

**Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans**

**Multidrug Resistance-Proteine in humanen malignen
Gliomen
Expression, funktionelle Aktivität und Regulation durch p53**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Roy Oliver Bähr
aus Johannesburg (Südafrika)**

2005

Dekan : Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter : Professor Dr. M. Weller

2. Berichterstatter : Professor Dr. R. Meyermann

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Maligne Gliome	9
1.2	Aktuelle Therapien.....	10
1.2.1	Operative Therapie	10
1.2.2	Strahlentherapie.....	10
1.2.3	Chemotherapie	10
1.3	Resistenzmechanismen gegen Zytostatika	14
1.3.1	Prinzipien	14
1.3.2	Das P-Glykoprotein.....	15
1.3.3	Das <i>Multidrug resistance-associated</i> Protein 1 (MRP1).....	15
1.4	Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke	17
1.5	Prinzipien und Substanzen zur MDR-Inhibition	18
1.6	Regulation von P-gp und MRP1 durch p53.....	19
1.7	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Chemikalien.....	23
2.2	Zelllinien und Zellkultur	24
2.3	Transfektion	24
2.4	Untersuchung von Zytotoxizität	25
2.4.1	Berechnung der EC50-Werte	25
2.5	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	26
2.5.1	RNA-Isolierung und RNA-Testgel.....	26
2.5.2	DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	27
2.5.3	Amplifikation der cDNA	28
2.5.4	Primer.....	30
2.6	Durchflußzytometrische Bestimmung der Proteinexpression.....	30

2.7	Quantifizierung der P-gp-Aktivität mittels Rhodamin-123 Transport	31
2.8	Quantifizierung der MRP-Aktivität mittels Fluorescein-Transport	32
2.9	Statistik	32
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	35
3.1	mRNA-Expression	35
3.2	Proteinexpression	37
3.3	Transportaktivität.....	39
3.4	Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch MDR-Inhibitoren	43
3.5	Vergleich mit anderen molekularen Parametern.....	47
3.6	MDR-Mechanismen bei humanen zerebralen Endothelzellen.....	48
3.7	Einfluß von p53 auf die P-gp/MRP1-Expression und -Funktion	50
3.7.1	Beeinflussung von P-gp durch Wildtyp-p53	50
3.7.2	Beeinflussung von P-gp durch mutantes p53	50
3.7.3	Beeinflussung von MRP1 durch Wildtyp-p53	51
3.7.4	Beeinflussung von MRP1 durch mutantes p53	52
3.7.5	Einfluß von p53 auf die Vincristin-Sensibilität humaner Gliomzelllinien	53
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	57
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
6	ANHANG	65
6.1	Veröffentlichungen.....	65
6.1.1	Publikationen.....	65
6.1.2	Vorträge.....	65
6.1.3	Poster.....	65
6.2	Abkürzungen	67
6.3	Danksagung	68

6.4	Lebenslauf.....	69
------------	------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1 Maligne Gliome

Als „maligne Gliome“ bezeichnet man Tumoren des Zentralnervensystems, die sich aus Gliazellen oder deren Vorläuferzellen entwickeln und die nach der neuen WHO-Klassifikation in die Grade III und IV eingeteilt werden (Kleihues und Cavenee, 2000). Dazu gehören die anaplastischen Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome (alle Grad III) sowie die Glioblastome (Grad IV). Typische histologische Merkmale sind eine hohe Zelldichte und Zellpolymorphie. Grad III-Tumoren zeigen eine erhöhte mitotische Aktivität, die Grad IV-Tumoren weisen zusätzliche Endothelproliferation und/oder Nekrosen auf.

Gliome sind die häufigsten malignen, hirneigenen Tumoren des Erwachsenenalters. Die Prognose insbesondere für Patienten mit Glioblastomen ist schlecht. Die mediane Überlebenszeit beträgt bei maximaler Therapie kaum mehr als ein Jahr (Fine et al., 1993). Neben der operativen Therapie ist die Strahlentherapie der wichtigste Bestandteil der Therapie, der eine Verlängerung der Überlebenszeit um etwa 6 Monate zugeschrieben wird. Die Effektivität der Chemotherapie bei malignen Gliomen ist begrenzt. Die Anzahl der länger als 1 bis 1,5 Jahre überlebenden Patienten steigt jedoch deutlich an (Fine et al., 1993; De Angelis et al., 1998).

Da die chirurgischen und radioonkologischen Möglichkeiten weitestgehend ausgeschöpft erscheinen, stützt sich die Hoffnung für die Zukunft auf optimierte Chemotherapieprotokolle und vor allem auf neue, innovative Therapieformen. Der Focus liegt dabei auf immunologischen und gentherapeutischen Ansätzen.

1.2 Aktuelle Therapien

1.2.1 Operative Therapie

Ob bei malignen Gliomen eine radikale Resektion angestrebt werden soll oder die alleinige Biopsie ausreichend ist, wird noch immer kontrovers diskutiert. Die Datenlage erlaubt diesbezüglich keine Entscheidung für oder gegen eine der beiden Möglichkeiten. Es fehlt eine randomisierte, prospektive Studie, die den therapeutischen Wert einer möglichst umfassenden Resektion untersucht. Retrospektive Untersuchungen legen jedoch nahe, daß eine möglichst komplette Resektion einen positiven prognostischen Faktor darstellt. Bei großen, ausgedehnten Tumoren ist die Resektion wegen des Hirndrucks notwendig, um die Ausgangsbedingungen für die sich anschließende Strahlen- und Chemotherapie zu verbessern, da durch die Resektion eine deutliche Zytoreduktion erreicht wird. Zudem profitiert der Patient davon, daß nach umfassender Resektion eine rasche Reduktion der Steroiddosis möglich ist. Das größte Hindernis für den Erfolg der operativen Therapie ist das diffus infiltrierende Wachstumsverhalten maligner Gliome. Umgekehrt erspart die stereotaktische Biopsie dem Patienten einen stärker belastenden neurochirurgischen Eingriff mit allen Risiken und Komplikationen.

1.2.2 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist die einzige Therapie, deren Wirksamkeit in kontrollierten, randomisierten Studien nachgewiesen wurde. Die Bestrahlung der erweiterten Tumorregion mit 60 Gy verlängert die mediane Überlebenszeit von 4 auf 9 bis 12 Monate. Höhere Strahlendosen verbessern die Prognose nicht und sind wegen der begrenzten Strahlentoleranz vor allem des Marklagers nicht vertretbar. Auch die früher durchgeführte Ganzhirnbestrahlung hat nur zu mehr Nebenwirkungen geführt, ohne die Prognose zu verbessern.

1.2.3 Chemotherapie

Bezogen auf die Gesamtpopulation von Glioblastompatienten ist der Wert einer zusätzlichen Chemotherapie gering. Eine Untergruppe von etwa 20 - 25 % der Patienten profitiert jedoch von einer Chemotherapie mit Nitrosoharnstoff-haltigen Protokollen (De Angelis et al., 1998).

Der fehlenden Effektivität der aktuellen Chemotherapeutika liegen vermutlich mehrere

Mechanismen zugrunde. Zum einen stellt die Blut-Hirn-Schranke in unterschiedlichem Ausmaß eine wichtige Hürde für viele der verwendeten Zytostatika dar, zum anderen zeigen Gliome eine ausgeprägte endogene Chemoresistenz. Die schlechte Durchblutung maligner Hirntumoren, sowie der niedrige pH-Wert und die Hypoxie im Zentrum dieser Tumoren beeinträchtigen die Wirkung von Zytostatika ebenfalls. Auch wenn die Blut-Hirn-Schranke in Teilen des Tumors nicht intakt ist, so können sich doch immer noch viele Zellen, gerade die infiltrativen, hinter dieser vor Medikamenten in der Blutbahn „verstecken“. Einige der zur Gliomtherapie bisher eingesetzten Substanzen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 : Beschreibung der verwendeten Zytostatika

Zytostatikum	Beschreibung
Vincristin	Vincristin gehört zu den Pflanzenalkaloiden (Vincaalkaloide), bindet in niedrigen Konzentrationen an die Proteine des Spindelapparats und hemmt die Zellteilung in der Metaphase. Bei höheren Konzentrationen, die auch therapeutisch erreicht werden, treten aber auch Chromosomenbrüche und Translokationen, d.h., genotoxische Effekte auf.
Doxorubicin	Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen (Antibiotika) und interkaliert in die DNA. Darüber hinaus ist jedoch der Stoffwechsel an der Wirkung beteiligt. Durch mikrosomale Zytochrom-P-450-Reduktase und NADPH werden Anthracycline zu Semichinon-Radikalen reduziert, die Radikalreaktionen auslösen und Sauerstoffradikalanionen produzieren. Das Auftreten von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie von Schwesterchromatid-Austauschen wird damit in Zusammenhang gebracht.
Teniposid	Teniposid gehört zur Gruppe der Epipodophyllotoxine, die in Extrakten von Fußblattgewächsen (<i>Podophyllum peltatum</i>) enthalten sind. Obwohl Podophyllotoxin wie die Vincaalkaloide an Tubulin bindet, beeinträchtigt Teniposid die Funktion der Spindelproteine nicht. Es erzeugt aber DNA-Strangbrüche. Die Topoisomerase II wird als Zielmolekül der Schädigung angesehen.
CCNU	CCNU (Lomustin) gehört zu den Nitrosoharnstoffen und damit zu den alkylierenden Verbindungen. Die Nitrosoharnstoff-Derivate sind besonders lipophil und passieren die Bluthirnschranke.

Zytostatikum	Beschreibung
Paclitaxel	Paclitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane, das bei einer breit angelegten Naturstoffsuche aus der pazifischen Eibe (<i>Taxus brevifolia</i>) isoliert wurde. Es bindet spezifisch an β -Tubulin und stabilisiert die Assemblierung von Mikrotubuli durch Hemmung der Depolymerisierung. Die Folge ist eine abnorme Spindelbildung während der Mitose, so daß die Zelle in der M-Phase des Zellzyklus blockiert wird.
Cisplatin	Cisplatin wird zu den alkylierenden Verbindungen gezählt und verursacht Verknüpfungen zwischen benachbarten DNA-Strängen (<i>interstrand cross linking</i>), zwischen DNA und Proteinen, vor allem aber zwischen benachbarten Guanin-Resten innerhalb eines DNA-Stranges (<i>intrastrand cross linking</i>). Die Ausbildung von <i>cross links</i> hemmt die Zellteilung und wirkt sich vor allem in der S-Phase aus.
Topotecan	Topotecan hemmt das Enzym Topoisomerase I, das an der DNA-Replikation beteiligt ist, indem es die Torsionsspannung vor der Replikationsgabel löst. Als Folge der Topoisomerase-Hemmung entstehen Brüche der DNS-Einzelstränge.
Gemcitabin	Gemcitabin gehört in die Gruppe der Nukleosidanaloga. Es ist ein fluoriertes Cytarabinanalogon und wird nach Umwandlung zum Triphosphat in die DNS eingebaut, und es kommt zum Kettenabbruch. Da noch ein normales Nukleotid folgt, bevor die DNS-Kette abbricht, spricht man von maskiertem Kettenabbruch. Reparaturenzyme können das halb falsche Nukleotid nicht erkennen und entfernen. Darüber hinaus blockiert Gemcitabindiphosphat die Ribonukleotidreduktase und senkt dadurch die intrazelluläre Konzentration von Desoxycytidintriphosphat. Schließlich hemmen die Gemcitabinnukleotide die Desoxycytidindesaminase und vermindern dadurch den Abbau von Gemcitabin.

1.3 Resistenzmechanismen gegen Zytostatika

1.3.1 Prinzipien

Die molekularen Mechanismen, die der Resistenz maligner Gliome gegenüber Zytostatika zugrunde liegen, sind bisher nur unzureichend verstanden (Rieger et al., 2001). Prinzipiell bestehen für eine Tumorzelle verschiedene Möglichkeiten, sich vor Zytostatika zu schützen (Gottesman, 1993). So können Defekte in den Apoptosesignalwegen oder ein Mißverhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen eine Resistenz gegen chemo- und/oder strahleninduzierter Apoptose zur Folge haben. Außerdem können die gesteigerte Funktion von DNA-Reparaturmechanismen oder Enzymen zur Zytostatikametabolisierung die Wirkung von Zytostatika beeinträchtigen. Ein weiterer Resistenzmechanismus wird als „multidrug resistance“ (MDR) oder multiple Zytostatikaresistenz bezeichnet. Dabei kommt es primär oder nach Behandlung mit Zytostatika zur Kreuzresistenz gegenüber vielen strukturell nicht verwandten Substanzen. Die Substanzen werden unter ATP-Verbrauch durch Transportproteine aus der Zelle gepumpt, so daß ein steiler Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum entsteht (Abb. 1).

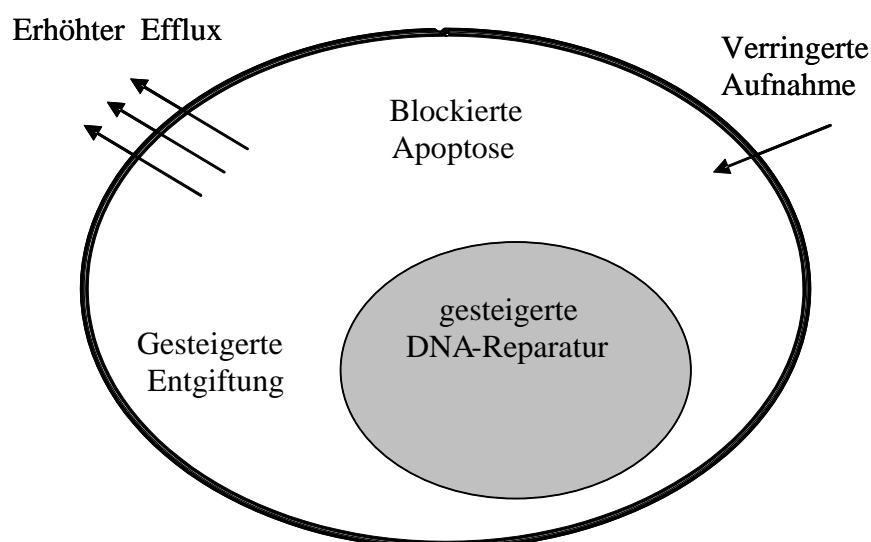


Abbildung 1 : Zelluläre Faktoren der Zytostatikaresistenz

1.3.2 Das P-Glykoprotein

Das P-Glykoprotein (P-gp) ist ein Breitspektrum-MDR-Transporter, der aus 12 Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsstellen besteht. Die Transmembranregionen binden hydrophobe Substanzen, die entweder neutral oder positiv geladen sind. Zwei ATP-Moleküle werden zeitversetzt verbraucht, um Medikamente aus der Zelle zu pumpen. Das erste ATP-Molekül dient dem eigentlichen Transport, während das zweite Molekül benötigt wird, um den Transporter wieder in die funktionsfähige Ausgangsstellung zu bringen. P-gp kann so eine Vielzahl zytotoxischer Substanzen und etliche klinisch eingesetzte Pharmaka aus der Zelle pumpen. Der daraus entstehende Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum erzeugt die relative Resistenz (Gottesman et al., 1996). Wie die vermutete Funktion im Prozeß der natürlichen Detoxifikation nahe legt, findet sich P-gp in vielen gesunden Geweben. Insbesondere sekretorische oder schrankenbildende Zellen einschließlich der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zeigen hohe P-gp Expression.

