

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin

Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin

Prof. Dr. med. Keilholz

Multidrug Resistenz-assoziierte Gene und –Proteine
in humanen Kolonkarzinomgeweben

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Andrea Dach

aus : Frankenthal

Referent: Prof. Dr. med. U. Keilholz

Korreferent: PD Dr. med. T. Schöneberg

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.12.2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin in der Medizinischen Klinik III, Hämatologie und Onkologie (Leiter Prof. Dr. E. Thiel) im Labor von Prof. Dr. U. Keilholz und im immunhistologischen Labor des Instituts für Pathologie (Leiter Prof. Dr. H. Stein) durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Keilholz für die Überlassung des Themas dieser Promotionsarbeit, für die Unterstützung während der Erstellung der Arbeit, die Möglichkeit, zahlreiche in vitro Methoden zu erlernen und anzuwenden, sowie Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten zu Erlangen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. N. Max und Frau Dr. A. Perez-Canto für die theoretischen Einführungen, ihre kritische Begleitung meiner Arbeit, ihre Einführung in die molekularbiologischen bzw. immunhistologischen Techniken und die Bereitschaft, alle meine Fragen zu jedem Zeitpunkt zu beantworten.

Dank gebührt auch den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau K. Heufelder und Frau H. Protz für ihre ständige Hilfsbereitschaft, freundliche Begleitung und Einführungen in die verschiedenen Arbeitstechniken.

Ich danke meinen Eltern, Holger und Gilsa Dach, für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, die stetigen Ermutigungen und die Ermöglichung des Hochschulstudiums.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 3
1.1. Das Problem der Zytostatikaresistenz	S. 3
1.2. Biochemische Resistenzmechanismen	S. 3
1.3. Allgemeine Einführung in die Multidrug Resistenz (MDR)	S. 3
1.4. Das P-Glykoprotein (Pgp)	S. 4
1.5. Das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein (MRP)	S. 7
1.6. Das Lungen Resistenz-assoziierte Protein (LRP)	S. 10
1.7. Das Kolonkarzinom	S. 12
1.8. Aufgabenstellung	S. 13
2. Material und Methoden	S. 14
2.1. Abkürzungen	S. 14
2.2. Geräte	S. 15
2.3. Materialien für molekularbiologische und immunhistologische Arbeiten	S. 16
2.4. Lösungen und Puffer	S. 17
2.5. Patientenmaterial	S. 19
2.6. RNA-Extraktion	S. 20
2.7. Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit	S. 21
2.8. Reverse Transkription	S. 21
2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 22
2.9.1. Semiquantitative PCR	S. 22
2.9.2. Quantitative Real-Time online PCR	S. 24
2.10. Gelelektrophorese	S. 25
2.11. Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)	S. 26
2.12. Statistische Auswertung	S. 27
3. Ergebnisse	S. 28
3.1. Transkriptionsebene	S. 28
3.1.1. Konventionelle PCR	S. 28
3.1.2. Light Cyclers	S. 34

3.2.	Translationsebene	S. 42
3.3.	Vergleich Transkriptions- Translationsebene	S. 50
3.3.1.	Light Cycler PCR versus Immunhistochemie (IHC)	S. 50
3.3.2.	Konventionelle PCR versus Immunhistochemie	S. 53
3.4.	Vergleich Light Cycler-konventionelle PCR	S. 56
4.	Diskussion	S. 59
4.1.	Polymerase-Kettenreaktion	S. 59
4.2.	Vergleich der semiquantitativen PCR mit dem Light Cycler System	S. 61
4.3.	Immunhistochemischer Proteinnachweis	S. 62
4.4.	Vergleich Transkriptions- und Translationsebene	S. 63
4.5.	Ausblick	S. 64
5.	Zusammenfassung	S. 65
6.	Anhang	S. 67
6.1.	Patientendaten	S. 67
6.2.	Ergebnisse der konventionellen PCR	S. 68
6.3.	Ergebnisse der Real-Time RT-PCR	S. 69
6.4.	Schmelzkurvenanalysen der RT-PCR mit dem Light Cycler	S. 70
6.5.	Nachweis von β 2M-Transkripten mit der Real Time RT-PCR	S. 74
6.6.	Abbildungsverzeichnis	S. 75
6.7.	Tabellenverzeichnis	S. 77
7.	Literaturverzeichnis	S. 78