

**Nachweis und Modulation
der P-Glykoprotein-vermittelten Multidrugresistenz
bei akuter myeloischer Leukämie in vitro**

Mauricio Esteban García

Meinen Eltern Leonor und Mauricio
sowie meinen Schwestern Rosa und Paloma

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

**Nachweis und Modulation
der P-Glykoprotein-vermittelten Multidrugresistenz
bei akuter myeloischer Leukämie in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Mauricio Esteban García
aus Segovia (Spanien)
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. E. Scheulen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. W. Beelen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2005

P u b l i k a t i o n e n

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

I. Originalarbeit

Schröder J., Esteban M., Müller M.R., Kasimir-Bauer S., Bamberger U., Heckel A., Seeber S., Scheulen M.E. (1996):

Modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of de novo or relapsed or persistent acute myeloid leukemia ex vivo.

J Cancer Res Clin Oncol 122, 307-312

II. Buchbeitrag

Schröder J., Esteban M, Kasimir-Bauer S., Bamberger U., Heckel A., Scheulen M.E., Seeber S. (1996):

In vitro modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of de novo or relapsed or persistent AML.

In: Hiddemann W., Büchner T., Wörmann B., Ritter J., Creutzig U., Plunkett W., Keating M. (Eds.): Acute Leukemias V; S. 118-123. Berlin, Heidelberg: Springer

III. Abstracts

Schröder J., Scheulen M.E., Esteban M., Heckel A., Bamberger U, Seeber S (1994):

In vitro modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of AML.

Proc Am Ass Cancer Res 35, 358

Schröder J., Scheulen M.E., Esteban M., Heckel A., Bamberger U, Seeber S (1994):

In vitro modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of de novo or relapsed or persistent AML.

Ann Hematol 68 (Supp I), A26

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Akute myeloische Leukämie	6
1.2	Multidrugresistenz	7
1.2.1	Klassische Multidrugresistenz	7
1.2.1.1	Familie der P-Glykoproteine	7
1.2.1.2	Gewebeverteilung des MDR1-Genprodukts	8
1.2.1.3	Aufbau und Struktur von P-Glykoprotein	9
1.2.1.4	Modell der P-Glykoproteinfunktion	9
1.2.1.5	Resistenzmodulation	12
1.2.2	Atypische Multidrugresistenz	15
1.2.2.1	Multidrugresistenz assoziiertes Protein 1	15
1.2.2.2	Isoformen des Multidrugresistenz assoziierten Proteins	17
1.2.2.3	Brust-Krebs-Resistenz-Protein	18
1.2.2.4	Lungen-Resistenz-Protein	20
1.2.2.5	Apoptoseresistenz	20
1.3	Zielsetzung	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	Patienten	23
2.2	Medikamentöse Behandlungsmaßnahmen	23
2.3	Zellproben	23
2.4	Zelllinien	24
2.4.1	CEM-CCRF	24
2.4.2	CEM-VBL	24
2.5	Durchflußzytometrische Bestimmungen der CD34-Expression	24
2.6	Durchflußzytometrische Bestimmungen der P-Glykoprotein-expression	25
2.7	Zelluläre Effluxuntersuchungen	25
2.8	In vitro-Zytotoxizitätsversuch	26
2.9	Verwendete Chemikalien	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Bestimmung der Modulatorkonzentrationen an Zellen der Zelllinie CEM-VBL	28
3.2	MDR-Modulation mittels BIBW22BS an Zellen der Zelllinie CEM-VBL	29
3.3	Effluxuntersuchungen an Blastenpopulationen mit akuter myeloischer Leukämie	31

3.3.1	Rhodamin 123	31
3.3.2	Daunorubicin	34
3.3.3	Idarubicin	37
3.4	Korrelation zwischen CD34-Expression und Rhodamin 123-Efflux	37
3.5	Korrelation zwischen P-Glykoproteinexpression und Rhodamin 123-Efflux	40
3.6	Rhodamin 123-Efflux und Therapieergebnis bei Patienten mit unvorbehandelter akuter myeloischer Leukämie	41
3.7	In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid bei den Zelllinien CEM-CCRF und CEM-VBL	43
3.7.1	In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid an Zellen der Zelllinie CEM-CCRF	43
3.7.2	In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid an Zellen der Zelllinie CEM-VBL	45
4.	D i s k u s s i o n	48
4.1	P-Glykoproteinaktivität als prognostischer Faktor bei unvorbehandelter akuter myeloischer Leukämie	48
4.2	Änderung der P-Glykoproteinexpression bei rezidivierender oder refraktärer akuter myeloischer Leukämie	50
4.3	Effektivität von Idarubicin in vivo und in vitro	52
4.4	Modulation der P-Glykoprotein-vermittelten Resistenz durch BIBW22BS	55
4.5	CD34-Expression	57
4.6	Ausblick	58
4.6.1	Multidrugresistenz assoziiertes Protein	59
4.6.2	Brust-Krebs-Resistenz-Protein	60
4.6.3	Lungen-Resistenz-Protein	61
4.6.4	Apoptoseresistenz	61
4.7	Schlußfolgerung	63
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Verzeichnis der Abkürzungen	92
8.	Danksagung	94
9.	Lebenslauf	95

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Erkrankung, die durch die Akkumulation einer unreifen hämatopoetischen Zellpopulation, der Blasten im Blut und/oder Knochenmark charakterisiert ist (van der Kolk et al., 2002). Die Induktionschemotherapie von Patienten mit AML wird mit einem Anthrazyklin wie z.B. Daunorubicin (DNR) oder Idarubicin (IDA) in Kombination mit Cytosinarabinosid (Ara-C) durchgeführt, wobei ersatzweise Etoposid (VP-16), oder Mitoxantron eingesetzt werden können (Bishop et al., 1996; Lowenberg et al., 1998; Vellenga et al., 1999; Weick et al., 1996). Bei prognostisch ungünstiger AML oder Rezidiv wird im Idealfall nach Induktion einer klinischen Vollremission (CR) eine allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation bei Patienten in gutem Allgemeinzustand, die nicht älter als 60 Jahre sind, angestrebt.

Etwa 60 bis 80% der Erkrankten erreichen nach zytotoxischer Chemotherapie eine CR, die bei etwa 25 bis 40% über fünf Jahre andauert (Burnett, 1998; Cassileth et al., 1992; Hann et al., 1997; Mayer et al., 1994). Bei den über 60-jährigen Patienten beträgt die CR-Rate weniger als 50% und die Gesamtüberlebensrate ist auf ungefähr sechs Monate limitiert. 25% (< 60 Jahre) und 40 bis 50% der Erkrankten älter als 60 Jahre weisen bei Erstdiagnose der AML eine chemotherapeutische Resistenz auf. Zusätzlich entwickeln viele Patienten, die primär eine CR erreichten, innerhalb von ein bis zwei Jahren ein Rezidiv (Manoharan, 1998).

Eine Resistenz gegenüber Zytostatika kann bereits primär (oder intrinsisch) bei einer unvorbehandelten AML vorliegen oder sich während einer zytostatischen Behandlung oder bei einem Rezidiv entwickeln (erworbene oder sekundäre Resistenz) (van der Kolk et al., 2002).

Die primäre oder erworbene Resistenz maligner Zellen gegenüber einer Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher natürlicher Substanzen (sogenannte Kreuzresistenz gegenüber Xenobiotika) wird als Multidrugresistenz (multidrug resistance, MDR) bezeichnet (Avendaño & Menéndez, 2002; Hegewisch-Becker & Hossfeld, 1996; Ross, 1991).

1.2 Multidrugresistenz

Bei den verschiedenen Phänotypen der Vielfachresistenz können einerseits energieabhängige und energieunabhängige Formen unterschieden werden. Andererseits kann eine Einteilung in klassische im Gegensatz zu atypischer MDR vorgenommen werden.

1.2.1 Klassische Multidrugresistenz

Die als klassische Multidrugresistenz (MDR) bezeichnete (Mehrfach-)Resistenz wird durch die Überexpression eines hochmolekularen Plasmamembranglykoproteins, P-Glykoprotein (Pgp), hervorgerufen (Choi et al., 1988; Ueda et al., 1987). Die Überexpression von Pgp erfolgt durch eine erhöhte Synthese mittels Aktivierung der Gentranskription (Gottesman & Pastan, 1988; Kohno et al., 1989). Pgp bewirkt einen zellauswärts gerichteten Substratstrom (Efflux) (Roninson, 1992).

1.2.1.1 Familie der P-Glykoproteine

Verschiedene Versuche der MDR-Genamplifikation mit multidrugresistenten Zelllinien weisen darauf hin, daß die MDR-Gene der Säugetiere durch eine *mdr*-Genfamilie gebildet werden. Im humanen Genom wurden zwei MDR-Gene (MDR1 und MDR2) und jeweils drei im Hamster- (*pgp1* - *pgp3*) und Mausgenom (*mdr1* - *mdr3* oder *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2*) entdeckt (Gros et al., 1988; Juranka et al., 1989).

Obwohl beim Menschen zwei MDR-Gene nachweisbar sind, ist die Synthese von Pgp lediglich auf die Expression eines Gens zurückzuführen (Genklasse I, siehe Tabelle 1) (Choi et al., 1988). Im Gegensatz dazu sind bei Hamstern und Mäusen die Genklassen I und II zur Pgp-Expression erforderlich (Ng et al. 1989).

Das humane MDR2-Gen, das nicht mit der MDR assoziiert ist, besteht auch bei Nagetieren aus nur einem Gen (Genklasse III, siehe Tabelle 1) (Ng et al., 1989). Es ist zwar erwiesen, daß das menschliche MDR2-Gen ebenfalls ein transmembranäres Glykoprotein kodiert. Dieses hat jedoch keine Bedeutung für die klinische MDR (Schinkel et al., 1991).

Tabelle 1: Beziehung zwischen MDR-Genen verschiedener Spezies (Ng et al., 1989 (modifiziert))

Spezies	Genklasse		
	I	II	III
Hamster	pgp1	pgp2	pgp3
Maus	mdr3 (mdr1a)	mdr1 (mdr1b)	mdr2
Mensch	MDR1	-	MDR2 (MDR3)

1.2.1.2 Gewebeverteilung des MDR1-Genprodukts

Pgp wird physiologisch in verschiedenen Organen und Geweben exprimiert. So wurde es in differenzierten epithelialen Zellen mit sekretorischer Funktion nachgewiesen. Die Lokalisation von Pgp an der apikalen lumenauskleidenden Oberfläche des Dün- und Dickdarms, der Gallenwege und der proximalen renalen Tubuli weist auf eine exkretorische Funktion für xenobiotische Substanzen hin (Cordon-Cardo et al., 1990; Lum & Gosland, 1995). In Tabelle 2 sind die menschlichen Organe und Gewebe mit physiologischer Pgp-Aktivität aufgelistet.

Tabelle 2: Gewebe und Organe mit physiologischer Pgp-Aktivität (Fisher et al., 1996 (modifiziert))

Leber:	luminale Oberfläche der Gallenwege
Niere:	luminale Oberfläche der proximalen Tubuli
Dünndarm und Colon:	mukosaauskleidendes Lumen
Nebennierenrinde:	Nebennierenrinde
Pankreas:	Pankreasgänge
Kapillarendothelien:	ZNS (Blut-Hirn-Schranke) Plazenta (Blut-Plazenta-Schranke) Testes (Blut-Hoden-Schranke)
Hämatopoetische Zellen:	Makrophagen aktivierte T-Zellen pluripotente Stammzellen (CD34 ⁺)

Durch Nachweis von Pgp entlang der intraluminalen Oberfläche der Kapillarendothelien einschließlich des Zentralnervensystems (ZNS), der Plazenta und der Testes wird ein protektiver Mechanismus gegen zelltoxische Substanzen vermutet (Cordon-Cardo et al., 1989; Sugawara et al., 1988)

1.2.1.3 Aufbau und Struktur von P-Glykoprotein

Pgp ist das Produkt des MDR1-Gens, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q) befindet (Bradley et al., 1988). Es hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und ist in die Lipidbilayer der Zellmembran eingebettet (Chen et al., 1987; Roninson, 1992; Gottesman & Pastan, 1988). Pgp gehört zur Superfamilie der ABC-(ATP-binding-cassette)-Transporter. Gemeinsames Merkmal der ABC-Transporter ist die molekulare Architektur in Form von transmembranären Domänen (TMD) und intrazellulären Nukleotidbindungsstellen (NBD), die Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle nutzen (Higgins, 1992).

Das transmembranäre Glykoprotein wird aus zwei gleichen Hälften gebildet. Jede Hälfte besteht aus sechs TMD und einer NBD (siehe Abbildung 1). Insgesamt setzt sich Pgp aus 1280 Aminosäuren zusammen (Chen et al., 1987; Hegewisch-Becker & Hossfeld, 1996). Die Domänen eines Pgp-Moleküls formen einen Kanal, durch den die entsprechenden Substrate transportiert werden. Eine solche Pore kann auch durch mehrere Moleküle gebildet werden (Bradley et al., 1988).

1.2.1.4 Modell der P-Glykoproteinfunktion

Zu den Substraten von Pgp gehören vor allem Xenobiotika, aber auch körpereigene Substanzen, wie z.B. Steroide, Hormone und Bilirubin (Nooter & Herweijer, 1991; van Kalken et al., 1991) (siehe Tabelle 3). Es sind vorwiegend neutrale und positiv geladene lipophile Verbindungen (Xenobiotika, MDR-related drugs), die durch passive Diffusion ins Zellinnere gelangen (Cornwell et al., 1986; Gottesman, 2002) (siehe Abbildung 2).

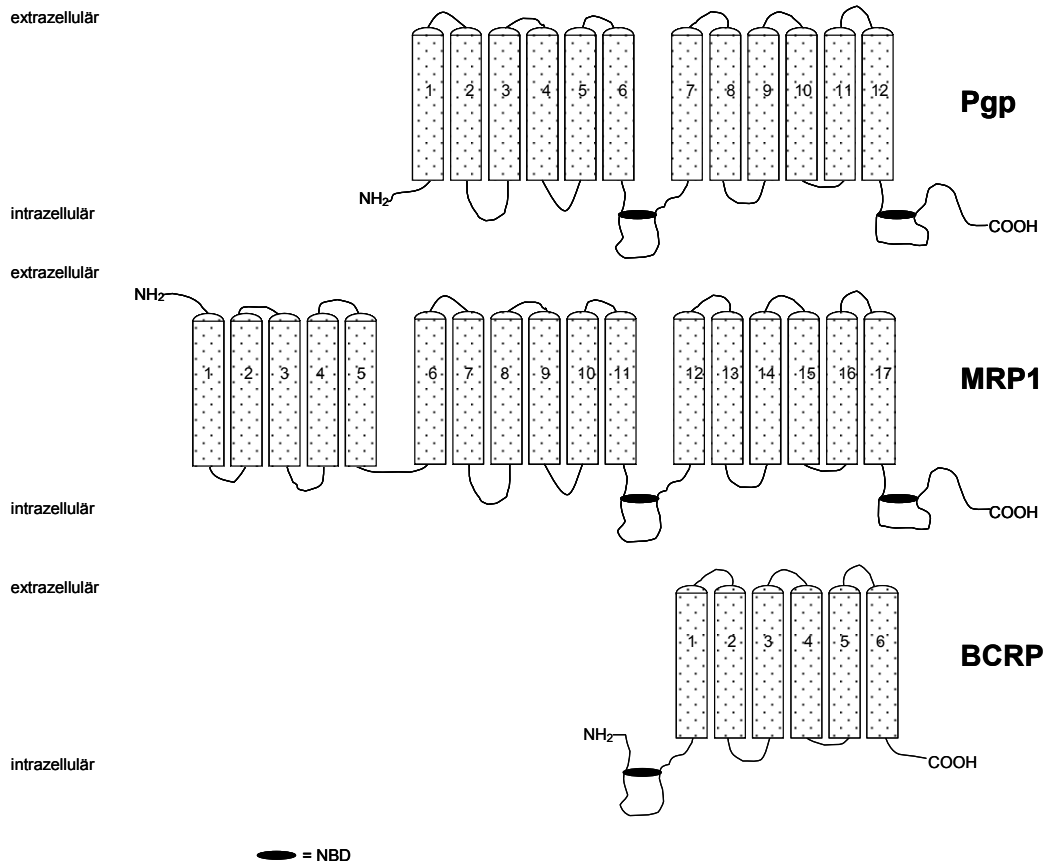


Abbildung 1: Schematische Darstellung der ABC-Transporter (van der Kolk et al., 2002 (modifiziert))

Die Funktion des humanen membranären Transporters erfolgt energieabhängig und unidirektional. Die utilizede Energie von Pgp wird in Form von ATP intrazellulär an die NBD gebunden und zu Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert. Der Transport erfolgt entweder direkt durch den von transmembranären Segmenten gebildeten Kanal oder indirekt durch Bindung an ein Carriermolekül von intra- nach extrazellulär (van der Blik & Borst, 1989). Die Bindung der Substrate oder Resistenzmodulatoren (siehe 1.2.1.5) an Pgp führt zur Aktivierung einer der beiden NBD. Dadurch kommt es zu einer Stimulation der ATPase, die zur Hydrolyse des ATP führt. Diese Hydrolyse ruft eine Konformitätsänderung des Moleküls hervor, wodurch das Substrat in den extrazellulären Raum befördert wird (Ramachandra et al., 1998). Die Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls ist zur Wiederherstellung des Ursprungszustandes von Pgp erforderlich, damit der Zyklus der Substratbindung und -ausschleusung erneut durchlaufen werden kann (Sauna & Ambudkar, 2001).

Tabelle 3: Substrate von Pgp und anderen ABC-Transportern (van der Kolk et al., 2002 (modifiziert))

Transporter	Substrat	Referenz
Pgp	Daunorubicin	Zhou et al., 1997
	Doxorubicin	Saito et al., 2001
	Idarubicin	Mankhetkorn et al., 1996
	Epirubicin	Litman et al., 2000
	Mitoxantron	Saito et al., 2001
	Vinblastin	Ushigome et al., 2000
	Vincristin	Ushigome et al., 2000
	Etoposid	Hendricks et al., 1992
	Topotecan	Vanhoefer et al., 1999
	Paclitaxel	Bardelmeijer et al., 2000
MRP1	Daunorubicin	Renes et al., 1999
	Doxorubicin	Marbeuf-Gueye et al., 1998
	Epirubicin	Litman et al., 2000
	Mitoxantron	Schneider et al., 1994
	Vinblastin	Cole et al., 1994
	Vincristin	Loe et al., 1998
	Etoposid	Young et al., 2001
	Tenoposid	Lorico et al., 1996
	Methotrexat	Hooijberg et al., 1999
MRP2	Doxorubicin	Cui et al., 1999
	Epirubicin	Cui et al., 1999
	Vinblastin	Evers et al., 1998
	Vincristin	Cui et al., 1999
	Methotrexat	Hooijberg et al., 1999
MRP3	Doxorubicin	Young et al., 2001
	Etoposid	Young et al., 2001
	Methotrexat	Zeng et al., 1999
MRP4	Methotrexat	Lee et al., 2000
	6-Mercaptopurin	Chen et al., 2001
MRP 5	6-Mercaptopurin	Wijnholds et al., 2000
	Thioguanin	Wijnholds et al., 2000
BCRP	Daunorubicin	Litman et al., 2000
	Doxorubicin	Litman et al., 2000
	Epirubicin	Litman et al., 2000
	Mitoxantron	Litman et al., 2000
	Topotecan	Litman et al., 2000

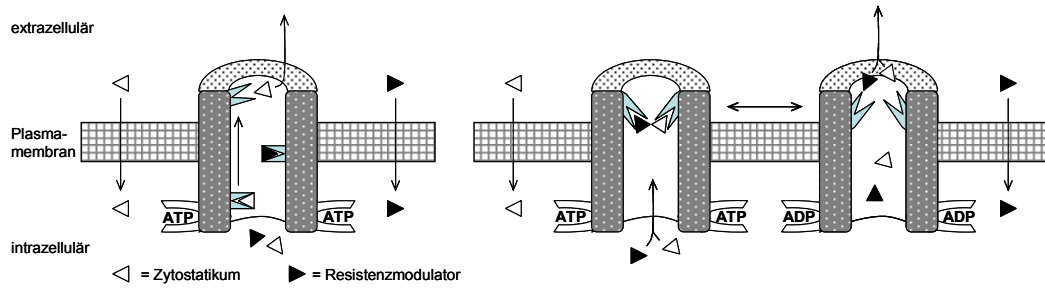


Abbildung 2: Modell der P-Glykoproteinfunktion (Ford & Hait, 1990 (modifiziert))

Pgp kann innerhalb kürzester Zeit phosphoryliert und dephosphoryliert werden. Die im Zytosol befindliche Proteinkinase C hat eine regulatorische Funktion auf die Pgp-Phosphorylierung und bedingt somit eine erhöhte Transportaktivität von Pgp (Sachs et al., 1999).

