris-Base [36]
2 M Glyzin [5]	0,4% SDS [34]	0,4% SDS [34]
1% SDS [34]	pH 8,8	pH 6,8

Die Pufferkammern des Gels wurden mit 1 x Lauf-Puffer gefüllt. Eine der Taschen wurde mit einem Molekulargewichtsmarker zur Größenbestimmung des gesuchten Proteins gefüllt. Die verwendete, vorgefärbte (BenchMark™) Proteinleiter [15] (8 µl) bestand aus 10 Proteinen mit Molekulargewichten von 10 bis 200 kDa, die kovalent an einen blauen bzw. rosafarbenen Farbstoff gebunden sind. Die übrigen Taschen wurden mit 20 µl des Gesamtproteinextrakts der jeweiligen Proben (10-20 µg) beladen. Die Trenngele bestanden zu 8% aus Polyacrylamid, zur gelelektrophoretischen Separation auch hochmolekularer Proteine wie P-Gp. Die Elektrophorese bei den verwendeten Mini-Gelen (10 cm x 10 cm x 0,1 cm) lief bei 20 mA und 100-130 V konstanter Spannung je nach Molekulargewicht für zwei bis drei Stunden.

Protein Transfer (Blotting)

Blot-Puffer (2l):

6,06 g Tris-Base [36]

28,83 g Glyzin [5]

400 ml Methanol [9]

20 ml SDS (10%) [34]

auf 2 l mit Aq. bidest.

Der Proteintransfer erfolgte nach einem gängigen Elektro-Blot Verfahren. Hierfür wurde zwischen zwei Graphit-Elektroden ein sogenanntes Blot-Sandwich, bestehend aus Schwämmen, Filterpapier, Gel und Nitrozellulose, gepackt (siehe Abbildung 3.6). Die Elektroden waren an ein Netzgerät mit Konstantstrombetrieb angeschlossen. Nach ca. zwei Stunden war der Transfer hochmolekularer Proteine, wie P-Gp, bei einer Spannung von 24 V und einem Strom von ca. 1000 mA abgeschlossen. Die Nitrozellulose-Membran (Hybond tm-c extra) [30] wurde vom Gel gelöst, mit MilliQ Wasser gewaschen und für fünf Minuten in Ponceau-S-Lösung [33] (2,6 mM in 3% Trichloressigsäure [34]) gefärbt, um einen erfolgreichen Transfer der Proteine dokumentieren zu können. Durch mehrfaches Waschen in 0,01% TBST (1x TBST= 20 mM Tris-Base pH 7,6 [36]; 130 mM NaCl [34]; 0,05% Tween-20 [9]) wurde die Membran wieder entfärbt.

Antikörpermarkierung der proteintragenden Nitrozellulose-Membran und ECL

Um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen, musste die Nitrozellulose-Membran zunächst für mindestens eine Stunde in 10% fettarmem Milchpulver [17] oder BSA [15] in TBST inkubiert und geschwenkt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen P-Gp [8] (2 µl / ml TBST und 2% BSA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Vor der Applikation des sekundären Antikörpers wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Esel anti-Kaninchen Antikörper [11] wurde in einer Konzentration von 1:16000 in 1x TBST und 2% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Der hier verwendete sekundäre Antikörper reagiert mit schweren Ketten der Immunglobuline G des Kaninchens und mit leichten Ketten der meisten Kaninchen-Immunglobuline. Er weist keine Kreuzreaktionen mit anderen Serumproteinen auf.

Zum Abschluss wurde die Membran wieder viermal für 10 Minuten mit TBST gewaschen.

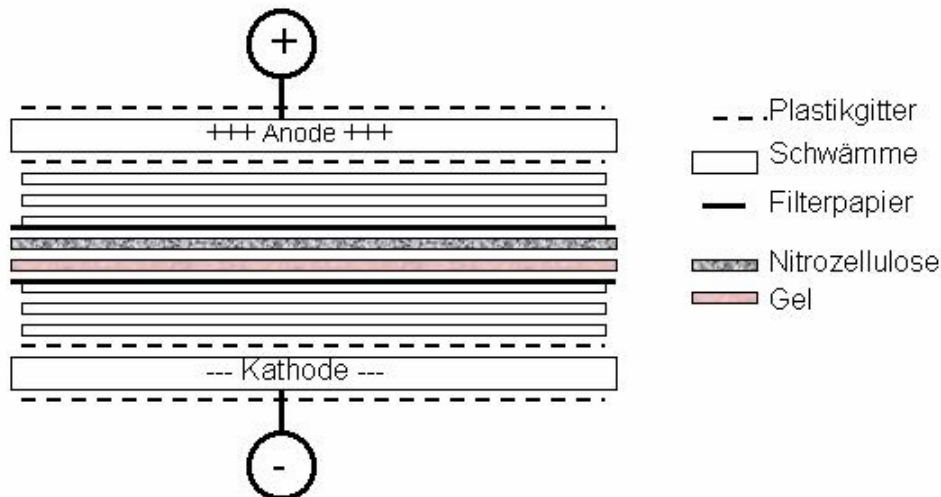


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Blot-Sandwich für das Elektro-Blot Verfahren

Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus [25]

Lösung A, verstärktes Luminol Reagenz

Lösung B, oxidierendes Reagenz

Der auf der Nitrozellulose-Membran gebundene Antikörper wurde über eine verstärkte Chemilumineszenzreaktion (ECL) sichtbar gemacht. Die Reaktion basiert auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol. Durch Kombination der Peroxidase und dem Lumigen PS-3 entstehen Acridinium Ester Intermediate. Diese Intermediate reagieren unter leicht alkalischen Bedingungen mit Peroxid und produzieren eine lang anhaltende Chemilumineszenz hoher Intensität. Das emittierte Licht ruft auf einem Röntgenfilm eine Schwarzfärbung hervor.

Die Lösungen A und B wurden nach Kit-Anleitung im Verhältnis 1:1 gemischt und ergaben die Detektionslösung. Die Membran wurde für eine Minute bei Raumtemperatur in eine Plastikschiene mit der Lösung gelegt und danach leicht trockengetupft. Die Nitrozellulose-Membran wurde in Plastikfolie luftblasenfrei eingepackt und im Dunkeln mit Röntgenfilm [14] in eine Röntgenkassette ohne Verstärkerfolie gelegt. Die Belichtung erfolgte nach Abhängigkeit des Signals zunächst für fünf Minuten. Der Film wurde dann für zwei bis fünf Minuten ins Entwicklerbad [22] gelegt, kurz mit Wasser abgewaschen und für zwei bis drei Minuten fixiert, gewaschen und getrocknet. Reichte das Signal auf dem Film nicht aus, so konnte der Vorgang mit einer längeren Belichtungszeit wiederholt werden.

3.2.10. Physiologische Messungen

3.2.10.1. Efflux-Messungen

Das Chemotherapeutikum Doxorubicin [34] ist fluoreszierend und kann am konfokalen Mikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 543 nm mit dem 0,5 mW Helium-Neon-Laser und einem Emissionsfilter LP 570 nm gemessen und quantifiziert werden. Doxorubicin wurde in den Versuchen in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Da Doxorubicin ein Ligand aller zu untersuchenden Resistenz-Proteine darstellte, konnte man in resistenten Sphäroiden eine geringere Akkumulation als in nicht-resistenten MTS erwarten. Kleine, mittlere und große MTS der Zelllinie DU-145 wurden für 60 Minuten im Zellkulturmedium mit Doxorubicin bei 37°C im Brutschrank [13] [16] beladen.

Mit dem konfokalen Laserrastermikroskop konnte die Doxorubicin-Fluoreszenz in einer optischen Schnittebene von 10 μm Dicke in einer Gewebetiefe von 60-80 μm bestimmt werden (Uptake-Wert). Anschließend wurde Doxorubicin mit F10-Medium sorgfältig entfernt und die Fluoreszenz nach einer, zwei und drei Stunden erneut ermittelt (Efflux 1h, 2h, 3h). Dieser Ansatz diente dem Zeitverlauf des Effluxes von Doxorubicin in MTS.

3.2.10.2. Efflux-Messungen mit revertierenden Substanzen

Diese Messungen dienen dem funktionellen Nachweis von P-Gp, MRP und LRP. Für die Versuche mit MDR-revertierenden Substanzen wurden kleine (2-6d, \varnothing 40-180 μm), mittlere (7-16d; \varnothing 200-400 μm) und große (17-30d; \varnothing >400 μm) DU-145 Sphäroide, sowie Sphäroide der Zelllinie A-549 und DU-Nox in vergleichbarem Alter verwendet.

Die MTS wurden in drei ml Medium mit Doxorubicin und der jeweiligen revertierenden Substanz für eine Stunde inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Doxorubicin inkubiert. Nach 60 Minuten konnten die behandelten MTS am CLSM [37] untersucht werden, um den Uptake-Wert zu messen. Danach wurden die Sphäroide in Medium ohne Doxorubicin, aber mit der entsprechenden revertierenden Substanz umgesetzt und wiederum für zwei Stunden inkubiert. Nach zwei Stunden wurden am CLSM Bilder für den Efflux-Wert von zwei Stunden aufgenommen. Die Doxorubicin-Fluoreszenz wurde in definierter Tiefe, 60-80 μm von der Sphäroidperipherie, bestimmt.

Die Retention von Doxorubicin wurde aus dem Unterschied der Fluoreszenz vor und nach dem Entfernen des Chemotherapeutikums bestimmt und in Prozentwerte umgerechnet.

3.2.10.3. Messung der endogenen ROI-Produktion

Zur Messung der endogen produzierten ROI in MTS wurde die Substanz 2', 7'-dihydrodichlorofluorescein Diazetat (H_2DCFDA) [34] verwendet. H_2DCFDA ist lipophil und nicht fluoreszierend. Das bedeutet, dass die Substanz leicht durch die Plasmamembran in das Innere der Zellen diffundieren kann und dort durch Abspaltung des AcetatRest durch zelluläre Esterasen in 2', 7'-dihydrodichlorofluorescein (H_2DCF) umgewandelt wird. H_2DCF ist noch nicht fluoreszierend, aber polar und dadurch in der Zelle gefangen. Durch ROI wird H_2DCF innerhalb der Zelle zu 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, welches fluoresziert. Die Fluoreszenz dieser Substanz dient als Indikator für die intrazellulär generierten Radikale.

Für die Messung wurden kleine, mittlere und große MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox sorgfältig in Ca^{2+} -freier E1-Lösung gewaschen. Danach wurden die MTS in einem ml E1-Lösung mit 20 μM H_2DCFDA (gelöst in DMSO [23]) überführt. Die beschriebenen Arbeitsschritte fanden unter Ausschluss von Licht statt, da H_2DCFDA lichtempfindlich ist. Das in den Sphäroiden entstehende DCF hat ein Anregungsmaximum von 504 nm und ein Emissionsmaximum von 529 nm. Es wurde mit der 488 nm Linie eines Argon Lasers zum Fluoreszieren angeregt. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden am CLSM alle fünf Minuten Bilder mit einem Langpassfilter LP 515 nm der MTS aufgenommen, um eine Kinetik des Fluoreszenzanstieges zu ermitteln.

3.2.10.4. Messung der endogenen ROI-Produktion unter Anwendung von spezifischen Blockern

Wie oben beschrieben, wurden kleine, mittlere und große MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox vor der Überführung in H_2DCFDA und Ca^{2+} -freier E1-Lösung eine Stunde mit DPI [34] oder AEBSF [34] inkubiert. Danach erfolgte die Messung des Fluoreszenzanstieges wie beschrieben.

3.2.11. Effekt von Sauerstoffradikalfängern auf die Expression von P-Gp und Hif-1 α

Junge Tumorsphäroide (2-3 d) der Zelllinien DU-145 und DU-Nox wurden für eine Woche mit den Antioxidantien Trolox [34] und Vitamin C [34] - die Kontrollgruppe nur mit Medium - inkubiert. Nach einer Woche wurden die 9 -10 Tage alten Sphäroide geerntet und mit den Antikörpern gegen P-Gp [4] und Hif-1 α [1] gefärbt (Beschreibung siehe Fluoreszenz-Immuncytochemie). Danach wurden am CLSM [37] Bilder aufgenommen und anschließend quantifiziert.

3.3. Statistik

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal unter gleichen Bedingungen durchgeführt (n steht für die Anzahl der voneinander unabhängigen Versuche), dabei wurden pro Versuch mindestens 30 MTS ausgewertet. Bei mehreren Messreihen mit unterschiedlicher Anzahl von Einzeldaten wurden die Mittelwerte gewichtet und ein Mittelwert der gewichteten Mittelwerte aller durchgeführten Messreihen gebildet. Der Fehler wurde aus der gewichteten, mittleren, quadratischen Abweichung berechnet. Die Signifikanz der Versuche wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten „*Students t-Test*“ geprüft (GraphPad Software Inc.). Als signifikant (*) gekennzeichnet wurde eine Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$, als sehr signifikant (**) $p < 0,01$ und als überaus signifikant (***) ein $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1. Das Wachstumsverhalten von MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox

Um das Wachstum der multizellulären Tumorsphäroide zu erfassen, wurden jeden zweiten Tag Sphäroide aus der Spinner-Flaschen-Kultur entnommen und Transmissionsbilder am CLSM aufgenommen. Ein Transmissionsbild durchleuchtet die MTS. Ein Teil des Lichtes wird durch das Sphäroid absorbiert, der andere Teil durchbricht das Objekt. Die quantitative Erfassung des Größenwachstums erfolgte über einen Zeitraum von 30 Tagen. MTS der Zelllinie DU-145 besaßen an dem jeweilig gemessenen Zeitpunkt immer einen durchschnittlich größeren Durchmesser als Sphäroide der anderen beiden Zelllinien. In Abbildung 4.1 ist zu sehen, dass das Größenwachstum der MTS der Zelllinie A-549 zunächst nahezu parallel mit demjenigen der Zelllinie von DU-145 verlief, ab Tag 20 blieben diese Sphäroide in ihrer Größe jedoch zurück. MTS der Zelllinie DU-Nox waren zu allen Zeitpunkten kleiner als MTS der anderen beiden Zelllinien.

Die Größenzunahme der Sphäroide gleicht einem linearen Wachstum. MTS der Zelllinie DU-Nox weisen erhebliche Größenunterschiede mit zunehmendem Alter auf, da sie die Tendenz haben, Zellen an der Peripherie abzulösen und nicht, wie MTS der Zelllinie DU-145, kompakte, gleichmäßige Sphäroide zu bilden (vgl. Arbiser et al. 2002).

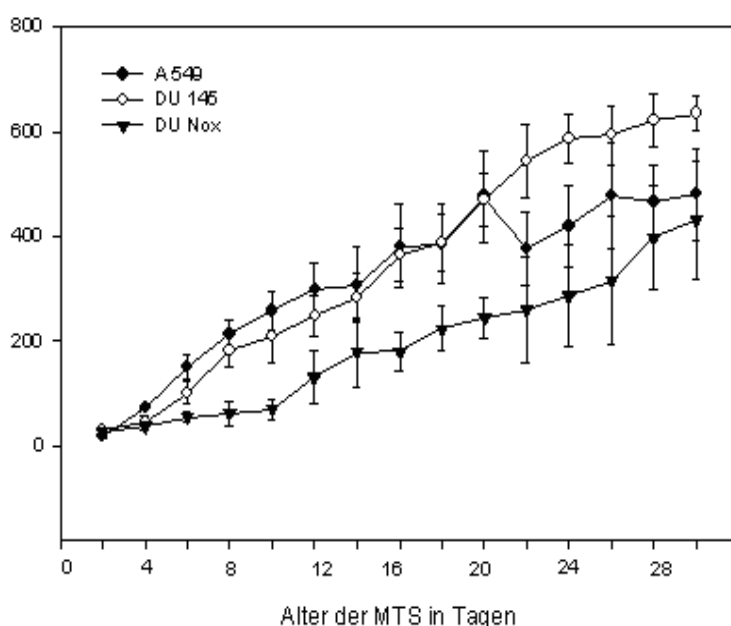


Abb. 4.1: Altersabhängige Wachstumskinetik der drei Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox (n=3; pro Versuch wurden 30 Zellen ausgewertet) Sphäroiddurchmesser in µm versus Alter in Tagen

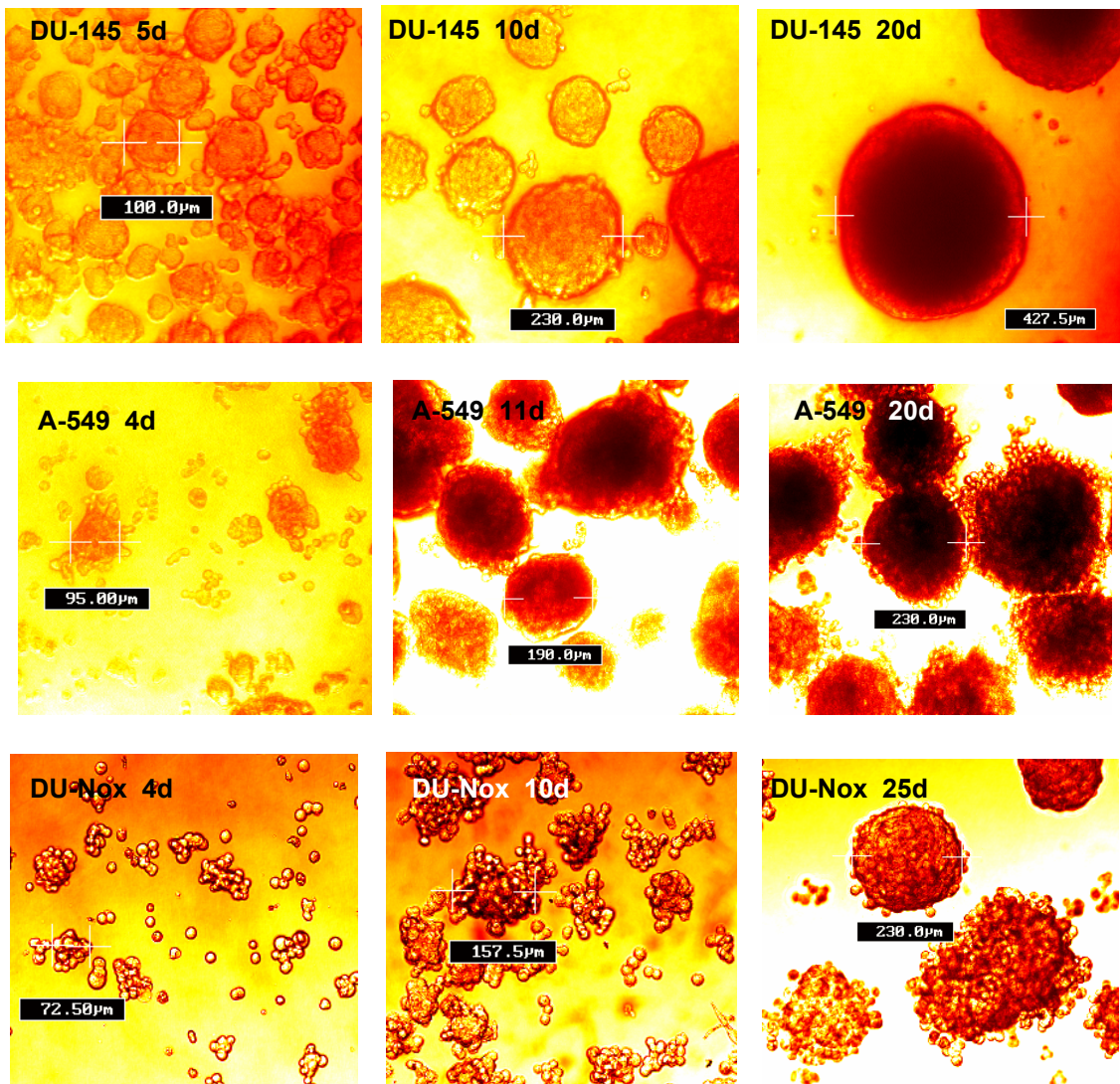


Abb. 4.2:

Transmissionsbilder von MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox der drei verschiedenen Altersgruppen. Spalte 1 zeigt kleine, stark proliferative Sphäroide (1-6d); Spalte 2 hauptsächlich ruhende Sphäroide mittlerer Größe (7-16d); Spalte 3 große Sphäroide mit teilweise nekrotischem Zentrum (17d-30d)

Die Tumorsphäroide können in drei verschiedene Altersgruppen eingeteilt werden: kleine, proliferative MTS (1-6d), mittelgroße MTS (7-16d) und große MTS mit Nekrose-zentrum (17-30d).

4.2. Expression des Proliferationsmarker Ki 67 in MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox

Mit zunehmendem Alter der MTS nimmt das Volumenwachstum ab. Der Hauptgrund für die Verlangsamung des Wachstums ist eine schlechtere Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im Zentrum der Sphäroide. Wegen dieser Vorgänge sinkt auch die Anzahl der proliferativen Zellen im Sphäroid. MTS der Zelllinie DU-Nox wird eine hohe Proliferationsrate attestiert, da Nox1 reaktive Sauerstoffradikale produziert, die zu einer vermehrten Angiogenese und damit erhöhten Vaskularisation führen

(Arbiser et al. 2002). Im Wachstumsversuch *in vitro* blieben MTS von DU-Nox in ihrer Größe gegenüber den anderen beiden Zelllinien jedoch zurück.

Um den Anteil proliferativer Zellen im Sphäroid zu bestimmen, wurde der Proliferationsmarker Ki 67 eingesetzt und MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox in verschiedenen Alters- und Größenklassen immunocytochemisch aufgearbeitet.