1.3.3 Das *Multidrug resistance-associated Protein 1 (MRP1)*

Hinweise auf ein weiteres P-gp-ähnliches Transportsystem ergaben sich aus den Untersuchungen an der Leukämiezelllinie HL60/ADR (McGarth und Center, 1988). Die Klonierung dieses neuen Transporters gelang aber erst 4 Jahre später aus der P-gp-negativen Bronchialkarzinomzelllinie H69AR (Cole et al., 1992). Untersuchungen an anderen Zelllinien zeigten, daß die meisten resistenten, aber P-gp-negativen Linien, MRP1-positiv waren. Wie P-gp gehört auch MRP1 zu der Familie der ATP-bindenden Transporter mit jedoch geringer Sequenzhomologie zu P-gp (Borst et al., 1999).

Im Gegensatz zu P-gp wirkt MRP1 als GS-X-Pumpe (*ATP-dependent glutathione S-conjugate efflux pump*), bei der ein Transport von GSH-konjugierten Substanzen stattfindet. So pumpt MRP1 auch Leukotrien C₄ und S-2,4-Dinitrophenyl-Glutathion aus der Zelle. Allerdings scheint auch ein Cotransport von GSH mit unkonjugierten Substanzen statt zu finden.

Schließlich existieren weitere Homologe von MRP1, die am Phänomen der MDR beteiligt sind. Dazu wird das MRP2 oder auch cMOAT genannte Protein gezählt. MRP2, das eine 49%ige Übereinstimmung mit MRP1 auf Proteinebene besitzt, arbeitet ebenfalls als GS-X Pumpe und wird in erster Linie von den kanalikulären Membranen der Hepatozyten exprimiert. Dort ist es vor allem für die Ausscheidung von

konjugiertem Bilirubin wichtig. Eine Mutation in dem entsprechenden Gen führt beim Menschen zum Dubin-Johnson-Syndrom, einer Form der primären Hyperbilirubinämie. Eine Recherche in der EST-Bibliothek (*expressed sequence tag*) brachte weitere MRP-Homologe zu Tage, die als MRP3, MRP4 und MRP5 bezeichnet werden, deren Rolle in der Ausprägung des MDR-Phänotyps jedoch noch ungeklärt ist (Kool et al., 1997).

1.4 Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke

Einen wesentlichen Unterschied zwischen soliden Tumoren anderer Organe des menschlichen Körpers und den malignen Hirntumoren stellt die Blut-Hirn-Schranke dar (Tóth et al., 1996). Unter physiologischen Bedingungen stellt sie unter anderem sicher, daß Substanzen, die für das Gehirn potentiell toxisch sind, nicht ins Hirngewebe eindringen können. Früher wurde angenommen, daß die Blut-Hirn-Schranke vor allem durch die besonders enge Verknüpfung zwischen den einzelnen Endothelzellen aufrechterhalten wird. Den „Tight Junctions“ wies man dabei die größte Bedeutung zu. Heute weiß man, daß die Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch weitere spezifischere Mechanismen garantiert wird (Borst und Schinkel, 1996). Auch die MDR-Transporter gehören zu diesen Mechanismen und können, da sie nur luminal exprimiert werden (Tanaka et al., 1994), Zytostatika daran hindern, ins Hirngewebe zu gelangen (Cordon-Cardo et al., 1989; Huai-Yun et al., 1998; Regina et al., 1998). Für die Chemotherapie hirneigener Tumore hat das weitreichende Folgen (Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996). Untersuchungen an mdr-1-defizienten Mäusen zeigten eindrücklich wie effizient P-gp z.B. Vincristin den Eintritt ins Gehirn verwehrt. Auch wenn die durch Neoangiogenese gefäßreichen Tumorteile ein minderwertiges Endothel aufweisen und keine funktionsfähige Blut-Hirn-Schranke besteht, so liegen doch große Teile eines Tumors „hinter“ einer intakten Blut-Hirn-Schranke. Dadurch entziehen sich diese Tumorzellen einer effektiven Chemotherapie (Fellner et al., 2002; Takamiya et al., 1997).

1.5 Prinzipien und Substanzen zur MDR-Inhibition

Neben der grundsätzlichen Untersuchung der MDR-Transporter begann man sehr früh, die Möglichkeiten der Hemmung dieser Pumpen zu studieren (Den Boer et al., 1998). Zunächst setzte man Substanzen ein, die selbst Substrate dieser Pumpen sind, z.B. Verapamil, die den Transport der Chemotherapeutika kompetitiv hemmen (Kiwit et al., 1994; Roller et al., 1999; Rieger et al., 2000). Da diese Substanzen wie die Zytostatika aus der Zelle gepumpt werden, ist ihre Wirkung limitiert. Mehr Hoffnungen werden nun auf Substanzen gesetzt, die nicht Substrate der MDR-Transporter sind, z.B. Cyclosporin A oder PSC833, sondern diese an anderen Stellen der dreidimensionalen Proteinstruktur binden und inhibieren (Larrivee und Averill, 1999). Von diesen Substanzen weiß man, daß sie P-gp bei einmaliger klinischer Verabreichung für mindestens 3 Tage hemmen. Solche Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien eingesetzt. Die bisherigen Ergebnisse sind jedoch eher ernüchternd ausgefallen.

1.6 Regulation von P-gp und MRP1 durch p53

Wird die DNA einer Zelle durch ionisierende Strahlung, mutagene Substanzen oder Zytostatika geschädigt, so kommt es zur gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressorgens p53. Dieses Protein, auch „Wächter des Genoms“ genannt, verhindert, daß die geschädigte DNA repliziert wird. Dies kann auf zwei verschiedene Art und Weisen erreicht werden. Zum einen kann p53 durch die Aktivierung von p21 zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase führen. Dadurch gewinnt die Zelle Zeit, ihre DNA zu reparieren. Die zweite Möglichkeit ist die Auslösung eines apoptotischen Zelltods, der durch p53 vermittelt wird (Levine, 1997).

Mutationen im p53-Gen sind in humanen malignen Tumoren weit verbreitet. Ca. 50% aller Tumoren weisen p53-Mutationen auf. Dadurch gehen die oben genannten p53-vermittelten Funktionen zur Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion verloren. Den inaktivierenden Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53 und den aktivierenden Mutationen in zellulären Protoonkogenen werden eine entscheidende Rolle in der Genese maligner Tumoren zugeschrieben.

Einige Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß auch *mdr-1* (P-gp) und *mrp-1* (MRP1) Zielgene von p53 sind (Chin et al., 1992; Wang und Beck, 1998). Dabei soll p53 als transkriptioneller Repressor wirken und im Wildtyp-Status die Transkription von *mdr-1* und *mrp-1* hemmen. Die dazu durchgeführten Untersuchungen sind allerdings widersprüchlich. So steigerte die Expression von mutantern p53 in verschiedenen Zelllinien die MDR1-CAT-Reporter-Aktivität signifikant (Chin et al., 1992; Zastawany et al., 1993). Die Transfektion von mutantern p53 in embryonale Fibroblasten einer p53 „knock-out“ Maus führte ebenfalls zu einer leichten Steigerung der MDR1-CAT-Aktivität. Daraus wird deutlich, daß mutantes p53 nicht nur als dominantnegativer Inhibitor des Wildtyp-p53-Proteins wirkt, sondern auch eine direkte Wirkung, im Sinne eines *gain of function* Phänotyps, entfalten kann (Lin et al., 1995). Im Gegensatz dazu führte in einer anderen Arbeit die Überexpression von mutantern p53 in drei weiteren p53-Wildtyp-Tumorzelllinien zu keiner Änderung der MDR1-CAT-Aktivität (Goldsmith et al., 1995).

Die Rolle von Wildtyp-p53 bei der Regulation von *mdr-1* zeigt sich gleichermaßen paradox. Transfiziertes Wildtyp-p53 hatte keinen Effekt auf die MDR1-CAT-Aktivität

in NIH-3T3-Fibroblasten (Chin et al., 1992), aber reduzierte die Aktivität des MDR1-CAT-Reporters in Kolonkarzinomzellen und stimulierte die Aktivität dieses Konstrukts in drei weiteren Karzinomzellen (Goldsmith et al., 1995).

Nur wenige Studien haben bisher den Einfluss von p53 auf die Proteinexpression und die funktionelle Aktivität von P-gp und MRP1 untersucht (Sullivan et al., 2000), aber auch diese ergaben widersprüchliche Befunde (Zhou und Kuo, 1998).

1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das Phänomen der *Multidrug Resistance* auf grund der Expression von P-gp und/oder MRP1 ist bei verschiedenen Tumorentitäten eine zentrale Hürde für eine erfolgreiche Chemotherapie (Gottesmann et al., 1996).

Maligne Gliome, insbesondere die Glioblastome, sind äußerst resistent gegenüber den momentan zur Verfügung stehenden Therapieformen. Die molekularen Mechanismen dieser Resistenz sind bis heute nur unzureichend verstanden (Rieger et al., 2000). Diese zu klären stellt eine wichtige Voraussetzung für neue Therapien dar, um diese Resistenzen zu umgehen. Schon die Vorhersage, welche Patienten von einer Chemotherapie profitieren könnten, wäre ein großer Schritt für die Gliomtherapie. Die klinische Bedeutung des MDR-Phänotyps bei Gliomen wird kontrovers diskutiert (Ashmore et al., 1999). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß sowohl die Tumorzellen als auch die Endothelzellen zu diesem Phänomen beitragen können (Henson et al., 1992; Matsumoto et al., 1991, Abe et al., 1994; Abe et al., 1998; Becker et al., 1991). Die vorliegende Arbeit wurde initiiert, um besser zu verstehen, inwieweit die Expression von P-gp und MRP1 in Gliomzellen und cerebralen Endothelzellen die erfolgreiche zytostatische Therapie maligner Gliome behindert.

Außerdem sollte geklärt werden, inwieweit die entsprechenden Gene, *mdr-1* (P-gp) und *mrp-1* (MRP1), durch p53 reguliert werden. Der Verlust von p53-Wildtyp-Aktivität und das Auftreten des MDR-Phänotyps sind zwei Schlüsselereignisse der Resistenzentwicklung humaner Neoplasien. Die mögliche Verknüpfung dieser beiden Ereignisse lag deshalb im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit. Die existierenden Arbeiten zur Regulation von *mdr-1* und *mrp-1* durch Wildtyp oder mutantes p53 waren äußerst widersprüchlich. Außerdem lagen nur wenige Studien vor, die neben Promoteraktivitäten auch die Proteinexpression und die funktionelle Aktivität untersuchen. Diese Kontroversen sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Folgende Reagenzien wurden käuflich erworben :

1-(2-chlorethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU)	<u>Medac</u> (Hamburg)
Cisplatin	<u>Bristol</u> (München)
Doxorubicin	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM)	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
Ethidiumbromid	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Fluorescein	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierter anti-Ratten IgG-Antikörper	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
Gemcitabin	<u>Lilly</u> (Bad Homburg)
Heparin	<u>Sigma</u> (St.Louis, MO, USA)
Hygromycin	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
Indomethacin	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
ITS Premix	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Kristallviolett	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Maus-IgG2a-Isotyp-Kontrollantikörper	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
MRP-Antikörper MRPr1	<u>Hölzel Diagnostics</u> (Köln)
Natriumzitrat	<u>Merck</u> (Hohenbrunn)
PBS	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
Penizillin / Streptomycin	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
P-gp-Antikörper MRK-16	<u>Hölzel Diagnostics</u> (Köln)
Phycoerythrin (PE)-markierter anti-Maus IgG-Antikörper	<u>Sigma</u> (St.Louis, MO, USA)
Probenecid	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)

Ratten-IgG2a-Isotyp-Kontrollantikörper	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Rhodamine-123	<u>Molecular Probes</u> (Leiden, Niederlande)
RNeasy Mini kit	<u>Quiagen</u> (Hilden, Germany)
Superscript II Reverse Transkriptase	<u>Gibco BRL</u> (Basel, Schweiz)
Taxol	<u>Bristol</u> (München)
Teniposid	<u>Bristol</u> (München)
Topotecan	<u>Smith Kline Beecham</u> (München)
Verapamil	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)
Vincristin	<u>Sigma</u> (St. Louis, MO, USA)

PSC 833 wurde von Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.2 Zelllinien und Zellkultur

Die humanen malignen Gliomzelllinien wurden bei 37°C und 5 % Kohlendioxidgehalt der Brutschrankinnenluft in modifiziertem Dulbecco Medium (DMEM) gehalten. Ferner wurden dem Medium 10 % fetales Kälberserum (FCS), 100 I.E./ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden als Monolayer kultiviert und alle 2 – 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 – 5 min. mit 0,5 ml Trypsin inkubiert. Anschließend wurden sie in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert. LN-18-, U138MG-, U87MG-, LN-428-, D247MG-, T98G-, LN-319-, LN-229-, A172-, U251MG-, U373MG-, LN-308-Zellen wurden von Prof. Dr. N. de Tribolet (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Die SV40-Large T-Antigen-immortalisierten humanen zerebralen Endothelzellen (SV-HCEC) wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt in M199 Medium kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 10 % FCS, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 µg/ml Selen (ITS Premix) und 600 I.E./l Heparin zugesetzt. Die Passagierung wurde wie bei den Gliomzelllinien durchgeführt. Die SV-HCEC-Linie wurde von Dr. A. Muruganandam (Ottawa, ON, Kanada) bereitgestellt.

2.3 Transfektion

Die Zelllinien LN-18, T98G, U87MG, LN-229 und LN-308 wurden mittels Elektroporation mit dem Vektor für das Hygromycin-Resistenzgen (hygro) oder mit

einem Vektor transfiziert, der das Hygromycin-Resistenzgen und das murine p53val¹³⁵ enthält. Daraus resultierten je 2 neue Varianten der Zelllinien, z.B. LN-18 hygro und LN-18 p53val¹³⁵. Das Prinzip der Elektroporation besteht darin, daß sich in der Zellmembran der zu transfizierenden Zellen durch Anlegen einer hohen Spannung kurzzeitig Poren bilden, durch die die in der Zellsuspension enthaltenen Plasmide in die Zellen eintreten. Danach verschließt sich die Zellmembran wieder. Zur Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und mittels einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt, so daß für 5 µg Plasmid 10^7 Zellen verwendet wurden. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen, mit 800 µl PBS resuspendiert und auf Eis gelagert. Zu dieser Zellsuspension wurden 5 µg Plasmid zugegeben und gemischt. Diese Suspension wurde in eine Transfektionsküvette gegeben und die Elektroporation im Genepulser (Biorad, Krefeld-Oppum) bei 250 V und 950 µF durchgeführt. Dann wurden die Zellen in Kulturflaschen und mit Vollmedium kultiviert. Nach zwei Tagen wurde das normale Vollmedium durch Selektionsmedium, d.h., Vollmedium mit 200 µg/ml Hygromycin B, ersetzt und damit die Selektion nach Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, gestartet. Nach ca. 6 Wochen war dieser Vorgang abgeschlossen, und die Zellen wurden gepoolt.

