

Atypische pleiotrope Zytostatikaresistenz (Multidrug-Resistenz) humaner Tumorzellen

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Hermann Lage

geboren am 04.01.1960 in Hamburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

eingereicht: März 2001
Tag der letzten Prüfung: 4. Dezember 2001

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Osieka
2. Prof. Dr. F. Hölzel

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	3
1.1.	Allgemeine Einführung	3
1.2.	Das klinische Problem der pleiotropen Resistenz (Multidrug-Resistenz)	5
1.3.	Chemoresistenz im Zellkulturmodell	7
1.4.	Chemoresistenzmechanismen	7
2.	Problemstellung	8
3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	9
3.1.	Zellbiologische Charakterisierung verschiedener chemoresistenter Tumorzellen bezüglich bekannter Resistenzmechanismen	9
3.2.	Suche nach neuen resistenz-assoziierten Faktoren auf Ebene der zellulären mRNA-Expression („Transcriptomics“)	10
3.3.	Suche nach neuen resistenz-assoziierten Faktoren auf Ebene der zellulären Protein-Expression („Proteomics“)	12
3.4.	Gentherapeutische Inhibition resistenz-assoziiierter Faktoren mittels Ribozymtechnologie	13
3.5.	Funktionelle Charakterisierung neuer resistenz-assoziiierter Faktoren	14
4.	Diskussion	15
5.	Literatur	19
6.	Publikationen	22
	Danksagung	25
	Eidesstattliche Versicherung	26

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Jährlich erkranken in der Bundesrepublik Deutschland etwa 350.000 Menschen neu an einem bösartigen Tumor bzw. einer malignen Systemerkrankung. Weniger als die Hälfte dieser Patienten kann mit einer definitiven Heilung rechnen. So verstarben z.B. im Jahr 1997 insgesamt 209.233 Personen an den Folgen einer Tumorerkrankung; dieses entspricht einem Anteil von 24,3 % aller Todesfälle. Zu den drei Säulen der modernen Krebsbehandlung, der Operation, der Strahlentherapie und der medikamentösen Behandlung mit Zytostatika und Hormonen kommt ein weiteres Spektrum unterstützender Maßnahmen hinzu. Bei der überwiegenden Zahl der Patienten ist eine Therapie mit primär kurativer Intention entweder von vornherein nicht möglich oder sie wird durch den späteren Nachweis einer ausgedehnten lokoregionären bzw. generalisierten Metastasierung hinfällig. Für diese Patienten bestehen nur noch Möglichkeiten einer palliativen Behandlung oder Linderung von Tumorsymptomen. Bei etwa zwei Dritteln der Patienten ist dieses Ziel erreichbar. Ein Teil von ihnen profitiert von der Behandlung nicht nur im Sinne einer Palliation, sondern auch einer Lebensverlängerung.

Eine zytostatische Chemotherapie kommt in der Regel zum Einsatz, wenn die maligne Erkrankung weit fortgeschritten oder, wie im Falle hämatologischer Malignome schon primär generalisiert sind. Aufgrund der geänderten Stoffwechsellage von Neoplasien ist es möglich, diese durch die Applikation bestimmter Substanzen in stärkerem Maße zu schädigen, als den Gesamtorganismus. So wird unter einer Chemotherapie im engeren Sinne der Einsatz von bioaktiven Substanzen verstanden, die in den Stoffwechsel maligner Zellen und derer Zellteilungsvorgänge zytostatisch oder zytotoxisch einwirken. Die dabei zum Einsatz kommenden antineoplastischen Substanzen wirken dabei prinzipiell gegen alle Zellen des Organismus, Tumorzellen zeigen jedoch aufgrund ihrer gesteigerten Proliferationsrate eine wesentlich stärkere Chemosensitivität. Mit anderen Worten: Zellen, die sich in der G₀-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus befinden – wie es für die meisten körpereigenen Zellen, insbesondere für Zellen bradytropher Gewebe gilt – werden im Gegensatz zu neoplastischen Zellen, die sich in aktiven Zellzyklusphasen befinden, von den häufig zyklusphasenspezifisch wirksamen Therapeutika, erheblich weniger beeinflusst. Bei einem Fortschreiten der malignen

Erkrankung (Progression), ist je nach Tumorentität und Therapieziel die zytostatische Therapie zu beenden.

Zur chemotherapeutischen Behandlung von Malignomen steht eine Vielzahl verschiedener Wirkstoffe mit antineoplastischen Eigenschaften aus unterschiedlichen Substanzklassen zur Verfügung. Diese unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Herkunft, ihrem Wirkungsmechanismus, ihrer Tumorspezifität und ihren Nebenwirkungen. Grundsätzlich können zwei Wirkmechanismen voneinander unterschieden werden:

- zytostatische Wirkung, d.h. die entsprechende Substanz bewirkt eine Inhibition der Zellproliferation durch Blockierung einer bestimmten Zellzyklusphase der Tumorzellen. Diese Zellzyklusblockierung ist potentiell reversibel.
- zytotoxische Wirkung, d.h. das zur Anwendung gebrachte Therapeutikum hat irreversible, letale Folgen für die Tumorzellen.

Der Übergang zwischen zytostatischer - und zytotoxischer Wirkung ist dabei fließend. In der Regel bewirken niedrigere Dosen eine Zytostase, während höhere Dosen zytotoxische Effekte zeigen. Üblicherweise werden antineoplastische Substanzen trotz dieser Unterscheidung allgemein als Zytostatika bezeichnet.

Aufgrund der enormen Bedeutung von Resistenzen gegenüber Zytostatika korrelieren die pharmakodynamischen Wirkungen meist nur sehr unzulänglich mit pharmakokinetischen Parametern. Die erreichte Dosisintensität, angegeben als verabreichte Dosis pro Zeit in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Woche}$, entspricht der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC, area under the curve) im Serum. Bei onkologischen Patienten wird der AUC oftmals beeinflusst von entstehender Hepato- und Nephropathie sowie Diarrhö, Mukositis, Pleuraerguß oder Aszites. Auch bei optimierten Serumkonzentrationen, übt die Tumervaskularisierung einen entscheidenden Einfluß auf die zu erreichende Zytostatikakonzentration im Tumor aus. Aufgrund zellulärer Resistenzmechanismen kann die Wirkstoffaufnahme des Tumors weiter reduziert werden. Im Serum kann die Proteinbindung antineoplastischer Substanzen z.B. aufgrund des Vorhandenseins von Paraproteinen stark verändert sein. Es ergibt sich daraus

eine sehr individuelle Situation für den einzelnen Patienten, für die eine Reihe von Einflußgrößen bestimmend sind. Neben der Tumorentität, der Tumorzellheterogenität und der an der Zielzelle erreichbaren Zytostatikakonzentration kommt dem individuellen Zytostatikaresistenz-Phänotyp eine entscheidende Bedeutung für die pharmakodynamischen Effekte in den neoplastischen Zellen zu.

