

Aus der
Abteilung Allgemeine Pharmakologie
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Einfluss der Expression und Modulation von MRP4 (ABCC4) und
MRP5 (ABCC5) auf die Sensitivität von
Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Zytostatika**

Eine *in vitro* Untersuchung zur Expression und Funktion von Membranproteinen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2008

vorgelegt von: Tobias Florian Hübner
geb. am: 19.06.1977
in: Nürnberg (Bayern)

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Ritter (Greifswald)

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde (Bonn)

Tag der Disputation: 06. Januar 2009

Raum: Seminarraum (Alte Bibliothek) der Klinik für Innere Medizin A; Greifswald

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

MAßE UND EINHEITEN.....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	2
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Tumoren.....	5
1.1.1 Pankreaskarzinom.....	5
1.1.1.1 Therapeutische Maßnahmen beim Pankreaskarzinom.....	8
1.1.2 Antimetabolite.....	9
1.1.2.1 Folsäureantagonisten.....	9
1.1.2.2 Purin- und Purinnucleosidanaloga.....	10
1.1.2.3 Pyrimidin- und Pyrimidinnucleosidanaloga.....	11
1.2 Resistenzmechanismen bei Tumorerkrankungen.....	13
1.2.1 Die Superfamilie der ABC-Proteine.....	14
1.2.1.1 Charakterisierung und Struktur der ABC-Transporter.....	14
1.2.1.2 Klassifizierung der Multi Drug Resistance-Proteine.....	15
1.2.1.3 Vorkommen und Substratspektren der verschiedenen MRP Isoformen.....	16
1.2.1.4 Inhibitoren von MRP4 und MRP5.....	18
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel.....	22
2.1.2 Allgemein verwendete Chemikalien/Reagenzien und Enzyme.....	23
2.1.3 Lösungen und Puffer.....	25
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.4.1 Primäre Antikörper.....	27
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper.....	28
2.1.5 Oligonukleotide/TaqMan [®] -Sonden.....	28
2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Zellkultur.....	29
2.2.1.1 Zelllinien (Capan-1, Capan-2, PaTu 8988 T und PaTu 8902).....	29
2.2.1.2 Kultivierung der Zellen.....	30
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	30
2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	30
2.2.2 RNA/DNA-Methoden.....	31
2.2.2.1 Gewinnung der Gesamt-RNA aus Zellen.....	31
2.2.2.2 Quantifizierung der RNA.....	31
2.2.2.3 Reverse Transkription.....	32
2.2.2.4 Real Time PCR.....	33
2.2.3 Proteinchemische Methoden.....	35
2.2.3.1 Isolierung von Membranproteinen.....	35
2.2.3.2 Quantifizierung des Proteingehaltes.....	36
2.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	36
2.2.3.4 Western Blotting.....	38
2.2.3.5 Immundetektion.....	39
2.2.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	40

2.2.4	Alamar-Blue-Assay.....	41
2.2.5	Kristallviolett-Assay	42
2.2.6	In-vitro Zytotoxizitätsassay.....	44
2.2.7	Mathematische und statistische Methoden.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Untersuchungen von MRP4/MRP5 auf mRNA-Ebene.....	46
3.2	Untersuchungen zur Proteinexpression von MRP4/MRP5.....	46
3.3	Lokalisation der Transportproteine MRP4/MRP5.....	47
3.4	Untersuchungen zur Zellviabilität bzw. Zytotoxizität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Zytostatika mit Hilfe des Alamar Blue-Assays.....	52
3.4.1	Optimale Zellzahlbestimmung.....	52
3.4.2	Einfluss ausgewählter Zytostatika.....	53
3.5	Untersuchungen zur Zellviabilität bzw. Zytotoxizität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluß von Zytostatika mit Hilfe des Kristallviolett-Assays.....	56
3.5.1	Optimale Zellzahlbestimmung.....	56
3.5.2	Einfluss von Purin und Pyrimidinanaloga auf die Zellen.....	57
3.5.3	Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Probenecid und in der Kombination von Zytostatika.....	63
3.5.3.1	Einfluss von Probenecid auf die Zellen.....	63
3.5.3.2	Einfluss von Probenecid in der Kombination mit verschiedenen Zytostatika.....	65
4	DISKUSSION	72
4.1	Expression von MRP4 und MRP5 in Pankreaskarzinomzellen	73
4.2	Zellviabilitätsuntersuchungen an Capan-Zellen unter dem Einfluss von Zytostatika mit Hilfe des Alamar Blue-Assays.....	74
4.3	Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen mittels Kristallviolett-Assay	75
4.4	Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Probenecid und in der Kombination von Zytostatika	77
	ZUSAMMENFASSUNG	80
	LITERATURVERZEICHNIS	81
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	90
	TABELLENVERZEICHNIS	91
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	92
	LEBENS LAUF	93
	DANKSAGUNG	95

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm = 10^{-6} Gramm
µl	Mikroliter = 10^{-6} Liter
µM	mikromolar = 10^{-6} mol/l
bp	Basenpaare (base pairs)
cm ²	Quadratzentimeter
g	Normalbeschleunigung g_n (9,897 m/s ²)
h	Stunde
kB	Kilobasen = 10^3 Basenpaare
kDa	Kilodalton = 10^3 Dalton
mA	Milliampere = 10^{-3} Ampere
mg	Milligramm = 10^{-3} Gramm
min	Minute
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
nM	nanomolar = 10^{-9} mol/l
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
pmol	picomol = 10^{-12} mol
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
U	Unit = Einheiten
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	18 S Untereinheit der ribosomalen Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding Cassette
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre DANN
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	Schwellenzyklus (Cycle of threshold)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
ECL	Verstärkte chemische Lumineszenz (enhanced chemical luminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
MDR	Mehrfachresistenz (M ulti D rug R esistance)
mRNA	Boten-RNA
MRP	Multi Drug Resistance Related Protein
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	Revers

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transkription-polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung versetzt mit TWEEN
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Well	Kavität
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

In den westlichen Industrienationen sind derzeit maligne Erkrankungen nach den kardiovaskulären die zweithäufigste Todesursache. Allerdings nimmt die Zahl der malignen Tumore, welche oft eine Krankheit des höheren Alters darstellen, durch den medizinischen Fortschritt und die dadurch bedingte erhöhte Lebenserwartung stetig zu. Die Inzidenz (Neuerkrankungen pro Jahr) beträgt hier derzeit ca. 450 pro 100 000 Einwohner. Das Spektrum reicht dabei von Tumorentitäten wie Hodentumore, die nach entsprechender Behandlung vollständig heilbar sind und sich somit nicht auf die Lebenserwartung niederschlagen, bis zum fortgeschrittenen kleinzelligen Lungenkarzinom oder ausgewählten Hirntumoren wie z.B. dem Glioblastom, bei denen die Heilungschancen äußerst gering sind. Auch wenn in den letzten Jahrzehnten größere Fortschritte in Diagnostik und der Tumorthherapie gemacht wurden, hängt die jeweilige Prognose noch immer sehr stark vom Zeitpunkt der Diagnose und damit vom Stadium des Krebsleidens ab. So ist als großes Problem anzusehen, dass die Tumorerkrankungen selten Frühsymptome aufzeigen, sondern sich erst im Verlauf der Krankheit mit den auftretenden Komplikationen bzw. Spätsymptomen zu erkennen geben.

Häufige maligne Tumorerkrankungen bzw. Tumorarten finden sich in den Bereichen Lunge, Brust und Magen-Darm-Trakt. Eine Übersicht gibt hier Abbildung 1-1.

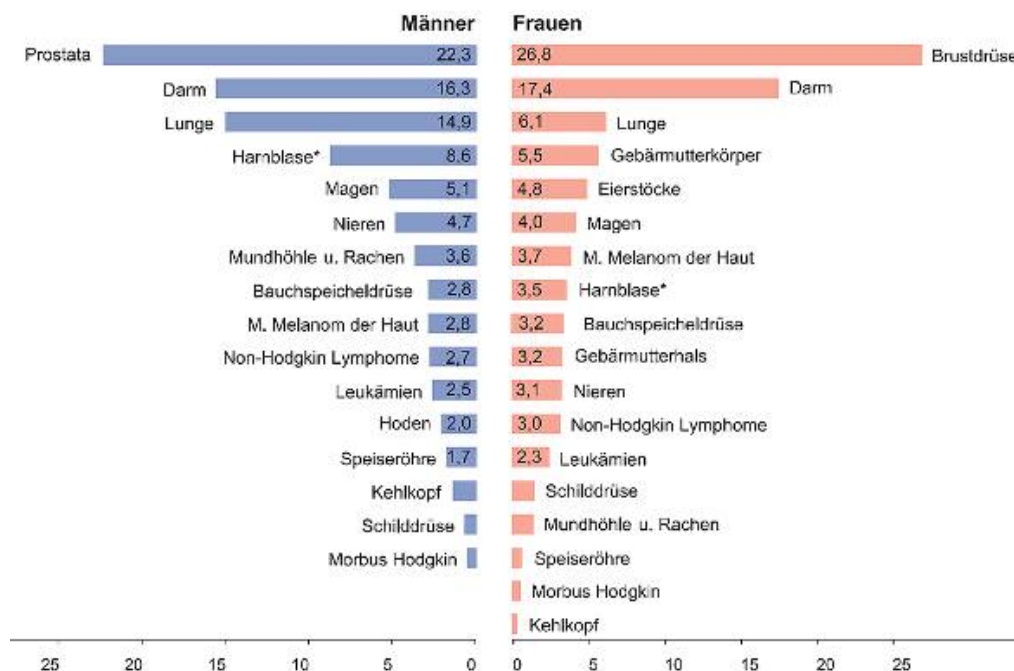


Abbildung 1-1: Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2002. Männer n= 218.250, Frauen n= 206.000; * einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens (Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006).

1.1 Tumoren

Als Tumor wird definitionsgemäß eine abnorme Gewebsmasse beschrieben, die durch eine unkontrollierte Vermehrung von körpereigenen aber entarteten Zellen entsteht. Durch unkontrolliertes Wachstum können sie dabei auch andere Gewebe infiltrieren, so dass die Ausbreitung nicht lokal begrenzt sein muss (Metastasen). Letztere Fähigkeit ist häufig die Ursache für schwerwiegende Komplikationen im Krankheitsverlauf und verschlechtert die Überlebenschancen je nach Tumorart drastisch.

Zellen unterliegen im gesunden Gewebe einer genauen Regulation von der Proliferation bis zum programmierten Tod (Apoptose). Normalerweise halten sich dabei Zellauf- und abbau im Gleichgewicht, allerdings können manche Zellen durch genetische Mutationen zu Tumorzellen transformieren, bei denen diese Regulationsmechanismen außer Kraft gesetzt sind. Die Ursachen für die Entstehung von Tumoren sind sehr vielseitig und bis heute noch nicht vollständig geklärt. Endogene Faktoren aber auch exogene Noxen wie ionisierende Strahlen oder onkogene Viren sind an der Entstehung beteiligt, bzw. können sie begünstigen. Man unterscheidet hauptsächlich zwei Dignitäten eines Tumors. Zum einen die benigne, gutartige Form, welche sich überwiegend durch ein langsames, expansiv verdrängendes aber nicht infiltrierendes Wachstum kennzeichnen lässt. Histologisch gesehen besitzen diese Tumore einen hohen Differenzierungsgrad und ähneln dadurch meist dem entsprechenden Normalgewebe. Zum anderen gibt es die malignen, bösartigen Tumore, die sich durch ihr invasives, destruierendes Wachstum auszeichnen und zusätzlich die Fähigkeit zur Metastasenbildung besitzen. Sie sind gegenüber dem normalen Gewebe durch eine ausgeprägte Zellatypie abgegrenzt. Epidemiologisch unterscheiden sich Tumore in Inzidenz und Mortalität, Alters- und Geschlechtsverteilung sowie in regionalem Vorkommen.

Ein Tumor, der häufig relativ spät erkannt wird und dementsprechend eine schlechte Prognose aufweist, ist das Pankreaskarzinom, das im Zentrum dieser Arbeit steht und daher im Folgenden näher betrachtet werden soll.

1.1.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung und hat nach Kolon- und Magenkarzinomen die dritthöchste Inzidenz bei malignen Erkrankungen des Verdauungstraktes. Es ist die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und fünfhäufigste bei Männern¹. Jedes Jahr erkranken etwa 10 von 100 000 Einwohnern, wobei weltweit unterschiedliche Inzidenzen und Mortalitäten dieser Erkrankung beobachtet werden^{2,3}. Wie bei den meisten malignen Tumorerkrankungen ist auch das Pankreaskarzinom eine

Erkrankung des höheren Alters⁴. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Mann und Frau zwischen 50 und 70 Jahren, wobei 60-70 % der Erkrankten älter als 60 Jahre sind, was auch aus Abbildung 1-2 ersichtlich wird. Das Geschlechterverhältnis von Mann zu Frau liegt in etwa bei 2:1⁵.

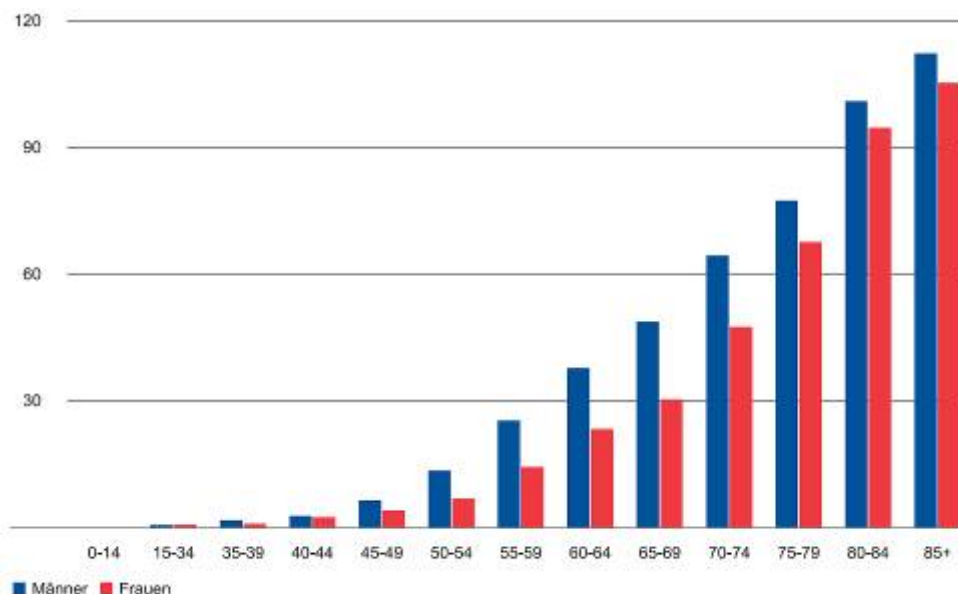


Abbildung 1-2: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Pankreaskarzinom in Deutschland 2002. ICD-10 C25:Pankreaskarzinom (Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006).

Über die Entstehung des Pankreaskarzinoms gibt es noch keine exakten Erkenntnisse. Viele Einflüsse, die zur Entstehung dieses Tumors beitragen könnten, werden derzeit diskutiert^{6,7}. Als Risikofaktor für das Auftreten der Erkrankung scheint allerdings Zigarettenrauchen als gesichert⁸. Umwelteinflüsse, Ernährungsgewohnheiten und chronische Entzündungen des Pankreas werden außerdem angenommen^{9,10}. Eine familiäre Häufung oder das in Erscheinung treten von hereditären Syndromen wurde ebenfalls beim Auftreten der Erkrankung beobachtet¹¹⁻¹⁴. Pankreastumore nehmen ihren Ursprung entweder im exokrinen oder im endokrinen Teil der Bauchspeicheldrüse. Benigne Neoplasien sowie Tumore ausgehend vom endokrinen Teil sind sehr selten und sollen hier nicht genauer besprochen werden. Weit häufiger betroffen ist der exokrine Teil, von dem das Adenokarzinom ausgeht. In den häufigsten Fällen hat es dort seinen Ursprung im duktalem Gewebe (ca. 80%), während Azinuszellen deutlich seltener betroffen sind (ca. 20%). Die Mehrzahl dieser Karzinome entwickelt sich zudem im Pankreaskopfgebiet, welches aus Abbildung 1-3 zu entnehmen ist.

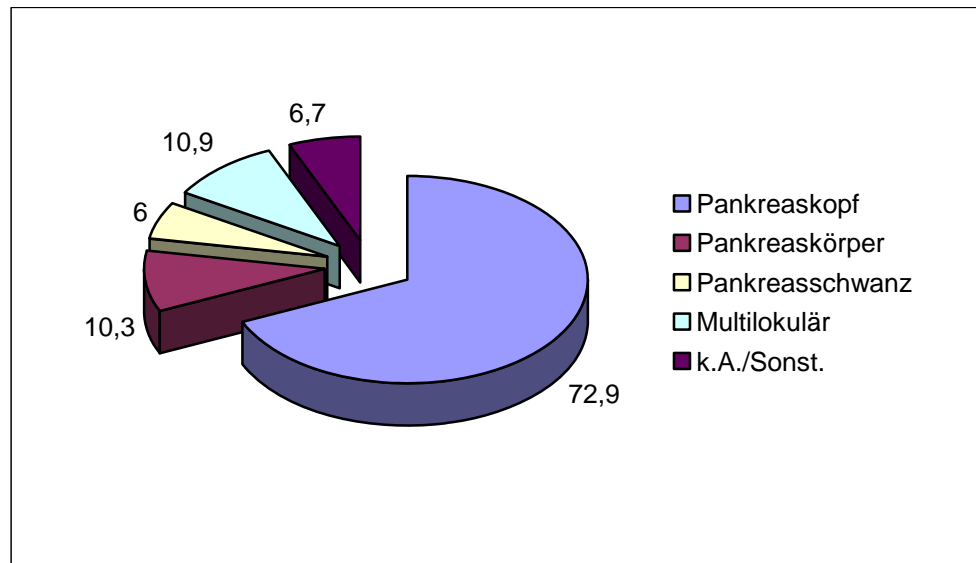


Abbildung 1-3: Lokalisation der Pankreaskarzinome in [%].
(modifiziert nach D. Hölzel, A. Klamert, M. Schmidt: Krebs, W. Zuckerschwerdt Verlag).

Als eigenständige Tumorgruppe sind weiterhin die Papillen- oder Ampullenkarzinome abzugrenzen. Dabei handelt es sich um Adenokarzinome mit tubulärer und/oder papillärer Struktur. Sie finden sich meistens in der gemeinsamen Endstrecke des Ductus choledochus und Ductus pancreaticus. Durch die Tumorlage bedingt treten hierbei schon sehr früh Symptome (frühzeitiger cholestatischer Ikterus) auf, was die Prognose dieser Tumorgruppe entscheidend verbessert.

Als Ursache für die Entwicklung eines duktales Adenokarzinoms wird hauptsächlich eine Akkumulation verschiedener Genmutationen genannt. Diese verursachen zum einen die Aktivierung des Onkogens K-ras^{15,16}, andererseits werden Tumorsuppressor-Gene wie p53, p16 oder p21 ausgeschaltet^{7,11,17}.

Wie viele andere maligne Tumore zeigt auch das Pankreaskarzinom besonders in der Frühphase der Erkrankung eine Vielzahl allerdings sehr uncharakteristischer Symptome. Es werden Gewichtsverlust, Übelkeit und unspezifische Schmerzen im epigastrischen Bereich genannt¹⁸. Ein Ikterus tritt bei ca. 25% der Fälle bereits im Frühstadium auf, während er in weiter fortgeschrittenen Stadien fast immer beobachtet wird. Seltener Symptome sind Thrombophlebitis oder Diabetes mellitus. Eine effektive Screeninguntersuchung ist bisher allerdings noch nicht verfügbar. Durch die daraus resultierende häufig späte Diagnose ist die Prognose des Pankreaskarzinoms meist sehr schlecht¹⁸. Es zählt sogar zu den prognostisch ungünstigsten Krebserkrankungen. Gudjonsson veröffentlichte 1987 eine Arbeit, in der die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung zwischen 3 und 6 Monaten betrug¹⁹. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt zurzeit im Mittel zwischen 6 und 12 Monaten. In

Abbildung 1-4 wird das relative Überleben nach Jahren dargestellt, wobei heute die 5-Jahresüberlebensrate aller Pankreaskarzinome zusammengenommen im Mittel weniger als 4% beträgt²⁰.

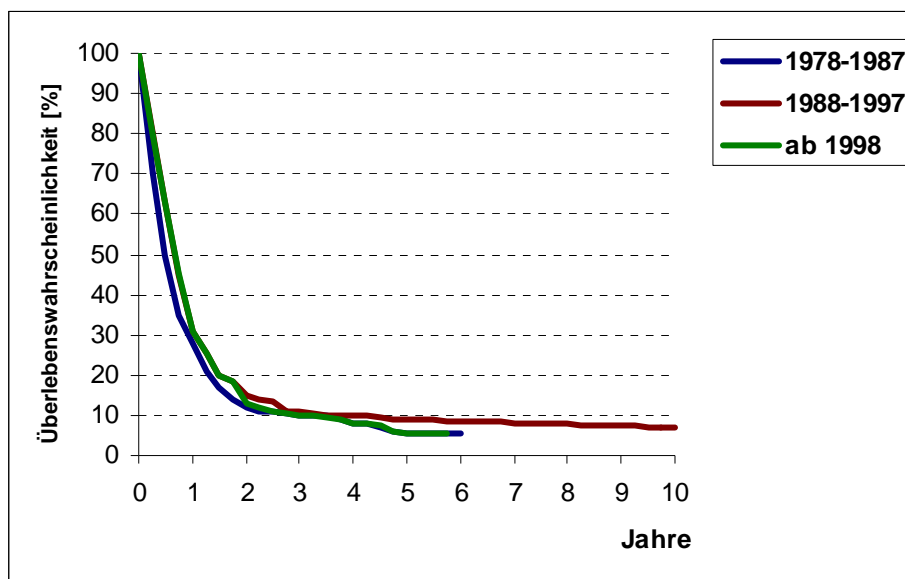


Abbildung 1-4: Relatives 10 Jahres Überleben für Pankreaskarzinom über je drei Perioden. In der Auswertung befinden sich 2589 Patienten aus den Diagnosejahrgängen 1979 bis 2005 (modifiziert nach Überleben C25:Pankreaskarzinom, Tumorregister München).

1.1.1.1 Therapeutische Maßnahmen beim Pankreaskarzinom

Eine kurative Behandlung des Pankreaskarzinoms besteht nur durch die operative Entfernung des Tumors. Dabei richtet sich das Ausmaß der Operation nach dessen Lokalisation. Als Ziel jeglicher Operation unter kurativer Zielsetzung ist die R₀-Resektion (die Entfernung sämtlichen Tumorgewebes) anzusehen. Allerdings ist nur ein kleiner Teil aller Pankreaskarzinome bei Diagnosestellung noch kurativ chirurgisch resektabel²¹. Eine anschließende postoperative adjuvante Chemotherapie erhöht zusätzlich das Überleben der Patienten. Sind bereits Fernmetastasen nachgewiesen oder besteht eine großflächige tief reichende retroperitoneale Infiltration und eine ausgedehnte Infiltration der Mesenterialwurzel, so ist eine Chemotherapie Mittel der Wahl, da im Vergleich zu resezierenden Maßnahmen keine Prognoseverbesserung erzielt werden konnte. Es existiert bis heute allerdings keine kurative Therapieoption für Patienten in diesem Stadium der Erkrankung¹⁸.

Unter der Maßgabe einer adjuvanten Chemotherapie nach kurativer Resektion ist eine kombinierte Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil als derzeit wirksamste Therapie anzusehen^{22,23,24}. Für Patienten, bei denen bereits Fernmetastasen vorhanden sind, kommen als therapeutische Option der Chemotherapie die Zytostatika Gemcitabin, 5-Fluoruracil,

Mitomycin, Adriamycin und Epirubicin in Frage. Dabei zeigten die mit Gemcitabin behandelten Patienten in Studien die besten Ergebnisse, so dass es heute als Primärtherapeutikum bei palliativer Therapie eingesetzt wird²⁵⁻²⁹.

1.1.2 Antimetabolite

Antimetabolite können aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu natürlichen Metaboliten an Enzyme binden und in Zellbestandteile eingebaut werden. Hier hemmen sie dann entweder die Funktion des Enzyms oder den weiteren Aufbau, bzw. führen zum Funktionsverlust der Produkte. In der Chemotherapie werden daher häufig Substanzen verwendet, die als „falsche Basen“ in die DNA und RNA eingebaut werden und so die weitere Replikation hemmen. Ihre Wirkungen sind weitgehend unspezifisch und beeinflussen somit jede sich schnell teilende Zelle. Man unterscheidet drei Gruppen von Antimetaboliten, die Folsäureantagonisten, Purinnucleosidanaloga und die Pyrimidinnucleosidanaloga. Antimetabolite sind hochtoxisch und bedürfen daher einer sorgfältigen Anwendung.

1.1.2.1 Folsäureantagonisten

Folsäureantagonisten gehören zu den ersten erfolgreich eingesetzten Chemotherapeutika. Sie werden durch chemische Abwandlung der natürlich vorkommenden Folsäure hergestellt (siehe Abbildung 1-5). Das einzige derzeit im Handel befindliche Präparat ist Methotrexat, das mit einer vielfach höheren Affinität an die Dihydrofolat-Reduktase bindet als dessen eigentliches Substrat, das Dihydrofolat. Dadurch wird die Aktivität des Enzyms blockiert, so dass die für die Zellproliferation notwendige Bildung der Tetrahydrofolsäure verhindert wird. Die stark hydrophile Substanz kann allerdings nicht per Diffusion die Zellmembran überwinden sondern wird über Transporterproteine aus der Gruppe der organischen Anionen Transporter (OAT) wie hOAT1, hOAT3 und hOAT4 in die Zelle transportiert³⁰. Für die Wirkung ist die intrazelluläre Bildung eines Methotrexat-Polyglutamat-Komplexes von entscheidender Bedeutung, da so eine Anreicherung in der Zelle erreicht wird.

Häufig ist eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber Methotrexat zu beobachten, die auf eine Verminderung des Membrantransportes, eine Reduktion der Affinität zur Dihydrofolat-Reduktase, der Zunahme der Dihydrofolat-Reduktase-Spiegel durch Genamplifikation und auf die Reduktion der Polyglutamatbildung zurückgeführt wird. Medikamente wie nicht-steroidale Antiphlogistika, Probenecid und Penicillin G führen darüber hinaus zu Interaktionen mit dem Methotrexattransport³¹⁻³⁶. Methotrexat wird neben

der Therapie verschiedener Tumore auch bei Autoimmunleiden wie rheumatoiden Erkrankungen sowie schweren Verlaufsformen der Psoriasis eingesetzt.

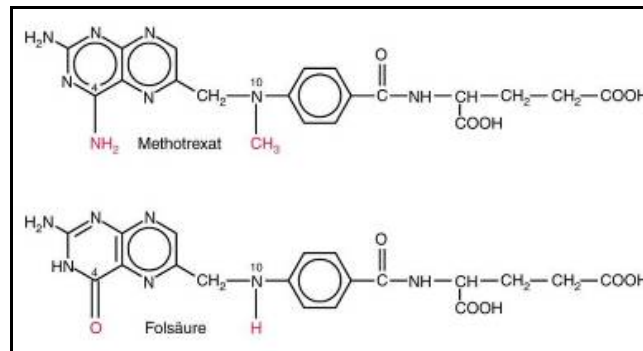


Abbildung 1-5: Chemische Struktur der Folsäure und des Folsäureantagonisten. Methotrexat (Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Pharmakologie und Toxikologie, 9 Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).

1.1.2.2 Purin- und Purinnucleosidanaloga

Als bedeutende Purinanaloga sind 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin zu erwähnen, die sich vom Hypoxanthin und Guanin ableiten und einerseits als kompetitive Hemmstoffe der Purinbiosynthese fungieren und andererseits als „falsche“ Basen in die DNA eingebaut werden (siehe Abbildung 1-6). Dabei leitet sich das Thioguanin vom 6-Mercaptopurin ab^{37,38}, und beide müssen zunächst durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) in 6-Thioinosin-5'-Phosphat (Thio-IMP) bzw. Thioguanosin-5-Phosphat (Thio-GMP) umgewandelt werden, bevor sie in ihre Wirkform das Ribonucleotid aktiviert werden können.