2.4 Untersuchung von Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden die Zellen mit einer Dichte von 10^4 Zellen/well in 96 well-Platten gesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von 8 verschiedenen Zytostatika jeweils mit und ohne P-gp- bzw. MRP1-Inhibitor, behandelt. Nach 72 Stunden wurde mittels Kristallviolett-Färbung das Überleben bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 50 µl Kristallviolett-Lösung pro well für einige Minuten gefärbt und anschließend mit Leitungswasser dreimal gewaschen. Nachdem die Platten getrocknet waren wurden die gefärbten Zellen mit 50 µl Na-Citrat-Lösung lysiert und anschließend am CytoFluor 2350 Lesegerät gemessen.

2.4.1 Berechnung der EC50-Werte

Als Maß der Empfindlichkeit einer bestimmten Zelllinie für ein bestimmtes Zytostatikum wurde aus den Überlebensdaten die Konzentration berechnet bei der noch

50 % der Zellen überleben, die EC50 (*effective concentration*). Im ersten Schritt wurde dazu aus den drei Messergebnissen je Konzentration mit, bzw. ohne Inhibitor, der Mittelwert berechnet. Dann wurde der Mittelwert unter Behandlung ohne Zytostatika und ohne Inhibitor (Kontrollwert) auf 100 % gesetzt und alle anderen Mittelwerte eines Versuches prozentual auf diesen Kontrollwert bezogen. Im dritten Schritt wurden die beiden Konzentrationen identifiziert bei der gerade noch mehr als 50 % (x1), bzw. gerade noch weniger als 50 % der Zellen überleben (x2). Zusammen mit den zu diesen Konzentrationen zugehörigen prozentualen Überlebenswerten (y1 und y2) wurde die EC50 nach folgender Formel berechnet:

$$EC50 = x2 - (x2-x1) * (50-y2) / (y1-y2)$$

D.h. es wurde zwischen den beiden, den 50%-Wert flankierenden Datenpunkten, ein linearer Verlauf angenommen, was eine ungefähre Bestimmung des EC50-Wertes zuläßt.

2.5 Reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR)

2.5.1 RNA-Isolierung und RNA-Testgel

Die Zellen einer konfluenten, mittleren Zellkulturflasche (75 cm²) wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und in Vollmedium aufgenommen. Fünf x 10⁶ Zellen wurden bei 1200 rpm pelletiert, das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen bei -80 °C gelagert. Der folgende Lyseschritt zur RNA-Isolierung mußte zügig und auf Eis durchgeführt werden. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen und gemäß der Herstelleranleitung isoliert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 5 µl RNA-Lösung (ad 500µl mit DEPC-H₂O, zur Inaktivierung der RNasen) gegen DEPC-H₂O als Leerwert bei 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Anschließend wurden die RNA-Proben in einem 1%igen Agarose-Gel zur weiteren Verwendung überprüft. Dazu wurde die Agarose in H₂O thermisch in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen 5 x Laufpuffer und Formaldehyd zugegeben. Die warme Lösung wurde dann in eine Gel-Kammer (Cosmo

ad 100 µl mit DEPC-H₂O

DNase I Extraktion : 100 µl DNase
 10 µl 3 M NaAc, pH=8,0
 250 µl EtOH abs.
Waschschrift : + 1 ml 70 % EtOH

Die DNA/DNase-freien RNA-Proben (5 µg) wurden in 11 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Synthese der cDNA erfolgte durch reverse Transkription der RNA. Den Poly(A)-Enden der mRNA wurden Oligo(dT)₃₀-Primer (Bioscience) bei 70°C für 10 Minuten angelagert und für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Unter Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Puffer (Gibco), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Mix wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Oligo(dT)-Primer erlauben die Verlängerung durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase Superscript II (Gibco, 200 U/µl). Inkubiert wurde für 50 Minuten bei 42 °C. Die Polymerase wurde anschließend bei 70°C für 15 Minuten hitzedenaturiert.

cDNA-Synthese-Ansatz : 5 µg RNA in 11µl DEPC-H₂O
 1 µl Oligo(dT)₃₀ (500 µg/ml)
 4 µl 5 x First strand-Puffer (Gibco)
 2 µl 0,1 M DTT
 1 µl 10 mM dNTP-Mix
 1 µl Superscript II (Gibco, BRL 200 U/µl)

Anschließend wurde die synthetisierte cDNA durch Inkubation mit RNase H von RNA befreit. Dazu wurden zum cDNA-Synthese-Mix 0,5 µl RNase H (Gibco, 1 U/µl) gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit H₂O wurde eine Endkonzentration von 100 µg/ml eingestellt.

2.5.3 Amplifikation der cDNA

Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch die Taq-Polymerase (temperaturstabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*) mit sequenzspezifischen Primern wurde die cDNA-Amplifikation durchgeführt. Das Temperaturprogramm sieht folgenden Zyklus vor :

Denaturierung	40 sec.	94°C
Primer-Annealing	40 sec.	Temperatur primerspezifisch
Primer-Extension	60 sec.	72°C

Zu Beginn wurde 5 Minuten bei 94°C denaturiert, es folgten standardmäßig 35 Zyklen, die mit 5 Minuten Endelongation abgeschlossen wurden. Das Programm sieht eine Deckelbeheizung mit 110°C vor.

PCR-Ansatz :

- 2,5 µl Primer 1 (10 µM)
- 2,5 µl Primer 2 (10 µM)
- 5,0 µl 10 x PCR-Mix (Gibco, mit MgCl₂)
- 1,0 µl 10 mM dNTP-Mix
- 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/l)
- 38 µl H₂O
- in 500 µl PCR-Röhrchen

Die Proben wurden dann in einem 1 %igen Agarose-Gel, das EtBr (0,2 µg/ml) enthielt, aufgetrennt. Die Agarose wurde erneut mit H₂O thermisch in der Mikrowelle in 0,6 x TEA-Puffer gelöst. Ethidiumbromid (EtBr) wurde nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ausgehärtet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 100 V für 30 Minuten durchgeführt. Als Längenstandard diente ein Boehringer DNA-Molekulargewichts-Standard VIII.

50 x TAE-Puffer :

- 242 g Tris
- 57,1 ml Essigsäure (100 %)
- 100 ml 0,5 M EDTA, pH=8,0

0,6 x TAE-Puffer : 6 ml 50 x TAE-Puffer mit dd H₂O ad 500 ml

6 x DNA-Ladepuffer : 30 % Glycerin in dd H₂O

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylolcyanol FF

2.5.4 Primer

Vorwärts- und rückwärts-PCR-Primer für *mdr-1* und *mrp-1* wurden von James Beck (Universitätskinderklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Primer für *mrp-2*, *mrp-3*, *mrp-4* und *mrp-5* wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) erworben, die für humanes β -Aktin bei der Firma Biosource (Fleurus, Belgien). Die Sequenzen der Primer und die Länge des resultierenden Fragments sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Primersequenzen

Gen		Primersequenz	Nucleotide	Länge
<i>mdr-1</i>	vorwärts	5'-GGAGAGATCCTCACCAAGCG-3'	2765-2784	229
	rückwärts	5'-GTTGCCAACCATAGATGAAGG-3'	2973-2993	
<i>mrp-1</i>	vorwärts	5'-CGTGTACTCCAACGCTGAC-3'	2540-2558	326
	rückwärts	5'-CTGGACCGCTGACGCCCGTGAC-3'	2844-2865	
<i>mrp-2</i>	vorwärts	5'-CTGCCTCTTCAGAATCTTAG-3'	4136-4155	241
	rückwärts	5'-CCCAAGTTGCAGGCTGGCC-3'	4358-4376	
<i>mrp-3</i>	vorwärts	5'-GATACGCTCGCCACAGTCC-3'	3229-3247	211
	rückwärts	5'-CAGTTGGCCGTGATGTGGCTG-3'	3425-3439	
<i>mrp-4</i>	vorwärts	5'-CCATTGAAGATCTTCCTGG-3'	12-30	239
	rückwärts	5'-GGTGTTC AATCTGTGTGC-3'	233-250	
<i>mrp-5</i>	vorwärts	5'-GGATAACTTCTCAGTGGG-3'	4033-4050	448
	rückwärts	5'-GGAATGGCAATGCTCTAAAG-3'	4461-4480	
β -Aktin	vorwärts	5'-TGTTTGAGACCTTCAACACCC-3'	409-429	529
	rückwärts	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	918-937	

2.6 Durchflußzytometrische Bestimmung der Proteinexpression

Die Proteinexpression von P-gp und MRP1 der 12 humanen Gliomzelllinien wurde

mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurden die monoklonalen Antikörper MRK-16 (P-gp) und MRPr1 (MRP1) verwendet (Den Boer et al., 1997).

Zur Bestimmung der P-gp-Expression wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen entweder mit dem spezifischen Antikörper MRK-16 (25 µg/ml) oder mit dem Maus-IgG2a-Isotyp-Kontrollantikörper (25 µg/ml) für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit kaltem PBS (0,1% BSA) gewaschen und mit dem Phycoerythrin (PE)-markierten Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus) für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Da der MRPr1 Antikörper an ein intrazelluläres Epitop des MRP1-Proteins bindet, mußten die Zellen vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper permeabilisiert werden. Dazu wurden 5×10^6 Zellen für 15 Minuten bei -20°C in 100%igem Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit dem spezifischen Antikörper MRPr1 (2 µg/ml) oder mit dem entsprechenden Isotyp-Antikörper (Ratte IgG2a, 2 µg/ml) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde dann die Färbung mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundärantikörper (Anti-Ratte-IgG) durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mit einem Becton Dickinson FACSCalibur-Durchflußzytometer gemessen. Es wurden je Probe mindestens 20000 Zellen registriert. Aus dem Quotienten der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der mit dem spezifischen Antikörper gefärbten Zellen und der mit dem Kontrollantikörper gefärbten Zellen wurde der spezifische Fluoreszenz Index (SFI) errechnet.

2.7 Quantifizierung der P-gp-Aktivität mittels Rhodamin-123 Transport

Die funktionelle Aktivität von P-gp wurde mittels der Messung des Rhodamin-123-Transports bestimmt (Den Boer et al., 1997). Dazu wurden zunächst 5×10^5 Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit Rhodamin-123 (200 ng/ml) beladen. Danach konnten die Zellen den Farbstoff für 2 Stunden, entweder mit oder ohne Behandlung mit einem P-gp-Inhibitor (Verapamil 20 µM, PSC833 2 µM) heraus transportieren. Dabei wird erwartet, daß die Zellen bei vorhandener P-gp-Aktivität den Farbstoff Rhodamin-123 aktiv raus transportieren, d.h. Fluoreszenz-Intensität verlieren. Unter Behandlung mit einem P-gp-Inhibitor dagegen sollten diese Zellen auf einem hohen Fluoreszenzniveau bleiben.

Bevor die Zellen dann mittels Durchflußzytometrie analysiert wurden, folgte noch ein Waschschrift mit PBS. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität wurden mit einem Becton Dickinson FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen. Der P-gp-Aktivitätsindex wurde aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität mit und ohne P-gp-Inhibitor errechnet.

2.8 Quantifizierung der MRP-Aktivität mittels Fluorescein-Transport

Die funktionelle Aktivität von MRP1 wurde durch Bestimmung der Fluorescein-Akkumulation in An- und Abwesenheit des MRP-Inhibitors Indomethacin gemessen (Roller et al., 1999).

Dazu wurden die Zellen auf 24-well-Kulturplatten ausgesät und für 24 bis 48 Stunden bis zur Konfluenz bei 37°C im Brutschrank gehalten. Dann wurde den Zellen entweder nur Fluorescein (100 µM) oder Fluorescein zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des MRP-Inhibitors Indomethacin (4, 20, 100 µM) zugesetzt. Dabei wird erwartet, daß sich die Zellen mit MRP-Aktivität aufgrund des Abtransports von Fluorescein gegen die Färbung wehren und deshalb auf einem niedrigen Fluoreszenzniveau bleiben. Gibt man jetzt parallel einen MRP-Inhibitor dazu, so läßt sich bei vorhandener MRP-Aktivität die Färbung intensivieren und eine dementsprechende höhere Fluoreszenzintensität erreichen.

Nach 2 Stunden bei 37°C wurden Farbstoff und Inhibitor entfernt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis mit Lyse-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 0,2 % Triton X-100, pH 7,5) inkubiert. Mit einem CytoFluor 2350 Fluoreszenzmeßgerät (Millipore, Bedford, MA, USA) wurde dann mit einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm die Fluoreszenzintensität gemessen.

Der Aktivitätsindex wurde, nach Subtraktion des Hintergrunds (Fluoreszenz von Medium alleine), erneut aus dem Quotienten aus der Fluoreszenzintensität mit und ohne MRP-Inhibitor berechnet.

2.9 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Der Zusammenhang

zwischen P-gp/MRP-Proteinexpression, der P-gp/MRP-Transportaktivität und den Inhibitor-Effekten wurde mittels des Korrelationskoeffizienten von Pearson bzw. linearer Regression dargestellt. Zur Berechnung wurden je die Mittelwerte der logarithmierten Werte aus den drei Experimenten pro Zelllinie herangezogen. Ein Effekt der Inhibitoren auf die EC50-Werte der Zytostatika wurde dadurch gezeigt, daß die EC50-Werte in Anwesenheit mit den Werten in Abwesenheit des Inhibitors mittels eines 2-Stichproben-t-Tests verglichen wurden. Die resultierenden p-Werte wurden pro Zytostatikum durch die Bonferroni-Holm-Methode für multiples Testen korrigiert. Danach wurden diejenigen Effekte, bei denen der zugehörige p-Wert $< 0,05$ war, als signifikant angesehen. Auch hier wurden die EC50-Werte vor den Berechnungen logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 mRNA-Expression

Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression von *mdr-1* und *mrp-1* bis *mrp-5* sowie als Kontrolle für die Qualität der RNA von β -Aktin untersucht (Abb. 2).

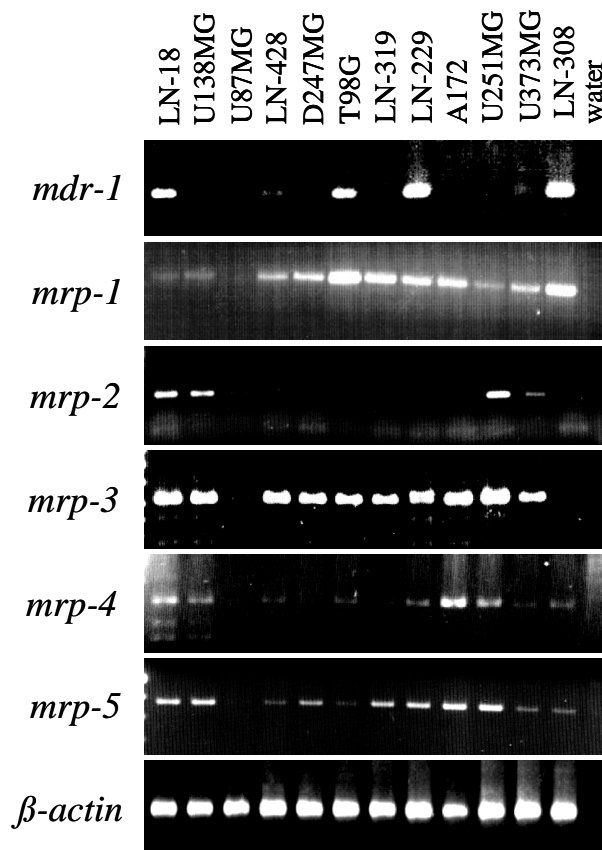


Abbildung 2 : mRNA-Expression der MDR-Gene in 12 humanen Gliomzelllinien

LN-18, T98G, LN-229 und LN-308 zeigten starke *mdr-1*-mRNA-Expression, wohingegen LN-428 und U373MG nur geringe Expression zeigten. In U138MG, U87MG, D247MG, LN-319, A172 und U251MG lag der *mdr-1*-mRNA-Gehalt unter der Detektionsgrenze. T98G, LN-229, A172 und LN-308 zeigten starke *mrp-1*-mRNA-Expression. Schwächere *mrp-1*-Expression fand sich in LN-428, D247MG, U251MG und U373MG. In LN-18, U138MG und U87MG ließ sich kaum *mrp-1*-mRNA

nachweisen. Mrp-2-, mrp-3-, mrp-4- und mrp-5-mRNA ließ sich jeweils in 4, 10, 6 und 10 von 12 Zelllinien detektieren. Die als Ladekontrolle durchgeführte Amplifikation von β -Aktin-mRNA zeigt ein akzeptables Ergebnis. Zum Ausschluß von Kontaminationen wurde auch eine Wasserkontrolle durchgeführt.

