

4. Diskussion

Bei der Therapie maligner Tumoren stellt die Entwicklung von Kreuzresistenz gegen Zytostatika ein ernstzunehmendes Hindernis dar. Im wesentlichen verantwortlich für die so genannte Multidrug Resistenz (MDR) sind die mit dieser assoziierten Proteine Pgp, MRP und LRP, die von den Genen *mdr1*, *mrp* und *lrp* kodiert werden.

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen unternommen, die Multidrug Resistenz mit Modulatoren zu überwinden. Dabei liegt besonders das P-Glykoprotein im Mittelpunkt der Interessen. Eine Coexpression oder Korrelation von PGP mit anderen Resistenzgenen und -Proteinen könnte die Effizienz der Modulatoren kompensieren. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, die relative quantitative Beteiligung der verschiedenen Resistenzmechanismen zur Resistenzentstehung zu bestimmen.

Ziel dieser Arbeit waren Expressionsuntersuchungen und Korrelationsanalysen dieser Multidrug Resistenz-assoziierten Gene und Proteine in Kolonkarzinomgeweben, die mittels konventioneller PCR semiquantitativ und mittels online Real Time RT-PCR (Light Cycler System) qualitativ auf molekularer Ebene und auf Translationsebene mit der APAAP-Methode durchgeführt wurden.

Für die Korrelationsanalysen kamen sowohl der Pearson'sche Maßkorrelationskoeffizient als auch der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient zur Anwendung. Beide statistischen Methoden sind standardisierte Tests, die sich an Signifikanzen orientieren und daher sehr zuverlässig sind. Es wurden außerdem Punktdiagramme angefertigt, die jedoch allein zur Illustration der statistischen Tests dienen sollten und keine statistische Aussagekraft besitzen.

4.1. Polymerase-Kettenreaktion

Mittels konventioneller semiquantitativer PCR konnten sowohl *mdr1*, *mrp* als auch *lrp* nach spätestens 37 Amplifikationszyklen in allen 31 Kolonkarzinomgewebeproben nachgewiesen werden. Mit dem Light Cycler System kam eine quantitative Real-Time online PCR zum Einsatz. Hierbei wurden Fluoreszenzanstiege zwischen Zyklus x und y beobachtet. Bei drei der untersuchten Proben waren *lrp* und *mdr1* und bei einer davon auch *mrp* nicht

nachweisbar. Unterschiede der Proben hinsichtlich RNA und cDNA-Qualität wurden durch ihre relative Menge an β_2 -Mikroglobulin kompensiert.

Mit den Tests nach Pearson und Spearman wurden anschließend die Expressionsmuster der MDR-assoziierten Gene auf Korrelationen untersucht. Als Maß der Expression wurde der Quotient aus der Expression des Haushalts-Gens (β_2 M) und der des jeweiligen spezifischen Multidrug Resistenz-assoziierten Gens verwendet. Bei der herkömmlichen semiquantitativen PCR zeigte sich eine eindeutig positive Korrelation für *mrp* und *mdr1*. *lrp* und *mrp* korrelierten schwach und für *lrp* und *mdr1* konnte nur mit dem Test nach Spearman eine positive Korrelation festgestellt werden. Mit dem Light Cycler untersuchte Expressionsprofile ergaben hingegen eine eindeutig positive Korrelation für *lrp* und *mrp*. Für *mrp* und *mdr1* konnte nur mit Spearman eine schwache positive Korrelation nachgewiesen werden, während *lrp* und *mdr1* nicht korrelierten. Dies entspricht den Untersuchungen von Hart et al., Ikeda et al. und Xu et al., die eine positive Korrelation zwischen *lrp* und *mrp* bei AML- bzw. ALL-Patienten fanden (26, 31, 90). Eine positive Korrelation für *mrp* und *mdr1* bei AML-Patienten zeigten Hart et al., Lohri et al. und Zhou et al. (26, 54, 94). Hingegen konnten Gurbuxani et al., Hart et al. und Schneider et al. für *mrp* und *mdr1* in Leukämiepatienten keine Korrelation nachweisen (23, 25, 72). Entsprechend den Ergebnissen mit dem Light Cycler System fanden auch Hart et al. bei AML- Patienten zwischen *lrp* und *mdr1* keine Korrelation (26).

Sowohl für *lrp* und *mrp* als auch für *mrp* und *mdr1* wurden mit beiden PCR-Methoden positive Korrelationen festgestellt. Ursächlich für diese Co-Expressionen der Multidrug Resistenz-assoziierten Gene könnte ein gemeinsamer Induktionsmechanismus oder eine Co-Regulation sein (94). Zumindest für *lrp* und *mrp* ist dazu die molekulare Basis gegeben, da beide nur 27 cM von einander entfernt auf Chromosom 16 lokalisiert sind.