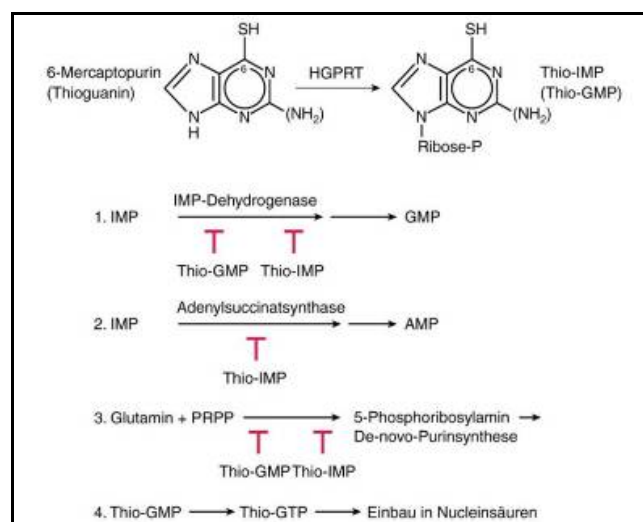


Abbildung 1-6: Wirkmechanismen von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRTase) überführt 6-Mercaptopurin in Thio-IMP und 6-Thioguanin in Thio-GMP. Hierdurch werden unter anderem die GMP- (1.), die AMP- (2.), und die De-novo-

Purinsynthese (3.) gehemmt. Weiterhin wird Thio-GTP als „falsches“ Nukleotid in Nukleinsäuren eingebaut (4.). (Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Pharmakologie und Toxikologie, 9 Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).

Die Substanzen sind lipophil und werden daher schnell über die Plasmamembran aufgenommen. Die zelluläre Aufnahme von 6-Mercaptopurin wie auch von 6-Thioguanin unterliegt allerdings auch einer Sättigungskinetik³⁹. Inaktiviert wird 6-Mercaptopurin durch Methylierung in das atoxische Endprodukt 6-Methyl-Mercaptopurin mittels der Thiopurinmethyltransferase (TPMT)⁴⁰. Hier ist daher eine Genotypisierung der Patienten auf einen Polymorphismus im Thiopurinmethyltransferase-Gen notwendig, da dieser zu einer verminderten Inaktivierung des 6-Mercaptopurin führt und somit schwere Nebenwirkungen verursachen kann. Weiterhin kann eine verminderte Aktivität der HPRTase zu einer herabgesetzten Konzentrationen des wirksamen Metaboliten führen^{41,42}. Eine Thiopurinresistenz ist ebenfalls nach vermehrter Expression der 5`Nucleosidase und veringertes Aktivität der Thiopurinmethyltransferase beobachtet worden^{41,43,44}.

Eingesetzt werden die Purinanaloga hauptsächlich zur Therapie von verschiedenen Leukämien⁴⁵. 6-Mercaptopurin kommt außerdem als Immunsuppressivum bei der Behandlung des Morbus Crohn zur Anwendung⁴⁶.

1.1.2.3 Pyrimidin- und Pyrimidinnucleosidanaloga

Die Purin- und Pyrimidinanaloga ähneln sich in ihrem Verhalten. So muss auch das Pyrimidinanalogon 5-Fluoruracil erst zu seiner Wirkform (5-Fluordesoxyuridin-Monophosphat (FdUMP)) intrazellulär aktiviert werden. Hierbei wird die zelluläre Aufnahme des Zytostatikums durch einen Nukleosidtransporter erleichtert. Für die Wirkung werden vor allem zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. Wie in Abbildung 1-7 dargestellt, spielt wie schon bei den Purin-Analoga der Einbau als „falsche“ Base in RNA und DNA eine wesentliche Rolle⁴⁷. Außerdem fungiert der aktive Metabolit als Enzyminhibitor, da es die Thymidylat-Synthase (TS) blockt und dadurch die Methylierung von Desoxyuridylsäure zu Thymidylsäure verhindert⁴⁸. Das Verhältnis von freiem 5-FdUMP zu Desoxyuridylmonophosphat (dUMP) stellt hierbei den limitierenden Faktor der Inhibierung dar⁴⁹.

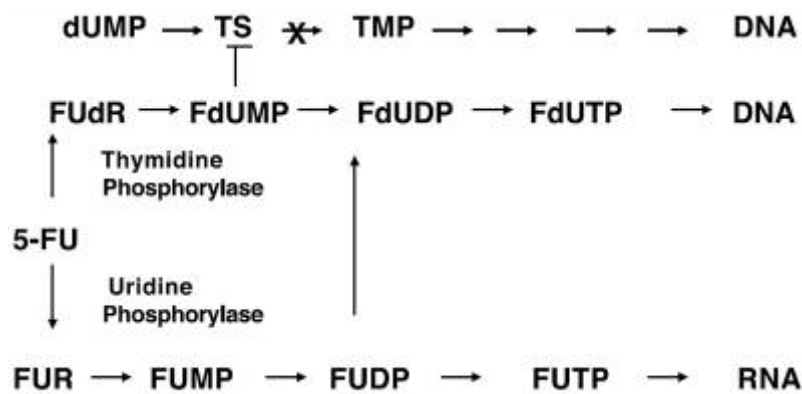


Abbildung 1-7: Intrazellulärer Wirkmechanismus von 5-Fluoruracil (nach Pratt et al. 2005).

Durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase wird das zytostatisch wirksame Substrat wieder inaktiviert. Auch hier sind genetische Varianten bekannt, welche die Therapie beeinflussen können.

Gemcitabin (2',2'-Difluorodeoxycytidin), ein weiteres Pyrimidinanalogon, wird ebenfalls erst intrazellulär in seine Wirkformen, die Diphosphat- und Triphosphatnucleotide umgewandelt⁵⁰. Als Aktivator dient hier die Desoxycytidinkinase, bei der als limitierender Faktor für die Umwandlung des Gemcitabins der geringe dynamische Bereich des Enzyms zu beachten ist, so dass es durch therapeutische Gemcitabinkonzentrationen schon gesättigt sein kann^{51,52}. Jüngste Studien haben dementsprechend eine klare Beziehung zwischen der Expression des Enzyms Desoxycytidin-Kinase (dCK) und der Sensitivität gegenüber Gemcitabin gezeigt⁵². In seinen aktiven Formen wird es ebenfalls als „falscher Baustein“ in die RNA und DNA eingebaut, was zum Abbruch der RNA/DNA-Synthese führt^{53,54}. Inaktiviert wird Gemcitabin durch Desaminierung und Dephosphorylierung durch die 5'-Nukleotidase und Cytidindesaminase^{51,55,56}. Auch für Gemcitabin sind mittlerweile mehrere Resistenzmechanismen beschrieben^{51,55-59}. Gemcitabin findet seine Anwendung hauptsächlich bei inoperablen Pankreaskarzinomen, Harnblasentumoren sowie nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen^{27,28,60}.

Ebenfalls in die Gruppe der Pyrimidinanaloga gehört Cytarabin, das hauptsächlich bei verschiedenen Leukämieformen angewendet wird. Alle drei Zytostatika sind in Abbildung 1-8 nochmals vergleichend aufgeführt.

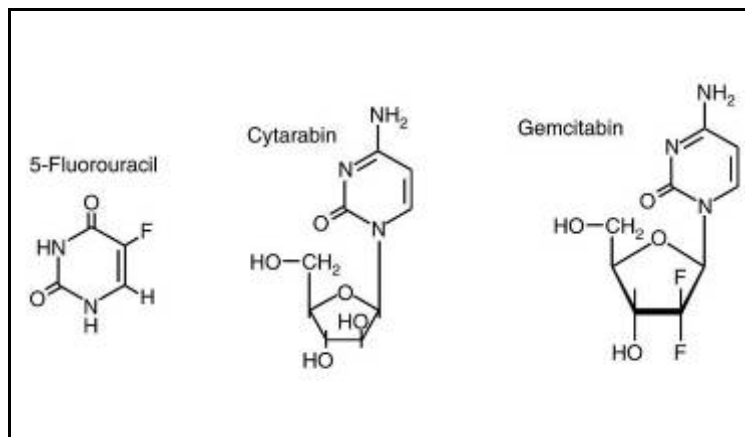


Abbildung 1-8: Strukturgerüste der Pyrimidinanaloga.
(Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Pharmakologie und Toxikologie, 9 Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).

1.2 Resistenzmechanismen bei Tumorerkrankungen

Zytostatika können aus verschiedenen Gründen gegenüber Tumoren wirkungslos sein, was ein großes Problem für die Tumorthherapie darstellt. Grundsätzlich lassen sich dabei die Resistenzfaktoren in zwei große Bereiche, die auf zellulärer und die nicht-zellulärer Ebene, untergliedern.

Auf nicht zellulärer Ebene kann der Grund darin liegen, dass Kombinationen von Zytostatika gewählt wurden, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig abschwächen oder aber die Substanzen wurden nach einem falschen Therapieschema appliziert. Einige solide Tumore zeigen darüber hinaus die Eigenschaft, schlecht vaskularisiert zu sein, so dass das Zytostatikum nur in geringen Konzentrationen an der Tumorzelle wirken kann. Auf zellulärer Ebene (siehe Abbildung 1-9) sind beispielsweise Genmutationen zu nennen, die unter Therapie auftreten und die Zelle unempfindlich gegenüber dem Wirkstoff werden lassen. Eine weitere Möglichkeit ist eine veränderte Expression von Ein- und Auswärtstransportern in den Krebszellen, was entweder den Einwärtstransport der Zytostatika hemmen kann oder aber, was häufiger ist, für eine verstärkte Elimination der Zytostatika aus dem Intrazellularraum sorgt⁶¹. Abbildung 1-9 stellt die Resistenzentwicklung bei ausgewählten Zytostatika dar.

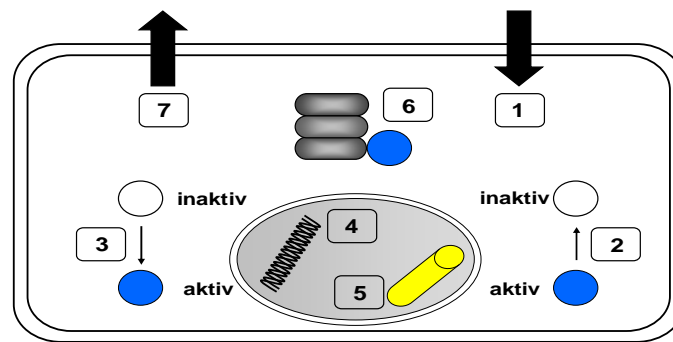


Abbildung 1-9: Zelluläre Resistenzmechanismen.

[1] Verminderte Aufnahme, [2] verstärkte Inaktivierung, [3] verminderte Aktivierung, [4] verstärkte DNA-Reparatur, [5] Veränderung des Zielsubstrats, [6] Überexpression des Zielproteins, [7] verstärkter Auswärtstransport aus der Zelle (modifiziert nach Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Pharmakologie und Toxikologie, 9 Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).

1.2.1 Die Superfamilie der ABC-Proteine

1.2.1.1 Charakterisierung und Struktur der ABC-Transporter

Die ABC-Superfamilie gehört zu einer großen sowie sehr bekannten Proteinfamilie. Ihre Vertreter konnten ubiquitär nachgewiesen werden, so dass es nicht verwundert, dass sie an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind⁶². Als Superfamilie der ABC-Transporter werden membranständige, funktionell heterogene Proteine zusammengefasst⁶³. Alle verfügen als gemeinsames Strukturelement über mindestens eine ATP-bindende Domäne (*ATP-binding cassette*). Sie transportieren zum größten Teil ihre Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten, ATP-abhängig meist unidirektional über eine Zellmembran^{62,63}. Dies ist notwendig, da Zellmembranen normalerweise ein erhebliches Hindernis für große oder hydrophile Moleküle darstellen würden. Den meisten ABC-Transportern ist gemeinsam, dass sie aus mindestens zwei hydrophoben transmembranären Domänen (TMDs), bestehend aus 5 bis 6 α -Helices, und zwei ATP-Bindungsdomänen (auch „nucleotid-binding-domain“, NBD, bzw. ABC-Einheit genannt) gebildet werden (siehe Abbildung 1-11)⁶⁴. Die ATP-Bindungsdomänen sind für die Funktion des Proteins von entscheidender Bedeutung, denn nur die Hydrolyse von gebundenem ATP ermöglicht erst den Transport der jeweiligen Substrate⁶². Die NBD selbst (Abbildung 1-10) umfasst eine hochkonservierte Region aus etwa 200-250 Aminosäuren, die charakteristische Sequenzmotive aufweist: zwei an der ATP Bindung beteiligte Peptid-Domänen (Walker- A und Walker- B) und das dazwischen befindliche und für alle ABC-Transporter typische C-Motiv⁶⁵. Innerhalb der Walker A Region

ist an der Bindung des ATP β -Phosphats die Aminosäure Lysin beteiligt, in der Walker B Region interagiert ein Aspartat-Rest mit Mg^{2+} ^{66,67}.

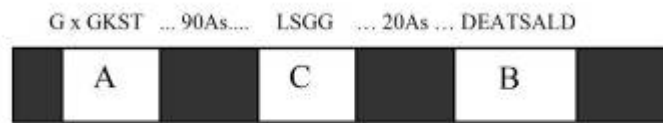


Abbildung 1-10: Aufbau einer Nukleotidbindedomäne in ABC-Transportern. [A] Walker A- Motiv, [B] Walker B- Motiv, [C] C- Motiv (nach Dean et al. 2001).

Es sind außerdem Transporter beschrieben, die erst nach Ausbildung von Dimeren ihre Funktion aufnehmen können (siehe Abbildung 1-11). Sie verfügen nur über eine TMD und eine NBD und werden deswegen auch als *half-transporter* bezeichnet⁶⁴. Zu ihnen zählen das BCRP (*breast cancer resistance protein*) oder der TAP-Komplex (*transporter associated with antigen processing*)⁶⁴.

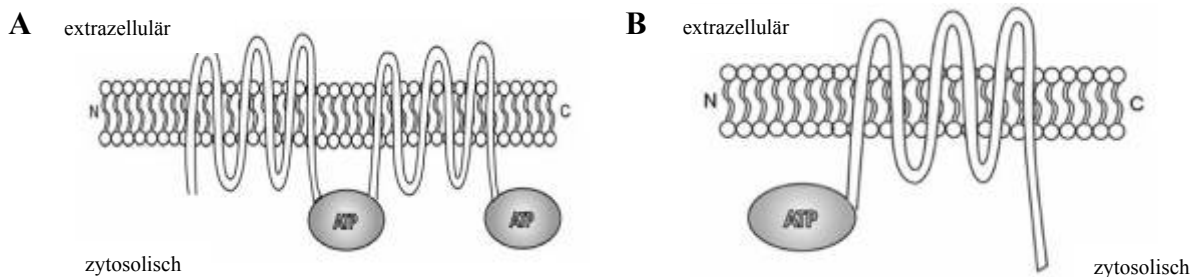


Abbildung 1-11: Aufbau der ABC-Transporter. [A] ABC-Transporter bestehend aus zwei TMDs und zwei NBDs, [B] Darstellung eines *half-transporters* (nach J. Štefková et al. 2004).

1.2.1.2 Klassifizierung der Multi Drug Resistance-Proteine

Von den bisher bekannten 48 Mitgliedern der ABC-Transporter-Superfamilie – unterteilt auf Grundlage von Homologiebeziehungen in die Familien ABCA bis ABCG (www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm) – spielen für die Resistenzentwicklung gegen moderne Chemotherapeutika neben P-Glykoprotein (ABCB1) und *breast cancer resistance protein* (BCRP/ ABCG2) besonders die Vertreter der ABCC-Familie eine wichtige Rolle⁶⁸. Dabei weisen die Wirkstoffe, gegen die diese Transporter den Tumorzellen Schutz verleihen, häufig weder Strukturähnlichkeiten noch gleiche intrazelluläre Wirkorte auf⁶⁹. Die Entdeckung dieser Transporterfamilie erfolgte erst 1992 und damit etwa 16 Jahre nach Entdeckung des P-Glykoproteins durch die Arbeitsgruppe um S. Cole, die aus H69AR Zellen (Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms) eine mRNA isolierte, die, wie sich später

herausstellte, für das MRP1 Protein codierte, den ersten Vertreter der *multidrug-resistance related* Proteine⁷⁰. Mittlerweile sind diesem C-Zweig der ABC-Transporter bereits 13 Mitglieder zugeordnet. Neun von ihnen sind an den resistenzvermittelnden Transportvorgängen beteiligt^{71,72}. Auf Grund dieser Eigenschaft werden diese Transporter auch als *multi-drug resistance associated proteins* (MRPs) bezeichnet. Nicht in Verbindung mit Arzneimittelresistenzen stehen ABCC7, ein cAMP regulierter Chloridkanal⁷³, ABCC8 sowie ABCC9 (beides Oberflächenrezeptoren)^{74,75} und das ABCC13. Die Funktion des ABCC13 Proteins ist bis heute nicht ganz geklärt⁷⁶. Strukturell bestehen alle MRPs aus zwei TMD und zwei NBD (siehe Abbildung 1-11 A und Abbildung 1-12). Zusätzlich weisen die Transportproteine MRP1, 2, 3 und 6 noch eine weitere N-terminale Transmembrandomäne auf (siehe Abbildung 1-12)^{71,77}, welche aber für die Transportaktivität nicht notwendig zu sein scheint⁷⁸.

ABCC-Transporter sind 170-200 kDa große Membranproteine, die sowohl organische Anionen als auch mit Sulfat, Glucuronsäure und Gluthation gekoppelte Konjugate befördern können^{77,79,80}. Außerdem konnte für einige MRP-Proteine ein Cotransport verschiedener Substrate, darunter auch verschiedene Zytostatika, mit Gluthation gezeigt werden^{71,79,81,82}.

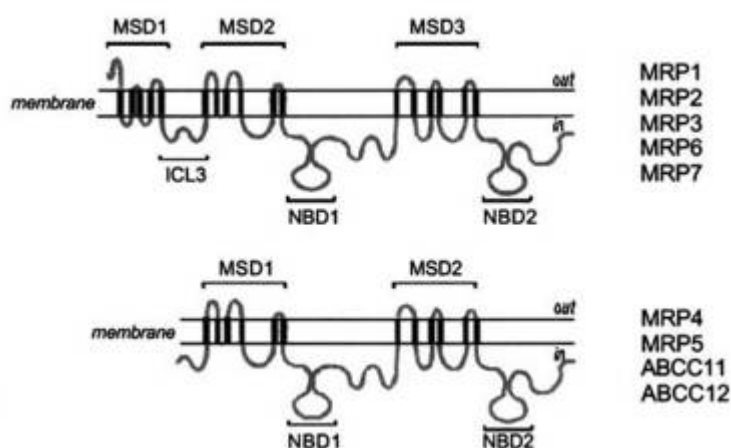


Abbildung 1-12: Aufbau der verschiedenen MRP Transporter (nach Haimeur et al. 2004).

1.2.1.3 Vorkommen und Substratspektren der verschiedenen MRP Isoformen

Die beiden hier in der Arbeit näher betrachteten Transportproteine MRP4 (ABCC4) und MRP5 (ABCC5) spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf den Transport endogener zyklischer Nukleotide wie cAMP und cGMP^{83,84}, sie sind aber auch am Transport verschiedener Zytostatika wie z.B. den beiden Purinnucleosidanaloga 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin^{83,85,85-90} oder am Transport von antiviralen Wirkstoffen^{77,91,92} beteiligt. Durch den

Efflux der beiden zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP durch die beiden Transporter wird außerdem ein möglicher Eingriff in den Signalkaskadeweg diskutiert⁸⁸. Veränderungen der Expression dieser Proteine sind in die Entwicklung der Resistenzen gegenüber Zytostatika, besonders der Nucleosidanaloga verwickelt⁹³. Die Rolle der beiden Transportproteine wird in Abbildung 1-13 nochmals zur besseren Übersicht dargestellt.

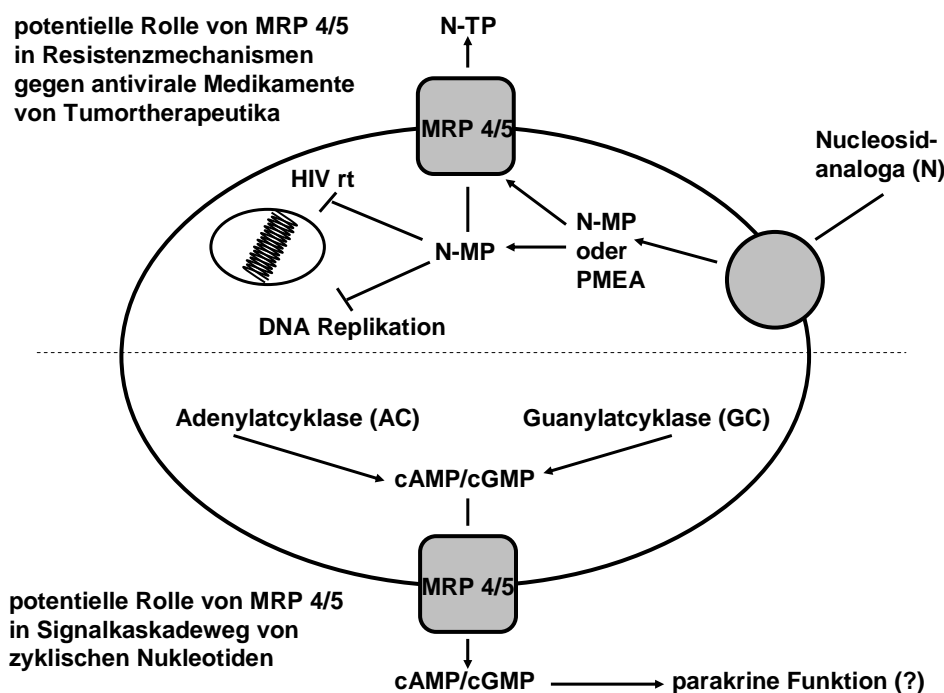


Abbildung 1-13: Rolle von MRP4/5 in Resistenzmechanismen gegen antivirale Medikamente und Tumortheraeutika sowie der Eingriff von MRP4/5 in den Signalkaskadeweg von zyklischen Nucleotiden. HIV rt, HIV reverse Transkriptase; N, Nucleoside; MP, Monophosphate; PK, Proteinkinase; PMEA, 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenin; TP, Triphosphate. (modifiziert nach Ritter et. al. 2005)

MRP4 wurde 1998 entdeckt und kloniert⁹⁴, der Transporter besteht aus 1325 Aminosäuren und ist damit aufgrund der fehlenden N-terminalen TMD wesentlich kleiner als das MRP1, 2 und 3^{91,92,95}. MRP4 findet sich in vielen verschiedenen Geweben und Zelllinien, darunter Prostata^{91,94}, Leber^{94,96}, Niere⁹⁴, Nebenniere⁸⁷, Ovar⁹⁴, Gehirn^{95,97} und Pankreas^{71,98}. Außerdem konnte es in hohen Konzentrationen in Thrombozyten nachgewiesen werden⁹⁹. MRP4 transportiert zyklische Nucleotide wie cAMP und cGMP^{83,87,100}, Nucleosidmonophosphate^{90,92,101} und Glukuronide wie das Estradiol-17- β -D-Glukoronid⁸⁷. Die beiden antiviralen Wirkstoffe 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenin (PMEA) und Azidothymidinmonophosphat^{77,91,92} werden genauso wie der Antimetabolit Methotrexat^{77,102,103} oder Dihydroepiandrosteron-3-sulfat (DHEAS)⁸⁰ ebenfalls von MRP4 transportiert. Eine Beteiligung am Prostaglandinefflux wurde erstmals 2003 von Reid beschrieben¹⁰⁴.

MRP5 fungiert wie auch MRP4 als Transporter für cGMP und cAMP, wobei als Hauptsubstrat cGMP identifiziert wurde^{83,89}. Es ist ebenfalls seit 1998 bekannt^{95,105} und auch sein Vorkommen ist ubiquitär^{95,98,105-108}. Eine erhöhte Expression zeigte sich in Skelettmuskulatur, Lunge, Herz und Hirn^{95,97,98,105,107,109}. Neben den zyklischen Nukleotiden⁸³ umfasst das Substratspektrum von MRP5 pharmakologisch bedeutsame Chemotherapeutika wie 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin und PMEA⁹⁰. Für den Antimetaboliten Methotrexat konnte aber allerdings im Gegensatz zum MRP4 kein Transport nachgewiesen werden⁸⁵. Weiterhin ist eine Resistenz gegenüber 5-Fluoruracil bzw. der monophosphorylierten Metabolite als auch deren Transport durch MRP5 beschrieben¹¹⁰. Desweiteren besteht eine mögliche Resistenz gegen viele andere Zytostatika wie Oxaliplatin oder Doxorubicin, welche aber in der Literatur verschieden diskutiert wird^{90,107,110}. *Mc. Aleer* und Mitarbeiter haben an MRP5 transfizierten HEK 293 Zellen beweisen können, dass diese eine Resistenz gegenüber bestimmten metallischen Salzen wie Cadmiumchlorid aufweisen, wohl aber nicht für die beiden Zytostatika Cisplatin oder Daunomycin¹⁰⁷.

1.2.1.4 Inhibitoren von MRP4 und MRP5

Generell konnte schon in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass sich ABCC-Transporter in ihrer Funktion blockieren lassen^{83,85,90,96,99,110}. Aber trotz vieler Bemühungen ist es bisher nicht gelungen spezifische Inhibitoren von MRP4 und 5 zu finden. Substanzen, die MRP4 und/oder MRP5 hemmen, sind in Tabelle 1-1 und

Tabelle 1-2 aufgezeigt. Es handelt sich hauptsächlich um nichtsteroidale Antiphlogistika^{83,85,99}, Phosphodiesterasehemmer^{83,85} und Substanzen, die Ähnlichkeit zur Struktur von cGMP^{85,99} aufweisen.