1.2. Das klinische Problem der pleiotropen Resistenz (Multidrug-Resistenz)

Verschiedene Malignome reagieren sehr unterschiedlich auf den Einsatz von Chemotherapeutika. So werden z.B. bei akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) des Kindesalters, bei Hodenseminomen und bei bestimmten Lymphomen gute therapeutische Erfolge durch eine chemotherapeutische Behandlung erzielt; diese Tumoren sind potentiell durch eine Chemotherapie heilbar. Diese positiven Ergebnisse werden allerdings hauptsächlich bei der Behandlung relativ seltener Tumorentitäten erreicht. Tatsächlich stellen 90% der fortgeschrittenen Tumore, die gut auf eine Chemotherapie ansprechen, nur 10% aller Malignome dar. Im Gegensatz zu diesen günstigen Resultaten sprechen ungefähr 50% aller neoplastischen Gewebe nicht oder nur marginal auf eine Behandlung mit Zytostatika an. Dieses gilt insbesondere für Karzinome, die sich von der Niere, der Nebenniere, dem Kolon, dem Pankreas, der Leber und den Gallenwegen ableiten sowie für maligne Melanome und Hirntumore. Diese Malignome sind typischerweise gegen die heute zur Verfügung stehenden Pharmaka weitgehend unempfindlich, d.h. sie verfügen über Mechanismen, die eine primäre bzw. intrinsische Resistenz gegenüber Zytostatika bewirken. In der klinischen Praxis stellt die meßbare Tumormasse bzw. deren therapeutisch induzierte Veränderung den entscheidenden Parameter dar, der beschreibt ob ein solider Tumor resistent ist oder nicht. Wenn nach einer Chemotherapie eine Vollremission erreicht wird, handelt es sich klinisch um einen chemosensiblen Tumor, anderenfalls gilt er als primär resistent. Dabei ist es gleichgültig, ob sich die gesamte Neoplasie aus a priori resistenten Zellen zusammensetzt oder ob eliminierte chemosensible Tumorzellen durch resistente Zellklone ersetzt werden; das Ergebnis wird vom Kliniker in jedem Falle als primäre klinische Resistenz interpretiert werden.

Die Mehrzahl der Fälle der anderen Pateintenhälfte mit malignen Erkrankungen, wie z.B. bestimmte Mammakarzinome, Ovarialkarzinome oder akute myeloische Leukämien (AML),

sprechen initial gut auf eine zytostatische Behandlung an, im Behandlungsverlauf verliert die Therapie jedoch ihre Wirkung mit der Folge, daß sich die Malignome nach mehreren Chemotherapiezyklen nicht mehr therapeutisch beeinflussen lassen. Die Tumore haben eine sekundäre Zytostatikaresistenz entwickelt. Selbst unter einer Hochdosistherapie und Polychemotherapien mit kombiniertem Einsatz unterschiedlich wirksamer Substanzen können sich sekundäre Resistenzen ausbilden. Zum anderen wird beobachtet, daß Tumore, die anfänglich gut auf eine Chemotherapie reagieren, wie z.B. das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC, small cell lung carcinoma) meist Rezidive entwickeln, die fast immer chemoresistent sind.

Es zeigt sich zudem oftmals, daß während des Therapieverlaufs nicht nur die eingesetzten Chemotherapeutika ihre zytostatischen Wirkungen verlieren, sondern auch andere antineoplastische Substanzen aus unterschiedlichen Stoffgruppen, die in den vorangegangenen Chemotherapiezyklen nicht appliziert wurden. Dieses Phänomen ist um so bemerkenswerter, da diese Substanzen nicht nur eine völlig verschiedene chemische Struktur aufweisen, sondern auch ihre antineoplastischen Wirkungen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Dieser Phänotyp von Malignomen, der sich durch das Auftreten von Kreuzresistenzen bzw. pleiotropen Resistenzen charakterisiert ist, wird auch als Zytostatika-Mehrfachresistenz oder in Anlehnung an die angelsächsische Literatur als Multidrug-Resistenz (MDR) bezeichnet. Der Begriff der Multidrug-Resistenz von Tumoren wurde bereits Ende der 1960er Jahre geprägt und von Biedler und Riehm (1970) erstmalig in die wissenschaftliche Literatur eingeführt.

Es ist bisher nicht geklärt, ob der klinische Phänotyp einer erworbenen Zytostatikaresistenz inklusive einer erworbenen Multidrug Resistenz die Folge eines Selektionsvorteils bereits existierender a priori resistenter Subpopulationen von malignen Zellen in einem sich heterogen zusammensetzenden Tumor ist, oder ob Chemoresistenzen durch die Applikation von antineoplastischen Substanzen in den Tumorzellen induziert werden. Es ist zudem wahrscheinlich, daß sich erworbene Zytostatikaresistenzen aus einer Kombination beider Wege herleiten.