1.2.1.5 Resistenzmodulation

Durch den Einsatz von Resistenzmodulatoren (resistance modifying agents, RMA) wird versucht, den Pgp-vermittelten Efflux zytostatischer Therapeutika (siehe Tabelle 3) aus den resistenten Zellen zu inhibieren. Dabei werden die MDR-related Drugs mit den RMA kombiniert. RMA sind lipophile Substanzen, die direkt am Pgp binden und kompetitiv am Carriermolekül konkurrieren, das einen Efflux der MDR-related Drugs bewirkt (siehe Abbildung 2). Somit lassen sich höhere Zytostatikakonzentrationen in den malignen Zellen erreichen (Akiyama et al., 1988; Nooter & Sonneveld, 1994). Derzeit befindet sich eine Vielzahl dieser Modifier in Erprobung (siehe Tabelle 4).

Das klinische Konzept zur Verbesserung der Therapie maligner Erkrankungen durch Überwindung der MDR ist kritisch zu beurteilen (Scheulen, 1998; van Zuylen et al., 2000a). Einwände bestehen vor allem darin, daß

- a. die Resistenz maligner Zellen gegenüber Zytostatika in der Regel multifaktoriell bedingt ist (Kasimir-Bauer et al., 2002),

Tabelle 4: MDR-Modulatoren und zur MDR-Überwindung in vitro erforderliche Konzentrationen (Fisher et al., 1996 (modifiziert), Sonneveld, 1996 (modifiziert), van Zuylen et al., 2000a, Thomas & Coley, 2003)

MDR-Modulatoren der ersten Generation

<u>Calciumantagonisten:</u>		<u>Hormone:</u>	
Verapamil	6-10 μM	Tamoxifen	10 μM
Nifedipin	3 μM	N-Demethyltamoxifen	~10 μM
Bepidil	4 μM	4-Hydroxy-Tamoxifen	~10 μM
Nicardipin	3 μM	Progesteron	8 μM
Niguldipin	10 μM		
<u>Andere kardiovaskulär aktive Substanzen:</u>		<u>Antimalariamittel:</u>	
Amiodaron	5-10 μM	Chinin	4-7 μM
Dipyridamol	8-10 μM	Chloroquin	10-50 μM
Chinidin	4-7 μM		
<u>Phenothiazine:</u>		<u>Antibiotika:</u>	
Trifluoroperazin	3-15 μM	Cefoperazon	1.000 μM
Prochlorperazin	4 μM	Ceftriaxon	1.000 μM
Fluphenazin	3-4 μM	Erythromycin	650 μM
trans-Flupenthixol	3-5 μM	Tetracyclin	4.000 μM
<u>Immunsuppressiva:</u>			
Cyclosporin A	2-4 μM		

MDR-Modulatoren der zweiten Generation

Dexverapamil	6-10 μM
Dexniguldipin	1-2 μM
Valspodar (PSC 833)	0,5-2 μM
Rapamycin	2,5-5 μM

MDR-Modulatoren der dritten Generation

Elacridar (GF120918)	0,01-0,1 μM
Laniquidar (R101933)	0,05-0,1 μM
Zosuquidar (LY335979)	0,05-0,1 μM
Tariquidar (XR9576)	0,03-0,1 μM

- b. die MDR-Modulatoren durch Hemmung von Pgp im Gallengangsepithel einen pharmakokinetischen Effekt im Sinne einer Zunahme der Retention auf Zytostatika haben, die vorwiegend biliär eliminiert werden,
- c. die MDR-Modulatoren in einer zur Hemmung von Pgp erforderlichen Dosierung eine nicht unerhebliche intrinsische Toxizität haben,
- d. die MDR-Modulatoren in einer zur Hemmung von Pgp erforderlichen Dosierung wegen einer Hemmung der Blut-Hirn-Schranke möglicherweise zu einer Zunahme zentralnervöser Nebenwirkungen der Zytostatika beitragen (Kemper et al., 2004),
- e. die Entwicklung einer tertiären Resistenz gegen Zytostatikum und MDR-Modulator zu erwarten ist.

Für einige der MDR-Modulatoren der dritten Generation (siehe Tabelle 4) scheinen zumindest die Beeinflussung der Pharmakokinetik und die intrinsische Toxizität geringer zu sein (Bates et al., 2002), endgültige Ergebnisse klinischer Studien stehen jedoch noch aus.

Der aktuelle Stand der klinischen Entwicklung dieser MDR-Modulatoren ist:

Elacridar (GF120918): Ausgehend von In vitro- und tierexperimentellen Untersuchungen (Hyafil et al., 1993) liegen die Ergebnisse einer klinischen Phase I- und pharmakokinetischen Studie von Elacridar in Kombination mit Doxorubicin bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren vor, die bei geringer intrinsischer Toxizität nur eine marginale Interaktion mit der Pharmakokinetik von Doxorubicin zeigen (Planting et al., 2005).

Laniquidar (R101933): Entsprechend einer klinischen Phase I- und pharmakokinetischen Studie von Laniquidar in Kombination mit Docetaxel besteht keine Interaktion zwischen beiden Substanzen (van Zuylen et al., 2000b, 2002).

Zosuquidar (LY335979): Aufgrund der Ergebnisse von klinischen Phase I- und pharmakokinetischen Studien von Zosuquidar in Kombination mit dem CHOP-Regimen bei Patienten mit malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (Tura et al., 2001), mit Doxorubicin bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen (Sandler et al., 2004) und mit Daunorubicin und Cytosinarabinosid bei Patienten mit AML (Callies et al., 2004; Gerrard et al., 2004) ist eine sichere Verabreichung beider Substanzen möglich.

Tariquidar (XR9576): Ausgehend von In vitro- und tierexperimentellen Untersuchungen (Mistry et al., 1999) und dem Nachweis der Modulation von Pgp in gesunden Probanden (Stewart et al., 2000) liegen positive Ergebnisse von klinischen Phase I/IIA- und pharmakokinetischen Studien von Tariquidar in Kombination mit Vinorelbin (Abraham et al., 2001), Doxorubicin (Ferry et al., 2001) und Paclitaxel (Thomas et al., 2001) vor, die für eine Wiederherstellung der Antitumorwirksamkeit durch Hemmung von Pgp (Walker et al., 2004) sprechen.

Das in dieser Arbeit als Resistenzmodulator untersuchte BIBW22BS, dessen Wirksamkeit an die Pgp-Expression gebunden ist (Jansen et al., 1994), ist ein Phenylpteridinderivat, das sich von Dipyridamol ableitet (siehe Abbildung 3), ist 20- bis 100-fach potenter, die Pgp-vermittelte Resistenz umzukehren, und damit in seiner spezifischen Wirksamkeit den MDR-Modulatoren der dritten Generation vergleichbar.

1.2.2 Atypische Multidrugresistenz

1.2.2.1 Multidrugresistenz assoziiertes Protein 1

Die Arbeitsgruppen von Marquardt (1991) und Gervasoni (1991) fanden bei der anthrazyklin-resistenten leukämischen Zelllinie HL-60 einen ATP-abhängigen Efflux. Aufgefallen war ein Efflux in Abwesenheit von Pgp. Cole und Mitarbeiter (1992) gelang der Nachweis des Multidrugresistenz-Proteins 1 (MRP1), das ebenfalls der Superfamilie der ATP-bindenden Kasette (ABC) angehört und wird daher auch als ABCC1 bezeichnet. Diese Superfamilie ist für den aktiven Transport einer Vielfalt von Verbindungen (Phospholipide, Ionen, Peptide, Steroide, Polysaccharide, Aminosäuren, organische Anionen, Medikamente und andere xenobiotische Substanzen) durch biologische Membranen verantwortlich (Borst et al., 1999; Cole & Deeley, 1998; Higgins et al., 1992; Hipfner et al., 1999; Klein et al., 1999).

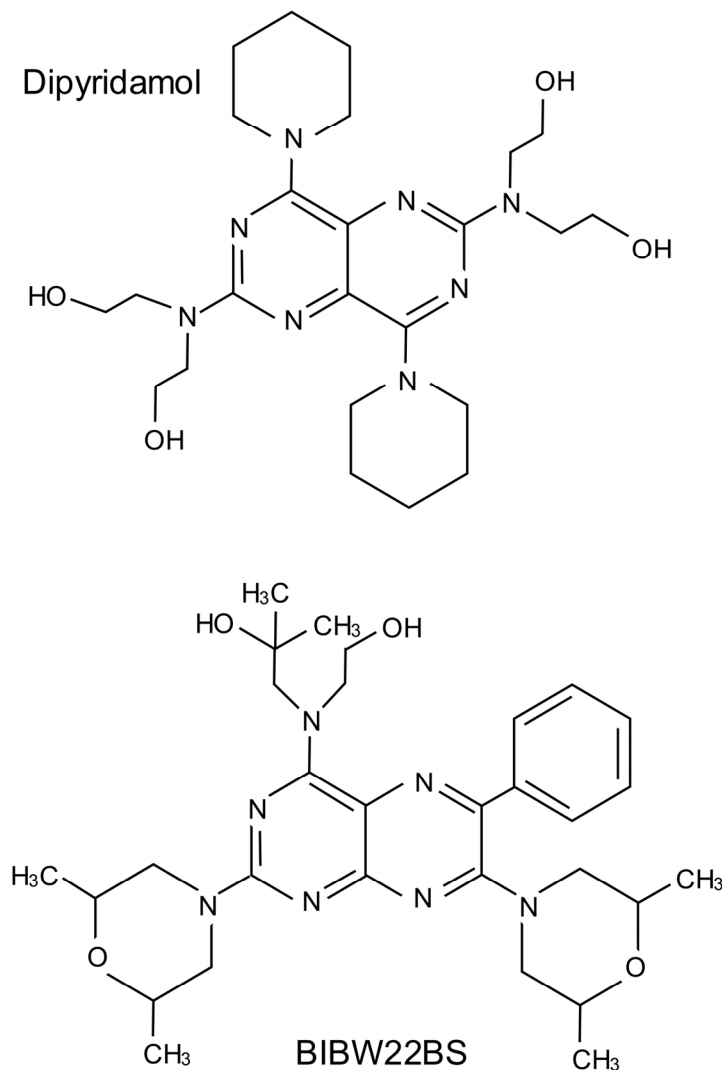


Abbildung 3: Strukturformeln von Dipyridamol und BIBW22BS
 (4-[N-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-ethanolamino]-2,7-bis(cis-2,6-dimethyl-morpholino)-6-phenylpteridin)
 (Avendaño & Menéndez, 2002)

Dieses 190 kDa-Protein, das aus 1531 Aminosäuren besteht und auf dem Chromosom 16 lokalisiert ist, kann im Gegensatz zum Pgp sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazytoplasmatischen Membranen (endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) vorhanden sein (Lautier et al., 1996). Zu den Substraten von MRP1 in MRP1-selektierten Zelllinien gehören die Anthrazykline, Epipodophyllotoxine, Vinkaalkaloide, Folsäure und Methotrexat (Cole et al., 1994; Hipfner et al., 1999; Hooijberg et al., 1999; Zaman et al., 1994; siehe Tabelle 3). Das Resistenzspektrum ist ähnlich dem von Pgp.

Taxane und Mitoxantron sind lediglich Substrate von Pgp und nicht von MRP1 (Lautier et al., 1996).

Der Aufbau entspricht dem der eukaryoten ABC-Transporter mit zwei transmembranären Regionen und zwei zytoplasmatischen ATP-Bindungsstellen, wobei MRP1 im Gegensatz zum Pgp eine zusätzliche N-terminale Erweiterung mit fünf transmembranären Domänen aufweist (Hipfner et al., 1999; van der Kolk et al., 2002) (siehe Abbildung 1).

In vivo ist MRP1 ein aktiver Glutathion-Transporter und ein Transporter von glutathion-, glucuronat- und sulfatkonjugierten Substanzen (Jedlitschky et al., 1996). Die zytostatischen Substrate von MRP1 werden in vivo nur zu einem geringen Umfang konjugiert. Im Gegensatz zum Pgp kann MRP1 kationische und neutrale Verbindungen nur durch einen Kotransport bewerkstelligen. Der Transport und damit der Efflux dieser Substanzen findet durch einen Kotransport mit reduziertem Glutathion statt (Loe et al., 1998; Renes et al., 1999). Die Konjugation von Glutathion mit Xenobiotika wird durch das Enzym Glutathion S-Transferase katalysiert (O'Brien et al., 2000).

MRP1 kommt im menschlichen Organismus ubiquitär vor. Die höchsten Konzentrationen sind in der Lunge, den Testes und den Nieren zu finden. Ferner kommt es in den verschiedenen Blut-Organschranken vor (Blut-Hirn-, Blut-Hodenschranke) (Borst et al., 2000). Aus der Gewebeverteilung und Funktion kommt MRP1 ein wichtiger Anteil an Entgiftungsvorgängen und Gewebeschutz zu (Allen et al., 2000; Leslie et al., 2001).

1.2.2.2 Isoformen des Multidrugresistenz assoziierten Proteins

Sechs weitere Mitglieder der MRP-Familie (MRP2 - 7) sind bisher bekannt (Kool et al., 1997; 1999a; Hopper et al., 2001; Taniguchi et al., 1996). Die Funktion dieser MRP1-Isoformen in der Multidrugresistenz sind bisher ansatzweise untersucht. MRP2 soll zytostatische Verbindungen wie Cisplatin, Etoposid und Vincristin transportieren (Taniguchi et al., 1996). MRP3 wird eine Substratspezifität zu Methotrexat und Etoposid zugeschrieben (Kool et al., 1999b). MRP4 kann nach Kurzzeitexposition mit Methotrexat Resistenz verleihen (Lee et al., 2000) und MRP5 transportiert 6-Mercaptopurin (siehe Tabelle 3).

1.2.2.3 Brust-Krebs-Resistenz-Protein

Dieser Transporter der ABC-Superfamilie (breast cancer resistance protein, BCRP) wurde aus einer humanen resistenten Brustkrebs-Zelllinie isoliert (Doyle et al., 1998). Nach Reproduktion des BCRP in einer sensitiven Mammakarzinom-Zelllinie konnten Resistenzen gegenüber Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron und Topotecan beobachtet werden (Doyle et al., 1998). Synonyme Bezeichnungen sind „mitoxantrone resistance protein“ (MXR) (de Bruin et al., 1999; Miyake et al., 1999) und „placental ABC transporter“ (ABCP) (Allikmets et al., 1998). Das kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 4 und besteht aus 655 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 72,6 kDa (Allikmets et al., 1998; Miyake et al., 1999). Rocchi et al. (2000) und Scheffer et al. (2000) konnten in verschiedenen Zelllinien den Nachweis erbringen, daß das BCRP in Zellmembranen lokalisiert ist.

Der Aufbau dieses Resistenzproteins unterscheidet sich von dem der übrigen ABC-Transporter. Das BCRP setzt sich aus nur einer hydrophoben transmembranären Region zusammen, die von sechs Domänen gebildet wird. Folglich besitzt es lediglich eine Nukleotidbindungsstelle (siehe Abbildung 1). Für den Transport zytostatischer Verbindungen ist jedoch eine zweite ATP-Bindungsstelle erforderlich. Das BCRP wird vielfach auch als Halbtransporter bezeichnet. Derzeit ist völlig unbekannt, mit welchem weiteren Halbtransporter BCRP sich zu einem vollständig funktionsfähigen Transportkomplex zusammenschließt (Ross, 2000).

Mögliche funktionelle BCRP-Transporterkonfigurationen sind (Ross, 2000):

1. Aktives BCRP ist ein Homo- oder Heterodimer.
2. Der unbekannte BCRP-Partner wird erst nach Kontakt mit einem Substrat gebildet.
3. BCRP ist als Monodimer aktiv. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da ausgedehnte Untersuchungen mit dem Pgp die absolute Erfordernis erbrachten, daß zwei Nukleotidbindungsstellen notwendig sind (Ambudkar et al., 1999).

Ausgehend von der Halbtransporter-Hypothese können die Tumorzellen durch Zusammenschluß mit einem weiteren Halbtransporter zu einem funktionellen Komplex, wobei Homo- und Heterodimere von BCRP möglich sind, verschiedene Kombinationen für einen „maßgeschneiderten Transport“ von zytotoxischen Substanzen verwenden. In dem in Abbildung 4 dargestellten Beispiel, das sich beliebig erweitern lässt,

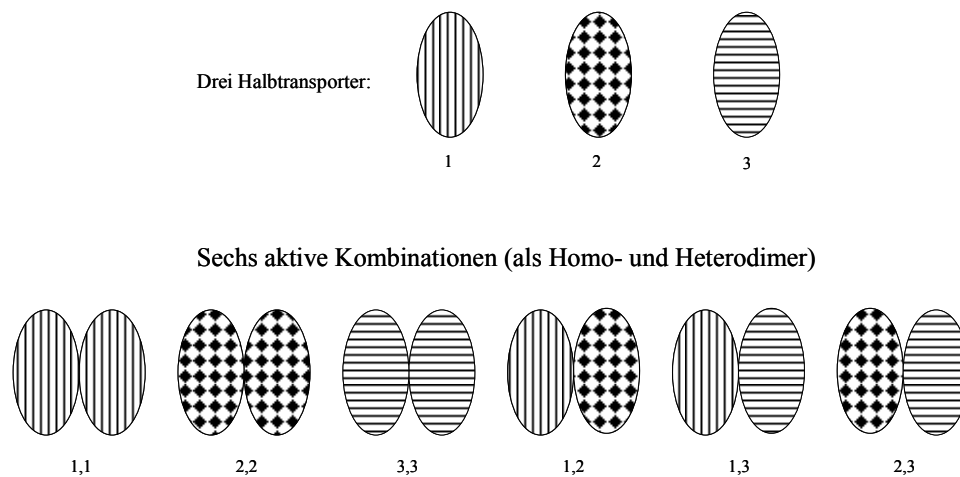


Abbildung 4: BCRP-Halbtransporter-Hypothese (Ross, 2000 (modifiziert))

sind bei drei Halbtransportern sechs potentiell aktive Kombinationen zur Resistenzentwicklung gegen eine bestimmte Verbindung möglich. Allgemein ergeben sich bei n Halbtransportern $\Sigma 1 + 2 + \dots + n-1 + n$ Kombinationsmöglichkeiten.