Tabelle 1-1: Inhibitoren von MRP4 (nach Ritter et al. 2005)

MRP 4 Inhibitoren	
<i>Substanz</i>	<i>IC₅₀-Werte [μM]</i>
Probenecid	100 ¹¹¹ ; 100 ⁹⁶ ; 2300 ⁸⁵
Sulfinpyrazon	420 ⁸⁵
MK 571	2 ⁹⁶ ; 10 ⁸⁵ ; 43 ⁹⁹
Zaprinast	250 ⁸⁵
Trequensin	10 ⁸⁵
Sildenafil	20 ⁸⁵
Dipyridamol	2 ⁸⁵ ; 12 ⁹⁹ ; <20 ⁹⁶
Indomethacin	5 ⁸⁵ ; 22 ⁹⁹
Ibuprofen	20 ⁸⁵ ; 50 ⁹⁹

Tabelle 1-2: Inhibitoren von MRP5 (nach Ritter et al. 2005)

MRP 5 Inhibitoren	
<i>Substanz</i>	<i>IC₅₀-Werte [μM]</i>
Probenecid	50 ⁸³ ; 200 ⁸⁵
Sulfinpyrazon	300 ⁹⁰
Zaprinast	10 ⁸³ ; 250 ⁸⁵
Trequensin	<1 ⁸³ ; 30 ⁸⁵
Sildenafil	<1 ⁸³ ; 80 ⁸⁵
Dipyridamol	30 ⁸⁵

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Pankreas nimmt im menschlichen Körper eine wesentliche Rolle ein. Es ist durch seine exokrine Funktion an der Sekretion von vielen Verdauungsenzymen beteiligt, und durch die endokrine Sezernierung von Insulin stellt es eine wichtige Größe in der Regulation des Blutglukosespiegels dar. Diese Funktionen machen es zu einem unverzichtbaren Teil im menschlichen Organismus, so dass eine Beeinträchtigung dieses Organs erhebliche Konsequenzen nach sich zieht. Eine maligne Erkrankung der Bauchspeicheldrüse ist das Pankreaskarzinom, welches mit einer sehr hohen Mortalitätsrate und schlechten Prognose assoziiert ist. Eine auftretende Chemotherapeutikaresistenz gegen viele in der Behandlung eingesetzte Zytostatika stellt eines der Hauptprobleme in der Behandlung dieses Karzinoms dar.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, zwei Auswärtstransporter, die an Zytostatikaresistenzen beteiligt sind, in pankreasnahen Zellsystemen näher zu charakterisieren. Dabei handelt es sich um die Transportproteine:

- Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4)
- Multidrug Resistance Protein 5 (MRP5/ABCC5)

Es wurden hierfür *in vitro* Untersuchungen an vier verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt. Zunächst sollte auf RNA-Ebene mittels *Real-Time* PCR die Pankreaszelllinien (Capan-1, Capan-2, PaTu 8988 T und PaTu 8902) hinsichtlich der MRP4- und MRP5-Expression untersucht und diese Ergebnisse dann mittels *Western Blot* und Immunfluoreszenzmikroskopie verifiziert werden. Anschließend wurde für verschiedene Zytostatika bzw. Antimetaboliten der zytotoxische Einfluss auf diese Krebszellen untersucht. In Voruntersuchungen zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für folgende Zytotoxizitätsversuche wurde der *Alamar Blue Assay* und der *Kristallviolettassay* auf ihre Verwendbarkeit getestet. Es wurden als Zytostatika verwendet:

- 6-Mercaptopurin

- 6-Thioguanin
- 5-Fluoruracil
- Gemcitabin
- Methotrexat

Aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen wurden IC_{50} -Werte für die Zelllinien mit den verwendeten Zytostatika im Zytotoxizitätsassay ermittelt. Anschließend wurden Versuche durchgeführt, bei denen beide Transporter zusätzlich durch einen Inhibitor (Probenecid) blockiert waren und die dabei gewonnenen Daten mit denen ohne Hemmstoff verglichen wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

ABI PRISM 7700 Sequence Detector [®]	Applied Biosystems, Weiterstadt
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau Memmert, Schwabach
Einfrierbox	VWR [™] , Hamburg
Einfrierröhrchen	Nunc, Kirchheim
Filterpapier	Whatman International, Buckinghamshire, England
Heizblock Grant QBT	Grant Instruments, Cambridgeshire, England
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Visitech international, Chromaphor
Küvetten 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph, Schwabach
MicroAmp [®] Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mikrotiterplatten, 96-well	Falcon, Meylon Cedex, Frankreich
Mikrotiterplatten, 96-well	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten, 6-well	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Mikrotiterplattenlesegerät	1420 Victor2 Multilabel Counter, Wallac, Boston, MA, USA
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
PCR-Cycler, Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, pH 526	WTW, Weilheim
Rocking Plattform	Biometra [®] , Göttingen
Röntgenfilme	AGFA Crones 5, Mortsels, Belgien
Röntgenfilmkassette	Hyperkassette, Amersham Biosciences, Freiburg
Vakuumpumpe	neoLab, Heidelberg
SDS-Page Elektrophoresekammer	Owl Separations Systems, Inc. Portsmouth, USA
Sterilfilter	Sartorius, Hannover
Sterilwerkbank	HERAsafe, Heraeus Instruments, Hanau

Stromversorgungsgerät	Standard Power Pack P25, Biometra [®] , Göttingen
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Vortexer	Reax top, Heidolph, Schwabach
Waagen	Feinwaage, Sartorius, Göttingen Waage, Explorer, Ohaus, Schweiz
Wasserbad	Julabo, Seelbach GFL, Burgwedel
Zellkulturflaschen	BD, Falcon, Heidelberg
Zellzählgerät	Casy [®] 1, Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen	Micon Microcentrifuge MC 13, Heraeus Instruments, Hanau Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau Galaxy Mini, VWR [™] , Hamburg

2.1.2 Allgemein verwendete Chemikalien/Reagenzien und Enzyme

Alamar Blue	Biosource, Camarillo, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Bicinchoninic Acid Solution (BCA)	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Pasching
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Casy [®] ton	Schärfe System, Reutlingen
DAKO [®] Fluorescent Mounting Medium	Dako Corporation, Carpintera,/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dNTPs (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL [™] Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham biosciences, Freiburg
EDTA	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Endogenous 18S Ribosomal RNA Control	Applied Biosystems, Weiterstadt
Entwickler G153 A	AGFA, Mortsel, Belgien
Entwickler G153 B	AGFA, Mortsel, Belgien

Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Fixierer	AGFA, Mortsel, Belgien
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gemzar [®]	Lilly Deutschland GmbH, Gießen
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Kupfer(II)sulfat-Lösung	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Magermilchpulver Naturaflor [®]	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Magnesiumchlorid (25 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
6-Mercaptopurinmonohydrat	Alfa Aesar, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Holland
Methotrexat	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
peqGOLD RNA Pure	Peqlab, Erlangen
Platinum [®] Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Prestained Marker	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Probenecid	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Rox Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TaqMan [®] Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems, Weiterstadt
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tris-HCl	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Triton x-100	SERVA, Heidelberg
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Seromed Biochrom KG, Berlin
TOTO [®] 3-Iodide	Molecular Probes, Göttingen
Tween [®] -20	Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen

2.1.3 Lösungen und Puffer

<i>Blockierungspuffer (I)</i>	BSA	2,5 g
	TBST	ad 50 ml
<i>Blockierungspuffer (II)</i>	Magermilchpulver	2,5 g
	FCS	1,5 ml
	TBST	ad 50 ml
<i>Real-time PCR-Master-Mix</i>	Aqua ad injectabilia	595,75 µl
	Tris-HCl	46 µl
	2 M KCl	57,5 µl
	25 mM MgCl ₂	276 µl
	Glycerol	92 µl
	10 mM dNTPs	46 µl
	Rox Reference Dye	231 µl
	Platinum [®] Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	8 µl
<i>Einfriermedium</i>	FCS	90 %
	DMSO	10 %
<i>Kristallviolett-Arbeitslösung</i>	Kristallviolettstammlösung	1 ml
	Ethanol (99 %)	3,6 ml
<i>Laemmli-Puffer (4x)</i>	Tris pH 6,8	3,125 ml
	SDS	1 g
	Glycerol (100%)	5 ml

	Bromphenolblau	0,005 g
	β-Mercaptoethanol	25 ml
	Aqua dest.	ad 12,5 ml
<i>Natriumdodecylsulfat (SDS)</i>	SDS	1 g
<i>10 % (v/v)</i>	Aqua dest.	ad 10 ml
<i>Sammelgelpuffer</i>	Tris-HCl	6 g
		auf pH
	mit NaOH	6,8
	Aqua dest.	ad 100 ml
<i>Stripping Puffer</i>	Tris	7,75 g
	SDS	20 g
		auf pH
	mit HCl	6,8
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Tankpuffer (10x)</i>	Tris-Base	60 g
	Glycin	288 g
	SDS	7 g
	Aqua dest.	ad 1600 ml
<i>Tankpuffer (1x)</i>	10x Tankpuffer	10 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Trenngelpuffer</i>	Tris-HCl	45,5 g
		auf pH
	mit NaOH	8,8
	Aqua dest.	ad 250 ml
<i>Towbinpuffer (10x)</i>	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 mM
	Aqua dest.	ad 1000 ml

<i>Towbinpuffer (1x)</i>	Towbinpuffer (10x)	100 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Waschpuffer TBS (10x)</i>	Tris	30 g
	Natriumchlorid	80 g
	Kaliumchlorid	2 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Waschpuffer TBST</i>	10x TBS	100 ml
	TWEEN 20	400 µl
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>PBS (10x)</i>	Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g
	Kaliumchlorid	20 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
	Natriumchlorid	80 g
		auf pH
	mit HCL oder NaOH	7,4
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>PBS (1x)</i>	PBS (10x)	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Für den immunologischen Nachweis der MRP4 und 5 Proteine, wurden die Antiseren „SNG“ bzw. „AMF“ verwendet, welche aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg von der Arbeitsgruppe um Professor Keppler zur Verfügung gestellt wurden. Diese polyklonalen Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den C-terminalen Peptiden SNGQPSTLTIFETAL (MRP4) und AMFAAAENKVAVKG (MRP5) gewonnen.

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen
Goat anti-rabbit IgG-HRP konjugiert	Bio-Rad Laboratories, München

2.1.5 Oligonukleotide/TaqMan[®]-Sonden

Tabelle 2-1: Oligonukleotide/ TaqMan[®]-Sonden

Primer bzw. Sonde	Sequenz
MRP 4 F	5`GTCTTCATTTTCCTTATTCTCCTAAACAC-3`
MRP 4 R	5`CCATTTACAGTGACATTTAGCATACTTGT-3`
MRP 4 TM (Sonde)	5`-6FAM-CCAGTATGAAAGCCACCAATCTTGAAGCA-TAMRA-3`
MRP 5 F	5`-CACCATCCACGCCTACAATAAA-3`
MRP 5 R	5`-CACCGCATCGGCACACGTA-3`
MRP 5 TM (Sonde)	5`-6FAM-GCTTGGTTGTCATCCAGCAGCTCCTG-TAMRA-3`

Die verwendeten Oligonukleotide, in Tabelle 2-1 dargestellt, wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Für die Bestimmung der 18S-Expression wurde der Pre-Developed TaqMan[®]-Assay *Reagents Endogenous 18S Ribosomal RNA Control* (Applied Biosystems) genutzt.

2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium Dulbecco`s MEM	Seromed-Biochrom KG, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Seromed-Biochrom KG, Berlin
L-Glutamin 200 mM	Seromed-Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10 000U/10 000µg/ml)	Seromed-Biochrom KG, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Seromed-Biochrom KG, Berlin
Medium RPMI 1640	Seromed-Biochrom KG, Berlin
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Seromed-Biochrom KG, Berlin

*Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die jeweiligen Zelllinien:**Capan-1 und Capan-2*

RPMI 1640
 FCS (10 %)
 Penicillin (170 U/ml)/Streptomycin (170µg/ml)
 L-Glutamin (2 mM)

PaTu 8902 und PaTu 8988 T

Dulbecco's MEM
 FCS (10 %)
 Penicillin (170 U/ml)/Streptomycin (170µg/ml)
 L-Glutamin (2 mM)

2.2 Methoden**2.2.1 Zellkultur***2.2.1.1 Zelllinien (Capan-1, Capan-2, PaTu 8988 T und PaTu 8902)**Capan-1 und Capan-2*

Die Zelllinien Capan-1 und 2 sowie die beiden PaTu-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Lerch der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Die Originalzelllinie Capan-1 wurde aus einer Metastase des Lebergewebes eines 40-jährigen Kaukasiers gewonnen, welcher primär an einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt war¹¹². Capan-1-Zellen bilden einen konfluent wachsenden, einschichtigen adhären Zellrasen in Kultur aus, der sich gut unter Zugabe von Trypsin ernten lässt. Capan-2-Zellen wurden Mitte der 70er Jahre aus erkranktem Pankreasgewebe eines Kaukasiers entnommen und dann kultiviert¹¹². Dieser Patient litt ebenfalls an einem Adenokarzinom des Pankreas. In Kultur wachsen diese Zellen ebenfalls adhärent am Zellkulturflaschenboden an.

PaTu 8988 T und PaTu 8902

PaTu 8902-Zellen wurden ursprünglich von einem duktalem Adenokarzinom einer kaukasischen Frau entnommen und dann kultiviert¹¹³. PaTu 8988 T-Zellen wurden aus Lebermetastasen einer Frau mit Adenokarzinom des Pankreas gewonnen¹¹⁴. Diese Zellen wachsen in Kultur ähnlich schnell wie die PaTu 8902 Zellen. Beide Zelllinien sind adhären wachsend.

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Sämtliche verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten CO₂-Atmosphäre (5 %) in sterilen Gefäßen kultiviert, wobei das Medium alle drei Tage gewechselt wurde. Die standardmäßige Kultivierung von Capan-1- sowie Capan-2-Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen mit 20 ml Medium. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert, wozu das alte Medium entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen wurde. Das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden erfolgte durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) und anschließender Inkubation bei 37 °C für 5 min bei Capan-1 bzw. von 20 min bei Capan-2. Die Zellen wurden in 7 ml frischen Mediums (+10 % FCS v/v) aufgenommen und durch mehrmaliges kräftiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, bevor ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen wurde. Um die Zellen weiterhin in Kultur zu halten, wurden je nach gewünschter Zelldichte verschiedene Volumina der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit 20 ml entsprechend temperiertem Medium (37 °C) überführt.

Die Kultivierung der PaTu-Zellen erfolgte ähnlich den Capan-Zellen, allerdings wurde hier anstatt RPMI DMEM-Medium mit Zusätzen (10 % FCS, 1,7 % Penicillin/Streptomycin v/v und L-Gluthamin (2 mM)), verwendet.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Mittels des Casy[®] One-Zytometers sind Zellzahl-, Volumen- und Durchmesserbestimmungen an vereinzelt Zellen möglich. Für die einzelnen Messungen wurden 50 µl einer frisch trypsinierten Zellsuspension in 10 ml Casy[®] ton (isotone Lösung) verdünnt und durch eine Kapillare definierten Durchmessers mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit in die Messzelle transportiert. Während des Messvorgangs wird eine Spannung an die Messzelle angelegt. Passieren die Zellen die Messeinheit, kommt es proportional zum Zellvolumen zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstandes. Dadurch kann das gesamte Zellspektrum von Zelltrümmern über vitale Einzelzellen bis hin zu Zellaggregaten erfasst werden.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung (Lagerung der Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff) dient der längerfristigen Lagerung von Zelllinien wie der Capan- oder PaTu-Zellen, ohne die Viabilität der Zellen zu beeinträchtigen. Bei diesen niedrigen Temperaturen ruht die metabolische Stoffwechselaktivität, so dass die Zellen keinen Schaden nehmen.

Die geernteten und gezählten Zellen wurden bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert und anschließend mit einer Mischung aus 90 % FCS (v/v) und 10 % (v/v) des Kryoprotektivums DMSO resuspendiert. Jeweils etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in spezielle Einfrierröhrchen (NUNC) überführt und in einer Einfrierbox, welche mit Isopropanol gefüllt ist, innerhalb von 24 Stunden im Gefrierschrank langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Für die langfristige Lagerung werden die Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen in einem 37 °C vortemperierten Ethanolbad erwärmt und sofort in einer 75 cm^2 Kulturflasche ausgesät. Ein erster Mediumwechsel schloss sich nach 24 Stunden an, um das Kulturmedium vom restlichen DMSO zu befreien.

2.2.2 RNA/DNA-Methoden

2.2.2.1 Gewinnung der Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Präparation der Gesamt-RNA wurden die kultivierten Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums zunächst mit $250\text{ }\mu\text{l}$ *peqGOLD RNAPure*-Lösung lysiert und die RNA nach dem Herstellerprotokoll isoliert, wobei es sich um eine kombinierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Chlorform Extraktion handelte. Die RNA-Pellets wurden schließlich in $50\text{ }\mu\text{l}$ RNase-freien Wassers resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, bevor in den Proben die RNA-Menge und -Reinheit bestimmt werden konnten (siehe 2.2.2.2). Die RNA wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration von RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hintergrund dieser Methode ist, dass die aromatischen Ringsysteme der Basen der Nukleinsäuren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250-270 nm absorbieren. Aus der gemessenen Extinktion wurde die Nukleinsäurekonzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet.

Der Reinheitsgrad der RNA lässt sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermitteln. Der Quotient liegt für reine Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0. Mögliche Kontaminationen durch Proteine äußern sich in einem deutlichen Abfall des Quotienten, da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am UV/VIS-Messgerät (Eppendorf Biophotometer).

2.2.2.3 Reverse Transkription

Bevor die Expressionsuntersuchungen mittels *Real-Time* PCR erfolgen konnten, war die Umschreibung der RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) mittels einer reversen Transkriptase nötig, da zur anschließenden Quantifizierung eine DNA-abhängigen Polymerase eingesetzt wurde. Für diese Umschreibung wurde der *TaqMan*[®] *Reverse Transcription Reagents* Kit verwendet. Als Primer wurden *Random Hexamere* eingesetzt, welche Oligonukleotide aller möglichen Kombinationen der vier vorkommenden Basen enthielten und sich somit unspezifisch an den RNA-Strang anlagern konnten. Auf diese Weise wurde nicht nur mRNA, sondern auch rRNA und tRNA revers transkribiert. Dadurch war eine spätere Normalisierung der PCR-Ergebnisse auf die 18S rRNA als „Housekeeping-Gen“ möglich. Die Reverse Transkription erfolgte nach Protokoll 1 und 2 aus Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3.

Tabelle 2-2: Protokoll 1: Ansatz für Reverse Transkription

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [μl pro 20 μl-Ansatz]</i>	<i>Endkonzentration</i>
10 x <i>TaqMan</i> [®] RT-Puffer	2	1 x
25 mM $MgCl_2$	4,4	5,5 mM
2,5 mM dNTP-Mix	10	500 μ M
50 μ M <i>Random Hexamere</i>	1	2,5 μ M
20 U/ μ l RNase-Inhibitor	0,4	0,4 U/ μ l
50 U/ μ l Reverse Transkriptase	0,5	1,25 U/ μ l
RNA	500 ng	-
Aqua ad injectabilia	ad 25 μ l	-

Tabelle 2-3: Protokoll 2: Reaktionsbedingungen:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur [$^{\circ}$C]</i>	<i>Zeit [min]</i>
1. Inkubation	25	10
2. Reverse Transkription	48	30
3. Inaktivierung der Transkriptase	95	5

Während der initialen Inkubationsphase bei 25 $^{\circ}$ C kommt es zur Anlagerung der *Random Hexamer* Primer an die RNA. Die Reverse Transkriptase katalysiert bei 48 $^{\circ}$ C die Synthese einer zum RNA-Strang komplementären DNA (cDNA). Schließlich erfolgt bei 95 $^{\circ}$ C die Inaktivierung der *Reversen Transkriptase*. Bis zu ihrer Verwendung wurde die cDNA bei

-20 °C aufbewahrt, außerdem wurde die cDNA durch Zugabe von Aqua ad injectabilia auf 10 ng/ µl verdünnt.

2.2.2.4 Real Time PCR

Zur Quantifizierung von Zielsequenzen dient die *Real-Time* PCR. Diese spezielle Form der PCR beruht auf dem Prinzip, dass eine fluoreszenzmarkierte Sonde während des Ablaufes der Polymerasenkettenreaktion an die DNA hybridisiert. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem Reporterfluoreszenz-Farbstoff (für die zu messende Probe FAM und für 18S rRNA VIC) gekoppelt, am 3'-Ende trägt sie einen Quencher (z.B. das 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin; TAMRA). Wird die intakte Sonde mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt, so wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes zum Quencher durch den Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) unterdrückt und z.B. als Licht einer anderen Wellenlänge abgestrahlt. Beide Primer sowie die dazwischen liegende Sonde hybridisieren während der PCR mit dem DNA-Matrizenstrang. In der Elongationsphase der PCR wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase die gebundene Sonde hydrolysiert, wodurch die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen aufgehoben und damit auch der FET unterbrochen wird, so dass nun der Reporterfarbstoff ein Fluoreszenzsignal emittiert. Das hierbei gemessene Signal ist proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts. Abbildung 2-1 stellt schematisch das Prinzip der TaqMan[®]-Detektion dar.

Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzemission gemessen und gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Daraus ergibt sich ein sogenannter *Amplification Plot*. Dabei ist das Fluoreszenzsignal während der ersten Zyklen so gering, dass es die Hintergrundfluoreszenz nicht übersteigt. Daher wird die während der ersten Zyklen gemessene Fluoreszenz als Hintergrundsignal definiert, aus der sich dann der Schwellenwert (Threshold) (ein vielfaches dieser Hintergrundaktivität) ergibt. Dieser Schwellenwert, bzw. der PCR-Zyklus bei dem er für die jeweilige Probe erreicht wird, wird entsprechend als *Cycle of Threshold* (C_T -Wert) bezeichnet und ist Grundlage für weitere Berechnungen. Im Folgenden sind in Tabelle 2-3 und

Tabelle 2-4 die verwendeten Pipettierschemata aufgeführt. Des Weiteren ist in Tabelle 2-5 das verwendete Temperaturprofil aufgezeigt.

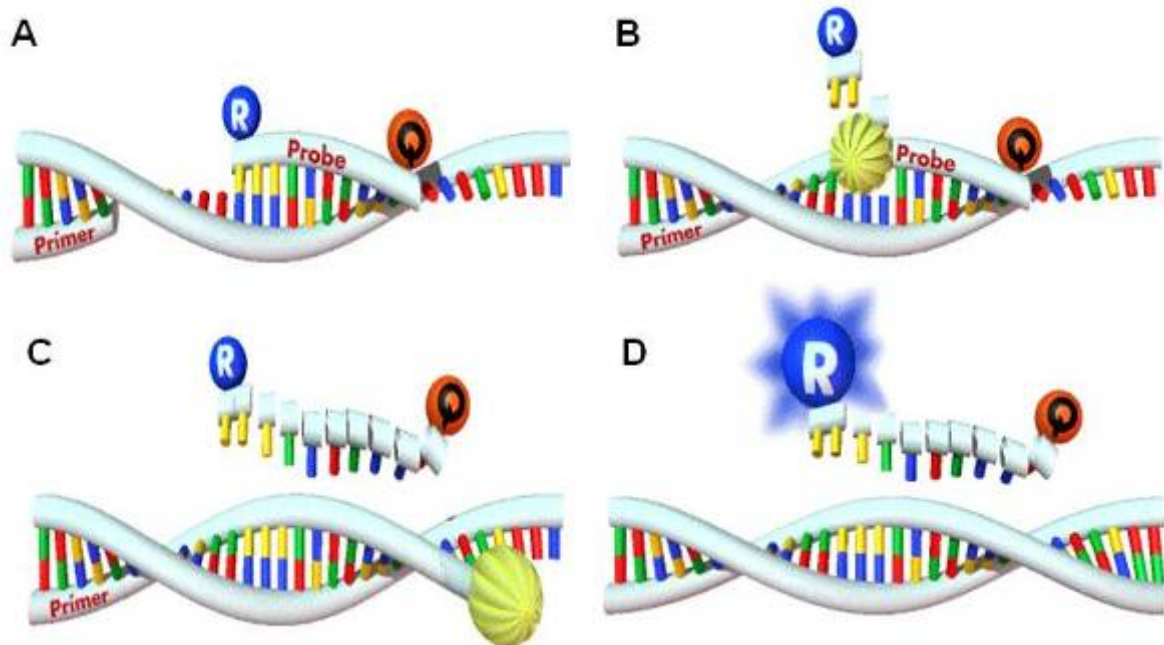


Abbildung 2-1: Prinzip der TaqMan[®]-Detektion.

A) Anlagerung der Sonde an den DNA-Strang: Durch den Energietransfer auf den Quencher (Q) wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes (R) unterdrückt. B) zeigt die Elongation und C) die Spaltung der Sonde. Während dieses Schrittes wird der Reporterfarbstoff frei und sendet ein detektierbares Fluoreszenzsignal aus.

Tabelle 2-3: Pipettierschema für die Gene MRP4 und 5

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [μl] pro 20 μl Ansatz</i>	<i>Endkonzentration</i>
Real-time PCR-Master-Mix	10	-
Primer-Sonden-Mix 10×	2	1x
cDNA 10 ng/μl	2,0	20 ng
Aqua ad injectabilia	ad 20 μl	-
<i>Primer-Sonden Mix 10×</i>		
Forward-Primer 20μM		300 nM
Reverse-Primer 20 μM		300 nM
Sonde 20 μM		100 nM

Tabelle 2-4: Pipettierschema für das Referenzgen 18S

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [μl] pro 20 μl Ansatz</i>	<i>Endkonzentration</i>
Real-time PCR-Master-Mix	10	-
Primer-Sonden Mix 20x	1	1x
cDNA 10 ng/ μ l	2,0	20 ng
Aqua ad injectabilia	ad 20 μ l	-

Tabelle 2-5: Für die PCR verwendete Temperaturprofil

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur [$^{\circ}$C]</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Aktivierung der AmpliTaq-Polymerase	95	10 min	1
DNA-Doppelstrang-Auftrennung	95	15 sec	45
Primer-Anlagerung/ Extension	60	1 min	

Die Real Time PCR-Untersuchungen wurden für jede Probe in 20 μ l Ansätzen als Doppelbestimmung in 96-Well-Platten durchgeführt. Auf jeder Platte wurde eine eigene Standardkurve, bestehend aus verschiedenen Konzentrationen der in ein Plasmid klonierten PCR-Fragmente, zur späteren Quantifizierung sowie eine Wasserkontrolle zum Ausschluss von Verunreinigungen der PCR-Komponenten mit DNA (Negativkontrolle) mitgeführt. Die Messungen wurden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector[®] durchgeführt.

Da es bei der RNA-Messung und der Reversen Transkription zu geringen Abweichungen von Probe zu Probe kommen kann, die dann die Ergebnisse verfälschen würden, wurde neben dem jeweiligen Zielgen auch ein Referenzgen gemessen, auf dessen Expression die Ergebnisse dann jeweils normalisiert werden konnten. Hierfür verwendet werden z. B. GAPDH oder 18S rRNA, da diese „housekeeping“ Gene/Struktur-RNA nur gering bis gar nicht reguliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde 18S rRNA eingesetzt, für das eine kommerzielle Primer-Sonden-Kombination erhältlich war.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Membranproteinen

Da in der vorliegenden Arbeit mit MRP4 und 5 gearbeitet wurde, welche funktionell in membranären Kompartimenten der Zelle vorkommen, war es zunächst notwendig die Proteine anzureichern. Aus diesem Grund wurde aus dem Gesamtprotein die Membranfraktion isoliert.

Nach der Zellernte wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet einmal mit 1 ml PBS-Dulbecco gewaschen und anschließend in 500 µl 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) resuspendiert. Zusätzlich wurden die Protease-Inhibitoren Aprotinin (Endkonzentration 0,1 mM), Leupeptin (0,1 mM) und PMSF (0,01 mM) zugegeben. Für den weiteren Zellaufschluss und zur Isolierung der Membranfraktion wurden die Zellen zunächst mehrfachen Einfrier-Auftau Zyklen unterworfen und das Lysat anschließend bei 100.000×g und 4 °C für 45 Minuten in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im Überstand finden sich anschließend die zytosolischen Proteine, die verworfen wurden, während das gewonnene Pellet, die Membranfraktion, in 75 µl 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen wurde.

2.2.3.2 Quantifizierung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Membranfraktion wurde die BCA-Methode verwendet. Hierbei wird die Eigenschaft von Proteinen in alkalischer Lösung mit Kupfer(II)-Ionen einen Komplex zu bilden (Biuret-Reaktion) ausgenutzt. Dabei werden die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Diese bilden nun wiederum mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, dessen Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen werden kann. Dafür wurden je 10 µl der zuvor 1:5 mit Aqua dest. verdünnten Proteinprobe in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit je 200 µl frisch angesetzten Färbereagenz, bestehend aus einem Teil 4 prozentiger Kupfer(II)sulfat-Lösung und 50 Teilen 1 prozentiger Bicinchoninsäure, versetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Färbeintensität mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Victor² 1420 Multilabel Counter) bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve aus 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt und der Proteingehalt einer Probe anhand der Eichgeraden nach unten genannter Formel ermittelt.

$$\text{Proteingehalt} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Mittelwert der Messwerte} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1\ 000}$$

2.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Um die Proteingemische aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli genutzt. Dabei bildet SDS (ein

anionisches Agens) mit den Proteinen negativ geladene Komplexe aus, welche ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis besitzen und so die Ladungsunterschiede zwischen den jeweiligen Proteinen überdecken. Durch die SDS-Bindung kommt es außerdem zum Verlust der Sekundär- und Tertiärstrukturen innerhalb der Proteine, in diesen Prozess ist ferner das dem Ladepuffer zugesetzte β -Mercaptoethanol (Aufbrechen von Disulfidbrücken) und die Erwärmung der Probe vor dem Auftragen involviert. Im elektrischen Feld wandern diese geladenen Komplexe während der Elektrophorese zur Anode und werden dabei nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Mithilfe eines mitgeführten Proteinmarkers lässt sich die Größe der Banden ermitteln. Porengröße und Elastizität des verwendeten Gels werden hauptsächlich darüber bestimmt, welche Konzentration das Acryl- und Bisacrylamid im Polymerisationsansatz hat. Dabei bestimmt das Acrylamid die Länge und das Bisacrylamid den Vernetzungsgrad der Polyacrylamidketten. Initiiert wird die Polymerisation durch die Zugabe von TEMED und APS.

Um die Membranproteine MRP4 und 5 untersuchen zu können, die jeweils ein Molekulargewicht von 170-200 kDa besitzen, wurde ein 7,5 prozentiges Trenngel sowie ein 4 prozentiges Sammelgel gewählt. Als erstes werden die Proteine im Sammelgel konzentriert bevor sie ins Trenngel übertreten. Dabei besitzt das Sammelgel größere Poren und einen anderen pH-Wert als das verwendete Trenngel. Am Übergang zum kleinporigeren Trenngel werden die Proteine durch den Siebeffekt der engen Poren verlangsamt und anschließend nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Dabei wandern die Proteine wesentlich langsamer als im Sammelgel um eine Bandenschärfung zu bewirken. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 2-6 zu entnehmen.