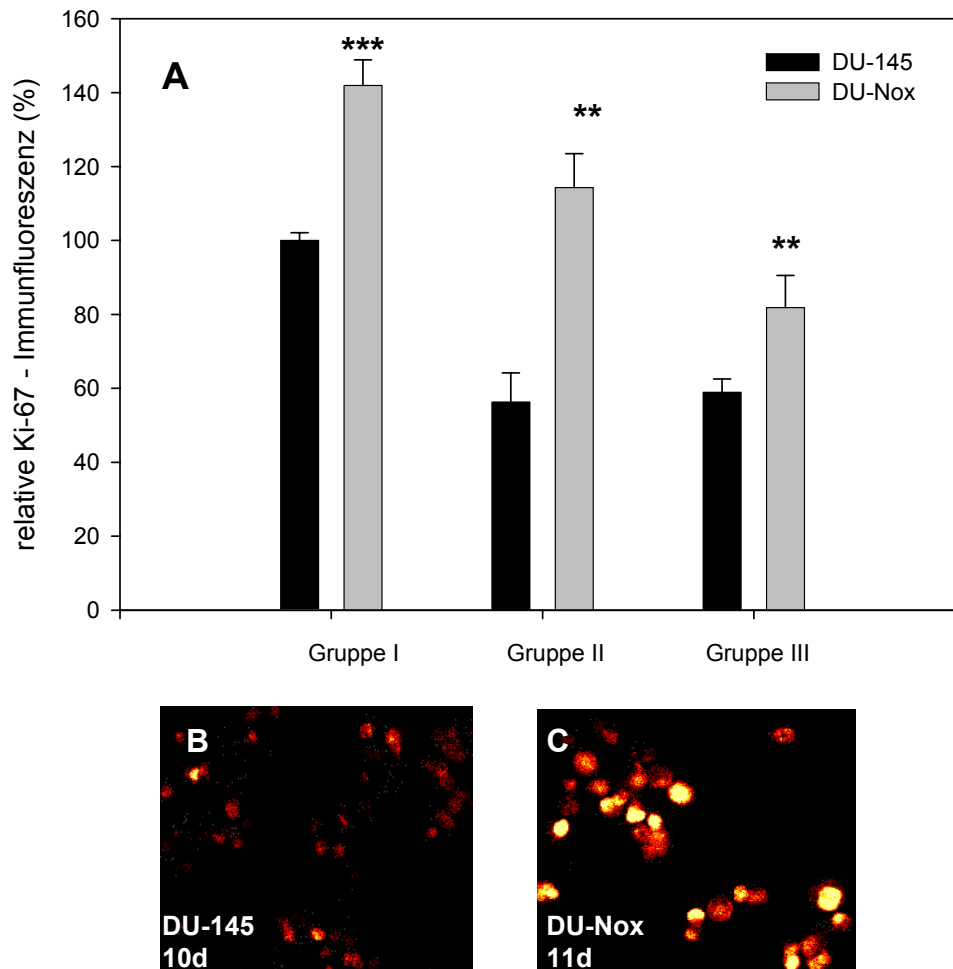


Abb. 4.3:

(A) zeigt die Ki 67-Proteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die Ki 67-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. Innerhalb der jeweiligen Altersgruppe wurde DU-Nox mit DU-145 verglichen. Die quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie verdeutlichen eine erhöhte Expression des Proteins in MTS der Zelllinie DU-Nox in allen drei Altersgruppen. Gruppe I= 1-6d; Gruppe II= 7-16d; Gruppe III= 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

(B)-(C) Repräsentative Bilder der Immuncytochemie für die Expression von Ki 67 in Gruppe II. In (B) und (C) sind einzelne Zellen zu sehen, da die MTS vor dem Einsatz des Antikörpers mit Trypsin / EDTA behandelt wurden.

Ki 67 ist ein Antikörper, der die Zellkerne von Zellen, die sich nicht in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden markiert. Abbildung 4.3 zeigt, dass DU-Nox Sphäroide in jeder Altersklasse den höheren Anteil an proliferativen Zellen besaßen. Beide Zelllinien wiesen in der ersten Gruppe die höchste Anzahl an proliferierenden Zellen auf.

4.3. Das Expressionsmuster der Cytostatika-Transporter in MTS von DU-145, A-549 und DU-Nox

In der malignen Prostatakarzinom Zelllinie DU-145, die in Monolayer-Kulturen gezüchtet werden, wird eine signifikante P-Gp Expression vor dem Einsatz von chemo-therapeutischen Medikamenten nicht gefunden, dafür aber nach dem Einsatz von Doxorubicin (David-Beabes et al. 2000).

Eine Expression von MRP ist jedoch schon vor einem Gebrauch von Chemo-therapeutika vorhanden, so dass man hier nicht von einer erworbenen Resistenz sprechen kann.

Die LRP-Expression ist in Prostata-Zelllinien sehr unterschiedlich ausgeprägt (David-Beabes et al. 2000). Es wurde eine Tumorzelllinie gesucht, die ein möglichst gegensätzliches Expressionsmuster der MDR-Proteine als DU-145 hat. Die Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie A-549 besitzt eine hohe Expression von LRP und eine moderate Expression von MRP (Berger et al. 2000). Die Induktion der Resistenz durch das Medikament Etoposid brachte eine parallel verlaufende Steigerung der Expression des MRP-Gens und eine Erniedrigung der Expression des LRP-Gens. P-Gp wurde in dieser Zelllinie nicht exprimiert (Trussardi et al. 1998).

Das Expressionsmuster von MDR-Proteinen in der Zelllinie DU-Nox war bisher noch nicht bekannt.

4.3.1. Expression von P-Gp in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox

Für die drei Zelllinien wurde P-Gp jeweils für kleine, mittlere und große Sphäroide der drei Altersgruppen (I-III) immunocytochemisch mit dem spezifischen P-Gp Antikörper Ab-1 nachgewiesen. In den Abbildungen 4.4.1-3 ist deutlich zu sehen, dass die Zelllinie DU-145 die höchste Expression von P-Gp aufwies. Die Expression von P-Gp ist in MTS jedoch nicht statisch, sondern im Bezug auf das Alter der Sphäroide unterschiedlich stark ausgeprägt. In MTS der Zelllinie DU-145 stieg die Expression mit dem Grad der

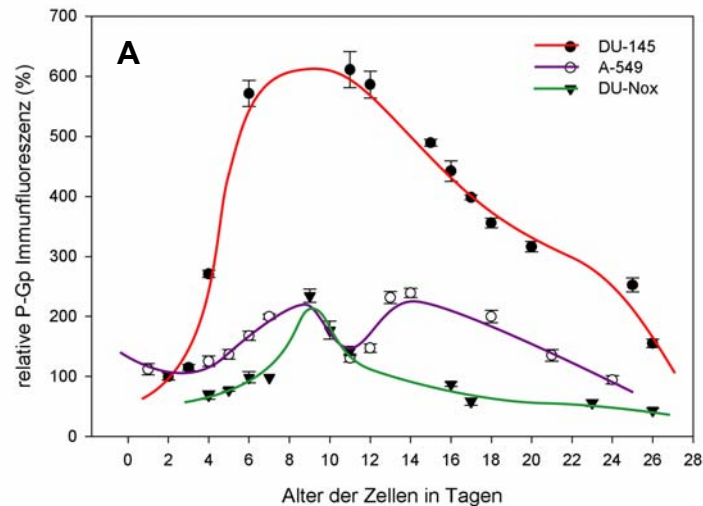


Abb. 4.4.1:

(A) stellt die P-Gp-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinsten MTS der Zelllinie DU-145 (100%) für die drei Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox dar.

Sphäroidbildung stetig bis Tag 12 an und fiel danach wieder ab. Für die beiden anderen Zelllinien war im mittleren Alter ebenfalls ein leichter Anstieg von P-Gp zu vermerken, der aber gegenüber dem der DU-145 MTS wesentlich geringer war. Membranstrukturen ließen sich in der Färbung nicht deutlich erkennen, obwohl P-Gp ein membranständiges Protein ist. Diese diffuse Färbung ist schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden (Germann et al. 1993; Kuchler & Thorner 1992) und entsteht möglicherweise, weil P-Gp sich nicht nur innerhalb der Plasmamembran verteilt, sondern auch in den Membranen intrazellulärer Organellen.

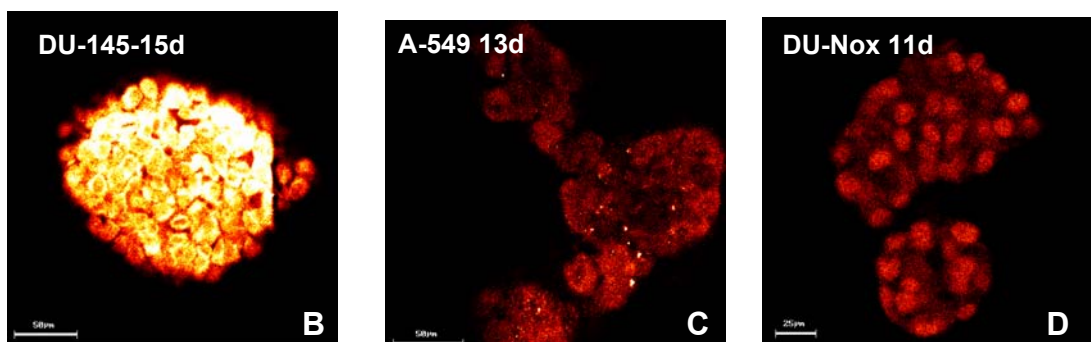


Abb. 4.4.2:

(B)-(D) Repräsentative Bilder des immunocytochemischen Nachweises für P-Gp in Gruppe II. (B) zeigt einen 15 Tage alten DU-145-Sphäroid, (C) einen 13 d alten A-549-Sphäroid und (D) zwei 11 Tage alte DU-Nox-Sphäroide.

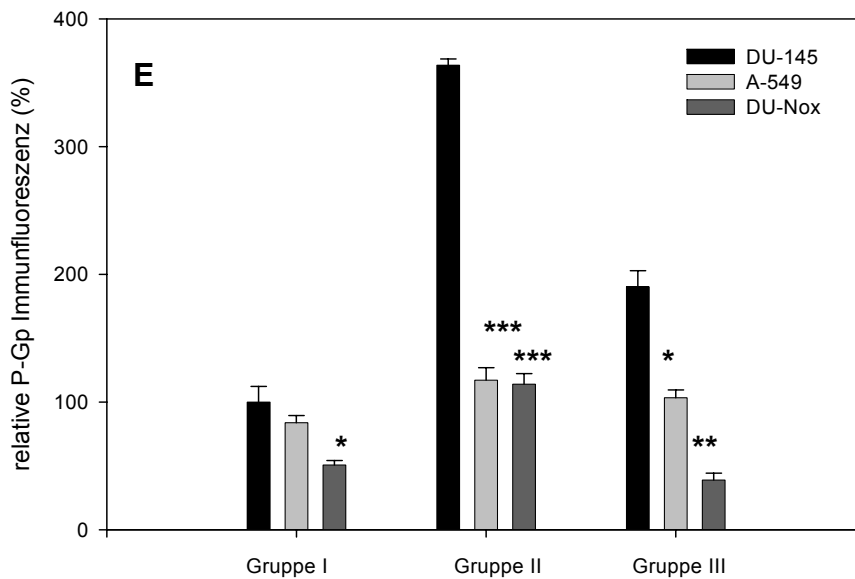


Abb. 4.4.3:

(E) zeigt die P-Glykoproteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die P-Gp-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox wurden innerhalb einer Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. Die quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie verdeutlichen eine erhöhte Expression des Proteins bei mittleren MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe II); MTS der Zelllinie DU-Nox besitzen eine sehr niedrige P-Gp Proteinexpression. Gruppe I = 1-6d; Gruppe II = 7-16d; Gruppe III = 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

4.3.2. Expression von MRP in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox

Für den immuncytochemischen Nachweis des MDR-Proteins MRP wurden von jeder Zelllinie kleine, mittlere und große MTS aus der Spinner-Flaschen-Kultur entnommen und mit dem Antikörper MRPr1 immuncytochemisch aufgearbeitet. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop im aminoproximalen Teil des MRP-Proteins. Die Ergebnisse zeigten war zu, dass sich die Expression von MRP in MTS der Zelllinie DU-145 invers zur Expression von P-Gp verhielt. Die MRP Expression war bei den kleinen MTS relativ hoch; bei mittleren Sphäroiden niedrig. Die großen DU-145 MTS hatten hingegen wieder eine erhöhte Expression des MDR-Proteins. MTS der Zelllinie A-549 hatten in den ersten zwei Gruppen eine gleichmäßige MRP-Expression, die dann in der dritten Altersgruppe leicht sank. Die höchste MRP-Expression wiesen MTS von DU-Nox auf. Das Expressionsmuster von MRP war hier genau gegensätzlich zur Zelllinie DU-145. Bis Tag 12 stieg die Proteinexpression an, um dann langsam wieder abzufallen. Bei diesem immuncytochemischen Fluoreszenznachweis ist deutlich zu sehen, dass MRP ein reines Plasmamembran-Protein ist (siehe Abbildungen 4.5.1-2).

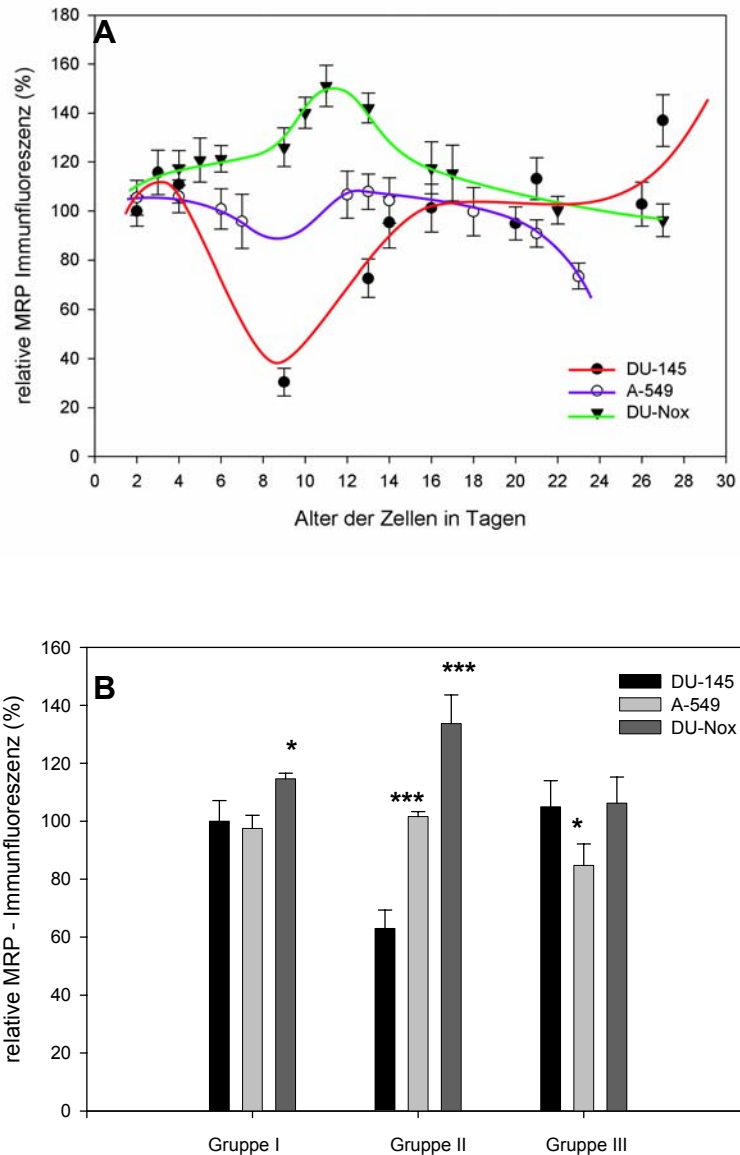


Abb. 4.5.1:

(A) stellt die MRP-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinsten MTS der Zelllinie DU-145 (100%) für die drei Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox dar.

(B) zeigt die MRP-Proteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die MRP-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox wurden innerhalb einer Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. Durch quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie wurde die höchste Expression in Gruppe II der MTS von DU-Nox ermittelt. In der gleichen Altersgruppe fand sich die niedrigste Expression bei MTS von DU-145. Gruppe I = 1-6d; Gruppe II = 7-16d; Gruppe III = 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

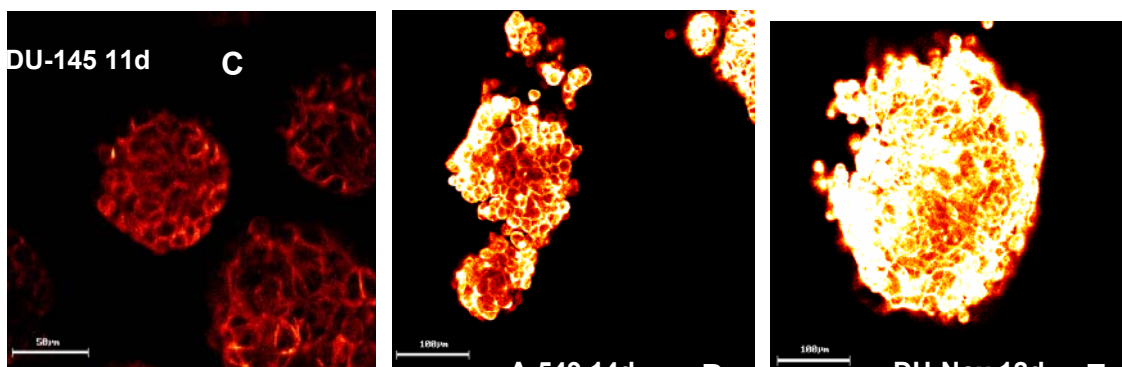
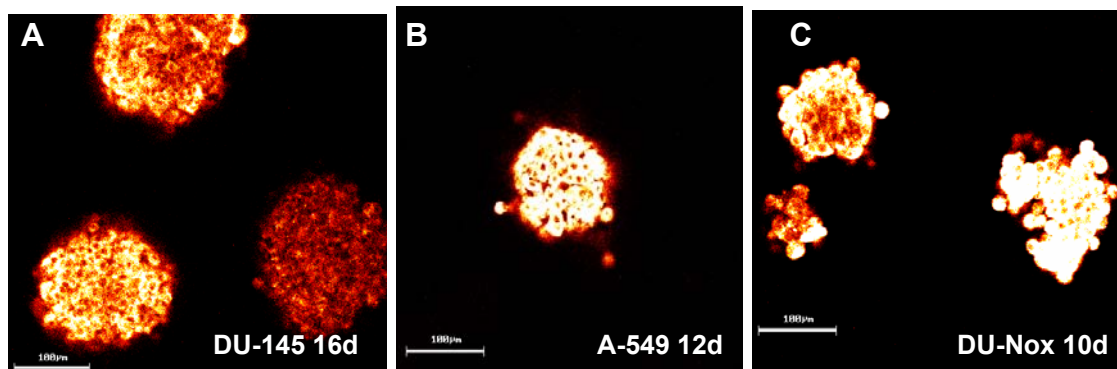


Abb. 4.5.2:

(C)-(E) Repräsentative Bilder des immunocytochemischen Nachweises für MRP in Gruppe II. (C) zeigt mehrere 11 Tage alte DU-145-Sphäroide, (D) mehrere 14 d alte A-549-Sphäroide und (E) ein 12 Tage altes DU-Nox-Sphäroid.

4.3.3. Expression von LRP in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox

Für den Nachweis des MDR-Proteins LRP wurden kleine, mittlere und große MTS der drei Zelllinien aus der Spinner-Flaschen-Kultur entnommen und immunocytochemisch aufgearbeitet.

**Abb. 4.6.1:**

(A)-(C) Repräsentative Bilder des immunocytochemischen Nachweises für LRP in Gruppe II. (A) zeigt mehrere 16 Tage alte DU-145-Sphäroide, (B) ein 12 d altes A-549-Sphäroid und (C) ein 10 Tage altes DU-Nox-Sphäroid.

Im Gegensatz zu den beiden anderen MDR-Proteinen ist die Antikörperfärbung nicht nur an der Plasmamembran zu sehen, sondern primär intracytoplasmatisch. Die Expression von LRP war in ihrer Verlaufskurve für alle drei Zelllinien ähnlich. LRP wurde zunächst nur sehr wenig exprimiert und stieg dann langsam mit zunehmendem Alter der Sphäroide an. Wenn die MTS mittleren Alters (12-14d) waren, gab es einen Wendepunkt und die LRP-Expression fiel wieder ab. Unterschiedlich und auffällig war jedoch die Intensität der Expression von LRP. MTS der Zelllinie DU-Nox exprimierten das MDR-Protein zu nahezu allen Zeiten am höchsten, gefolgt von der Zelllinie A-549. DU-145 MTS exprimierten zu fast allen Zeitpunkten sehr wenig LRP.

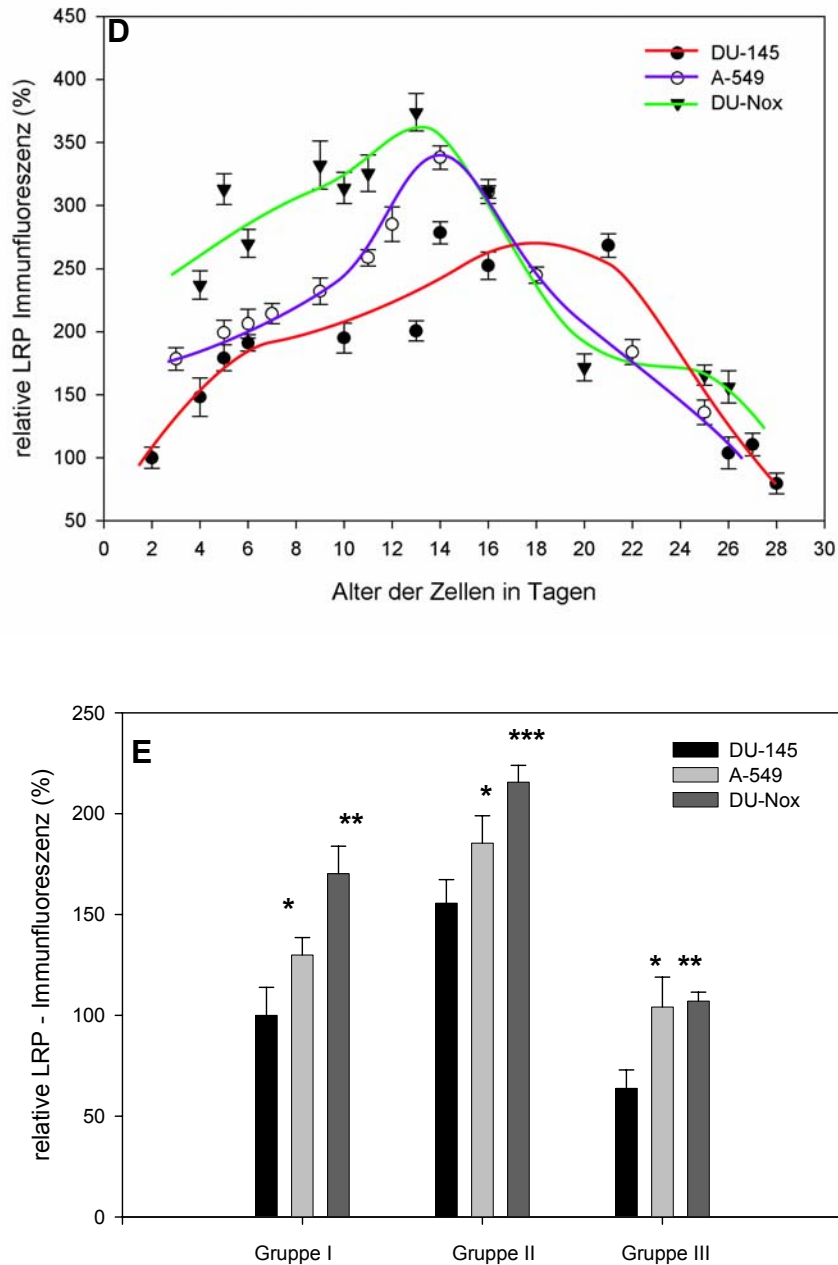


Abb. 4.6.2:

(D) stellt die LRP-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinsten MTS der Zelllinie DU-145 (100%) für die drei Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox dar.