Die Gewebeverteilung von BCRP im Menschen unterscheidet sich weitestgehend von der von Pgp. Hohe Expressionsraten wurden im plazentaren Synzytiotrophoblasten, im Darmepithel, in der Leber, in den Brustmilchgängen und im venösen und Kapillarendothel entdeckt. Im Knochenmark konnte eine Expression in unreifen Progenitorzellen nachgewiesen werden. BCRP wird eine protektive Aufgabe im menschlichen Organismus zugeschrieben (Maliapaard et al., 2001).

Mit Fumitremorgin C, einem Produkt des Schimmelpilzen *Aspergillus fumigatus*, konnte ein spezifischer Inhibitor von BCRP aufgedeckt werden (Rabindran et al., 1998). Es ist nicht in der Lage, Resistenzen, die durch Pgp oder MRP vermittelt werden, umzukehren (Rabindran et al., 1998). Der klassische Pgp-Inhibitor Cyclosporin A ist in der Resistenzumkehr von BCRP ineffektiv (Ross, 2000).

1.2.2.4 Lungen-Resistenz-Protein

Das Lungen-Resistenz-Protein (lung resistance protein, LRP; auch als major vault protein, MVP, bezeichnet) ist im Gegensatz zur Namensgebung kein prognostischer Faktor in Bezug auf Bronchialkarzinome. Die Bezeichnung rührt von der primären Isolierung einer Bronchialkarzinom-Zelllinie (Scheper et al., 1993). Es gehört nicht zur Gruppe der ABC-Transporter.

Das kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 16 (Izquierdo et al., 1996) und besitzt ein Molekulargewicht von 110 kDa (Hart et al., 1997). Es kodiert ein zytoplasmatisches Ribonukleinprotein (Vault), das den Transport xenobiotischer Substanzen vom Zytoplasma in den Zellkern verhindert (Hart et al., 1997). In Anbetracht der Gewebeverteilung des LRP (Lunge, Nieren, Darm) wird ihm eine protektive Aufgabe zugeschrieben (Scheper et al., 1993; Izquierdo et al., 1996). Obwohl der genaue Transportmechanismus nicht bekannt ist, wird ihm eine bedeutende Rolle in der Multidrugresistenz eingeordnet. (Kitazono et al, 1999)

1.2.2.5 Apoptoseresistenz

Mit Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Sie stellt das morphologische Erscheinungsbild einer aktiven, genetisch programmierten Reaktionskaskade zur Selbstzerstörung von Zellen dar (Schulte-Hermann et al., 1997). Der apoptotische Zelltod wird durch ein komplexes System von Genen reguliert, deren Proteinprodukte als molekulare Weichen zur Induktion oder Inhibition von Apoptose gelten. Bei der Regulation der Apoptose stellen intrazelluläre Zystein-Proteinasen, die sogenannten Kaspasen, die Haupteffektormoleküle dar. Sie werden wiederum durch andere Moleküle aktiviert und/oder reguliert (Yin, 2000). Kaspasen werden als Vorläufermoleküle synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert, wobei ihnen als Substrat wiederum Kaspasen oder andere zelluläre Proteine dienen (Thornberry & Lazebnik, 1998).

Bei der Apoptoseinduktion sind zwei Reaktionswege bekannt, der eine ist rezeptorvermittelt, der andere mitochondrienvermittelt (Yin, 2000).

Die rezeptorbedingte Induktion erfolgt durch Bindung eines Fas-Liganden mit dem Fas-Membranprotein (Adachi et al., 1995). Das Fas-Protein besteht aus einer

extrazellulären, einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne. Letztgenannte ist bei der Übertragung des Todessignals essentiell und wird als „death domain“ (DD) bezeichnet (Nagata, 1997). An die DD des Fas-Proteins binden zytoplasmatische Proteine, die ebenfalls mit einem DD-Motiv ausgestattet sind, das sogenannte „Fas associated protein with DD“ (FADD) (Cleveland & Ihle, 1995). Die Apoptoseauslösung erfolgt durch Bindung von Fas mit FADD durch kaspasenbedingte proteolytische Spaltung (Los et al., 1995; Duan et al., 1996).

Fas bewirkt zudem eine Apoptoseinduktion durch eine kaspasevermittelte Spaltung des „nuclear factor- κ B“ (NF- κ B), der die Bildung von Proteinen induziert, die teilweise das Überleben der Zelle gewährleisten (Ravi et al., 1998).

Eine weitere Form der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion erfolgt durch den Tumornekrosefaktor (TNF) (Boldin et al., 1995). Auch hierbei bindet die DD vom TNF an die DD zytoplasmatischer Proteine (Hsu et al., 1995). Es kommt ebenfalls zur Spaltung durch Kaspasen, die die Apoptose induzieren (Boldin et al., 1996). Im Gegensatz zu Fas kann der TNF-Rezeptor den NF- κ B aktivieren und schützt die Zellen vor einer TNF-induzierten Schädigung (Wang et al., 1996; Liu et al., 1996a). Ferner verursacht TNF die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid, das in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Kim et al., 1991).

Der zweite Hauptreaktionsweg wird durch Veränderungen im Mitochondrien-Membranpotential ausgelöst (Raff, 1998). Eine Mitochondrien-Membranpotentialänderung führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C und Prokaspasen, die wiederum Kaspasen aktivieren (Sun et al., 1999; Susin et al., 1999). Eine absolute Trennung dieser Induktionsform von der rezeptorvermittelten ist nicht möglich, da es auch nach Fas-Aktivierung zu Veränderungen des Mitochondrien-Membranpotentials durch Aktivierung zytoplasmatischer Faktoren kommt (Steemans et al., 1998). Zudem können beide Wege durch gesteigerte Expression von bcl_2 unterdrückt werden (Cory et al., 1999). bcl_2 gehört zur B-Zell-Leukämie/Lymphom-2-Genfamilie. Die Mitglieder dieser Familie spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose. bcl_2 , $bcl-x_s$, $mcl-1$ und $A1$ sind Antagonisten (Reed, 1994; Gross et al., 1999), bax , bak , bad , $bcl-x_s$ und bid sind Agonisten der Apoptose (Gross et al., 1999; Yin, 2000). Die anti- und proapoptische Regulierung durch Beeinflussung des Cytochrom C erfolgt in erster

Linie über eine Wirkung auf die Mitochondrien. Antagonisten hemmen und Agonisten fördern die Cytochrom C-Freisetzung (Gross et al., 1999).

1.3 Zielsetzung

Hämato-onkologische Erkrankungen - wie die akute myeloische Leukämie - werden in erster Linie zytostatisch therapiert. Die medikamentöse Behandlung erfolgt mit der Intention, eine komplette Remission dieser Erkrankung zu erreichen und zu erhalten. Das Erreichen dieses Ziels kann durch Zytostatikaresistenzen erschwert werden, die beispielsweise durch das ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommende und auch von leukämischen Blasten exprimierte MDR1-Genprodukt Pgp hervorgerufen werden. So hat die vorliegende Arbeit das Ziel, die P-Glykoprotein-vermittelte Multidrugresistenz an Blasten akuter myeloischer Leukämien zu untersuchen. Eine Korrelation zwischen dem Therapieansprechen und der Expression von Pgp soll für die untersuchten Proben erstellt werden. Bei den MDR1-positiven Proben soll eine Resistenzmodulation durch Einsatz verschiedener Modifier (BIBW22BS im Vergleich zu Verapamil und Dexniguldipin) erfolgen. Der Effekt der Modifier soll mit verschiedenen Substraten von Pgp, die zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt werden, untersucht werden. Durch Inhibition des 'Drugefflux' an resistenten leukämischen Blasten soll die zytotoxische intrazelluläre Konzentration der Substrate erhöht werden. Eine Beeinflussung des MDR1-Phänotyps kann einen Einfluß auf das Therapieansprechen und damit für die Prognose der akuten myeloischen Leukämie bedeuten.

Ferner soll das neben einem Anthrazyklin bei der Therapie verwendete Ara-C, das kein Substrat von Pgp ist, mit dem zu erprobenden Resistenzmodulator BIBW22BS im In vitro-Verhalten gegenüber Zellen sensitiver und resistenter Zelllinien untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

In die Untersuchungsreihe wurden insgesamt 51 Patienten aufgenommen. Davon wiesen 25 Patienten eine unvorbehandelte AML und 26 Patienten eine rezidierte oder persistierende AML auf.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit früheren hämatologischen Erkrankungen und mit myelodysplastischem Syndrom oder bekannter stattgehabter Exposition zu Karzinogenen.

2.2 Medikamentöse Behandlungsmaßnahmen

Die AIDA-Induktionstherapie (Idarubicin: $12 \text{ mg m}^{-2} \text{ die}^{-1} \times 3$; Ara-C: $200 \text{ mg m}^{-2} \text{ die}^{-1} \times 5$; jeweils als kontinuierliche intravenöse Infusion) erhielt das gesamte Patientenkollektiv (Berman et al., 1991; Vogler et al., 1992; Flasshove et al., 2000; Wiernik et al., 1992).

Eine komplette Remission wurde entsprechend der Standardkriterien definiert (Cheson et al., 1990).

Bei den Patienten mit unvorbehandelter AML erreichten 68% ($n = 17$) eine komplette Remission und erhielten zwei weitere AIDA-basierende Konsolidierungszyklen. Drei dieser 18 Patienten erzielten nach zwei Induktionstherapien eine komplette Remission, und bei den übrigen Patienten wurde dies nach dem ersten Therapiezyklus erreicht.

2.3 Zellproben

Den Patienten wurden vor Therapiebeginn Knochenmark- oder Blutproben in heparinisierten Spritzen entnommen. Aus den Proben wurden am gleichen Tag die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation (Dichte: 1.077 g/ml ; Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 200 g bei Raumtemperatur über 25 Minuten isoliert.

2.4 Zelllinien

2.4.1 CEM-CCRF

Die humane T-Zell lymphoblastische Zelllinie CEM-CCRF wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA) erworben. Die Zelllinie leitet sich von Foley et al. (1965) ab. Die sensitiven Zellen wurden 1964 aus dem peripheren Blut eines vierjährigen Mädchens entnommen, das an einer akuten lymphoblastischen Leukämie litt.

Die Zellkultur wurde gemäß der ATCC in RPMI 1640 Medium (Firma Gibco, Karlsruhe, Deutschland) mit zusätzlichem hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum 10% (FCS; Firma Gibco) und L-Glutamin 1% (Firma Gibco) aufbewahrt und jeden 2. bis 3. Tag wurde das Medium mit Zusätzen ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37° Celsius mit 5% Kohlendioxid und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.4.2 CEM-VBL

Die vinblastinresistente Zelllinie CEM-VBL von CEM-CCRF wurde freundlicherweise von Dr. W. T. Beck, Memphis, Tennessee, USA zur Verfügung gestellt (Beck et al., 1979).

Wie bereits früher demonstriert wurde, exprimieren diese Zellen Pgp auf ihrer Oberfläche. Dies konnte mit dem monoklonalen Antikörper HYB-241 erfolgreich nachgewiesen werden (Meyers et al., 1989).

Die Zelllinie wurde in RPMI-1640 Medium (Firma Gibco) mit zusätzlichem hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum 10% (FCS; Firma Gibco) und L-Glutamin 1% (Firma Gibco) aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte bei 37° Celsius mit 5% Kohlendioxid (CO₂) und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.5 Durchflußzytometrische Bestimmungen der CD34-Expression

Die mittels Zentrifugation isolierten Zellen wurden zunächst in RPMI Medium ergänzt mit FCS 10% gewaschen. Anschließend wurde eine Suspension von 2×10^6 Zellen ml⁻¹ vorbereitet. 50 µl dieser Suspension wurden mit 10 µl phycoerythrin-konjugiertem HPCA-2 (anti 34-CD PE; Firma Becton Dickinson, San José,

Kalifornien, USA) bei 4° Celsius für 20 Minuten inkubiert. Mit einem ELITE Durchflußzytometer (Firma Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA) wurden 5000 Ereignisse gezählt. Das Fluoreszenzsignal des Phycoerythrins wurde logarithmisch verstärkt. Als Negativkontrolle diente ein irrelevanter, isotyp-entsprechender monoklonaler Antikörper.

Eine CD34-Expression unter 10% wurde als negativ eingestuft.

Die Datenanalyse erfolgte mittels ELITE Software.

2.6 Durchflußzytometrische Bestimmungen der P-Glykoproteinexpression

Die Messungen der Expression von Pgp erfolgte im wesentlichen wie bereits 1994 von Müller und seinen Mitarbeitern beschrieben.

Nach Vorbereitung einer Einzelzellsuspension wurden 2×10^6 Zellen pro Röhrchen in 50 µl des gegen eines oberflächlichen Pgp-Epitop gerichteten monoklonalen Antikörpers MRK16 (Syrinx, Frankfurt, Deutschland) zu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die bovines Serumalbumin 10% enthielt (PBS/BSA; Testprobe). Zur Vermeidung einer nicht spezifischen Färbung wurden die Zellen mit einem Mausmyelomprotein IgG_{2Ak} (Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verdünnt in einer Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ inkubiert (Kontrollprobe). Nach einer Inkubationsdauer von 45 Minuten bei 4° Celsius wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Eine erneute Resuspendierung der Zellen erfolgte in 50 µl fluorescein-isothiozyanat-konjugiertem Kaninchen-Anti-(Maus IgG) Serum (Firma Sigma) verdünnt 1:32 in PBS/BSA und für 45 Minuten bei 4° Celsius inkubiert. Die Analyse erfolgte dann umgehend mit dem Flowzytometer.

2.7 Zelluläre Effluxuntersuchungen

Für die Effluxuntersuchungen wurden 1×10^6 Zellen ml^{-1} entweder mit Rhodamin 123, Daunorubicin oder Idarubicin mit einer Konzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei 37° Celsius mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen gewaschen und in RPMI Medium mit 10% FCS entweder allein oder unter Zusatz von BIBW22BS, Dexniguldipin oder Verapamil resuspendiert.

Vor jedem Versuch wurden die vorgenannten Stoffe mit RPMI Medium und FCS 10% verdünnt.

Die durchflußzytometrische Analyse wurde nach 15-minütiger Inkubation bei 37° Celsius mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Unmittelbar der Inkubation anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in eiskaltem RPMI Medium resuspendiert, um einen weiteren Efflux zu unterbinden, und auf Eis bis zur Analyse gelagert.

Die Pgp-Funktion wurde als prozentuale Verringerung des Fluoreszenzsignals nach 15 Minuten im Vergleich zur maximalen Fluoreszenz am Ende der Influxperiode quantifiziert. Als positiv wurde ein Efflux ab 10% definiert.

Alle Untersuchungen wurden dreifach durchgeführt.

2.8 In vitro-Zytotoxizitätsversuch

Die Bestimmung der Überlebensrate der sensitiven und resistenten Zellen, die mit Ara-C allein oder mit BIBW22BS inkubiert wurden, wurde mit dem Sulphorhodamin B (SRB)-Test durchgeführt. Der SRB-Test ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung des Proteingehalts einer Zelle. Dieser ist über einen großen Bereich linear zur Zellzahl (Skehan et al., 1990).

Zunächst wurden die Zellen (CEM-CCRF, CEM-VBL) mit PBS (phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Firma Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,25% Trypsin/EDTA (Firma Biochrom) für 2 Minuten bei 37 °C gewaschen und gezählt und mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Well („Loch“) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät (Firma Halcon, Heidelberg, Deutschland). Nach Inkubation der Zellen für 72 Stunden mit Ara-C mit oder ohne BIBW22BS und alleiniger Inkubation mit BIBW22BS ebenfalls für 72 Stunden wurde den Zellen mit BIBW22BS für eine Stunde Ara-C hinzugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das weitere Wachstum der Zellen durch Fixierung gestoppt. Das Medium wurde vorsichtig aus der Mikrotiterplatte abgesaugt und die Zellen wurden mit 150 µl gekühltem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte nach Zugabe von 50 µl gekühlter Trichloressigsäure 50% (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) bei mindestens einer Stunde Lagerung im Kühlschrank (4 °C). Anschließend wurde die

Platte drei Mal mit PBS gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur (maximal 40 °C) getrocknet.

Zum Anfärben wurden in jedes Well 50 µl einer 0,4%-igen Lösung von SRB (Firma Sigma) in 1%-iger Essigsäure gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen solange mit 1%-iger Essigsäure gewaschen, bis der Überstand in den Wells farblos war. Die angefärbten Zellen wurden wiederum bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Vorbereitung der Messung wurden die Platte auf Eis gelegt und in jedes Well 100 µl kalter Trispuffer 10 mM (Firma Sigma) pipettiert. Nach 10 Minuten war der Farbstoff von den Zellproteinen gelöst und der Inhalt der Wells konnte am Photometer (340 EL BIO Kinetics Reader, Firma Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) bei 550 nm Wellenlänge gemessen werden.

2.9 Verwendete Chemikalien

Daunorubicin und Idarubicin – Firma Farmitalia, Freiburg, Deutschland

Rhodamin 123 – Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland

BIBW22BS – Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riss, Deutschland

Dexniguldipin – Firma Byk Gulden Pharmaceuticals, Konstanz, Deutschland

Verapamil – Firma Knoll AG, Ludwigshafen, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Modulatorkonzentrationen an Zellen der Zelllinie CEM-VBL

Die Resistenzumkehr der MDR sollte mit Hilfe von Resistenzmodulatoren erfolgen. Dabei wurde nicht nur deren Wirksamkeit gegen Pgp sondern ebenfalls die niedrigste wirksame Konzentration der Modifier in vitro ermittelt. Den vinblastinresistenten Zellen der Zelllinie CEM-VBL wurden zur optimalen Bestimmung der einzelnen Konzentrationen der zu untersuchenden Modulatoren BIBW22BS, Dexniguldipin (DNIG) und Verapamil (VER) diese in aufsteigenden Konzentrationen hinzugefügt. Es wurden Modifikerkonzentrationen von 0,1 bis 100 μM untersucht. Für die Effluxanalyse wurden 1×10^6 resistenter Zellen in einem ml aufgenommen und mit R123 in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ eingesetzt. Eine wirksame Konzentration zur Hemmung von Pgp war bei Erreichen eines R123-Efflux' von $\leq 10\%$ gegeben.

Die niedrigste eingesetzte Konzentration von BIBW22BS bzw. DNIG von jeweils $0,1 \mu\text{M}$ führte zu einer geringen prozentualen Reduktion des R123-Efflux' auf 73 bzw. 91% des ungehemmten Efflux' (siehe Abbildung 5). Bei $0,3 \mu\text{M}$ DNIG konnte eine 49-%ige Effluxhemmung ermittelt werden. Mit BIBW22BS konnte eine 92-%ige Inhibition bereits bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ erzielt werden und somit als wirksame Konzentration zur Effluxinhibition gefunden werden. Weitere Konzentrationserhöhungen von BIBW22BS zeigten einen Kurvenverlauf, der bei $6 \mu\text{M}$ zu einer kompletten Hemmung des Efflux führte. Das heißt, bei dieser Konzentration verblieb das R123 vollständig in den vinblastinresistenten Zellen der Zelllinie CEM-VBL. Bei DNIG wurde eine Hemmung von mehr als 90% des R123-Efflux' bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ erreicht. Der Efflux betrug dabei 7%. VER wurde erst ab $1 \mu\text{M}$ eingesetzt. Bei dieser Konzentration zeigte sich noch ein Efflux von 82%, der ebenfalls, wie bei den anderen zwei verwendeten Modifiern, mit steigender Konzentration zunächst steil abnahm, um bei niedrigeren Konzentrationen in einen flacheren sich gegen Null nähernden oder Null erreichenden Anteil überzugehen. Mit VER wurde im Gegensatz zu BIBW22BS und DNIG auch nicht bei der Maximalkonzentration von $100 \mu\text{M}$ eine vollständige

Hemmung des Efflux' von R123 erreicht. Da BIBW22BS mit 0,3 μM die niedrigste effluxinhibierende Konzentration erzielte, ist es verständlich, daß der Kurvenverlauf des BIBW22BS vergleichend zu den weiteren gemessenen Resistenzmodulatoren am steilsten verläuft. Auch bei dieser Substanz zeigt sich der Eintritt der flacheren asymptotischen Verlaufsform mit Erreichen der 90-%igen Effluxinhibitionsmarke. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein Reduktion des Efflux von R123 auf 10% mit Konzentrationen von 0,3 μM für BIBW22BS, 1 μM für DNIG und 10 μM für VER erreicht werden konnte.

