

1. Einleitung

1.1. Das Problem der Zytostatikaresistenz

Die Zytostatikaresistenz ist ein ernstzunehmendes Problem für die erfolgreiche Therapie von Tumorpatienten. Man unterscheidet intrinsische und extrinsische Resistenz. Bei intrinsischer Resistenz (primäre Resistenz) ist bereits a priori, z.B. genetisch bedingt, ohne vorausgegangene zytostatische Therapie eine schlechte Chemosensitivität des Tumors zu verzeichnen. Dies ist bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber und der Niere häufig zu beobachten. Bei der extrinsischen (sekundären, erworbenen) Resistenz werden einige der initial sensitiven Zellen erst während der Behandlung gegenüber dem Medikament resistent. Da die resistenten Zellen während der Chemotherapie einen Selektionsvorteil besitzen, bilden sie schließlich die vorherrschende Zellpopulation im Tumor.

1.2. Biochemische Resistenzmechanismen

Man kann im wesentlichen fünf Hauptmechanismen der Resistenzentstehung unterscheiden:

- Beeinflussung des Transports und der Aufnahme des Substrates in die Zelle
- Reduzierte Aktivierung bzw. erhöhte Deaktivierung und Abgrenzung des Substrates vom Angriffspunkt
- Veränderungen am Wirkungspunkt des Substrates
- Verstärkte Reparatur von Zytostatika verursachten Schäden
- Erhöhter Substratausstrom aus der Zelle und/oder dem Zellkern

1.3. Allgemeine Einführung in die Multidrug Resistenz (MDR)

Um das Entstehen einer Resistenz zu verhindern oder zu verzögern, wurde die kombinierte Chemotherapie entwickelt, in der mehrere Zytostatika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen nach einem bestimmten Schema appliziert werden. Man hoffte, so die Entstehung eines resistenten Tumors zu verhindern, da die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung mehrerer Resistenzen innerhalb eines Tumors sehr gering ist. Tatsächlich erzielte man damit hohe Heilungsraten bei einigen Formen der Leukämie im Kindesalter und

beim Morbus Hodgkin. Dennoch entwickelten viele Tumorentitäten, wie z.B. Tumoren des Magen-Darm-Traktes, der Lunge, der Leber und der Mamma, eine Resistenz gegen die eingesetzten zytostatischen Medikamente. Durch einen einzelnen Effekt wurde eine Kreuzresistenz gegen ein breites Spektrum chemisch nicht verwandter Substanzen, genannt Multidrug Resistenz (MDR), ausgelöst.

Ein enormer Fortschritt zum Verständnis des Multidrug Resistenz-Phänotyps wurde durch die Identifizierung der MDR-assoziierten Proteine und die Charakterisierung ihrer Struktur und Funktion erreicht.

1.4. Das P-Glykoprotein (Pgp)

Das P-Glykoprotein wurde erstmals 1976 von Juliano und Ling identifiziert, die in Colchicin-resistenten Hamsterzelllinien die Überexpression eines hochmolekularen, glykosylierten Membranproteins beobachteten. Die Menge des Pgp in der Plasmamembran korrelierte mit dem Ausmaß der Resistenz (39).

Das für das P-Glykoprotein kodierende Gen wird als *mdr1* bezeichnet und wurde erstmals 1986 von Ueda und Gros kloniert und sequenziert (21, 85). *mdr1* hat eine Größe von etwa 120 kb und umfasst 26 Exons sowie 28 Introns. Beim Menschen fanden sich zwei *mdr*-Gene (*mdr1* und *mdr2*), deren Aminosäuresequenzen zu 80 % homolog sind und die sich beide auf Chromosom 7 innerhalb eines Bereiches von 330 kb befinden (4, 66). Es vermittelt jedoch nur das *mdr1*-Genprodukt die klassische Multidrug Resistenz, die Funktion des durch *mdr2* kodierten Proteins ist bislang unbekannt. Bei Hamstern und Mäusen konnten im Gegensatz zum Menschen je drei *mdr*-Gene (*pgp1*, *pgp2*, *pgp3* bzw. *mdr1*, *mdr2*, *mdr3*) identifiziert werden (14, 17, 22). Das menschliche *mdr1*-Gen entspricht dem *mdr1* und *mdr3* der Maus und *pgp1* und *pgp2* des Hamsters, was auf einen gemeinsamen Ursprung in der Evolution hinweist.