4.2. Vergleich der semiquantitativen PCR mit dem Light Cycler System

Die Ergebnisse der beiden PCR-Methoden wurden anschließend ebenfalls Korrelationsanalysen unterzogen. Es konnte bei keinem der drei Multidrug Resistenz-assoziierten Gene eine Korrelation zwischen den Expressionsergebnissen der herkömmlichen semiquantitativen PCR und der quantitativen Real-Time online PCR nachgewiesen werden.

Konventionelle semiquantitative RT-PCR-Methoden wie die kompetitive PCR bzw. Quantifizierungen durch Kombination mit Blot-Verfahren sind zeitaufwendig und arbeitsintensiv und erfordern post-PCR-Schritte, welche die Gefahr der Kontamination erhöhen (61).

Quantitative Real-Time RT-PCR (Light Cycler System) ist schneller, reproduzierbarer und genauer als die konventionelle semiquantitative PCR. Noch während der Amplifizierung erfolgt der direkte Nachweis der PCR-Produkte. Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme (linearen Logphase der PCR), der als crossing point bezeichnet wird, ist der anfänglichen PCR-Zielproduktmenge (cDNA-Menge) proportional. Die online Real-Time RT-PCR benötigt keine post-PCR-Schritte, wodurch das Kontaminationsrisiko reduziert wird. Die Zyklen dauern nicht so lange, da die Amplifizierung in speziell angefertigten Glaskapillaren erfolgt, wodurch schnelle Temperaturänderungen für jede Reaktion möglich sind. Durch die Minimierung der Denaturierungs- und Amplifizierungszeit wird die Schnelligkeit, Spezifität und die Effizienz der Reaktion verbessert. Der Nachteil des Light Cycler Systems ist die schwierige Handhabung der sehr zerbrechlichen Glaskapillaren und der geringe Platz von nur 32 Proben pro Lauf.

Ursache der mangelnden Korrelation zwischen den beiden verschiedenen PCR-Methoden könnte die Verwendung unterschiedlicher cDNA-Präparationen der einzelnen Patientenproben sein. Es wurden von jeder Patientenprobe mehrere RNAs extrahiert und cDNAs synthetisiert. Durch den relativ hohen Verbrauch an cDNA in den vielfach durchgeführten Läufen der semiquantitativen PCR wurden zum Teil cDNAs aufgebraucht und mit neu synthetisierten cDNAs weitergearbeitet. Lediglich in den später durchgeführten Expressionsanalysen mit dem Light Cycler kamen für alle Gene die gleichen cDNAs zur Anwendung. Somit sind die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR im Vergleich zur semiquantitativen PCR zuverlässiger.

4.3. Immunhistochemischer Proteinnachweis

Zum Expressionsnachweis der Multidrug Resistenz-assoziierten Proteine Pgp, MRP und LRP kam die immunhistochemische Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP) zum Einsatz. Alle 31 Kolonkarzinomgewebeproben waren positiv für MRP, LRP konnte bei drei und Pgp bei zwei Patienten nicht nachwiesen werden.

Die Korrelationsanalysen, die mit den Expressionsergebnissen der Proteine durchgeführt wurden, ergaben für Pgp und MRP, MRP und LRP, sowie für Pgp und LRP jeweils positive Korrelationen. Michieli et al. konnten bei akuten nicht lymphozytischen Leukämiepatienten (ANLL) ebenfalls eine positive Korrelation für Pgp und LRP nachweisen (58).

Diese Co-Expression aller drei Multidrug Resistenz-assoziiierter Proteine hat Einfluss auf die Versuche, die Resistenz mit Modulatoren zu überwinden. Die Effekte von Modulatoren gegen Pgp, die bisher im Mittelpunkt der Interessen standen, würden durch die co-exprimierten Resistenzproteine MRP und LRP kompensiert werden.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie hängen im Besonderen vom Fixierungsprozess, von den verwendeten Antikörpern und der Definition von Positivität der angefärbten Zellen ab (2, 18, 55). Letzteres lässt nur eine relativ subjektive Bewertung und keine quantitativen Aussagen zu. Darüber hinaus ist die Qualität immunhistochemischer Färbungen von Paraffinschnitten von möglichen Konformationsveränderungen der Epitope (Antigen-Maskierung) durch die Formalinfixierung abhängig (73). In verschiedenen Studien wurden bereits die MDR-assoziierten Proteine Pgp, MRP und LRP mittels Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern (AK) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde das P-Glykoprotein mit dem AK JSB-1, MRP mit dem AK MRP-1 und LRP mit dem AK LRP-56 detektiert. Meijer et al. arbeiteten ebenfalls mit in Paraffin gebetteten Kolonkarzinomgeweben und verwendeten dieselben monoklonalen Antikörper (56). Spoelstra et al. setzte JSB1 zum Nachweis von Pgp und Meschini et al. MRP1 für MRP und LRP-56 für LRP bei Untersuchungen von Kolonkarzinom-Zelllinien ein (57, 80). In allen drei Arbeitsgruppen bewährten sich die verwendeten Antikörper.