Für *mdr-1* zeigt sich demnach eine sehr variable Expression bei 4 eindeutig positiven und 8 eher negativen Zelllinien, wohingegen sich für *mrp-1* ein abgestuftes Bild zeigt. Für zukünftige Studien ist von den restlichen *mrp*-Genen vor allem *mrp-3* interessant, das in fast allen Zelllinien eine starke mRNA-Expression zeigt. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit außer für P-gp und MRP1 keine Antikörper oder andere experimentelle Werkzeuge, z.B. Expressionsplasmide oder pharmakologische Inhibitoren, zur Verfügung standen, beschränkten sich die Untersuchungen der restlichen *mrp*-Gene auf die RT-PCR.

3.2 Proteinexpression

Die Proteinexpression von P-gp (mdr-1) und MRP1 (mrp-1) wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für 4 Zelllinien, jeweils eine mit hoher und eine mit niedriger P-gp-, bzw. MRP1-Expression. Die gepunkteten Linien zeigen die Autofluoreszenz der Zellen ohne Antikörper, die dünnen Linien die Fluoreszenz mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper, und die dicken Linien zeigen das Signal mit dem spezifischen Antikörper gegen P-gp oder MRP1.

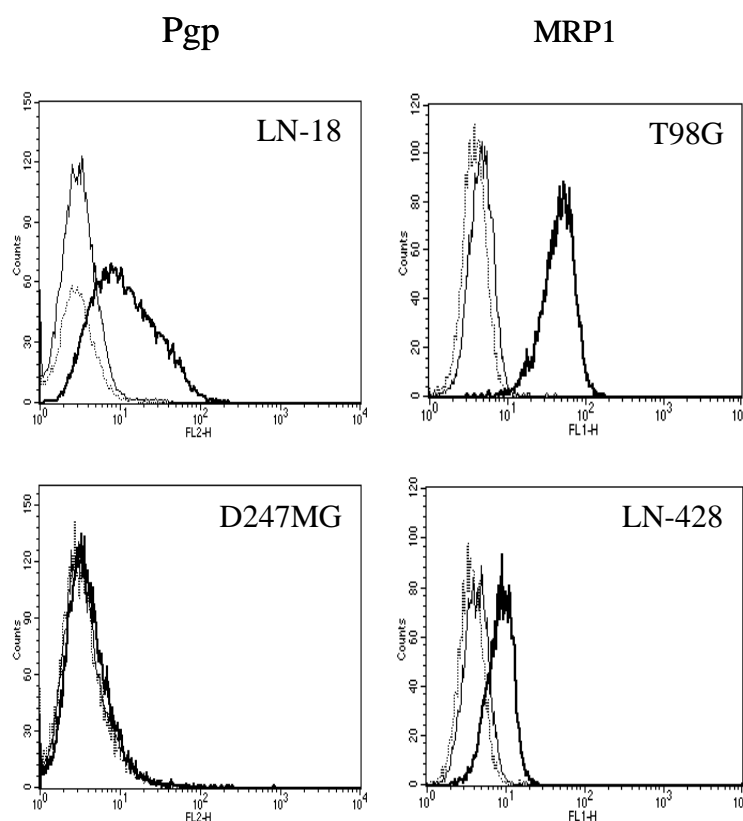


Abbildung 3 : Durchflußzytometrische Analyse der P-gp- und MRP1-Proteinexpression in 4 exemplarischen Gliomzelllinien

Der Quotient aus Fluoreszenzintensität des spezifischen Antikörpers und der des Isotyp-Antikörpers ergab den spezifischen Fluoreszenzindex SFI, welcher der Proteinexpression entspricht (Abb. 4 und 5).

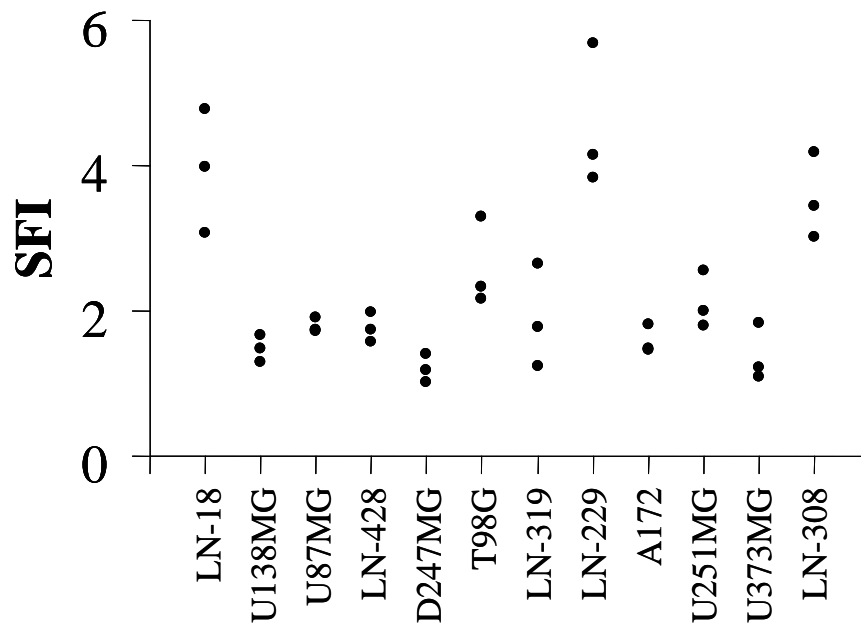


Abbildung 4 : P-gp-Proteinexpression der 12 Gliomzelllinien (je Zelllinie die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

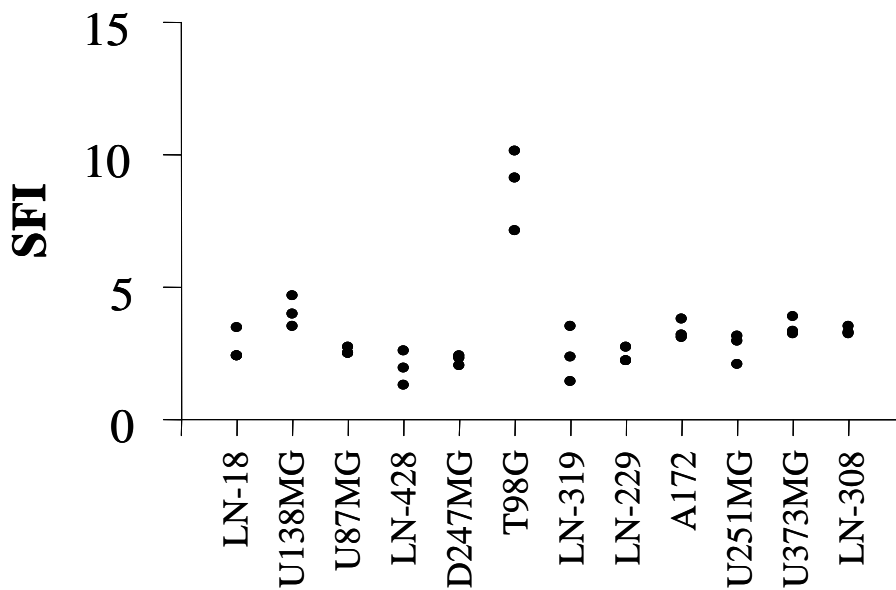


Abbildung 5 : MRP1-Proteinexpression der 12 Gliomzelllinien

Wie aus den PCR Daten zu erwarten, war die P-gp-Expression in LN-18, T98G, LN-229 und LN-308 am stärksten. Die Proteindetektion mittels Durchflußzytometrie zeigte sich als äußerst sensitiv. Bei einigen Zelllinien, die keine mRNA-Expression zeigten, fand sich jedoch Proteinexpression. Möglich wäre, daß der Antikörper neben P-gp ein

weiteres Protein erkennt oder unspezifisch bindet.

Zu bedenken ist, daß die RT-PCR primär der qualitativen Detektion der entsprechenden mRNA diene und nur eine eingeschränkte quantitative Aussage zuläßt. Das mrp-1-mRNA-Signal der U87MG-Zellen, zum Beispiel, war kaum detektierbar, es zeigte sich jedoch in der Durchflußzytometrie MRP1-Proteinexpression und MRP-1-Transportaktivität.

Die Untersuchung von MRP2 bis 5 beschränkte sich auf die Detektion der mRNA, da zum Zeitpunkt der Dissertation keine Antikörper oder andere experimentelle Werkzeuge für diese Proteine zur Verfügung standen.

3.3 Transportaktivität

Die funktionelle Aktivität von P-gp und MRP1 wurde mittels des Transports zweier Fluoreszenzfarbstoffe untersucht.

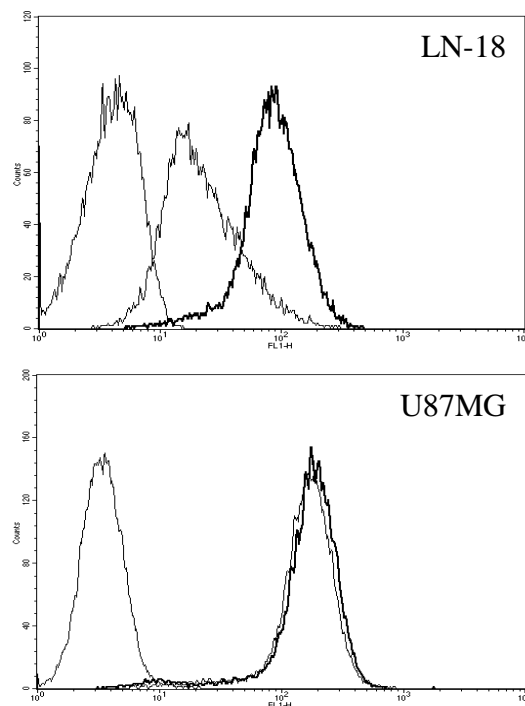


Abbildung 6 : Durchflußzytometrische Analyse des Rhodamin-Transports (die dünne Kurve ganz links stellt die ungefärbten Kontrollzellen dar, die zweite dünne Kurve die gefärbten Zellen ohne P-gp-Inhibitor und die dicke Kurve die gefärbten Zellen mit P-gp-Inhibitor)

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Messungen der Aktivität von P-gp an zwei Zelllinien, Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse von zwei MRP-Aktivitätsmessungen.

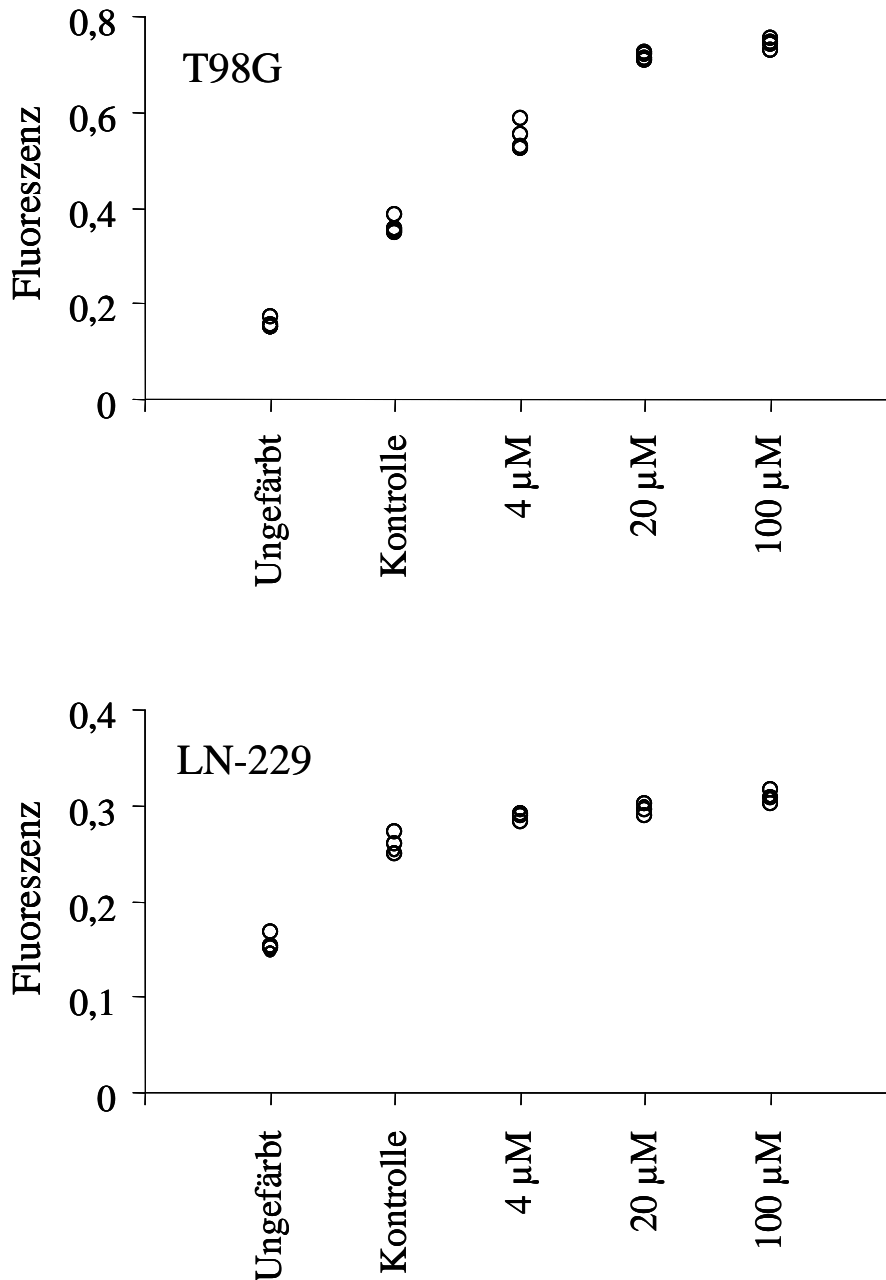


Abbildung 7 : Fluorometrische Bestimmung der MRP1 Aktivität (exemplarische Darstellung der MRP1-positiven Zelllinie T98G, die unter Zugabe des MRP-Inhibitors Indomethacin mehr Fluorescein aufnimmt und mit der Fluoreszenzintensität ansteigt, und der MRP1-negativen Linie LN-229, je 3 Meßwerte)

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde daraus für alle Zelllinien ein Aktivitätsindex für P-gp und MRP1 errechnet, der in Abbildung 8 und 9 für alle 12 Zelllinien dargestellt wurde.