Das P-Glykoprotein hat ein Molekulargewicht von 170 kDa. Es besteht aus 1280 Aminosäuren und enthält zwei zu 43 % identische Hälften. Jede homologe Hälfte besteht aus einer N-terminalen hydrophoben und einer C-terminalen hydrophilen Sequenz. Jede hydrophobe Sequenz enthält ihrerseits sechs transmembranäre Segmente. Der hydrophile Teil ist mit einer Nukleotidbindungsstelle für ATP versehen. Das Protein ist so orientiert, dass die ATP-Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Seite liegt. Die insgesamt zwölf transmembranären Segmente des Moleküls lagern sich zu einer zwölfeckigen, ca. 5 nm großen Pore und damit zu einem Membrankanal zusammen, durch den die Substrate

ausgeschleust werden (3). Die Amino- und die Carboxylhälften des Proteins werden durch die so genannte „Linker“-Region verbunden. Bei der Klasse von P-Glykoproteinen, die in der Lage sind, Resistenz zu vermitteln, enthalten diese Regionen jeweils übereinstimmende Sequenzen für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen (30). Ähnliche Bindungsstellen wurden in der ersten zytoplasmatischen Domäne der zwei humanen P-Glykoproteine gefunden, jedoch nicht in den Hamster- oder Maushomologen. Es besteht eine auffallende Übereinstimmung der ATP-bindenden Domäne aller P-Glykoproteine mit anderen Transportproteinen. Diese bilden zusammen eine Superfamilie von Proteinen, genannt ATP-binding cassette (ABC), welche die Energie von ATP für verschiedene Funktionen nutzen, meistens in Verbindung mit transmembranärem Transport, und die in vielen verschiedenen Organismen vorkommen. Die Expression von P-Glykoprotein in Normalgewebe wurde vor allem in Epithelzellen mit sekretorischer und exkretorischer Funktion gefunden (12). Es konnte u.a. im Epithel des Gastrointestinaltraktes, der Bronchien und der Brustdrüse nachgewiesen werden (87). Die physiologische Aufgabe von Pgp ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass es eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation der Zellen spielt. Da es in normalen Geweben hauptsächlich in Bereichen exprimiert wird, die mit Ausscheidungs- und Transportprozessen zu tun haben, könnte man daraus schließen, dass Pgp eine sekretorische Funktion hat. Das P-Glykoprotein hat primär die Funktion eines aktiven ATP-abhängigen Zellmembrantransportproteins. Unter ATP-Verbrauch transportiert es Substanzen aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum.

Substrate des P-Glykoproteins (5):

resistent		sensitiv
Chemotherapeutika	andere	Chemotherapeutika
Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin	Colchicin Puromycin	5-Fluorouracil Cytosinarabinosid
Anthracycline Daunorubicin, Doxorubicin	Podophyllotoxin Ethidiumbromid	Methotrexat Chlorambucil
Mitoxantron	Emetin	Melphalan
Epipodophyllotoxine Etoposid, Teniposid	Gramicidin D Valinomycin	Cyclophosphamid Carmustin
Mitomycin C		Bleomycin
Actinomycin D		Camptothecin
Taxol		
Topotecan		
Mithramycin		

Die Überexpression des Pgp im Tumorgewebe kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden. In Nagetierzelllinien geschieht dies meist durch Genamplifikation. In menschlichen Zelllinien ist erhöhte *mdr1* Expression hingegen nicht darauf zurückzuführen (76). Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte der Phosphorylierungsgrad des Proteins sein, da nach Behandlung der Zellen mit Phorbolestern oder Kalziumkanalblockern, die eine Reversion des MDR-Phänotypes bewirken, eine gesteigerte Phosphorylierung beobachtet wurde (24). Es wurde bereits eine Reihe von Substanzen gefunden, welche die reduzierte Substratakkumulation in resistenten Zellen aufheben und somit Multidrug Resistenz überwinden. Solche Substanzen werden Modulatoren oder auch Chemosensitizer genannt. So wurde der zytotoxische Effekt von Daunorubicin, Adriamycin, Vincristin und Vinblastin in Multidrug resistenten Zellen durch gleichzeitige Gabe von Strukturanaloga potenziert. Diese Analoga besaßen bei den verwendeten Konzentrationen keine eigene Zytotoxizität, verstärkten aber die Zytotoxizität der Therapeutika, indem sie den Auswärtstransport der Zytostatika verhinderten und so die intrazelluläre Akkumulation verstärkten. Interessanterweise konnten Strukturanaloga der Vinca-Alkaloide auch die Wirkung der Anthracycline potenzieren und vice versa (32, 33). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass

nicht-zytotoxische Dosen des Kalziumkanalblockers Verapamil den Effekt von Vinca-Alkaloiden verstärken. Ebenso können andere Kalziumkanalblocker und Calmodulininhibitoren, wie Trifluorperzin und Reserpin die Akkumulation und Retention von Vincristin, Adriamycin und Daunorubicin verstärken (83, 84). Auf der Suche nach Möglichkeiten zur Umgehung der MDR wurden einige weitere Chemosensitizer gefunden, die weder Kalziumkanalblocker noch Calmodulininhibitoren sind, wie Chinidin, Chloroquin, Tamoxifen, Propranolol, synthetische Isoprenoide und Cyclosporin A (13, 60, 65, 77, 78, 93). Diese Komponenten können Resistenz gegen eine Reihe von Zytostatika, wie Vinblastin, Vincristin, Daunorubicin, Adriamycin, Colchicin und Aktinomycin D, überwinden.

1.5. Das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein (MRP)

1992 wurde von Cole et al. erstmals eine 6,5 kb mRNA in der nicht P-Glykoprotein-resistenten kleinzelligen Lungentumorzelllinie H69AR identifiziert, die in den resistenten Zellen ca. 100 mal stärker exprimiert wurde als in nicht resistenten. Sequenzierung der cDNA ergab, dass sie für ein 1531 Aminosäuren langes Protein kodiert, genannt Multidrug Resistenz-assoziiertes Protein (MRP) (7, 8).

Das *mrp*-Gen wurde auf Chromosom 16, Bande p13.13-13.12 kartiert. Die Hochregulation von *mrp* geschieht nicht durch Genamplifikation, sondern entweder durch vermehrte Transkription oder eventuell durch Stabilitätsänderungen der mRNA (7, 53).

Das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein gehört wie Pgp zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) (20, 22, 28, 45, 67, 86, 92). Diese Proteine transportieren Substrate unter ATP-Hydrolyse durch zelluläre oder intrazelluläre Membranen und besitzen eine gemeinsame Molekularstruktur. Sie sind Kombinationen von Nukleotid- (ATP) bindenden ABC-Untereinheiten und charakteristischen membranständigen Domänen (88). In den letzten Jahren wurden mehrere Homologe von MRP identifiziert, die eine mögliche Untergruppe der ABC-Transporter darstellen. Es existieren fünf eng verwandte humane MRP Homologe. Das MRP1 ist das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein, beschrieben 1992 von Cole et al. (7), MRP2 ist MOAT, der multispezifische organische Anionentransporter, der konjugierte Gallensalze transportiert (64). Die neuesten entdeckten Verwandten sind MRP3, MRP4 und MRP5, deren vollständige Sequenz und physiologische Aufgabe noch unbekannt ist. Aufgrund ihrer Gewebelokalisation wird jedoch vermutet, dass sie eine Rolle im Detoxifikationsprozess der Zelle spielen, indem sie organische Anionen und/oder ihre