(E) zeigt die LRP-Proteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die LRP-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox wurden innerhalb einer Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. Die quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie belegen einen jeweils sehr signifikanten Anstieg der Proteinexpression aller MTS in Gruppe II. Gruppe I = 1-6d; Gruppe II = 7-16d; Gruppe III= 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

4.3.4. Schematische Darstellung des Expressionsmuster der MDR-Proteine

Zusammenfassend wurde erkenntlich, dass die drei Zelllinien ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster von P-Gp, MRP und LRP besitzen. In Tabelle 4.1 ist dieses Muster für die drei Zelllinien schematisch dargestellt.

MTS der Zelllinie DU-145 in den Gruppen I, II und III eine wesentlich höhere P-Gp-Expression als in MTS der anderen beiden Zelllinien. MRP und LRP wurde in dieser Zelllinie jedoch nicht so hoch exprimiert. Die höchste Expression der Transportproteine MRP und LRP besaß die Zelllinie DU-Nox.

Tab. 4.1:

Schematische Übersicht der Expressionsmuster der MDR-Proteine P-Gp, MRP, LRP in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox bezogen auf P-Glykoprotein. Die MTS wurden in drei unterschiedliche Altersgruppen eingeteilt: Gruppe I = kleine Sphäroide in einem Alter von 2-6d; Gruppe II = mittelgroße Sphäroide in einem Alter von 7-16d; Gruppe III = große Sphäroide in einem Alter von 17-30d
+ entspr. Δ 0-100%; ++ entspr. Δ 100-300%; +++ entspr. $>\Delta$ 300%

DU-145	P-Gp	MRP	LRP	A-549	P-Gp	MRP	LRP	DU-Nox	P-Gp	MRP	LRP
Gr. I 2-6d	Referenz-Wert	+	+		+	+	++		+	+	++
Gr. II 7-16d	+++	(+)	++		++	+	++		++	+(+)	++(+)
Gr. III 17-30d	++	+	+(+)		+	(+)	+(+)		+	+	+(+)

4.3.5. Nachweis von P-Gp mittels Western Blot

Um einen weiteren Hinweis für den unterschiedlichen Gehalt an P-Gp der drei Zelllinien zu bringen, wurden MTS der Zelllinien DU-145 und A-549 der zweiten Gruppe (7-16d) mittels Western Blot Analyse hinsichtlich der P-Gp Expression verglichen. Es wurde der gleiche Antikörper verwendet, der auch schon in den immunocytochemischen Färbungen gegen P-Gp angewendet wurde. In Abbildung 4.7 ist deutlich zu sehen, dass bei identisch aufgetragener Proteinmenge die immunologische Darstellung der Protein-Banden für P-Gp bei DU-145 wesentlich deutlicher waren, als für MTS der Zelllinie A-549. Als interner Standard und zum Beweis, dass in jeder Probe die gleiche Proteinmenge vorhanden war, erfolgte eine Markierung mit dem Antikörper gegen Tubulin (=“house keeping gene“).

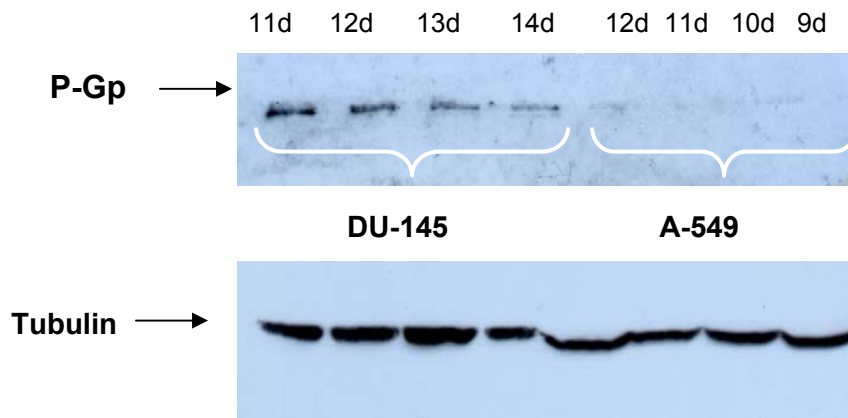


Abb. 4.7:

Western Blot mittlerer MTS der Gruppe II der Zelllinien DU-145 und A-549.

Jede Probe enthält 20 µg Protein. Der Blot wurde mit dem P-Gp Antikörper Ab-1 und einem Tubulin Antikörper gefärbt. Die Banden wurden mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

4.4. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen

4.4.1. Zeitverlauf des Effluxes von Doxorubicin in DU-145 MTS

Efflux-Versuche dienen dem funktionellen Nachweis von MDR-Proteinen. Sie zeigen, dass Tumorsphäroide in der Lage sind, mittels verschiedener MDR-Transporter die cytotoxischen Substanzen aus dem Zellinneren heraus zu befördern. Um den zeitlichen Verlauf des Effluxes von Doxorubicin nachzuweisen wurden kleine, mittlere und große MTS der Zelllinie DU-145 mit Doxorubicin inkubiert.

Doxorubicin ist ein antibiotisches Zellgift, welches hier in der Konzentration von 10 µM angewendet wurde. Es fluoresziert nach einer Anregung mit der 543 nm Linie eines Helium-Neon Lasers. Der Transport von Doxorubicin durch MDR-Proteine kann anhand von Fluoreszenzänderungen gut evaluiert werden. Die Kinetiken der Doxorubicin Aufnahme und Abgabe (Doxorubicin-Zeitverlauf) sind in unserer Arbeitsgruppe an MTS der Zelllinie DU-145 in verschiedenen Altersgruppen untersucht worden (Wartenberg et al. 1998). Demnach akkumulieren kleine Sphäroide in einer Zeit von 60 Minuten (Uptake-Wert) mehr Doxorubicin als große MTS.

Des Weiteren sind große DU-145 MTS in der Lage die cytotoxische Substanz schneller aus dem Zellinneren zu entfernen, als jüngere, kleine MTS (Wartenberg et al. 1998). Zur Überprüfung dieser Versuche wurden die Zeitverlaufskurven der Doxorubicin-Extrusion in den drei Altersgruppen von MTS der Zelllinie DU-145 wiederholt (siehe Abbildung 4.8).

Nach optischer Ermittlung des Uptake-Wertes wurde Doxorubicin durch die Applikation von F10-Medium entfernt und danach dreimal in einstündigem Abstand

die Doxorubicin-Retention der Sphäroide aufgenommen. Allen Kurven gemein war, dass nach zweistündigem Efflux der größte Teil des Doxorubicin aus dem Zellinneren transportiert war. Dieser Zeitpunkt wurde als Standard für die weiteren Untersuchungen mit revertierenden Substanzen genutzt. Sphäroide der Gruppe I und II transportierten Doxorubicin schneller als MTS der Gruppe III.

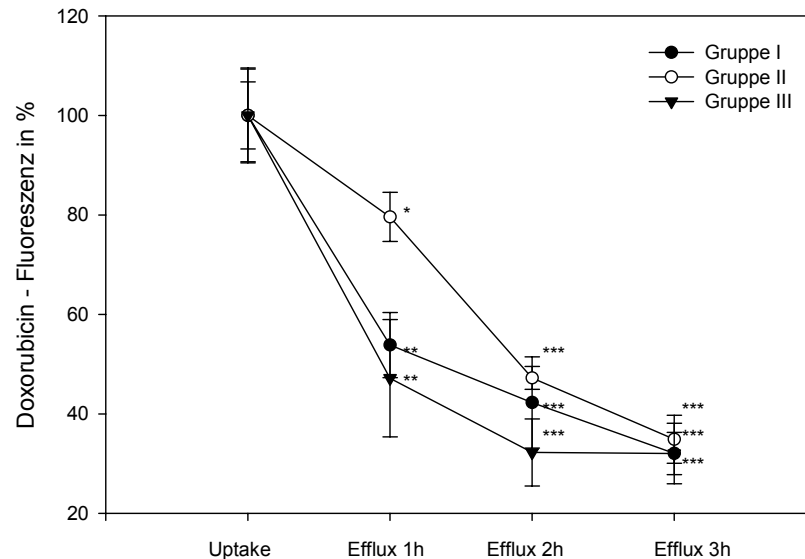
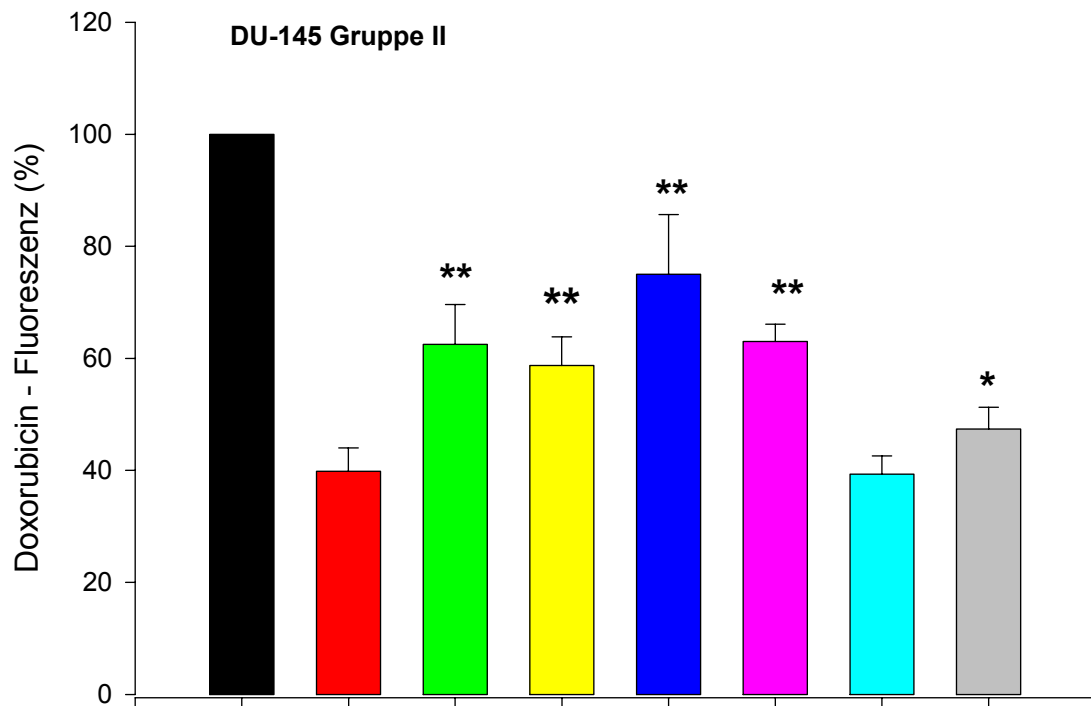
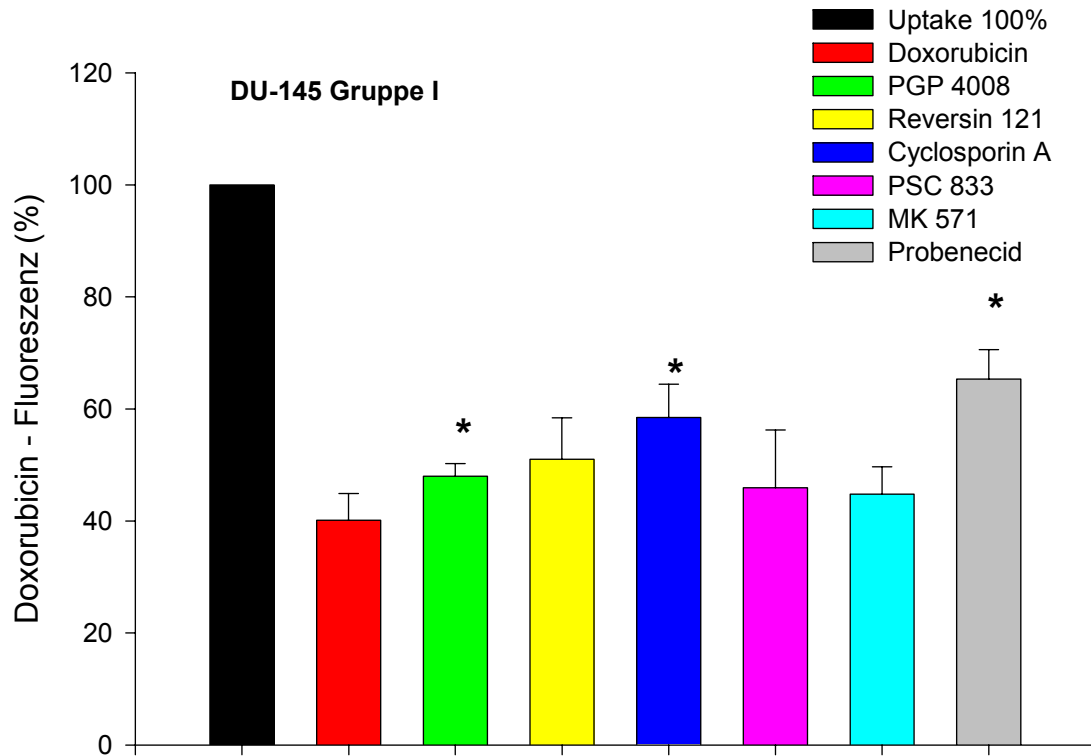


Abb. 4.8:

Zeitverlaufskurven für Aufnahmen und Efflux von Doxorubicin (10 μ M) für MTS der Zelllinie DU-145 (n=3). Es wurden Sphäroide der drei verschiedenen Altersgruppen genutzt. Pro Versuch wurden 30 MTS quantifiziert (n=3). Die Efflux-Werte 1h, 2h und 3h wurden innerhalb der jeweiligen Altersgruppe mit dem Uptake-Wert verglichen. Gruppe I = 1-6d; Gruppe II = 7-16d; Gruppe III= 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

4.4.2. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie DU-145

P-Gp, MRP und LRP sind funktionelle, membran-intrinsische Transportproteine, die in der Lage sind, cytotoxische Substanzen aus dem Zellinneren auszuschleusen und somit den gewünschten, zelltötenden Effekt zu unterbinden. Efflux-Versuche mit revertierenden Substanzen demonstrieren, dass es Inhibitoren gibt, die in der Lage sind, die Funktion der MDR-Transporter zu hemmen. Um diese Funktionalität zu überprüfen, wurden Efflux-Versuche mit spezifischen revertierenden Substanzen an MTS der Zelllinie DU-145 in drei verschiedenen Altersgruppen unternommen.



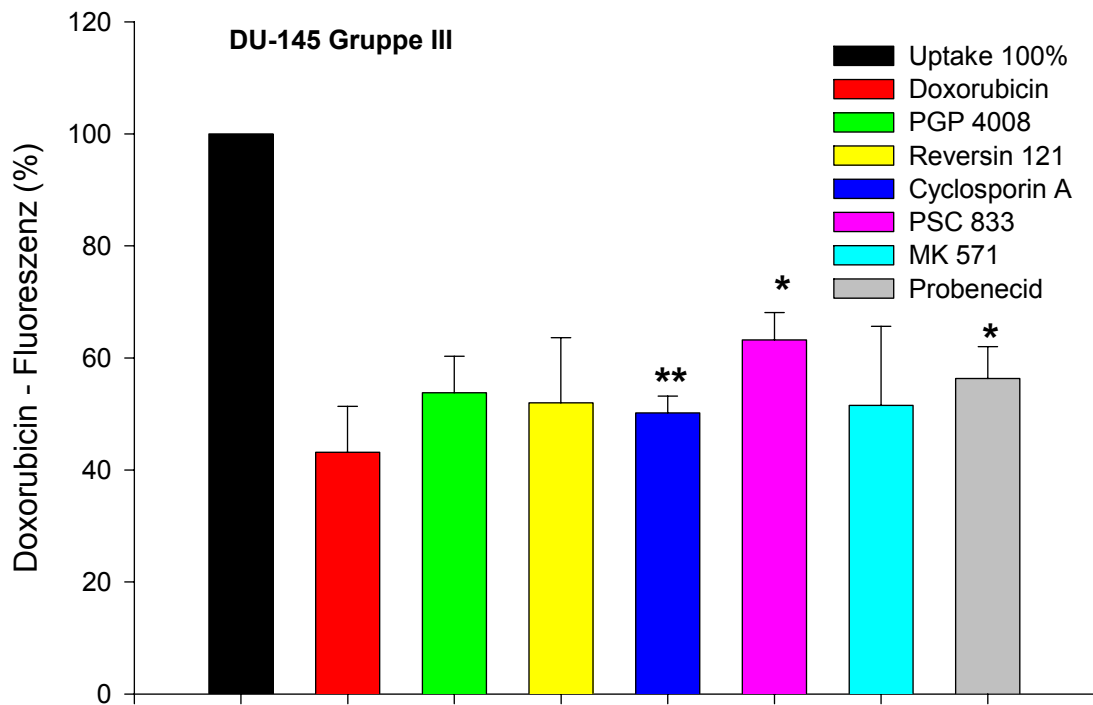


Abb. 4.9:

Die Retentionskraft von spezifischen revertierenden Substanzen im Hinblick auf das Chemotherapeutikum Doxorubicin. MTS der Zelllinie DU-145 wurden mit der jeweiligen revertierenden Substanz und Doxorubicin für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Doxorubicin-Fluoreszenz mit dem CLSM aufgenommen und quantifiziert = Uptake-Wert (n=3; pro Versuch 30 MTS). Dargestellt ist der Efflux-Wert von Doxorubicin zwei Stunden nach dem Entfernen dieser und der jeweiligen revertierenden Substanz. Der Uptake-Wert wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Kontrollwert von Doxorubicin ohne den Einsatz von jeglicher revertierender Substanz. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

Die Inkubation der MTS erfolgte für eine Stunde mit 10 µM Doxorubicin und der jeweiligen revertierenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach optischer Ermittlung des Uptake-Wertes wurde, wie bei den Zeitverlaufskurven, das Doxorubicin mit F10-Medium entfernt und die MTS nochmals für zwei Stunden mit der jeweiligen revertierenden Substanz inkubiert. Der Efflux-Wert zwei Stunden nach dem Entfernen von Doxorubicin wurde in Prozent angegeben und ist ein Zeichen für die Retentionskraft der jeweiligen revertierenden Substanzen verglichen mit dem Uptake-Wert (100%). Die Ergebnisse für alle drei Altersgruppen sind in Abbildung 4.9 zu sehen.

Die Substanzen PGP 4008 (20 µM), Cyclosporin A (30 µM) und Probenecid (200 µM) hemmten den Efflux von Doxorubicin bei kleinen, proliferativen MTS signifikant.

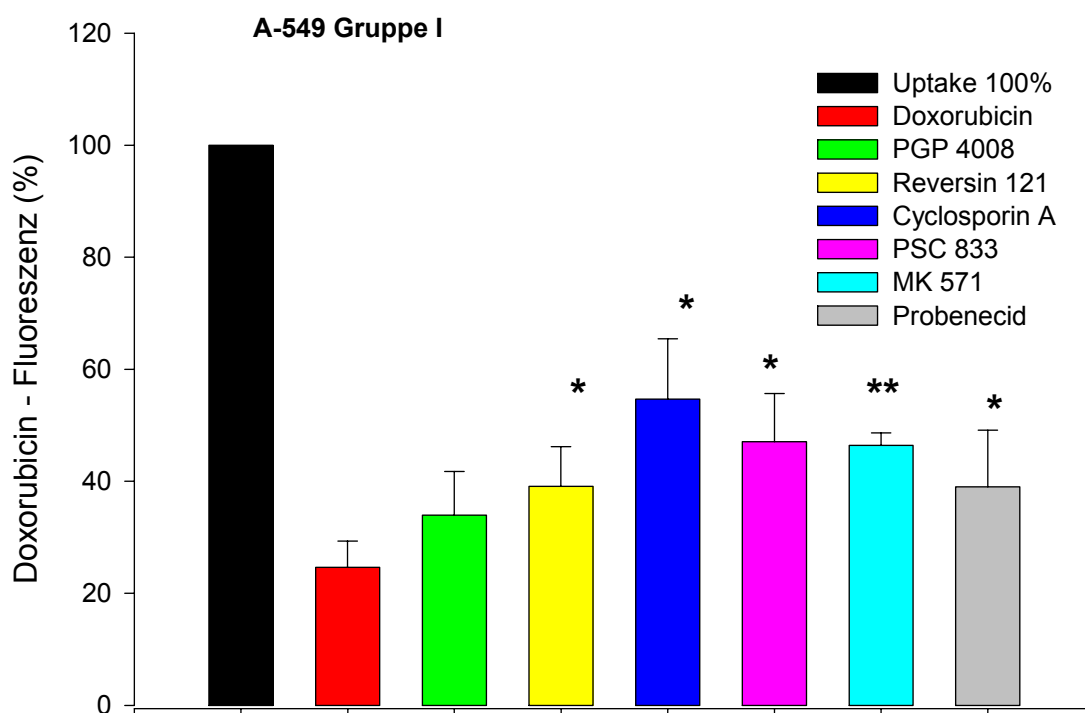
Die mittlere Gruppe zeigte von allen Altersgruppen das effizienteste Ansprechen auf revertierende Substanzen. Zu den oben genannten Substanzen kamen Reversin 121 (20 μ M) und PSC 833 (30 μ M).

Die großen MTS zeigten wieder ein reduziertes Ansprechen auf revertierende Substanzen. Signifikant wirksam waren hier nur PSC 833 (30 μ M) und Probenecid (200 μ M). In allen drei Altersgruppen war der MRP-spezifische Inhibitor MK 571 (50 μ M) nicht signifikant wirksam.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirksamkeit von revertierenden Substanzen in direktem Zusammenhang mit dem Expressionsmuster von MDR-Proteinen steht. Die Effektivität einer revertierenden Substanz hängt auch vom Alter der MTS und dem damit zusammenhängenden Proliferationsstatus ab.

4.4.3. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie A-549

Die gleichen Versuche zum funktionellen Nachweis von MDR-Transportern wurden auch mit MTS der Zelllinie A-549 unternommen. In den gleichen Altersgruppen wie schon bei DU-145 wurden die selben revertierenden Substanzen eingesetzt. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der drei Altersgruppen im Vergleich.



