

Peter Grabner  
Dr. med.

Expression von Resistenzfaktoren (P-170, GST-(, Katalase) und Onkoproteinen (c-Fos, EGF-R) bei Nagetier-Zelllinien nach kurzzeitiger Exposition zu Doxorubicin, Ethanol und Coffein

Geboren am 03.08.1964 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 22.05.1984 in Neckargemünd  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1987 bis SS 1997  
Physikum am 29.08.1989 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Pforzheim  
Staatsexamen am 12.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. M. Volm

An tierischen Zell- und Tumorlinien wurde der Einfluß einer kurzzeitigen Doxorubicin-, Ethanol- und Coffein-Exposition auf die Expression von verschiedenen Resistenzproteinen und Onkoproteinen untersucht. Als Resistenzproteine wurden P-Glykoprotein (P-170), Glutathion S-Transferase-(GST-( und Katalase, und aus der Gruppe der Onkoproteine wurden c-Fos und der EGF-Rezeptor (EGF-R) analysiert.

Es wurde gezeigt, daß die Expression von Resistenzproteinen sowohl auf mRNA-Ebene (Northern-blotting) als auch auf Protein-Ebene (Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode) nachweisbar ist. Da mit der zuletzt genannten, immunocytochemischen Methode zusätzlich die Heterogenität der einzelnen Zellen bezüglich der Expression des jeweils untersuchten Proteins beurteilt werden konnte, wurde diese Methode für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Bei neun Zelllinien (NIH 3T3, Zajdela, Colon 26, CD 3575, MH 3924, AH 130, Hep F1, RYH, L1210) wurde die Expression von P-170, GST-( und c-Fos nach 24-stündiger Exposition zu Doxorubicin, Ethanol und Coffein bestimmt. Bei einzelnen Zelllinien wurde der zeitliche Verlauf der P-170, GST-(, Katalase, c-Fos und EGF-R Expression nach einmaliger Behandlung mit Doxorubicin (4 Linien), Ethanol und Coffein (2 Linien) über einen Zeitraum von 96 Stunden analysiert.

Während bei einigen Zelllinien keine Veränderungen nach Gabe der Agentien festgestellt werden konnten, zeigten andere Linien deutliche Veränderungen. Nach einer Behandlung mit Doxorubicin wurde bei den Zelllinien NIH 3T3 und Zajdela eine erhöhte Expression aller fünf untersuchten Parameter nachgewiesen. Bei der Zelllinie Colon 26 ließen sich P-170 und c-Fos induzieren, während bei L1210 Zellen keine Veränderungen beobachtet wurden. Nach einer Ethanol-Exposition wurden bei der Zelllinie NIH 3T3 wiederum alle untersuchten Parameter vermehrt exprimiert und nach einer Behandlung mit Coffein wurde bei dieser Zelllinie ein Anstieg von P-170, GST-( und c-Fos gefunden. Die Katalase und der EGF-Rezeptor ließen sich nicht durch Coffein induzieren. Bei der Zelllinie Zajdela wurde die Expression der untersuchten Proteine weder durch Ethanol noch durch Coffein erhöht.

Die Untersuchungen zeigten, daß Doxorubicin der stärkste Induktor war, gefolgt von Ethanol und Coffein. Die Induktion der Proteine trat jeweils innerhalb von 36 Stunden auf. In der Regel fiel die Expression innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 96 Stunden wieder auf Kontrollwerte zurück oder war rückläufig. Die Resistenzproteine P-170 und GST-( wurden häufig gemeinsam überexprimiert, ein Ergebnis, das auf eine gemeinsame Regulation der beiden Proteine hindeutet. Da sowohl P-170 als auch GST-( eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 besitzen, wird eine gemeinsame Regulation durch diesen AP-1 Faktor, der von den beiden Onkoproteinen c-Fos und c-Jun gebildet wird, angenommen. In Übereinstimmung mit dieser Ansicht konnte in dieser Dissertation in allen

Fällen, in denen ein Anstieg der P-170 und/oder GST- $\alpha$  Expression gefunden wurde, auch eine Erhöhung der c-Fos Expression nachgewiesen werden.

Bei den Zelllinien NIH 3T3 und Zajdela wurde die Resistenz nach einer Behandlung mit Doxorubicin (1  $\mu$ g/ml, 24 Stunden) mit dem Nukleotid-Inkorporationstest bestimmt. Die mit Doxorubicin vorbehandelten Zellen waren deutlich resistenter gegen diese Substanz als die unbehandelten Kontrollzellen.

Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit Doxorubicin, Ethanol bzw. Coffein wurde bei NIH 3T3 Zellen eine im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen verminderte Akkumulation von Rhodamin 123 nachgewiesen. Die verminderte R123 Akkumulation korrelierte mit der erhöhten Expression von P-Glykoprotein und zeigte, daß dieses Transportprotein funktionsfähig war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, Resistenz- und Onkoproteine mit verschiedenen Agentien zu induzieren. Die Zeitspanne, die zwischen der Applikation der Substanzen und dem Anstieg der Resistenzproteine liegt, ist zu kurz, um das Ergebnis mit einer Selektion von resistenten Zellen zu erklären. Die schnelle und in der Regel vorübergehende Erhöhung der P-170, GST- $\alpha$  und Katalase Expression ist vielmehr eine direkte Reaktion der einzelnen Zellen auf die durch Doxorubicin, Ethanol und Coffein verursachte akute Zellschädigung. Die schnelle Induktion von Resistenzfaktoren, zum Beispiel nach einer Doxorubicin-Behandlung, könnte auch das Versagen einer Chemotherapie bei zuvor als sensitiv getesteten Tumoren erklären.