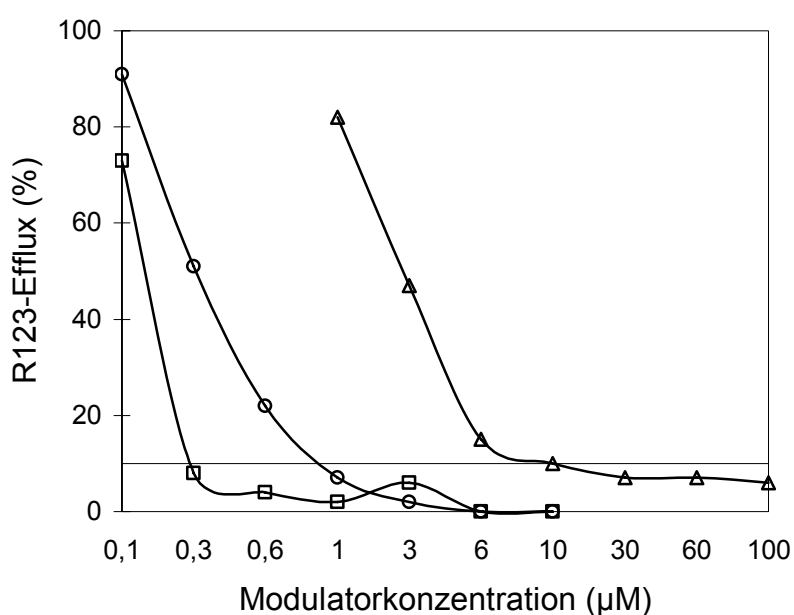


Abbildung 5: R123-Efflux in CEM-VBL-Zellen nach Inkubation mit BIBW22BS (□), DNIG (○) und VER (△) durchflußzytometrisch gemessen

3.2 MDR-Modulation mittels BIBW22BS an Zellen der Zelllinie CEM-VBL

An den Zellen der vinblastinresistenten Zelllinie CEM-VBL, die eine hohe Pgp-Expression aufweisen, wurde zunächst der Substratefflux der Substanzen R123, DNR und IDA untersucht. Ein möglicher bestehender Efflux dieser Substanzen sollte durch Zugabe des Resistenzmodulators BIBW22BS blockiert werden.

Für die Effluxanalyse wurden 1×10^6 Zellen ml^{-1} resistenter Zellen mit dem jeweiligen Substrat in einer Konzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ mit und ohne BIBW22BS in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ inkubiert und mit dem Flowzytometer gemessen.

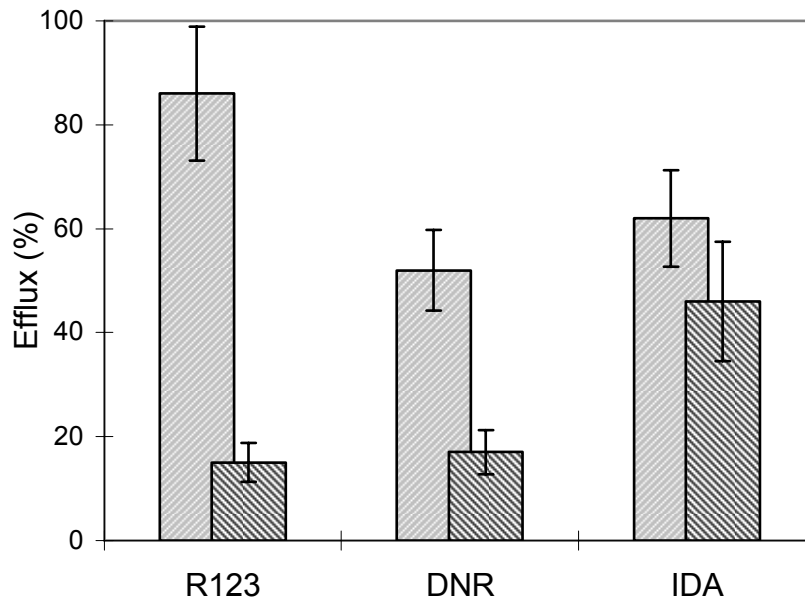


Abbildung 6: R123-, DNR- und IDA-Efflux in CEM-VBL Zellen nach Inkubation mit Zellkulturmedium (helle Säulen) oder BIBW22BS (dunkle Säulen) durchflußzytometrisch gemessen ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

Die durchflußzytometrischen Messungen nach 15 Minuten ergaben, daß die mit Frischmedium inkubierten Zellen eine starke Reduktion des intrazellulären Gehalts an R123, DNR und IDA aufwiesen (siehe Abbildung 6). Durch diesen starken Efflux der Substanzen verblieben in den multidrugresistenten Zellen lediglich 14% der initialen R123-Konzentration. DNR zeigte einen Efflux von 52% und IDA von 62%, was einem intrazellulärem Verbleib von 48 und 38% nach 15-minütiger Inkubation entsprach. Wurde den Proben das Phenylpteridinderivat BIBW22BS in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ hinzugegeben, so verringerte sich der Efflux aller verwendeten Substanzen in unterschiedlichem Ausmaß. Der R123-Efflux konnte um das 6-fache und der von DNR um das 3-fache reduziert werden. Dies entspricht einem prozentualen Efflux von 15 und 17%. Die IDA-Inkubation von 15 Minuten mit dem untersuchten Modifier BIBW22BS $1 \mu\text{M}$ ergab eine Effusion, die wesentlich

geringer als die der übrigen Substanzen ausgeprägt war. Die Effusion konnte nur von 62 auf 46% verringert werden. Dies entspricht einem 1,3-fachen Rückgang im Gegensatz zum R123 und DNR. Durch Inhibition des Effluxmechanismus mittels BIBW22BS verblieben bei R123 85%, bei DNR 83% und bei IDA jedoch 54% in den vinblastinresistenten Zellen CEM-VBL. Fraglich bleibt der Mechanismus, der eine IDA-Effusion hervorruft. Aus Pgp-positiven Zellen gelangt IDA zwar ebenfalls zellauswärts, jedoch ließ sich die durch Pgp vermittelte MDR nicht in so starkem Ausmaß hemmen, wie es bei R123 und DNR der Fall war.

3.3 Effluxuntersuchungen an Blastenpopulationen mit akuter myeloischer Leukämie

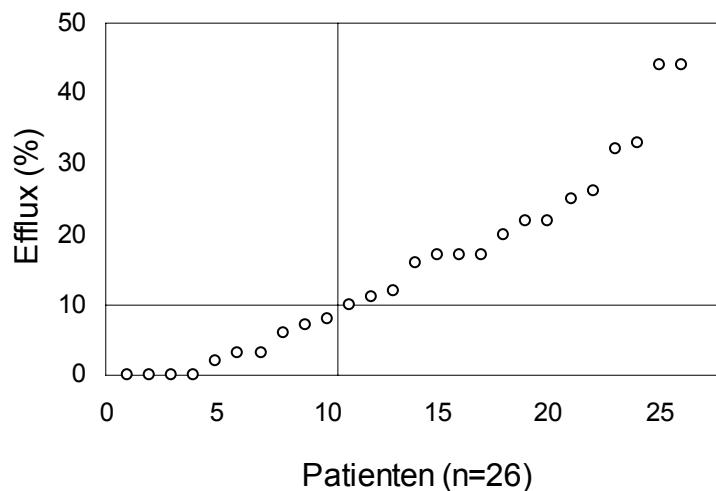
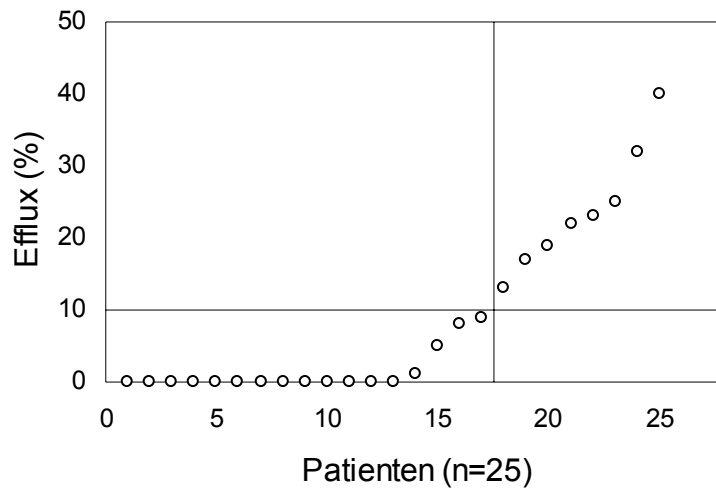
Es wurde zunächst der Efflux der einzelnen fluoreszierenden Substanzen gemessen. Anschließend erfolgte die nochmalige Effluxmessung, nachdem jede dieser Substanzen mit den Resistenzmodulatoren versetzt wurden. Ein positiver Efflux wurde ab 10% definiert.

3.3.1 Rhodamin 123

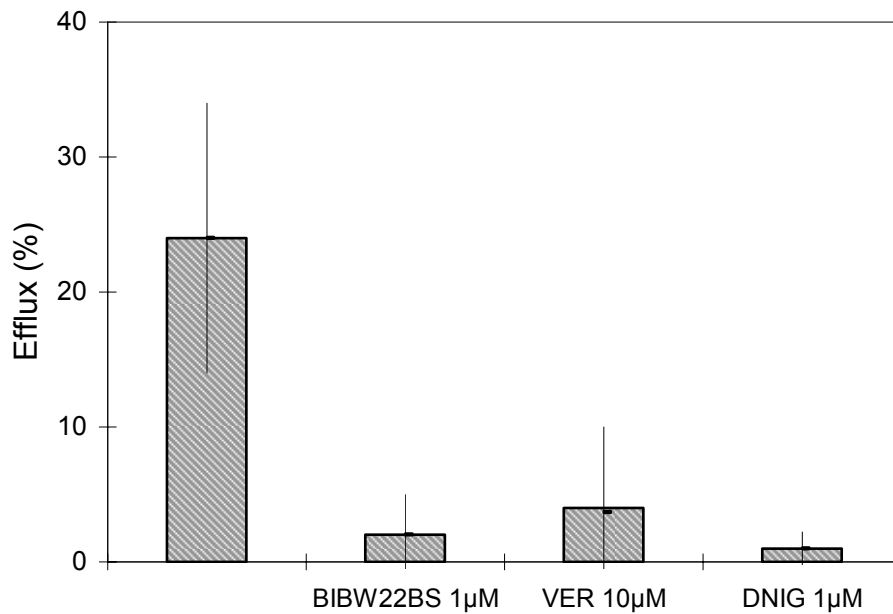
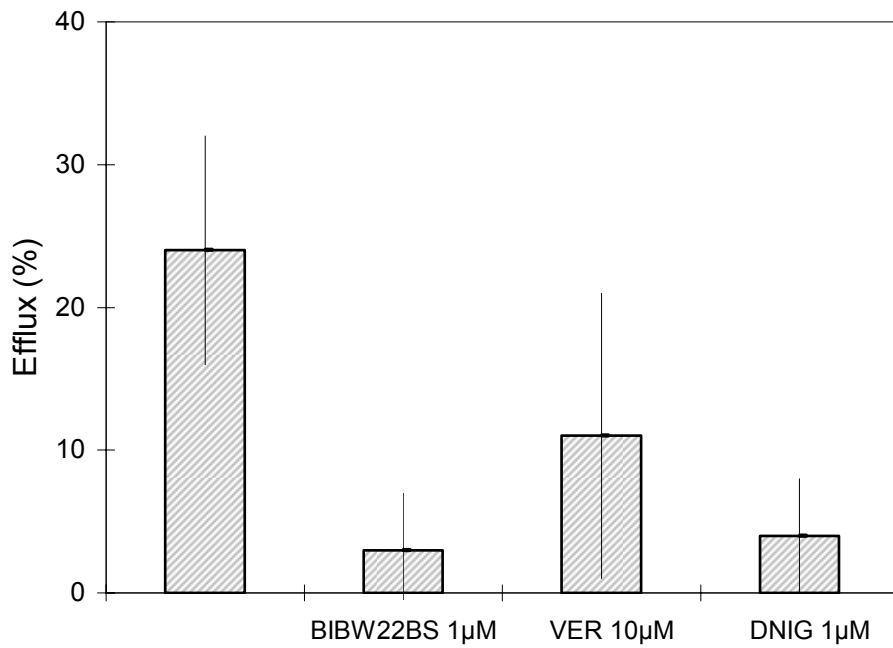
Von den insgesamt 51 Patienten handelte es sich um 25 Neuerkrankungen. 26 Patienten wiesen ein Rezidiv oder Persistenz der AML auf. Von den 25 Patienten mit unvorbehandelter AML wiesen 32% (8 von 25 Patienten) einen positiven R123-Efflux auf (siehe Abbildung 7a). Nach 15-minütiger Inkubation mit Zellkulturmedium ohne Zusätze wiesen die Blasten der Patienten mit positivem Efflux einen Efflux von im Mittel 24% auf. Wurde diesen Efflux-positiven Zellproben jeweils ein Resistenzmodulator hinzugefügt, so konnte der Efflux inhibiert werden (siehe Abbildung 8a). 1 μ M BIBW22BS bewirkte, daß 97% des R123 bei den MDR-Positiven intrazellulär verblieb. 10 μ M VER und 1 μ M DNIG verursachten einen durchflußzytometrisch gemessenen Efflux von 11 und 4%.

Im Gegensatz zu den Patienten mit unvorbehandelter AML wiesen nahezu doppelt so viele Erkrankte mit einem Rezidiv oder Persistenz der Erkrankung einen Efflux auf. Insgesamt 16 von 26 gemessenen Proben (62%) zeigten einen Efflux (siehe Abbildung 7b). Aus Abbildung 8b ist ersichtlich, daß auch hier bei 62% der

Patienten ein prozentualer Efflux von 24% ermittelt wurde. Das bedeutet, daß 76% des R123 in den leukämischen Blasten verblieben. Wurde den Zellproben der Patienten mit refraktärer oder rezidivierter AML ein Modifier hinzugefügt, so wurde in diesen Fällen ebenfalls eine deutliche Inhibition des Efflux' erkennbar. Die Mittelwerte der Hemmung betragen 98% für BIBW22BS 1 μ M, 96% für VER 10 μ M und 99% für DNIG 1 μ M.



Abbildungen 7a, b: R123-Efflux in Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben) oder rezidivierter/refraktärer AML (unten) durchflußzytometrisch gemessen

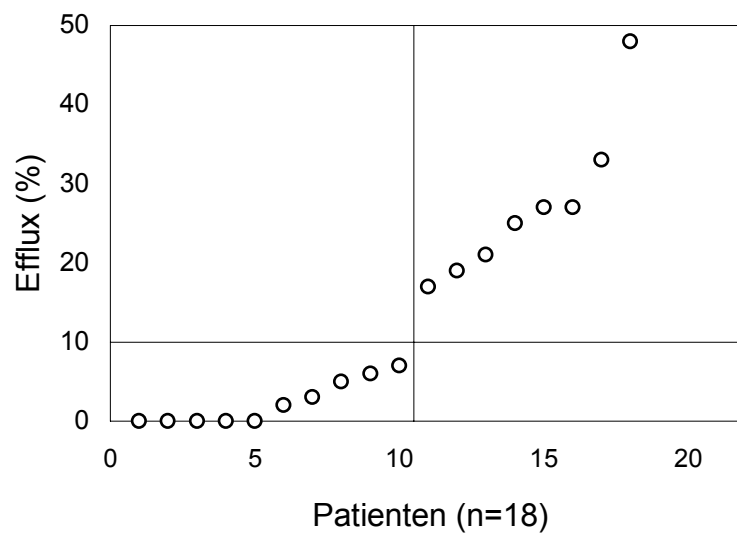
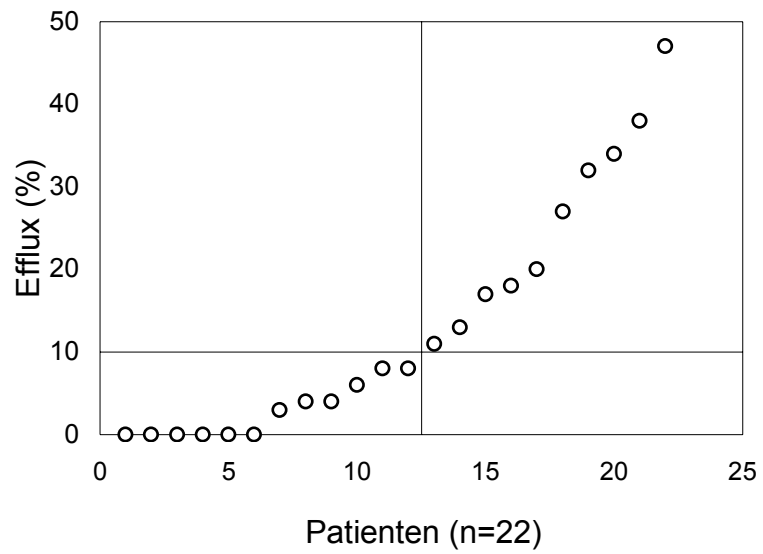


Abbildungen 8a, b: R123-Efflux in resistenten Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben, n = 8) oder rezidivierter/refraktärer AML (unten, n = 16) nach Inkubation mit Resistenzmodulatoren oder mit Zellkulturmedium durchflußzytometrisch gemessen ($x \pm SD$)