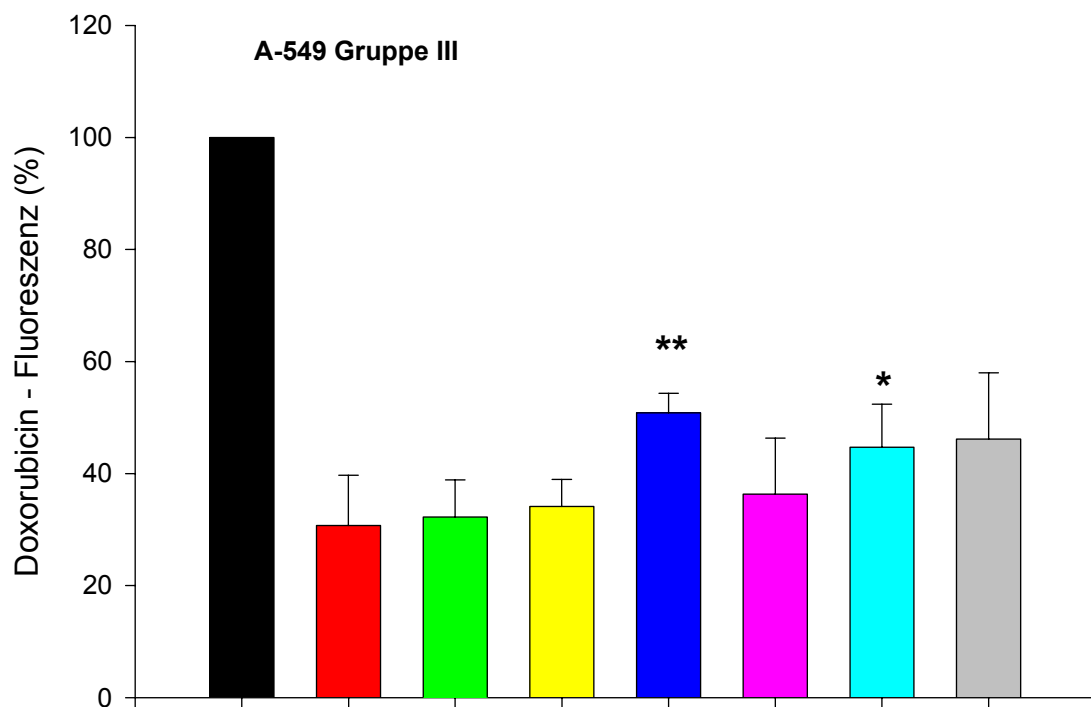
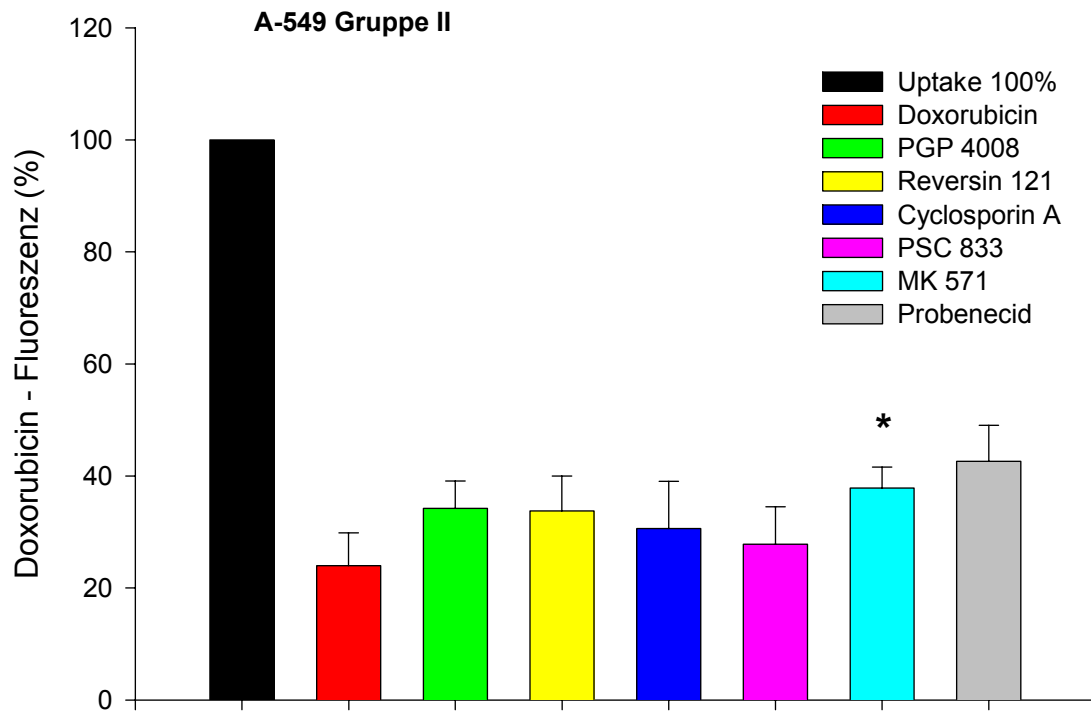


Abb. 4.10:

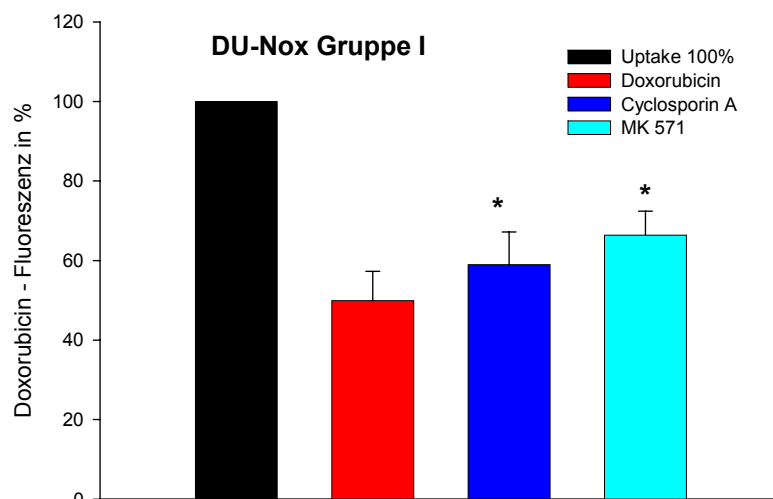
Die Retentionskraft von spezifischen revertierenden Substanzen im Hinblick auf das Chemotherapeutikum Doxorubicin. MTS der Zelllinie A-549 wurden mit der jeweiligen revertierenden Substanz und Doxorubicin für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Doxorubicin-Fluoreszenz mit dem CLSM aufgenommen und quantifiziert = Uptake-Wert (n=3; pro Versuch 30 MTS). Dargestellt ist der Efflux-Wert von Doxorubicin zwei Stunden nach dem Entfernen dieser und der jeweiligen revertierenden Substanz. Der Uptake-Wert wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Kontrollwert von Doxorubicin ohne den Einsatz jeglicher revertierender Substanz. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

Bei den kleinen MTS zeigten sich alle revertierenden Substanzen signifikant wirksam, bis auf das P-Gp spezifische PGP 4008 (20 μ M).

Weit weniger sprachen die mittleren und großen MTS auf eine Doxorubicin-Retention durch revertierende Substanzen an. Allen gemein war jedoch, dass der MRP-spezifische Inhibitor MK 571, der bei MTS der Zelllinie DU-145 keine Wirkung zeigt, hier in jeder Altersgruppe eine signifikante Retention von Doxorubicin aufwies.

4.4.4. Funktioneller Nachweis von MDR-Proteinen in MTS der Zelllinie DU-Nox

Für die Zelllinie DU-Nox wurden die bestwirksamen revertierenden Substanzen ausgesucht. In der Gruppe der P-Gp spezifischen Inhibitoren war dies Cyclosporin A (30 μ M) und von den beiden MRP-spezifischen Inhibitoren wurde MK 571 (50 μ M) eingesetzt. Sowohl bei den kleinen als auch bei den großen MTS waren beide revertierenden Substanzen signifikant wirksam, in der mittleren Altersgruppe hingegen keiner der beiden Inhibitoren (siehe Abbildung 4.11). Diese Ergebnisse korrelierten nicht mit dem Expressionsmuster der MDR-Proteine. Hier war bei den mittleren MTS von DU-Nox eine hohe Expression von MRP zu finden und gegenüber den anderen beiden Altersgruppen eine vergleichsweise höhere Expression von P-Gp. Daraus ließ sich ein potentiell hoher Einfluss von LRP auf die Ausschleusung von Doxorubicin aus dem Zellinneren in dieser Zelllinie schließen.



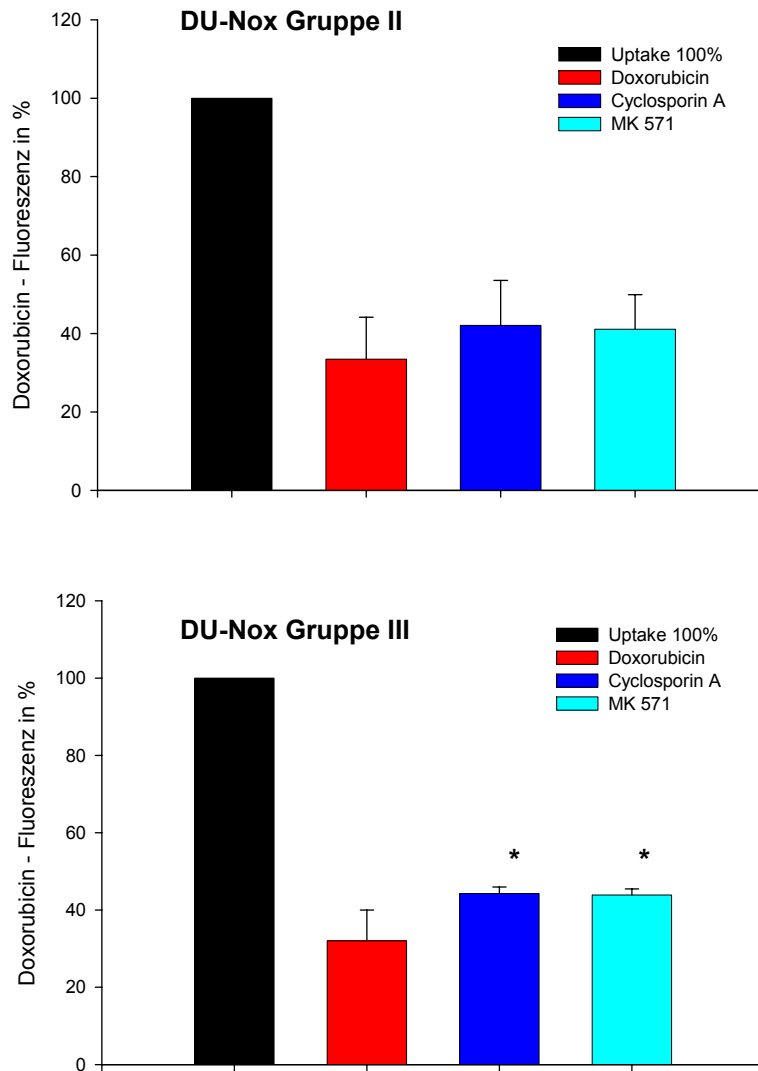


Abb. 4.11:

Die Retentionskraft von spezifischen revertierenden Substanzen im Hinblick auf das Chemotherapeutikum Doxorubicin. MTS der Zelllinie DU-Nox wurden mit nur mit Doxorubicin (10 μM) und Doxorubicin und jeweils einem spezifischen P-Gp Inhibitor (Cyclosporin A, 30 μM) und einem spezifischen MRP Inhibitor (MK 571, 50 μM) für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Doxorubicin-Fluoreszenz mit dem CLSM aufgenommen und quantifiziert = Uptake-Wert (n=3; pro Versuch 30 MTS). Dargestellt ist der Efflux-Wert von Doxorubicin zwei Stunden nach dem Entfernen dieser und der jeweiligen revertierenden Substanz. Der Uptake-Wert wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Kontrollwert von Doxorubicin ohne den Einsatz jeglicher revertierender Substanz. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

4.5. Vergleich der endogenen Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten in drei verschiedenen Zelllinien

Auch Tumorzellen sind in der Lage, reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI) zu produzieren (Bittinger et al. 1998). Diese Radikale besitzen die Fähigkeit, in verschiedenster Weise auf Zellvorgänge einzuwirken. Unter anderem beeinflussen sie die Stabilität von Proteinen und Nukleinsäuren, können in die Genexpression eingreifen und spielen eventuell eine Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen.

Die NADPH-Oxidase hat als Enzym die Fähigkeit, die Produktion von Superoxid zu katalysieren (Jones 1994, Sorescu et al. 2002).

4.5.1. Expression von gp91phox und Mox1

Um einen Überblick zu erhalten, wie hoch die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten bei den drei getesteten Zelllinien war, erfolgte der immunocytochemische Nachweis verschiedener Untereinheiten der NADPH-Oxidase.

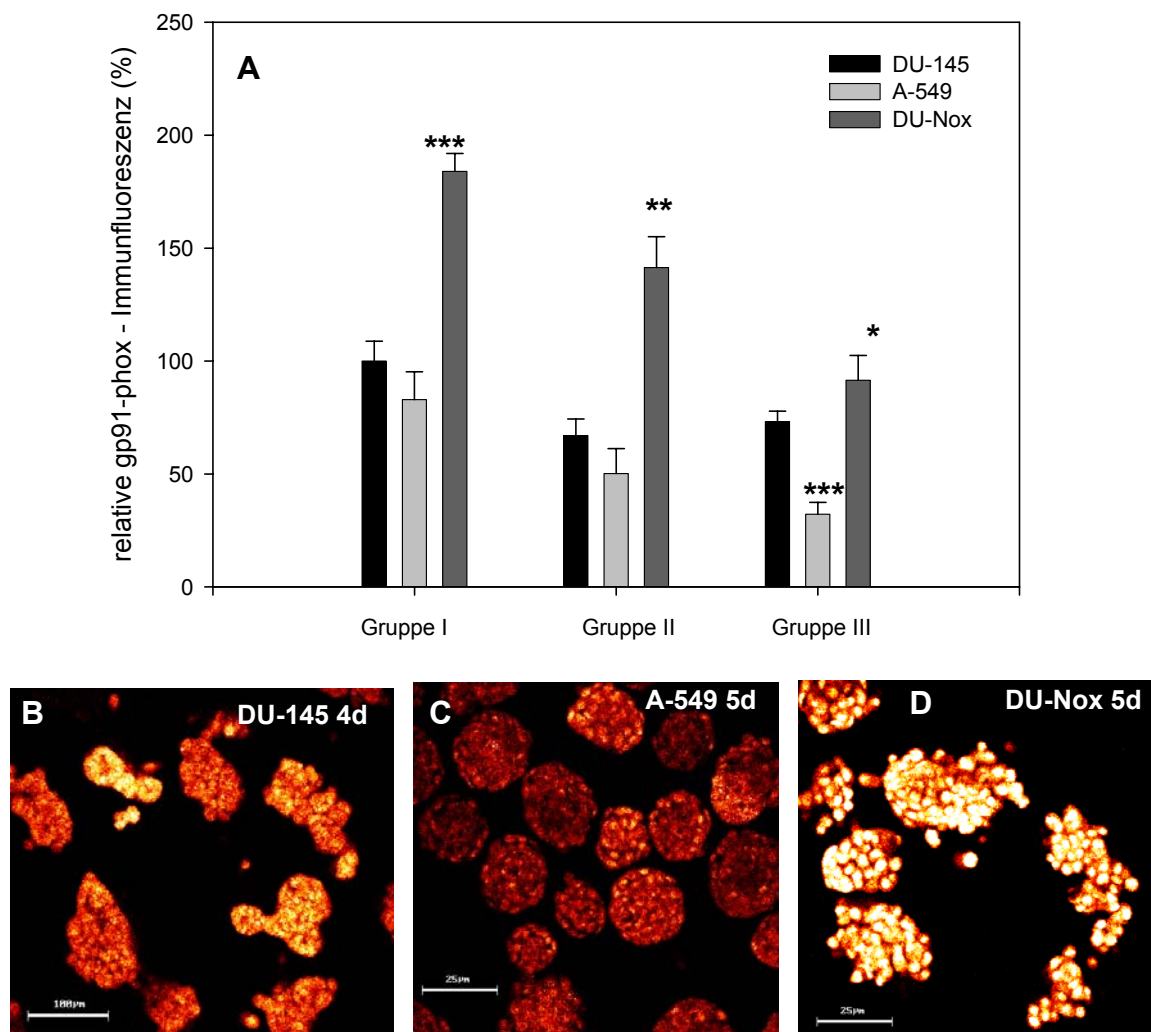


Abb. 4.12:

(A) zeigt die gp91phox-Proteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die gp91phox-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox wurden innerhalb einer Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. Die quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie zeigen eine sehr hohe Proteinexpression in MTS von DU-Nox in allen drei Altersgruppen im Gegensatz zu MTS der Zelllinie A 549. Gruppe I = 1-6d; Gruppe II = 7-16d; Gruppe III = 17-30d. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

(B) -(D) Repräsentative Bilder des immunocytochemischen Nachweises für gp91phox der Gruppe I. (B) zeigt mehrere 4 Tage alte DU-145-Sphäroide, (C) mehrere 5 d alte A-549-Sphäroide und (D) mehrere 5 Tage alte DU-Nox-Sphäroide.

So zeigte z.B. die mit Nox1 transfizierte Zelllinie DU-Nox in allen drei Altersgruppen die höchste Expression der membranständigen Untereinheit gp91phox. Mit ansteigender Aggregation der MTS ergab sich eine reduzierte immunocytochemische Nachweisbarkeit dieser NADPH-Oxidase Untereinheit in MTS der DU-Nox Zelllinie. MTS der Zelllinie A-549 verhielten sich von der Verlaufskurve ähnlich, nur mit einer weit weniger starken Expression von gp91phox.

Im Gegensatz dazu war der Verlauf der Expression bei DU-145 MTS zunächst sinkend in der mittleren Altersklasse, um dann in den großen MTS wieder leicht zu steigen. Bezüglich der Quantität der Expression von gp91phox lag die Zelllinie DU-145 noch vor MTS der Zelllinie A-549.

Um zu beweisen, dass die Zelllinie DU-Nox wirklich eine wesentlich höhere Expression des Proteins Nox1 besitzt, wurde diese Zelllinie mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. Es wurden in allen drei Altersgruppen immunocytochemische Nachweise für Nox1 durchgeführt. Die Abbildungen 4.13.1-2 zeigen, dass das Expressionsmuster mit dem von gp91phox in beiden Zelllinien vergleichbar ist.

Bei DU-Nox war eine wesentlich höhere Expression von Nox1 zu verzeichnen, die mit zunehmendem Alter der Sphäroide stetig sank. Die Zelllinie DU-145 hatte hingegen eine wesentlich niedrigere Expression des Proteins, die zunächst sank, in den großen MTS jedoch nochmals leicht anstieg.

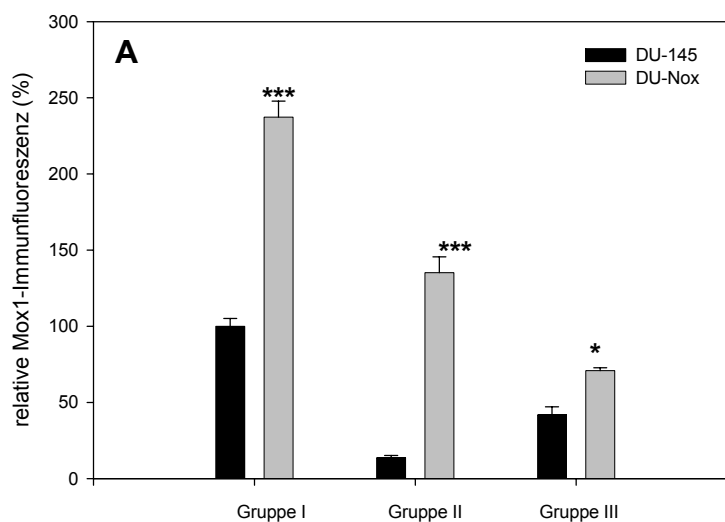


Abb. 4.13.1:

(A) zeigt die Mox1-Proteinexpression in MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox in der Spinner-Flaschen-Kultur (n=3). Dargestellt ist die Mox1-spezifische Immunfluoreszenz relativ zum Wert der kleinen MTS der Zelllinie DU-145 (Gruppe I), der auf 100% gesetzt wurde. MTS der Zelllinie DU-Nox wurden mit MTS der Zelllinie DU-145 in der jeweiligen Altersgruppe verglichen. Die quantitative Fluoreszenz-Immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie verdeutlichte eine erhöhte Expression des Proteins bei MTS der Zelllinie DU-Nox in allen drei Altersgruppen; MTS der Zelllinie DU-145 hatten eine sehr niedrige Proteinexpression. Gruppe I = 1-6d; Gruppe 2 = 7-16d; Gruppe III = 17-30d. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

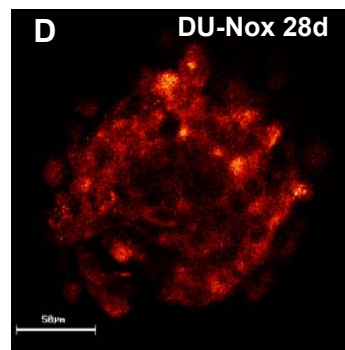
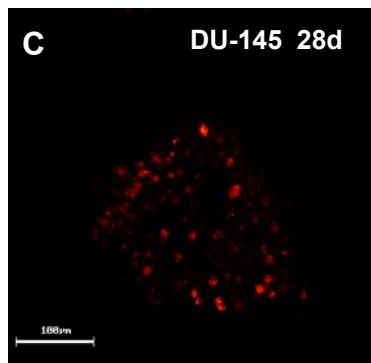
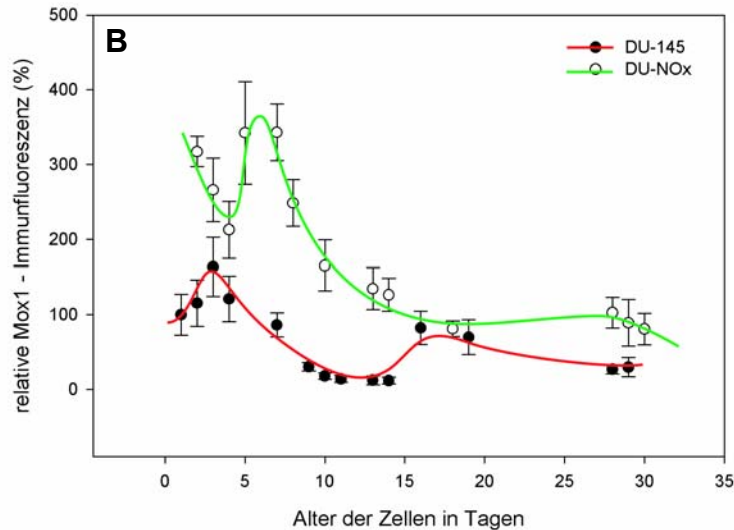


Abb. 4.13.2:

(B) stellt die relative Mox1-Immunfluoreszenz zum Wert der kleinsten MTS der Zelllinie DU-145 (100%) für die beiden Zelllinien DU-145 und DU-Nox dar.