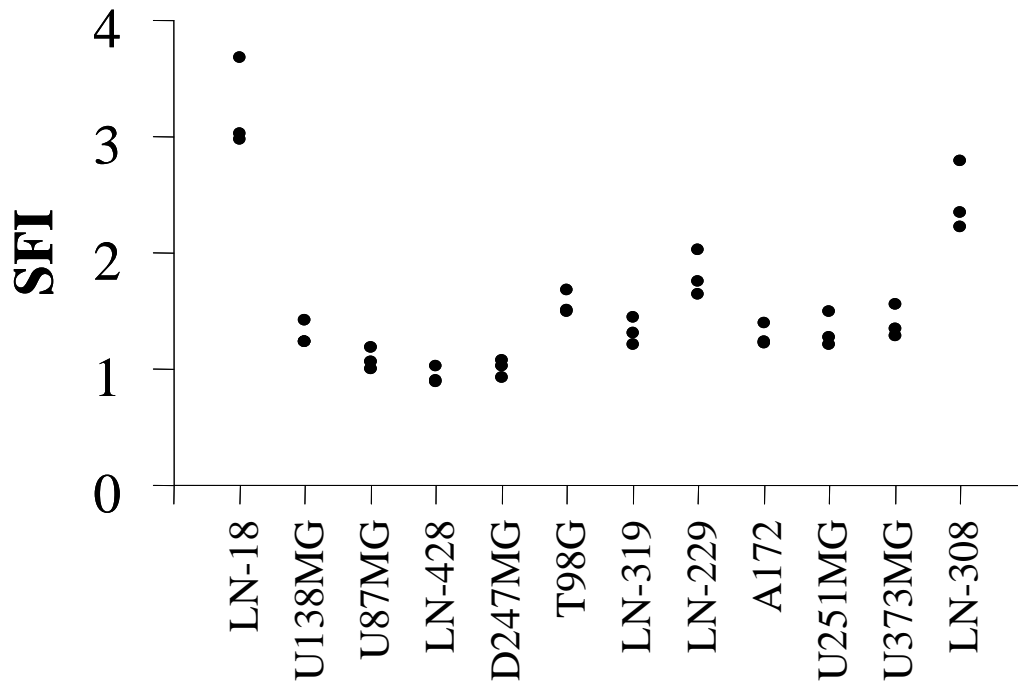


Abbildung 8 : P-gp-Aktivität der 12 Gliomzelllinien

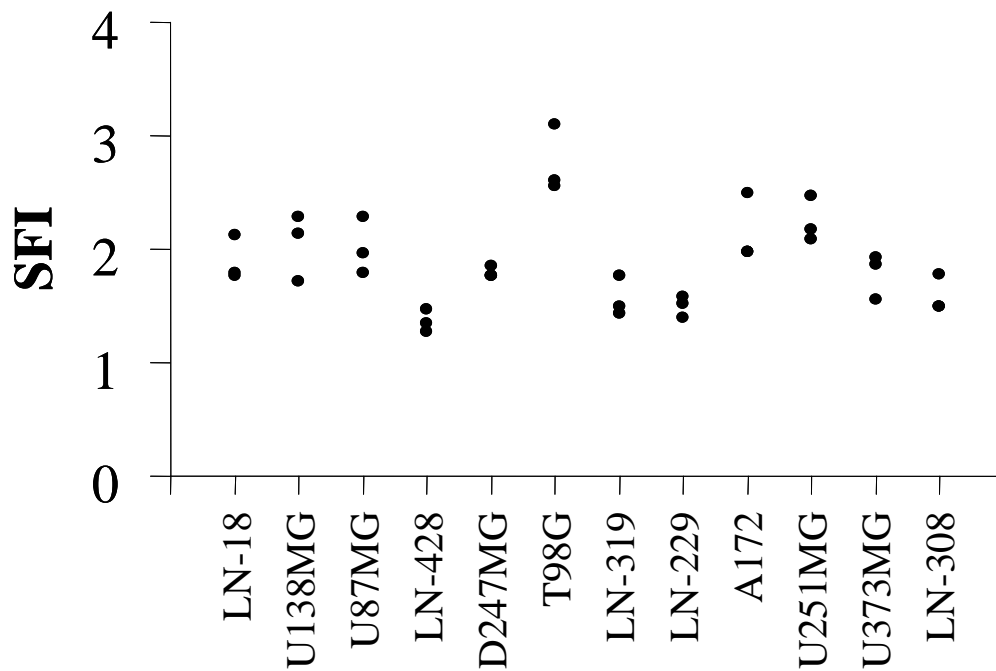


Abbildung 9 : MRP1- Aktivität der 12 Gliomzelllinien

Dabei ergab sich eine positive Korrelation zwischen P-gp-Proteinexpression und Aktivität (Pearsonscher Korrelationskoeffizient=0.81, n=12) und zwischen MRP1-Proteinexpression und Aktivität (Pearsonscher Korrelationskoeffizient=0.76, n=12) (Abbildung 10).

Für mögliche diagnostische Zwecke erscheint, trotz guter Korrelation mit der Proteinexpression, die Transportaktivität der sinnvollste Marker zu sein, da sie der biologischen Bedeutung der beiden Transportproteine am nächsten steht. So wäre die prätherapeutische *ex vivo*-Untersuchung von Tumorzellen auf MDR-Aktivität ein möglicherweise aussichtsreicher Versuch, Patienten, die von einer Chemotherapie profitieren, von denen, die nicht profitieren, zu unterscheiden.

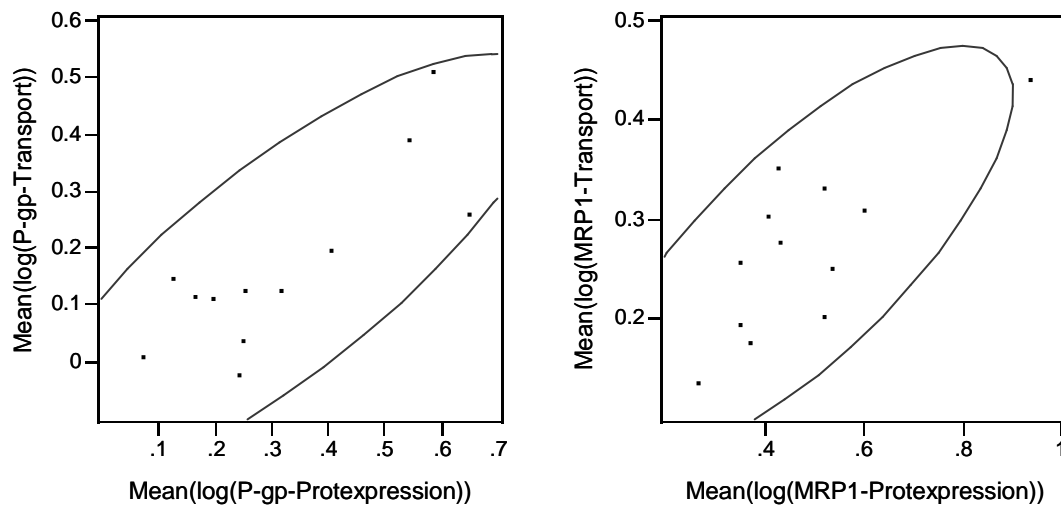


Abbildung 10 : Korrelation zwischen Proteinexpression und Transportaktivität

3.4 Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch MDR-Inhibitoren

Um die biologische Bedeutung von P-gp und MRP1 bei der Chemoresistenz maligner Gliome zu klären, wurden die 12 humanen Gliomzelllinien mit ansteigenden Konzentrationen von 8 verschiedenen Zytostatika, in der An- oder Abwesenheit von P-gp- oder MRP-Inhibitoren, behandelt.

Als P-gp-Inhibitoren wurden Verapamil und PSC 833 verwendet, zur MRP-Inhibition kamen Indomethacin und Probenecid zum Einsatz. Typische Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt.

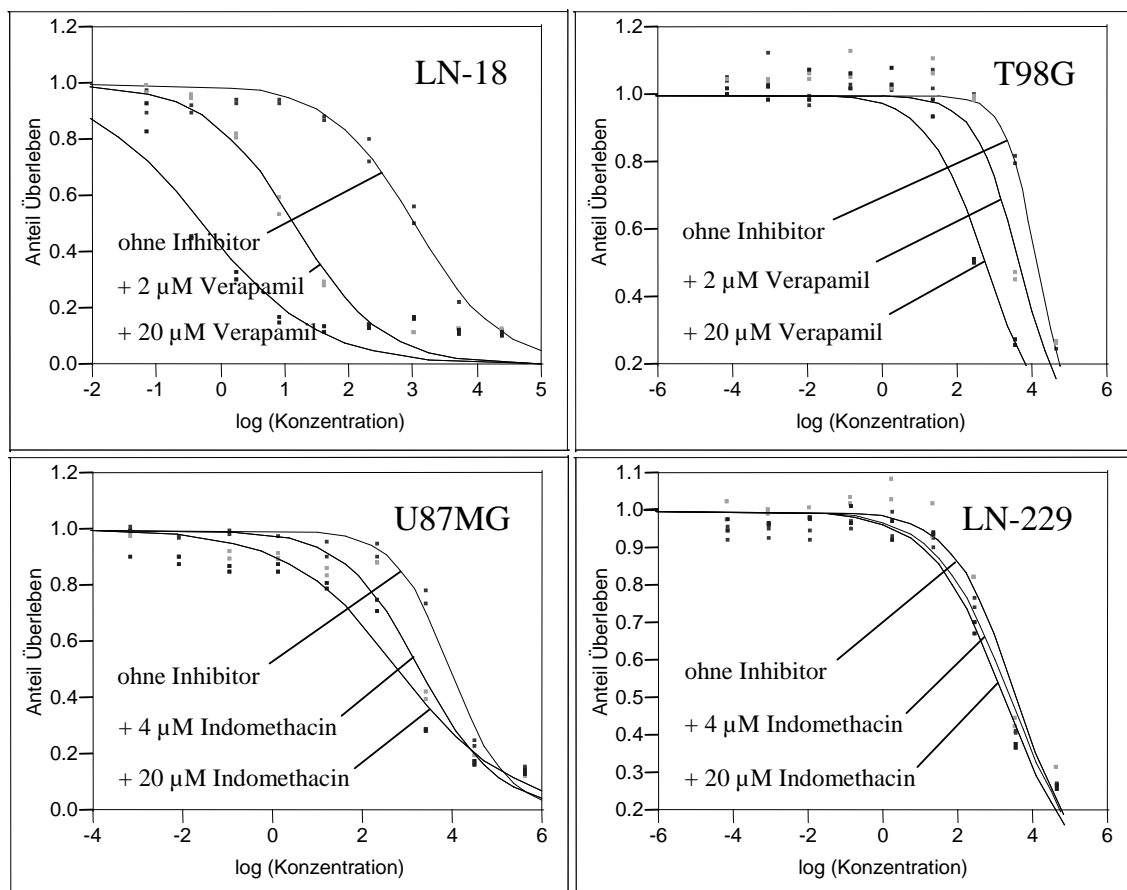


Abbildung 11 : Auswirkungen der MDR-Inhibition auf die Vincristin-Sensibilität (Überlebenskurven ohne MDR-Inhibitor, mit 2 µM, bzw. 20 µM Verapamil oder 4 µM, bzw. 20 µM Indomethacin)

Aus diesen Kurven wurden für die jeweiligen Zelllinien, Zytostatika und Inhibitoren

EC50-Werte berechnet und in Tabelle 3 zusammengefasst. Verapamil beeinflusste in mindestens 6 der 12 Zelllinien die EC50 Werte für Vincristin, Doxorubicin und Teniposid. Taxol wurde in seiner Wirkung nur in den Zelllinien mit der höchsten P-gp-Transportaktivität (LN-18, LN-229, LN-308) beeinflusst. Topotecan und Cisplatin wurden durch Verapamil nur schwach und nur in einigen wenigen Zelllinien in ihrer Wirkung beeinflusst. Gemcitabin und CCNU wurden durch Verapamil nicht in ihrer Wirkung verstärkt. Insgesamt bestand ein signifikanter Einfluß der P-gp-Transportaktivität auf den Verapamil-Effekt ($p=0.002$, Bestimmtheitsmaß $R^2=0.64$, Abbildung 12). Hier zeigt sich, daß die Aktivität eines MDR-Transporters ein guter prädiktive Marker für die zu erwartende Sensibilisierung gegenüber Zytostatika ist, wenn dieser mittels Pharmaka inhibiert wird.

Die Inhibition von MRP durch Indomethacin verursachte eine stärkere Wirkung von Vincristin, Doxorubicin und Teniposid. Die Eigenschaften von Taxol, Teniposid, Cisplatin, Gemcitabin und CCNU blieben unbeeinflusst durch Indomethacin. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Einfluß der MRP-Transportaktivität auf den Indomethacin-Effekt ($p=0.0007$, $R^2=0.70$, Abbildung 12). In Vorversuchen zeigte Probenecid, ein weiterer MRP-Inhibitor, ähnliche Ergebnisse. Diese Untersuchungen wurden aber aufgrund der höheren Eigentoxizität von Probenecid nicht weiter verfolgt.