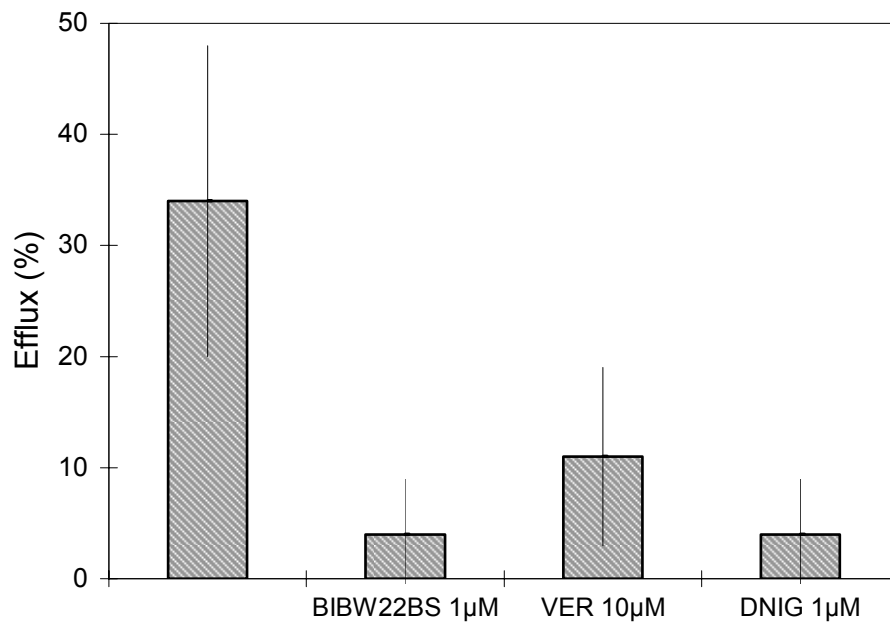
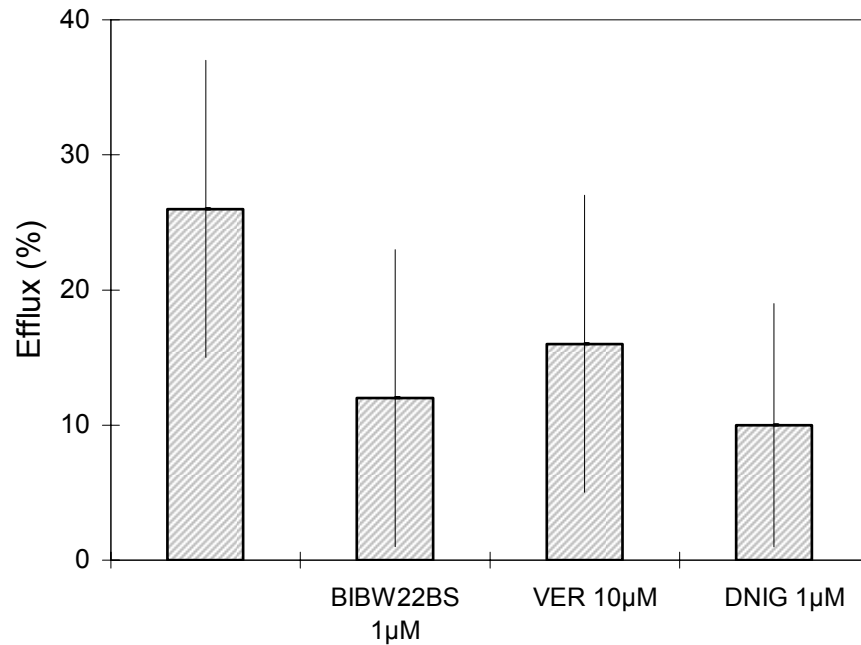
3.3.2 Daunorubicin

Das Effluxverhalten von DNR wurde an 22 Patientenproben mit unvorbehandelter AML untersucht. Bei Inkubation von DNR mit Zellkulturmedium konnte ein positiver Efflux bei 10 von 22 Untersuchungen festgestellt werden (siehe Abbildung 9a). Dies entspricht 45% der Proben. Dabei verteilte sich der als positiv definierte Efflux zwischen 11 und 47%. Bei 27% der Patientenproben konnte überhaupt kein Efflux nachgewiesen werden. Aus Abbildung 9b geht hervor, daß das resistente Patientenkollektiv mit unvorbehandelter AML einen mittleren Efflux von 26% erkennen ließ. Nach Zugabe der MDR-Modulatoren zu den resistenten Blastenpopulationen konnte der Daunorubicinausstrom inhibiert werden, war jedoch schwächer als bei den positiven R123-Proben der Patienten mit unvorbehandelter AML ausgeprägt. Nach Zugabe von 1 μM BIBW22BS konnte der Efflux auf 12% reduziert werden. 10 μM VER und 1 μM DNIG ergaben eine Reduktion auf 16 und 10%.

Bei den rezidivierend Erkrankten und bei den Patienten mit Blastenpersistenz wurde ein positiver Efflux bei 44% der untersuchten Proben entdeckt. Es waren 18 Untersuchungsproben auswertbar (siehe Abbildung 9b). Acht dieser Proben waren mit positivem Efflux gekennzeichnet. Eine Probe war nicht auswertbar. Die Proben mit nachweisbarem Efflux von 10% und mehr umfaßten einen Bereich von 17 bis 48%. Bei fünf Patienten konnte keinerlei Efflux nachgewiesen werden. Dabei ergab sich bei 28% kein Efflux. Der Effluxmittelwert der als positiv eingestuften Proben betrug 34% (siehe Abbildung 10b). Wurde diesen resistenten leukämischen Blasten die Modifier hinzugegeben, so erhielt man Effluxmittelwerte von 4% für 1 μM BIBW22BS, 11% für 10 μM VER und 4% für 1 μM DNIG und somit eine deutliche Effluxinhibition.



Abbildungen 9a, b: DNR-Efflux in Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben) oder rezidivierter/refraktärer AML (unten) durchflußzytometrisch gemessen



Abbildungen 10a, b: DNR-Efflux in resistenten Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben, n = 10) oder rezidivierter/refraktärer AML (unten, n = 8) nach Inkubation mit Resistenzmodulatoren oder mit Zellkulturmedium durchflußzytometrisch gemessen ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

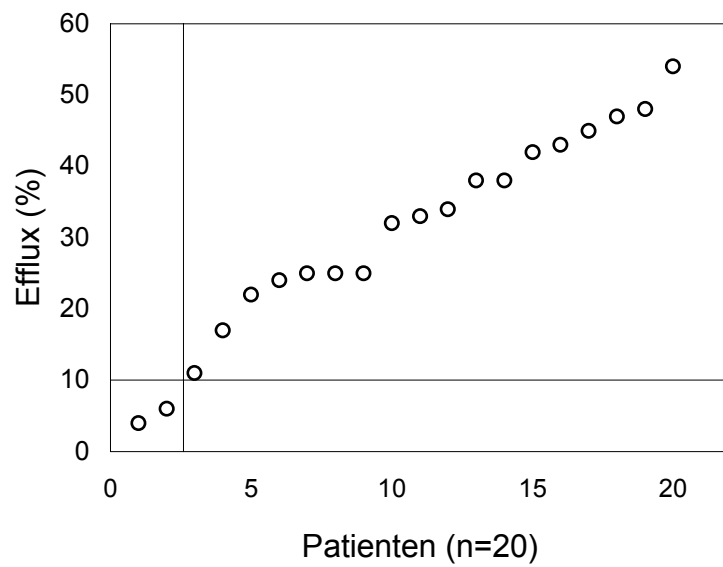
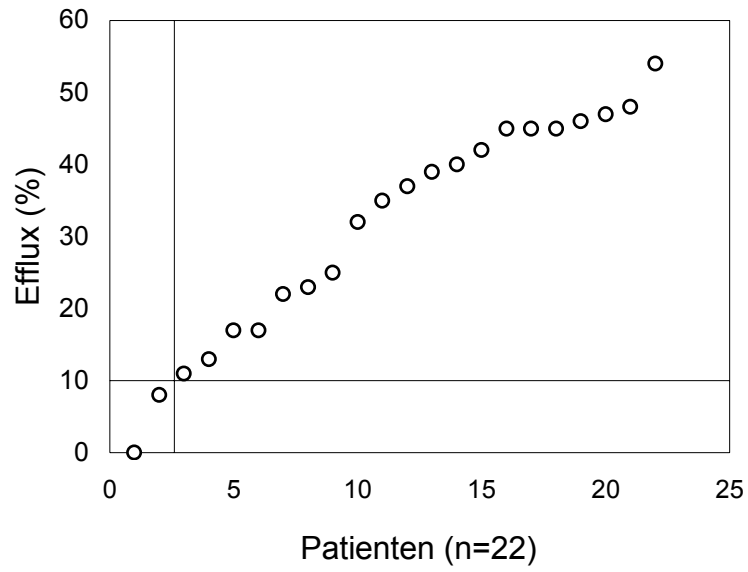
3.3.3 Idarubicin

Bei der Analyse des Effluxverhaltens des Anthrazyklins IDA, wurde bei 20 von 22 gemessenen Patientenproben mit unvorbehandelter AML ein positiver Efflux analysiert (siehe Abbildung 11a). Dies macht 91% der Patienten mit unvorbehandelter AML aus. Im Gegensatz zu R123 und DNR ließ sich bei zwei unvorbehandelten AML kein Efflux von IDA nachweisen. Die Positiven variierten zwischen 11 und 54%. Der Mittelwert betrug 35%. Im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Substanzen R123 und DNR ließ sich der Efflux aus den Zellen nicht durch 10 μM VER, 1 μM DNIG und 1 μM BIBW22BS blockieren. (siehe Abbildung 12a).

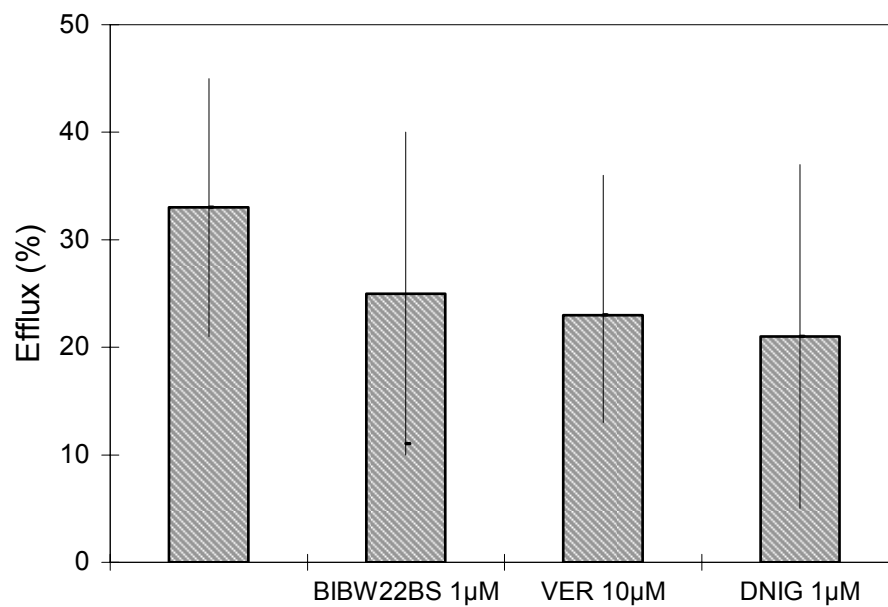
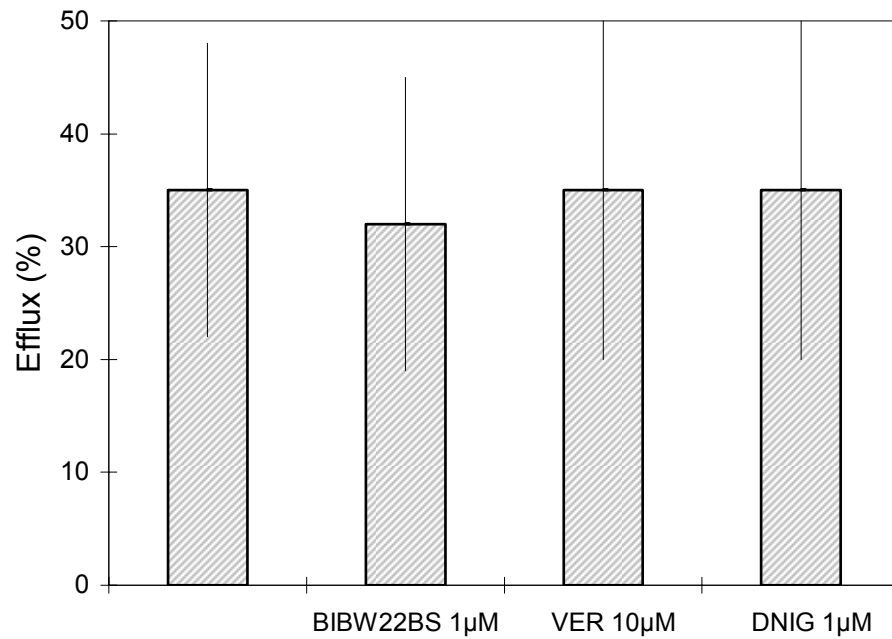
Auch bei der refraktären/rezidierten AML ergab sich ein hoher Anteil mit positivem Efflux. Von den 20 untersuchten Patienten wiesen 18 (90%) - wie bei den Proben der Patienten mit unvorbehandelter AML - einen Efflux zwischen 11 und 54% auf. Bei den 18 Proben mit positivem Effluxnachweis gelang durch Einsatz der verschiedenen Modifier lediglich eine schwache Blockierung des IDA-Efflux. BIBW22BS 1 μM konnte den Efflux auf 25% verringern, VER 10 μM auf 23 und DNIG auf 21%.

3.4 Korrelation zwischen CD34-Expression und Rhodamin 123-Efflux

Von 51 Patienten mit AML wurden 40 Proben zur CD34-Bestimmung ausgewertet. Die CD34-Expression wurde ab 10% als positiv eingestuft. Die Variationsbreite der ermittelten Werte lag zwischen 10 und 90% (Mittelwert: 57%). Wie aus der Vierfeldertafel (siehe Tabelle 5) ersichtlich, zeigten 26 der insgesamt 40 untersuchten Proben eine CD34-Antigenexpression (CD34^+). Dies entspricht 65%. 50% der Proben ergaben einen positiven Efflux von R123 (R123^+ ; 20 von 40 Patienten). Von den 26 CD34^+ waren 58% (15 von 26 Patienten) gleichzeitig R123^+ . Betrachtet man allerdings die R123^+ , so zeigt sich, daß 15 von 20 Proben ebenfalls CD34^+ exprimierten (75%). Aus der obigen Tafel können insgesamt 15 Patienten ausgemacht werden, die sowohl eine positive CD34-Expression als auch einen positiven R123-Efflux vorweisen. Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten



Abbildungen 11a, b: IDA-Efflux in Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben) oder rezidivierter/refraktärer AML (unten) durchflußzytometrisch gemessen



Abbildungen 12a, b:

IDA-Efflux in resistenten Blastenpopulationen von unvorbehandelter AML (oben, n = 20) oder persistierender/rezidivierter AML (unten, n = 18) nach Inkubation mit Resistenzmodulatoren oder mit Zellkulturmedium durchflußzytometrisch gemessen ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Patienten ergibt das einen Anteil von 37,5%. Es ließ sich nach dem obigen Vierfeldertest keine Korrelation zwischen der Expression des CD34-Antigens und dem positiven Efflux des R123 bei Patienten mit AML finden ($p \leq 0,19$). Einen negativen Nachweis beider untersuchten Merkmale wiesen insgesamt neun Patienten auf. Neun der 14 CD34-negativen Patienten (64%) wiesen auch keinen R123-Efflux auf und bei neun der insgesamt 20 R123⁻ Patienten konnte keine CD34-Antigenexpression ermittelt werden.

Tabelle 5: Korrelation zwischen R123-Efflux und CD34-Expression in AML-Blastenpopulationen (n = 40; $p \leq 0,19$)

CD34-Expression	R123-Efflux		Total
	+	-	
+	15	11	26
-	5	9	14
	20	20	40

3.5 Korrelation zwischen P-Glykoproteinexpression und Rhodamin 123-Efflux

Im Vergleich zum R123-Efflux, der als funktioneller Nachweis von Pgp gilt, wurde bei 22 der insgesamt 51 Patienten die Expression des für die MDR verantwortlichen Pgp bestimmt. Dazu wurde der gegen ein Oberflächenepitop gerichtete monoklonale Antikörper MRK16 verwendet. Er zeigt keine Kreuzresistenz zu dem menschlichen MDR2-Genprodukt.

Insgesamt 12 von 22 Patienten (55%) wiesen eine nachweisbare Pgp-Expression auf (siehe Tabelle 6). 8 von 22 waren positiv hinsichtlich des R123-Efflux (36%). Bei den Patienten mit positivem R123-Efflux (R123⁺) konnte gleichzeitig bei sieben eine Pgp-Expression nachgewiesen werden (Pgp⁺; 87,5%). Von 12 Patienten, die Pgp⁺ waren, hatten auch sieben einen nachweisbaren positiven R123-Efflux (58%).

Aus der Vierfeldertafel geht ferner hervor, daß neun von 14 Patienten (64%), die keinen R123-Efflux hatten, auch keine Pgp-Expression aufwiesen. Von 10 Patienten mit fehlender Pgp-Expression hatten neun keinen R123-Efflux nachzuweisen (90%). Zwischen der Pgp-Expression und dem positiven Effluxnachweis von R123 konnte mit dem Vierfeldertest eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p \leq 0,02$).

Tabelle 6: Korrelation zwischen R123-Efflux und Pgp-Expression in AML-Blastenpopulationen (n = 22; p ≤ 0,02)

Pgp-Expression	R123-Efflux		Total
	+	-	
+	7	5	12
-	1	9	10
	8	14	22

3.6 Rhodamin 123-Efflux und Therapieergebnis bei Patienten mit unvorbehandelter akuter myeloischer Leukämie

In dieser Arbeit wurden 25 Patienten mit erstdiagnostizierter AML unter anderem auf deren Pgp-vermittelte MDR untersucht. Dabei konnte durch durchflußzytometrische Untersuchungen bei acht der 25 Patienten (32%) ein Pgp-bedingter R123-Efflux verifiziert werden (siehe Tabelle 7). Das Untersuchungsmaterial wurde vor Beginn der Induktionstherapie gewonnen. Die 25 Patienten mit unvorbehandelter AML wurden mit einer AIDA-Induktionstherapie bestehend aus Ara-C und IDA behandelt. 56% (14 von 25 Patienten) erreichten nach dem ersten Kurs der Induktionstherapie eine CR. Drei Patienten erreichten erst nach dem zweiten Kurs der Induktionstherapie eine CR. 20% der Erkrankten wiesen eine Blastenpersistenz auf. Zwei Patienten erreichte eine partielle Remission ohne Erreichen einer CR.

Von den acht Patienten mit positivem Efflux erreichten fünf Patienten eine CR (62,5%). Nur bei einem Patienten mit R123-Efflux persistierten die myeloischen Blasten trotz chemotherapeutischer Behandlung. Zwei der Patienten mit positivem Efflux konnten eine CR nach dem zweiten Kurs der Induktionstherapie erzielen. Aus der Gruppe der Patienten mit positivem R123-Efflux erlangten fünf von acht Patienten (62,5%) im Vergleich zu 53% aus dem Patientenkollektiv ohne nachgewiesenen Efflux eine CR nach dem ersten Therapiezyklus. Der positive R123-Efflux der Patienten mit erstdiagnostizierter AML ließ sich bei allen acht Patienten nach Zugabe des Resistenzmodulators BIBW22BS komplett blockieren, das heißt, daß der Efflux zu über 90% inhibiert wurde.

Betrachtet man die CD34-Antigenexpression der Patienten mit der Erstdiagnose einer AML, so wurde die Expression bei 17 dieser Patienten bestimmt. Von diesen 17 Messungen konnten 41% (sieben Patienten) als positiv eingestuft werden. 43% der CD34⁺ erreichten nach dem ersten Induktionskurs eine CR. Vier der sieben Patienten waren neben der CD34-Positivität ebenfalls positiv bezüglich des R123-Efflux', die allesamt eine CR erreichten, zwei Patienten nach dem zweiten Therapiekurs.