(C)-(D) Repräsentative Bilder des immunocytochemischen Nachweises für Mox1 in Gruppe III. (C) zeigt ein 28 Tage altes DU-145-Sphäroid und (D) ein 28 Tage altes DU-Nox-Sphäroid.

4.5.2. Funktionelle Untersuchungen zur endogenen ROI-Produktion in den Zelllinien DU-145, A-549 und DU-Nox

Mittels DCF-Fluoreszenz-Anstiegs-Kinetiken kann die endogene ROI-Produktion in Tumorsphäroiden funktionell untersucht werden. In den Versuchen sollte geklärt werden, in wieweit sich die drei verschiedenen Zelllinien in ihrem Redox-Status unterscheiden. Weiterhin sollte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCF für die jeweilige Zelllinie gezeigt werden, ob es Unterschiede in der ROI-Produktion bezüglich des jeweiligen Proliferationsstatus gab.

Dafür wurden MTS jeder Zelllinie in allen drei Altersgruppen mit dem ROI-Indikator H_2DCFA in E1-Medium inkubiert und es wurden über einen Zeitraum von 20 Minuten alle fünf Minuten Aufnahmen mit dem CLSM gemacht. Die Anstiegskinetik für DCF in kleinen MTS der Zelllinie DU-145 war nach 20 Minuten am höchsten. Mittlere MTS,

mit einem hohen Anteil an dormanten Zellen, hatten hingegen die niedrigste Oxidationskinetik.

Die großen MTS lagen mit der endogenen Radikalproduktion in der Mitte, was sehr wahrscheinlich auf einen höheren Anteil an proliferativen Zellen zurückzuführen war. Diese Oxidationskinetiken passten auch zum Ergebnis der Antikörperfärbungen gegen Proteine der Untereinheiten der NADPH-Oxidase.

Für MTS der Zelllinie A-549 ergab sich mit zunehmender Zellaggregation eine immer geringer werdende endogene Produktion an ROI. In kleinen MTS dieser Zelllinie war die Entstehung von H_2O_2 wesentlich höher als in großen MTS.

In dieser Weise verhielten sich auch DU-Nox MTS, die mit zunehmendem Alter immer weniger ROI produzierten. Auffällig war hier jedoch, dass die Oxidationskinetik für kleine MTS wesentlich höher und schneller stieg, als bei den älteren Gruppen.

Verglich man nun in den einzelnen Altersgruppen der drei Zelllinien die endogene Produktion von Sauerstoffradikalen, so wurde deutlich, dass auch ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Quantität der Produktion bestand. Bei den kleinen MTS generierte die Zelllinie DU-Nox nahezu die doppelte Menge an ROI verglichen mit DU-145 MTS und die vierfache Menge verglichen mit A-549 MTS. Auch bei den mittleren und großen Sphäroiden lagen MTS der Zelllinie DU-Nox in ihrer ROI-Produktion am höchsten. In allen drei Altersgruppen zeigte sich, dass die Zelllinie DU-145 weit weniger steile Anstiegskinetiken für DCF aufwies. MTS der Zelllinie A-549 hatten einen wesentlich geringeren DCF-Fluoreszenzanstieg als Sphäroide der beiden anderen Zelllinien (siehe Abbildung 4.15).

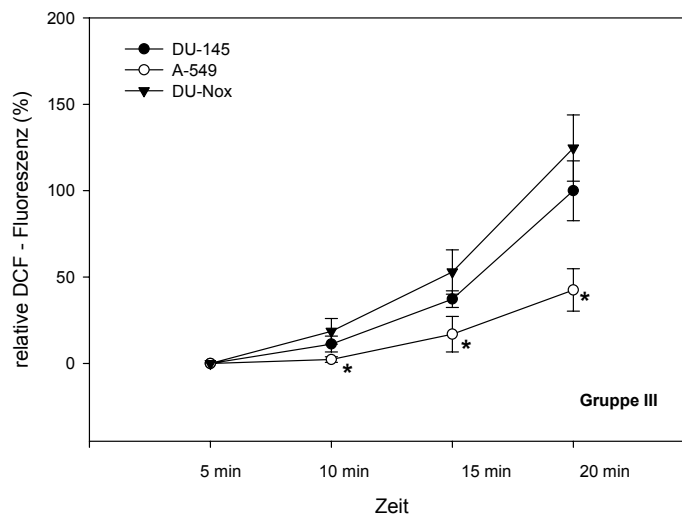
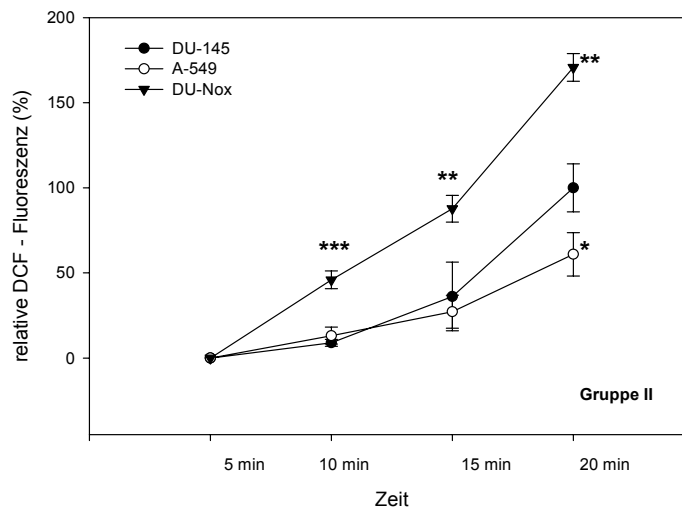
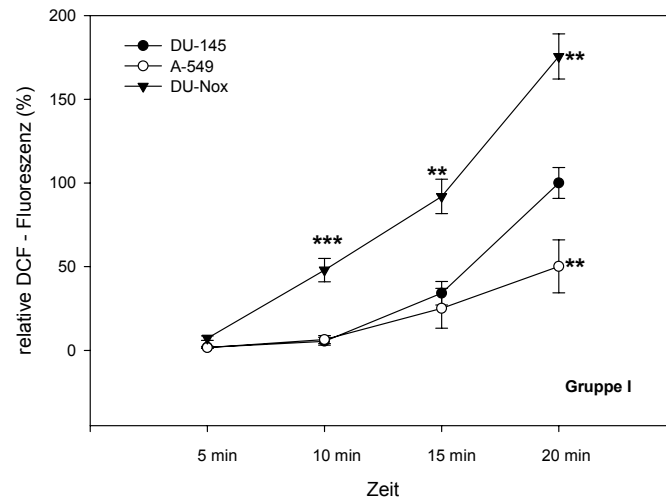


Abb. 4.15:

Vergleich der Anstiegskinetiken von H_2DCFDA der MTS der drei Zelllinien innerhalb einer Altersgruppe, Gruppe I-III (n=3). Der Fluoreszenz-Anstieg von DCF wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten im Abstand von fünf Minuten gemessen. Die DCF-Fluoreszenz ist relativ zum Wert von MTS der Zelllinie DU-145 bei 20 Minuten, der auf 100% gesetzt wurde. Innerhalb eines Zeitpunktes (5, 10, 15 und 20 Minuten) wurden die MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox in der jeweiligen Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

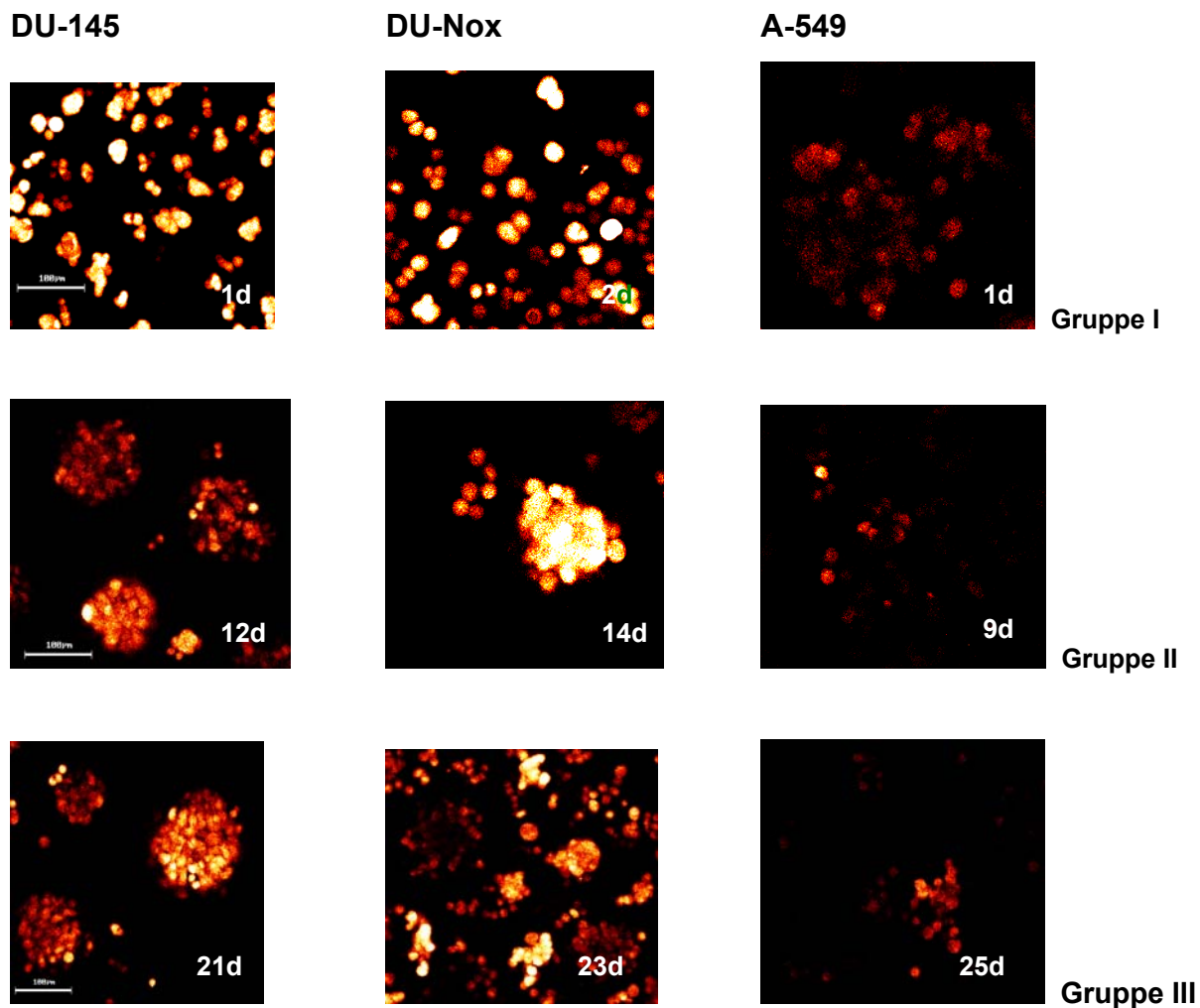


Abb. 4.16:

MTS der Zelllinien DU-145, DU-Nox und A-549 in den Altersgruppen I-III. Gezeigt ist die DCF-Fluoreszenz nach 20 Minuten.

4.6. Hemmung der endogenen ROI-Produktion in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox

Die Generierung von Sauerstoffradikalen erfolgt zu einem großen Teil durch die NADPH-Oxidase. Durch den gezielten Einsatz von Antagonisten dieses Enzyms kann die Produktion von ROI gehemmt werden. Um das nachzuweisen, wurden zur Kontrolle erneut DCF-Anstiegs-Kinetiken mit MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox durchgeführt. Als Antagonisten wurden je Versuchsdurchlauf DPI (10 μ M) oder AEBSF (100 μ M) der E1-Lösung mit H₂DCFA zugesetzt und die endogene ROI-Produktion für einen Zeitraum von 20 Minuten alle fünf Minuten gemessen.

In den Gruppen I-III zeigte sich in allen MTS der beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der endogenen Radikalproduktion. DPI hatte in den Versuchen eine stärkere Wirkung als Antagonist als AEBSF.

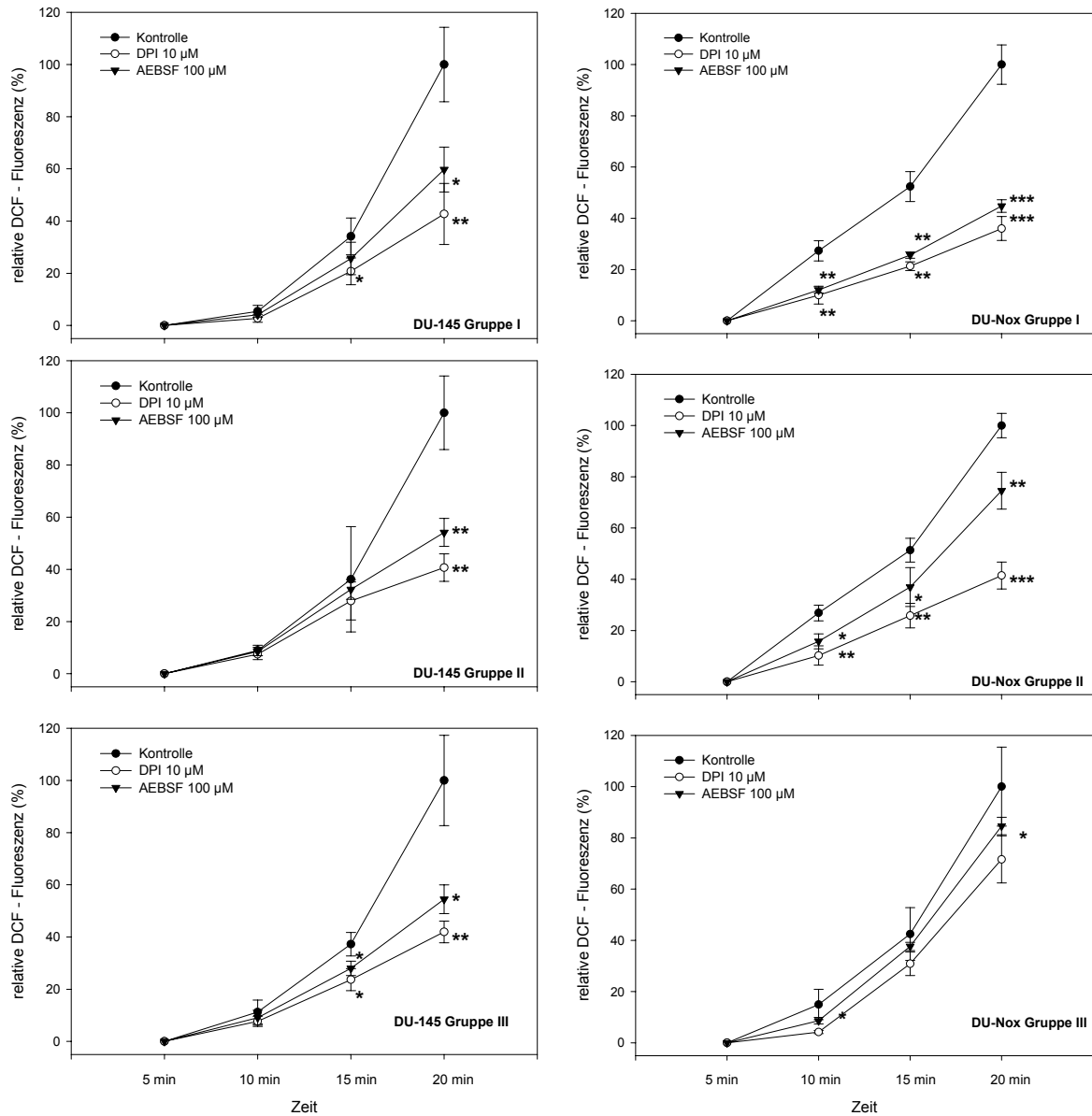


Abb. 4.17:

DCF-Anstiegskinetiken der Zelllinien DU-145 (Gruppe I-III, linke Graphiken) und DU-Nox (Gruppe I-III, rechte Graphiken) mit den NADPH-Oxidase Blockern DPI und AEBSF (n=3). Die DCF-Fluoreszenz ist relativ zum Wert von MTS der Zelllinie DU-145 bei 20 Minuten, der auf 100% gesetzt wurde. Innerhalb eines Zeitpunktes (5, 10, 15 und 20 Minuten) wurden die MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox in der jeweiligen Altersgruppe mit MTS der Zelllinie DU-145 verglichen. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001

4.7. Die Wirkung von Radikalfängern auf die Expression P-Gp und Hif-1α in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox

Die Pro-Oxidantien H₂O₂ und Buthionin Sulfoxamin sind in der Lage, in MTS der Zelllinie DU-145 die Proteinexpression von HIF-1α und P-Gp herunter zu regulieren. Eine Expressionssteigerung kann durch den Einsatz von Radikalfängern wie Dehydroascorbat, N-Acetylcystein und Vitamin E erreicht werden (Wartenberg et al. 2003). Um diesen Nachweis auch in Sphäroiden der Zelllinie DU-Nox zu erbringen,

die eine wesentlich höhere Produktion an ROI haben, wurden kleine MTS beider Zelllinien für eine Woche mit den Radikalfängern Vitamin C (30 μM) und Trolox (100 μM) inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation der gleichen MTS ohne die Radikalfänger. Nach einer Woche wurden immuncytochemische Nachweise für die Proteine HIF-1 α und P-Gp an den Tumorsphäroiden durchgeführt.

Während der Einsatz der Radikalfänger bei DU-145 MTS nur wenig Wirkung auf die Expression von HIF-1 α und P-Gp zeigte, wurde bei MTS der Zelllinie DU-Nox der Einfluss von Antioxidantien bei weitem deutlicher. Sowohl beim immuncytochemischen Nachweis für HIF-1 α , als auch für P-Gp wurde die Expression dieser Proteine signifikant hochreguliert.

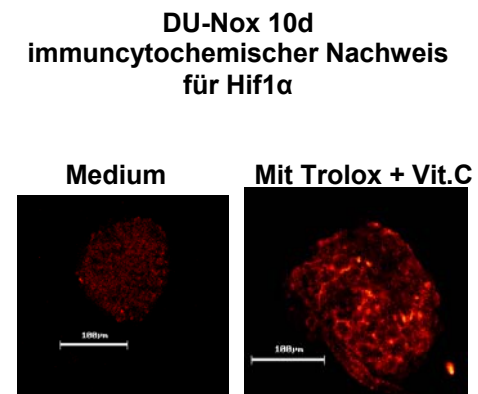
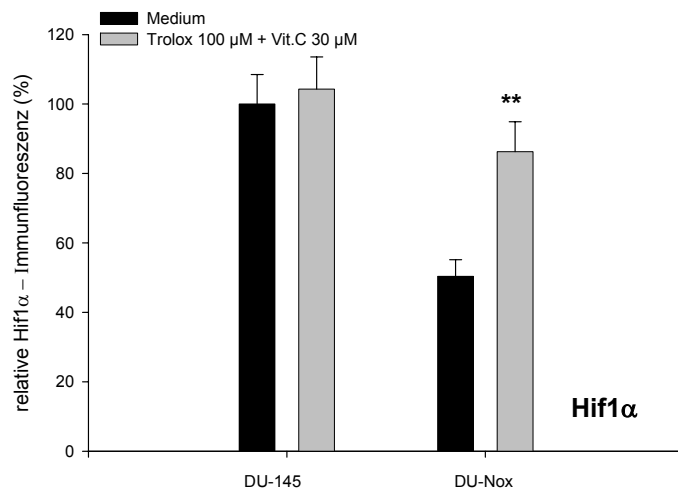
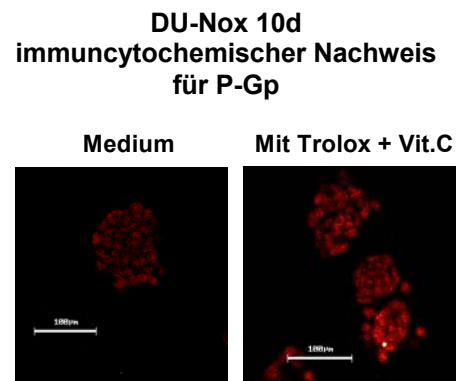
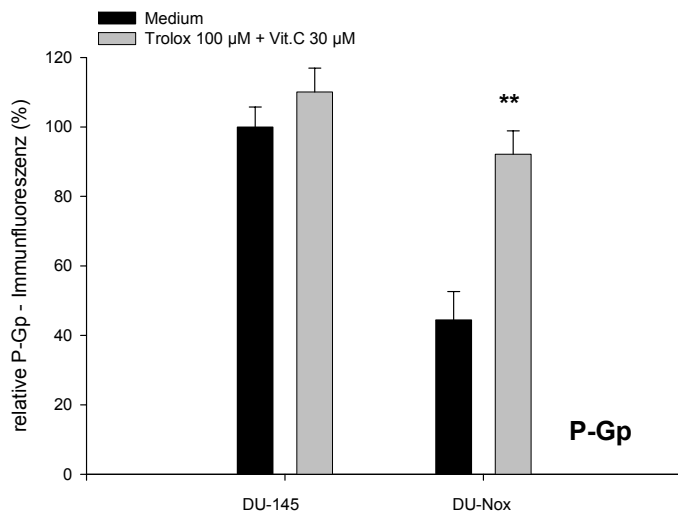


Abb. 4.18:

P-Gp- und HIF-1 α -Proteinexpression in MTS mittleren Alters (Gruppe II) der Zelllinien DU-145 und DU-Nox im Vergleich nach einwöchiger Inkubation in F-10-Medium (Kontrolle) und F-10-Medium mit Sauerstoffradikalfängern Vitamin C (30 μM) und Trolox (100 μM) (n=3). Die quantitative Fluoreszenz-immuncytochemie und konfokale Laserrastermikroskopie verdeutlichten einen signifikanten Anstieg der Proteinexpression in MTS der Zelllinie DU-Nox durch den Einsatz der Sauerstoffradikalfänger. Die P-Gp-spezifische sowie die Hif1 α -spezifische Immunfluoreszenz sind relativ zum Kontrollwert der Zelllinie DU-145 (Medium), der auf 100% gesetzt wurde. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

5. Diskussion

Das Hauptproblem einer effektiven Krebstherapie mit Chemotherapeutika ist nach wie vor die Entstehung von Resistenzen in Tumorzellen. Ein weiterer, negativer Aspekt ist, dass sich solche Resistenzen nicht nur gegen ein spezifisches Cytostatikum richten, sondern gegen eine Vielzahl strukturell und funktionell sehr unterschiedlicher Substanzen. Die bisher am häufigsten untersuchte Ursache für die Resistenz-Entwicklung ist die Überexpression von sogenannten MDR-Proteinen. Diese Proteine besitzen, trotz struktureller Unterschiede, alle die gleiche Funktion als transmembranale, exocytotische Transporter. Mit ihrer Hilfe werden Chemotherapeutika aus dem Zellinneren transportiert und können somit ihrer Aufgabe – der Proliferationshemmung von Tumorzellen – nicht nachkommen.