Tabelle 2-6: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Komponente	Sammelgel (4%)	Trenngel (7,5%)
A. dest	7,28 ml	6,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30:8)	3,75 ml	1,3 ml
Tris, pH 6,8	-	2,5 ml
Tris, pH 8,8	3,75 ml	-
10 % SDS	150 μ l	100 μ l
TEMED	7,5 μ l	7,5 μ l
10 % APS	75,0 μ l	75,0 μ l

Das Trenngel wurde zwischen zwei fettfreie Glasplatten, die durch 1,5 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt und mit Silikongummistreifen abgedichtet wurden, bis zu $\frac{3}{4}$ des Gesamtvolumens eingefüllt und zur Schaffung einer ebenen Oberfläche vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, so dass es unter Luftabschluss polymerisieren konnte. Nach Abschluss der Polymerisation - etwa 15 min - wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel einpipettiert. Anschließend wurde ein Kunststoffkamm zur Definition der Auftragsaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war (ca. 10 min), wurden Kamm und Dichtungsgummis vorsichtig entfernt. Danach erfolgte der Einbau des Gels in die Elektrophoresekammer, so dass es oben und unten in den 1x-Tankpuffer eintauchte. Die Proben wurden in 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen und mit 4x Laemmli versetzt. Um die Proteine zu denaturieren wurden sowohl die Proben als auch der verwendete Marker bei 95 °C für 5 min inkubiert. Danach wurden mit einer Mikroliterspritze je 20 µl Probe (entspricht 50 µg Protein) in die Geltaschen gefüllt. Als Größenstandard wurden 5 µl des *Prestained SDS Molecular weight marker* verwendet.

Beim Eintritt der Proben in das Sammelgel lag eine Spannung von 70 V an und wurde bei Erreichen des Trenngels auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese wurde bei diesen Bedingungen für 1,5 Stunden fortgesetzt bis die Bromphenolblau-Bande des Laemmli-Puffers aus dem Gel gelaufen war.

2.2.3.4 Western Blotting

Als Western Blotting bezeichnet man den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran. Es ist Voraussetzung dafür, dass eine spätere immunologische Detektion der Proteine erfolgen kann. Durch den Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran werden die Proteine immobilisiert und anschließend irreversibel fixiert. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde elektrophoretisch nach der Methode von Towbin im sogenannten „Nass-Blot“-Verfahren durchgeführt¹¹⁵. Die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran (Porengröße von 0,2 µm) wurden so geschnitten, dass sie der Größe des Gels entsprachen. Bevor der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut und in die Blot-Apparatur eingespannt werden konnte, wurde die Membran erst in Aqua dest. hydriert und dann in eiskaltem Towbin-Puffer mit 20 % Methanol äquilibriert. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte bei 370 mA für 2 Stunden in eisgekühltem, methanolhaltigen Towbinpuffer. Um zu überprüfen, ob der Transfer erfolgreich und gleichmäßig verlaufen ist, wurde die Membran nach dem Blotting für etwa 3 Minuten mit 0,2% Ponceau S gefärbt, was durch die enthaltene Essigsäure darüberhinaus zu einer

Fixierung der Proteine auf der Membran führt. Diese unspezifische und reversible Proteinfärbung mit Ponceau S wurde zu Dokumentationszwecken eingescannt.

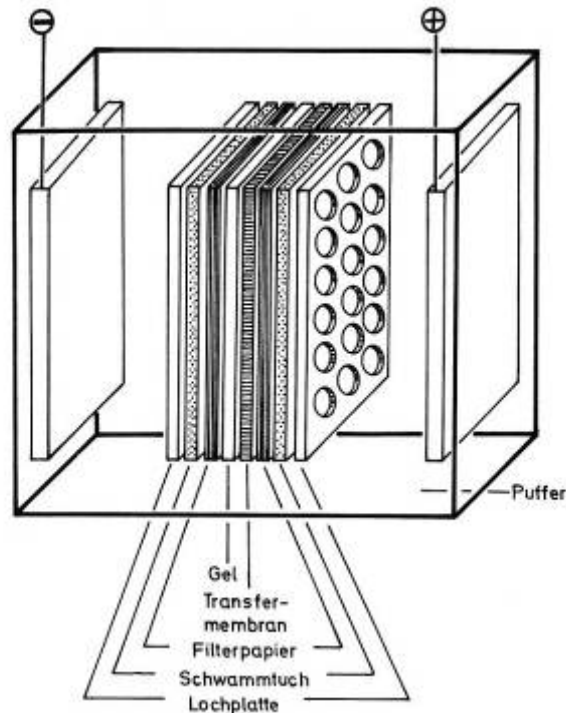


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau eines Sandwich-Blots nach Towbin¹¹⁵.

2.2.3.5 Immundetektion

Für den Nachweis von Proteinen im Gewebeschnitt oder auf der *Western Blot*-Membran macht man sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze, wobei jeweils das zu untersuchende Protein das Antigen darstellt. Hier wurde das indirekte Verfahren eingesetzt, bei dem der gegen das Antigen gerichtete „primäre“ Antikörper mittels eines zweiten, markierten Antikörper nachgewiesen wurde. Dieser „sekundäre“ Antikörper war hier mit der Meerrettichperoxidase (HPR) gekoppelt, welche bei Zugabe von ECL⁺-Substratlösung (enhanced chemiluminescence), dieses chemisch umsetzt. Die dabei durch Oxidation von Luminol entstehende Chemilumineszenz wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

Im Einzelnen wurde die mit Protein beladene Nitrozellulosemembran in einem Blockierungspuffer (I oder II) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dieser Schritt wurde bei 4 °C für mindestens 1 Stunde oder über Nacht durchgeführt. Danach folgte zweimaliges Waschen mit 1x TBST und die Zugabe des primären Antikörpers. Der Antikörper wurde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur für eine Stunde auf der Nitrozellulosemembran belassen, anschließend entfernt und die Membran mehrfach mit 1x TBST gewaschen, um dann nochmals für etwa eineinhalb Stunden mit dem oben genannten

Puffer blockiert zu werden. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper nach einem kurzen Waschvorgang mit TBST (um den restlichen Blockierungspuffer zu entfernen) auf die Membran aufgetragen und anschließend bei Raumtemperatur für zirka eine Stunde inkubiert. Nach Entfernung des Antikörpers und mehrmaligem Waschen der Membran konnte nun das ECL⁺-Reagenz aufgetragen werden. Die Nitrozellulosemembran wurde für fünf Minuten im Dunkeln mit der Lösung inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert.

Es ist möglich die Membran mehrmals zu verwenden. Dies wird durch den Einsatz des Stripping-Puffers gewährleistet, durch den die Antikörper von der Membran gelöst werden. Hierbei wurde die Nitrozellulosemembran für 30 Minuten bei 52 °C mit dem Stripping-Puffer rotierend in einem Glasrohr inkubiert und anschließend mehrfach mit 1x TBST gewaschen (bis das β -Mercaptoethanol des Strippingpuffers olfaktorisch nicht mehr wahrgenommen werden konnte). Danach stand der Blot für weitere Anfärbungen zur Verfügung.

Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind in nachfolgender Tabelle 2-7 dargestellt.

Tabelle 2-7: Antikörper

<i>Primärantikörper</i>	Konzentration (in 5% BSA-TBST)
AMF (anti-MRP5)	1:1000
SNG (anti-MRP4)	1:1000
<i>Sekundärantikörper</i>	Konzentration (in 5% BSA-TBST)
Goat anti-rabbit-IgG HPR-konjugiert	1:2000

2.2.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein Primärantikörper an die zelluläre Zielstruktur und durch Zugabe eines zweiten Anti-Immunglobulin-Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, wird dieser Komplex dann sichtbar gemacht. Dies geschieht, indem das Fluorochrom mittels eines monochromatischen Lasers angeregt und das dabei emittierte Licht durch das Okular oder eine CCD Kamera detektiert wird. Dadurch ist eine Darstellung der Zelle und subzelluläre Lokalisation z.B. von Membranproteinen möglich. Um bei diesen Färbungen auch Transporter-negative Zellen zu erfassen, wurde neben der spezifischen Antikörperfärbung zusätzlich eine unspezifische Kerngegenfärbung mit dem interkalierenden *TOTO*[®]-3 Iodid (im *DAKO*[®]-Eindeckelmedium) durchgeführt.

Durch die adhärenen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien konnten die Zellen auf den Objektträgern ausgesät und kultiviert werden. Die Zellen wurden bei Erreichen einer fast vollständigen Konfluenz mit 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert. Nach zwei fünfminütigen Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mittels 2 ml/well 0,1 % Triton X 100 bei Raumtemperatur permeabilisiert, um den ungehinderten Zugang des

primären Antikörpers zum intrazellulären Antigen zu ermöglichen. Um nachfolgend alle unspezifischen Bindungsstellen der Zellen zu blockieren, wurde nachdem mittels PBS die Triton X-100-Reste gewaschen worden waren, eine Blockierlösung bestehend aus 5 % FCS in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit je 50 µl primärer Antikörperlösung benetzt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um den gebundenen Primär-Antikörper zu detektieren wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärintikörper auf die Zellen pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und darauf folgender Lufttrocknung für einige Minuten im Dunkeln, konnten die Zellen nun mit DAKO[®] Fluorescent Mounting Medium, dem der Kernfarbstoff TOTO[®]-3 Iodid in der Verdünnung 1:2000 zugesetzt war, eingedeckelt werden. Die getrockneten Präparate konnten dann an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen zeigt die nachfolgende Tabelle 2-8.

Tabelle 2-8: Antikörper

<i>Primärintikörper</i>	Konzentration (in 5% FCS-PBS)
AMF (anti-MRP5)	1:250 und 1:500
SNG (anti-MRP4)	1:250 und 1:500
<i>Sekundärintikörper</i>	Konzentration (in 5% FCS-PBS)
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG	1:200

2.2.4 Alamar-Blue-Assay

Das Prinzip des Assay beruht darauf, dass die Vitalität einer Zelle indirekt durch die Bestimmung der mitochondrialen metabolischen Aktivität gemessen werden kann. Es wird dabei die katalytische Wirkung NADPH/NADH-abhängiger Dehydrogenasen in den Zellen detektiert, deren Konzentration proportional zur Zellproliferation und Viabilität der Zellen ist. In proliferierenden Zellen ist das Verhältnis von NADPH/NADP und NADH/NAD in Richtung NADP bzw. NAD verschoben. *Alamar Blue* ist ein blauer, wasserlöslicher, ungiftiger Farbstoff, der von den stoffwechselaktiven Zellen bis zu seinem roten Endpunkt reduziert werden kann¹¹⁶. Die Farbe schlägt dabei von blau über violett nach rosa um. Im Vergleich zu anderen zytotoxischen Zellmethoden wie dem Kristallviolett-Assay, können auch nach der Behandlung die Zellen weiter beobachtet werden, da das Reagenz selbst keine toxische Wirkung auf die Zellen besitzt. Dies stellt, neben der Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit, einen weiteren wesentlichen Vorteil dieser Methode dar.

Zur Untersuchung der Zellviabilität unter Zytostatikagabe wurden für Capan-1 50.000 Zellen (für die 48 Stunden Messung) und 25.000 Zellen (für die 72 bzw. 96 Stunden Messung) in je eine Kavität einer 96-Well-Platte ausgesät. Für Capan-2-Zellen wurden für die Messungen für jeden Zeitpunkt etwa 100.000 Zellen pro Well ausgesät. Zu den drei Zeitpunkten (48, 72, 96 h) wurden dann 10% Alamar Blue zu den Zellen pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Mikrotiterplatten durch duale Wellenlängenmessung der Absorption bei 560 und 595 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Victor² 1420 Multilabel Counter) vermessen.

2.2.5 Kristallviolett-Assay

Diese Methode beruht auf dem Anfärben vitaler adhärenter Zellen mit Kristallviolett nach Fixierung¹¹⁷. Gentianaviolett (Kristallviolett) ist ein kationischer Farbstoff, der an fixierte, negativ geladene Makromoleküle elektrostatisch bindet. Die Zellkerne werden durch das Kristallviolett tief blau-violett, das Zytoplasma nur schwach blau angefärbt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet um das Wachstumsverhalten der Zellen mit und ohne Substanzgabe (z. B. Zytostatika) über einen definierten (48, 72, 96 Stunden) Zeitraum zu untersuchen. Die Zellen wurden hierbei in 96-Well-Platten ausgesät. Die verwendeten Zellzahlkonzentrationen werden in der nachfolgenden

Tabelle 2-9 dargestellt. Nach 48, 72 und 96 Stunden wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der adhärenen noch vitalen Zellen wurden dann je 100 µl 4 prozentiges Formaldehyd zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Platten konnten nun wahlweise bei 4 °C in 1x PBS gelagert oder gleich angefärbt werden. Dazu wurde nach Entfernung der Fixierlösung pro Well je 100 µl der vorgefertigten Kristallviolett-Arbeitslösung zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die Lösung wurde abgegossen und über mehrere Waschkvorgänge mit Aqua dest. vollständig entfernt. Nach dem letzten Waschkritt wurden die Platten mit Zellstoff getrocknet und die Zellen durch Zugabe von 75 µl 1 % SDS pro Well 20 Minuten auf einen Plattenschüttler bei 900 rpm lysiert. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen in den Wells entstanden, da sonst bei der nachfolgenden photometrischen Auswertung Streulichteffekte die Messung verfälscht hätten. Die anschließende Messung der Absorption bei 560 nm erfolgte mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Victor² 1420 Multilabel Counter).

Tabelle 2-9: Konzentrationen der Zellzahlen von Capan-1- und Capan-2 für den Kristallviolett-Assay.

Zeitpunkt	Zellzahl pro Well
48 h	10 000
72 h	5 000
96 h	5 000

2.2.6 *In-vitro* Zytotoxizitätsassay

Zur Untersuchung der Sensitivität der verwendeten Zelllinien (siehe 2.2.1.1) gegenüber verschiedenen zytotoxisch wirksamen Substanzen (Zytostatika) wurde ein Zytotoxizitätsassay angewendet. Die Zellen wurden hierbei in verschiedenen Konzentrationen (siehe 2.2.4 und 2.2.5) als Zellsuspension im Kulturmedium in sterilen 96-Well-Platten ausgesät, ohne dabei die äußeren Wells der Platte zu belegen. Auf den bestückten inneren 60 Wells konnten die Zellen über 24 Stunden anwachsen. Abbildung 2-3 zeigt die verschiedenen Schemata zur Plattenbelegung für den Alamar Blue-Assay und den Kristallviolett-Assay. Nach der am folgenden Tag erfolgten Substanzzugabe inklusive Mediumwechsel wurde das Kulturmedium mit der jeweiligen Substanz (aus Tabelle 2-10 zu entnehmen) während der gesamten Versuchsdauer nicht mehr ausgetauscht, um eventuelle pH- Schwankungen und Temperaturunterschiede als Störfaktoren zu minimieren.

Tabelle 2-10: Stammkonzentration und Lösungsmittel der verwendeten Zytostatika

Zytostatikum	Stammkonzentration	Lösungsmittel
6-Mercaptopurin	100 mM	0,1 N NaOH
6-Thioguanin	100 mM	0,1 N NaOH
5-Fluoruracil	500 mM	DMSO
Gemcitabin	10 mM	0,9 % NaCl
Methotrexat	10 mM	0,1 N NaOH

Die Zellversuche mit den entsprechenden Konzentrationsreihen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurde außerdem eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierbei wurden die Zellen nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel z.B. DMSO oder NaOH versetzt. Die anschließende Auswertung sowie die weitere Behandlung der Zellen erfolgte entweder nach der Alamar Blue Methode (siehe 2.2.4) oder dem Kristallviolettassay (siehe 2.2.5).

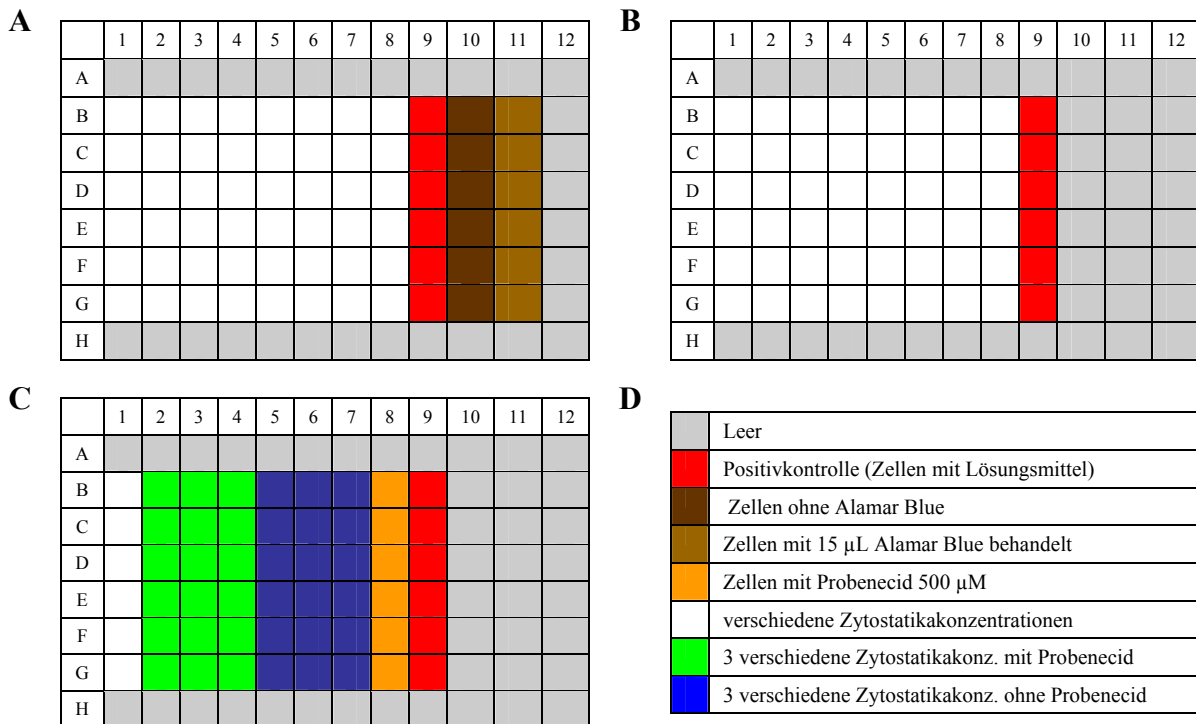


Abbildung 2-3: Schemazeichnung über Plattenbelegung bei Zytotoxizitätsassays.

[A] Zytostatikum allein nach der Alamar Blue Methode, [B] Zytostatikum allein mit der Kristallviolett Methode, [C] Zytostatikum in Kombination mit Probenecid mit der Kristallviolett Methode, [D] Legende.

2.2.7 Mathematische und statistische Methoden

Die Signifikanzanalyse wurde mit dem T-Test nach Student (Signifikanzkriterium $p < 0,05$) durchgeführt. Für die statistischen als auch für die mathematischen Auswertungen wurde das Programm *Microsoft[®] Excel* verwendet.

Für die Berechnungen der IC_{50} -Werte der Zytotoxizitätsversuche sowie für deren folgende graphische Darstellung kam das Programm *GraphPad Prism* Version 3 der Firma *GraphPad* (San Diego, CA, USA) zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von MRP4/MRP5 auf mRNA-Ebene

An den vier Krebszelllinien, die uns von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Lerch der Universitätsklinik Greifswald (Klinik für Innere Medizin A) zur Verfügung gestellt wurden, wurde zunächst mittels *Real-Time* PCR die jeweilige mRNA-Expression der beiden MRPs bestimmt und auf die 18S rRNA Expression normalisiert. Es zeigten sich dabei große Unterschiede, in Abbildung 3-1 sind die Ergebnisse für die jeweilige Zelllinie dargestellt. Dabei zeigen die PaTu 8902-Zellen sowohl die höchste MRP4 als auch MRP5 Expression, wobei MRP5 insgesamt stärker exprimiert ist als MRP4. Weiterhin weisen die Capan-1-Zellen die geringste MRP4 Expression auf.

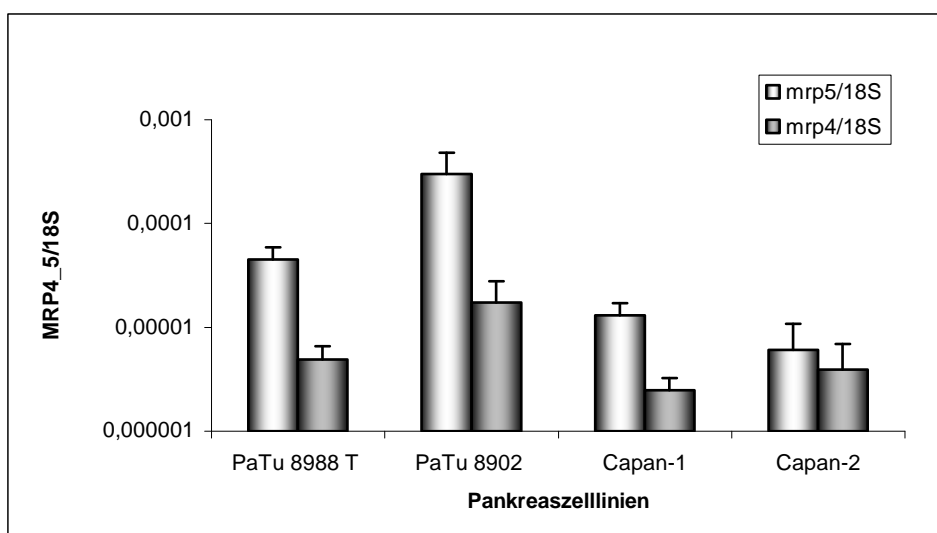


Abbildung 3-1: Darstellung der normalisierten MRP4/5 mRNA Expression in ausgewählten Pankreaskrebszelllinien.

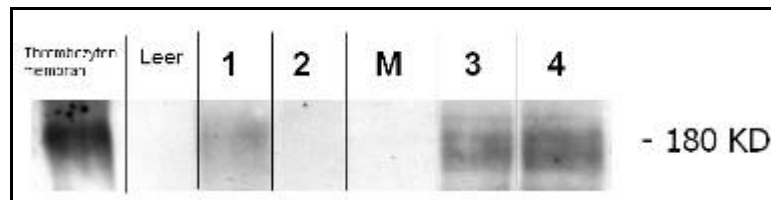
Ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan[®]-Prinzip. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für n=3. Die Werte sind zur besseren Ansicht logarithmiert dargestellt.

3.2 Untersuchungen zur Proteinexpression von MRP4/MRP5

Der Proteinnachweis von MRP4 und MRP5 wurde mittels Western Blot geführt. Um die Transportproteine detektieren zu können wurden die polyklonalen Antiseren SNG (anti-MRP4) und AMF (anti-MRP5) verwendet. Als Positivkontrolle für MRP4 wurde eine Thrombozytenmembranpräparation verwendet, für die eine starke MRP4-Expression bereits beschrieben wurde⁹⁹. Für MRP5 wurden MRP5-transfizierte V 79 Hamsterfibroblasten verwendet⁸³. Das erwartete Molekulargewicht liegt für die glykosylierte Form beider Proteine bei 180/190 kDa.

Bei MRP4 zeigte sich im Western Blot eine entsprechende Bande für PaTu 8902, PaTu 8988 T und Capan-2-Zellen, während in den Capan-1-Zellen keine oder nur sehr geringe Mengen an MRP4 gefunden werden konnten (Abbildung 3-2 A). MRP5 konnte nur in den Zelllinien Capan-1, PaTu 8902 und PaTu 8988 T nachgewiesen werden (Abbildung 3-2 B). Die Capan-2-Zellen zeigten hingegen keine entsprechende Bande.

A MRP4



B MRP5

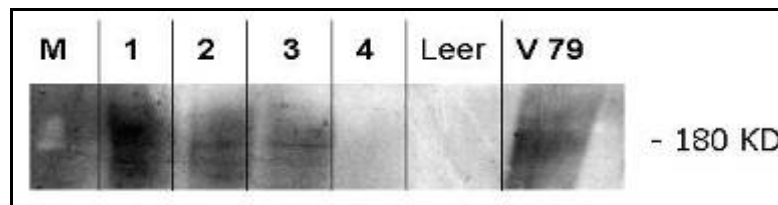


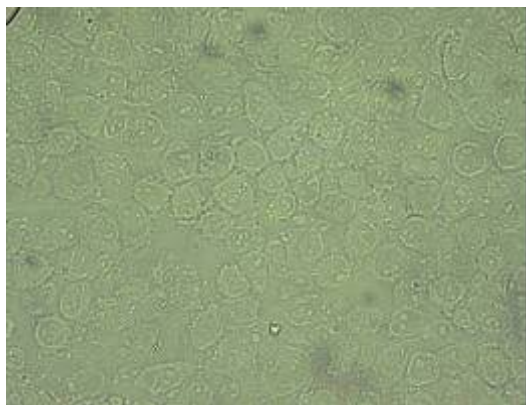
Abbildung 3-2: MRP4- und MRP5-Proteinexpression.

[A] Darstellung der MRP4-Proteinexpression. Positivkontrolle ist eine Thrombozytenmembranpräparation. Zum Nachweis von MRP4 sind jeweils 50 µg der Membranproteinfraction der Pankreaskrebszellen in Bahn 1, 2, 3 und 4 aufgetragen. [1] Capan-2; [2] Capan-1; [3] PaTu 8988 T; [4] PaTu 8902; [M] Prestained Marker. [B] Darstellung der MRP 5-Proteinexpression. Bahn 1 zeigt den mitgeführten Prestained Marker [M]. Zum Nachweis von MRP5 sind jeweils 50 µg der Membranproteinfraction der Pankreaskrebszellen in 1-4 aufgetragen. [1] PaTu 8902; [2] PaTu 8988 T; [3] Capan-1; [4] Capan-2. Als Positivkontrolle sind V 79 transfizierte MRP 5 Zellen verwendet worden.

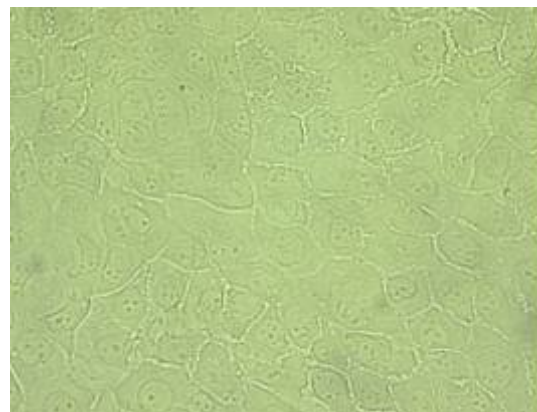
3.3 Lokalisation der Transportproteine MRP4/MRP5

Primär wurden die beiden Capan- sowie die beiden Patu-Zelllinien unter dem Mikroskop ohne jegliche Anfärbung fotografiert. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-3 dargestellt.

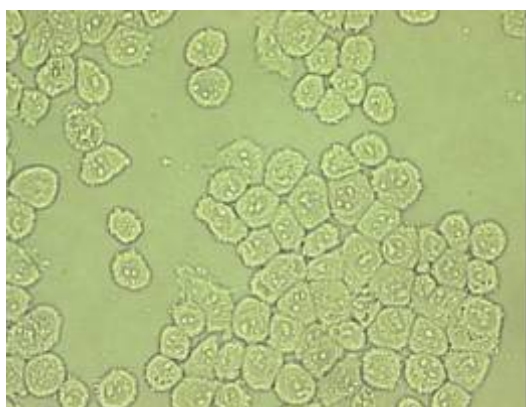
A Capan-1



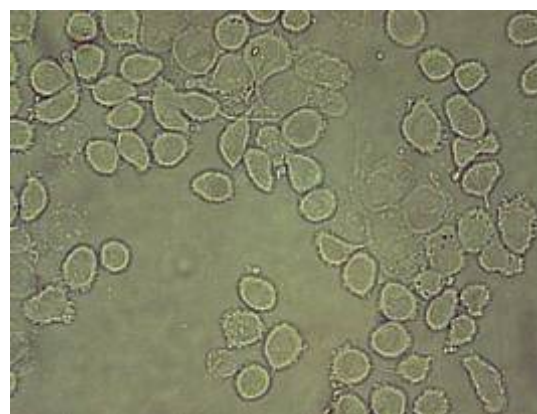
B Capan-2



C PaTu 8902



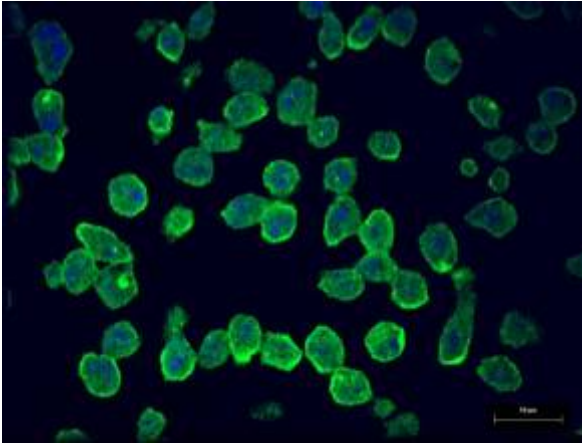
D PaTu 8988 T

**Abbildung 3-3:** Durchlichtmikroskopie der Zellen.

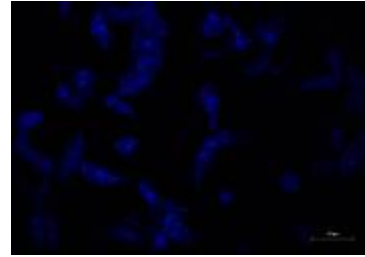
[A] Capan-1 (10. Passage, 400x) nach 3 Tagen, [B] Capan-2 (8. Passage, 400x) nach 5 Tagen, [C] PaTu 8902 (7. Passage, 400x) nach 3 Tagen und [D] PaTu 8988 T (8. Passage, 400x) nach 4 Tagen unter Standardkulturbedingungen in einer Zellkulturflasche.