Konjugate transportieren, ähnlich dem MRP1 und MRP2 (44). MRP und Pgp haben zwar nur eine Sequenzhomologie von 15 %, besitzen jedoch eine große Ähnlichkeit in ihren zytoplasmatischen Nukleotidbindungsstellen. MRP besitzt zwölf transmembranäre Segmente, ähnlich denen des Pgp, und darüber hinaus eine NH₂-proximale hydrophobe Domäne von ca. 230 Aminosäuren mit bis zu sechs zusätzlichen membranübergreifenden Helices (46, 53). Die Aminosäuresequenz von MRP enthält potentielle Bindungsstellen für eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein glykosyliert und phosphoryliert wird. Das unmodifizierte MRP hat eine molekulare Masse von 170 kDa und wird durch Hinzufügen N-gebundener komplexer Oligosaccharide in die reife 190 kDa Form gebracht. Nur zwei oder drei der insgesamt elf vorhandenen potentiellen Glykosylierungsstellen befinden sich außerhalb der Plasmamembran, je nach Positionierung der transmembranären Helices. Vermutlich ist sowohl die NH₂- als auch die COOH-Hälfte des Proteins glykosyliert (46).

MRP hat eine hohe Affinität zu Cystein-Leukotrienen, vor allem zu dem GSH-Konjugat LTC₄. Dieses Arachidonsäurederivat und seine Metaboliten LTD₄ und LTE₄ sind aktive Komponenten der langsamen anaphylaktischen Reaktion. Sie spielen bei der Kontrolle der Gefäßpermeabilität und langsamen Muskelkontraktion eine Rolle und wurden mit der Pathogenese des Asthmas in Verbindung gebracht. Es wurden eine Reihe weiterer physiologischer Substrate für MRP identifiziert, unter anderem Glutathiondisulfid und steroidale Glucuronide z.B. von 17β-Östradiol (37, 38, 46, 50, 51, 53, 59). MRP-Expression ist ausreichend, um gegen eine Reihe von lipophilen Zytostatika Resistenz zu vermitteln, mit der speziellen Ausnahme von Paclitaxel und Mitoxantron. Die Besonderheit von MRP ist seine Substratspezifität für amphiphile Anionen und Glutathion-, Glukuronat-, und Sulfat-Konjugate von Zytostatika, wie Anthracycline, Vinca-Alkaloide und Etoposide (9, 15, 20, 45, 92).

Substrate von MRP (52):

Glucuronate	Glutathione	Sulfate
Etoposid	Doxorubicin	Gallensalze
Östradiol	Daunorubicin	
Bilirubin	Etoposid	
Gallensalze	Vincristin	
	Melphalan	
	Leukotriene, LTC ₄	

In Normalgeweben konnte MRP-Expression u.a. in Lunge, Nebenniere, Leber, Hoden, Colon und Duodenum nachgewiesen werden. Relativ hohe Expression wurde in der Nebenniere und im Hoden, geringe dagegen in Leber und Colon gefunden. Die physiologische Rolle von MRP in diesen Geweben ist nicht bekannt und es wurde bislang die relative Menge an vorhandenem funktionellen MRP nicht gemessen (53, 91). Bei dem Multidrug Resistenz-assoziierten Protein sind die für das P-Glykoprotein bereits beschriebenen effizienten Chemosensitizer meist nicht aktiv. So zeigen zum Beispiel Verapamil und Cyclosporin A normalerweise keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die MRP-assoziierte Resistenz. Komponenten, die bislang als Modulatoren der Zytostatikasensitivität für MRP beschrieben wurden, sind die Dihydropyridine Nicardapin und NIK 250, das Chinolon Difloxacin, der Bisindolymaleimid Proteinkinase C-Inhibitor GF109203X, der LTD₄ Rezeptorantagonist MK 571, das Tiapamilanalog DMDP, der Isoflavanoid Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein, das Cyclosporinanalogue PSC 833 und das dijodierte Benzofuran Amidaron. Der Effekt dieser Chemosensitizer ist jedoch oft von dem eingesetzten Zytostatikum und der Art des Gewebes abhängig (46, 53).