Um eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu überwinden, sind bisher eine Vielzahl revertierender Substanzen zum Einsatz gekommen, die spezifisch an einen MDR-Transporter binden und die Ausschleusung eines Cytostatikums verhindern sollen. Da jeder Tumor ein spezifisches Expressionsmuster dieser MDR-Proteine aufweist, ist es Ziel dieser Arbeit, die unterschiedliche Wirksamkeit und Effektivität von MDR-spezifischen revertierenden Substanzen an verschiedenen Zelllinien zu zeigen.

Das Mikromilieu von Tumoren unterscheidet unter anderem über deren Wachstum, die Entwicklung von Resistenzen und auch über die Zugänglichkeit für Chemotherapeutika. Monolayer-Kulturen sind bedingt durch ihre Zweidimensionalität nicht in der Lage, die physiologischen Bedingungen eines Tumors widerzuspiegeln. Das MTS ist ein Modellsystem für avaskuläre Tumoren (Wartenberg et al. 2001) und hervorragend in der Lage, *in vitro* die zahlreichen Unterschiede des Mikromilieus innerhalb verschiedener Regionen, wie bei einem Tumor *in vivo*, darzustellen. Die Variationen in der Mikroumgebung eines Tumors entstehen wachstumsbedingt durch längere Diffusionswege für Sauerstoff und Nährstoffe. Dies führt unweigerlich zu einer Unterversorgung im Inneren des Tumors und zur Entstehung von Nekrosen. Umgekehrt lassen sich im Zentrum des Tumors entstehende, giftige Stoffwechselprodukte nur verlangsamt nach außen abgeben. Die pO_2 - und pH-Gradienten, welche in malignen MTS im Inneren der Tumorzellverbände wesentlich niedriger sind als in weiter entfernten Regionen, sind sehr gut beschrieben worden (Görlach & Acker, 1994).

In der vorliegenden Arbeit repräsentieren die drei Zelllinien DU-145, DU-Nox und A-549 die unterschiedlichen Bedingungen und Reaktionen von verschiedenen Tumorzelllinien.

5.1. Wachstumsverhalten von unterschiedlichen Zelllinien

Bestimmte Gradienten, wie oben beschrieben, führen zur Ausprägung eines charakteristischen Vitalitätsmuster, das jedoch in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt ist. In der Spinner-Flaschenkultur beobachtet man bei MTS der Zelllinie DU-145 zunächst einen exponentiellen Wachstumsanstieg von Tag 1-6, der von einer linearen Volumenzunahme bis Tag 20 gekennzeichnet ist. Nach dieser Phase folgt nur noch eine geringe Größenzunahme, d.h. das Wachstum hat seine Plateauphase erreicht (Fischer, Dissertation, Köln,2001).

Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks, der pH- und Nährstoffgradienten, bedingt durch das Wachstum der Sphäroide, induzieren ein nekrotisches Areal im Zentrum des drei-dimensionalen Zellaggregates (Dubessy et al. 2000, Wartenberg & Acker 1995). Andere Autoren vertreten die Meinung, dass die Nekrose nicht Konsequenz einer Hypoxie oder Anoxie ist, sondern als sekundäre Nekrose, einer Akkumulation von Apoptose folgend, entsteht (Mueller-Klieser 2000).

In dieser Arbeit kann durch den Proliferationsmarker Ki 67 gezeigt werden, dass ein Größenwachstum von MTS unabhängig von der Anzahl proliferierender Zellen ist. Ki 67 markiert alle Zellen, mit Ausnahme solcher die sich in der G₀-Phase befinden (Scholzen & Gerdes 2000, Kreitz et al. 2000). MTS der Zelllinie DU-Nox, die eine sehr hohe Anzahl an proliferierenden Zellen aufweisen, bleiben in ihrer Größenzunahme jedoch eindeutig zurück. Wahrscheinlich ist dies auf eine vermehrte Ablösung von Zellen an der Peripherie zurückzuführen.

Ein wesentliches Merkmal sich schnell teilender Tumorzellen ist die endogene Produktion von Sauerstoffradikalen (Burdon et al. 1994, Szatrowski & Nathan 1991). Auch eine exogene Zufuhr von ROI führt zu einer Stimulation der Zellproliferation. Zu hohe ROI-Konzentrationen hingegen führen nicht nur zu einer Unterdrückung der Proliferationsrate, sondern auch zu einem gehäuften Erscheinen von apoptotisch-ähnlichen Zellen in der Zellkultur (Burdon et al. 1996). Der fluoreszierende Indikator für die endogene Produktion von ROI – DCF - zeigt in dieser Arbeit, dass kleine MTS

der Zelllinie DU-145 wesentlich mehr Sauerstoffradikale produzieren als größere MTS. Kleine Sphäroide haben zudem einen wesentlich höheren Anteil an proliferierenden Zellen als ältere MTS. Eine sehr hohe ROI-Produktion geht mit einer großen Anzahl an proliferativen Zellen einher, wie bei MTS der Zelllinie DU-Nox. Dies bewirkt jedoch auch ein Zurückbleiben im Wachstum der Sphäroide, durch ein vermehrtes Ablösen von proliferativen Zellen an der Peripherie der MTS.

MTS der Zelllinie A-549 besitzen eine sehr niedrige endogene Produktion von ROI, verhalten sich in ihrem Größenwachstum jedoch sehr ähnlich den MTS von DU-145. Dies verdeutlicht, dass am Wachstum von Tumoren nicht nur ein einzelner Faktor für die Ausprägung eines Vitalitätsmuster verantwortlich ist.

5.2. Die Expression von Multidrug-resistance Proteinen

Das Expressionsmuster von MDR-Proteinen unterscheidet sich deutlich in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft. Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern können die Unterschiede in der Proteinexprimierung sichtbar gemacht werden. Während es Studien gibt, die ein Vorhandensein von P-Gp in Prostatakrebs-Zelllinien negieren (vgl. van Brussel et al. 1999), kann hier gezeigt werden, dass sowohl MTS der Zelllinie DU-145, als auch DU-Nox, P-Gp enthalten. In kleinen MTS von DU-145 ist P-Gp kaum exprimiert, es steigt jedoch in MTS mittleren Alters bis auf das Vierfache. Mit dem Auftreten von nekrotischen Arealen im Zentrum der Sphäroide sinkt auch die Expression von P-Gp kontinuierlich. Im Gegensatz dazu steht die niedrige Expression von P-Gp in den Zelllinien A-549 und DU-Nox.

Ähnlich ist auch die Expression der MDR-Proteine MRP und LRP in MTS der Zelllinien A-549 und DU-Nox. Die Expression steigt in kleinen Sphäroiden langsam an, hat in MTS mit einem hohen Anteil an dormanten Zellen ihren Höhepunkt und fällt in großen MTS erneut ab. Auffällig ist eine sehr hohe Expression von LRP in der Zelllinie DU-Nox. MTS der Zelllinie DU-145 weisen diese beiden Proteine nur in geringem Maße auf. MRP verhält sich hier invers zur Expression in den beiden anderen Zelllinien. In kleinen MTS ist eine starke Expression vorhanden, die mit der Volumenzunahme stark abfällt, um später wieder leicht anzusteigen (vgl. Fischer, Dissertation 2000).

Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Alter und Größenwachstum von MTS und den sich daraus ergebenden Veränderungen in ihrem spezifischen Expressionsmuster.

Die Regulation der MDR-Proteine in Tumorzellen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Während zunächst vermutet wurde, dass eine Aktivierung des *mdr1*-Promoters aus einem transkriptionalen Event resultiert (Uchiumi et al. 1993), wird jetzt die These einer posttranskriptionalen Regulation von P-Gp befürwortet (Grandjean et al. 2001).

Neben anderen Faktoren, wie schlechter Vaskularisierung von Tumoren (Koomagi et al. 1995), niedrigem externem pH-Wert und hypertonischem Schock (Wei & Roepe 1994), welche für eine erhöhte Expression von P-Gp verantwortlich sind, hat auch die Proliferation der Tumorzellen einen Einfluss auf die Expression von P-Gp. An einer Leberkarzinom Zelllinie konnte mit dem Proliferationsmarker Ki 67 gezeigt werden, dass die Expressionsrate von P-Gp signifikant invers zur Expression von Ki 67 korrelierte (Takanishi et al. 1997). Auch in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox weist die Proliferationsrate der Tumorzellen diesen inversen Zusammenhang mit der Expression von P-Gp auf, was durch Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigt wird.

Die P-Gp Expression der Zelllinie A-549 wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Eine Arbeit beschreibt keine Expression des *mdr1*-Gens in NSCLC-Zellen (Trussardi et al. 1998). Dieser Aussage steht eine andere Veröffentlichungen gegenüber, in der die *mdr1*-Transkription und P-Gp Expression durch eine Behandlung mit Antisense Oligodesoxynucleotid inhibiert wurde (Chen & Liu 2000) und niedrige Niveaus von mRNA gefunden wurden (Lehmann et al. 2001). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen eine P-Gp Expression in MTS der Zelllinie A-549, die verglichen mit der Zelllinie DU-145 jedoch signifikant erniedrigt ist.

Die Expression des MDR-Transporters MRP verhält sich, verglichen mit P-Gp, in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox genau gegensätzlich. Während in großen, nicht nekrotischen MTS der Zelllinie DU-Nox eine sehr hohe Proteinexpression vorhanden ist, ist diese in der Zelllinie DU-145 stark erniedrigt. Auch hier kann ein Zusammenhang mit der Proliferationsrate der Tumorzellen gesehen werden, die einen positiven Effekt auf die Expression von MRP hat.

Dies gilt auch für die Expression des LRP in MTS der Zelllinie DU-Nox. Das Protein wird, verglichen mit den beiden anderen Zelllinien, wesentlich stärker exprimiert. Für die Zelllinie A-549 lässt sich eine erhöhte MRP- und LRP-Expression bestätigen (Laurencot et al. 1997). LRP ist in der Zelllinie DU-145 sehr niedrig exprimiert.

Alle drei Zelllinien haben ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster der untersuchten MDR-Proteine. Für die Zelllinie DU-Nox wird in dieser Arbeit zum ersten Mal ein solches Expressionsmuster untersucht.

5.3. Einfluss der Produktion von ROI auf die Expression von MDR-Proteinen

Die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) hat eine erhebliche Auswirkung auf Tumorzellen. ROI führen zu einer erhöhten Proliferationsrate und Expression von Wachstums-verwandten Genen (Suh et al. 1999). Die neu beschriebene Nox5-Oxidase (ein Homolog von Nox1) generiert in DU-145 Zellen ROI, welche als essentiell für das Wachstum von Prostatakrebs angesehen werden (Brar et al. 2003). Weiterhin werden ROI für eine erhöhte Mutationsrate und veränderte Protein- und Enzymfunktionen verantwortlich gemacht (Ohshima et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die erhöhte Produktion von ROI auch einen Einfluss auf die Expression von MDR-Proteinen besitzt. Der Redox-Status von MTS verschiedener Zelllinien unterscheidet sich erheblich, auch im Hinblick auf das Alter. MTS, die eine erhöhte endogene ROI-Produktion aufweisen, besitzen auch eine starke Proliferationsrate. Sinkt diese Produktion, so nimmt auch der Anteil an proliferierenden Zellen in Sphäroiden ab.

An MTS der Zelllinien DU-145 und DU-Nox wird ersichtlich, dass DU-Nox zu allen Zeitpunkten eine höhere Expression des gp91phox, der Untereinheit der NADPH-Oxidase besitzt. Auch die erwartete Nox1 Überexpression in dieser Zelllinie kann verifiziert werden.

Die Expression der MDR-Proteine P-Gp, MRP und LRP verhält sich in den beiden Prostatakarzinom Zelllinien gegensätzlich, so dass daraus gefolgert werden kann, dass die erhöhte Expression von Nox1 und gp91phox in MTS der Zelllinie DU-Nox zum einen zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt und zum anderen eine Veränderung des Expressionsmuster von MDR-Proteinen bedingt. Eine Erhöhung der ROI-Produktion durch Transfektion mit Nox1 führt in der modifizierten Zelllinie

DU-145 zu einer erhöhten Expression von MRP und LRP und zu einer erniedrigten P-Gp Expression. Dies bestätigt auch eine andere Veröffentlichung, in der gezeigt wird, dass Pro-Oxidantien das Wachstum multizellulärer Sphäroide (DU-145) stimulieren und zu einer erniedrigten Expression des Cyklin-abhängigen Kinase Inhibitors p27(kip1) führen. Daraus ergibt sich die Annahme, dass eine durch ROI induzierte Herunterregulation der P-Gp Expression von einer Rekrutierung dormanter Chemotherapeutika-resistenter Zellen aus der Tiefe des Tumorgewebes für die Zellzyklusaktivität begleitet sein könnte (Wartenberg et al. 2000).

Durch den Einsatz von ROI-generierenden Substanzen wie H₂O₂, Menadion und Glycerinaldehyd kommt es in großen MTS der Zelllinie DU-145 zu einem Anstieg des zellulären MRP Gehalts (Fischer 2001). Ein solcher MRP-Anstieg wird auch in humanen Lungentumorzellen beschrieben, die nach oxidativem Stress, induziert durch H₂O₂ und Paraquat, dieses Protein überexprimieren. Allerdings kommt es in dieser Zelllinie ebenfalls zu einem Anstieg der P-Gp Expression infolge erhöhter ROI-Produktion (Köhler 2002).

Die Lungen-Adenokarzinom Zelllinie A-549 besitzt, wie MTS der Zelllinie DU-Nox, ebenfalls eine hohe Expression von MRP und LRP, weist aber im Gegensatz zu DU-Nox, eine sehr niedrige ROI-Produktion auf. Dies ist ein Indiz, dass die Regulation von MDR-Proteinen ein multifaktorielles Geschehen ist.

Übersteigt die ROI-Konzentration ein bestimmtes Niveau, so wird die Zellproliferation unterdrückt und führt zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen (Burdon et al. 1996). Dieser Vorgang kann durch den Einsatz von NADPH-Oxidase Inhibitoren vorgebeugt werden. Szatrowski und Nathan (1991) zeigen in ihrer Arbeit eine Inhibition der H₂O₂ Produktion durch Diphenylen Iodonium (DPI) und Diethyldithiocarbamat in sieben humanen Tumorzelllinien. Auch die Produktion von Superoxid-Anion kann in malignen Melanomzellen durch den Einsatz von Superoxid-Dismutase inhibiert werden (Bittinger et al. 1998). Eine signifikante Inhibition der ROI-Produktion in den Zelllinien DU-145 und DU-Nox mit den NADPH-Oxidase Blockern DPI und AEBSF zeigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

5.4. Einfluss von Antioxidantien

Ein weiterer Beweis für den Einfluss von ROI auf das Expressionsmuster von MDR-Proteinen ist der Einsatz von Antioxidantien. Die Verwendung von Radikalfängern wie Dehydroascorbat, N-Acetylcystein und Vitamin E führt in MTS einer Hepatom-Zelllinie zu einer Hochregulation der Proteine P-Gp und Hif1- α , während Pro-Oxidantien wie H₂O₂ und Buthionin Sulfoximin diese Proteine herunterregulieren (Wartenberg et al. 2003). In einer anderen Arbeit weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine antioxidative Behandlung von humanen Lungentumorzellen zu einer Suppression der durch ROI bedingten Überexpression der MDR-Proteine führt. Dadurch kann die Wirkung von Chemotherapeutika erhöht und eine Resistenzentstehung verringert werden (Köhler 2002). Weiterhin konnte an primären Hepatozyten von Ratten gezeigt werden, dass Antioxidantien wie Ascorbat, Mannitol, DMSO und Acetylcystein in der Lage sind, die intrinsische *mdr1b* mRNA und eine P-Gp Überexpression zu supprimieren (Ziemann et al. 1999).

Allen Arbeiten gemein ist der Einfluss von antioxidativen Agenzien auf die Expression von MDR-Proteinen. Auch in den vorliegenden Ergebnissen zeigen die Versuche mit Vitamin C und α -Tocopherol diesen Einfluss. In den Zelllinien DU-145 und DU-Nox führt die einwöchige Inkubation von kleinen MTS mit Antioxidantien zu einer gesteigerten Expression der Proteine P-Gp und Hypoxia-inducible factor-1 α .

Hif-1 besteht aus zwei Untereinheiten: Hif-1 α und Hif-1 β . Neueste Fortschritte in der Forschung zeigen, dass Hif-1 α nicht nur durch den Sauerstoffdruck reguliert wird, sondern auch über verschiedene andere Stimuli, wie Stickstoffmonoxid, ROI, Wachstumsfaktoren und mechanischen Stress (Chun et al. 2002). Hif-1 selbst kontrolliert die Expression von P-Gp in MTS. Eine induzierte Hypoxie in MTS der Zelllinie Hepa1 erhöht sowohl die Hif-1 α als auch die P-Gp Expression, wogegen in einer Zelllinie mit HIF-1 β Mutation (Hep1C4) die P-Gp Expressionssteigerung ausbleibt (Wartenberg et al. 2003).

5.5. Einsatz und Nutzen von MDR revertierenden Substanzen

Für eine effektive Chemotherapie ist es unerlässlich, das spezifische Expressionsmuster der jeweiligen Tumorart zu kennen, um in multi-resistenten Arten mit dem zusätzlichen Einsatz von revertierenden Substanzen zu einem

zufriedenstellenden Behandlungsergebnis zu kommen. Theyer et al. (1993) beobachten in ihrer Studie sehr niedrige MDR-Revertierungsraten durch Substanzen wie Cyclosporin A und Verapamil in drei Prostatakrebs Zelllinien (PC-3, DU-145 und LNCaP). Dies führt zu der Annahme, dass nicht-MDR-assozierte Mechanismen als dominante Faktoren für die Chemoresistenz bei Prostatakrebs verantwortlich sind.

Betrachtet man die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, so lässt sich feststellen, dass in Zelllinien, die eine erhöhte P-Gp Expression besitzen, der Efflux des Chemotherapeutikums Doxorubicin mit P-Gp spezifischen Reversal-Substanzen signifikant inhibiert wird. Den Ansatz einer Kombination von Cytostatika mit „Resistenz-Modifizierern“ für bessere Effektivität in der Chemotherapie befürwortet auch eine Veröffentlichung von Szabo et al. (2000). Weiterhin ist es wichtig, die Veränderungen der MDR-Expression durch Wachstum und Volumenzunahme, sowie den Redox-Status der Tumorzellen im drei-dimensionalen Gewebe zu kennen, um dadurch, im gegebenen Fall, auf eine alternative revertierende Substanz umsteigen zu können.

Als Substrat wurde in der vorgelegten Arbeit das Antibiotikum Doxorubicin gewählt, da es sowohl durch P-Gp, MRP als auch LRP transportiert wird (Tannock & Goldenberg 1998).

Für die Reversal-Substanz PGP 4008 wird in resistenten Zelllinien (NCI/ADR und MCF-7/VP) ein exzellenter Antagonismus von P-Gp beschrieben, bei einer relativ niedrigen Toxizität gegenüber Therapeutika-sensitiven Zellen (Lawrence et al. 2001). PGP 4008, welches zur Familie der Quinoxaline gehört, besitzt keinen revertierenden Effekt für MRP. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diesen Effekt in den Zelllinien DU-145 und A-549. In DU-145 MTS, die eine hohe P-Gp Expression besitzen, inhibiert PGP 4008 signifikant, während In A-549 MTS mit niedriger P-Gp und hoher MRP Expression nahezu keine Inhibition des Chemotherapeutika-Efflux von Doxorubicin stattfindet.

Für Reversin 121 und 205, als hydrophobe Chemosensitizer, werden ebenfalls eine hohe Affinität und Selektivität für das MDR1-Protein bei einer niedrigen Toxizität beschrieben. Wegen dieser Attribute könnten sie gute Kandidaten für die Entwicklung der P-Gp spezifischen, revertierenden Substanzen sein (Sharom et al. 1999). In mittleren MTS der Zelllinie DU-145 mit der höchsten Expression von P-Gp findet eine signifikante Inhibition statt, interessanterweise jedoch auch in den kleinen MTS der Zelllinie A-549, die so gut wie keine Expression von P-Gp besitzen, so dass bei

dieser revertierenden Substanz weder von einer hohen Selektivität noch Affinität für P-Gp gesprochen werden kann.

Das immunsupprimierende Cyclosporin A ist eine der ältesten und beststudierten revertierenden Substanzen der ersten Generation von P-Gp Modulatoren. Es wird in seiner inhibierenden Potenz in Studien oft mit dem Cyclosporin D Analog Valspodar oder PSC 833 verglichen, welches zur zweiten Generation der P-Gp Modulatoren gehört. PSC 833 soll in der humanen Doxorubicin-resistenten leukämischen Zelllinie K562/A02 3 -10fach potenter sein als Cyclosporin A oder Verapamil (Dai et al. 2002). Weiterhin soll PSC 833 auch in der Lage sein, MRP zu inhibieren (Krishna & Mayer 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt in MTS der Zelllinie DU-145 für beide Substanzen eine sehr gute Inhibition des Doxorubicin-Efflux. Allerdings ist Cyclosporin A auch schon in kleinen MTS signifikant wirksam, während PSC 833 dies erst in mittleren MTS ist. Ein zusätzlicher revertierender Effekt von PSC 833 für MRP kann zumindest in kleinen MTS der Zelllinie A-549 bestätigt werden. Interessanterweise revertiert hier auch Cyclosporin A in kleinen und großen MTS, was durchaus auch für eine erweiterte Funktion als MRP-spezifische revertierende Substanz sprechen könnte.