Die MRP4/MRP5 Lokalisation wurde anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Als primäre Antikörper dienten für MRP4 SNG und für MRP5 AMF-Seren, als Negativkontrollen die jeweiligen Präimmunsere. Der interkalierende Kernfarbstoff TOTO[®]-3-iodid wurde zur Anfärbung der Zellkerne verwendet. Die entsprechenden Färbungen der Pankreaskrebszellen sind in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 dargestellt.

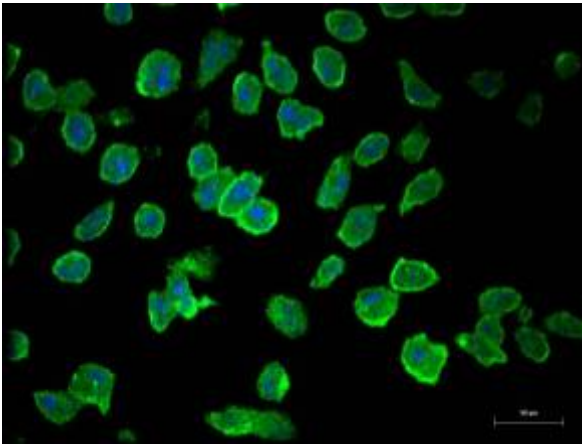
A PaTu 8902



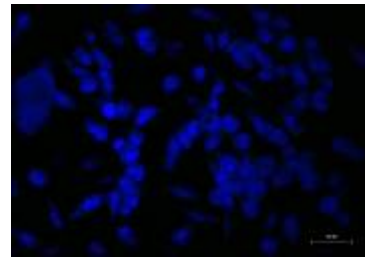
a



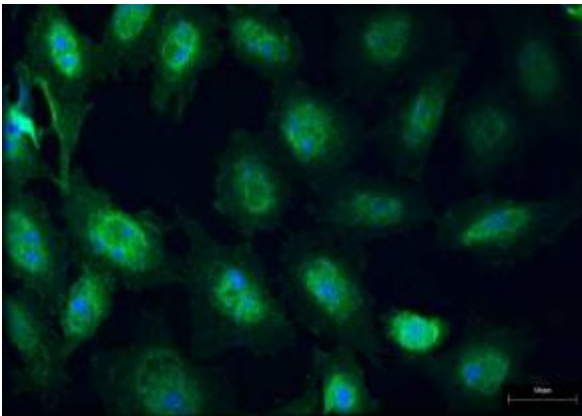
B PaTu 8988 T



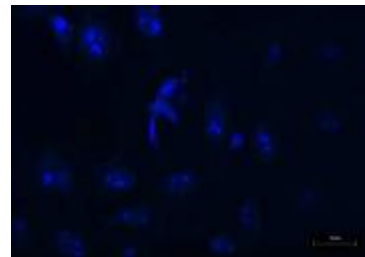
b



C Capan-1



c



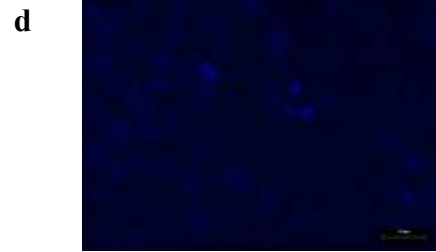
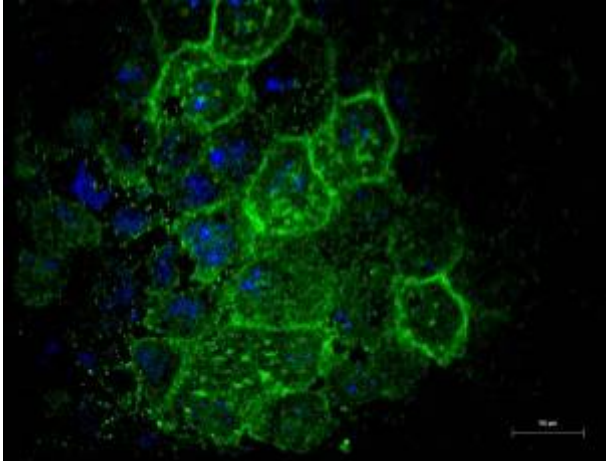
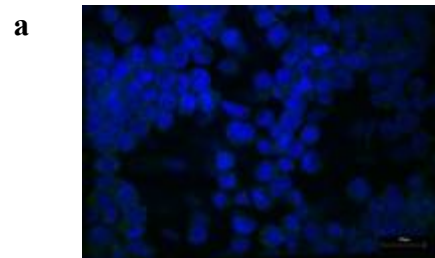
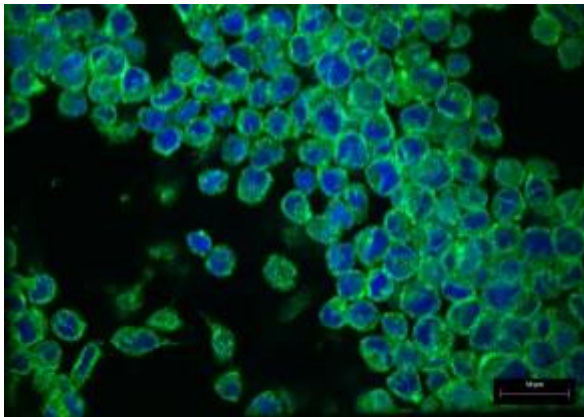
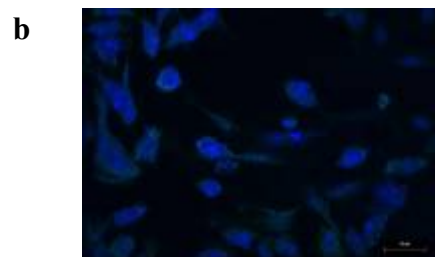
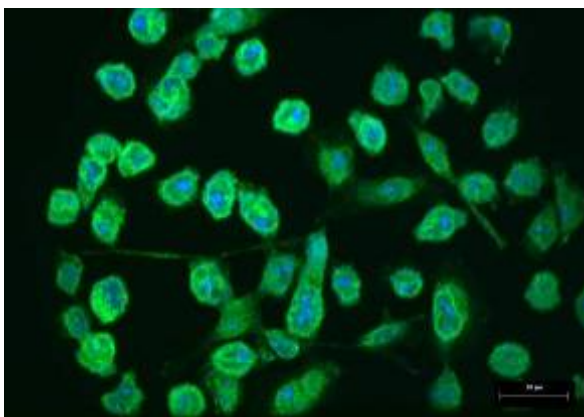
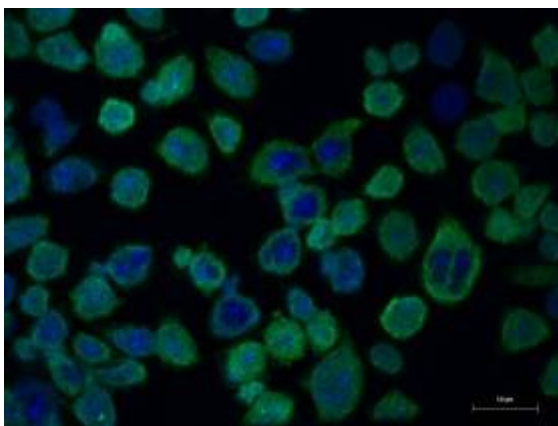
D Capan-2

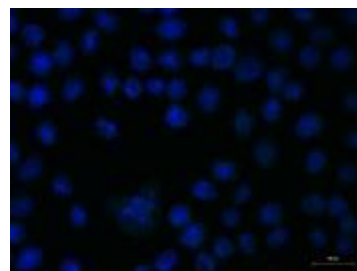
Abbildung 3-4: Immunhistologischer Nachweis von MRP4. MRP4 (grüne Fluoreszenz) in Pankreaskrebszellen in 400-facher Vergrößerung. Für diese Darstellung wurden die meisten Antiseren 1:250 verdünnt: [A] PaTu 8902 SNG, [a] PaTu 8902 Präimmunserum von SNG [B] PaTu 8988 T SNG, [b] PaTu 8988 T Präimmunserum von SNG, [C] Capan-1 SNG 1:500 verdünnt, [c] Capan-1 Präimmunserum von SNG, [D] Capan-2 SNG, [d] Capan-2 Präimmunserum von SNG. Die Zellkerne wurden mit TOTO[®]-3-iodid (1:2000; blau) angefärbt.

A PaTu 8902**B PaTu 8988 T**

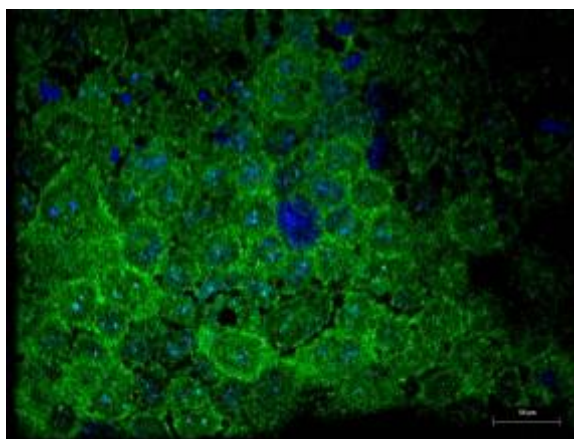
C Capan-1



c



D Capan-2



d



Abbildung 3-5: Immunhistologischer Nachweis von MRP5.

MRP5 (grüne Fluoreszenz) in Pankreaskrebszellen in 400-facher Vergrößerung. Für diese Darstellung wurden die meisten Antiseren 1:250 verdünnt: [A] PaTu 8902 AMF, [a] PaTu 8902 Präimmunserum von AMF [B] PaTu 8988 T AMF 1.500 verdünnt, [b] PaTu 8988 T Präimmunserum von AMF, [C] Capan-1 AMF, [c] Capan-1 Präimmunserum von AMF, [D] Capan-2 AMF, [d] Capan-2 Präimmunserum von AMF. Die Zellkerne wurden mit TOTO®-3-iodid (1:2000; blau) angefärbt.

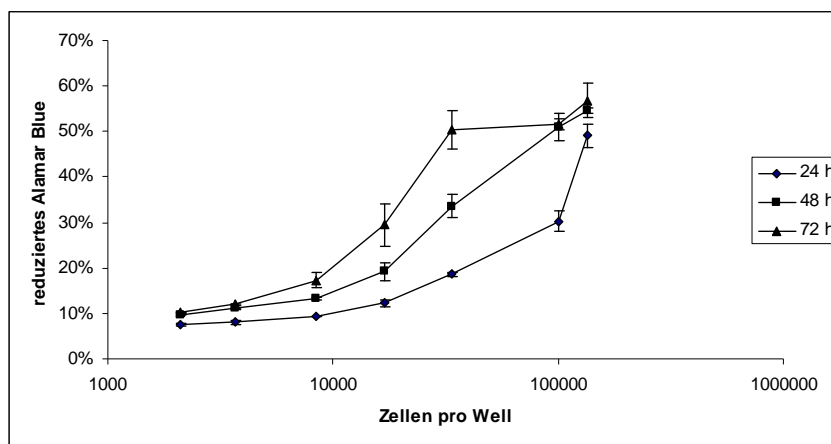
In Abbildung 3-4 lässt sich für die Zelllinien PaTu 8902, PaTu 8988 T genauso wie in Abbildung 3-5 für Capan-2 eine verstärkte grüne Fluoreszenz im Bereich der Membranen erkennen. Die Capan-1-Zellen zeigen hingegen eine diffuse Färbung der ganzen Zelle für MRP4. MRP5 ist in allen Pankreaskrebszelllinien, wie in Abbildung 3-5 zu sehen, in den Zellmembranen zu finden. Die negativen Kontrollen zeigten bei allen vier Zelllinien bei gleicher Antikörperverdünnung kein Immunfluoreszenzsignal.

3.4 Untersuchungen zur Zellviabilität bzw. Zytotoxizität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Zytostatika mit Hilfe des Alamar Blue-Assays

3.4.1 Optimale Zellzahlbestimmung

Um einen Zytotoxizitätsassay durchführen zu können ist es von großer Bedeutung, dass man die Zelldichte kennt, bei der sich der größte Teil der Zellen in der proliferierenden Phase befindet. Um diese optimale Zellzahl/Zelldichte zu ermitteln, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 bzw. 96 Stunden kultiviert und deren Wachstum anschließend mittels *Alamar Blue*-Assay ausgewertet.

A Capan-1



B Capan-2

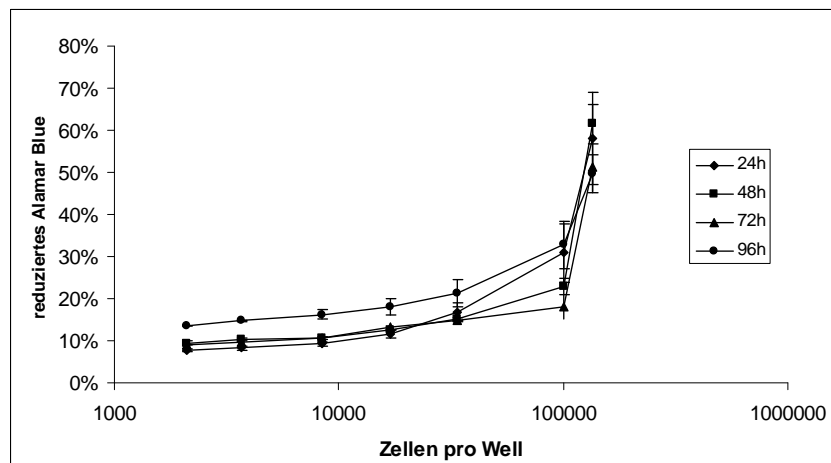


Abbildung 3-6: Viabilität der Capan-1- und Capan-2-Zellen.

[A] Darstellung der Viabilität von Capan-1-Zellen nach 24, 48 und 72 h, ermittelt durch den Alamar Blue-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen in Dreifachbestimmung. [B] Darstellung der Viabilität von Capan-2-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h, ermittelt durch den Alamar Blue-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen in Dreifachbestimmung.

Bei der Auswahl der optimalen Zellzahl war darauf zu achten, dass ein Zeitpunkt gewählt wurde, zu dem sich die Tumorzellen am Anfang der linearen Wachstumsphase befanden.

Außerdem sollte unter den gewählten Bedingungen ein großer Teil des *Alamar Blue* bereits reduziert werden, um valide Ergebnisse zu erhalten. Tabelle 3-1 stellt die aus Abbildung 3-6 abgeleiteten optimalen Zellzahlen dar.

Tabelle 3-1: Konzentrationen der optimalen Zellzahlen für den Alamar Blue-Assay.

Zelllinie	Zeitpunkt	Zellzahl pro Well
<i>Capan-1</i>	48 h	50 000
	72 h	25 000
	96 h	25 000
<i>Capan-2</i>	24/48/72/96 h	100 000

3.4.2 Einfluss ausgewählter Zytostatika

Nucleosidanaloga sind Substrate von MRP4 und 5, daher sollte hier untersucht werden, bei welcher Konzentration eines Zytostatikums der halbmaximale zytotoxische Effekt der jeweiligen Substanz (IC_{50} -Werte) erreicht wird. Die Ergebnisse sollten dann in Bezug zur Transporterexpression gesetzt werden. Wie aus Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 exemplarisch zu erkennen ist, konnten hier nur für die zwei Purinanaloga an Capan-1-Zellen entsprechende Werte ermittelt werden. An Capan-2-Zellen gelang dies nicht. In Abbildung 3-8 wurden nochmals Versuche an Capan-1-Zellen mit anderen Zellzahlen (24 h 15.000, 48 h 8.500 und 72 h 4.500 Zellen) durchgeführt.

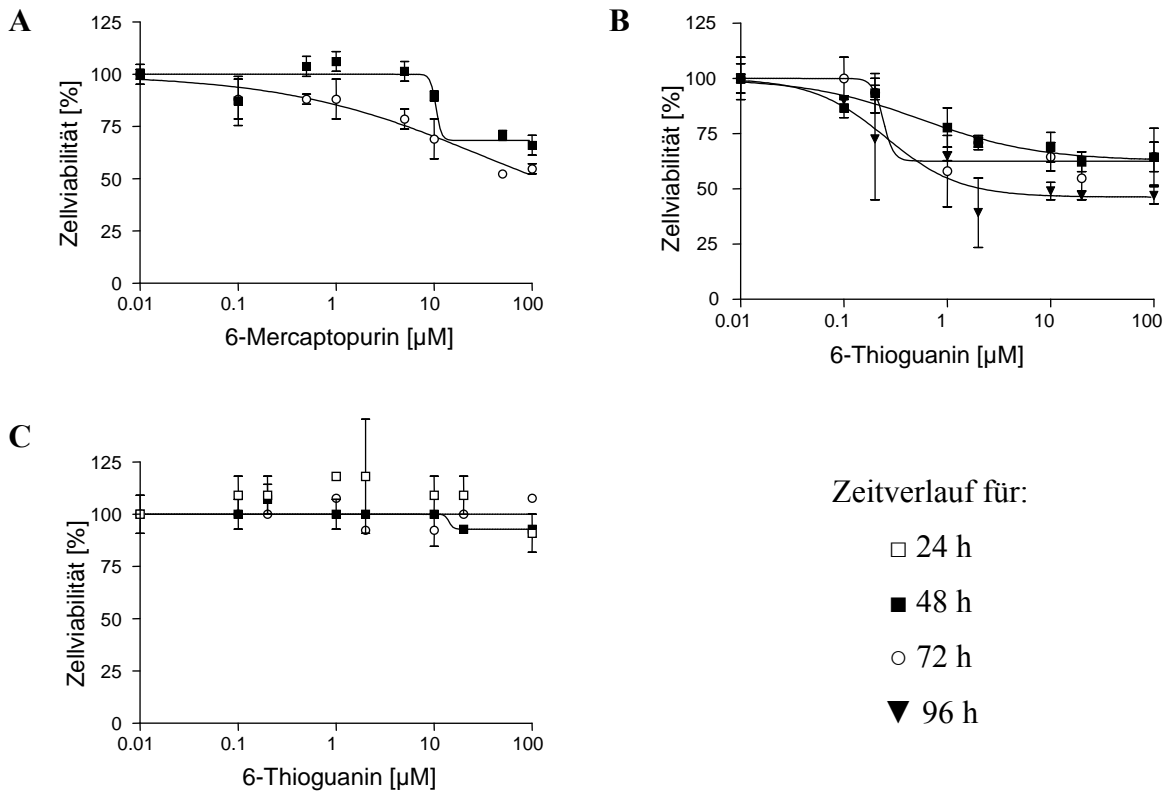


Abbildung 3-7: Zytotoxizitätstests an Capan-Zellen.

Darstellung des Verhaltens von Capan-1- und Capan-2-Zellen behandelt mit verschiedenen Zytostatika über einen Zeitraum von 24, 48, 72 und 96 h, ermittelt durch den Alamar Blue-Assay. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für $n=3$. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [A] Capan-1 behandelt mit 6-Mercaptopurin, [B] Capan-1 behandelt mit 6-Thioguanin, [C] Capan-2 behandelt mit 6-Thioguanin. Zeitverlauf für □ 24 h, ■ 48 h, ○ 72 h, ▼ 96 h.

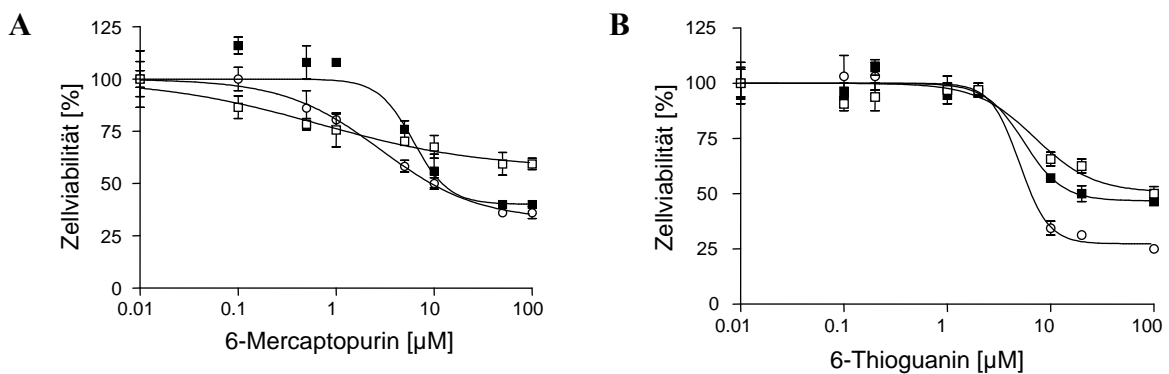


Abbildung 3-8: Zytotoxizitätstests an Capan-1-Zellen.

Darstellung des Verhaltens von Capan-1-Zellen mit verschiedenen Zytostatika behandelt über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h, ermittelt durch den Alamar Blue-Assay. Zellzahlen für 24 h 15.000, 48 h 8.500 und 72 h 4.500 Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für $n=3$. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [A] behandelt mit 6-Mercaptopurin, [B] behandelt mit 6-Thioguanin. Zeitverlauf für □ 24 h, ■ 48 h, ○ 72 h.

Aus den gewonnenen Daten konnten die IC_{50} -Konzentrationen der entsprechenden Zytostatika berechnet werden. Die nachfolgenden Tabelle 3-2 und Tabelle 3-3 zeigen die Ergebnisse für Abbildung 3-7, Tabelle 3-4 zeigt die aus Abbildung 3-8 ermittelten Werte.

Tabelle 3-2: IC_{50} -Werte für Capan-1-Zellen.
Dargestellt sind die Werte für 48, 72 und 96 h.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	10,5 μ M	30,4 μ M	nicht bestimmt
6-Thioguanin	0,57 μ M	0,24 μ M	0,26 μ M

Tabelle 3-3: IC_{50} -Werte für Capan-2-Zellen.
Dargestellt sind die Werte für 24 und 48 h. * entsprechende Werte konnten nicht bestimmt werden.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	24	48	72
6-Thioguanin	*	14 μ M	*

Tabelle 3-4: IC_{50} -Werte für Capan-1 aus Abbildung 3-8.
Dargestellt sind die Werte für 48, 72 und 96 h.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	24	48	72
6-Mercaptopurin	0,67 μ M	2,8 μ M	6,2 μ M
6-Thioguanin	7,1 μ M	5,5 μ M	5 μ M

Im Folgenden sind die jeweiligen Restzellviabilitäten nach Zytostatikabehandlung zur besseren Übersicht nochmals dargestellt.

Tabelle 3-5: Restzellviabilität für Capan-1- und Capan-2-Zellen nach Zytostatikabehandlung für die Werte aus Abbildung 3-7.

* entsprechende Werte konnten nicht bestimmt werden.

Capan-1:

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	68 %	24 %	*
6-Thioguanin	63 %	63 %	46 %

Capan-2:

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	24	48	72
6-Thioguanin	63 %	63 %	46 %

Tabelle 3-6: Restzellviabilität für Capan-1 nach Zytostatikabehandlung für die Werte aus Abbildung 3-8.

* entsprechende Werte konnten mit dem Programm nicht bestimmt werden.

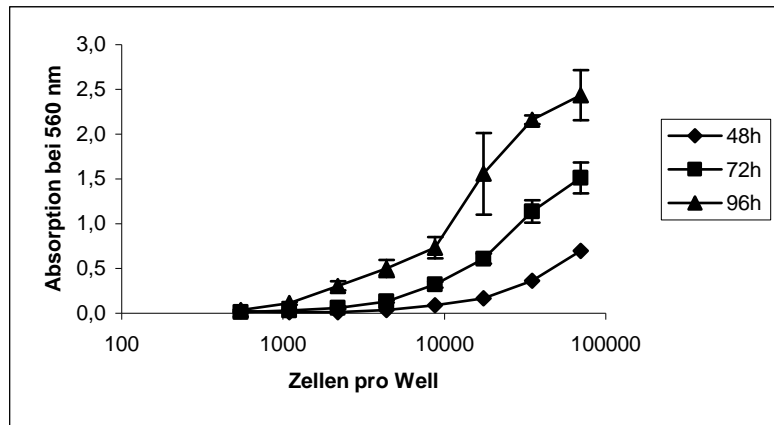
Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	24	48	72
6-Mercaptopurin	57 %	32 %	40 %
6-Thioguanin	50 %	47 %	27 %

3.5 Untersuchungen zur Zellviabilität bzw. Zytotoxizität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluß von Zytostatika mit Hilfe des Kristallviolett-Assays

3.5.1 Optimale Zellzahlbestimmung

Wie beim *Alamar Blue*-Assay ist es auch bei diesem Verfahren notwendig zunächst die optimale Zellzahl zu bestimmen. Das Wachstumsverhalten von Capan-1-Zellen ist aus Abbildung 3-9 A und das von Capan-2-Zellen aus Abbildung 3-9 B zu entnehmen.

A Capan-1



B Capan-2

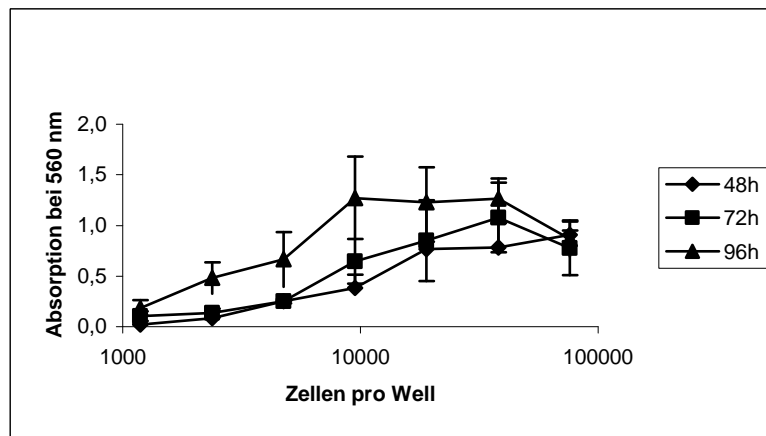


Abbildung 3-9: Wachstumsverhalten der Capan-Zellen.

[A] Wachstumsverhalten von Capan-1-Zellen und [B] für Capan-2-Zellen nach 48, 72 und 96 h, ermittelt durch den Kristallviolett-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen für n=3.

Aus den beiden Graphen für Capan-1 (Abbildung 3-9 A) und Capan-2 (Abbildung 3-9 B) wurden die optimalen Zellzahlen/Zelldichten visuell bestimmt. Die Tabelle 3-7 stellt die Zellzahlen dar.

Tabelle 3-7: Optimalen Zellzahlen für den Kristallviolett-Assay.

Zelllinie	Zeitpunkt	Zellzahl pro Well
<i>Capan-1 und Capan-2</i>	48 h	10.000
	72 h	5.000
	96 h	5.000

3.5.2 Einfluss von Purin und Pyrimidinanalog auf die Zellen

Hier sollte wie beim *Alamar Blue* Assay untersucht werden, bei welcher Konzentration eines Zytostatikums der halbmaximale zytotoxische Effekt der jeweiligen Substanz (IC_{50} -Werte)

erreicht wird. Die untersuchten Pankreaskrebszelllinien wurden für 24, 48 und 96 Stunden mit verschiedenen Zytostatikakonzentrationen behandelt. Sowohl für Capan-1 als auch für Capan-2 ergaben sich erhebliche Unterschiede in den jeweiligen IC_{50} -Werten (Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).