Tabelle 7: R123-Efflux und Behandlungsergebnis bei Patienten mit unvorbehandelter AML (n = 25) (CR = klinische Remission, PR = partielle Remission, BP = Blastenpersistenz, n.b.= nicht bestimmt)

Patienten	R123- Efflux (%)	R123-Efflux (%) + BIBW22BS	CD34- Expression (%)	Therapieergebnis
1	0	0	1	PR
2	0	0	0	BP
3	0	0	0	CR
4	0	0	0	CR
5	0	0	48	BP
6	0	0	5	BP
7	0	13	n.b.	CR
8	0	2	32	CR
9	0	0	47	BP
10	0	4	n.b.	PR
11	0	0	n.b.	PR→CR
12	0	0	n.b.	CR
13	0	0	n.b.	PR
14	5	16	1	CR
15	8	0	3	CR
16	8	4	5	CR
17	9	0	n.b.	CR
18	13	0	n.b.	CR
19	17	0	7	BP
20	19	0	90	PR→CR
21	22	0	n.b.	CR
22	23	8	0	CR
23	25	0	75	CR
24	32	0	30	PR→CR
25	40	0	17	CR

3.7 In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid bei den Zelllinien CEM-CCRF und CEM-VBL

Ara-C gehört zu den Zytostatika, die zur Behandlung der AML eingesetzt werden. Es unterliegt nicht dem Mechanismus der MDR. In diesem Versuchsaufbau sollte die Überlebensrate Pgp-positiver und -negativer Zellen einer sensitiven und resistenten Zelllinie ermittelt werden, wenn sie mit Ara-C inkubiert wurden. Zum Nachweis möglicher Interaktionen wurden die Zellen beider Zelllinien zum Ara-C mit dem Resistenzmodulator BIBW22BS inkubiert. Dazu wurde Ara-C jeweils eine und 72 Stunden mit Zellen der sensitiven Zelllinie CEM-CCRF und der resistenten Zelllinie CEM-VBL inkubiert. BIBW22BS wurde bei allen Versuchen 72 Stunden mit Zellen der beiden Zelllinien inkubiert und jeweils in einer Konzentration von 0,3 μM eingesetzt, die mindestens eine 90%ige Effluxinhibition von R123 an Pgp-haltigen resistenten Zellen der Zelllinie CEM-VBL bewirkt (siehe 3.1). Ara-C wurde in steigenden Konzentrationsreihen von 0,001 bis 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ untersucht.

3.7.1 In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid an Zellen der Zelllinie CEM-CCRF

Nach dreitägiger Inkubation des Ara-C mit den drugsensitiven Zellen, die kein Pgp exprimieren, zeigte sich, wie aus der Abbildung 13 hervorgeht, daß die niedrigste eingesetzte Konzentration von 0,001 $\mu\text{mol l}^{-1}$ einen Zelltod von 20% verursachte. In weiteren steigenden Schritten der Konzentration nahm der Kurvenverlauf einen sehr steilen Verlauf an, so daß bei 0,01 $\mu\text{mol l}^{-1}$ die Zellen noch eine Überlebensrate von 28% aufwiesen. Bei 0,1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ waren nahe zu alle sensitiven Zellen zugrundegegangen.

Wurden die sensitiven Zellen und Ara-C noch zusätzlich mit BIBW22BS inkubiert, so ergab sich eine während des gesamten Konzentrationsumfanges des Ara-C von 0,001 bis 0,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ eine hohe zelluläre Überlebensrate der sensitiven Zelle. Es konnte lediglich ein minimaler Zelluntergang (maximal 15%) verzeichnet werden. Eine eigene zytotoxische Wirkung des BIBW22BS gegenüber den sensitiven Zellen der Zelllinie CEM-CCRF konnte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 13).

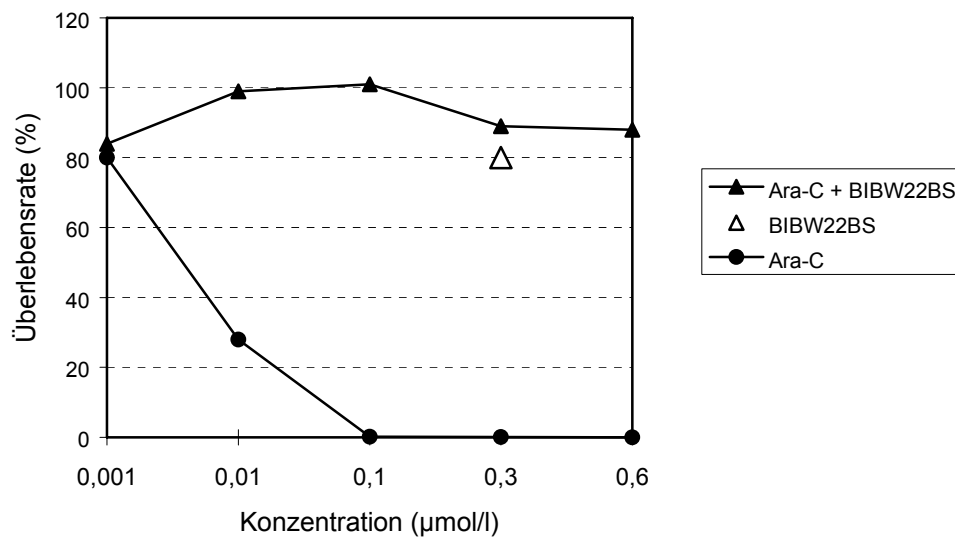


Abbildung 13: In vitro-Zytotoxizität von Ara-C mit und ohne BIBW22BS nach 72-stündiger Inkubation mit sensitiven Zellen der Zelllinie CEM-CCRF

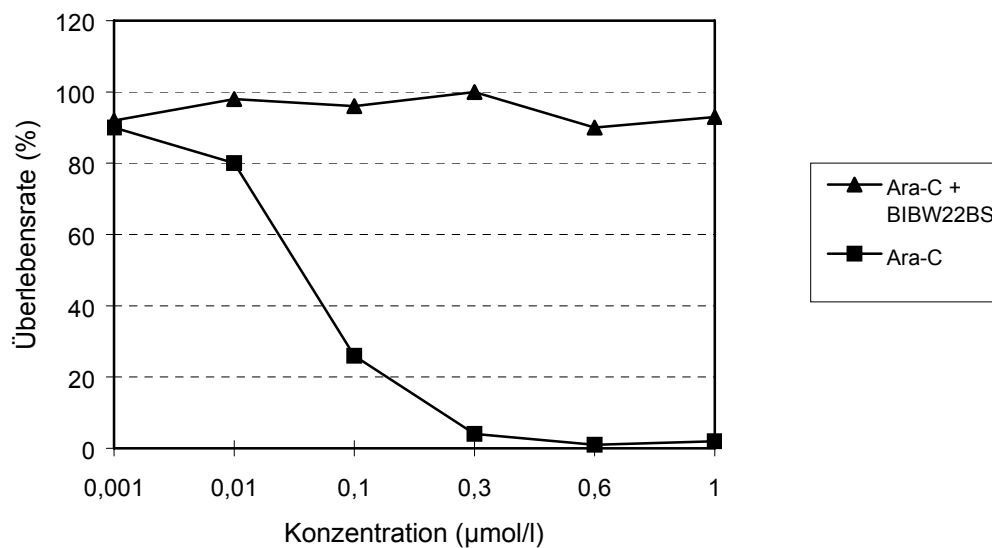


Abbildung 14: In vitro-Zytotoxizität von Ara-C mit und ohne BIBW22BS nach 1-stündiger Inkubation mit sensitiven Zellen der Zelllinie CEM-CCRF

Die Ergebnisse nach einstündiger Inkubation der Pgp-negativen Zellen mit Ara-C ergaben ab einer Konzentration von $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ein ähnliches Bild wie nach dreitägiger Inkubation (siehe Abbildung 14). Es überlebten kaum sensitive Zellen. Die Ergebnisse unterschieden sich dahin, daß bei $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ nach einer Stunde noch 36% der Zellen im Gegensatz zum kompletten Zelltod bei 72 Stunden überlebten. Diese Differenz ließ sich durch die unterschiedliche Inkubationszeit der Zellen mit Ara-C erklären. Nahezu identische Ergebnisse ergaben sich beim Einsatz von $0,3$ und $0,6 \mu\text{mol l}^{-1}$. Hier näherte sich die Überlebensrate der sensitiven Zellen gegen Null oder erreichte 0%. Das Ergebnis der zusätzlich mit BIBW22BS inkubierten Zellen nach einer Stunde stellt ein Abbild der 72-stündigen Inkubationsergebnisse dar. Die sensitiven Zellen der Zelllinie CEM-CCRF zeigten einen maximalen Zelltod von 10% der Zellen.

3.7.2 In vitro-Zytotoxizität von Cytosinarabinosid an Zellen der Zelllinie CEM-VBL

Der gleiche Versuchsaufbau (siehe Abbildung 15) diente zum Vergleich der resistenten Zellen gegenüber Ara-C und andererseits Ara-C mit BIBW22BS. Bei dreitägiger Inkubation von Ara-C ergab die erste gemessene Konzentration von $0,01 \mu\text{mol l}^{-1}$, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit sensitiven Zellen, daß Ara-C mit und ohne dem Phenylpteridinderivat keinen Zelluntergang hervorrief. Bis zum zehnfachen Konzentrationsansatz verhielten sich die Zellen mit und ohne BIBW22BS sehr ähnlich. Bei $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ zeigten die Zellen, die nur mit Ara-C inkubiert wurden, eine 86%-ige Überlebensrate. Mit BIBW22BS lag diese noch bei 100%. Bei $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ erreichten beide Kurven fast den Nullpunkt, das heißt, es überlebten fast keine Zellen. Bei der resistenten Zelllinie verhielten sich Ara-C als auch Ara-C mit Zusatz ähnlich.

Nach einstündiger Inkubation von Ara-C mit dem Resistenztyp der Zelllinie CEM-VBL zeigte sich bei den getesteten Konzentrationen tendenziell das gleiche Ergebnis wie zuvor. Gemäß Abbildung 16 bestand bei einer einstündiger Inkubation und einer Konzentration von $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ noch eine 100%-ige Überlebensrate, obwohl nach 72-stündiger Inkubation die Überlebensrate abgefallen war.

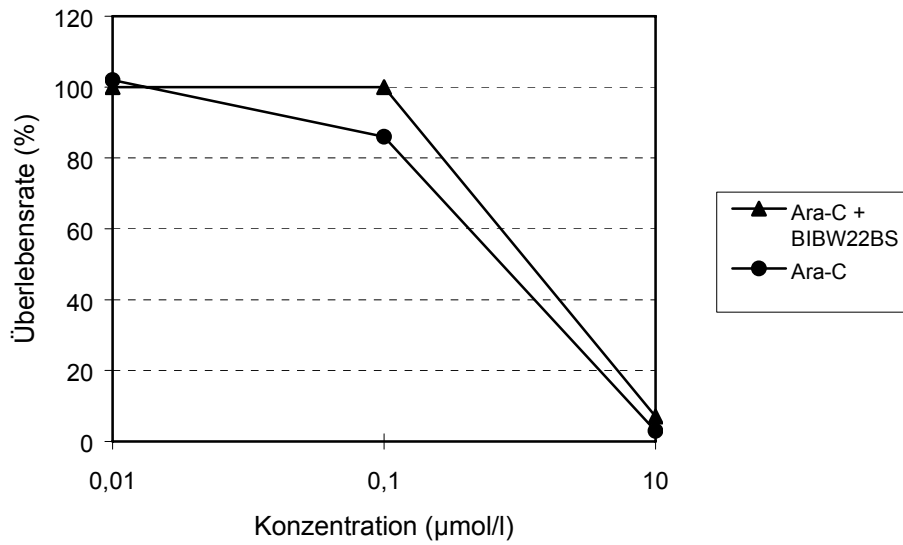


Abbildung 15: In vitro-Zytotoxizität des Ara-C mit und ohne BIBW22BS nach 72-stündiger Inkubation mit den resistenten Zellen der Zelllinie CEM-VBL

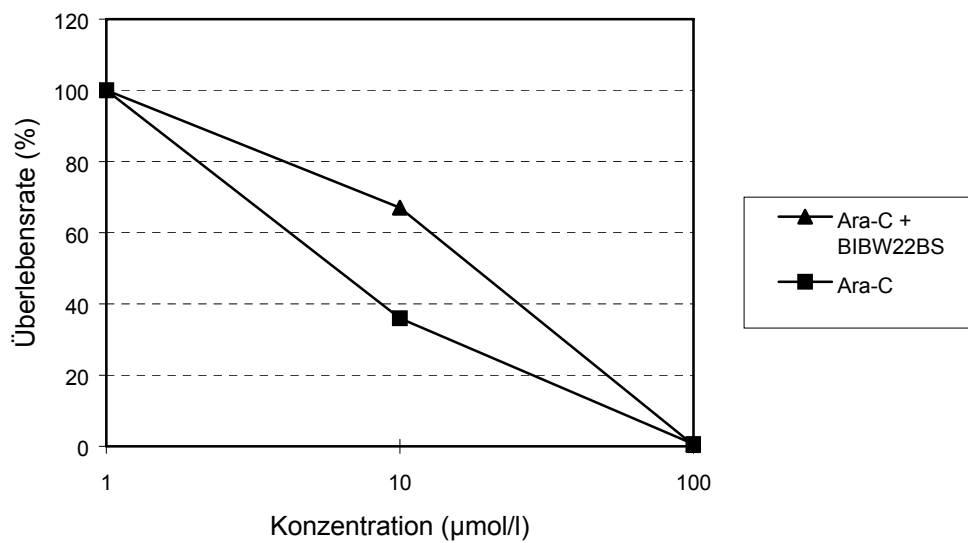


Abbildung 16: In vitro-Zytotoxizität des Ara-C mit und ohne BIBW22BS nach 1-stündiger Inkubation mit den resistenten Zellen der Zelllinie CEM-VBL

Ähnlich verhielt es sich bei $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Dies war durch die unterschiedlich langen Inkubationszeiten, wie sie bereits zwischen den Abbildungen 13 und 14 bestehen, zu erklären. Auch dort gab es bei den Zellen, die lediglich mit Ara-C inkubiert wurden, Unterschiede in der prozentualen Überlebensrate aufgrund der ungleich langen Inkubationszeiträume.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß beim Wildtyp (ohne Pgp) Ara-C ohne Modifier wesentlich zytotoxischer zu sein schien als das Ara-C mit BIBW22BS. Beim Ara-C mit BIBW22BS überlebten die sensitiven Zellen.

Beim Resistenztyp (mit Pgp) zeigte sich, daß Ara-C mit oder ohne BIBW22BS unverändert zytotoxisch wirkte.

4. Diskussion

Die AML ist eine Erkrankung mit maligner Transformation hämatopoetischer Stammzellen mit Proliferation und Akkumulation neoplastischer Zellen im Knochenmark und zumeist auch im Blut.

Bei Erwachsenen stellt die AML 80% der Leukämien dar. Die chemotherapeutische Behandlung erfolgt durch Kombination verschiedener Zytostatika. Das Ziel der medikamentösen Therapie ist das Erreichen und die Aufrechterhaltung einer CR. Eines der Hauptgründe für das Therapieversagen bei der AML ist die Resistenz der malignen Zellen gegenüber einer Vielzahl natürlicher Substanzen, die weder eine strukturelle noch eine funktionelle Beziehung miteinander erkennen lassen (Xenobiotika). Diese Vielfach- oder Mehrfachresistenz (MDR) kann sich als intrinsische Resistenz bei Diagnosestellung einer AML oder im Verlauf einer zytostatischen Therapie oder bei Vorliegen eines Rezidivs entwickeln (erworbene oder sekundäre Resistenz). Ein denkbarer Ansatz, die Prognose von Patienten mit AML zu verbessern, besteht in der Überwindung der MDR-vermittelten Resistenz. In der vorliegenden Arbeit ist das BIBW22BS als potenter Resistenzmodulator der Pgp-vermittelten Resistenz untersucht worden. Bei der MDR werden in letzter Zeit verschiedene Resistenzmechanismen (atypische MDR) diskutiert, die eigenständig oder im Verbund zur Resistenzentwicklung bei der AML beitragen und im folgenden ebenfalls zu berücksichtigen sind.

4.1 P-Glykoproteinaktivität als prognostischer Faktor bei unvorbehandelter akuter myeloischer Leukämie

Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die eine Pgp-Funktion bei einer unvorbehandelten AML als einen ungünstigen prognostischen Faktor bezogen auf die Rate der CR, die Dauer der CR, die Gesamtüberlebensrate und die erhöhte Inzidenz einer sekundären Resistenzentwicklung bei einem Rezidiv ansehen (Borg et al., 1998, Campos et al., 1992; Del Poeta et al., 1996; Jiang et al., 1998; Sievers et al., 1995; van den Heuvel-Eibrink et al., 1997). Die Rate der erreichten CR wird in der Literatur bei den unter 60-jährigen mit einer unvorbehandelten AML zwischen 60 bis 80% angegeben (Burnett, 1998; Cassileth et al., 1992; Hann et al., 1997; Mayer et al., 1994, Pogliani et al., 2001). In dieser Arbeit erreichten insgesamt 68%

der Patienten mit der Erstdiagnose einer AML eine CR. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bisherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Von diesen 17 von 25 Patienten wiesen acht (32%) einen positiven R123-Efflux auf. Fünf der acht Patienten erzielten nach dem ersten Induktionskurs und zwei nach dem zweiten Kurs eine CR.

Weitere Studien (Campos et al., 1992; Leith et al., 1999; Marie et al., 1991, 1996; Pirker et al., 1991) zeigten eine Variationsbreite von 20 bis 75% Pgp-positiver Fälle auf. Diese Diskrepanz wird durch verschiedene Untersuchungstechniken oder durch unterschiedliche Patientenselektion bezogen auf den Reifegrad der AML zurückgeführt. Ferner ist auch das Ausmaß der Pgp-Expression zu beachten. Dies bedeutet, daß die neoplastischen Zellen einem dynamischen Prozeß unterliegen und sich das Effluxverhalten dieser Zellen im Verlauf einer unvorbehandelten AML ändern kann (van der Kolk et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte bei 32% der neuerkrankten Patienten eine R123-Effluxaktivität nachgewiesen werden. Die Rate an CR soll bei unvorbehandelter AML mit Pgp-Positivität signifikant niedriger sein als bei Pgp-negativen Patienten (Del Poeta et al., 1999; Leith et al., 1997, 1999; Marie et al., 1991; Pirker et al., 1991; Zochbauer et al., 1994). In der vorliegenden Studienarbeit wurde kein deutlicher Unterschied zwischen den multidrug-positiven und -negativen Patienten ermittelt. 62,5% der Patienten mit nachgewiesenem Efflux konnte nach dem ersten Zyklus der AIDA-Induktionstherapie eine CR erreichen. Die CR-Rate bei den Patienten ohne Efflux betrug dagegen 53%. Auch Broxterman und Mitarbeiter (2000) konnten bei Patienten mit erstdiagnostizierter AML keine Korrelation zwischen dem nachgewiesenem Pgp und der Rate an CR, der Länge des rezidivfreien Intervalls als auch der Gesamtüberlebensrate bestätigen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die Überexpression von Pgp nicht allein für die schlechte Prognose der AML verantwortlich sei (siehe 4.6). Pogliani et al. (2001) untersuchten 50 Patienten mit einer unvorbehandelten AML und fanden heraus, daß 45% der multidrug-positiven Patienten eine CR erzielten. In der negativen Gruppe erreichten jedoch 80% eine CR. Hierbei ist jedoch die mit den Anthrazyklinen DNR oder IDA erfolgte Induktionstherapie zu beachten. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Induktion lediglich das Anthrazyklin IDA verwendet, so daß die Ergebnisse der

Studie von Pogliani et al. (2001) nicht vollständig mit dem Ergebnis dieser Studie zu vergleichen sind (siehe 4.3).