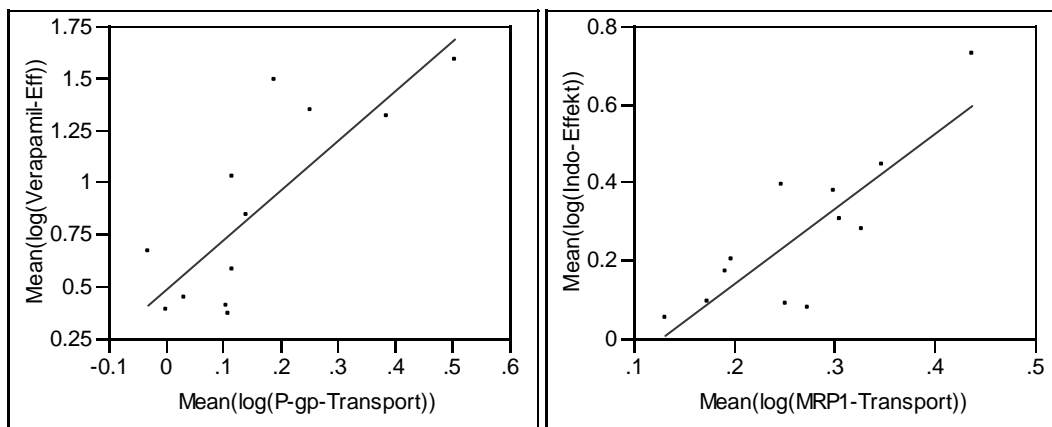


Abbildung 12 : Regression des Inhibitor-Effektes und der Transportaktivität (Regressionsgleichung $\log(\text{Vera-Effekt})=0.48 + 2.4 * \log(\text{P-gp-Transportaktivität})$, bzw. $\log(\text{Indo-Effekt})= -0.25 + 1.93 * \log(\text{MRP1-Transportaktivität})$)

Tabelle 3 : Mittelwerte der logarithmierten EC₅₀-Werte aus je drei Experimenten für 8 Zytostatika und 12 Gliomzelllinien +/- Standardfehler (ohne MDR-Inhibitor, mit 20 µM Verapamil und mit 20 µM Indomethacin, * p<0,05)

	Vincristin [nM]	Doxorubicin [nM]	Teniposid [nM]	Taxol [nM]
LN-18	1,87 +/- 0,02	2,14 +/- 0,03	2,76 +/- 0,02	2,36 +/- 0,02
+ Verapamil	0,29 +/- 0,03 *	1,62 +/- 0,02 *	2,26 +/- 0,02 *	1,49 +/- 0,01*
+ Indomethacin	1,80 +/- 0,03	1,95 +/- 0,02 *	2,59 +/- 0,03	2,36 +/- 0,02
U138MG	1,70 +/- 0,02	2,23 +/- 0,02	2,73 +/- 0,02	2,36 +/- 0,03
+ Verapamil	1,34 +/- 0,02 *	1,86 +/- 0,02 *	2,59 +/- 0,02	2,41 +/- 0,01
+ Indomethacin	1,40 +/- 0,02 *	1,90 +/- 0,02 *	2,59 +/- 0,03	2,32 +/- 0,02
U87MG	1,45 +/- 0,03	2,28 +/- 0,02	2,92 +/- 0,02	1,92 +/- 0,03
+ Verapamil	1,00 +/- 0,02 *	1,90 +/- 0,03 *	2,81 +/- 0,02	1,93 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,07 +/- 0,04 *	1,83 +/- 0,03 *	2,58 +/- 0,02 *	1,92 +/- 0,02
LN-428	1,44 +/- 0,03	2,43 +/- 0,00	2,74 +/- 0,02	1,95 +/- 0,03
+ Verapamil	0,78 +/- 0,02 *	2,23 +/- 0,03 *	2,59 +/- 0,01 *	1,83 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,40 +/- 0,03	2,38 +/- 0,02	2,70 +/- 0,01	1,96 +/- 0,03
D247MG	1,65 +/- 0,02	2,46 +/- 0,02	3,88 +/- 0,02	1,83 +/- 0,03
+ Verapamil	1,28 +/- 0,03 *	2,36 +/- 0,02	3,98 +/- 0,01	1,83 +/- 0,03
+ Indomethacin	1,57 +/- 0,03	2,20 +/- 0,03 *	3,90 +/- 0,02	1,81 +/- 0,03
T98G	1,80 +/- 0,02	2,63 +/- 0,02	3,04 +/- 0,02	1,65 +/- 0,02
+ Verapamil	0,32 +/- 0,25 *	1,87 +/- 0,02 *	2,46 +/- 0,02 *	1,55 +/- 0,03
+ Indomethacin	1,07 +/- 0,04 *	2,32 +/- 0,03 *	2,71 +/- 0,02 *	1,62 +/- 0,02
LN-319	1,49 +/- 0,03	2,57 +/- 0,03	3,00 +/- 0,03	2,20 +/- 0,03
+ Verapamil	0,46 +/- 0,04 *	2,34 +/- 0,02 *	2,82 +/- 0,03 *	2,03 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,32 +/- 0,02	2,46 +/- 0,01	2,98 +/- 0,02	2,11 +/- 0,03
LN-229	1,32 +/- 0,02	2,36 +/- 0,02	3,14 +/- 0,02	2,00 +/- 0,02
+ Verapamil	-0,01 +/- 0,08 *	2,14 +/- 0,03 *	3,14 +/- 0,02	1,63 +/- 0,03*
+ Indomethacin	1,23 +/- 0,03	2,11 +/- 0,03 *	2,88 +/- 0,02 *	1,98 +/- 0,02
A172	1,48 +/- 0,03	2,08 +/- 0,02	3,17 +/- 0,02	1,88 +/- 0,02
+ Verapamil	1,08 +/- 0,02 *	1,75 +/- 0,02 *	3,11 +/- 0,03	1,91 +/- 0,01
+ Indomethacin	1,20 +/- 0,03 *	1,76 +/- 0,03 *	2,90 +/- 0,02 *	1,76 +/- 0,02
U251MG	1,34 +/- 0,01	1,92 +/- 0,02	2,40 +/- 0,02	1,60 +/- 0,02
+ Verapamil	0,77 +/- 0,04 *	1,62 +/- 0,03 *	2,08 +/- 0,02 *	1,50 +/- 0,02
+ Indomethacin	0,90 +/- 0,03 *	1,46 +/- 0,03 *	2,15 +/- 0,02 *	1,60 +/- 0,01
U373MG	1,53 +/- 0,02	2,25 +/- 0,03	2,63 +/- 0,02	2,15 +/- 0,02
+ Verapamil	0,69 +/- 0,05 *	1,83 +/- 0,02 *	2,49 +/- 0,02	2,15 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,14 +/- 0,03 *	1,99 +/- 0,03 *	2,52 +/- 0,02	2,20 +/- 0,02
LN-308	2,15 +/- 0,02	2,76 +/- 0,00	3,08 +/- 0,02	2,79 +/- 0,02
+ Verapamil	0,84 +/- 0,04 *	2,20 +/- 0,02 *	2,73 +/- 0,02 *	2,04 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,95 +/- 0,03 *	2,64 +/- 0,02	2,73 +/- 0,01 *	2,78 +/- 0,02

	Cisplatin [μ M]	Topotecan[nM]	Gemcitabin [nM]	CCNU [nM]
LN-18	0,63 +/- 0,01	2,38 +/- 0,00	1,32 +/- 0,05	2,85 +/- 0,03
+ Verapamil	0,50 +/- 0,02 *	2,42 +/- 0,00	1,33 +/- 0,05	2,77 +/- 0,03
+ Indomethacin	0,58 +/- 0,00	2,30 +/- 0,00	1,32 +/- 0,03	2,81 +/- 0,02
U138MG	0,71 +/- 0,01	1,92 +/- 0,02	3,08 +/- 0,02	2,60 +/- 0,03
+ Verapamil	0,71 +/- 0,03	2,01 +/- 0,02	3,27 +/- 0,06	2,62 +/- 0,03
+ Indomethacin	0,69 +/- 0,04	1,75 +/- 0,02	3,08 +/- 0,03	2,59 +/- 0,04
U87MG	1,18 +/- 0,02	1,89 +/- 0,02	1,26 +/- 0,03	2,87 +/- 0,01
+ Verapamil	1,29 +/- 0,03	1,94 +/- 0,02	1,29 +/- 0,02	2,93 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,21 +/- 0,03	1,90 +/- 0,01	1,26 +/- 0,03	2,87 +/- 0,03
LN-428	1,00 +/- 0,02	2,48 +/- 0,00	1,45 +/- 0,04	2,77 +/- 0,03
+ Verapamil	0,95 +/- 0,02	2,50 +/- 0,00	1,50 +/- 0,03	2,69 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,00 +/- 0,01	2,45 +/- 0,00	1,46 +/- 0,04	2,61 +/- 0,02
D247MG	1,28 +/- 0,01	3,84 +/- 0,02	4,11 +/- 0,02	2,72 +/- 0,02
+ Verapamil	1,32 +/- 0,01	3,82 +/- 0,02	4,17 +/- 0,03	2,77 +/- 0,03
+ Indomethacin	1,31 +/- 0,02	3,83 +/- 0,02	4,08 +/- 0,03	2,74 +/- 0,03
T98G	1,72 +/- 0,03	2,48 +/- 0,02	1,80 +/- 0,04	3,00 +/- 0,03
+ Verapamil	1,65 +/- 0,02	2,36 +/- 0,02	1,87 +/- 0,04	3,04 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,74 +/- 0,02	2,96 +/- 0,04 *	1,93 +/- 0,03	3,00 +/- 0,02
LN-319	0,96 +/- 0,01	3,81 +/- 0,02	3,97 +/- 0,02	2,74 +/- 0,02
+ Verapamil	0,82 +/- 0,01 *	3,86 +/- 0,02	3,97 +/- 0,03	2,73 +/- 0,03
+ Indomethacin	0,99 +/- 0,02	3,82 +/- 0,02	4,08 +/- 0,03	2,76 +/- 0,01
LN-229	0,78 +/- 0,01	1,88 +/- 0,02	1,30 +/- 0,02	2,45 +/- 0,03
+ Verapamil	1,00 +/- 0,03 *	1,93 +/- 0,02	1,76 +/- 0,11	2,39 +/- 0,04
+ Indomethacin	0,91 +/- 0,03	1,88 +/- 0,02	1,30 +/- 0,05	2,41 +/- 0,04
A172	1,42 +/- 0,02	2,28 +/- 0,03	1,84 +/- 0,03	2,70 +/- 0,02
+ Verapamil	1,41 +/- 0,02	2,34 +/- 0,03	1,93 +/- 0,04	2,70 +/- 0,03
+ Indomethacin	1,48 +/- 0,02	2,18 +/- 0,02	1,76 +/- 0,03	2,70 +/- 0,03
U251MG	0,12 +/- 0,03	1,30 +/- 0,02	1,26 +/- 0,05	2,08 +/- 0,02
+ Verapamil	0,09 +/- 0,01	1,27 +/- 0,02	1,24 +/- 0,03	2,25 +/- 0,03
+ Indomethacin	0,03 +/- 0,01	1,30 +/- 0,02	1,31 +/- 0,02	2,14 +/- 0,03
U373MG	0,18 +/- 0,04	1,57 +/- 0,01	2,72 +/- 0,03	2,67 +/- 0,04
+ Verapamil	0,17 +/- 0,02	1,58 +/- 0,02	3,22 +/- 0,07	2,68 +/- 0,04
+ Indomethacin	0,18 +/- 0,04	1,56 +/- 0,03	2,77 +/- 0,03	2,70 +/- 0,03
LN-308	1,14 +/- 0,03	3,11 +/- 0,02	2,74 +/- 0,02	2,51 +/- 0,04
+ Verapamil	1,18 +/- 0,02	3,09 +/- 0,02	3,28 +/- 0,10	2,46 +/- 0,02
+ Indomethacin	1,10 +/- 0,02	2,94 +/- 0,03	2,75 +/- 0,03	2,52 +/- 0,02

3.5 Vergleich mit anderen molekularen Parametern

Schlußendlich wurden die erhobenen Daten zum MDR-Phänotyp der 12 humanen Gliomzelllinien mit denen im Labor für Molekulare Neuro-Onkologie der Neurologischen Klinik bereits erhobenen Daten zur Apoptose und Zellzyklus-Regulation verglichen (Weller et al., 1998; Wick et al., 1999). Insbesondere fragten wir uns, ob die P-gp- oder MRP-Expression oder Aktivität und die Modulation der Zytostatikawirkung durch Verapamil oder Indomethacin mit dem genetischen oder funktionellen p53-Status, dem p16/CDK-4-Status, dem PTEN-Status oder der bcl-2-Expression korreliert. Diese Vergleiche blieben jedoch ohne biologisch relevante Ergebnisse.

3.6 MDR-Mechanismen bei humanen zerebralen Endothelzellen

Um der Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke bei der Chemotherapie von Hirntumoren gerecht zu werden, wurde die humane zerebrale Endothelzelllinie SV-HCEC auf MDR-Mechanismen untersucht. Die RT-PCR zeigte, daß die Endothelzellen *mdr-1*, *mrp-1*, *mrp-2* und *mrp-4*, aber nicht *mrp-3* und *mrp-5* exprimieren. In der Durchflußzytometrie zeigten sie im Vergleich zu den Gliomzelllinien durchschnittliche P-gp und MRP1-Proteinexpression (Abbildung 13).

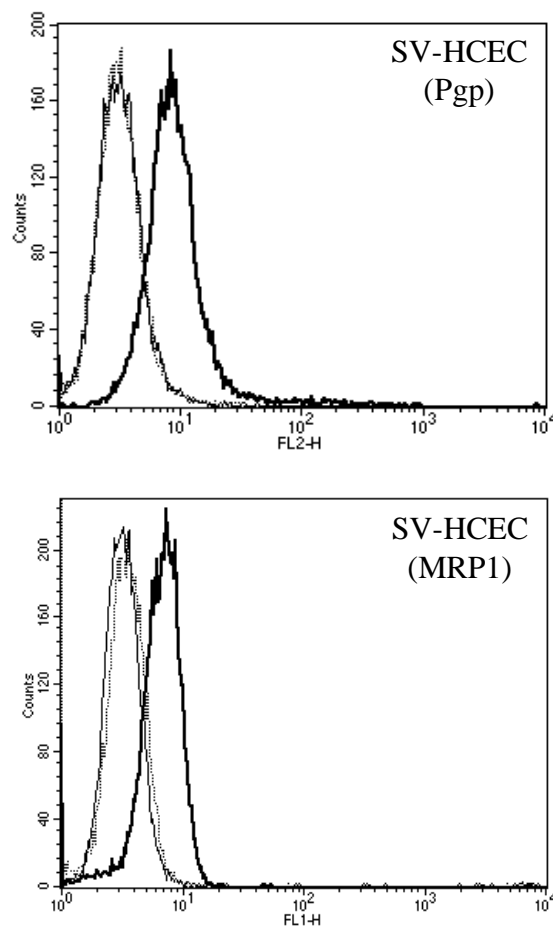


Abbildung 13 : P-gp- und MRP1-Proteinexpression humaner zerebraler Endothelzellen

Im Gegensatz dazu war die P-gp-Aktivität im Rhodamin-Transport-Test mit einem Index von 4,3 höher als in allen Gliomzelllinien (Abbildung 14). Die MRP-Aktivität lag im oberen Bereich der 12 Gliomzelllinien.

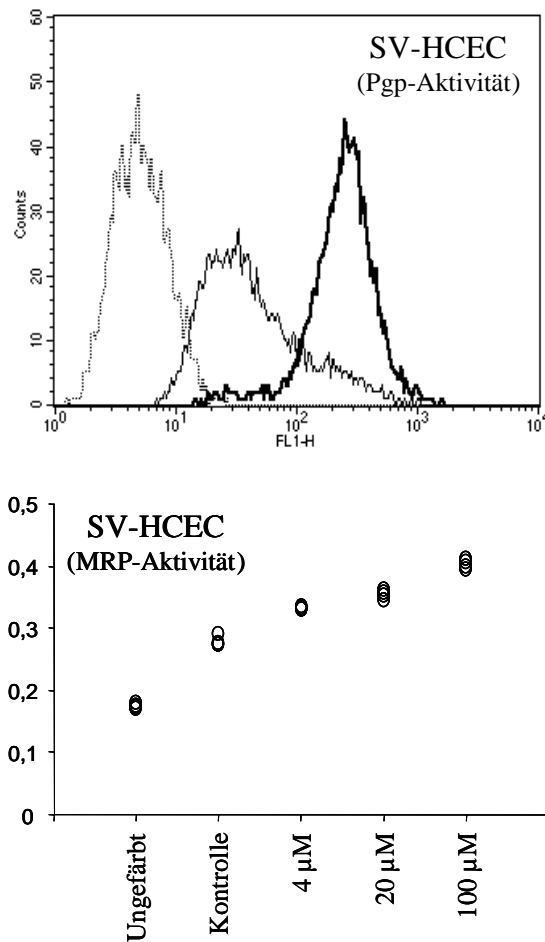


Abbildung 14 : P-gp- und MRP1-Aktivität humaner zerebraler Endothelzellen (zur Erklärung siehe Abb. 6 und 7)

Wie erwartet verstärkte Verapamil die zytotoxischen Effekte von Vincristin, Doxorubicin und Teniposid, nicht aber die der anderen Zytostatika. Indomethacin sensibilisierte die Endothelzellen dagegen nur kaum gegenüber Zytostatika. Dem liegt eventuell die hohe P-gp-Aktivität zu Grunde, die die Kapazität hat eine MRP1-Inhibition zu kompensieren.