1.3. Chemoresistenz im Zellkulturmodell

Das Verständnis der für diese Resistenzen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist von fundamentaler Bedeutung für die Entwicklung von therapeutischen Strategien, die darauf zielen, Zytostatikaresistenzen zu verhindern bzw. zu überwinden. Da eine gezielte und reproduzierbare Untersuchung der Resistenzmechanismen am Patienten nur schwer bzw. überhaupt nicht zu realisieren ist, wurden in den letzten 3 Dekaden von verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche Zellkulturmodelle entwickelt und analysiert. Zur Etablierung eines solchen Resistenzmodells wird i.d.R. eine bereits vorhandene Tumorzelllinie einer bestimmten Tumorentität gegen ein definiertes Zytostatikum selektioniert. D.h., daß eine Zelllinie einer bestimmten subletalen Zytostatikumkonzentration so lange ausgesetzt, bis die Zellverdoppelungsrate in dieser genau so hoch ist, wie in der Ausgangszelllinie. Durch weitere Erhöhung der Zytostatikumkonzentration wird schließlich eine Tochterzelllinie generiert, die sich in der Gegenwart hoher Zytostatikumkonzentrationen, die für die Ausgangszelllinie toxisch und letal wirken, uneingeschränkt weiter teilt. In diesen Modellsystemen werden ähnliche Phänomene wie bei der Behandlung von Tumorzellen von onkologischen Patienten beobachtet. Auch hier konnten Resistenzphänotypen gegenüber allen wichtigen Chemotherapeutika induziert werden. Insbesondere konnten zahlreiche Zelllinien etabliert werden, die unterschiedliche Formen einer Multidrug-Resistenz zeigen. Die heute bekannten Mechanismen, die zur zellulären Zytostatikaresistenz von Tumorzellen führen, sind alle ursprünglich in derartigen Zellkulturmodellen beschrieben worden.

1.4. Chemoresistenzmechanismen

Eine Übersicht über unterschiedliche zelluläre Chemoresistenzmechanismen wird in **Lage, 1999; Lage und Dietel, 1999** und **Lage und Dietel, 2000** gegeben. Eine allgemeine ausführliche Zusammenfassung der heute diskutierten Resistenzmechanismen ist in **Lage, 1999** dargestellt. In diesem Kapitel werden die Begriffe „klassische Multidrug-Resistenz“, die durch die Aktivität des ABC-Transportproteins P-Glykoprotein (P-Gp) vermittelt wird, und „atypische Multidrug-Resistenz“, die durch alle P-Gp unabhängigen Formen der pleiotropen Resistenz gekennzeichnet ist, definiert. Die wesentlichen Mechanismen, die zu atypischen MDRs führen, sind dabei im einzelnen:

- alternative ABC-Transporter
- DNA-Topoisomerasen
- intrazelluläre Kompartimentierung
- Vaults
- Detoxifizierung über Glutathion-S-Transferasen
- Phosphorylierungen über Proteinkinasen C
- Modulation der Apoptose
- DNA-Reparatursysteme
- Weitere Mechanismen

In *Lage und Dietel, 1999* und *Lage und Dietel, 2000* sind spezielle Aspekte zweier erst kürzlich charakterisierter Mechanismen detailliert ausgeführt. *Lage und Dietel, 1999* beschäftigt sich mit der Rolle des DNA-Mismatch Repair Systems im Zusammenhang mit Zytostatikaresistenz. In *Lage und Dietel, 2000* wird ein neuer ABC-Transporter, das „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP), und seine Bedeutung für die atypische MDR abgehandelt.

2. Problemstellung

Trotz der Beschreibung unterschiedlicher Resistenzmechanismen, können bisher nicht alle Resistenzerscheinungen erklärt werden. Es ist daher notwendig, weitere für die Zytostatikaresistenz bedeutsame Mechanismen zu charakterisieren. Außerdem ist es von Bedeutung Strategien zu entwickeln, die es erlauben, die vorhandenen zellulären Resistenzmechanismen negativ zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit werden daher unterschiedliche in vitro Ansätze beschrieben, die es gestatten, einerseits neue Resistenzfaktoren und deren zellbiologische Wirkung zu analysieren und andererseits Chemoresistenzen zu modulieren.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1. Zellbiologische Charakterisierung verschiedener chemoresistenter Tumorzellen bezüglich bekannter Resistenzmechanismen

Ausgehend von bereits etablierten Modellsystemen wurden im Sinne der Problemstellung unterschiedliche zelluläre Resistenzmechanismen charakterisiert. Um neuartige Mechanismen von bereits in der Literatur beschriebenen Mechanismen abzugrenzen, mußte als erstes das Vorhandensein bekannter Resistenzmechanismen in den Chemoresistenz Modellzelllinien nachgewiesen werden. Diesbezügliche zellbiologische Arbeiten zur Charakterisierung unterschiedlicher Resistenzmodelle sind in *Dietel et al., 1990; Kellner et al., 1997; Ross et al., 1999; Lage et al., 1999; Lage et al., 2000a* und *Lage et al., 2000b* ausführlich dargelegt.

In *Dietel et al., 1990* ist die Etablierung der atypischen MDR Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV beschrieben. In dieser P-Gp-negativen Zelllinie konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß ein Zytostatikum intrazellulär kompartimentiert wird, und es die Zelle auf diese Art und Weise verhindern kann, daß das Therapeutikum seinen Wirkort erreicht.

Wie in *Kellner et al., 1997* erörtert wird, ist der Resistenzphänotyp in der humanen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV mit einer verminderten Akkumulation von Zytostatikum assoziiert. Es konnte außerdem ermittelt werden, daß die Expression von DNA-Topoisomerase II α , einem häufig in atypischen MDR Zellen negativ reguliertem Enzym, in dieser Zelllinie vermindert ist.

Nach Klonierung der BCRP-spezifischen cDNA (Doyle *et al.*, 1998) wurde es ermöglicht nachzuweisen, daß dieser ABC-Transporter massiv in EPG85-257RNOV Zellen überexprimiert wird. Wie in *Ross et al., 1999* ausgeführt, konnte gezeigt werden, daß BCRP nicht nur in der Linie EPG85-257RNOV verstärkt exprimiert vorliegt, sondern außerdem in weiteren atypischen MDR Zelllinien. Es wurde zudem nachgewiesen, daß weitere in dieser Arbeit verwendete atypische MDR Zelllinien nicht nur P-Gp- sondern auch BCRP-negativ sind.

Eine therapeutischer Ansatz, um die Wirkung von Chemotherapeutika zu unterstützen, erfolgt über eine gleichzeitige Applikation von Hyperthermie (Übersicht in: Falk und Issels, 2001). Um zu untersuchen, wie sich die Thermosensitivität von Tumorzellen in Abhängigkeit vom Resistenztyp verhält, wurde diese in *Lage et al., 2000b* analysiert. Dabei zeigte sich, daß zwei klassische MDR Linien – einerseits aus einem Magenkarzinomsystem etabliert (EPG85-257RDB), andererseits aus einer Pankreaskarzinomlinie selektioniert (EPP85-181RDB) – eine erhöhte Thermotoleranz im Vergleich zur Ausgangslinie zeigten. Im Falle der atypischen MDR war das Ergebnis uneinheitlich: die BCRP-positive Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV zeigte eine verstärkte Thermotoleranz, die BCRP- und P-Gp-negative Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RNOV zeigte im Vergleich zu der parentalen Zellvariante keine Veränderung in der Thermosensitivität.