4.2 Änderung der P-Glykoproteinexpression bei rezidivierter oder refraktärer akuter myeloischer Leukämie

Die Pgp-Expression soll bei Rezidiverkrankungen einer Hochregulation durch klonale Selektion unterliegen (van der Kolk et al., 2002). So können gegebenenfalls einige MDR1-resistente Zellen bei Patienten mit unvorbehandelter AML durch das Anthrazylin der Induktionstherapie unbeeinflusst bleiben und für ein Rezidiv verantwortlich sein. In der Literatur werden kontroverse Angaben über die Pgp-Expression im Rezidivfall beschrieben. Zahlreiche Publikationen weisen auf die erhöhte Expression hin (Beck et al., 1996; Guerci et al., 1995; List, 1996; Maslak et al., 1994; Marie et al., 1991; Schröder et al., 1996a, b; Wood et al., 1994; Zhou et al., 1995). Dabei handelt es sich um Studien, die nicht gepaarte Stichproben (non-paired samples; unvorbehandelt versus Rezidiv) mit einer geringen Anzahl an Rezidivfällen verglichen. Tabelle 8 zeigt eine Auflistung dieser ungepaarten Vergleiche zwischen der MDR1-Genexpression bei Rezidiverkrankungen versus erstdiagnostizierter AML. Dabei ergibt sich, von Ausnahmen abgesehen, eine erhöhte Expression zum Zeitpunkt des Rezidivs oder der refraktären Erkrankung.

Referenz	Patientenanzahl		MDR1-Genexpression beim Rezidiv versus unvorbehandelter AML
	Unvorbe- handelt	Rezidiv	
Beck et al., 1996	14	23	höher
Guerci et al., 1995	69	10	höher
List, 1996	21	29	gleich / höher
Marie et al., 1991	21	6	gleich
Musto et al., 1990	8	7	niedriger
Maslak et al., 1994	18	19	höher
Michieli et al., 1991	38	21	höher
Schröder et al., 1996a, b	25	26	höher

Tabelle 8: Überblick über ungepaarte Studienvergleiche der MDR1-Genexpression bei rezidivierter im Vergleich zu unvorbehandelter AML (van den Heuvel-Eibrink et al., 2001 (modifiziert))

Vergleicht man gepaarte Patientenproben ergeben sich unterschiedliche Resultate der MDR1-Genexpression für unvorbehandelte und rezidierte/refraktäre AML (siehe Tabelle 9). Lediglich Wood und Mitarbeiter (1994) konnten bei 14 untersuchten Patienten einen einheitlich höheren Prozentsatz an Pgp-positiv Erkrankten beim Rezidiv im Vergleich zur Erstdiagnose zeigen. Die neueren Untersuchungen von van den Heuvel-Eibrink et al. (2001 & 2002) und van der Kolk et al. (2001) konnten in gepaarten Untersuchungsreihen zeigen, daß es während des Zeitraums der Rezidiventwicklung oder bei einer refraktären AML zu keiner signifikanten Änderung der Regulation der MDR1-Genexpression kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 51 Patientenproben auf die Pgp-Aktivität untersucht (25 unvorbehandelte, 26 rezidierte/refraktäre AML). Hierbei handelte es sich um ungepaarte Proben. Zweiunddreißig Prozent der unvorbehandelten AML und 68% der rezidierten oder refraktären AML wiesen eine positive Pgp-Aktivität auf. Der niedrigere Efflux bei unvorbehandelten AML und der höhere Efflux bei rezidivierter oder refraktärer AML stimmt überwiegend mit den Untersuchungsgruppen mit ungepaarten Stichproben überein (siehe Tabelle 8).

Referenz	Patientenanzahl	MDR1-Genexpression beim Rezidiv versus unvorbehandelter AML
Guerci et al., 1995	4	höher / gleich
Hart et al., 1994	9	höher / niedriger
Ino et al., 1994	21	gleich / niedriger
Ito et al., 1989	10	höher / niedriger
List, 1996	17	Niedriger
Marie et al., 1991	4	höher / gleich
Marie et al., 1993	4	höher / niedriger / gleich
Maslak et al., 1994	5	höher
Michieli et al., 1991	7	höher / niedriger / gleich
Sato et al., 1990	6	gleich
Wood et al., 1994	14	höher
van den Heuvel-Eibrink et al., 2001	30	gleich
van den Heuvel-Eibrink et al., 2002	20	gleich
van der Kolk et al., 2001	30	gleich

Tabelle 9: Überblick über gepaarte Studienvergleiche der MDR1-Genexpression bei rezidivierter und unvorbehandelter AML (van den Heuvel-Eibrink et al., 2002 (modifiziert))

4.3 Effektivität von Idarubicin in vivo und in vitro

In der MDR1-resistenten Zelllinie CEM-VBL konnte der Efflux von R123 um das 6-fache, DNR um das 3-fache und IDA um das 1,3-fache durch den Resistenzmodifier BIBW22BS blockiert werden. Bei den Untersuchungen der AML-Blastenpopulationen konnte bei den Pgp-positiven Patienten der Efflux von R123 und DNR nach Modulatorzugabe (BIBW22BS 1 μ M, Verapamil 10 μ M, Dexniguldipin 1 μ M) deutlich gehemmt werden. Im Vergleich zu R123 und DNR konnte die IDA-Effusion nur sehr schwach durch Zugabe der genannten Resistenzmodulatoren inhibiert werden.

Zur Therapie der AML wird neben Ara-C ein Anthrazyklinderivat verabreicht (Bishop et al., 1996; Lowenberg et al., 1998; Vellenga et al., 1999; Weick et al., 1996). Anthrazykline sind in der Lage den MDR1-Phänotyp zu induzieren und sind Substrate von Pgp (Higgins 1992; Mankhetkorn et al., 1996; Ross, 2000) (siehe Tabelle 3).

Das 4-Demethoxy-Derivat des DNR, Idarubicin, weist eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu den anderen Anthrazyklinen auf (Tolomeo et al., 1996). In vitro-Untersuchungen konnten an verschiedenen Zelllinien eine 2- bis 12,3-fach höhere zytotoxische Wirkung als Doxorubicin oder DNR zeigen (Dodion et al., 1987; Kuffel et al., 1992; Schott & Robert, 1989). Eine wesentlich ausgeprägtere zytotoxische Aktivität wurde an MDR-Zelllinien (27,8- bis 64,2-fach) nachgewiesen (Facchetti et al., 1991; Schott & Robert, 1989). IDA führt im Vergleich zu den übrigen Anthrazyklinen nicht zu einer MDR1-Genexpression (Lotfi et al., 2002). Schröder et al. (2000) implizieren jedoch eine durch IDA hervorgerufene MDR-Induktion. Der Hauptmetabolit von IDA, IDA-ol ist ein Substrat von Pgp.

Auch bei der Behandlung der AML besteht die Möglichkeit, daß IDA den übrigen Anthrazyklinen überlegen ist (Carella et al., 1990; Mehta et al., 1996; Nussler et al., 1997; Wiernik et al., 1992). Die höhere Lipophilie und die reduzierte Sensitivität gegenüber MDR-Mechanismen (Pgp und MRP) können diesen möglichen Vorteil erklären (Smeets et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe von Pogliani et al. (2001) untersuchte 50 Patienten mit erstdiagnostizierter AML, die entweder mit dem Anthrazyklin DNR oder IDA therapiert wurden. Bei den Patienten mit Pgp-negativer AML konnte zwischen der Therapie mit DNR oder IDA kein signifikanter Unterschied bezüglich der Rate an CR festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ergab sich bei den Patienten mit Pgp-positiver AML ein signifikanter Unterschied, wobei 70% der mit IDA behandelten Patienten im Gegensatz zu 40% der mit DNR behandelten Patienten eine CR erreichten. Bei der Gesamtüberlebensrate bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied zugunsten der Patienten, die mit IDA behandelt wurden.

Chiodini und Mitarbeiter (1999a) untersuchten an der MDR-Zelllinie CEM-VBL die Effektivität des IDA und DNR mit jeweiliger Zugabe des Resistenzmodulators Cyclosporin A (CsA). Sie fanden heraus, daß IDA ein höheres Uptake und eine erhöhte apoptotische Zellrate aufwies. Diese Effekte konnten sie nach Zugabe von CsA potenzieren. Auch die Arbeitsgruppe von Michieli et al. (1994a) kamen zu dem gleichen Ergebnis. Da für IDA keine oder teilweise eine Substratspezifität für Pgp besteht (Broxterman et al., 2000; Chiodini et al., 1999a; Lotfi et al., 2002; Schröder et al., 2000), kann die Potenzierung nach Zugabe eines Resistenzmodulators durch den Hauptmetaboliten des IDA, Idarubicinol (IDA-ol oder Dihydro-Idarubicin),

erklärt werden (Schröder et al., 2000). IDA-ol ist der Alkoholmetabolit des IDA und hat die gleiche zytotoxische Wirkung wie IDA (Kuffel et al., 1992; Tidefelt et al., 1996). Der intrazelluläre Uptake von IDA ist jedoch geringer (Tolomeo et al., 1996), IDA-ol ist aber im Vergleich zur Grundsubstanz ein Pgp-Substrat, so daß sich der Efflux mittels Resistenzmodulation hemmen läßt (Roovers et al., 1999; Ross et al., 1995; Schröder et al., 2000).

Einige In vitro-Studien zeigten, daß die intrazelluläre IDA-Akkumulation im Vergleich zu DNR in Pgp-exprimierenden Zelllinien schneller und höher verlief (Bogush & Robert, 1996; Mankhetkorn et al., 1996). So lieferten Smeets und Mitarbeiter (1999) einen weiteren Erklärungsversuch zur effektiveren IDA-Therapie bei der AML. Sie untersuchten die DNA-Interkalation von DNR und IDA an Pgp- und MRP1-exprimierenden Zelllinien. Es zeigte sich, daß die Bindung des DNR an die DNA sowohl durch Pgp als auch durch MRP1 beeinflusst wird. Im Vergleich dazu wird die DNA-Interkalation des IDA lediglich durch MRP1 und nicht durch Pgp beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen mit durchgeführten Studien von Hargrave et al. (1995), Berman & McBride (1992) und Michieli et al. (1994b) im Einklang, daß IDA in Pgp-exprimierenden Zelllinien effektiv ist. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen existieren verschiedene Arbeiten (Bogush & Robert, 1989; Mankhetkorn et al., 1996; Mulder et al., 1995), die einen vergleichbaren Efflux von DNR und IDA nachweisen. Die DNA-Interkalation von Anthrazyklinen korreliert direkt mit deren Zytotoxizität (Gieseler et al., 1994).

Apoptose kann durch Anthrazykline in therapeutischen Dosen induziert werden (Chiodini et al., 1999b; Skladanowski & Konopa, 1993). IDA kann Apoptose in leukämischen Zellen verursachen (Vial et al., 1997). Lotfi et al. (2002) untersuchten an leukämischen Zelllinien die Apoptoseinduktion durch die Anthrazykline DNR und IDA. Ihre Ergebnisse wiesen eine effektivere Induktion der Apoptose durch IDA als durch DNR auf. Die Ergebnisse basieren auf identische intrazelluläre Konzentrationen beider Anthrazykline und nicht auf äquivalente extrazelluläre Konzentrationen.

4.4 Modulation der P-Glykoprotein-vermittelten Resistenz durch BIBW22BS

In der vorliegenden Arbeit konnte BIBW22BS erstmalig als effektiver Resistenzmodulator der Pgp-vermittelten MDR in vitro bei Patienten mit rezidivierender/refraktärer und erstdiagnostizierter AML dargestellt werden. Bei 32% der Patienten mit unvorbehandelter AML konnte der MDR1-Phänotyp nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erfolgte bei 68% der Patienten mit Rezidiv/Persistenz ein Resistenznachweis. Der Efflux von R123 und DNR wurde signifikant mit 1 μ M BIBW22BS sowohl bei den Patienten mit Persistenz/Rezidiv als auch mit Ersterkrankung blockiert. Diese Konzentration wurde ebenfalls von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in Versuchsreihen mit verschiedenen Zelllinien ermittelt (Boven et al., 1999; Chen et al., 1993; Gaj et al., 1998; Jansen et al., 1994, 1998; Liu et al., 1996b). Die Effluxinhibition von BIBW22BS wurde mit den Resistenzmodulatoren VER (Jansen et al., 1994) und Dexniguldipin (DNIG) (Scheulen et al., 1994) verglichen. Der Efflux von R123 und DNR konnte signifikant bei Patienten mit AML in vitro mit 1 μ M BIBW22BS, 1 μ M DNIG und 10 μ M VER bei beiden Patientengruppen gehemmt werden (siehe 4.3). Bei der kompletten Effluxinhibition an der Zelllinie CEM-VBL wurde kein signifikanter Unterschied zwischen 0,3 μ M BIBW22BS, 1 μ M DNIG und 10 μ M VER festgestellt.

BIBW22BS (4-[N-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-ethanolamino]-2,7-bis(cis-2,6-dimethyl-morpholino)-6-phenylpteridin (Strukturformel siehe Abbildung 3) (Liu et al., 1996b) leitet sich vom Dipyridamol (DPM), einem Thrombozytenaggregationshemmer ab (Fitzgerald, 1987). Die pharmakodynamischen Effekte des DPM bestehen in der Hemmung des Nukleosidtransports und der Phosphodiesterase des zyklischen Adenosinmonophosphats (Chen et al., 1993). Durch Inhibition des Nukleosidtransports wird die Zytotoxizität einiger Zytostatika verstärkt. DPM agiert bei der Resistenzmodulation der MDR sowohl mit dem Pgp als auch mit dem MRP (Avendaño & Menéndez, 2002). Nachteilig ist die hohe Konzentration von mehr als 10 μ M, die zur optimalen MDR1-Modulation notwendig ist (Asoh et al., 1989; Shalinsky et al., 1990; Tatsuta et al., 1991). Jansen und Mitarbeiter (1994) konnten die modulatorischen Eigenschaften von DPM bestätigen. Bei einer Konzentration von 10 μ M erreichten sie lediglich eine minimale Resistenzumkehr. Ramu und Ramu (1989) konnten zeigen, daß einige Phenylpteridinderivate gute resistenzmodulatorische Eigenschaften besitzen. So

untersuchten Jansen et al. (1994) die resistenzumkehrenden Eigenschaften des BIBW22BS an verschiedenen Zelllinien. Sie demonstrierten, daß Konzentrationen zwischen 0,5 bis 2 μM ausreichend waren, um die Resistenz von Vincristin und Doxorubicin in Pgp-positiven Zelllinien komplett umzukehren. BIBW22BS war 20 bis 100-fach potenter als DPM und auch stärker wirksam als die übrigen untersuchten Modifier (Bepriidil, Flunarizin). In äquimolaren Konzentrationen von 1 μM war BIBW22BS potenter als VER. In Pgp-negativen Zelllinien hat BIBW22BS keine verstärkende zytotoxische Wirkung. Dies konnte in dieser Arbeit im In vitro-Zytotoxizitätsversuch mit Zellen der Zelllinie CEM-CCRF, die kein Pgp exprimieren, bestätigt werden (siehe Abbildung 13)

Liu und Mitarbeiter (1996b) konnten ebenfalls in einer Untersuchungsreihe bestätigen, daß bereits niedrige BIBW22BS-Konzentrationen (0,5 bis 2 μM) zu einer kompletten Resistenzumkehr von Vinblastin und Doxorubicin in der Zelllinie CEM-VBL führen. Sie konnten eine feste (kovalente) Bindung zwischen dem Pgp und BIBW22BS nachweisen. Ferner stellten sie eine Zunahme der Bindungen und der Akkumulation von BIBW22BS in dieser Zelllinie fest. BIBW22BS akkumuliert zwar in Pgp-positiven Zellen, unterliegt jedoch nicht dem Pgp-vermittelten Efflux. Pgp-negative Zellen weisen eine deutlich geringere Akkumulation auf. Ungeklärt bleibt die Frage, weshalb sich BIBW22BS in MDR1-resistenten Zellen anhäuft. Im Gegensatz dazu akkumuliert VER gleich stark in resistenten und sensitiven Zellen und stellt ein Substrat von Pgp dar (Safa, 1988; Safa et al., 1987).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätstest (siehe Abbildungen 13 - 16) interagierte BIBW22BS mit dem Ara-C - einem nicht Pgp-Substrat (Pallis et al., 2002) - in Zellen der sensitiven Pgp-negativen Zelllinie und führte zu einem Verlust der zytotoxischen Wirkung des Zytostatikums, da die Pgp-negativen Zellen bei Inkubation mit Ara-C einschließlich des Resistenzmodulators eine Überlebensrate von 85 bis 100% aufwiesen. Bei alleiniger Inkubation von Ara-C mit den sensitiven Zellen kam es zur raschen Abnahme der Zellüberlebensrate und somit zum zytotoxischen Effekt. Dieses Resultat könnte mit einem Einfluß des BIBW22BS auf den Nukleosidtransporter zusammenhängen (Jansen et al., 1995). Im Gegensatz dazu führte das BIBW22BS bei der resistenten Pgp-positiven Zelllinie bei der Inkubation des Ara-C mit und ohne BIBW22BS zur Entfaltung der zytotoxischen Wirkung des Ara-C unabhängig von der Anwesenheit des Phenylpteridinderivats. Ob

der verminderte Effekt von BIBW22BS auf die zytotoxische Wirkung von Ara-C durch seine Akkumulation in den resistenten Zellen eine Rolle spielt, bleibt unklar.

In einer Studie von Jansen et al. (1998) konnte gezeigt werden, daß sowohl BIBW22BS, VER und DNIG in der Lage sind, die Pgp-Resistenz gegenüber CPT-11, einem Camptothecin-Derivat, in zwei Pgp-positiven Zelllinien (BRO/mdr1.1 und 2780^{AD}) umzukehren. Das bereits von Jansen et al. (1994) nachgewiesene starke modulatorische Potential konnten sie erneut bestätigen. Die stark ausgeprägte Resistenz des SN-38, einem CPT-11-Metaboliten, konnte in der Zelllinie 2780^{AD} lediglich durch BIBW22BS umgekehrt werden. VER und DNIG blieben wirkungslos.

Die modulatorischen Eigenschaften von BIBW22BS wurden von Gaj und Mitarbeitern (1998) an einer MRP- und nicht Pgp-exprimierenden Zelllinie (KB/7D) untersucht. Sie konnten eindeutig zeigen, daß BIBW22BS in MRP-exprimierenden Zellen keinen Einfluß auf die Resistenzumkehr besitzt.

In einer klinischen Studie von Tsimberidou et al. (2002) konnte der Efflux von R123 und DNR bei Pgp-positiven Patienten mit unvorbehandelter AML signifikant gehemmt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen. BIBW22BS konnte eine starke Inhibition des R123- und DNR-Efflux' sowohl bei Patienten mit Erstdiagnose als auch mit Persistenz/Rezidiv. Der IDA-Efflux aus den myeloischen Blasten ließ sich -wie bereits beschrieben- nicht blockieren.