Die Substanzen MK 571 und Probenecid gelten als spezifische MRP-Modulatoren. Der Leukotrien D4 - Rezeptor Antagonist MK 571 verstärkt die durch Gemtuzumab-Ozogamicin (GO) induzierte Cytotoxizität in P-Gp-negativen/MRP-positiven humanen promyelozytischen Zelllinien. GO ist ein Immunkonjugat, welches nach intrazellulären Prozessen seinen toxischen Anteil an Kalichamicin freigibt (Walter et al. 2003). Auch in MTS der Zelllinie A-549 mit einer sehr hohen MRP-Expression ist diese Substanz in allen Altersgruppen signifikant wirksam. In der Zelllinie DU-145 hingegen zeigt MK 571 hinsichtlich seiner revertierenden Eigenschaften keinen Effekt. Walter et al. vergleichen (2003) in ihrer Arbeit den cytotoxischen Effekt mit demjenigen des Cyclosporin A. Da beide Substanzen in einer Reihe von P-Gp-positiven/MRP-positiven AML Proben die Cytotoxizität nicht beeinflussen, wird vermutet, dass zusätzliche Resistenzmechanismen wirksam sind.

Der zweite Vertreter der MRP-spezifischen revertierenden Substanzen, Probenecid, wird in einer *in vivo* Studie als sehr effektiv in der Co-Administration mit Cytostatika beschrieben. Probenecid verstärkt die intrazelluläre Akkumulation *in vitro* und die intrazelluläre Persistenz *in vivo* eines neuen Folat-Analogs: 10-Deazaaminopterin (Sirotnak et al. 2000). Im Gegensatz dazu, besitzt diese revertierende Substanz

keinen verstärkenden Effekt bei der Akkumulation von Makroliden in Maus-Makrophagen (Seral et al. 2003). Probenecid hat in kleinen und großen MTS der Zelllinie DU-145 einen inhibitorischen Effekt. Bezüglich der Zelllinie A-549 zeigt sich diese Substanz als signifikant in der jüngsten Altersgruppe, die auch die höchste Expression an MRP enthält.

Im Hinblick auf die Zelllinie DU-Nox ist sowohl Cyclosporin A, als auch MK 571 in der Gruppe der kleinen und großen MTS signifikant wirksam. Dies steht nicht im Zusammenhang mit der vorliegenden MDR-Expression von P-Gp und MRP bei dieser Zelllinie. Andere Faktoren, wie die intensivere ROI-Produktion, müssen hier einen Beitrag zur veränderten Reaktion der spezifischen Vertreter der MDR-Modulatoren leisten. Aber auch sehr niedrige Expressionsniveaus von P-Gp und MRP, die in Tumoren schwierig zu detektieren sind, könnten signifikant die Effektivität gegenüber einer hohen Anzahl an klinisch wichtigen Substraten beeinflussen. Allen et al. sieht (2000) den Gebrauch von revertierenden Substanzen für die Sensibilisierung noch unbehandelter Tumore in vielen Fällen für angemessener als es zur Zeit gewürdigt wird.

5.6. Das Expressionsmuster von MDR-Proteinen und der Redox-Status als prognostische Faktoren

Die Expressionsmuster der MDR-Transporter P-Gp, MRP und LRP variieren stark in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft. In SCLC wird die immunhistochemische Analyse der Expression von P-Gp und MRP als potentiell Werkzeug für die Vorhersage einer effektiven Chemotherapie bei Patienten gesehen. Bei einem guten Ansprechen auf die Chemotherapie hatten 27 Patienten mit SCLC eine negative P-Gp und MRP-Expression (Hsia et al. 2002). Eine weitere Veröffentlichung über Patienten mit NSCLC untermauert die Beobachtung eines schlechten Ansprechens auf Chemotherapie bei einer erhöhten P-Gp Expression. Obwohl die Expression dieses MDR-Proteins den Verlauf einer auf Paclitaxel basierenden Therapie nicht vollständig vorhersagen kann, so hilft es doch bei der Planung einer solchen (Yeh et al. 2003). Auch bei Patienten mit fortgeschrittenem Blasenkrebs stellt die P-Gp Expression einen wichtigen prognostischer Faktor für das Ansprechen auf eine Chemotherapie und die Überlebensrate des Patienten dar (Baekelandt et al. 2000). In einer Studie an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, die chemotherapeutisch Rhodamin 123 in Kombination mit PSC 833 und Carboxyfluorescein in Kombination mit MK 571 erhielten, konnte andererseits keine Beziehung zwischen

den MDR-Parametern P-Gp und MRP und der Überlebensrate der Patienten gefunden werden (van der Kolk et al. 2000).

Auch die Aussagekraft der Expression von MRP und LRP wird kontrovers diskutiert. In fortgeschrittenen Blasenkrebs werden MRP und LRP als nützlich in Kombination mit anderen klinisch-pathologisch prognostischen Faktoren beschrieben, um bei diesen Patienten die Blase nach einer Chemotherapie mit Neoadjuvantien zu erhalten (Diestra et al. 2003). Ganz anders sieht dies Arts et al. (1999), die in ihrer Arbeit ein Heranziehen von MDR-Proteinen, zur Prognose für das Ansprechen auf Chemotherapeutika in Ovarial-Karzinomen, für ungeeignet halten. Die Detektion von LRP in klinischen Daten spricht für die LRP-Expression, die von hohem klinischen Wert sein könnte, um das Ansprechen von verschiedenen Tumorarten auf eine Chemotherapie vorherzusagen (Scheffer et al. 2000). Verschiedene andere Publikationen sehen in einer erhöhten Expression von LRP in diversen Tumorarten einen ungünstigen prognostischen Faktor für das Ansprechen auf Chemotherapeutika und den weiteren Verlauf einer Therapie (Izquierdo et al. 1995, Zurita et al. 2003, Lu et al. 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten bekräftigen die Bedeutung der MDR-Proteine als prognostische Faktoren. Durch die Kenntnis des spezifischen Expressionsmuster einer Tumorart kann sowohl das am besten geeignete Cytostatikum, als auch, in multiresistenten Arten, die effektivste revertierende Substanz, eingesetzt werden.

Als wesentlich hat sich zudem die endogene Produktion von ROI in den Zelllinien gezeigt. ROI haben einen eindeutigen Einfluss auf die Expression von MDR-Proteinen wie P-Gp. Eine Überexpression von Nox1 in der Zelllinie DU-145 führt zu einer erniedrigten P-Gp Expression und einer verstärkten Expression von MRP und LRP. Durch den Einsatz von Radikalfängern lässt sich die Expressierung von P-Gp und Hif-1 α verändern. Desweiteren besitzen MTS mit einer erhöhten ROI-Produktion eine stärkere proliferative Kapazität.

Die Behandlung eines Patienten mit der Diagnose „Krebs“ muss im Falle einer Chemotherapie individuell auf die Krebsart abgestimmt werden. Dies bedeutet die genaue Kenntnis der Expression von MDR-Proteinen und des Redox-Status des jeweiligen Tumors. Auf diesen Grundsätzen basiert eine prätherapeutische Resistenz-Analyse, die als Modellvorstellung wie in Abbildung 5.1 aussehen könnte.

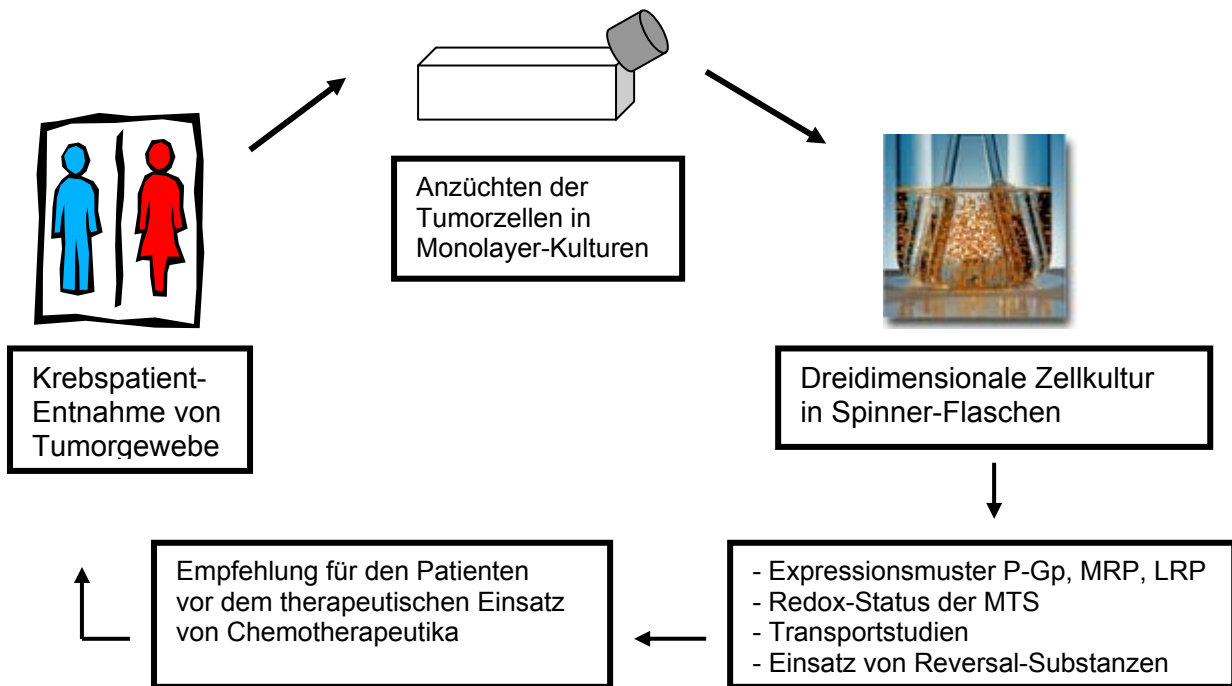


Abb.5.1: Schematische Darstellung der Modellvorstellung der prätherapeutischen Resistenzanalyse

5.7. MDR-Proteine, Chemotherapie und revertierenden Substanzen in der Veterinärmedizin

Auch in der Veterinärmedizin wird auf dem Gebiet der Onkologie geforscht, vor allen Dingen in Hinblick auf eine effektive Chemotherapie. Das canine Lymphom hat beispielweise ein sehr ähnliches P-Gp Expressionsmuster, verglichen mit dem humanen non-Hodgkin Lymphom. Eine Studie hält diese Art von Krebs für ein brauchbares Modell, um MDR zu studieren (Moore et al. 1995).

Weiterhin gibt es immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von P-Gp und MRP in caninen kutanen Mastzelltumoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen eindeutig darauf hin, dass solche MDR-Proteine auch bei Hunden exprimiert werden und dass diese Tumoren sehr wahrscheinlich resistent gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika sind (Miyoshi et al. 2002). Auch der Einsatz von revertierenden Substanzen wird an caninen Zelllinien getestet. Um die Chemosensitivität einer Wildtyp- und einer multiresistenten Zelllinie von Hunden besser zu charakterisieren, wurden diese mit den P-Gp Modulatoren Verapamil, Tamoxifen und PSC 833 behandelt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die P-Gp Inhibition von verschiedenen Faktoren wie der Zelllinie, dem Modulator und der eingesetzten Konzentration abhängig ist (Page et al. 2000).

Auch an feline Zelllinien wird geforscht. Die molekulare Analyse der MDR in feline Lymphomzellen zeigt, dass die grundlegende Struktur des feline *mdr1* Gens im wesentlichen die gleiche ist, wie die der MDR-Gene anderer Spezies. Die Expression von P-Gp ist auch in feline Lymphomzellen *in vitro* einer der Mechanismen, die verantwortlich für die Entwicklung einer MDR sind (Okai et al. 2000).

Die Proliferationsmarker BrdU und Ki 67 sind nützlich, um das proliferative Potential in Tumoren, wie beispielsweise in caninen Mastzelltumoren, zu bestimmen (Sakai et al. 2002). Eine weitere Arbeit beschreibt die Anzahl von Ki 67-positiv gefärbten Nuclei in solitären kutanen Mastzelltumoren von Hunden als hilfreich im Hinblick auf die Vorhersage der Prognose (Abadie et al. 1999).

Alle diese Arbeiten zeigen, dass auch im Bereich der Expression von MDR-Proteinen in der Veterinärmedizin ein weiterer Forschungsbedarf besteht. Dies wird durch eine Studie von Bronden et al. (2003) bekräftigt, die sich mit der Wahrnehmung von Hunde- und Katzenbesitzern hinsichtlich der medikamentösen Behandlung von Krebs bei ihren Tieren beschäftigt. Von 91 Tierbesitzern fanden fast alle, dass die chemotherapeutische Behandlung der Mühe wert ist. Über die Hälfte der Besitzer glauben, dass ihr Tier länger gelebt hat als es ohne eine Therapie möglich gewesen wäre und dass sich sein Allgemeinbefinden gebessert hatte.

5.8. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig die Unterschiede der Expressionsmuster von MDR-Proteinen in Zelllinien verschiedener Herkunft. Weiterhin wird ersichtlich, dass die Expression von P-Gp, MRP und LRP in der Zelllinie DU-145 durch den Einfluss von ROI verändert wird. Inwiefern dieser Einfluss positiv im Hinblick auf eine effektive Chemotherapie nutzbar ist, sollte weiterhin untersucht werden. Auch die Möglichkeit, Sauerstoffradikale zur Herunter-Regulation von P-Gp zu nutzen, sollte nicht außer acht gelassen werden.

Der Redox-Status von Tumorzellen ist ein weiterer wichtiger Faktor bei der Ausbildung einer MDR. Eine erhöhte ROI-Produktion steht auch im Zusammenhang mit einer stärkeren proliferativen Aktivität von MTS. An welchen Orten und wie solche Sauerstoffradikale wirken, sollte in weiteren Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Die Arbeit zeigt des weiteren, dass der Einsatz von Antioxidantien einen Einfluss auf die Expression von P-Gp und Hif-1 α besitzt. Dieser Einfluss lässt sich gegebenenfalls in Kombination mit dem Einsatz von revertierenden Substanzen positiv nutzen.

Aus den Ergebnissen mit dem Einsatz von revertierenden Substanzen lässt sich schlussfolgern, dass diese effektiv eingesetzt werden können, wenn die Kenntnis über die jeweilige MDR-Expression eines Tumors vorhanden ist. Um die Anzahl erfolgreicher Krebsbehandlungen zu erhöhen, sollten revertierende Substanzen weiterhin an Zelllinien getestet werden.

6. Zusammenfassung

Krebserkrankungen gehören immer noch zu den Krankheiten mit einer sehr hohen Mortalitätsrate. Obwohl auf diesem Gebiet weiterhin sehr viel geforscht wird, ergeben sich hier einige Schwierigkeiten in der Behandlung. Eines der größten Probleme ist das Phänomen der Chemotherapeutika-Resistenz. Diese sogenannte MDR von Tumorzellen basiert auf einer Serie verschiedener Mechanismen. Am häufigsten ist eine Überexpression von MDR-Transportern wie P-Glykoprotein, MRP oder LRP verantwortlich für das Entstehen einer MDR.

An Tumorsphäroiden von drei unterschiedlichen Zelllinien (Prostatakarzinom Zelllinie DU-145, Lungen-Adenokarzinom Zelllinie A-549, transfizierte Prostatakarzinom Zelllinie DU-Nox) wurde gezeigt, dass sich die Expression der MDR-Proteine mit dem Alter und dem Größenwachstum der Tumorsphäroide verändert. Das Expressionsmuster der MDR-Proteine unterscheidet sich fundamental in Zelllinien verschiedener Herkunft.

Zudem veränderte sich die MDR-Expression mit dem Proliferationsstatus der Zellen im drei-dimensionalen Gewebe. Im Vergleich wies die mit Nox1, einem Bestandteil der NADPH-Oxidase, transfizierte Zelllinie DU-Nox eine wesentlich höhere Expression der MDR-Proteine MRP und LRP auf als die Zelllinie DU-145 selbst. Im Gegensatz dazu hatte die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten einen inversen Effekt auf die Expression von P-Gp. Dies wurde auch durch den Einsatz von Radikalfängern wie α -Tocopherol und Vitamin C bewiesen, die zu einer höheren Expression von P-Gp in MTS von DU-Nox führten.

Die Verwendung von P-Gp-spezifischen revertierenden Substanzen PGP 4008, Reversin 121, Cyclosporin A und PSC 833 war bei mittleren MTS in der Zelllinie DU-145, die eine hohe P-Gp Expression besitzt, am effektivsten. Die MRP-spezifischen revertierenden Substanzen MK 571 und Probenecid wirkten unabhängig vom Expressionsstatus des MDR-Proteins. Für LRP gibt es bisher noch keine spezifische revertierende Substanz.

Die Behandlung mit Chemotherapeutika und revertierenden Substanzen muss individuell an den spezifischen Tumor, seine „persönliche“ MDR-Expression und

seinen Proliferationsstatus adaptiert werden. Auf diesen Prinzipien basiert eine prätherapeutische Resistenz-Analyse.

7. Summary

Until today cancer has been an illness with a high mortality rate. Even though a lot of research in this field has been done, there are difficulties in cancer treatment. One of the biggest problems is the phenomenon of chemotherapeutic resistance. This so called multidrug resistance (MDR) of tumor cells is based on a series of different mechanisms. Most often the development of MDR is due to an overexpression of multidrug transporters such as p-glycoprotein, MRP or LRP.

Experiments with tumor spheroids of three different cell lines (prostate carcinoma cell line DU-145, lung adenocarcinoma cell line A-549, transfected prostate carcinoma cell line DU-Nox) showed, that the expression of MDR-proteins changes with age and growth of tumor spheroids. The pattern of expression varies fundamentally in cell lines of different origin.

The pattern of expression of MDR-proteins also changes with the status of proliferation in the three-dimensional tissue. The cell line DU-Nox, transfected with Nox1, a component of the NADPH-Oxidase, had a very high expression of the MDR-proteins MRP and LRP compared to the cell line DU-145. In contrast to this a high production of reactive oxygen species had an inverse effect on the expression of P-gp. This was also proven by the use of free radical scavengers, such as α -tocopherol and vitamin c, which contributed to a higher expression of P-gp in MTS of DU-Nox.

The use of specific P-gp reversal substances PGP 4008, Reversin 121, Cyclosporin A and PSC 833 was most effective in middle aged spheroids of cell line DU-145, that have a high expression of P-gp. The specific MRP reversal substances MK 571 and Probenecid worked independent of the status of expression of this MDR-protein. Until now there is no specific reversal substance for LRP.

A cancer-treatment with chemotherapeutics and reversal substances must be adapted individually to the specific tumor, its MDR expression and its status of proliferation. On these principles a pre-therapeutic analysis of resistance is based.

8. Literaturverzeichnis

- Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. **1999**. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 215(11): 1629-1634
- Allen JD, Brinkhuis RF, van Deemter L, Wijnholds J, Schinkel AH. **2000**. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res* 60(20): 5761-5766
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA. **1999**. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 361-398
- Arbiser JL, Petros J, Klaffer R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD. **2002**. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 715-720
- Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD. **2001**. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5550-5555
- Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ. **1999**. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 5(10): 2798-2805
- Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. **2000**. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 20(2B): 1061-1067
- Bakos E, Evers R, Szakács G, Tusnády GE, Welker E, Szábo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Váradi A, Sarkadi B. **1998**. Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 273: 32167-32175
- Berger W, Elbling L, Micksche M. **2000**. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 88(2): 293-300
- Bittinger F, Gonzalez-Garcia JL, Klein CL, Brochhausen C, Offner F, Kirkpatrick CJ. **1998**. Production of superoxide by human malignant melanoma cells. *Melanoma Res* 8(5): 381-387
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. **1999**. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347-357

- Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarium B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Hueckstaedt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. **2003**. NOX5 NAD(p)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2): 353-369
- Bronden LB, Rutteman GR, Flagstad A, Teske E. **2003**. Study of dog and cat owners' perception of medical treatment for cancer. *Vet Rec* 152(3): 77-80
- Burdon RH, Gill V, Alliangana D. **1996**. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free Radic Res* 24(2): 81-93
- Burdon RH, Gill V, Alliangana D. **1994**. Endogenously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-21 cell proliferation. *Free Radic Res* 21: 121-133
- Callaghan R, Riordan JR. **1993**. Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 268: 16059-16064
- Chen L, Liu Y. **2000**. Reversal of multidrug resistance in lung adenocarcinoma-resistant cell Line A-549/R by *mdr1* antisense oligodeoxynucleotides in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 80(3): 219-221
- Chun YS, Kim MS, Park JW. **2002**. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 alpha. *J Korean Med Sci* 17(5): 581-588
- Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JE, Mackie JH, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley GR. **1992**. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
- Cole S, Sparks K, Fraser K, Loe D, Grant C, Wilson G, Deeley R. **1994**. Pharmacological characterisation of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54(22): 5902-5910
- Dai H, Luo S, Yin A, Peng A. **2002**. Reversal of multidrug-resistance in human leukemia cell line K562/A02 by a cyclosporin D analogue PSC 833. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 23(1): 23-26
- David-Beabes GL, Overman MJ, Petrofski JA, Campell PA, de Marzo AM, Nelson WG. **2000**. Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU-145, PC-3, PPC-1 and TSU-PR1: characterisation of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity. *Int J Oncol* 17(6): 1077-1086
- Dean M, Rhzetsky A, Allikmets R. **2001**. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166
- Dertinger H, Hinz G, Jakobs KH. **1982**. Intercellular communication, three-dimensional cell contact and radiosensitivity. *Biophys Struct Mech* 9(2): 89-93

- Diestra JE, Condom E, Del Muro XG, Scheffer GL, Perez J, Zurita AJ, Munoz-Segui J, Vignes F, Scheper RJ, Capella G, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA. **2003**. Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: Biological and clinical implications. *J Urol* 170(4 Pt 1): 1383-1387
- Drewe J. **2000**. Klinische Pharmakologie: Proteine für den Transport von Arzneistoffen. *Schweiz Med Wochenschr* 130: 727-731
- Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemin F. **2000**. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 36(2-3): 179-192
- Eijdemans EW, de Haas M, Coco-Martin JM. **1995**. Mechanisms of MRP over-expression in four human lung cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int J Cancer* 60: 676-684
- Erlichman C, Wu A. **1991**. Effects of 5-fluorouracil and leucovorin in spheroids: a model for solid tumours. *Anticancer Res* 11(2): 671-675
- Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. **1996**. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 27: 1283-1291
- Feller N, Broxterman HJ, Währer DCR, Pinedo HM. **1995**. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Letters* 368: 385-388
- Ferry DR, Traunecker H, Kerr DJ. **1996**. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer* 32A: 1070-1081
- Fischer K. **2001**. Die Bedeutung der Zellproliferation und des Redoxstatus für die Regulation der P-Glykoprotein Expression in multizellulären DU-145 Prostata Tumor Sphäroiden. *Dissertation*, Universität zu Köln
- Freyer JP. **1998**. Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J Cell Physiol* 176(1): 138-149
- Freyer JP. **1988**. Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Res* 48(9): 2432-2439
- Futscher BW, Abbaszadegan MR, Domann F. **1994**. Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected, multidrug resistant human tumor cells. *Biochem Pharmacol* 47: 1601-1606
- Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. **1995**. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 208(1): 345-352
- Germann UA, Pastan I, Gottesmann MM. **1993**. P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance. *Semin Cell Biol* 4: 63-76