In *Lage et al., 1999* wird gezeigt, daß DNA-Reparatursysteme, wie das DNA-Mismatch Repair System sowie die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) mit der Zytostatikaresistenz in unterschiedlichen Melanomzellen assoziiert ist.

Veränderungen in der DNA-Topoisomerase II-Aktivität, sowie der Expression beider DNA-Topoisomerase II Isoenzyme, DNA-Topoisomerase II α und II β , in chemoresistenten, malignen Melanomzellen werden in *Lage et al., 2000a* erörtert.

3.2. Suche nach neuen resistenz-assoziierten Faktoren auf Ebene der zellulären mRNA-Expression („Transcriptomics“)

Ein experimenteller Ansatz neue resistenz-assoziierte Faktoren darzustellen, erfolgt über den Vergleich von unterschiedlichen mRNA-Expressionsprofilen, dem jeweiligen „Transkriptom“, zwischen chemoresistenten und chemosensitiven Zellen. Überexprimierte bzw. vermindert regulierte Gene stellen dabei potentielle Kandidaten dar, die an dem entsprechenden Resistenzmechanismus beteiligt sind. Für diese Strategie bieten sich unterschiedliche Methoden an, die in *Lage und Dietel, 1996; Lage und Dietel, 1997* und *Grottko et al., 2000* diskutiert und angewandt wurden. In dieser Untersuchung der Chemoresistenzmodelle wurden bisher zwei unterschiedliche methodische Ansätze erfolgreich eingesetzt:

- Subtraktive Hybridisierung (Lage und Dietel, 1996 und Lage und Dietel, 1997)
- Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR) (*Grottke et al., 2000*)

In *Lage und Dietel, 1996* wird die molekulare Klonierung der humanen cDNA, spezifisch für die zytoplasmatische Methionyl-tRNA Synthetase (MetRS) beschrieben. Die subtraktive Hybridisierungsstrategie ergab, daß die MetRS in der atypischen MDR Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV stärker exprimiert, als in der Ausgangslinie vorlag. Diese Überexpression ist allerdings als Ausdruck einer vermehrten, streßinduzierten zellulären Proteinbiosynthese und nicht als ursächlich verbunden mit dem Resistenzgeschehen zu interpretieren.

Ebenfalls über eine subtraktive Hybridisierung konnte, wie in *Lage und Dietel, 1997* dargelegt, die MXR7 spezifische cDNA kloniert werden. MXR7, mittlerweile als Glypican-3 (GPC3) identifiziert, zeigte sich dabei als stark in den atypischen MDR Magenkarzinomzellen EPG85-257RNOV überexprimiert. Wie später noch in *Wichert et al., 1999* und *Wichert et al., eingereicht* ausgeführt, ist es unterdessen möglich gewesen die GPC3-Expression spezifisch zu inhibieren und dadurch den funktionellen Nachweis zu führen, daß GPC3 tatsächlich an dem atypischen MDR Phänotyp beteiligt ist.

Der Einsatz der DDRT-PCR wird in *Grottke et al., 2000* erörtert. Durch den Einsatz dieser Technik war es möglich insgesamt 11 cDNA-Fragmente zu klonieren, deren homologe mRNA Moleküle differentiell in chemoresistenten malignen Melanomzellen exprimiert werden. Diese Fragmente entsprachen 3 bekannten Genen mit charakterisierter biologischer Funktion, 4 bekannten Genen mit unbekannter Funktion und 4 völlig unbekanntem Genen. In *Lage et al., 2001a* wird dargestellt werden, daß bisher für eines dieser Fragmente, homolog zu DFNA5, eines Gens mit unbekannter physiologischer Funktion, der funktionelle Nachweis geführt wurde, am Chemoresistenzverhalten beteiligt zu sein.

3.3. Suche nach neuen resistenz-assoziierten Faktoren auf Ebene der zellulären Protein-Expression („Proteomics“)

Eine weitere experimentelle Strategie zur Identifizierung potentiell an der Chemoresistenz beteiligter Faktoren, ist durch den Vergleich der Protein-Expressionsmuster, dem entsprechenden „Proteom“, chemoresistenter und –sensibler Tumorzellen gegeben. In *Sinha et al., 1998; Sinha et al., 1999a; Sinha et al., 1999b* und *Sinha et al., 2000* ist dieser Ansatz, der durch den Einsatz der 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) gekennzeichnet ist, dargelegt.

Eine vergleichende Proteom-Analyse zwischen parentalen Magenkarzinomzellen (EPG85-257P), klassischen MDR-Varianten (EPG85-257RDB) sowie atypischen MDR-Varianten (EPG85-257RNOV) ist in *Sinha et al., 1998* beschrieben. Über diesen Ansatz konnte gezeigt werden, daß in beiden chemoresistenten Zelllinien, Thioredoxin in einer höheren Konzentration, als in den sensitiven Zellen vorliegt. Zudem konnten in der atypischen MDR-Variante vermehrt Annexin I-spezifische Signale detektiert werden.

Der gleiche experimentelle Ansatz, dargestellt in *Sinha et al., 1999a*, ergab beim Proteom-Vergleich von sensiblen Pankreaskarzinomzellen (EPP85-181P), klassischen MDR-Varianten (EPP85-181RDB) und der atypischen MDR-Sublinie (EPP85-181RNOV) eine verstärkte Überexpression von Cofilin in beiden unterschiedlichen MDR-Linien. In der atypischen MDR-Variante konnte zudem ein erhöhter zellulärer Gehalt an zytosolischem E-FABP („epidermal-fatty acids binding protein“) und 14-3-3- σ nachgewiesen werden.