Der Vorteil immunhistochemischer Methoden zum Expressionsnachweis Multidrug Resistenz-assoziiierter Proteine ist, dass Expressionsprofile auf Einzelzellniveau bestimmt werden und normale von neoplastischen Zellen unterschieden werden können. Bei der

Polymerase-Kettenreaktion ist dies nicht möglich (1, 18, 55). Schroeijers et al. erzielten mit der APAAP-Methode konsistente und reproduzierbare Ergebnisse bei Expressionsuntersuchungen der Multidrug Resistenz-assoziierten Proteine in Kolonkarzinomgeweben (73).

4.4. Vergleich Transkriptions- und Translationsebene

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen auf Translations- und Transkriptionsebene auf Korrelationen überprüft. Dabei ergab sich für LRP eine eindeutig negative Korrelation zwischen der Gen- (Light Cycler) und der Proteinexpression. Für alle anderen Konstellationen wurden keine Korrelationen gefunden.

Legrand et al. und Nooter et al. konnten in normalen hämatopoetischen Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark bzw. bei Lungentumorpatienten (Plattenepithel-Ca) eine positive Korrelation für MRP zwischen mRNA und Proteinebene feststellen (47, 62), während Pall et al. in ALL- und AML-Proben für MRP keine Korrelation fanden. Bei Pall et al. korrelierte jedoch die Expression von *mdr1* mit der von Pgp (63). Ebenso fanden Charpin et al. bei Brustkrebspatienten eine positive Korrelation zwischen Pgp und *mdr1* (2). Legrand et al. konnten bei AML-Patienten keinen statistischen Zusammenhang für die Expression von LRP auf mRNA- und Proteinebene feststellen (48).

Die unterschiedlichen Expressionsmuster auf Transkriptions- und Translationsebene können durch verschiedene Faktoren, wie mRNA-Spleißvarianten, mRNA Stabilität, post-transkriptionelle Regulation der Proteinexpression oder Proteininstabilität verursacht sein (94). So ist vorstellbar, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme eventuell die mRNA-Expression bereits erhöht, die Translation aber noch nicht vollzogen ist oder im umgekehrten Fall die Expression auf Proteinebene vorliegt, die recht instabile mRNA jedoch bereits wieder abgebaut ist. Dies würde auch die negative Korrelation der vorliegenden Arbeit für LRP erklären.

4.5. Ausblick

Aufgrund mangelnder Studien, die sich mit Expressionsstärken von MDR-assoziierten Markern in Kolonkarzinomgeweben beschäftigen, konnten leider Vergleiche meist nur mit anderen untersuchten Tumorarten, vornehmlich Leukämien, vorgenommen werden.

Um die klinische Relevanz von Pgp, MRP und LRP hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft für das Ansprechen der Patienten auf eine Chemotherapie vollkommen zu erfassen, werden in der Zukunft weitere Untersuchungen erforderlich sein.

Es sollten zum einen die gefundenen Korrelationen durch Analysen eines größeren Patientenkollektivs verifiziert werden. Zum anderen ist zur Beurteilung der klinischen Relevanz die Überprüfung der vorliegenden Daten mit Patientendaten nötig. Weiterhin wäre von Interesse, die Multidrug Resistenz-assoziierten Gene und Proteine bei Patienten sowohl nach Primärdiagnose als auch nach erfolgter Chemotherapie zu detektieren, um so den Einfluss der Chemotherapie auf die entsprechenden Expressionsmuster nachzuweisen. Schließlich sollte man Expressionsmuster und Resistenzprofile von sensiblen und resistenten Zelllinien untersuchen, um diese später eventuell bei PCR-Analysen als Standard verwenden zu können.

Der Zusammenhang zwischen Überexpression bzw. Korrelation einzelner MDR-assoziiierter Gene und/oder Proteine und dem Resistenzauftreten maligner Tumoren stellt einen wichtigen Therapieaspekt dar. Der Nachweis Pgp, MRP und LRP könnte in prospektiven Untersuchungen routinemäßig zur Anwendung kommen, um auf diese Weise Patienten mit speziellen Resistenzprofilen zu identifizieren und entsprechend effiziente Therapien planen zu können.