- Görlach A, Acker H. **1994**. pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1227(3): 105-112
- Gooch JL, Pergola PE, Guler RL, Abboud HE, Barnes JL. **2004**. Differential expression of calcineurin a isoforms in the diabetic kidney. *J Am Soc Nephrol* 15(6):1421-9.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. **2002**. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58
- Gottesman MM, Pastan I. **1993**. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427
- Grandjean F, Bremaud L, Verdier M, Robert J, Ratinaud MH. **2001**. Sequential gene expression of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein: functional activity of P-gp and MRP present in the doxorubicin-resistant human K562 cell lines. *Anticancer Drugs* 12(3): 247-258
- Groebe K, Mueller-Klieser W. **1996**. On the relation between size of necrosis and diameter of tumor spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34(2): 395-401
- Hamilton G. **1998**. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett* 131(1): 29-34
- Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC. **1997**. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol* 8: 135-142
- Hsia TC, Lin CC, Wang JJ, Ho ST, Kao A. **2002**. Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression. *Lung* 180(3): 173-179
- Inch WR, McCredie JA, Sutherland RM. **1970**. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* 34: 271-282
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Shoemaker RH, Rome LH, Scheper RJ. **1996**. Relationship of a LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology* 19(3): 191-197
- Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, van der Valk, P, Belien JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P. **1995**. Drug resistance-associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87(16): 1230-1237
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U. **1996**. Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56: 988-994
- Jones OT. **1994**. The regulation of superoxide production by the NADPH oxide of neutrophils and other mammalian cells. *Bioassays* 16(12): 919-923

- Juliano RL, Ling V. **1976**. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455(1): 152-162
- Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M. **2000**. NADPH oxidase subunit, gp91 (phox homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254(1-2): 237-243
- Kitazono M, Okumura H, Ikeda R, Sumizawa T, Furukawa T, Nagayama S, Seto K, Aikou T, Akiyama S. **2001**. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* 91(1): 126-131
- Köhler C. **2002**. Expression von P-Glykoprotein (MDR-1), MRP-1 und LRP in humanen All- und Clara-Zell-ähnlichen Tumorzelllinien sowie normalen humanen Bronchialepithelzellen. Med. *Dissertation* Halle-Wittenberg
- Komarov PG, Shtil AA, Holian O, Tee L, Buckingham L, Mechetner EB, Robinson IB, Coon JS. **1998**. Activation of the LRP (lung-resistance-related protein) gene by short-term exposure of human leukemia cells to phorbol ester and cytarabine. *Oncol Res* 10(4): 185-192
- Kool M, Van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. **1996**. Expression of a human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 59: 175-182
- Koomagi R, Mattern J, Volm M. **1995**. Up-regulation of resistance-related proteins in human lung tumors with poor vascularization. *Carcinogenesis* 16(9): 2129-33
- Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. **2000**.
- Kreitz S, Fackelmayer FJ, Gerdes J, Knippers R. **2000**. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res* 261, 284-292
- Krishna R, Mayer LD. **2000**. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 11: 265-283
- Krishnamachary N, Center MS. **1993**. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDA membrane bound glycoprotein. *Cancer Res* 53: 3658-3661
- Kuchler K, Thorner J. **1992**. Functional expression of human mdr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2302-2306
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. **1998**. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path* 79: 1-23
- Lambeth JD, Uhlinger DJ, Tyagi SR. **1995**. On the mechanism of inhibition of the neutrophil respiratory burst oxidase by a peptide from the C-terminus of the large subunit of cytochrome b558. *Biochemistry* 34: 524-527

- Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. **2000**. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci* 25(10): 459-461
- Landry J, Freyer JP, Sutherland RM. **1982**. A model for the growth of multicellular spheroids. *Cell Tissue Kinet* 15(6): 585-594
- Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH. **1997**. Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int J Cancer* 72(6): 1021-1026
- Lawrence DS, Copper JE, Smith CD. **2001**. Structure-activity studies of substituted quinoxalinones as multiple-drug-resistance antagonists. *J Med Chem* 44: 594-601
- Lehmann T, Kohler C, Weidauer E, Taege C, Foth H. **2001**. Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* 167(1): 59-72
- List AF. **1997**. Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance. *Sem Hematology* 34(4) Suppl. 5: 20-24
- Lorico A, Rappa G, Flavell RY. **1996**. Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res* 56: 5351-5355
- Lu M, Wang J, Yi X. **2001**. Clinical significance of the expression of lung resistance protein in small cell lung carcinomas. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 24(8): 458-460
- Luk CK, Keng PC, Sutherland RM. **1986**. Radiation response of proliferating and quiescent subpopulations isolated from multicellular spheroids. *Br J Cancer* 54: 25-32
- Luk CK, Sutherland RM. **1986**. Influence of growth phase, nutrition and hypoxia on heterogeneity of cellular buoyant densities in in vitro tumor model systems. *Int J Cancer* 37(6): 883-890
- Mintz GR. **1993**. References to the use of AEBSF. *BioPharm* 6: 34
- Miyoshi N, Tojo E, Oishi A, Fujiki M, Misumi K, Sakamoto H, Kameyama K, Shimizu T, Yasuda N. **2002**. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Med Sci* 64(6): 531-533
- Moore AS, Leveille CR, Reimann KA, Shu H, Arias IM. **1995**. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest* 13(5): 475-479
- Mueller-Klieser WF, Sutherland RM. **1984**. Oxygen consumption and oxygen diffusion properties of multicellular spheroids from two different cell lines. *Adv Exp Med Biol* 180: 311-321
- Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM. **1986**. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br J Cancer* 53(3): 345-353

- Mueller-Klieser W. **2000**. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 36(2-3): 123-139
- Norman BH, Gruber JM, Hollinshead SP, Wilson JW, Starling JJ, Law KL, Self TD, Tabas LB, Williams DC, Paul DC, Wagner MM, Dantzig AH. **2002**. Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorg Med Chem Lett* 12(6): 883-883
- O'Donnell VB. **1993**. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH Oxidase. *J Biochem* 290(1): 41-49
- Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. **2003**. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 417(1): 3-11
- Okai Y, Nakamura N, Matsushiro H, Kato H, Setoguchi A, Yazawa M, Okuda M, Watari T, Hasegawa A, Tsujimoto H. **2000**. Molecular analysis of multidrug resistance in feline lymphoma cells. *Am J Vet Res* 61(9):1122-1127
- Olive PL, Durand RE. **1994**. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev* 13(2): 121-138
- Oloumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, Banath JP, Olive PL. **2000**. Changes in subcellular distribution of topoisomerase II alpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res* 60(20): 5747-5753
- Page RL, Hughes CS, Huyen S, Sagris J, Trogdon M. **2000**. Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines. *Anticancer Res* 20(5B): 3533-3538
- Pakos EE, Ioannidis JP. **2003**. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer* 98(3): 581-589
- Paneitz A, Kroemer H. **2001**. Wie Arzneistoffe sich gegenseitig beeinflussen. Pharmazeutische Zeitung. Govi-Verlag, Greifswald
- Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL, Muller M. **1999**. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *BR J Pharmacol* 126(3): 681-688
- Roepe PD, Wei LY, Cruz J, Carlson D. **1993**. Lower electrical membrane potential and altered pH homeostasis in multidrug-resistant (MDR) cells: further characterization of a series of MDR cell lines expressing different levels of P-glycoprotein. *Biochemistry* 32:11042-11056
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. **1993**. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 268: 6077-6080

- Safa AR. **1988**. Photoaffinity labeling of the multidrug resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil. *N Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19): 7187-7191
- Saito T, Zhang ZJ, Ohtsubo T, Noda I, Tokuriki M, Shibamori Y, Yamamoto T, Saito H. **2004**. Inhibitory effect of cyclosporin A on p-glycoprotein function in peripheral nerves of mice treated with doxorubicin and vinblastine. *Acta Otolaryngol* 124(3):313-7.
- Sakai H, Noda A, Shirai N, Lidaka T, Yanai T, Masegi T, Shirai N, Lidaka T, Yanai T, Masegi T. **2002**. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol* 127(4): 233-238
- Sauerbrey A, Zintl F, Hermann J, Volm V. **1998**. Multiple resistance mechanisms in acute nonlymphoblastic leukemia (ANLL). *Anticancer Res* 18: 1231-1236
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ. **1995**. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1(6): 578-582
- Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. **2000**. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 12(6): 550-556
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL. **1993**. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 53: 1475-1479
- Schlemmer SR, Sirotnak FM. **1994**. Functional studies of P-glycoprotein in inside-out plasma membrane vesicles derived from murine erythroleukemia cells overexpressing MDR3. Properties and kinetics of the interaction of vinblastine with P-glycoprotein and evidence for its active mediated transport. *J Biol Chem* 269: 31059-31066
- Scholzen T, Gerdes J. **2000**. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322
- Seral C, Michot JM, Chanteux H, Mingeot-Leclerq MP, Tulkens PM van Bambeke F. **2003**. Influence of P-glycoprotein inhibitors on accumulation of macrolides in J774 murine macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 47(3): 1047-1051
- Shapiro AB, Ling V. **1995**. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J Biol Chem* 270(27): 16167-16175
- Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y, Lu P. **1999**. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta* 1461(2): 327-345

- Sharom FJ, Yu X, Lu P, Liu R, Chu JW, Szabo K, Muller M, Hose CD, Monks A, Varadi A, Seprodi J, Sarkadi B. **1999**. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizer in isolated membranes, reconstituted systems and intact cells. *Biochem Pharmacol* 58(4): 571-586
- Sirotnak FM, Wendel G, Bornmann W, Tong W, Miller A, Scher H, Kris M. **2000**. Co-administration of probenecid, an inhibitor of a cMOAT/MRP-like plasma membrane ATPase, greatly enhanced the efficacy of a new 10-deazaaminopterin against human solid tumors. *Clin Cancer Res* (6): 3705-3712
- Slovak ML, Ho JP, Cole SP, Deeley RG, Greenberger L, de Vries EG, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ. **1995**. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res* 55(19): 4214-4219
- Smith CD, Myers CB, Zilfou JT, Smith SN, Lawrence DS. **2000**. Indoloquinoline compounds that selectively antagonize P-glycoprotein. *Oncol Res* 12(5): 219-229
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. **2002**. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105(12): 1429-1435
- Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nuijten WJ, Beijnen JH, van Tellingen O. **1997**. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of Paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2031-3035
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. **1978**. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int J Cancer* 21, 274-281
- Sugawara I. **1990**. Expression and function of P-glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissues. *Acta Pathol Jpn* 40(8): 545-553
- Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, Itoyama S. **1997**. Lung resistance protein (LRP) expression in normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett* 112(1): 23-31
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. **1999**. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401(6748): 79-82
- Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. **1970**. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 18(5): 491-495
- Sutherland RM, Durand RE. **1973**. Hypoxic cells in an in vitro tumor model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 23(3): 235-246
- Sutherland RM, Durand RE. **1976**. Radiation response of multicellular spheroids – an in vitro tumor model. *Curr Top Radiat Res Q* 11: 113-120

- Sutherland RM, Durand RE. **1984**. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Rec Res Cancer Res* 95: 24-49
- Sutherland RM. **1988**. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240: 177-184
- Szabo D, Keyzer H, Kaiser HE, Molnar J. **2000**. Reversal of multidrug resistance of tumor cells. *Anticancer Res* 20(6B): 4261-4274
- Szatrowski TP, Nathan CF. **1991**. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51(3): 794-798
- Takanishi K, Miyazaki M, Ohtsuka M, Nakajima N. **1997**. Inverse relationship between P-glycoprotein expression and its proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 54(3): 231-237
- Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R. **1992**. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharm Exp Ther* 263: 840-845
- Tannock IF, Goldenberg GG. **1998**. Drug resistance and experimental Chemotherapy. In: Tannock IF, Hill RP, editors. *The Basic Science of Oncology* Inc. USA: The McGraw-Hill Companies. 392-419
- te Boekhorst PA, van Kapel J, Schoester M. **1992**. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 238-242
- Theyer G, Schirmbock M, Thalhammer T, Sherwood ER, Baumgartner G, Hamilton G. **1993**. Role of the MDR-1-encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines. *J Urol* 150(5 Pt 1): 1544-1547
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. **1989**. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37: 159-164
- Thomas H, Coley H. **2003**. Overcoming multidrug resistance in cancer: An Update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 10(2): 159-165
- Trussardi A, Poivetin G, Gorisse MC, Faroux MJ, Bobichon H, Delvincourt C, Jardillier JC. **1998**. Sequential overexpression of LRP and MRP but not P-gp in VP16-selected A549 adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 13(3): 543-548
- Tsuruo T, Lida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. **1981**. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41: 1967-1972
- Twentyman PR, Bleehen NM. **1991**. Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin [corrected]. *Eur J Cancer* 27: 1639-1642

- Uchiumi T, Kohno K, Tanimura H, Matsuo K, Sato S, Uchida Y, Kuwano M. **1993**. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Diff* 4(3): 147-157
- Ueda K, Okamura N, Hirai M. **1992**. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267: 2424-2425
- Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF. **1992**. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355(6363): 830-833
- Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. **2000**. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 60(4): 457-470
- van Brussel JP, van Steenbrugge GJ, Romijn JC, Schroder FH, Mickisch GH. **1999**. Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur J Cancer* 35(4): 664-671
- Van der Kolk DM, Vellenga E, Muller M, de Vries EG. **1999**. Multidrug resistance protein MRP1, glutathione and related enzymes. Their importance in acute myeloid leukemia. *Adv Exp Med Biol* 457: 187-198
- Van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Vellenga E. **2000**. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 6(8): 3205-3214
- Volm M, Mattern J. **1993**. Detection of multiple resistance mechanisms in untreated human lung cancer. *Onkologie* 16: 189-200
- Walter RB, Raden BW, Hong TC, Flowers DA, Bernstein ID, Linenberger ML. **2003**. Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 102(4): 1466-1473
- Wartenberg M, Acker H. **1995**. Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy. *Micron* 26(5): 395-404
- Wartenberg M, Frey C, Diedershagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H. **1998**. Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated Doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 75: 855-863
- Wartenberg M, Fischer K, Hescheler J, Sauer H. **2000**. Redox regulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance in multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 85(2): 267-274
- Wartenberg M, Ling FC, Schallenberg M, Baumer AT, Petrat K, Hescheler J, Sauer H. **2001**. Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 276(20): 17421-17428

- Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, Sauer H. **2003**. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 7(3): 503-505
- Washington CB, Wiltshire HR, Man M, Moy T, Harris SR, Worth E, Weigl P, Liang Z, Hall D, Marriott L, Blaschke TF. **2000**. The disposition of saquinavir in normal and P-glycoprotein deficient mice, rats and in cultured cells. *Drug Metab Dispos* 28(9): 1058-1062
- Wei LY, Roepe PD. **1994**. Low external pH and osmotic shock increase the expression of human MDR protein. *Biochem* 33(23): 7229-7238
- Wijnholds J. **2002**. Drug resistance caused by multidrug resistance-associated proteins. *Novartis Found Symp* 243: 69-82
- Williams GC, Liu A, Knipp G, Sinko PJ. **2002**. Direct evidence that Saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canicular multispecific organic anion transporter (MRP2). *Antimicrob Agents Chemother* 46(11): 3456-3462
- Wolf DC, Horwitz SB. **1992**. P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity- labeled by the steroid. *Int J Cancer* 52: 141-146
- Xing H, Gao QL, Yang XK, Li J, Gao C, Wu JH, Lu YP, Ma D. **2003**. Resistance of multicellular spheroids to taxol in human ovarian cancer and its mechanism. *Ai Zheng* 22(8): 826-830
- Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB. **1989**. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 264: 782-788
- Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. **2003**. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. *Respiration* 70(1): 32-35
- Ziemann C, Burkle A, Kahl GF, Hirsch-Ernst KI. **1999**. Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* 20(3): 407-414
- Zurita AJ, Diestra JE, Condom E, García del Muro X, Scheffer GL, Scheper RJ, Pérez J, Lluch J, Izquierdo MA. **2003**. Lung-resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumor. *Brit J of Cancer* 88: 879-886

9. Anhang

9.1. Firmenverzeichnis der verwendeten Materialien

- [1] Affinity Bioreagents, Golden, Colorado, USA (www.bioreagents.com)
- [2] Alexis Biochemicals, Grünberg, D (www.alexis-corp.com)
- [3] Bandelin Elektronik, Berlin, D (www.bandelin.com)
- [4] Biochrom AG, Berlin, D (www.biochrom.de)
- [5] Biomol AG, Hamburg, D (www.biomol.de)
- [6] BioRad, München, D (www.bio-rad.com)
- [7] BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA (www.biotek.com)
- [8] Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, D (www.calbiochem-novabiochem.com)
- [9] Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D (www.carl-roth.de)
- [10] Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA (www.cellsignal.com)
- [11] Dianova, Hamburg, D (www.dianova.de)
- [12] Eppendorf GmbH, Engelsdorf, D (www.eppendorf.com)
- [13] Forma Scientific, Marjetta, Ohio, USA
- [14] Fujifilm Photo Europe GmbH, Düsseldorf, D (www.fujifilm.de)
- [15] Gibco, BRL® Life Technologie, Karlsruhe, D (www.ivitrogen.com)
- [16] Heraeus Instruments, Hanau, D
- [17] Heirler Cenovis, Radolfzell, D (www.heirler-cenovis.com)
- [18] Idea Scientific Company, Minneapolis, Minnesota, USA (www.ideascientific.com)
- [19] Ika Labortechnik, Staufen, D (www.ika.net)
- [20] Integra Biosciences, Fernwald, D (www.integra-biosciences.com)
- [21] Kendro Laboratory Products, Osterode, D (www.kendro.com)
- [22] Kodak AG, Stuttgart, D (www.kodak.de)
- [23] Merck, Darmstadt, D (www.merck.com)
- [24] Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA (www.probes.com)
- [25] NEN™ Life Sciences Products, Boston Massachusetts, USA (www.bio-itworld.com)
- [26] New England Biolabs, Beverly, Michigan, USA (www.neb.com)
- [27] Novartis Pharma AG, Basel, CH (www.novartis.com)
- [28] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA (www.scbt.com)
- [29] Sartorius AG, Göttingen, D (www.sartorius.com)
- [30] Schleicher und Schuell Bioscience GmbH, Dassel, D (www.biocompare.com)
- [31] Scientific-Industries Inc., Bohemia, New York, USA (www.scientificindustries.com)
- [32] Scotsman Elektronik, Mailand, Italien

- [33] Serva Electrophoresis, Heidelberg, D (www.serva.de)
- [34] Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D (www.sigmaaldrich.com)
- [35] Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, USA (www.upstate.com)
- [36] USB, Cleveland, Ohio, USA (www.usbweb.com)
- [37] Zeiss, Jena, D (www.zeiss.com)

Geräte

- automatische Eismaschine [32]
- Axiovert 135 [37]
- Brutschränke [13] [16]
- Cellspin Rührsystem [20]
- Feinwaage Sartorius [29]
- LSM 410 invert [37]
- Microplate-Photometer μ Quant [7]
- SDS-Gel-System, Minigelkammer, Hoefer Tall Mighty Small (www.labortechnik.com)
- Spinner-Flaschen [20]
- Stemi-1000 Mikroskop [37]
- Sterilbank „Nuaire“ Biological Safety Cabinet [20]
- Stromgerät „PowerPac 1000“ [6]
- Tankblot [18]
- Thermomixer compact [12]
- Ultraschallbad Sonorex RK 52 [3]
- Vortex-Genie 2 [31]
- Zentrifuge „Biofuge primo heraeus“ [16]
- Zentrifuge „Centrifuge 5417C“ [12]
- Zentrifuge „kamag Reo“ [19]

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation veröffentlichte Arbeiten

11.1. Publizierter Abstract

Wartenberg M, Veulemanns V, Budde P, Hoffmann E, Schwindt H, Hescheler J, Lambeth JD, Sauer H. **2004**. Effect of Nox1 overexpression in prostate tumor cells on ROS generation and tumor induced angiogenesis in confrontation cultures. Poster, 83. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 14.-17. März 2004, Leipzig

12. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Wartenberg bedanken, die es mir ermöglicht hat, diese Dissertation in ihrem Labor anzufertigen. Für die ständige Präsenz und Diskussionsbereitschaft, sowie die gute Betreuung bin ich Ihr und Herr Prof. Dr. Sauer, sehr dankbar. Herrn Prof. Hescheler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel für diese Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank geht vor allem an Frank Grünheck, der mich in der Durchführung meiner Arbeit sehr unterstützt hat. Des weiteren möchte ich mich bei Frau Tampier bedanken, die immer ein gutes Wort für mich parat hatte. Mein herzlicher Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Wiesener und der Arbeitsgruppe von Herr Dr. Rosenkranz, die mir mit der Durchführung der Western Blots eine sehr große Hilfe waren.

Herr Prof. Dr. R. Gerstberger danke ich, dass er bereit war, diese Dissertation als externe Doktorarbeit zu betreuen – vor allen Dingen zu korregieren - und dabei jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Zu großem Dank bin ich auch der Hans-Böckler-Stiftung verpflichtet, die mich durch ihr Stipendium finanziell sehr unterstützt hat.

Danken möchte ich auch allen anderen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Friederike Peiffer für die schnelle und genaue Korrektur meiner Rechtschreibung und Zeichensetzung, sowie Michael Walter – wo immer Du auch gerade sein magst - für die Korrektur des Summary.

Meinen Freunden möchte ich danken, dass sie meine Freunde sind.

Wilfried Brach-Virnich, sowie Theo und Irene, danke ich für einen ausgezeichneten Arbeitsplatz und die Möglichkeit, mich neben der Promotion in meinem Beruf weiter zu entwickeln.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in die Welt gesetzt haben und vor allen Dingen John, der so viel Geduld gehabt und zugehört hat und auf den ich mich jeder Zeit verlassen kann.