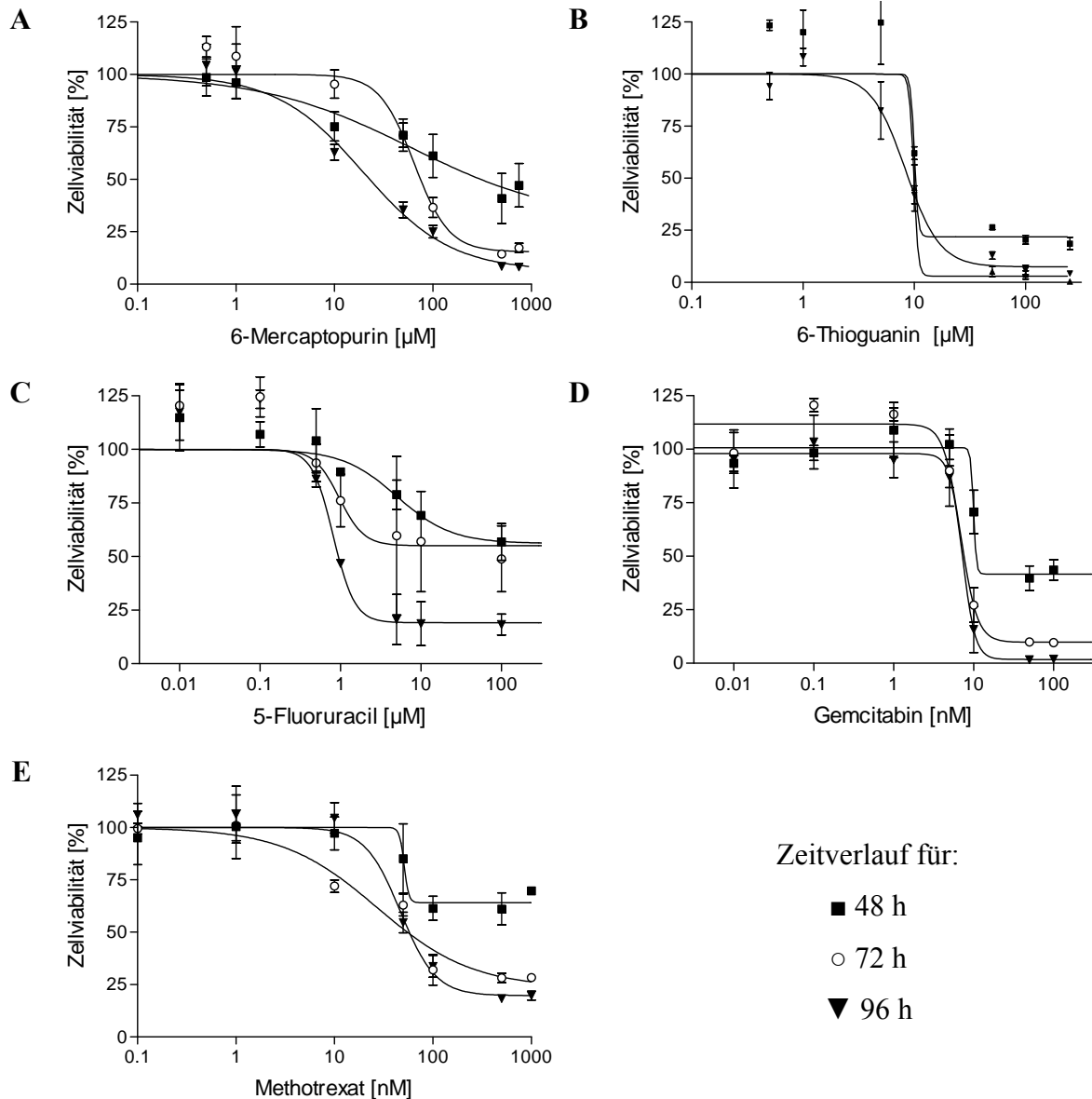


Abbildung 3-10: Zytotoxizitätstests der Capan-1-Zellen.

Darstellung des Verhaltens von Capan-1-Zellen behandelt mit verschiedenen Zytostatika über einen Zeitraum von 48, 72 und 96 h, ermittelt durch den Kristallviolett-Assay. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für $n=3$. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [A] behandelt mit 6-Mercaptopurin, [B] behandelt mit 6-Thioguanin, [C] behandelt mit 5-Fluoruracil, [D] behandelt mit Gemcitabin, [E] behandelt mit Methotrexat. Zeitverlauf für ■ 48 h, ○ 72 h, ▼ 96 h.

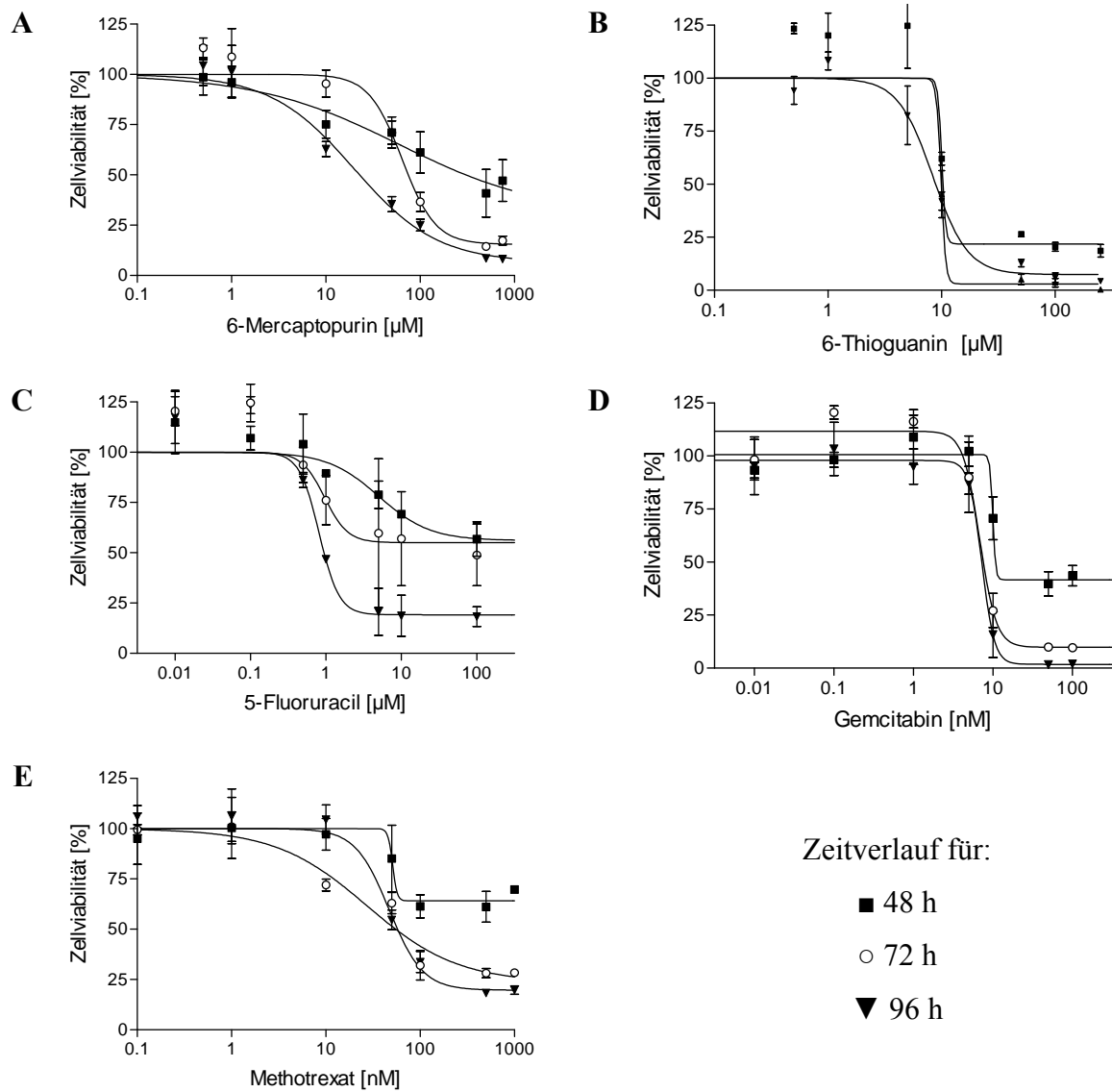


Abbildung 3-11: Zytotoxizitätstests der Capan-2-Zellen.

Darstellung des Verhaltens von Capan-2-Zellen behandelt mit verschiedenen Zytostatika über einen Zeitraum von 48, 72 und 96 h, ermittelt durch den Kristallviolett-Assay. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für $n=3$. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [A] behandelt mit 6-Mercaptopurin, [B] behandelt mit 6-Thioguanin, [C] behandelt mit 5-Fluoruracil, [D] behandelt mit Gemcitabin, [E] behandelt mit Methotrexat. Zeitverlauf für ■ 48 h, ○ 72 h, ▼ 96 h.

Aus den gewonnenen Daten aus Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11 konnten die IC_{50} -Werte für die entsprechenden Zytostatika der Zelllinien berechnet werden. Die nachfolgende

Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9 zeigen die ermittelten Werte für die beiden Zelllinien.

Tabelle 3-8: IC₅₀-Werte für Capan-1.
Dargestellt sind die Werte für 48, 72 und 96 h.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	60 µM	64 µM	20 µM
6-Thioguanin	10 µM	8,4 µM	9,9 µM
5-Fluoruracil	5 µM	1 µM	0,8 µM
Gemcitabin	10 nM	6,8 nM	7,3 nM
Methotrexat	51 nM	27 nM	47 nM

Tabelle 3-9: IC₅₀-Werte für Capan-2.
Dargestellt sind die Werte für 48, 72 und 96 h. * entsprechende Werte konnten nicht bestimmt werden.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	516 µM	217 µM	108 µM
6-Thioguanin	25 µM	6 µM	13,4 µM
5-Fluoruracil	*	1,4 µM	1,3 µM
Gemcitabin	2042 nM	30 nM	13,2 nM
Methotrexat	*	*	53 nM

Da nicht für alle Zytostatika IC₅₀-Werte berechnet werden konnten, die Zellviabilität jedoch durch die Behandlung deutlich reduziert wurden, sind die jeweiligen Restzellviabilitäten nach Zytostatikabehandlung zur besseren Übersicht nochmals in Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-10: Restzellviabilität für Capan-1-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	30,2 %	15,5 %	6,4 %

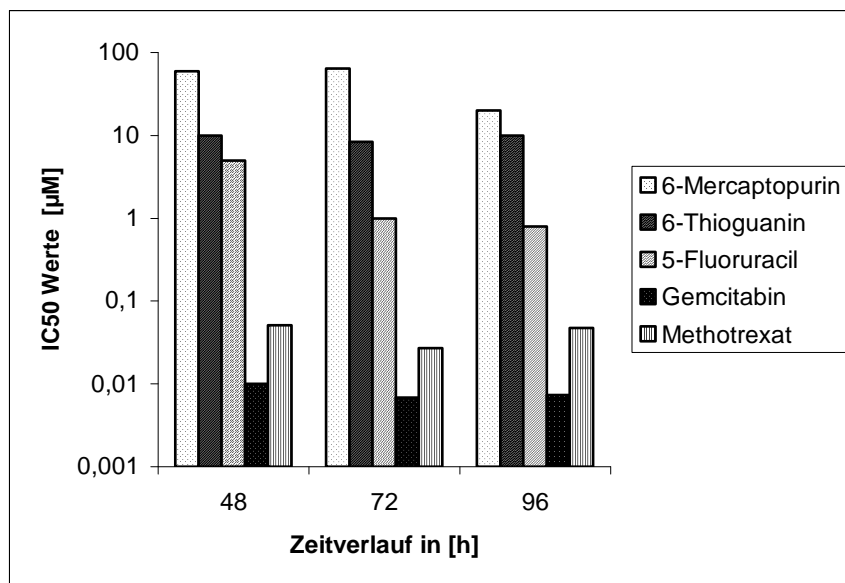
6-Thioguanin	21,9 %	7,4 %	3 %
5-Fluoruracil	56,1 %	55 %	19,2 %
Gemcitabin	41,7 %	9,8 %	1,8 %
Methotrexat	64,1 %	23,4 %	19,7 %

Tabelle 3-11: Restzellviabilität für Capan-2-Zellen nach Zytostatikabehandlung.
* entsprechende Werte konnten nicht ermittelt werden.

Zytostatikum	Zeitverlauf [h]		
	48	72	96
6-Mercaptopurin	*	*	*
6-Thioguanin	15,5 %	4,8 %	5,1 %
5-Fluoruracil	88,7 %	44 %	43,7 %
Gemcitabin	17 %	16,7 %	11,5 %
Methotrexat	*	*	53 %

Die berechneten IC_{50} -Werte für die beiden Pankreaszelllinien sind in Abbildung 3-12 nochmals graphisch dargestellt. Die berechneten Werte für Capan-1 als auch die für Capan-2 haben sich zum Teil so stark unterschieden, dass auf eine logarithmierte Darstellung zur besseren Übersicht zurückgegriffen wurde.

A Capan-1



B Capan-2

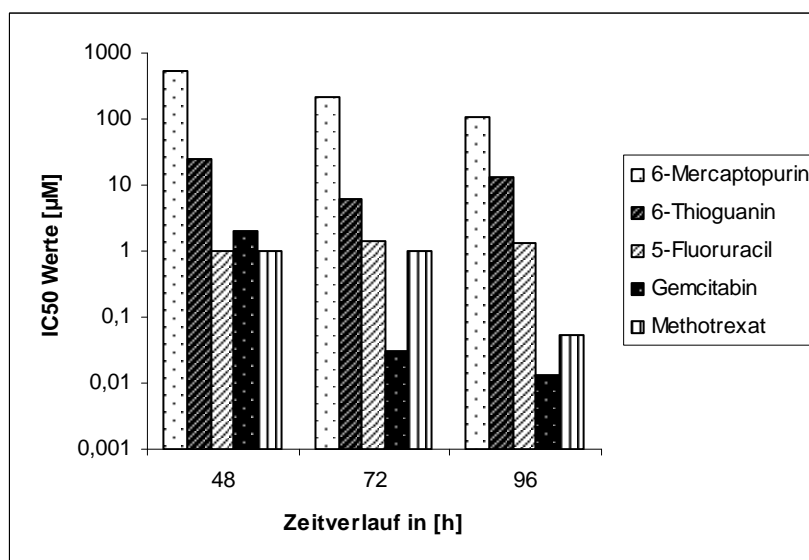


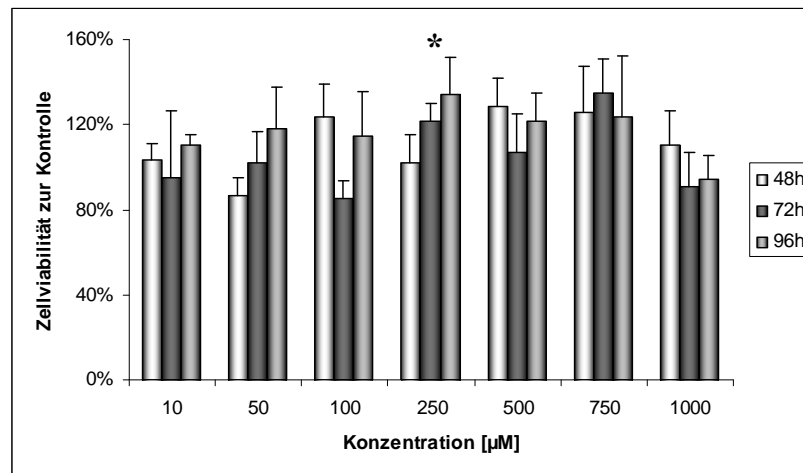
Abbildung 3-12: Logarithmierte IC₅₀-Werte der verschiedenen Zytostatika von Capan-1 [A] und Capan-2 [B]. Dargestellt sind die Werte für 48, 72 und 96 h.

3.5.3 Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Probenecid und in der Kombination von Zytostatika

3.5.3.1 Einfluss von Probenecid auf die Zellen

Um auszuschließen, dass Probenecid, ein unspezifischer Hemmstoff von anionischen Transportern⁸⁸, schon ohne die Zugabe von Zytostatika einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen besitzt, sollte im Vorversuch zunächst die Zytotoxizität dieser Substanz alleine untersucht werden. In Abbildung 3-13 sind die Ergebnisse dargestellt.

A Capan-1



B Capan-2

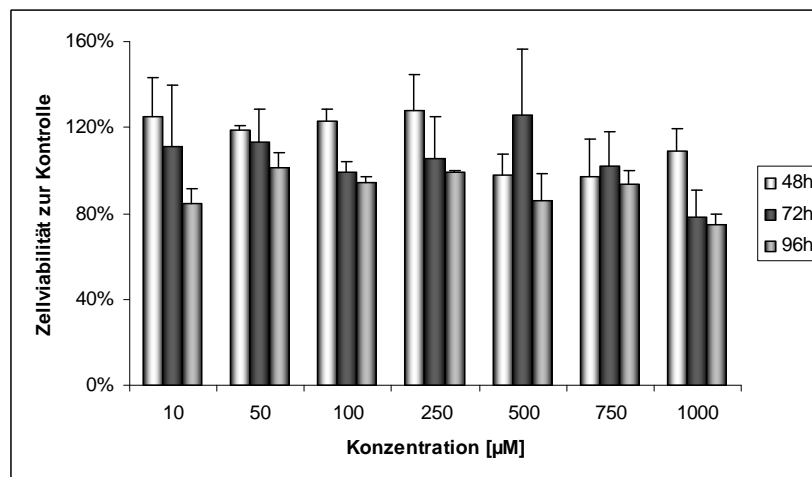


Abbildung 3-13: Einfluss von Probenecid auf Capan-Zellen.

Darstellung des Einflusses von Probenecid auf [A] Capan-1-Zellen und [B] Capan-2-Zellen nach 48, 72 und 96 h. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für n=3. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt [* entspricht $p < 0,05$].

An Capan-1-Zellen konnte ein signifikanter Anstieg der Viabilität bei 250 µM Probenecid gezeigt werden. Ansonsten zeigte sich für keine der beiden Zelllinien eine signifikante Veränderung unter dem Einfluss von Probenecid.

Um nun zu untersuchen, ob Probenecid in Kombination mit den entsprechenden Zytostatika einen hemmenden Einfluss auf die Transportproteine MRP4 und MRP5 zeigt, wurde für die weiteren Versuche eine Probenecidkonzentration von 500 µM gewählt.

3.5.3.2 Einfluss von Probenecid in der Kombination mit verschiedenen Zytostatika

Die Zellen wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Zytostatikums mit und ohne Probenecidvorbehandlung (1 Stunde) inkubiert. Als Kontrollen dienten zum einen Zellen mit Probenecid alleine oder die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen.

Die Versuche wurden über 48, 72 und 96 Stunden vorgenommen. Die drei verschiedenen Konzentrationen der Zytostatika wurden so gewählt, dass bei der niedrigsten kein Einfluss auf die Viabilität zu erwarten war, die mittlere in etwa der zuvor ermittelten IC₅₀ entsprach und die höchste Konzentration einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen besitzen sollte. Dargestellt ist in Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15 der Verlauf nach 48, 72 und 96 Stunden von 6-Mercaptopurin allein und in Kombination mit Probenecid. Die Resultate für 6-Thioguanin-, 5-Fluoruracil-, Gemcitabin- und Methotrexat in Kombination mit Probenecid sind in gleicher Weise dargestellt.

	Zytostatikum																	
Inkubationszeit [h]	6-Mercaptopurin/Probenecid	6-Thioguanin/Probenecid																
48	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (48h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,5</td> <td>~140</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>~60</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	0,5	~140	25	~100	250	~60	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (48h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>~160</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>~60</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>~30</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	1	~160	10	~60	100	~30
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
0,5	~140																	
25	~100																	
250	~60																	
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
1	~160																	
10	~60																	
100	~30																	
72	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (72h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,5</td> <td>~110</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>~80</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>~50</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	0,5	~110	25	~80	250	~50	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (72h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>~110</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>~30</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>~10</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	1	~110	10	~30	100	~10
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
0,5	~110																	
25	~80																	
250	~50																	
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
1	~110																	
10	~30																	
100	~10																	
96	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (96h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,5</td> <td>~110</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>~40</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>~20</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	0,5	~110	25	~40	250	~20	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (96h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration [µM]</th> <th>Zellviabilität (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>~160</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>~20</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>~10</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)	1	~160	10	~20	100	~10
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
0,5	~110																	
25	~40																	
250	~20																	
Konzentration [µM]	Zellviabilität (%)																	
1	~160																	
10	~20																	
100	~10																	

Zytostatikum		
Inkubationszeit [h]	5-Fluoruracil/Probenecid	Gemcitabin/Probenecid
48	<p style="text-align: center;">Konzentration 5-Fluoruracil [μM]</p>	<p style="text-align: center;">Konzentration Gemcitabin [nM]</p>
72	<p style="text-align: center;">Konzentration 5-Fluoruracil [μM]</p>	<p style="text-align: center;">Konzentration Gemcitabin [nM]</p>
96	<p style="text-align: center;">Konzentration 5-Fluoruracil [μM]</p>	<p style="text-align: center;">Konzentration Gemcitabin [nM]</p>

	Zytostatikum													
Inkubationszeit [h]	Methotrexat/Probenecid													
48	<table border="1"> <caption>Estimated data for 48h incubation</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration Methotrexat [nM]</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,1</td> <td>~95</td> <td>~135*</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>~70</td> <td>~105*</td> </tr> <tr> <td>500</td> <td>~45</td> <td>~80*</td> </tr> </tbody> </table>		Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid	0,1	~95	~135*	50	~70	~105*	500	~45	~80*
Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid												
0,1	~95	~135*												
50	~70	~105*												
500	~45	~80*												
72	<table border="1"> <caption>Estimated data for 72h incubation</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration Methotrexat [nM]</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,1</td> <td>~125</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>~70</td> <td>~55</td> </tr> <tr> <td>500</td> <td>~40</td> <td>~35</td> </tr> </tbody> </table>		Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid	0,1	~125	~100	50	~70	~55	500	~40	~35
Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid												
0,1	~125	~100												
50	~70	~55												
500	~40	~35												
96	<table border="1"> <caption>Estimated data for 96h incubation</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration Methotrexat [nM]</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein</th> <th>Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,1</td> <td>~90</td> <td>~85</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>~50</td> <td>~40</td> </tr> <tr> <td>500</td> <td>~20</td> <td>~25</td> </tr> </tbody> </table>		Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid	0,1	~90	~85	50	~50	~40	500	~20	~25
Konzentration Methotrexat [nM]	Zellviabilität (%) - Zytostatikum allein	Zellviabilität (%) - Zytostatikum + 500 µM Probenecid												
0,1	~90	~85												
50	~50	~40												
500	~20	~25												

Abbildung 3-14: Einfluss von Probenecid auf die Zytostatikawirkung auf Capan-1-Zellen.

Ermittelt nach 48, 72 und 96 h. Inkubiert wurde mit dem Zytostatikum allein [heller Balken] bzw. mit Zytostatikum und 500 µM Probenecid [dunkler Balken]. Es erfolgte eine Vorinkubation mit 500 µM Probenecid eine Stunde vor Zugabe des Zytostatikums. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für n=3. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [* entspricht $p < 0,05$].

Für 6-Mercaptopurin zeigt sich bei 48 Stunden für 0,5 und 25 µM und bei 96 Stunden für 0,5 µM eine signifikante Reduktion der Capan-1-Zellzahl in Kombination mit Probenecid gegenüber den nur mit dem Zytostatikum behandelten Zellen. Außerdem ist eine deutliche Verringerung der Zellviabilität mit Probenecid nach 96 Stunden für 0,5 µM erkennbar. Demgegenüber ist eine Steigerung der Zellviabilität für Capan-1-Zellen bei Behandlung mit 6-Mercaptopurin in Verbindung mit Probenecid für 25 und 250 µM bei 72 Stunden zu beobachten. Für 6-Thioguanin ist für 10 µM nach 48 und 72 Stunden eine Abnahme der Zellviabilität unter der Behandlung mit Probenecid im Vergleich zu den nicht mit Probenecid

vorbehandelten Zellen zu erkennen. Eine deutliche Reduktion der Viabilität zeigt sich auch in der Kombinationsbehandlung für 1 und 100 μM in der 96 Stunden Messung. Insgesamt zeigt sich für 6-Thioguanin unter allen Bedingungen tendenziell eine Reduktion der Viabilität in Anwesenheit von Probenecid, bei einigen Bedingungen ist dieser Unterschied signifikant. Ein umgekehrtes Bild ist bei den Pyrimidinanaloga und Folsäureantagonisten zu beobachten. Hier zeigt sich ein Anstieg des Zellwachstums bei der Kombination mit Probenecid, welches sich bei 5-Fluoruracil wesentlich ausgeprägter darstellt als bei Gemcitabin. Besonders nach 96 Stunden wird dies erkennbar. In der 48 Stunden Messung für Gemcitabin zeigt sich für 0,1 und 7,5 nM ein Abfall der Zellviabilität im Gegensatz zu den Versuchen mit 5-Fluoruracil. Für Methotrexat ist nur bei 48 Stunden bei allen Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der Zellzahl nach zusätzlicher Probenecidgabe zu verzeichnen. In Abbildung 3-15 sind die Ergebnisse für die entsprechenden Versuche für Capan-2 Zellen dargestellt.

	Zytostatikum																																					
Inkubationszeit [h]	6-Mercaptopurin/Probenecid	6-Thioguanin/Probenecid																																				
48	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (48h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~110</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~120</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">100</td> <td>Nein</td> <td>~90</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~85</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~55</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~60</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~110	Ja	~120	100	Nein	~90	Ja	~85	250	Nein	~55	Ja	~60	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (48h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Thioguanin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~90</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">10</td> <td>Nein</td> <td>~85</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~30</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~35</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~100	Ja	~90	10	Nein	~85	Ja	~65	250	Nein	~30	Ja	~35
Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~110																																				
	Ja	~120																																				
100	Nein	~90																																				
	Ja	~85																																				
250	Nein	~55																																				
	Ja	~60																																				
Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~100																																				
	Ja	~90																																				
10	Nein	~85																																				
	Ja	~65																																				
250	Nein	~30																																				
	Ja	~35																																				
72	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (72h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~160</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">100</td> <td>Nein</td> <td>~90</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~105</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~40</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~75</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~100	Ja	~160	100	Nein	~90	Ja	~105	250	Nein	~40	Ja	~75	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (72h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Thioguanin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">10</td> <td>Nein</td> <td>~55</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~55</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~10</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~15</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~100	Ja	~100	10	Nein	~55	Ja	~55	250	Nein	~10	Ja	~15
Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~100																																				
	Ja	~160																																				
100	Nein	~90																																				
	Ja	~105																																				
250	Nein	~40																																				
	Ja	~75																																				
Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~100																																				
	Ja	~100																																				
10	Nein	~55																																				
	Ja	~55																																				
250	Nein	~10																																				
	Ja	~15																																				
96	<table border="1"> <caption>6-Mercaptopurin/Probenecid (96h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~115</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">100</td> <td>Nein</td> <td>~85</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~35</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~45</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~115	Ja	~100	100	Nein	~85	Ja	~65	250	Nein	~35	Ja	~45	<table border="1"> <caption>6-Thioguanin/Probenecid (96h)</caption> <thead> <tr> <th>Konzentration 6-Thioguanin [μM]</th> <th>Probenecid</th> <th>Zellviabilität [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">0,5</td> <td>Nein</td> <td>~95</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~90</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">10</td> <td>Nein</td> <td>~50</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~45</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">250</td> <td>Nein</td> <td>~10</td> </tr> <tr> <td>Ja</td> <td>~15</td> </tr> </tbody> </table>	Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]	0,5	Nein	~95	Ja	~90	10	Nein	~50	Ja	~45	250	Nein	~10	Ja	~15
Konzentration 6-Mercaptopurin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~115																																				
	Ja	~100																																				
100	Nein	~85																																				
	Ja	~65																																				
250	Nein	~35																																				
	Ja	~45																																				
Konzentration 6-Thioguanin [μM]	Probenecid	Zellviabilität [%]																																				
0,5	Nein	~95																																				
	Ja	~90																																				
10	Nein	~50																																				
	Ja	~45																																				
250	Nein	~10																																				
	Ja	~15																																				

Zytostatikum		
Inkubationszeit [h]	5-Fluoruracil/Probenecid	Gemcitabin/Probenecid
48	<p>Konzentration 5-Fluoruracil [µM]</p>	<p>Konzentration Gemcitabin [nM]</p>
72	<p>Konzentration 5-Fluoruracil [µM]</p>	<p>Konzentration Gemcitabin [nM]</p>
96	<p>Konzentration 5-Fluoruracil [µM]</p>	<p>Konzentration Gemcitabin [nM]</p>

Zytostatikum		
Inkubationszeit [h]	Methotrexat/Probenecid	
48	<p>Konzentration Methotrxat [nM]</p>	

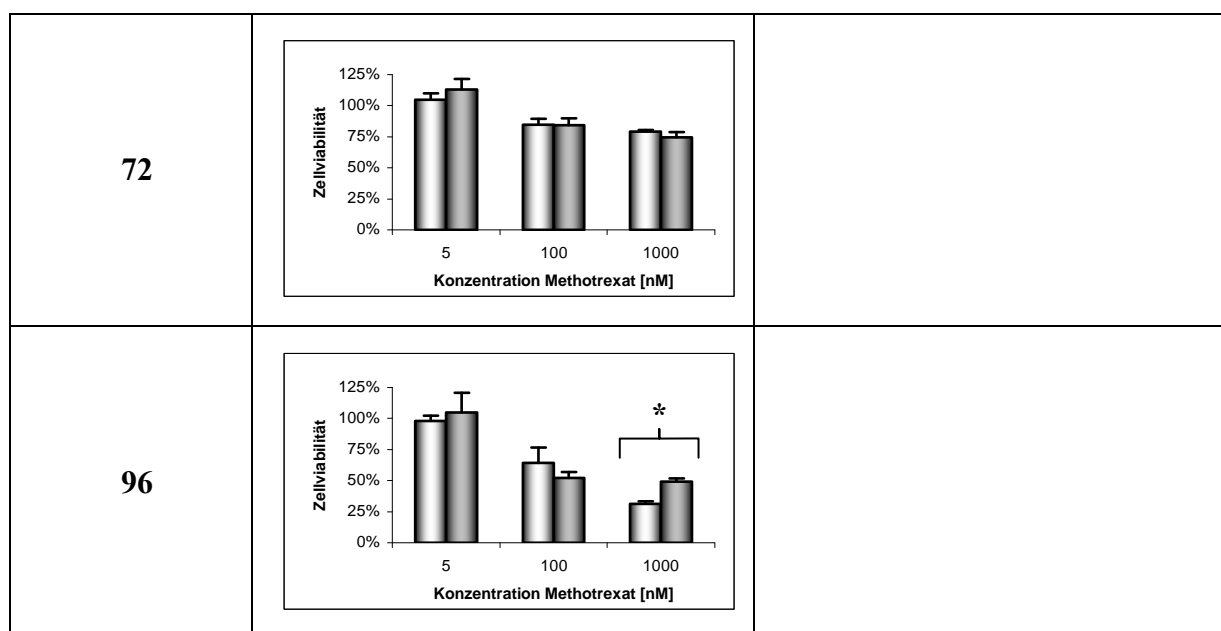


Abbildung 3-15: Einfluss von Probenecid auf die Zytostatikawirkung auf Capan-2-Zellen.