1.6. Das Lungen Resistenz-assoziierte Protein (LRP)

1993 entdeckten Scheper et al. in einer Multidrug resistenten Bronchialkarzinomzelllinie das so genannte Lungen Resistenz-assoziierte Protein (LRP) (71). In der revertierten Zelllinie, d.h. nach neunmonatiger Kultivierung der Zellen ohne Zytostatika, wurde eine Abnahme des Resistenzniveaus im Vergleich zur parentalen Zelllinie erzielt. Zudem wurde eine Abnahme der LRP-Expression beobachtet, was einen engen Zusammenhang zwischen LRP und Multidrug Resistenz in den Bronchialkarzinomzellen vermuten lässt. LRP konnte in Tumorzelllinien unterschiedlichen histogenetischen Ursprungs nachgewiesen werden, die weder Pgp noch MRP exprimieren (71). Die 1995 von Scheffer et al. isolierte cDNA für LRP kodiert für ein 896 Aminosäuren langes Protein mit einer Molekülmasse von 110 kDa. Das *lrp* wurde auf dem kurzen Arm des Chromosom 16, in der 16p11.2-16p13.1 chromosomalen Region lokalisiert, etwa 27 cM vom *mrp*-Genort entfernt (70, 79). Im Gegensatz zu den Multidrug Resistenz-assoziierten Proteinen Pgp und MRP konnten bei LRP keine für ABC-Transporter charakteristischen transmembranären Fragmente oder ATP-bindenden Domänen entdeckt werden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Proteinsequenzen von LRP und dem major vault protein (MVP) der Ratte zu 87,7% identisch sind. Daraus konnte geschlossen werden, dass LRP das menschliche MVP ist (43, 70, 89). Vaults wurden zum ersten Mal 1986 von Kedersha und Rome beschrieben (40). Sie sind Ribonukleotidpartikel, die aus einem major vault protein (MVP) von 104 kDa (70 % der Molekülmasse des Partikels), drei minor vault proteins von 210, 192 und 54 kDa und einem kleinen Vault-RNA Molekül bestehen. Die Vault-Komponenten sind in einer zylindrischen Form von ca. 57 x 32 nm mit einer Molekülmasse von ca. 13 MDa angeordnet und stellen damit den bisher größten dokumentierten Ribonukleotidkörper dar (dreimal größer als ein Ribosom). Das Vault-Partikel hat eine zweifach symmetrische Form. Jede Hälfte öffnet sich in eine blumenartige Struktur, die acht „Blütenblätter“ enthält, welche einen zentralen Ring umgeben (42, 68). Diese dynamischen Strukturvariationen spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Funktion der Vaults. Die Transfektion des *lrp*-Gens alleine konnte keine Resistenz vermitteln, was bedeutet, dass das komplette Vaultpartikel für die Funktionalität notwendig ist (70). Die meisten Vaults sind im Zytoplasma lokalisiert und nur ein kleiner Teil, ca. fünf Prozent, der Vaults befinden sich an der Kernmembran und am Kernporenkomplex (6, 68). Strukturelle Ähnlichkeiten lassen vermuten, dass Vaults die zentralen Verschlussmechanismen des Kernporenkomplexes darstellen. Vaults wurden auch zahlreich in cholinergen Nervenendigungen in der unmittelbaren Nähe von synaptischen Vesikeln gefunden (27). Der

monoklonale Antikörper LRP-56 zeigte dementsprechend eine charakteristische zytoplasmatische granuläre Färbung in den Bronchialkarzinomzellen. Das Fehlen einer eindeutigen Kernfärbung kann evtl. auf ihr geringes Vorhandensein an der Kernmembran und auf Signalmaskierung durch die zytoplasmatischen Vaults zurückgeführt werden (6, 34, 71). Die genaue Funktion der Vaults ist unbekannt. Möglicherweise vermitteln sie den bidirektionalen Transport einer Reihe von Substraten zwischen dem Kern und dem Zytoplasma. Aufgrund der Assoziation der Vaults mit den synaptischen Vesikeln in Nervenendigungen wird auch diskutiert, ob sie eventuell in vesikuläre Transportprozesse verwickelt sind (6, 27, 40, 68). Wie auch bei LRP beobachtet werden konnte, betreiben MDR-Zellen eine Wegverteilung der Zytostatika vom Kern, wohingegen parentale Zellen Substrate diffus im Kern und Zytoplasma verteilen (10, 19, 29, 75). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Vaults sowohl durch nukleären Transport der Zytostatika als auch durch ihre zytoplasmatische Rückverteilung in Vesikeln die Zytostatika von ihren Angriffspunkten im Kern fernhalten (36). In Normalgewebe wurde hohe LRP-Expression u. a. in Epithelzellen der Bronchien und des Verdauungstraktes, der Niere und der Nebennierenrinde gefunden (34, 35, 82). Starke LRP-Expression konnte also v.a. in Geweben nachgewiesen werden, die chronisch Fremdstoffen ausgesetzt und/oder metabolisch aktiv sind. An diesen Stellen übernehmen sie möglicherweise eine Schutzrolle gegenüber toxischen Substanzen. Vaults werden in Epithelzellen und Makrophagen verschiedener Spezies, wie z.B. Amoeben, Amphibien und Säugetieren, stark exprimiert und sind auch in Fibroblasten nachweisbar. Neben diesem hohen Grad an struktureller und morphologischer Konservierung der Vaults spricht die ähnliche Verteilung in den Zellen dafür, dass ihre Funktion für eukaryotische Zellen essentiell ist (34, 41, 68).