In *Sinha et al., 1999b* sind die Proteom-Analysen eines Resistenzmodells, das sich vom Kolonkarzinom herleitet (HT-29P: parental; HT-29RDB: klassische MDR; HT-29RNOV: atypische MDR) und eines Fibrosarkommodells (EPF86-079P: parental; EPF86-079RNOV: atypische MDR) dargelegt. In der Linie HT-29RDB konnte BCSG-1 („breast cancer-specific gene-1“), in HT-29RNOV-Zellen APRT (Adenin-Phosphoribosyl Transferase) und in der Zelllinie EPF86-079RNOV konnten Rho-Guanidinukleotidphosphat (Rho-GDP) Dissoziationsinhibitor und ein unbekanntes Protein mit Homologie zum *Saccharomyces cerevisiae* Polypeptid yer-7, als verstärkt exprimiert, identifiziert werden.

Sinha et al., 2000 beschäftigt sich mit der vergleichenden Proteom-Analyse von unterschiedlichen, chemoresistenten Melanomzelllinien. In diesem System wurden erhöhte zelluläre Konzentrationen von insgesamt 4 unterschiedlichen bekannten Proteinen nachgewiesen: Elongationsfaktor 1- δ , TCTP („translationally controlled tumor protein“), 14-3-3- γ und einem Tetratricopeptid Protein.

3.4. Genterapeutische Inhibition resistenz-assoziiierter Faktoren mittels Ribozymtechnologie

Die spezifische Inhibition von Resistenzfaktoren stellt sowohl einen experimentellen, als auch einen therapeutischen Ansatz dar, um Zytostatikaresistenzen zu modulieren. Zudem können potentielle Resistenzfaktoren, bei denen eine Beteiligung am Resistenzgeschehen nicht experimentell belegt ist, über eine spezifische Inhibition funktionell bezüglich ihrer Beteiligung am Zytostatikaresistenz-Phänotyp charakterisiert werden. In *Wichert et al., 1999; Kowalski et al., 2001; Materna et al., 2001* ist eine genterapeutische Strategie zur Modulation von Chemoresistenzen dargelegt. Bei diesem Ansatz werden Ribozyme, spezifische riboendonukleolytische RNA-Moleküle, gegen die Transkripte von resistenz-assoziierten Genen konstruiert, die auf diese Weise inaktiviert werden können.

In *Wichert et al., 1999* ist das Design und die kinetische Charakterisierung eines Ribozyms gegen den bereits in *Lage und Dietel, 1997* erwähnten, potentiellen Resistenzfaktor GPC3, der in atypischen MDR Magenkarzinomzellen verstärkt exprimiert vorliegt, beschrieben.

Kowalski et al., 2001 beschäftigt sich mit der Konstruktion und kinetischen Analyse eines Ribozyms gegen den mit atypischer MDR assoziierten und in der Zelllinie EPG85-257RNOV überexprimierten ABC-Transporters BCRP.

Design und Charakterisierung zweier gegen den cisplatinresistenz-assoziierten ABC-Transporter cMOAT („canalicular multispecific anion transporter“) gerichteter Ribozyme sind in *Materna et al., 2001* dargelegt.

3.5. Funktionelle Charakterisierung neuer resistenz-assoziiierter Faktoren

In *Wichert et al., eingereicht; Lage et al., 2001a* und *Lage et al., 2001b* sind funktionelle Studien mit mutmaßlich neuen, zytostatikaresistenz-assoziierten Faktoren bezüglich ihrer physiologischen Bedeutung und bezüglich ihrer möglichen Beteiligung an Chemoresistenzerscheinungen dargestellt.

Der funktionelle Nachweis, daß GPC3 an dem in der atypischen MDR Zelllinie EPG85-257RNOV vorliegenden Resistenzphänotyp beteiligt ist, ist in *Wichert et al., eingereicht* erörtert. Durch die Applikation des in *Wichert et al., 1999* beschriebenen Ribozyms gegen GPC3, konnte das GPC3 kodierende Transkript spezifisch inhibiert werden. Das Ausmaß der Resistenz gegenüber Mitoxantron konnte dabei um fast 80% reduziert werden. Die Studie zeigt gleichzeitig, daß das eingesetzte anti-GPC3 Ribozym potentiell für eine gentherapeutischen Strategie zur Resistenzmodulation einer atypischen MDR geeignet ist.

Transfektionsexperimente, mittels eines DFNA5-Expressionskonstruktes sind in *Lage et al., 2001a* dargelegt. Wie in *Grottke et al., 2000* erwähnt, ist DFNA5 in etoposid-resistenten Melanomzellen vermindert exprimiert. Durch Überexpression von DFNA5 in etoposid-resistenten Melanomzellen konnte die Sensitivität gegenüber einer Etoposidbehandlung partiell wieder hergestellt werden. Dieser Effekt beruht auf einer DFNA5-spezifischen Wirkung, die zelluläre Bereitschaft einen caspase-3-abhängigen Signaltransduktionsweg, der in einem apoptotischen Ereignis mündet, auszulösen.

In *Lage et al., 2001b* wird gezeigt, daß der ABC-Transporter TAP („transporter associated with antigen presentation“), physiologisch beteiligt an der MHC Klasse-I assoziierten Antigenpräsentation, in der atypischen MDR Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV überexprimiert vorliegt. Über Transfektionsexperimente mit beiden TAP-Untereinheiten des heterodimeren Transportmoleküls konnte Resistenz gegenüber Mitoxantron auf sensible Tumorzellen übertragen werden.

4. Diskussion

Resistenzen von Tumorzellen gegenüber antineoplastisch wirksamen Substanzen stellt eines der zentralen Probleme in der klinischen Onkologie dar. Die Überwindung dieser Resistenzen gehört daher zu den vordringlichsten Anliegen der molekularen onkologischen Forschung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche experimentelle Strategien verfolgt, neue molekulare Mechanismen zu identifizieren, die bei dem Zustandekommen von Zytostatikaresistenzen von Bedeutung sind. Insbesondere wurden verschiedene Formen der atypischen Multidrug-Resistenz näher charakterisiert. Dafür wurden unterschiedliche Zellkulturmodelle bezüglich der vorliegenden Resistenzmechanismen zellbiologisch analysiert. Zugleich wurden Techniken eingesetzt, die es ermöglichten auf den Ebenen der mRNA- und Proteinexpression neue, mutmaßlich resistenz-assoziierte Faktoren zu identifizieren. Es konnte so für GPC3, DNFA5 und TAP erstmalig funktionell nachgewiesen werden, für zelluläre Chemoresistenzerscheinungen humaner Malignomzellen mitverantwortlich zu sein. Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit eine gentherapeutische Strategie verfolgt, die es gewährleistet, spezifisch Zytostatikaresistenzen zu modulieren.

