

Dirk Nauheimer

Dr. med.

Charakterisierung humaner Pankreaskarzinom-Zelllinien auf Multidrug Resistenz-assoziierte Genprodukte und Veränderung der Genexpression durch chemotherapeutische Intervention

Geboren am 30.05.1978 in Wiesbaden

Staatsexamen am 16.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Viszeralchirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Jan Schmidt

Das Pankreaskarzinom ist eine häufige Tumorerkrankung des Gastrointestinaltrakts, dessen Prognose weiterhin sehr schlecht ist. Eine chirurgische Intervention stellt derzeit den einzig möglichen kurativen Therapieansatz dar. Bislang gibt es keine alternative medikamentöse Therapie, die einen wesentlichen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Pankreaskarzinompatienten ausübt. Zudem erreichen die klinischen Ansprechraten gegenüber zytostatischen Therapien, die sich aus objektiven, wie auch aus subjektiven Parametern definieren, kaum mehr als 20%. Dies beinhaltet messbare Faktoren wie Tumorregression, aber auch klinische Symptome, mit starkem Einfluss auf die Lebensqualität, wie Gewichtsverlust, Tumorschmerzen und Leistungsfähigkeit. Das Nichtansprechen einer Chemotherapie ist ein häufiges klinisches Phänomen, das große Probleme in der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen verursacht. Klinisch äußert sich dies durch weitere Progression der Erkrankung oder der Ausbildung von Fernmetastasen unter oder nach durchgeführter chemotherapeutischer Behandlung. Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der Untersuchung der so genannten „*Multidrug Resistenz*“ (MDR), dem Phänomen der Resistenz gegenüber einer Vielzahl von zytotoxischen Substraten bei humanen Pankreaskarzinomen, am Modell von humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien. Hierfür wurde die Expression einer Auswahl, der in der Literatur beschriebenen Multidrug Resistenz-vermittelnden Gene und deren Produkte an zehn häufig eingesetzten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien untersucht. Dies umfasste konkret die Genprodukte der P-Glykoproteine MDR-1 und MDR-3, sowie die Genprodukte und

Proteine der Multidrug Resistenz-assoziierten Proteine MRP1, MRP2, MRP3 und MRP5. Um den Einfluss zytostatischer Substanzen auf eine Veränderung der Genexpression und somit eine mögliche sekundäre Resistenzausbildung durch eine Chemotherapie selbst zu erfassen, wurden die ausgewählten Zelllinien in einem weiteren Schritt mit klinisch relevanten Zytostatika behandelt. Die hierfür durchgeführten chemotherapeutischen Behandlungen basierten auf Monotherapien mit jeweils 5-Fluorouracil, Cisplatin und Gemcitabin, wie auch der Kombinationsbehandlung von 5-Fluorouracil plus Cisplatin. Die Karzinomzellen, die nach der Selektion durch die chemotherapeutischen Interventionen weiter kultiviert werden konnten, wurden erneut den Analysen der Genexpression zugeführt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollte die Fragestellung klären, ob humane Pankreaskarzinom-Zelllinien Multidrug Resistenz vermittelnde Genprodukte aufweisen und ob sich nach beendeter chemotherapeutischer Intervention Veränderungen bezüglich dieses Expressionsprofils dokumentieren lassen. Im Hinblick auf die Darstellung der Multidrug Resistenz vermittelnder Gene und Proteine, ließe sich dann ein Zusammenhang zu einer möglichen intrinsischen oder auch zytostatisch induzierten sekundären Multidrug Resistenz herstellen.

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR belegten, dass alle untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Multidrug Resistenz-vermittelnde Genprodukte aufwiesen mit deutlicher Präsenz der MRPs. Die mRNA der P-Glykoproteine (MDR-1 und MDR-3) ließ sich hingegen nur äußerst gering und für einzelne Zelllinien gar nicht nachweisen. Die weiteren Analysen nach *in vitro* Therapie, ließen eindeutig veränderte Expressionsprofile erkennen. Es zeigten sich hierbei Über-, aber auch Unterexpressionen unterschiedlichen Ausmaßes. Zusätzlich sollte die Bestimmung der entsprechenden transmembranen Proteine, die letztendlich die Chemoresistenzen vermitteln darlegen, ob eine veränderte Transkription mit einer veränderten Proteinexpression assoziiert ist.

Die durchflusszytometrische Darstellung der membranständigen Transportproteine, die an einigen ausgewählten Beispielen die Messdaten der quantitativen RT-PCR belegen sollte, wies eindeutig vorhandene Proteine und geringer auch Veränderungen der Expression nach, konnte aber die deutlichen Überexpressionen der Transkriptionsprodukte nicht bestätigen. Die gesammelten Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass einige Zelllinien bereits vor den chemotherapeutischen Behandlungen deutliche Expressionen Multidrug Resistenz-assoziiierter Proteine

(MRPs) aufwiesen und hierdurch eine mögliche intrinsische Multidrug Resistenz vermittelt wird. Dies ließ sich am ehesten auf eine deutlich vorhandene Präsenz von MRP3 und MRP1, geringer auch von MRP5 und MRP2 zurückführen. Außerdem deuteten die Messergebnisse im Anschluss an die zytostatischen Therapien darauf, dass einige Zelllinien über den Mechanismus einer gesteigerten Expression der genannten MRPs, sekundär, eine Multidrug Resistenz ausbildeten. Für diese Resistenzausbildung konnte hingegen nach den vorliegenden Daten eine Beteiligung von MDR-1 und MDR-3 nahezu ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegten, dass Multidrug Resistenz vermittelnde Genprodukte in humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien nachweisbar waren und, dass diese durch die Anpassung ihrer Genexpression, auch bedingt durch zytostatische Therapien, an einer möglichen zellulären Resistenzausbildung beteiligt sein könnten.