1.7. Das Kolonkarzinom

Das Dickdarmkarzinom ist derzeit der zweithäufigste Krebs beim Mann und nach den gynäkologischen der dritthäufigste bei der Frau. Die Inzidenz nimmt ständig zu, zeigt jedoch regionale Unterschiede. Im Moment gehen in den westlichen Ländern ca. 20 % aller zum Tode führenden malignen Erkrankungen auf kolorektale Neoplasien zurück (81). Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen 50 und 80 Jahren.

Dickdarmkarzinome zählen histologisch in bis zu 80 % der Fälle zu den Adenokarzinomen.

Staging kolorektaler Karzinome:

UICC	Definition	TNM	Dukes
0	Carcinoma in situ	TIS N0 M0	
Ia	Beschränkung auf Mucosa u. Submucosa	T1 N0 M0	A
Ib	Infiltration der Muscularis propria	T2 N0 M0	
IIa	Infiltration aller Wandschichten,	T3 N0 M0	B
IIb	Überschreitung der Darmwand	T4 N0 M0	
IIIa	Infiltration regionaler Lymphknoten	Tx N1 M0	C
IIIb	Infiltration der Umgebung	Tx N2-3 M0	
IV	Fernmetastasen	Tx Nx M1	D

(74)

Die Therapie kolorektaler Karzinome ist primär chirurgisch. Es konnte die Wirksamkeit einer adjuvanten Chemotherapie für Patienten im Stadium Dukes C mit Folsäure/5-Fluoruracil (5-FU) in mehreren Studien belegt werden. Bei bestehender Unverträglichkeit von 5-FU ist die Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper 17-1 A eine Alternative. Für Patienten mit Rektumkarzinomen in den Stadien Dukes B und C ist eine Verminderung der Rezidivrate und eine Verlängerung der Überlebenszeit durch eine kombinierte postoperative Strahlen-/Chemotherapie mit 5-FU nachgewiesen.

1.8. Aufgabenstellung

Die Entwicklung von Multidrug Resistenz (MDR) spielt eine wichtige Rolle in der Therapie maligner Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass für dieses Phänomen im wesentlichen drei MDR-assoziierte Proteine verantwortlich sind: das P-Glykoprotein (Pgp), kodiert von *mdr1* auf Chromosom 7, das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein (MRP), kodiert von *mrp*, und das Lungen-Resistenzprotein (LRP), kodiert von *lrp*, beide auf Chromosom 16 lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden bei 31 Kolonkarzinompatienten die Expressionsmuster der MDR-assoziierten Gene und -Proteine mittels immunhistochemischer und molekulargenetischer Methoden untersucht. Es kamen dabei auf Translationsebene die APAAP-Methode und auf Transkriptionsebene zwei unterschiedliche PCR-Methoden, zum einen die herkömmliche semiquantitative- und zum anderen die Real-Time RT-PCR, zur Anwendung.

Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

- Inwieweit lassen sich die MDR-assoziierten Gene und -Proteine mit den hier verwendeten Methoden nachweisen ?
- Besteht eine Korrelation der MDR-assoziierten Gene und -Proteine untereinander und zwischen Translations- und Transkriptionsebene ?
- Korrelieren die Ergebnisse der zwei angewandten PCR-Methoden und welche Vor- und Nachteile weisen sie auf ?