Wesentliche Grundlage der Charakterisierung von atypischen MDR Phänotypen in Tumorzellen stellte die zellbiologische Analyse von bekannten, in der Literatur beschriebenen Mechanismen dar. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob sich die Chemoresistenz eines zu untersuchenden Zellkulturmodells nicht schon allein über bereits bekannte Mechanismen erklären läßt. So können z.B. die klassischen MDR Phänotypen der humanen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB und der humanen Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB über das Vorhandensein des ABC-Transporters P-gp (Lage *et al.*, 2000) erklärt werden. Im Gegensatz dazu konnten in atypischen MDR Zelllinien, wie z.B. der humanen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV mehrere Mechanismen identifiziert werden, die zum Resistenzphänotyp beisteuern.

Als ein wesentliches Ergebnis haben die verschiedenen Analysen unterschiedlicher chemoresistenter Zelllinien ergeben, daß ein Resistenzphänotyp i.d.R. aufgrund eines komplexen multifaktoriellen Geschehens zustande kommt. So konnten z.B. in der atypischen MDR Zelllinie EPG85-257RNOV bisher insgesamt fünf unterschiedliche Mechanismen ausgemacht werden, die einen Effekt auf den Resistenzphänotyp ausüben:

- intrazelluläre Kompartimentierung von Zytostatika (Dietel *et al.*, 1990)
- verminderte Expression von DNA-Topoisomerase II α (Kellner *et al.*, 1997)
- verstärkte Expression von GPC3 (Lage und Dietel, 1997; Wichert *et al.*, eingereicht)
- verstärkte Expression des ABC-Transporters BCRP (Ross *et al.*, 1999)
- verstärkte Expression des ABC-Transporters TAP (Lage *et al.*, eingereicht)

Es konnten in dieser Zelllinie zudem weitere Veränderungen gefunden werden, bei denen eine ursächliche Beteiligung an der Resistenz nicht geklärt ist (Lage und Dietel, 1996; Sinha *et al.*, 1998). Da sich ein Tumor aus heterogenen Anteilen zusammensetzt, kann darauf geschlossen werden, daß auch in der klinischen Situation mit verschiedenen, gleichzeitig agierenden Resistenzmechanismen gerechnet werden muß. Therapeutische Konsequenz aus dieser Überlegung stellt neben dem gleichzeitigen Einsatz unterschiedlicher Zytostatika, deren antineoplastische Wirkung über unterschiedliche Resistenzmechanismen inhibiert wird, die gleichzeitige Applikation von unterschiedlichen Chemoresistenzmodulatoren dar. Im Falle der in dieser Arbeit eingesetzten gentherapeutischen Strategie mittels Ribozymtechnologie, bedeutet dieses, daß gleichzeitig Ribozyme appliziert werden müssen, die spezifisch gegen die mRNA-Moleküle unterschiedlicher Resistenzfaktoren gerichtet sind.

Die eingesetzten Methoden zur vergleichenden mRNA- und Proteinexpressionsanalyse von chemoresistenten Tumorzellen zeichnen sich durch unterschiedliche Vor- und Nachteile aus. Die zu Beginn eingesetzte Methode der subtraktiven Hybridisierung (Hedrick *et al.*, 1984) ist durch eine relativ schnelle Durchführbarkeit charakterisiert, hat jedoch die Nachteile, daß sich jeweils nur zwei Zelllinien miteinander vergleichen lassen und nur relativ stark exprimierte Transkripte über diese Methode zu identifizieren sind. Die anschließend angewandte Methode der DDRT-PCR (Liang und Pardee, 1992) bietet darüber hinaus entscheidende Vorteile. Es lassen sich erstens gleichzeitig mehrere Zelllinien miteinander vergleichen, zum anderen können auch schwach exprimierte Transkripte identifiziert werden. Es stehen außer der DDRT-PCR mittlerweile noch weitere Methoden zur Verfügung, mit deren Hilfe sich mRNA-Expressionsprofile analysieren lassen. Dazu gehören die Techniken SAGE („serial analysis of gene expression“) (Velculescu *et al.*, 1995), SSH („subtractive suppression hybridization“) (Diatchenko *et al.*, 1996) sowie der Einsatz von DNA Chips bzw. Microarrays (Marshall and Hodgson, 1998). Der entscheidende Vorteil der DDRT-PCR gegenüber anderen

experimentellen Ansätzen zur Analyse differentieller mRNA-Expression liegt darin, daß beim gleichzeitigen Vergleich der Expressionsmuster vieler verschiedenen chemoresistenter Zelllinien, Transkripte, die in mehreren resistenten Zellen gleichzeitig in ihrer Expressionsstärke verändert sind, als besonders geeignete Kandidaten für eine mögliche Beteiligung an der Chemoresistenz in Frage kommen. Ein Beleg dafür, daß diese Methode besonders für diese Anwendung geeignet ist, ist dadurch gegeben, daß die Überexpression eines bekanntermaßen an der Resistenz beteiligten Faktors gefunden wurde. So konnte mittels DDRT-PCR die verstärkte Expression des ABC-Transporters BCRP in der atypischen MDR Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV detektiert werden (Lage und Dietel, 2000). Damit konnte der „proof of principle“ für die DDRT-PCR zur Identifikation von Resistenzfaktoren erbracht werden.

Die eingesetzte Technik der 2D-PAGE zur Proteomanalyse hat gegenüber der mRNA-Expressionsprofilanalyse zwei grundlegende Vorteile. Zum einen können potentielle Resistenzfaktoren direkt als Polypeptid detektiert werden, zudem können mittels 2D-PAGE Proteinmodifikationen, wie z.B. unterschiedliche Phosphorylierungs- oder Glykolisierungsmuster nachgewiesen werden. Der Nachteil der Methode liegt darin, daß die Empfindlichkeit des Nachweises schwach exprimierter Faktoren wesentlich geringer ist als bei Techniken, die Nukleinsäuren nachweisen. Dadurch bedingt ergibt sich, daß mittels dieser Technologie – im Gegensatz zu den auf PCR basierenden Techniken – nicht alle in Frage kommenden mutmaßlichen Resistenzfaktoren gefunden werden können. Ein weiterer Nachteil der Proteomanalyse besteht darin, daß besonders große, ausgeprägt hydrophobe, extrem saure oder stark basische Proteine mittels 2D-PAGE nur unzureichend aufgetrennt werden können. Für den Nachweis von spezifischen mRNA-Molekülen sind diese Einflußgrößen bedeutungslos.