3.7 Einfluß von p53 auf die P-gp/MRP1-Expression und -Funktion

Zwischen dem Verlust des Wildtyp-p53-Status und der Akquisition eines MDR-Phänotyps, zwei vermeintlich zentrale Faktoren bei der Therapieresistenz humaner Gliome, besteht möglicherweise ein Zusammenhang. Es gibt Hinweise, daß Wildtyp-p53 die Expression von *mdr-1* und *mrp-1* hemmt. Umgekehrt könnte mutantes p53 die Expression nicht nur frei geben, sondern evtl. sogar zusätzlich, im Sinne eines *gain of function*-Phänotyp, fördern. Deshalb wurden 5 der 12 humanen Gliomzelllinien mit dem murinen, temperatur-sensitiven p53^{V135A} transfiziert. Dieses mutante p53 verhält sich dominant-negativ über Wildtyp-p53 bei 38,5°C und nimmt bei 32,5°C zahlreiche Eigenschaften von Wildtyp-p53 an (Naumann et al., 1998). Die 5 Zelllinien (LN-18, U87MG, T98G, LN-229, LN-308) wurden anhand ihres p53-Status ausgewählt (Tabelle 4). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem gleichen Plasmid ohne p53, also nur mit der Hygromycinresistenz transfiziert. Schließlich wurde nach 48 Stunden Inkubation bei der jeweiligen Temperatur der P-gp- und MRP1-Status erhoben.

3.7.1 Beeinflussung von P-gp durch Wildtyp-p53

Nach 48 Stunden bei 32,5°C wurden die P-gp-Proteinexpression und die P-gp-Aktivität der 5 Zelllinien mittels Durchflußzytometrie gemessen. Dabei zeigten sich bei zwei Zelllinien (LN-18 und LN-308) niedrigere Werte als bei den Kontrolltransfektanten. Zwei weitere Zelllinien (U87MG und LN-229) blieben unbeeinflusst, während bei der Zelllinie T98G die Überexpression von p53^{V135A} zu einer erhöhten P-gp-Aktivität führte (Tabelle 4). Diese Veränderungen zeigten sich jedoch unabhängig vom endogenen p53-Status.

3.7.2 Beeinflussung von P-gp durch mutantes p53

Bei 38,5°C steigerte die p53^{V135A} Expression die P-gp-Expression und Aktivität in 3 von 5 Zelllinien (U87MG, T98G, LN-229), senkte sie jedoch in den übrigen beiden Zelllinien (LN-18, LN308) (Tabelle 4).

Tabelle 4 : Einfluß von p53 auf die Expression und Aktivität von P-gp (Mittelwerte der logarithmierten Daten aus je drei Experimenten +/- Standardfehler)

Temperatur	Zelllinie	p53-Status	Transfektion	P-gp-Expression	P-gp-Aktivität
32,5°C	LN-18	mutant	hygro	1,00 +/- 0,05	0,88 +/- 0,08
			p53 ^{V135A}	0,45 +/- 0,04	0,54 +/- 0,00
	U87MG	wildtyp	hygro	0,44 +/- 0,02	0,18 +/- 0,01
			p53 ^{V135A}	0,42 +/- 0,03	0,16 +/- 0,01
	T98G	mutant	hygro	0,17 +/- 0,02	0,21 +/- 0,01
			p53 ^{V135A}	0,20 +/- 0,02	0,39 +/- 0,01
	LN-229	wildtyp	hygro	0,70 +/- 0,04	0,32 +/- 0,02
			p53 ^{V135A}	0,63 +/- 0,04	0,29 +/- 0,02
	LN-308	deletiert	hygro	0,72 +/- 0,04	0,67 +/- 0,02
			p53 ^{V135A}	0,60 +/- 0,02	0,39 +/- 0,03
38,5°C	LN-18	mutant	hygro	1,27 +/- 0,03	0,91 +/- 0,08
			p53 ^{V135A}	0,89 +/- 0,00	0,70 +/- 0,01
	U87MG	wildtyp	hygro	0,24 +/- 0,02	0,15 +/- 0,01
			p53 ^{V135A}	0,45 +/- 0,04	0,31 +/- 0,03
	T98G	mutant	hygro	0,17 +/- 0,02	0,15 +/- 0,01
			p53 ^{V135A}	0,25 +/- 0,02	0,25 +/- 0,02
	LN-229	wildtyp	hygro	0,75 +/- 0,07	0,36 +/- 0,03
			p53 ^{V135A}	0,81 +/- 0,00	0,51 +/- 0,02
	LN-308	deletiert	hygro	0,85 +/- 0,07	0,73 +/- 0,03
			p53 ^{V135A}	0,76 +/- 0,00	0,69 +/- 0,04

3.7.3 Beeinflussung von MRP1 durch Wildtyp-p53

Die Expression und Aktivität von MRP1 wurde durch die Expression von p53^{V135A} bei 32,5°C in 3 von 5 Zelllinien (U87MG, T98G, LN-229) gesteigert, blieb aber in den anderen beiden Zelllinien (LN-18, LN-308) unverändert (Tabelle 5). Wie bei P-gp zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den Veränderungen und dem endogenem p53-Status.

3.7.4 Beeinflussung von MRP1 durch mutantes p53

Auch auf die MRP-Expression und -Aktivität hatte die Expression von p53^{V135A} bei 38,5°C heterogene Effekte. So reduzierte sich die MRP-Expression und Aktivität in LN-18 Zellen. In T98G und LN-229 Zellen führte sie demgegenüber zu gesteigerter MRP-Expression und -Aktivität (Tabelle 5).

Tabelle 5 : Einfluß von p53 auf die Expression und Aktivität von MRP1 (Mittelwerte der logarithmierten Daten aus je drei Experimenten +/- Standardfehler)

Temperatur	Zelllinie	P53-Status	Transfektion	MRP-Expression	MRP-Aktivität
32,5°C	LN-18	mutant	hygro	0,54 +/- 0,04	0,28 +/- 0,01
			P53 ^{V135A}	0,56 +/- 0,03	0,24 +/- 0,02
	U87MG	wildtyp	hygro	0,40 +/- 0,03	0,26 +/- 0,00
			P53 ^{V135A}	0,53 +/- 0,05	0,34 +/- 0,02
	T98G	mutant	hygro	0,88 +/- 0,03	0,54 +/- 0,04
			P53 ^{V135A}	1,13 +/- 0,01	0,75 +/- 0,04
	LN-229	wildtyp	hygro	0,26 +/- 0,01	0,18 +/- 0,00
			P53 ^{V135A}	0,36 +/- 0,01	0,24 +/- 0,02
	LN-308	deletiert	hygro	0,68 +/- 0,07	0,30 +/- 0,02
			P53 ^{V135A}	0,65 +/- 0,00	0,37 +/- 0,01
38,5°C	LN-18	mutant	hygro	0,59 +/- 0,04	0,36 +/- 0,02
			P53 ^{V135A}	0,47 +/- 0,01	0,30 +/- 0,02
	U87MG	wildtyp	hygro	0,55 +/- 0,03	0,29 +/- 0,01
			P53 ^{V135A}	0,52 +/- 0,04	0,28 +/- 0,01
	T98G	mutant	hygro	0,96 +/- 0,08	0,62 +/- 0,05
			P53 ^{V135A}	1,05 +/- 0,08	0,67 +/- 0,01
	LN-229	wildtyp	hygro	0,23 +/- 0,00	0,14 +/- 0,01
			P53 ^{V135A}	0,45 +/- 0,04	0,20 +/- 0,01
	LN-308	deletiert	hygro	0,73 +/- 0,03	0,31 +/- 0,02
			P53 ^{V135A}	0,73 +/- 0,02	0,35 +/- 0,01

3.7.5 Einfluß von p53 auf die Vincristin-Sensibilität humaner Gliomzelllinien

Schließlich wurde auch die Modulation der Gliomzellsensitivität für Vincristin durch p53^{V135A} bei 32,5°C und 38,5°C untersucht.

Bei 32,5°C induzierte p53^{V135A} dramatische Resistenz gegenüber Vincristin in 4 von 5 Zelllinien, während LN-308 Zellen sensibilisiert wurden (Tabelle 6). Außerdem wurde untersucht, inwieweit p53^{V135A} die Fähigkeit von Verapamil und Indomethacin, die Vincristinsensitivität zu verstärken, beeinflusst. Bei 32,5°C senkte p53^{V135A} die sensibilisierenden Effekte von Verapamil verglichen mit den Kontrolltransfektanten (hygro) unter gleichen experimentellen Bedingungen. Im Gegensatz dazu hatte p53^{V135A} kaum Effekte auf die Wirkung von Indomethacin (Tabelle 7). Zu bedenken ist dabei, daß Indomethacin per se nur Effekte in T98G Zellen zeigte, passend zur hohen MRP-Expression dieser Zelllinie.

Bei 38,5°C erhöhte p53^{V135A} die Vincristin-Empfindlichkeit in allen Zellen, jedoch mit Abstand am deutlichsten in LN-308. Außerdem verstärkte p53^{V135A} die Eigenschaft von Verapamil, die Vincristin-Empfindlichkeit zu erhöhen, in 4 von 5 Zelllinien, senkte diese jedoch in T98G Zellen. Die Effekte von Indomethacin blieben bei 38,5°C weitgehend unverändert.

Tabelle 6 : Einfluß von p53 auf die Vincristin-Sensibilität humaner Gliomzelllinien und auf die P-gp-Inhibition durch Verapamil (Mittelwerte der logarithmierten Daten aus je drei Experimenten +/- Standardfehler, Verapamil-Effekt=logarithmierter Quotient aus EC50 ohne und mit Verapamil)

Temperatur	Zelllinie	Transfektion	EC ₅₀ Vincristin (nM)	EC ₅₀ Vincristin mit Verapamil	Verapamil -Effekt	
32,5°C	LN-18	hygro	1,85 +/- 0,16	0,64 +/- 0,06	1,21	
		p53 ^{V135A}	2,64 +/- 0,04	1,98 +/- 0,09	0,65	
	U87MG	hygro	1,35 +/- 0,02	0,85 +/- 0,08	0,51	
		p53 ^{V135A}	1,93 +/- 0,18	1,49 +/- 0,14	0,45	
	T98G	hygro	0,90 +/- 0,06	-2,00 +/- 0,06	2,88	
		p53 ^{V135A}	>3,08	>3,08	n.d.	
	LN-229	hygro	1,19 +/- 0,01	0,22 +/- 0,02	0,97	
		p53 ^{V135A}	1,88 +/- 0,10	1,37 +/- 0,03	0,51	
	LN-308	hygro	1,11 +/- 0,05	-1,45 +/- 0,05	2,56	
		p53 ^{V135A}	0,64 +/- 0,01	-1,46 +/- 0,09	2,11	
	38,5°C	LN-18	hygro	2,16 +/- 0,21	0,93 +/- 0,01	1,23
			p53 ^{V135A}	1,96 +/- 0,14	0,37 +/- 0,03	1,59
U87MG		hygro	1,73 +/- 0,09	0,90 +/- 0,09	0,83	
		p53 ^{V135A}	1,64 +/- 0,03	0,49 +/- 0,02	1,15	
T98G		hygro	1,65 +/- 0,14	-0,67 +/- 0,01	2,32	
		p53 ^{V135A}	1,63 +/- 0,09	0,42 +/- 0,03	1,20	
LN-229		hygro	1,27 +/- 0,12	-0,05 +/- 0,00	1,31	
		p53 ^{V135A}	1,23 +/- 0,12	-0,39 +/- 0,04	1,62	
LN-308		hygro	2,40 +/- 0,04	0,64 +/- 0,02	1,76	
		p53 ^{V135A}	1,68 +/- 0,02	-0,68 +/- 0,06	2,35	

Tabelle 7 : Einfluß von p53 auf die Vincristin-Sensibilität humaner Gliomzelllinien und auf die MRP-Inhibition durch Indomethacin MRP1 (Mittelwerte der logarithmierten Daten aus je drei Experimenten +/- Standardfehler, Indomethacin-Effekt=logarithmierter Quotient aus EC50 ohne und mit Indomethacin)

Temperatur	Zelllinie	Transfektion	EC ₅₀ Vincristin (nM)	EC ₅₀ Vincristin mit Indomethacin	Indomethacin- Effekt	
32,5°C	LN-18	hygro	1,85 +/- 0,12	1,77 +/- 0,05	0,09	
		p53 ^{V135A}	2,64 +/- 0,08	2,54 +/- 0,03	0,10	
	U87MG	hygro	1,35 +/- 0,08	0,92 +/- 0,04	0,43	
		p53 ^{V135A}	1,93 +/- 0,06	1,75 +/- 0,11	0,18	
	T98G	hygro	0,90 +/- 0,08	-1,77 +/- 0,11	2,67	
		p53 ^{V135A}	>3,08	>3,08	n.d.	
	LN-229	hygro	1,19 +/- 0,07	0,77 +/- 0,06	0,41	
		p53 ^{V135A}	1,88 +/- 0,03	1,88 +/- 0,06	0,00	
	LN-308	hygro	1,11 +/- 0,05	1,02 +/- 0,05	0,09	
		p53 ^{V135A}	0,64 +/- 0,05	0,51 +/- 0,03	0,13	
	38,5°C	LN-18	hygro	2,16 +/- 0,11	2,11 +/- 0,15	0,05
			p53 ^{V135A}	1,96 +/- 0,03	1,95 +/- 0,04	0,02
U87MG		hygro	1,73 +/- 0,04	1,35 +/- 0,05	0,38	
		p53 ^{V135A}	1,64 +/- 0,05	1,34 +/- 0,01	0,30	
T98G		hygro	1,65 +/- 0,04	-1,33 +/- 0,02	2,97	
		p53 ^{V135A}	1,63 +/- 0,00	-1,20 +/- 0,06	2,83	
LN-229		hygro	1,27 +/- 0,03	1,19 +/- 0,04	0,08	
		p53 ^{V135A}	1,23 +/- 0,05	0,11 +/- 0,01	0,18	
LN-308		hygro	2,40 +/- 0,08	2,36 +/- 0,18	0,04	
		p53 ^{V135A}	1,68 +/- 0,09	1,64 +/- 0,06	0,04	

4 Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen der Resistenz maligner Gliome gegenüber Chemotherapie sind nicht geklärt. Bisher wurde kein Parameter gefunden, der die Subgruppe an Patienten identifiziert, die von der Chemotherapie profitieren. Trotz vieler Jahre der Forschung zur Bedeutung des MDR-Mechanismus bei der Therapieresistenz maligner Hirntumoren, ist diese Frage nur ungenügend beantwortet.