Ermittelt nach 48, 72 und 96 h. Inkubiert wurde mit dem Zytostatikum allein [heller Balken] bzw. mit Zytostatikum und 500 μM Probenecid [dunkler Balken]. Es erfolgte eine Vorinkubation mit 500 μM Probenecid eine Stunde vor Zugabe des Zytostatikums. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für $n=3$. Für die Auswertung wurden unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. [* entspricht $p < 0,05$].

Bei Capan-2-Zellen ist für 6-Mercaptopurin mit Probenecid ein Anstieg der Viabilität nach 72 Stunden zu erkennen. Deutlich ist dies vor allen für 0,5 und 250 μM . Eine Verringerung zeigte sich hingegen nach 96 Stunden mit 100 μM für die Kombinationsbehandlung. Eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bei der Behandlung mit 6-Thioguanin mit Probenecid wird für 10 μM nach 48 und 96 Stunden ersichtlich. Wie schon bei den Capan-1-Zellen ist auch hier ein verringerter zytotoxischer Effekt bei einer zusätzlichen Inkubation mit Probenecid zu erkennen.

Für Gemcitabin und Methotrexat lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationsreihen erkennen. Für 50 nM ist in der 72 Stunden Messung für das Pyrimidinanaloga in Kombination mit Probenecid eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zu sehen. Einen Anstieg des Zellwachstums in der 96 Stunden Auswertung für Methotrexat bei der Inkubation mit beiden Substanzen ist bei der Konzentration von 1000 μM zu erkennen. Sonst bleiben diese beiden Versuchsreihen ohne signifikante Ergebnisse. Die nachfolgende Tabelle dient dem Gesamtüberblick für den Einfluß von Probenecid in Koinkubation mit den jeweiligen Zytostatika auf beide Zelllinien.

Tabelle 3-12: Einfluss von Probenecid in Koinkubation mit verschiedenen Zytostatika für Capan-1- und Capan-2-Zellen.

↔ entspricht keinem Einfluss auf die Zellen; ↓ entspricht der Reduktion der Zellviabilität; ↑ entspricht einem Anstieg der Zellviabilität.

Zytostatikum	Zelllinie	
	Capan-1	Capan-2
6-Mercaptopurin	↓	↔
6-Thioguanin	↓	↓
5-Fluoruracil	↑	↑
Gemcitabin	↔	↔
Methotrexat	↔	↔

4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt mit fast 60.000 neu diagnostizierten Erkrankten im Jahr eine vergleichsweise häufige Krebsart in Europa dar¹. Aufgrund der kommenden demographischen Entwicklung in Deutschland (in Anlehnung an die 9. koordinierte Bevölkerungsvorausschätzung der statistischen Ämter in Deutschland) wird es zunehmend Patienten geben, die an dieser Krebsart erkranken, da es sich um einen Tumor handelt, der eher in den späteren Lebensabschnitten auftritt⁴. Vor diesem Hintergrund und der schlechten Prognose ist es naheliegend sich mit dieser Tumorerkrankung eingehender zu befassen.

Viele Gründe sind dafür verantwortlich, dass das Pankreaskarzinom mit einer sehr hohen Mortalitätsrate und einer schlechten Prognose assoziiert ist. Neben uncharakteristischen Symptomen, fehlenden Screeningverfahren und dadurch oft später Diagnosestellung stellt jedoch die, im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, sehr ausgeprägte Chemotherapeutikaresistenz eines der Hauptprobleme dar^{118,119}.

Diese Zytostatikaresistenzen neoplastischer Zellen sind auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen, wobei sowohl Faktoren auf zellulärer als auch auf nicht-zellulärer Ebene eine wichtige Rolle spielen. Ein wesentlicher Grund auf zellulärer Ebene liegt darin, dass sich Zytostatika nicht in Tumorzellen anreichern, sondern durch bestimmte Effluxpumpen der ABC-Transporterfamilie eliminiert werden.^{62,72} Diese Beobachtung ließ sich bereits durch eine Vielzahl von *in vitro* Studien zeigen^{85,100}. Aber auch für Neoplasien wie dem Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Resistenz neben einer Modulation metabolisierender Enzyme häufig auf Veränderungen in der Expression von Aufnahme- und Effluxtransportern beruht¹²⁰.

Neben den für dieses Phänomen der Multidrug Resistenz am häufigsten diskutierten ABC-Transportern P-Glykoprotein, dem *multidrug resistance associated protein* (MRP) 1 oder dem *breast cancer resistance protein* (BCRP) konnten König und Mitarbeiter 2005 erstmals die beiden Transportproteine MRP4 und MRP5 in Tumorgewebe des Pankreas nachweisen⁹⁸. Beide Transporter sind nicht nur am Auswärtstransport endogener zyklischer Nukleotide wie cAMP und cGMP beteiligt, sondern transportieren auch verschiedene Nucleosidanaloga⁸⁵⁻⁹⁰. Diese Wirkstoffe stellen eine wichtige Klasse von Zytostatika dar, die bei einer Vielzahl maligner Neoplasien, darunter auch dem Pankreaskarzinom, eingesetzt werden^{27,45,121,122}.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Expression und möglichen funktionellen Bedeutung dieser beiden Transporter für die Zytotoxizität verschiedener Chemotherapeutika

in Pankreaszelllinien. Hierfür wurden vier verschiedene Zelllinien (Capan-1, Capan-2, PaTu 8988 T und PaTu 8902) ausgehend von duktalem Pankreaskarzinomen verwendet.

4.1 Expression von MRP4 und MRP5 in Pankreaskarzinomzellen

In dieser Arbeit wurde in vier verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien die MRP4 und MRP5 mRNA Expression mittels *Real-Time* PCR analysiert. Es konnte bereits in der Arbeit von König gezeigt werden, dass MRP4 auch im gesunden Pankreas exprimiert wird und die Expression im Karzinomgewebe nicht signifikant verändert ist. Die hier beobachtete Variabilität der MRP4 mRNA-Expression unter den Zelllinien lässt sich daher am ehesten durch den unterschiedlichen Ursprung der Zellen erklären. Die Originalzelllinie Capan-1 wurde aus einer Metastase des Lebergewebes kultiviert, während die Capan-2-Zellen direkt einem Adenokarzinom des Pankreas entstammen¹¹². Darüber hinaus handelt es sich bei diesen Untersuchungen um Momentaufnahmen, so dass zellzyklusbedingte Unterschiede in der MRP-Expression hier unberücksichtigt bleiben. Auffallend gering ausgeprägt war jedoch die Expression für MRP4 in Capan-1-Zellen. Mittels *Western Blot* sollten anschließend die Ergebnisse der *Real-Time* PCR verifiziert werden, wobei Capan-1-Zellen ebenfalls keine eindeutige MRP4 Expression zeigten, was sich mit den Ergebnissen der mRNA Untersuchungen deckt, aber im Gegensatz zur Expression im Pankreas selbst steht⁹⁸.

In allen vier hier untersuchten Zelllinien zeigte sich eine höhere MRP5 als MRP4 mRNA Expression, was sich ebenfalls im Wesentlichen im *Western Blot* bestätigte. Darüber hinaus zeigt die Arbeit von König an humanem Pankreasgewebe ähnliche Ergebnisse⁹⁸. Im Gegensatz zum MRP4 war das MRP5-Protein dabei auch in den Capan-1-Zellen nachweisbar, während es in den Capan-2-Zellen am schwächsten exprimiert war. In den beiden Patu-Zelllinien konnten beide Transportproteine sicher detektiert werden. Neben der reinen Expression wurde auch die Lokalisation der Transporter untersucht. In der Literatur sind die beiden ABCC-Transporter als membranständige, aktive Auswärtstransporter beschrieben^{64,64,71,77,79}. So konnte König erstmals an gesundem Pankreas als auch an Pankreaskarzinomgewebe die beiden Transporter MRP4 und 5 in den Plasmamembranen von azinären als auch an duktalem Zellen nachweisen⁹⁸. Die in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 gezeigten Immunfluoreszenzbilder zeigen MRP4 in den Zelllinien PaTu 8902, PaTu 8988 T und Capan-2 und MRP5 in allen Zelllinien membranständig exprimiert, während das entsprechende Kontrollserum keine Signale lieferte. Die fehlende MRP4 Lokalisation in den Capan-1-Zellen bestätigt dabei die bereits erwähnten Expressionsdaten.

Zusammenfassend wird MRP4 und 5 in allen vier hier untersuchten Zelllinien unterschiedlich exprimiert. Dabei scheint aufgrund des Expressionsprofils MRP5 ein interessanter Kandidat im Hinblick auf die Resistenzentwicklung zu sein, während die MRP4-Expression zumindest in den betrachteten Zelllinien wohl nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Im Folgenden und in Hinblick auf eine Diskriminierung des Einflusses der beiden Effluxtransporter auf die Entwicklung einer möglichen Resistenz wurden die beiden Capan-Zelllinien daher näher charakterisiert. Diese Zellen waren aufgrund der unterschiedlichen Herkunft, und damit auch möglicherweise eines differenten Verhaltens gegenüber Zytostatikaeinflüssen interessant. Zudem zeigten Capan-1-Zellen die geringste MRP4 Expression, was im Vergleich mit den Capan-2-Zellen eine Abgrenzung und Bewertung eines möglichen MRP5 Einflusses für eine Resistenz erlauben würde.

4.2 Zellviabilitätsuntersuchungen an Capan-Zellen unter dem Einfluss von Zytostatika mit Hilfe des Alamar Blue-Assays

Aufgrund der starken Abhängigkeit des *Alamar Blue Proliferations Assay* von der verwendeten Zellzahl wurde zunächst die optimale Zellzahl für die Capan-1- und Capan-2-Zellen für die folgenden Versuche bestimmt. Ziel war es hier eine Zelldichte zu finden, bei der sich die Zellen während der optimalen Wirkungsdauer des Zytostatikums im linearen Bereich der Proliferation befanden. Der Hintergrund für diese Vorarbeiten liegt darin, dass der *Alamar Blue Assay* die Vitalität einer Zelle indirekt durch die Bestimmung der mitochondrialen metabolischen Aktivität bestimmt. Gegenüber anderen Proliferations- und Zytotoxizitätsassays wie der *Kristallviolettmethode* ist hierbei vorteilhaft, dass die Bestimmung an lebenden Zellen durchgeführt werden kann und es somit möglich ist, die Zellen auch im Anschluss weiter zu beobachten. Darüber hinaus zeichnet sich dieser Assay durch eine einfache und schnelle Handhabung aus.

In diesen Vorversuchen konnte jedoch weder an Capan-1- noch für Capan-2-Zellen im Zytotoxizitätsassay mit den Purinanaloga eine aussagekräftige Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden (siehe Abbildung 3-7). Weiterführende Untersuchungen über einen Zeitraum von 72 Stunden an Capan-1-Zellen mit veränderter, sehr viel niedriger gewählter Zellzahl lieferten zwar eine höhere Reduktion der Zellviabilität über die Zeit, allerdings waren hier die Bedingungen so gewählt, dass nur ein geringer Prozentsatz des *Alamar Blue* überhaupt umgesetzt wurde. Aus diesem Grund lagen die gemessenen Signale nur leicht über dem Hintergrund, teilweise waren sie sogar nicht von diesem zu trennen. Somit war hier mit deutlichen Messungenauigkeiten zu rechnen. Eine mögliche Ursache für diese

Schwierigkeiten liegt sicherlich in der sehr niedrigen metabolischen Aktivität der Capan-2-Zellen, was die geringe *Alamar Blue* Reduzierung erklärt.

Insgesamt ist es damit de facto nicht gelungen die optimale Zellzahlen für die beiden Capan-Zellen für die *Alamar Blue* Methode zu bestimmen. Die folgenden Zytotoxizitätsversuche wurden daher mit dem *Kristallviolettassay*, der diese Limitationen nicht hat, durchgeführt, zumal aus der Literatur heraus Assays mit ähnlicher Methodik bereits gute Ergebnisse bei *in vitro* Versuchen zeigen konnten^{39,85,90,110,123}.

4.3 Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen mittels Kristallviolett-Assay

Auch für diesen Assay mussten zunächst die Bedingungen optimiert werden. Dabei ergaben sich für die Zellzahlen verglichen mit dem *Alamar Blue Assay* deutlich geringere Ausgangsmengen, da das Prinzip hier nicht auf der Reduktion des Farbstoffs durch metabolische Aktivität sondern auf der Anfärbung der vitalen Zellen beruht.

Im Anschluss an die Vorversuche wurden die zytotoxischen Einflüsse der Purinanaloga 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin, der beiden Pyrimidinanaloga 5-Fluoruracil und Gemcitabin sowie dem Folsäureanalogon Methotrexat, welche Substrate bzw. mögliche Substrate von MRP4 und MRP5 darstellen, auf die Krebszellenreihen Capan-1 und Capan-2 untersucht.

Beide Zelllinien weisen das geringste Ansprechen (höchsten IC₅₀-Werte) gegenüber 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin (siehe Abbildung 3-12) auf. Schon früher konnte gezeigt werden, dass MRP4 und MRP5 im *in vitro* System an der Resistenzentwicklung gegenüber 6-Mercaptopurin, Thiopurin und 6-Thioguanin beteiligt sind^{39,90,91,110}. Aus Versuchen mit 6-Thioguanin ist weiterhin bekannt, dass die monophosphorylierte Form des Thioguanosin von MRP4 und MRP5 transportiert wird (siehe Abbildung 4-1)³⁹. MRP5, wie im übrigen auch MRP4, kann dabei Stoffwechselprodukte von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin aus der Zelle eliminieren und so die zytotoxische Potenz der Wirkstoffe vermindern^{39,90}. Diese intrazelluläre Detoxifikation umfasst beispielsweise die thioNMPs (tIMP, tXMP, tGMP und MetIMP) (siehe Abbildung 4-1)³⁹. Bei all diesen Arbeiten handelte es sich aber nicht um Pankreaskarzinomzelllinien, sondern um Systeme in denen die jeweiligen Transporter überexprimiert wurden. Es scheint aber auch für die beiden Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1 und Capan-2 zutreffend, dass der Einfluss der beiden Effluxtransporter MRP4 und 5 an den Resistenzmechanismen bzw. für die hohen IC₅₀-Werte der beiden Purinanaloga mit von Bedeutung sein müssen.

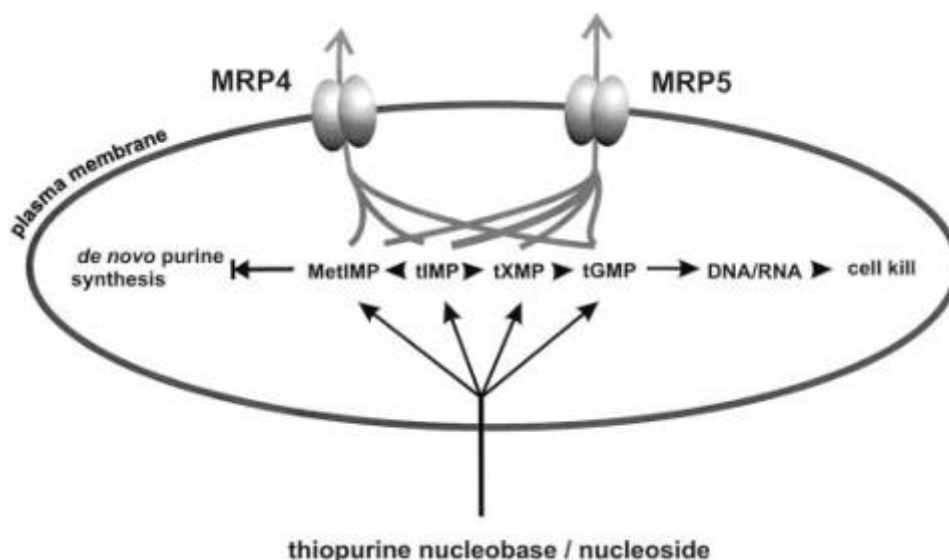


Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung des Effluxtransports von MRP4 und MRP5 in Verbindung mit Thiopurinresistenz.

Der geblockte Pfeil stellt die Inhibition über MetIMP der de novo Purinsynthese dar (nach Wielinga et al. 2002).

Zusätzlich müssen aber noch andere Faktoren, neben der Expression der Transporter MRP4 und MRP5, eine Rolle spielen, welche in den Stoffwechsel von Purinen involviert sind und ebenfalls zur Resistenzentwicklung bzw. zum verringerten Ansprechen gegenüber dem Antimetabolit beitragen können. Veränderte Enzymkonzentrationen oder Aktivitäten der beiden Krebszelllinien, welche hier nicht untersucht wurden, könnten so ebenfalls Einfluss auf die Zelltoxizität bzw. Reduktion der Zellzahl nehmen und sollen hier, neben den beiden untersuchten Effluxtransportern, nicht unerwähnt bleiben⁴¹⁻⁴⁴. Untersuchungen für die beiden Capan-Zellen in Bezug auf diese Enzymkonzentrationen liegen derzeit nicht vor.

Im Gegensatz zu den beiden Purinanaloga konnten für die Pyrimidinanaloga 5-Fluoruracil und Gemcitabin wesentlich niedrigere IC_{50} -Werte bestimmt werden. Auffallend war für 5-Fluoruracil auch, dass die ermittelten Restzellviabilitäten der beiden Zelllinien höher lagen als die von 6-Mercaptopurin oder 6-Thioguanin. Pratt konnte bereits zeigen, dass das Transportprotein MRP5 die monophosphorylierten Metabolite von 5-Fluoruracil transportiert und an der Resistenzentstehung beteiligt ist¹¹⁰. In dieser Arbeit wurde sogar gezeigt, dass MRP5 überexprimierende Zellen gegenüber den Parentalzellen eine 9-fach höhere Resistenz bei der Behandlung mit 5-Fluoruracil aufwiesen¹¹⁰. Shi fand eine generelle Resistenz von Pankreaskarzinomzellen gegenüber 5-Fluoruracil¹²³. Diese *in vitro* Daten decken sich zudem mit klinischen Erkenntnissen, wo das Pyrimidinanalogon 5-Fluoruracil auch *in vivo* nur einen eingeschränkten Erfolg in der Therapie des Pankreaskarzinoms zeigt. Auch an Capan-Zellen könnte der vermehrte Efflux von 5-Fluoruracil durch MRP5 keine ausreichende Elimination

der Tumorzellen zulassen, welches durch die gemessenen hohen Restzellviabilitäten der beiden Zelllinien bestätigt würde.

Das zweite in der Arbeit untersuchte Pyrimidinanalogon Gemcitabin zeigte gegenüber allen anderen hier untersuchten Substanzen die niedrigsten IC₅₀-Werte (siehe Abbildung 3-12). Wie bereits erwähnt beschrieb *Reid*, dass dieses Nucleosidanalogon kein Substrat für die beiden Auswärtstransporter darstellt⁸⁵. Jedoch konnte *Davidson* an überexprimierenden MRP5 HEK293 Zellen eine im Vergleich zu den untransfizierten Zellen deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Gemcitabin zeigen¹²⁴ und in von *Shi* untersuchten Pankreaskrebszelllinien (u.a. auch Capan-1-Zellen) konnte gezeigt werden, dass nach kontinuierlicher Gabe des Zytostatikums eine Resistenzentwicklung auftrat¹²³. Die hier gemachten Beobachtungen gehen dabei eher in die von *Reid* vertretene Richtung, wobei aber zu beachten ist, dass in den anderen beiden Arbeiten mit Modellen gearbeitet wurde, die nur teilweise mit den hier durchgeführten Versuchen vergleichbar sind. Der signifikante Anstieg der IC₅₀-Werte über die Zeit, welchen *Shi* an Capan-1-Zellen beschreibt, liegt wohl eher an Veränderungen der Expression von Apoptose regulierenden Genen oder intrazellulären Veränderungen als an der erhöhten Expression von MRP4 und 5^{52,93,123}. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Entstehung von Resistenzen hierbei als multifaktoriell anzusehen ist.

Die ermittelten IC₅₀-Werte nach Behandlung mit Methotrexat waren hier von einer signifikant stärkeren Restzellviabilität gegenüber allen anderen hier untersuchten Zytostatika begleitet. *Pratt* konnte bereits 2005 an MRP5-transfizierten HEK Zellen eine knapp 5-fache höhere Resistenz nach Behandlung mit Methotrexat gegenüber untransfizierten Zellen aufzeigen. So sind die nicht ermittelbaren Restzellviabilitäten der Pankreaszelllinie Capan-2 als auch die hohen Restzellviabilitäten für Capan-1 begründbar. Die höheren IC₅₀-Werte für Capan-2 gegenüber Capan-1-Zellen aber sind nicht allein auf Expression von MRP5 zurückzuführen, da Capan-1-Zellen eine höhere Expression dieses Transportproteins gezeigt hatten. Die Behandlung von Methotrexat auf Pankreaskrebszellen bleibt als unbefriedigend zu betrachten, eine Beobachtung, die sich mit den *in vivo* Daten für diesen Wirkstoff deckt¹²⁵.

4.4 Untersuchungen zur Zellviabilität an Capan-1- und Capan-2-Zellen unter dem Einfluss von Probenecid und in der Kombination von Zytostatika

Im Vorversuch wurde der Einfluss von Probenecid auf die beiden Zelllinien Capan-1 und Capan-2 getestet. Probenecid ist ein Hemmstoff, welcher nicht nur MRP4 und gleichzeitig MRP5 inhibiert dabei jedoch einen stärkeren Einfluss auf MRP5 zeigt, sondern ebenfalls an der Inhibierung von anderen Transportern beteiligt ist⁸⁵. Da im Moment aber kein spezifischerer Hemmstoff als Probenecid für die Inhibierung von MRP4 und 5 zur Verfügung

steht, wurde in dieser Arbeit mit dieser Substanz gearbeitet. Zusätzlich ist aus mehreren Arbeiten hervorgegangen, dass das Transportprotein MRP5 möglicherweise zu einem weitaus größeren Teil auf die Entwicklung von Resistenzen als MRP4 beiträgt, welches ebenfalls zur Entscheidung für die Verwendung dieses Hemmstoff beigetragen hat^{90,98,110,124}. Da weder an Capan-1 noch an Capan-2-Zellen bei 500 μ M Probenecid eine signifikante Änderung der Zellviabilität gezeigt werden konnte und so ausgeschlossen wurde, dass bei der alleinigen Inkubation mit Probenecid bereits ein zytotoxischer Einfluss auf beide Zelllinien besteht, wurden die folgenden Versuche mit dieser InhibitorKonzentration durchgeführt.

Für das Purinanalogen 6-Mercaptopurin konnte eine einheitliche aussagekräftige Reduktion der Zellviabilität, besonders für Capan-1-Zellen in Kombination mit dem Hemmstoff gezeigt werden. Es stellt sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl bei 48 bzw. 96 Stunden an Capan-1-Zellen sowie für 96 Stunden an Capan-2 dar. Dies steht zwar im Gegensatz zu der Zunahme der Viabilität der beiden Zellen in der 72 Stundenmessung, doch ist diese eher als Ausreisser zu betrachten. Auch für die Kombinationsversuche mit 6-Thioguanin konnte, besonders an den Capan-1 aber auch an den Capan-2-Zellen, eine klare Reduktion der IC₅₀-Werte gezeigt werden. Dies deckt sich mit der Arbeit von Pratt, der an MRP5 überexprimierenden Zellen zeigte, dass der Einfluss von Probenecid in Kombination mit 6-Thioguanin eine Reduktion der IC₅₀-Werte zur Folge hatte¹¹⁰.

Ebenfalls untersuchte er den Einfluss von 5-Fluoruracil mit diesem Hemmstoff sowie mit 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoesäure (NPPB). Dabei konnte keine signifikante Reduktion der Zellviabilität in Verbindung mit Probenecid, wohl aber mit dem Hemmstoff NPPB erreicht werden. Interessanterweise führte auch hier die Koinkubation von 5-Fluoruracil und Probenecid bei beiden Zelllinien – insbesondere aber bei Capan-1-Zellen - zu einer Zunahme der Zellviabilität. Da 5-Fluoruracil erst intrazellulär in seine aktiven Metabolite umgewandelt wird, spielt die Aufnahme des Zytostatikums über membranständige Nucleosidtransporter eine entscheidende Rolle. Da Probenecid nicht nur die beiden Auswärtstransporter MRP4 und 5 hemmt, sondern genauso Einfluss auf andere Nucleosidtransporter hat³⁰, könnte eine Inhibierung der Aufnahmetransporter für 5-Fluoruracil diese Ergebnisse bewirken. Jedoch fehlen in Bezug auf die Aufnahmetransporter für die Capan-Zellen hierzu Daten.

Für das zweite Pyrimidinanalogen Gemcitabin sind bisher keine Arbeiten bezüglich eines Probenecideffektes auf den Stofftransport bekannt. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse für Capan-1 und die alleinige Reduktion der Zellzahl bei 72 Stunden in Verbindung mit dem Hemmstoff für Capan-2-Zellen lassen nicht die Aussage zu, dass eine Inhibierung der

Transporter einen Einfluss auf eine mögliche Reduktion der Zellviabilität für die Behandlung mit Gemcitabin besitzt. Auch *Reid* beschrieb, dass Gemcitabin kein Substrat für die beiden Effluxtransporter darstellt⁸⁵. So spielt der Einfluss der beiden Transporter auf Gemcitabin eher eine untergeordnete bzw. keine Rolle. Intrazelluläre Veränderungen, besonders in Hinblick für die Ausbildung einer Resistenzentwicklung, scheinen hier von größerer Bedeutung zu sein^{52,93}.