Der gentherapeutische Einsatz von Ribozymen zur Modulation von Resistenzmechanismen hat sich in zweifacher Hinsicht als innovativ erwiesen. Zum einen können mittels Ribozymen resistenzfaktor-kodierende RNA-Moleküle spezifisch eliminiert werden (Wichert *et al.*, 1999; Kowalski *et al.*, 2001, Materna *et al.*, 2001) und auf diese Weise den Resistenzphänotyp im zellulären System modulieren (Wichert *et al.*, eingereicht). Zum anderen stellen Ribozyme ein ausgezeichnetes Laborwerkzeug dar, um den experimentellen Nachweis zu erbringen, daß ein mutmaßlicher Resistenzfaktor tatsächlich an einem Resistenzmechanismus beteiligt ist.

Dieses konnte für GPC3 gezeigt werden. Durch eine über Transfektion erreichte Überexpression von GPC3 in chemosensiblen Tumorzellen konnte keine Übertragung des Resistenzphänotyps bewerkstelligt werden (Lage und Dietel, 1997). Erst die spezifische Inhibition von GPC3 mittels der Ribozymtechnologie, war in der Lage den experimentellen Nachweis zu erbringen, daß GPC3 an der atypischen MDR beteiligt ist. Wie oben ausgeführt, stellt GPC3 somit einen für die Resistenz bedeutsamen Faktor dar, der auf das gleichzeitige Vorhandensein bisher unbekannter Kofaktoren angewiesen ist. Eine Überexpression kann daher keine Resistenz übertragen, die Inhibition eines essentiellen Faktors kann jedoch den Resistenzmechanismus negativ beeinflussen. Ein ähnlichen Effekt wurde vom humanen „major vault protein“ (MVP) – ursprünglich als „lung resistance protein“ (LRP) bezeichnet – berichtet. In Transfektionsexperimenten, in denen die LRP kodierende cDNA in sensible Tumorzellen eingeführt wurde, konnte keine Übertragung von Zytostatikaresistenz erreicht werden (Scheffer *et al.*, 1995). Die Inhibition von LRP mittels Ribozymen konnte jedoch auch in diesem System erstmals direkt experimentell belegen, daß LRP an der Ausbildung eines Resistenzphänotyps ursächlich beteiligt ist (Kitazono *et al.*, 1999).

5. Literatur

- Biedler, J.L., and Riehm, H. (1970) Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.* *30*, 1174-1184.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 6025-6030.
- Dietel, M., Arps, H., Lage, H., and Niendorf, A. (1990) Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* *50*, 6100-6106.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15665-15670.
- Falk, M.H., and Issels, R.D. (2001) Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperthermia* *17*, 1-18.
- Grottke, C., Mantwill, K., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (2000) Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer* *88*, 535-546.
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A., and Davis, M.M. (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* *308*, 149-153.
- Kellner, U., Hutchinson, L., Seidel, A., Lage, H., Danks, M.K., Dietel, M., and Kaufmann, S.C. (1997) Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma cell line in the absence of P-glycoprotein. *Int. J. Cancer* *71*, 817-824.
- Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z.S., Furukawa, T., Nagayama, S., Tani, A., Takao, S., Aikou, T., and Akiyama, S. (1999) Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1647-1653.
- Kowalski, P., Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001) Selection and characterization of a high activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* *8*, 185-192.
- Lage, H., and Dietel, M. (1996) Cloning of a human cDNA encoding a protein with high homology to yeast methionyl-tRNA synthetase. *Gene* *178*, 187-189.
- Lage, H., and Dietel, M. (1997) Cloning and characterization of cDNAs encoding a protein with high homology to rat intestinal development protein OCI-5. *Gene* *188*, 151-156.
- Lage, H. (1999) Atypische Multidrug-Resistenz. *Arzneimitteltherapie* *17.*, 39-44.

Lage, H., Christmann, M., Kern, M.A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B., and Schadendorf, D. (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* *80*, 744-750.

Lage, H., and Dietel, M. (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *125*, 156-165.

Lage, H., and Dietel, M. (2000) Effect of the breast cancer resistance protein on atypical multidrug resistance. *Lancet Oncol.* *1*, 169-175.

Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2000a) Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br. J. Cancer* *82*, 488-491.

Lage, H., Jordan, A., Scholz, R., and Dietel, M. (2000b) Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia* *16*, 291-303.

Lage, H., Helmbach, H., Grottko, C., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2001) DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. *FEBS Lett.* *494*, 54-59.

Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampé, R., Dietel, M., Schadendorf, D., and Sinha, P. : Enhanced expression of human ABC-transporter TAP is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Lett.* *503*, 179-184.

Liang, P. and Pardee, A.B. (1992), Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967-971.

Marshall, A. and Hodgson, J. (1998) DNA chips: an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.* *16*, 27-31.

Materna, V., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001) Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC-transporter cMOAT/MRP2/ABCC3. *Cancer Gene Ther.* *8*, 176-184.

Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P.C., and Doyle, L.A. (1999) Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 429-433.

Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C., and Scheper, R.J. (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.* *1*, 578-582.

Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1998) Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* *18*, 105-116.

Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999a) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3- σ (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* 20, 2952-2960.

Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999b) Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing. *Electrophoresis* 20, 2961-2969.

Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hütter, G., Kern, M., Köttgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnölzer, M., and Schadendorf, D. (2000) Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 3048-3057.

Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (1999) Selection of a high activity ribozyme against the cytostatic drug resistance associated glypican-3 using an in vitro assay containing total tumor RNA. *Cancer Gene Ther.* 6, 263-270.

Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. : Glypican-3 is involved in cellular protection against mitoxantrone. submitted for publication,

6. Publikationsliste

1. Dietel, M., Arps, H., Lage, H., and Niendorf, A. (1990) Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* 50, 6100-6106.
2. Lage, H., and Dietel, M. (1996) Cloning of a human cDNA encoding a protein with high homology to yeast methionyl-tRNA synthetase. *Gene* 178, 187-189.
3. Kellner, U., Hutchinson, L., Seidel, A., Lage, H., Danks, M.K., Dietel, M., and Kaufmann, S.C. (1997) Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma cell line in the absence of P-glycoprotein. *Int. J. Cancer* 71, 817-824.
4. Lage, H., and Dietel, M. (1997) Cloning and characterization of cDNAs encoding a protein with high homology to rat intestinal development protein OCI-5. *Gene* 188, 151-156.
5. Lage, H., Dietel, M., Fröschle, G., and Reymann, A. (1998) Expression of the novel mitoxantrone resistance associated gene MXR7 in colorectal malignancies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 58-60.
6. Reymann, A., Woermann, C., Fröschle, G., Schneider, C., Bräsen, J.H., Lage, H., and Dietel, M. (1998) Sensitive assessment of cytostatic drug resistance-mediating factors MDR1 and MRP in tumors of the gastrointestinal tract by RT-PCR. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 55-57.
7. Schwendel, A., Richard, F., Langreck, H., Kaufmann, O., Lage, H., Winzer, K.J., Petersen, I., and Dietel, M. (1998) Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21q. *Br. J. Cancer* 78, 806-811.
8. Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1998) Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 18, 105-116.
9. Lage, H. (1999) Atypische Multidrug-Resistenz. *Arzneimitteltherapie* 17, 39-44.
10. Lage, H., Christmann, M., Kern, M.A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B., and Schadendorf, D. (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* 80, 744-750.
11. Lage, H., and Dietel, M. (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 156-165.

12. Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P.C., and Doyle, L.A. (1999) Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 429-433.
13. Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3- σ (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* 20, 2952-2960.
14. Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999) Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing. *Electrophoresis* 20, 2961-2969.
15. Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (1999) Selection of a high activity ribozyme against the cytostatic drug resistance associated glypican-3 using an in vitro assay containing total tumor RNA. *Cancer Gene Ther.* 6, 263-270.
16. Grottko, C., Mantwill, K., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (2000) Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer* 88, 535-546.
17. Lage, H., and Dietel, M. (2000) Effect of the breast cancer resistance protein on atypical multidrug resistance. *Lancet Oncol.* 1, 169-175.
18. Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2000) Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br. J. Cancer* 82, 488-491.
19. Lage, H., Jordan, A., Scholz, R., and Dietel, M. (2000) Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia* 16, 291-303.
20. Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hütter, G., Kern, M., Köttgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnölzer, M., and Schadendorf, D. (2000) Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 3048-3057.
21. Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., and Kaina, B. (2001) Resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int. J. Cancer* 92, 123-129.
22. Kowalski, P., Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001) Selection and characterization of a high activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* 8, 185-192.

23. Lage, H., Helmbach, H., Grottke, C., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2001) DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. *FEBS Lett.* 494, 54-59.
24. Lage, H., Kellner, U., Tannapfel, A., and Dietel, M. (2001) Expression of a glypican-related 62-kDa antigen is decreased in hepatocellular carcinoma in correspondence to the grade of tumor differentiation. *Virchows Arch.* 438, 567-573.
25. Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampé, R., Dietel, M., Schadendorf, D., and Sinha, P. (2001) Enhanced expression of human ABC-transporter TAP is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Lett.* 503, 179-184.
26. Materna, V., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001) Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC-transporter cMOAT/MRP2/ABCC3. *Cancer Gene Ther.* 8, 176-184.
27. Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M., Celis, J.E., and Lage, H. (2001) Characterization of the differential protein expression associated with thermoresistance in human gastric carcinoma cell lines. *Electrophoresis* 22, 2990-3000.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich gerne denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel. Er gab mir durch seine langjährige, großzügige Unterstützung die Gelegenheit, diese Arbeit zu erstellen. Eine offene, sachbezogene und kontinuierliche Diskussionskultur sowie die uneingeschränkte Unterstützung zur Bereitstellung notwendiger Mittel sind auf das Engste mit seiner Person verknüpft und bieten die besten Voraussetzungen für motiviertes und erfolgreiches Arbeiten.

Der Arbeitsgruppe gilt mein aller herzlichster Dank, ohne ihr Engagement und ihre konstruktiven Anregungen wären viele der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich gewesen. Im Labor waren oder sind aktiv tätig: Birgit Schäfer, Alexandra Krumnow und Helga Kemmer als MTAs; Anke Wichert, Klaus Mantwill, Claudia Grottke, Verena Materna, Dr. Christin Perlitz, Christiane Nieth, Alicia Tejera, Alexandra Stege und Antje Müller als wissenschaftliche Mitarbeiter bzw. ehemalige Diplomanden und naturwissenschaftliche Doktoranden; Axel Pribsch, Petra Kowalski und Jenny Arnold als Diplomanden; sowie Juliane Pleger, Oliver Alshut und Margit Stehle als medizinische Doktoranden.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls meinen Kooperationspartnern, die mit konstruktiven Diskussionen, fruchtbaren Ideen und letztendlich durch ihre Motivation zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben. Besonders erwähnen möchte ich Prof. Dr. Dirk Schadendorf (Heidelberg), Prof. Dr. B. Kaina (Mainz), Prof. Dr. Andreas Herrmann (Berlin), Priv.-Doz. Dr. Dr. Pranav Sinha (Berlin), Priv.-Doz. Dr. Andreas Reymann (Hamburg), Priv.-Doz. Dr. J. Thomale (Essen), Dr. Per Sonne Holm (München), Dr. Udo Kellner (Magdeburg) und Dr. Ulrike Stein (Berlin). Allen Mitarbeitern in den entsprechenden Arbeitsgruppen, die hier nicht explizit erwähnt wurden, die Arbeit aber dennoch unterstützt haben, möchte ich ebenfalls auf das aller herzlichste danken.

Denjenigen Mitarbeitern und Kollegen am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charité, die mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft oder praktischen Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben und die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich auf das aller herzlichste danken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe, der Novartis-Stiftung für therapeutische Forschung, der Berliner Krebsgesellschaft sowie der universitären Forschungsförderung der Forschungskommission der Charité.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie Judith, Laura Sophie und Lavina Katharina, die mich mit ihrem immerwährenden, liebevollen Verständnis durch die letzten Jahre begleitet haben.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Datum

Unterschrift