Die vorliegende Arbeit liefert eine systematische Analyse des MDR-Phänomens in einer großen repräsentativen Gruppe humaner maligner Gliomzelllinien. Die Expression von *mdr-1/P-gp* und *mrp-1/MRP1* wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Durchflußzytometrie und auf funktioneller Ebene mittels Fluoreszenz-Transport untersucht. Außerdem wurde mittels P-gp/MRP-Inhibitoren die Möglichkeit untersucht, *in vitro* die Chemosensitivität maligner Gliomzellen zu verstärken. Es hat sich gezeigt, daß die meisten Gliomzelllinien entweder über P-gp- oder MRP-Aktivität oder beides verfügen und auf die Hemmung der P-gp/MRP-Aktivität mit erhöhter Sensitivität für spezifische Zytostatika reagieren. Das Spektrum der Zytostatika, deren Wirkung durch P-gp- oder MRP-Inhibitoren potenziert wird, bestätigte frühere Arbeiten an nicht-glialen Zellen. Frühere Untersuchungen, die zeigten, daß Verapamil die Toxizität von Nitrosoharnstoffen beeinflußt, wurden nicht bestätigt. Des weiteren wurden neue Daten zur mRNA-Expression von *mrp-2*, *mrp-3*, *mrp-4*, *mrp-5* in humanen Gliomzelllinien gezeigt. Die biologische Bedeutung dieser Daten bedarf der weiteren Klärung in Folgearbeiten. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit existierten jedoch keine experimentellen Werkzeuge für weiterführende Untersuchungen. Obwohl die Spezifität verschiedener MDR-Antikörper und deshalb die Bedeutung des MDR-Phänomens in Gliomen angezweifelt wurde, zeigt die gute Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression als auch der Transportaktivität zusammen mit den deutlichen Effekten der pharmakologischen P-gp/MRP-Hemmung auf die Zytostatikaempfindlichkeit, daß eine biologische Bedeutung des MDR-Phänomens für humane Gliome besteht.

Übereinstimmend mit früheren immunhistochemischen Arbeiten an malignen Gliomen zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, daß zerebrale Endothelzellen vermutlich eine wichtige Rolle beim MDR-Phänotyp dieser Tumoren spielen. Hohe P-gp- und MRP-Transport-Aktivität wurde in der humanen zerebralen Endothelzelllinie SV-HCEC

gefunden. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die zerebralen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, durch die Expression von MDR-Transportern, die erste und zentrale Hürde für Zytostatika auf dem Weg sowohl ins Tumorgewebe als auch in das gesunde Hirngewebe darstellen.

Zwischen dem Verlust von Wildtyp-p53-Aktivität und dem Auftreten des MDR-Phänotyps, zweier offensichtlicher Schlüsselfaktoren der Resistenz bösartiger Tumoren gegenüber Zytostatika, besteht eventuell ein Zusammenhang. Wildtyp p53 soll *mdr-1*, das Gen für P-gp, und auch *mrp-1*, das Gen für MRP1, reprimieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß mutantes p53 nicht nur seine Wildtyp-Aktivität verliert und die Wirkung des Wildtyp-Allels dominant negativ hemmt, sondern, im Sinne eines *gain of function*-Phänotyps, einen direkt aktivierenden Effekt auf die beiden MDR-Gene und damit auf die Expression und Aktivität der entsprechenden Proteine ausübt. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs haben wir 5 der 12 Zelllinien anhand ihres p53-Status ausgewählt und mit einem temperatursensitiven p53-Plasmid transfiziert. Das durch dieses Plasmid kodierte p53^{V135A} nimmt bei 32,5°C Wildtyp-Charakter an und verhält sich bei 38,5°C dominant negativ über endogenes Wildtyp-p53. Als Kontrolle wurden die Zellen parallel mit einem Plasmid transfiziert, das nur die Hygromycin-Resistenz enthält. Hier zeigte sich, daß bereits der Temperaturunterschied von 6°C zum Teil deutliche Effekte hat und deshalb die Ergebnisse der p53-Transfektanten sorgfältig betrachtet werden müssen. Diese wurden zunächst auf die Expression und Aktivität von P-gp und MRP bei 32,5°C und 38,5°C untersucht. Anschließend wurde auch der Einfluß auf die Vincristin-Sensibilität und auf die Effekte der P-gp- und MRP-Inhibitoren getestet. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es für P-gp und auch für MRP keine einheitlichen Effekte gab. Auch vor dem Hintergrund der unterschiedlichen p53-Ausstattung der 5 Zelllinien lies sich kein schlüssiges Modell des Einflusses von p53 entwerfen. Für P-gp scheint sich am ehesten eine negativ-regulatorische Rolle zu bestätigen, während p53 für die Regulation von MRP1 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Hier könnten neuere und kommende Arbeiten zu den p53-kontrollierenden Proteinen klarere Einblicke ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit liefert die Basis für die zukünftigen Möglichkeiten, die

Chemotherapie maligner Hirntumoren mittels MDR-Hemmung zu intensivieren. Nicht nur die Tumorzellen selbst sondern vor allem auch die Endothelzellen der Tumorgefäße wären Ziele solcher Ansätze. Der klinische Einsatz solcher Inhibitoren bei Tumorpatienten war bisher meist durch die Tatsache limitiert, daß therapeutisch wirksame Plasmaspiegel unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Neue Inhibitoren wie z.B. das Cyclosporin-Derivat PSC833 könnten dieses Problem lösen. Zu bedenken ist jedoch, daß die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke für bestimmte Zytostatika neben der höheren Toxizität gegenüber dem Tumor auch neue Probleme der Neurotoxizität hervorrufen könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K, Yokomizo A, Kuwano T, Ono M, Mori T, Hori S, Kohno K, Kuwano M (1994) Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int J Cancer* 58: 860-864
2. Abe T, Mori T, Wakabayashi Y, Nakagawa M, Cole SP, Koike K, Kuwano M, Hori S (1998) Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. *J Neuro-Oncol* 40: 11-18
3. Ashmore SM, Thomas DG, Darling JL (1999) Does P-glycoprotein play a role in clinical resistance of malignant astrocytoma? *Anticancer Drugs* 10: 861-872
4. Becker I, Becker KF, Meyermann R, Holtt V (1991) The multidrug-resistance gene MDR1 is expressed in human glial tumors. *Acta Neuropathol* 82: 516-519
5. Borst P, Schinkel AH (1996) What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes ? *Eur J Cancer* 32: 985-990
6. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347-357
7. Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman M (1992) Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53. *Science* 255: 459-462
8. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
9. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 695-698
10. De Angelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG (1998) Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy ? *Ann Neurol* 44: 691-695
11. Den Boer ML, Zwaan CM, Pieters R, Kazemier KM, Rottier MM, Flens MJ, Scheper RJ, Veerman AJ (1997) Optimal immunocytochemical and flow cytometric detection of P-gp, MRP and LRP in childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia* 11: 1078-1085

12. Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Henze G, Veerman AJ (1998) The modulating effect of PSC 833, cyclosporin A, verapamil and genistein on in vitro cytotoxicity and intracellular content of daunorubicin in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 12: 912-920
13. Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhänel M, Spruß T, Bernhardt G, Graeff C, Färber L, Gschaidmeier H, Buschauer A, Fricker G (2002) Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 110: 1309-1318
14. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP (1993) Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71: 2585-2597
15. Goldsmith M, Gudas J, Schneider E, Cowan K (1995) Wild type p53 stimulates expression from the human multidrug resistance promoter in a p53-negative cell line. *J Biol Chem* 270: 1894-1898
16. Gottesman MM (1993) How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 53: 747-754
17. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV (1996) P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6: 610-617
18. Henson JW, Cordon-Cardo C, Posner JB (1992) P-glycoprotein expression in brain tumors. *J Neuro-Oncol* 14: 37-43
19. Huai-Yun H, Secrest DT, Mark KS, Carney D, Brandquist C, Elmquist WF, Miller DW (1998) Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 816-820
20. Kiwit JCW, Hertel A, Matuschek AE (1994) Reversal of chemoresistance in malignant gliomas by calcium antagonists: correlation with the expression of multidrug-resistant p-glycoprotein. *J Neurosurg* 81: 587-594
21. Kleihues P, Cavanee WK (2000) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Tumors of the Nervous System. IARC Press, Lyon
22. Kool M, de-Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van-Eijk MJ (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57: 3537-3547

23. Larrivee B, and Averill DA (1999) Melphalan resistance and photoaffinity labelling of P-glycoprotein in multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells: reversal of resistance by cyclosporine A and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 59: 291-302
24. Lin J, Teresky AK, Levine AJ (1995) Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* 10: 2387-2390
25. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331
26. Matsumoto T, Tani E, Kaba K, Shindo H, Miyaji K (1991) Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. *J Neurosurg* 74: 460-466
27. McGrath T, Center MS (1988) Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from p-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.* 48: 3959-3963
28. Muruganandam A, Herx LM, Monette R, Durkin JP, Stanimirovic DB (1997) Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 11: 1187-1197
29. Naumann U, Durka S, Weller M (1998) Dexamethasone-mediated protection from drug toxicity linked to p21^{WAF/CIP1} protein accumulation. *Oncogene* 17: 1567-1575
30. Regina A, Koman A, Piciotti M, El Hafny B, Center MS, Bergmann R, Couraud PO, Roux F (1998) Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 71: 705-715
31. Rieger L, Rieger J, Winter S, Streffer J, Esser P, Dichgans J, Meyermann R, Weller M (2000) Evidence for a constitutive, verapamil-sensitive, non-P-glycoprotein multidrug resistance phenotype in malignant glioma that is unaltered by radiochemotherapy in vivo. *Acta Neuropathol* 99: 555-562
32. Roller A, Bähr O, Streffer J, Winter S, Heneka M, Deininger M, Meyermann R, Naumann U, Gulbins E, Weller M (1999) Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells: the role of COX-1 and MRP. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 600-605
33. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP (1994) Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77: 491-502

34. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, Mol CA, Borst P (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97: 2517-2524
35. Sullivan GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN (2000) Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *J Clin Invest* 105: 1261-1267
36. Takamiya Y, Abe Y, Tanaka Y, Tsugu A, Kazuno M, Oshika Y, Maruo K, Ohnishi Y, Sato O, Yamazaki H, Kijima H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M (1997) Murine P-glycoprotein on stromal vessels mediates multidrug resistance in intracerebral human glioma xenografts. *Br J Cancer* 76: 445-450
37. Tanaka Y, Abe T, Tsugu A, Takamiya Y, Akatsuka A, Tsuruo T, Yamazaki H, Ueyama Y, Sato O, Tamaoki N (1994) Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas. *Virchows Arch* 425: 133-138
38. Tóth K, Vaughan MM, Peress NS, Slocum HK, Rustum YM (1996) MDR1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors. *Am J Pathol* 149: 853-858
39. Wang Q, and Beck WT (1998) Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* 58: 5762-5769
40. Weller M, Rieger J, Grimm C, Van Meir EG, De Tribolet N, Krajewski S, Reed JC, von Deimling A, Dichgans J (1998) Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Cancer* 79: 640-644
41. Wick W, Furnari FB, Naumann U, Cavenee WK, Weller M (1999) PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene* 18: 3936-3943
42. Zastawany RL, Salvino R, Chen J, Benchimol S, Ling V (1993) The core promoter region of the P-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53. *Oncogene* 8: 1529-1535
43. Zhou G, and Kuo MT (1998) Wild-type p53-mediated induction of rat mdr1b expression by the anticancer drug daunorubicin. *J. Biol. Chem.* 273: 15387-15394

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungen

6.1.1 Publikationen

Roller, A., Bähr, R.O., Streffer, J., Winter, S., Heneka, M., Deininger, M., Meyermann, R., Naumann, U., Gulbins, E., Weller, M. (1999)
Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells: the role of COX-1 and MRP
Biochem. Biophys. Res. Commun. 259, 600-605

Bähr, O., Wick, W., Weller, M. (2001)
Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53
J. Clin. Invest. 107, 643-646

Bähr, O., Rieger, J., Duffner, F., Meyermann, R., Weller, M., Wick, W. (2003)
P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell cultures, but not in primary glioma cells
Brain Path. 13, 482-492

6.1.2 Vorträge

Bähr, O., Wick, W., Weller, M.
Zytostatikaresistenz bei malignen Gliomen
Tagung des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“, Tübingen, 2000

Bähr, O., Wischhusen, J., Wick, W., Weller, M.
Bedeutung der MDR-Proteine für die Zytostatikaresistenz maligner Gliome
Fortüne-Kolloquium, Tübingen, 2002

Bähr, O., Wick, W., Weller, M.
„Multidrug resistance“ Proteine (P-gp/MRP1) in humanen malignen Gliomen :
Expression, Funktionelle Aktivität, Modulation durch p53
12. Treffen der AG Experimentelle Neuroonkologie, 28.02-01.03.2003 Göttingen

6.1.3 Poster

Bähr, O., Wick, W., Weller, M. (2000)
P-glycoprotein mediates multidrug resistance in human malignant glioma cells
Neuro-Oncol. 2, S31
4th Congress of the European Association of Neuro-Oncology, Copenhagen, Denmark, 03. – 07.06.2000

Bähr, O., Wick, W., Weller, M. (2000)

P-glycoprotein (P-gp) mediates specific patterns of multidrug resistance in human malignant glioma cells

Akt. Neurol. 27, S133

73. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Baden-Baden, 27.09 – 01.10.2000

Bähr, O., Wick, W., Weller, M.

Multidrug resistance proteins (P-gp/MRP-1) in human malignant glioma :

Expression, functional activity and modulation by wild-type and mutant p53

Apoptosis 2003, Luxemburg, 29.01 – 01.02.2003

6.2 Abkürzungen

cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IgG	Immunglobulin
INDO	Indomethacin
MDR	Multidrug resistance (multiple Zytostatika-resistenz)
MRP	Multidrug-resistance associated protein
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlsg.)
P-gp	P-glycoprotein
SFI	spezifischer Fluoreszenz-Index
VCR	Vincristin
VERA	Verapamil

6.3 Danksagung

Vor allem danke ich Herrn Professor Dr. Michael Weller, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Seine Motivationsfähigkeit und Begeisterung für die Forschung haben mir die Tür zum wissenschaftlichen Arbeiten geöffnet.

Ohne die Einarbeitung und ständige Hilfestellungen durch PD Dr. med. Wolfgang Wick, Conny Grimmel und alle anderen Mitarbeiter des Labors für Molekulare Neuroonkologie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Euch allen herzlichen Dank für die tolle Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich Frau Dr. Tina Herberts vom Institut für Medizinische Biometrie für ihre geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Experimente.

Meinen Eltern danke ich für die langjährige Unterstützung, die mein Studium und damit auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

6.4 Lebenslauf

Name : Roy Oliver Bähr
Geb. 25.06.1973
In Johannesburg (Südafrika)

Eltern : Margarete (geb. Feil) und Eberhard Bähr

Schule : 1979-1983 Grundschule Egringen
1983-1989 Realschule Efringen-Kirchen
1989-1992 Wirtschaftsgymnasium Lörrach

Zivildienst : 1992-1993 Rettungsdienst, DRK Lörrach
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium : WS 1994/95 Begin des Medizinstudiums an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04.09.1996 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
28.08.1997 1. Staatsexamen
4/99-4/00 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in
der Medizin“ Tübingen
03.04.2001 2. Staatsexamen
14.05.2002 3. Staatsexamen
7/03-12/03 Arzt im Praktikum an der Neurologischen
Universitätsklinik Tübingen
Seit 1/04 Assistenzarzt an der Neurologischen
Universitätsklinik Tübingen