Bei den Untersuchungen in der Kombination mit dem Folsäureanalogon Methotrexat konnte ebenfalls keine Reduktion der Zellviabilität durch Zugabe von Probenecid erzielt werden. Im Gegenteil, es kam zu einem Anstieg der Zellviabilität für Capan-1 bei 48 Stunden sowie für Capan-2 bei 96 Stunden. Schon in der Vergangenheit konnten bereits Arzneimittelinteraktionen zwischen Methotrexat und Probenecid *in vivo* gezeigt werden. So wird die zelluläre Aufnahme von Methotrexat z. B. in der Niere durch verschiedene organische Anionentransporter konzentrationsabhängig durch Probenecid gehemmt³⁰. Es ist deshalb zu vermuten, dass die zelluläre Aufnahme des Folsäureanalogons in den beiden Pankreaskrebszellen durch Probenecid gehemmt wurde und so die Zunahme der Zellviabilität begründet ist. Ob aber die gleichen Transporter hOAT1, hOAT3 und hOAT4, welche in der Niere exprimiert werden, auch für die Aufnahme bzw. den Efflux von Methotrexat in den beiden den Pankreaskrebszelllinien verantwortlich gemacht werden können, ist bis jetzt nicht untersucht worden.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass zumindest in den Capan-1-Zellen eine deutliche Zunahme der Sensitivität gegenüber Purinanaloga bei Koinkubation mit Probenecid beobachtet werden konnte. Zusammen mit dem Befund, dass diese Zellen im *Western Blot* die höchste MRP5 Expression zeigten, ergibt sich damit zumindestens ein Hinweis für eine Beteiligung dieses Transporters an den Resistenzmechanismen dieser Zellen. Um diese Frage jedoch eindeutig klären zu können, wird es essentiell sein möglichst spezifische Inhibitoren für die beiden Transportproteine zu finden, bzw. mittels siRNA Technologie die MRP4 und 5 Expression in der jeweiligen Zelllinie selektiv herunterzuregulieren. Es sollte weiterhin nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um Zelllinien handelt, die die physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Pankreas und im Pankreaskarzinom allenfalls in Ansätzen wiedergeben. Daher wird es für die Frage nach der Bedeutung dieser Transporter bei der ausgeprägten Zytostatikaresistenz des Pankreaskarzinoms entscheidend sein, diese Zusammenhänge auch im Tiermodell anzuschauen.

Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung mit sehr schlechter Prognose. In der Therapie werden, bislang allerdings nur mit begrenztem Erfolg, verschiedenste Chemotherapeutika verwendet. Die Gründe für dieses Therapieversagen sind noch weitgehend unklar, jedoch wird vermutet, dass die Aufnahme und Elimination der jeweiligen Zytostatika in die malignen Zellen eine Rolle spielen. Daher sind in dieser Arbeit die beiden ABC-Transporter MRP4 und MRP5, die als Effluxtransporter für diese Zytostatika diskutiert werden, hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression, ihrer zellulären Lokalisation sowie ihrer möglichen Funktion in vier Pankreaskarzinomzelllinien (Capan-1, Capan-2, PaTu 8988 T und PaTu 8902) näher charakterisiert worden. Dabei zeigten sich zunächst zelllinienspezifische Unterschiede in der Transporterexpression, wobei MRP5 im Gegensatz zu MRP4 in allen untersuchten Zelllinien relativ stark exprimiert war. Die Membranständigkeit ließ sich an fast allen untersuchten Zelllinien eindeutig nachweisen. In folgenden Zytotoxizitätsversuchen wurden die beiden Capanzelllinien, ausgewählt aufgrund ihres unterschiedlichen Ursprungs, hinsichtlich möglicher Unterschiede im Ansprechen auf unterschiedliche Substanzen untersucht. Mit Blick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Therapieresistenz beim Pankreaskarzinom und der MRP4, 5 Transporterexpression erschienen hier vor allem Purin- und Pyrimidinanaloga interessant. Hierbei wurden, im Vergleich zu ersteren, wesentlich niedrigere IC_{50} -Werte für die Pyrimidinanaloga ermittelt, was durch eine Interaktion zwischen Purinanaloga und den MRP-Transportern erklärbar wäre. Eine anschließende Inhibierung der Effluxtransporter durch Probenecid führte ebenfalls gerade bei den Purinanaloga zu einer verstärkten Empfindlichkeit, während hier die anderen untersuchten Wirkstoffe keine Reduktion bzw. sogar ein Anstieg der Zellviabilität bewirkten. Zusammenfassend scheint die Expression der beiden Effluxtransporter für die beim Pankreaskarzinom auftretende Zytostatikaresistenz von Bedeutung zu sein. Diese Arbeit gibt dabei insbesondere Hinweise auf eine Beteiligung des ABC-Transporters MRP5 möglicherweise auch von MRP4 an diesen Prozessen. Welche Bedeutung diese Ergebnisse jedoch für das *in vivo* geschehen haben werden bleibt abzuwarten.

Literaturverzeichnis

1. Ferlay,J. *et al.* Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* **18**, 581-592 (2007).
2. Parkin,D.M. & Muir,C.S. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci. Publ.* 45-173 (1992).
3. Pisani,P., Bray,F. & Parkin,D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* **97**, 72-81 (2002).
4. Gold,E.B. & Goldin,S.B. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **7**, 67-91 (1998).
5. Ahlgren,J.D. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin. Oncol.* **23**, 241-250 (1996).
6. Michaud,D.S. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* **59**, 99-111 (2004).
7. Yeo,T.P. *et al.* Pancreatic cancer. *Curr. Probl. Cancer* **26**, 176-275 (2002).
8. Fuchs,C.S. *et al.* A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch. Intern. Med.* **156**, 2255-2260 (1996).
9. Lowenfels,A., Patel,V.P. & Pitchumoni,C.S. Chronic Calcific Pancreatitis and Pancreatic-Cancer. *Digestive Diseases and Sciences* **30**, 982 (1985).
10. Lowenfels,A.B., Maisonneuve,P. & Lankisch,P.G. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **28**, 673-85, x (1999).
11. Boardman,L.A. *et al.* Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann. Intern. Med.* **128**, 896-899 (1998).
12. Lynch,H.T. *et al.* Familial pancreatic cancer: a review. *Semin. Oncol.* **23**, 251-275 (1996).
13. Silverman,D.T. *et al.* Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **80**, 1830-1837 (1999).
14. Goldstein,A.M. *et al.* Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N. Engl. J. Med.* **333**, 970-974 (1995).
15. Almoguera,C. *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549-554 (1988).
16. Hruban,R.H. *et al.* K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am. J. Pathol.* **143**, 545-554 (1993).
17. Ghaneh,P., Kawesha,A., Evans,J.D. & Neoptolemos,J.P. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **9**, 1-11 (2002).

18. Lockhart,A.C., Rothenberg,M.L. & Berlin,J.D. Treatment for pancreatic cancer: current therapy and continued progress. *Gastroenterology* **128**, 1642-1654 (2005).
19. Gudjonsson,B. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* **60**, 2284-2303 (1987).
20. Blaszkowsky,L. Treatment of advanced and metastatic pancreatic cancer. *Front Biosci.* **3**, E214-E225 (1998).
21. Yeo,C.J. & Cameron,J.L. Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch. Surg.* **383**, 129-133 (1998).
22. Kalsner,M.H. & Ellenberg,S.S. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch. Surg.* **120**, 899-903 (1985).
23. Klinkenbijn,J.H. *et al.* Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and perampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann. Surg.* **230**, 776-782 (1999).
24. Neoptolemos,J.P. *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1200-1210 (2004).
25. Heinemann,V. Gemcitabine: Progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology* **60**, 8-18 (2001).
26. Burris,H.A. *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* **15**, 2403-2413 (1997).
27. Carmichael,J. *et al.* Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **73**, 101-105 (1996).
28. Casper,E.S. *et al.* Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* **12**, 29-34 (1994).
29. Berlin,J.D. *et al.* Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3270-3275 (2002).
30. Takeda,M. *et al.* Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 666-671 (2002).
31. Basin,K.S., Escalante,A. & Beardmore,T.D. Severe pancytopenia in a patient taking low dose methotrexate and probenecid. *J. Rheumatol.* **18**, 609-610 (1991).
32. Ellison,N.M. & Servi,R.J. Acute renal failure and death following sequential intermediate-dose methotrexate and 5-FU: a possible adverse effect due to concomitant indomethacin administration. *Cancer Treat. Rep.* **69**, 342-343 (1985).
33. Frenia,M.L. & Long,K.S. Methotrexate and nonsteroidal antiinflammatory drug interactions. *Ann. Pharmacother.* **26**, 234-237 (1992).

34. Kremer, J.M. & Hamilton, R.A. The effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on methotrexate (MTX) pharmacokinetics: impairment of renal clearance of MTX at weekly maintenance doses but not at 7.5 mg. *J. Rheumatol.* **22**, 2072-2077 (1995).
35. Thyss, A., Milano, G., Kubar, J., Namer, M. & Schneider, M. Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen. *Lancet* **1**, 256-258 (1986).
36. Tracy, T.S. *et al.* The effects of a salicylate, ibuprofen, and naproxen on the disposition of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 121-125 (1992).
37. LePage, G.A. BASIC BIOCHEMICAL EFFECTS AND MECHANISM OF ACTION OF 6-THIOGUANINE. *Cancer Res.* **23**, 1202-1206 (1963).
38. Lowe, E.S. *et al.* Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of thioguanine in children with acute lymphoblastic leukemia: a collaborative Pediatric Oncology Branch, NCI, and Children's Cancer Group study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **47**, 199-205 (2001).
39. Wielinga, P.R. *et al.* Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1321-1331 (2002).
40. Lennard, L., Van Loon, J.A., Lilleyman, J.S. & Weinshilboum, R.M. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **41**, 18-25 (1987).
41. Rosman, M., Lee, M.H., Creasey, W.A. & Sartorelli, A.C. Mechanisms of resistance to 6-thiopurines in human leukemia. *Cancer Res.* **34**, 1952-1956 (1974).
42. Zimm, S., Reaman, G., Murphy, R.F. & Poplack, D.G. Biochemical parameters of mercaptopurine activity in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **46**, 1495-1498 (1986).
43. Krynetski, E.Y. *et al.* A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 949-953 (1995).
44. Relling, M.V. *et al.* Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 2001-2008 (1999).
45. Stanulla, M. & Schunemann, H.J. Thioguanine versus mercaptopurine in childhood ALL. *Lancet* **368**, 1304-1306 (2006).
46. Markowitz, J., Grancher, K., Kohn, N., Lesser, M. & Daum, F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**, 895-902 (2000).
47. Peters, G.J. *et al.* Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 194-205 (2002).

48. Santi,D.V., McHenry,C.S. & Sommer,H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**, 471-481 (1974).
49. Myers,C.E., Young,R.C. & Chabner,B.A. Biochemical determinants of 5-fluorouracil response in vivo. The role of deoxyuridylate pool expansion. *J. Clin. Invest* **56**, 1231-1238 (1975).
50. Gandhi,V. *et al.* Cytotoxicity, Metabolism, and Mechanisms of Action of 2',2'-Difluorodeoxyguanosine in Chinese-Hamster Ovary Cells. *Cancer Res* **55**, 1517-1524 (1995).
51. Bergman,A.M., Pinedo,H.M. & Peters,G.J. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resistance Updates* **5**, 19-33 (2002).
52. Kroep,J.R. *et al.* Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 371-376 (2002).
53. Ruiz,v.H., V, Veerman,G., Vermorcken,J.B. & Peters,G.J. 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 762-766 (1993).
54. Gandhi,V., Legha,J., Chen,F., Hertel,L.W. & Plunkett,W. Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Res* **56**, 4453-4459 (1996).
55. Neff,T. & Blau,C.A. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **24**, 1340-1346 (1996).
56. Dumontet,C. *et al.* Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br. J. Haematol.* **106**, 78-85 (1999).
57. Goan,Y.G., Zhou,B., Hu,E., Mi,S. & Yen,Y. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res.* **59**, 4204-4207 (1999).
58. Chen,M., Hough,A.M. & Lawrence,T.S. The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45**, 369-374 (2000).
59. Cascallo,M., Calbo,J., Gelpi,J.L. & Mazo,A. Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* **7**, 545-556 (2000).
60. Noble,S. & Goa,K.L. Gemcitabine - A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs* **54**, 447-472 (1997).
61. Mackey,J.R., Baldwin,S.A., Young,J.D. & Cass,C.E. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **1**, 310-324 (1998).
62. Dean,M., Rzhetsky,A. & Allikmets,R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156-1166 (2001).

63. Higgins,C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113 (1992).
64. Stefkova,J., Poledne,R. & Hubacek,J.A. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.* **53**, 235-243 (2004).
65. Klein,I., Sarkadi,B. & Varadi,A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 237-262 (1999).
66. Hung,L.W. *et al.* Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**, 703-707 (1998).
67. Sharom,F.J., Liu,R., Romsicki,Y. & Lu,P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 327-345 (1999).
68. Allikmets,R., Gerrard,B., Hutchinson,A. & Dean,M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1649-1655 (1996).
69. Gottesman,M.M. & Pastan,I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385-427 (1993).
70. Cole,S.P. *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654 (1992).
71. Haimeur,A., Conseil,G., Deeley,R.G. & Cole,S.P. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab* **5**, 21-53 (2004).
72. Kruh,G.D. & Belinsky,M.G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* **22**, 7537-7552 (2003).
73. Hopper,E. *et al.* Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* **162**, 181-191 (2001).
74. Bera,T.K., Lee,S., Salvatore,G., Lee,B. & Pastan,I. MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol. Med.* **7**, 509-516 (2001).
75. Bera,T.K. *et al.* MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 6997-7002 (2002).
76. Yabuuchi,H. *et al.* ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 410-417 (2002).
77. Borst,P., Evers,R., Kool,M. & Wijnholds,J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1295-1302 (2000).
78. Bakos,E. *et al.* Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 32167-32175 (1998).

79. Borst,P., Evers,R., Kool,M. & Wijnholds,J. The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 347-357 (1999).
80. Zelcer,N. *et al.* Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J.* **371**, 361-367 (2003).
81. Jedlitschky,G. *et al.* Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* **56**, 988-994 (1996).
82. Borst,P. & Elferink,R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 537-592 (2002).
83. Jedlitschky,G., Burchell,B. & Keppler,D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **275**, 30069-30074 (2000).
84. Adachi,M., Reid,G. & Schuetz,J.D. Therapeutic and biological importance of getting nucleotides out of cells: a case for the ABC transporters, MRP4 and 5. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1333-1342 (2002).
85. Reid,G. *et al.* Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1094-1103 (2003).
86. Sampath,J. *et al.* Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS. PharmSci.* **4**, E14 (2002).
87. Chen,Z.S., Lee,K. & Kruh,G.D. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J. Biol. Chem.* **276**, 33747-33754 (2001).
88. Ritter,C.A. *et al.* Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.* **37**, 253-278 (2005).
89. Wielinga,P.R. *et al.* Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells. *J Biol Chem* **278**, 17664-17671 (2003).
90. Wijnholds,J. *et al.* Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 7476-7481 (2000).
91. Lee,K., Klein-Szanto,A.J. & Kruh,G.D. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1934-1940 (2000).
92. Schuetz,J.D. *et al.* MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat. Med.* **5**, 1048-1051 (1999).
93. Galmarini,C.M., Mackey,J.R. & Dumontet,C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **15**, 875-890 (2001).

94. Lee,K., Belinsky,M.G., Bell,D.W., Testa,J.R. & Kruh,G.D. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.* **58**, 2741-2747 (1998).
95. Kool,M. *et al.* 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 (1997).
96. Rius,M., Nies,A.T., Hummel-Eisenbeiss,J., Jedlitschky,G. & Keppler,D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **38**, 374-384 (2003).
97. Nies,A.T. *et al.* Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* **129**, 349-360 (2004).
98. Konig,J. *et al.* Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* **115**, 359-367 (2005).
99. Jedlitschky,G. *et al.* The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage . *Blood* (2004).
100. Lai,L. & Tan,T.M. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem. J.* **361**, 497-503 (2002).
101. Lee,V.H. Membrane transporters. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11 Suppl 2**, S41-S50 (2000).
102. Borst,P., de Wolf,C. & van de,W.K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* (2006).
103. Chen,Z.S. *et al.* Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* **62**, 3144-3150 (2002).
104. Reid,G. *et al.* The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9244-9249 (2003).
105. Belinsky,M.G., Bain,L.J., Balsara,B.B., Testa,J.R. & Kruh,G.D. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1735-1741 (1998).
106. Nies,A.T., Spring,H., Thon,W.F., Keppler,D. & Jedlitschky,G. Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system. *J. Urol.* **167**, 2271-2275 (2002).
107. McAleer,M.A., Breen,M.A., White,N.L. & Matthews,N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 23541-23548 (1999).

108. Meyer Zu Schwabedissen, H.E. *et al.* Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am. J. Pathol.* **166**, 39-48 (2005).
109. Dazert, P. *et al.* Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am. J. Pathol.* **163**, 1567-1577 (2003).
110. Pratt, S. *et al.* The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 855-863 (2005).
111. van Aabel, R.A., Smeets, P.H., van den Heuvel, J.J. & Russel, F.G. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **288**, F327-F333 (2005).
112. Kyriazis, A.A., Kyriazis, A.P., Sternberg, C.N., Sloane, N.H. & Loveless, J.D. Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma Capan-2 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Res.* **46**, 5810-5815 (1986).
113. Elsasser, H.P., Lehr, U., Agricola, B. & Kern, H.F. Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **64**, 201-207 (1993).
114. Elsasser, H.P., Lehr, U., Agricola, B. & Kern, H.F. Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **61**, 295-306 (1992).
115. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354 (1979).
116. Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Jr. & Walsh, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* **170**, 211-224 (1994).
117. Flick, D.A. & Gifford, G.E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* **68**, 167-175 (1984).
118. Erlichman, C., Fine, S., Wong, A. & Elhakim, T. A randomized trial of fluorouracil and folinic acid in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **6**, 469-475 (1988).
119. Lokich, J.J., Ahlgren, J.D., Gullo, J.J., Philips, J.A. & Fryer, J.G. A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. *J. Clin. Oncol.* **7**, 425-432 (1989).

-
120. Obata,T., Endo,Y., Murata,D., Sakamoto,K. & Sasaki,T. The molecular targets of antitumor 2'-deoxycytidine analogues. *Curr. Drug Targets* **4**, 305-313 (2003).
 121. Chu,E., Callender,M.A., Farrell,M.P. & Schmitz,J.C. Thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents: from bench to bedside. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **52 Suppl 1**, S80-S89 (2003).
 122. Erlichman,C. & Fine,S. 5-Fluorouracil and folinic acid in the treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **5**, 1492-1493 (1987).
 123. Shi,X., Liu,S., Kleeff,J., Friess,H. & Buchler,M.W. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology* **62**, 354-362 (2002).
 124. Davidson,J.D. *et al.* Human multidrug resistance protein 5 (MRP5) confers resistance to gemcitabine. *Proceedings of the American Association of Cancer Research* **43**, 780-781. 2002.
- Ref Type: Abstract
125. Di Costanzo,F. *et al.* Modulation of fluorouracil by methotrexate, leucovorin, and cisplatin (M-FLP) in the treatment of advanced pancreatic cancer: a phase II study of the Italian Oncology Group for Clinical Research (GOIRC). *Am. J. Clin. Oncol.* **23**, 314-318 (2000).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2002.	4
Abbildung 1-2:	Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Pankreaskarzinom in Deutschland 2002.	6
Abbildung 1-3:	Lokalisation der Pankreaskarzinome in [%].	7
Abbildung 1-4:	Relatives 10 Jahres Überleben für Pankreaskarzinom über je drei Perioden.	8
Abbildung 1-5:	Chemische Struktur der Folsäure und des Folsäureantagonisten.	10
Abbildung 1-6:	Wirkmechanismen von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin.	10
Abbildung 1-7:	Intrazellulärer Wirkmechanismus von 5- Fluoruracil (nach Pratt et al. 2005).	12
Abbildung 1-8:	Strukturgerüste der Pyrimidinanaloge.	13
Abbildung 1-9:	Zelluläre Resistenzmechanismen.	14
Abbildung 1-10:	Aufbau einer Nukleotidbindedomäne in ABC-Transportern.	15
Abbildung 1-11:	Aufbau der ABC-Transporter.	15
Abbildung 1-12:	Aufbau der verschiedenen MRP Transporter (nach Haimeur et al. 2004).	16
Abbildung 1-13:	Rolle von MRP4/5 in Resistenzmechanismen gegen antivirale Medikamente und Tumorthapeutika sowie der Eingriff von MRP4/5 in den Signalkaskadeweg von zyklischen Nukleotiden.	17
Abbildung 2-1:	Prinzip der TaqMan [®] -Detektion.	34
Abbildung 2-2:	Schematischer Aufbau eines Sandwich-Blots nach Towbin ¹¹⁵ .	39
Abbildung 2-3:	Schemazeichnung über Plattenbelegung bei Zytotoxizitätsassays.	45
Abbildung 3-1:	Darstellung der normalisierten MRP 4/5 mRNA Expression in ausgewählten Pankreaskrebszelllinien.	46
Abbildung 3-2:	MRP4- und MRP5-Proteinexpression.	47
Abbildung 3-3:	Durchlichtmikroskopie der Zellen.	48
Abbildung 3-4:	Immunhistologischer Nachweis von MRP4.	50
Abbildung 3-5:	Immunhistologischer Nachweis von MRP5.	51
Abbildung 3-6:	Viabilität der Capan-1- und Capan-2-Zellen.	52
Abbildung 3-7:	Zytotoxizitätstests an Capan-Zellen.	54
Abbildung 3-8:	Zytotoxizitätstests an Capan-1-Zellen.	54
Abbildung 3-9:	Wachstumsverhalten der Capan-Zellen.	57
Abbildung 3-10:	Zytotoxizitätstests der Capan-1-Zellen.	58
Abbildung 3-11:	Zytotoxizitätstests der Capan-2-Zellen.	59
Abbildung 3-12:	Logarithmierte IC ₅₀ -Werte der verschiedenen Zytostatika von Capan-1 [A] und Capan-2 [B].	63
Abbildung 3-13:	Einfluss von Probenecid auf Capan-Zellen.	64
Abbildung 3-14:	Einfluss von Probenecid auf die Zytostatikawirkung auf Capan-1-Zellen.	67
Abbildung 3-15:	Einfluss von Probenecid auf die Zytostatikawirkung auf Capan-2-Zellen.	70
Abbildung 4-1:	Vereinfachte Darstellung des Effluxtransports von MRP4 und MRP5 in Verbindung mit Thiopurinresistenz.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Inhibitoren von MRP4 (nach Ritter et al. 2005).....	19
Tabelle 1-2:	Inhibitoren von MRP5 (nach Ritter et al. 2005).....	20
Tabelle 2-1:	Oligonukleotide/ <i>TaqMan</i> [®] -Sonden.....	28
Tabelle 2-2:	Protokoll 1: Ansatz für Reverse Transkription	32
Tabelle 2-3:	Pipettierschema für die Gene MRP4 und 5.....	34
Tabelle 2-4:	Pipettierschema für das Referenzgen 18S.....	35
Tabelle 2-5:	Für die PCR verwendete Temperaturprofil.....	35
Tabelle 2-6:	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.....	37
Tabelle 2-7:	Antikörper	40
Tabelle 2-8:	Antikörper	41
Tabelle 2-9:	Konzentrationen der Zellzahlen von Capan-1- und Capan-2 für den Kristallviolett-Assay.....	44
Tabelle 2-10:	Stammkonzentration und Lösungsmittel der verwendeten Zytostatika	44
Tabelle 3-1:	Konzentrationen der optimalen Zellzahlen für den Alamar Blue-Assay	53
Tabelle 3-2:	IC ₅₀ -Werte für Capan-1-Zellen.	55
Tabelle 3-3:	IC ₅₀ -Werte für Capan-2-Zellen.	55
Tabelle 3-4:	IC ₅₀ -Werte für Capan-1 aus Abbildung 3-8.	55
Tabelle 3-5:	Restzellviabilität für Capan-1- und Capan-2-Zellen nach Zytostatikabehandlung für die Werte aus Abbildung 3-7.	56
Tabelle 3-6:	Restzellviabilität für Capan-1 nach Zytostatikabehandlung für die Werte aus Abbildung 3-8.	56
Tabelle 3-7:	Optimalen Zellzahlen für den Kristallviolett-Assay.	57
Tabelle 3-8:	IC ₅₀ -Werte für Capan-1.	61
Tabelle 3-9:	IC ₅₀ -Werte für Capan-2.	61
Tabelle 3-10:	Restzellviabilität für Capan-1-Zellen nach Zytostatikabehandlung.....	61
Tabelle 3-11:	Restzellviabilität für Capan-2-Zellen nach Zytostatikabehandlung.....	62
Tabelle 3-12:	Einfluss von Probenecid in Koinkubation mit verschiedenen Zytostatika für Capan-1- und Capan-2-Zellen.....	71

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tobias Florian Hübner, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Greifswald, den:

Unterschrift:

Lebenslauf

Tobias Florian Hübner

Geburtsdatum: 19. Juni 1977

Geburtsort: Nürnberg

Eltern: Matthias Paul und Siegrid Hübner geb. Lienhard

Geschwister: Stephan Matthias Hübner

Konfession: römisch-katholisch

Familienstand: ledig

Schulzeit:

1983-1987 Grundschule Nbg.-Katzwang

1987-1988 Wilhelm-Löhe-Schule, Nürnberg (Hauptschule)

1988-1995 Wilhelm-Löhe-Schule, Nürnberg (Gymnasium)

1995-1998 Gymnasium mit Schülerheim Pegnitz

Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: Malteser Hilfsdienst, Nürnberg

Abteilung: Rettungsdienst, 1998-1999

Berufsausbildung:

1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst, Nürnberg

1999 Ausbildung zum staatl. anerkannten Rettungsassistent

1999-2002 Hauptamtliche Vollanstellung als Rettungsassistent im Rettungsdienst beim Malteser Hilfsdienst, Nürnberg

2002-2003 Beschäftigung als studentische Hilfskraft bzw. als kurzfristiger Beschäftigung im Rettungsdienst beim Malteser Hilfsdienst, Nürnberg

2003-2007 Anstellung als studentische Hilfskraft am Institut für medizinische Psychologie im Bereich Community Medicine der Universität Greifswald

2003-2008 Anstellung als geringfügig Beschäftigter im Rettungsdienst der Rettungswachen des DRK-Kreisverbandes Ostvorpommern e.V.

2006-2007 Anstellung als studentische Hilfskraft im Institut für klinische Pharmakologie

- 2007-2008 Anstellung als studentische Hilfskraft für Sonderwachen; Weaning Station der Inneren Medizin II des Universitätsklinikums Greifswald
- 2009 Anstellung als Assistenzarzt für Innere Medizin; Klinik für Innere Medizin; Krankenhaus Martha – Maria; Nürnberg

Studium:

- 2001 – 2008 Studium der Humanmedizin der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
- September 2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
- November 2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

02. April – 01. Mai 2005 Klinik für Innere Medizin- Geriatrie, Toxikologie; Medizinische Klinik 2; Klinikum Nürnberg Nord; Nürnberg
02. Mai – 01. Juni 2005 Klinik für Chirurgie; Krankenhaus Martha – Maria; Nürnberg
06. Juni – 08. Juli 2005 Praxis für Allgemeinmedizin Herrn Dr. med. Wolfgang Frieser; Nürnberg
01. April – 01. Mai 2007 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin; Klinikum Nürnberg Süd; Nürnberg

Praktisches Jahr:

20. August – 07. Dezember 2007
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Greifswald unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Wendt
10. Dezember – 28. März 2008
Asklepios Klinik Pasewalk; Abteilung für Innere Medizin unter der konsiliarischen Leitung von Frau Dipl.- Med. Hinz
31. März – 18. Juli 2008
Kreiskrankenhaus Demmin; Abteilung für Chirurgie unter der Leitung von Herrn Dr. med. Wilhelm

Greifswald, den:

Unterschrift:

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer und Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. A. Ritter für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit diese am Institut für Pharmakologie in Greifswald durchführen zu können.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Lerch der Universität Greifswald danke ich für die Bereitstellung der zu untersuchenden Krebszelllinien.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. rer. nat. Markus Grube für alle hilfreichen Tipps, die wissenschaftliche Betreuung und die geduldige Bereitschaft auch außerhalb der Laborzeiten immer ein offenes Ohr für Probleme zu haben. Außerdem möchte ich mich herzlich bei den freundlichen und stets hilfsbereiten MTA's Frau Sonnenberger, Frau Uecker sowie Frau Böttcher für Tipps und die Hilfe bei den praktischen Laborarbeiten bedanken. Ebenso gebührt mein persönlicher Dank Herrn Danilo Wegner sowie Herrn Dr. rer. nat. Matthias Gratz die mir bei Computerproblemen und der statistischen Auswertung tatkräftig zur Seite standen. Einen großen Dank möchte ich auch an alle anderen Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie in Greifswald für die freundschaftliche Atmosphäre und die stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft richten.

Frau Pamela Wittke gilt mein Dank für die Unterstützung in Fragen hinsichtlich der Tücken der deutschen Orthographie.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die in allen Phasen meines Studiums und während der Anfertigung meiner Dissertation immer für mich da waren.