4.5 CD34-Expression

In dieser Arbeit wurde die CD34-Antigenexpression der leukämischen Blasten gemessen. Es handelt sich um ein Glykophosphoprotein, das physiologisch auf der Oberfläche unreifer hämatopoetischer Zellen in Knochenmark, Lymphozyten, CD56⁺ natürlichen Killerzellen und Makrophagen zu finden ist (Andrews et al., 1986; Campos et al., 1992). Das kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 1 (Molgaard et al., 1989). Eine Expression des CD34-Proteins läßt sich bei 40 - 50% der Patienten mit einer AML nachweisen und ist mit einer geringeren Rate an CR assoziiert als bei CD34-negativen Patienten (Geller et al., 1990; Lee et al., 1992; Tsimberidou et al., 2002). Campos et al. (1992), Leith et al. (1995) und te Boekhorst et al. (1993) versuchten die geringe CR-Rate durch den Pgp-vermittelten Efflux zu

erklären. In der vorliegenden Arbeit konnten bei 26 von 40 Patienten (65%) eine CD34-Expression nachgewiesen werden. Bei 58% dieser 26 Patienten wurde ein R123-Efflux ermittelt (siehe Tabelle 5). Die Hälfte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten (20 von 40) hatte einen positiven R123-Efflux, wovon 15 gleichzeitig CD34⁺ waren (75%). Insgesamt hatten 15 Patienten (37,5%) sowohl eine CD34-Expression als auch einen Efflux des R123. Zwar zeigten 75% der Patienten mit positivem R123-Efflux eine CD34-Antigenexpression, jedoch konnte keine Korrelation zwischen dem R123-Efflux und der CD34-Expression im Vierfeldertest ermittelt werden. Auch van der Kolk et al. (2001) berichteten über eine erhöhte Pgp-Aktivität in CD34-positiven Blasten, konnten aber keine Hochregulation von Pgp in unvorbehandelter und rezidivierter AML feststellen. Michieli und Mitarbeiter (1999) konnten in einer Untersuchung mit 96 unvorbehandelten AMLsn keine Beziehung zwischen dem Pgp-Nachweis und CD34-Expression ermitteln. Legrand et al. (1998) konnten bei 53 unvorbehandelten AML eine positive Korrelation zwischen der CD34-Expression und einer Pgp-Aktivität feststellen. In einer Untersuchungsreihe von van den Heuvel-Eibrink und Mitarbeitern (2001) an 30 Patienten mit AML, bei denen zu Erkrankungsbeginn und im Rezidivfall oder refraktärer Erkrankung die CD34-Expression bestimmt wurde, ergaben sich in den verschiedenen Erkrankungsstadien keine Unterschiede in der Expressionsrate.

4.6 Ausblick

Der 1970 von Biedler und Riehm beschriebene Resistenzmechanismus, der später als (klassische) Multidrugresistenz bezeichnet wurde, gilt auch heute noch als ein wesentlicher Hinderungsgrund für das Therapieversagen bei der AML. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Untersuchungen veröffentlicht, die ein Therapieversagen nicht nur der klassischen MDR zuschreiben, sondern vielmehr verschiedene andere Resistenzmechanismen angeben. Diese werden in der Literatur auch als atypische MDR bezeichnet. Diese Ergebnisse müssen zur Resistenzüberwindung und zur entscheidenden Verbesserung der Prognose der AML unbedingt berücksichtigt werden.

4.6.1 Multidrugresistenz assoziiertes Protein

Das Resistenzspektrum des MRP ähnelt dem von Pgp (siehe Tabelle 3). Ein großes Unterscheidungsmerkmal ist der glutathionabhängige Substrattransport des MRP. Zahlreiche Studien haben sich mit der MRP-Expression bei der AML beschäftigt (Filipits et al., 1997; Hart et al., 1994; Legrand et al., 1999; Leith et al., 1999; Michieli et al., 1999; van der Kolk et al., 2000; Zhou et al., 1995). Die Ergebnisse dieser Studien wiesen eine große Variationsbreite in der Expressionsrate dieses ABC-Transporters auf. Auch hier - wie bei der MDR1-Expression - ist die Expression eine kontinuierliche Variable und kann nicht streng nach positiv und negativ getrennt werden (van der Kolk et al., 2002). Der Einfluß der MRP1-Aktivität auf den klinischen Verlauf der AML ist nur in einer begrenzten Anzahl von Studien untersucht worden. Legrand und Mitarbeiter (1998) haben in einer Untersuchung mit 53 Patienten herausgefunden, daß eine erhöhte MRP1-Aktivität als ungünstiger prognostischer Faktor für das Erreichen einer CR anzusehen ist und daß MRP1 zur Resistenz bei der AML beiträgt. Bei 61 untersuchten Patienten mit unvorbehandelter AML korrelierte die MRP-Expression nicht mit einer gesteigerten CR-Rate (Tsimberidou et al., 2002). Diese Ergebnisse wurden durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Borg et al., 1998; Filipits et al., 1997; Hart et al., 1997; Leith et al., 1997). In einer weiteren Untersuchung von Legrand et al. (1999), in die 80 Patienten eingeschlossen wurden, zeigten sie, daß die kombinierte Aktivität von Pgp und MRP1 von Bedeutung für das Erreichen einer CR, die Dauer der CR und die Gesamtüberlebensrate ist. Um die Prognose der AML verbessern zu können, müssen beide ABC-Transporter in ihrer Resistenz mittels Resistenzmodulation umgekehrt werden. Zur Resistenzüberwindung in vitro setzten sie für Pgp CsA und für das MRP1 Probenecid ein. Van der Kolk und Mitarbeiter (2000) konnten dieses Ergebnis bestätigen. Von 104 Patienten mit unvorbehandelter AML erreichten 73%, die niedrige Aktivitäten sowohl vom Pgp als MRP1 aufwiesen, nach dem ersten Kurs der chemotherapeutischen Behandlung eine CR. Betrachtet man diese Ergebnisse, liegt die Vermutung nahe, daß nicht nur die klassische MDR sondern auch MRP1 zur Resistenzentwicklung bei der AML beiträgt. Interessanterweise haben van der Kolk et al. (2001) in einer weiteren Studie eine positive Korrelation zwischen der MRP1-Aktivität und der Expression des Oberflächenmarkers CD34 festgestellt. Legrand

und Mitarbeiter (1998) haben im Gegensatz dazu eine höhere MRP1-Aktivität in CD34-negativen Blasten als in CD34-positiven ermittelt.

Die MRP1-Expression bei der rezidierten AML wird in der Literatur kontrovers angegeben. So zeigen einige Studien eine Hochregulation der MRP1-Aktivität beim Rezidiv (Hart et al., 1994; Schneider et al., 1995; Zhou et al., 1995), im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, die keine Unterschiede zwischen unvorbehandelter und rezidivierter AML feststellen konnten (Hart et al., 1997; van den Heuvel-Eibrink et al., 2002). Die Untersuchungen waren nicht gepaart und wiesen lediglich geringe Patientenzahlen auf. Van der Kolk et al. (2001) haben in einer gepaarten Studie mit 30 Patienten und konsekutiver refraktärer oder rezidivierter Erkrankung keine erhöhte MRP1-Aktivität im Rezidivfall oder bei refraktärer Krankheit zeigen können. Lediglich die Patienten, die im Rezidivfall einen unreifen Phänotyp (CD34-Positivität) aufwiesen, hatten eine höhere MRP1-Aktivität und umgekehrt.

4.6.2 Brust-Krebs-Resistenz-Protein

BCRP dienen Substrate, die bei der Therapie der AML Anwendung finden (siehe Tabelle 3), so daß davon ausgegangen werden kann, daß BCRP eine Rolle bei der MDR einnimmt. Nur einige Studiengruppen haben dieses Mitglied der ABC-Transporterfamilie bei der AML untersucht. Ross und Mitarbeiter (2000) haben eine erhöhte BCRP-Expression bei 30% von 20 Patienten mit unvorbehandelter AML entdeckt und korrelierte nicht mit der Pgp-Expression. Van den Heuvel-Eibrink et al. (2001) zeigten in einer gepaarten Untersuchungsreihe mit 20 Patienten eine Hochregulation von BCRP beim Rezidiv versus Erstdiagnose. Ferner beschreiben sie eine Koexpression von BCRP und MDR1 in unvorbehandelter AML. In einer gepaarten Studie mit 20 Patienten von van der Kolk et al. (2001) zeigten sie eine niedrige aber variable Expression. Eine relativ hohe BCRP-Expression korrelierte mit einer niedrigen Mitoxantron-Akkumulation in den leukämischen Blasten, obwohl Aktivitäten anderer ABC-Transporter (Pgp durch PSC833, einem CsA-Analogen, und MRP1 durch MK-571) blockiert wurden. Mitoxantron ist sowohl ein Substrat von Pgp, MRP1 als auch von BCRP. Die BCRP-Expression korrelierte mit einem unreifen Phänotyp der Zellen (CD34-positiv). Eine Hochregulation bei rezidivierter oder refraktärer Erkrankung konnte nicht ermittelt werden.

4.6.3 Lungen-Resistenz-Protein

Das LRP gehört nicht zur Superfamilie der ABC-Transporter. Der Mechanismus, der zur MDR beitragen soll, ist bisher unbekannt. Eine positive Korrelation zwischen der LRP-Expression und dem Erreichen einer CR nach der Induktionstherapie bei der AML steht mit vielen Studienergebnissen im Einklang (Borg et al., 1998; Filipits et al., 1998; Hart et al., 1997; Legrand et al., 1998). Bei 52 Patienten mit unvorbehandelter AML haben Xu und Mitarbeiter (1999) entdeckt, daß eine hohe LRP-Expression aber nicht eine hohe MDR1- und MRP-Expression mit der MDR assoziiert ist. List et al. (1996) zeigten, daß lediglich die LRP- und nicht die MDR1-Expression ein prognostischer Faktor für das Erreichen einer CR ist. Xu und Mitarbeiter fanden weiterhin heraus, daß weder eine MDR1-, MRP- noch LRP-Expression bei Patienten mit einem Rezidiv oder refraktärer Krankheit im Vergleich zur Erstdiagnose erhöht ist. Lediglich Patienten, die Mitoxantron erhielten, zeigten beim Rezidiv eine erhöhte LRP-Expression (List et al., 1996; Xu et al., 1999). Michieli und Mitarbeiter (1999) beschreiben, daß sowohl die Pgp als auch die LRP-Expression bei erstdiagnostizierter AML häufig und MRP jedoch nur selten nachzuweisen ist. Sie postulieren aber, daß das LRP das Outcome im Gegensatz zum Pgp nicht beeinflußt, vor allem wenn Patienten mit IDA oder Mitoxantron und Ara-C behandelt werden. In dieser Studie, in die 96 Patienten mit unvorbehandelter AML eingeschlossen wurden, wiesen lediglich acht Patienten eine MRP-Expression auf, wovon jedoch sechs keine CR erreichten. In einer Untersuchung zeigen Tsimberidou et al. (2002) ebenfalls, daß eine LRP-Expression bei 61 Patienten mit unvorbehandelter AML keine prognostische Signifikanz aufweist.

4.6.4 Apoptoseresistenz

Ara-C ist ein Nicht-Pgp-Substrat und zeigt bei der Therapie der AML gute Wirksamkeit (Pallis et al., 2002). So wäre anzunehmen, daß eine Hochdosisbehandlung mit Ara-C (hd Ara-C) die Pgp-vermittelte MDR überwinden könne. In einer Untersuchung von Leith und Mitarbeitern (1999) wurden konventionelle Ara-C-Dosen mit hd Ara-C und jeweils DNR als Anthrazyklin verglichen. Diese Studie ergab, daß hd Ara-C die Rate an CR bei Patienten mit Pgp-positiver AML verbessern könne. Dies legt die Vermutung eines effluxunabhängigen

Resistenzmechanismus nahe. Dies entspricht dem In vitro-Zytotoxizitätsversuch der vorliegenden Arbeit (siehe 4.4).

Smith et al. (1998) konnten bei Patienten mit chemoresistenter Erkrankung feststellen, daß sich die leukämischen Blasten dieser Patienten weitaus weniger einer spontanen Apoptose in serumfreier Kultur unterzogen als die der Patienten, die eine CR erreichten. Wuchter et al. (1999) zeigten, daß spontane Apoptose in vitro einen positiven Vorhersagewert für eine CR besitzt. Pallis und Mitarbeiter (2002) kamen zu dem gleichen Ergebnis.

Neben dem Efflux xenobiotischer Substanzen scheint Pgp bei der Apoptoseresistenz einen nicht unerheblichen Faktor darzustellen. Pallis und Russel (1999) fanden heraus, daß Pgp-positive länger als Pgp-negative Blasten überleben. Hierfür existieren zwei Erklärungsansätze: Einerseits ist die Koexpression von Pgp und den anti-apoptotischen Proteinen bcl_x_L und/oder bcl_2 entscheidend (Konopleva et al., 2002; Pallis et al., 1997), andererseits verleiht Pgp Resistenz gegen die Fas-vermittelte (extrinsische) Apoptose (Johnstone et al., 1999; Pallis et al., 2003; Smyth et al., 1998). Die beiden letztgenannten Arbeitsgruppen konnten die anti-apoptotische Wirkung von Pgp durch die gegen verschiedene äußere Epitope gerichteten monoklonalen Antikörper MRK-16 und UIC₂ aufheben. Ferner gelang ihnen die Resistenz durch den Resistenzmodulator VER und Pallis und Russell (2000) durch das CsA-Analogon PSC833, ebenfalls ein Modulator der klassischen MDR, durch Spaltung und Aktivierung der Prokaspase 3 aufzuheben.

Weiterhin soll Pgp die Apoptose durch Veränderungen im Ceramid-Stoffwechsel inhibieren. Ceramid führt zur Apoptoseinduktion und entsteht durch Hydrolyse aus Sphingomyelin. Es wird angenommen, daß Pgp als anti-apoptotisches Molekül agiert, indem es das Sphingomyelin von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran transportiert (Bezombes et al., 1998). Bezombes und Mitarbeiter zeigten, daß PSC833 die Ceramidgeneration und Apoptose in Pgp-positiven Zellen wiederherstellen konnte. Pallis und Russell (2000) untersuchten die Sphingomyelin-Retention in AML-Blasten. CsA und PSC833 verstärkten im Gegensatz zum Pgp-spezifischen Antikörper UIC₂ die Sphingomyelin-Retention in den Zellen und war somit mit der Apoptoseinduktion assoziiert.

Eine weitere Rolle nimmt Pgp bei der Modulation des elektrochemischen Gradienten entlang der Plasmamembran ein (intrazellulärer pH, pH_i und transmembranäres Potential). Die Pgp-Expression ist mit einer intrazellulären Alkalisierung vergesellschaftet (Gottesman & Pastan, 1993; Thiebaut et al., 1990). Hoffman und Roepe (1997) zeigten, daß Pgp einen Natrium- und Chloridionen-abhängigen Mechanismus zum transmembranären Transport von Wasserstoffionen induziert, der zu Veränderungen des pH_i führt. Der Apoptose, die Fas-vermittelt durch UV-Strahlung, Serumentzug oder Chemotherapeutika induziert wird, geht zunächst eine intrazelluläre Ansäuerung voraus (Gottlieb et al., 1996; Li & Eastman, 1995). Diese Apoptoseinduktion kann durch steigenden pH_i inhibiert werden (Robinson et al., 1997). Zellen, die sensitiv gegenüber der extrinsischen Apoptose oder Serumentzug sind, können durch steigenden pH_i resistent gegenüber dieses kaspaseabhängige Todessignal gemacht werden (Gottlieb et al., 1996; Robinson et al., 1997). Es besteht die Möglichkeit, daß die Pgp-Expression den pH_i verändert und demnach die Zelle in einen Zustand von Kaspase-Inaktivität versetzt. Somit wird den Pgp-positiven Zellen Resistenz gegenüber verschiedene kaspaseabhängige Zelltodstimuli übertragen (Johnstone et al., 1999). Der Modulator VER führt zu einer Umkehr der intrazellulären Alkalisierung der Pgp-positiven Zellen, was mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber apoptotischer Stimuli korrelierte (Johnstone et al., 1999; Robinson et al., 1997; Smyth et al., 1998).

4.7 Schlußfolgerung

Der aktive Export antineoplastischer Substanzen aus malignen Zellen, der durch das membranständige Pgp vermittelt wird, gilt weiterhin als eines der Hauptgründe für das Therapieversagen bei der AML. Verschiedene randomisierte Phase III-Studienreihen konnten bisher kein Benefit beim Einsatz von Resistenzmodulatoren verzeichnen (Baer et al., 2002; Greenberg et al., 1999; Liu Yin et al., 2001; Solary et al., 1996). Lediglich List und Mitarbeiter (2001) konnten bei Patienten mit rezidivierter AML in einer Phase III-Untersuchung eine signifikante Steigerung der CR, des krankheitsfreien Intervalls und der Gesamtüberlebensrate bei Zugabe von CsA zur Umkehr der klassischen MDR feststellen. Die medikamentöse Behandlung erfolgte im Gegensatz zu den vorgenannten Untersuchungsreihen mit Ara-C und

kontinuierlicher DNR-Infusion. Ferner beeinflusst CsA nicht nur die Pgp-vermittelte Resistenz sondern auch antiapoptotische Mechanismen (Pilarski et al., 1998).

Die Beobachtung, daß der Efflux der Substanzen R123 und DNR in allen Blastenpopulationen der MDR1-resistenten AML signifikant durch Resistenzmodifizier gehemmt wurden, läßt die Schlußfolgerung zu, daß diese Inhibition mit der Pgp-Überexpression assoziiert ist. Weiterhin konnte eine signifikante Rolle zwischen dem R123-Efflux und dem zellulären Pgp-Gehalt gefunden werden. Dies beweist eine enge Beziehung zwischen der Antigenexpression und der funktionellen Rolle als Pgp.

Ungeklärt bleibt bisher die Reaktion der Organe und Gewebe auf den systemischen Einsatz von Resistenzmodulatoren, in denen das MDR1-Genprodukt physiologisch exprimiert wird. Pgp wurde hauptsächlich in spezialisierten epithelialen Zellen mit sekretorischer Funktion nachgewiesen. Die Lokalisation von Pgp an der apikalen lumenauskleidenden Fläche des Dün- und Dickdarms, der Gallenwege und der proximalen renalen Tubuli läßt u.a. eine exkretorische Funktion xenobiotischer Substanzen vermuten (Cordon-Cardo et al., 1990; Lum & Gosland, 1995). Ferner gelang der Nachweis des Glykoproteins entlang der intraluminalen Oberfläche der Kapillarendothelien einschließlich des Zentralnervensystems (ZNS), der Plazenta und der Testes. Dies läßt den Schluß zu, daß Pgp einen Schutz des ZNS, des Fetus und der Keimzellen gegen toxische Substanzen aufweist (Sugawara et al., 1988; Cordon-Cardo et al., 1989).

Aus der vorliegenden Arbeit kann gefolgert werden, daß die Applikation von BIBW22BS ein möglicher Ansatz bei Patienten mit AML darstellt, um die klassische MDR überwinden zu können. In vitro zeichnet sich die Substanz durch ein hohes effluxinhibierendes Potential in Blastenpopulationen bei Patienten mit rezidivierender oder resistenter AML aus. Außerdem unterliegt das BIBW22BS nicht dem Effluxverhalten und häuft sich somit in MDR1-resistenten Zellen an (Liu et al., 1996b). In Pgp-negativen Zellen zeigt es keine verstärkende zytotoxische Wirkungen (Jansen et al., 1994).

Mögliche nachteilige Nebenwirkungen des BIBW22BS (Manson et al., 1986) und der Einfluß auf physiologisch Pgp-exprimierende Gewebe einschließlich der Modulation der Pharmakokinetik der multidrugabhängigen zytotoxischen Stoffe (McLeod, 1994) bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen. Außerdem beeinflusst

BIBW22BS den Nukleosidtransport (Chen et al., 1993) und kann daher die Reaktion leukämischer Blasten zu Antimetaboliten wie das Ara-C beeinflussen. Weitere Untersuchungen zwecks möglicher Interaktionen des BIBW22BS mit Ara-C einerseits in Pgp-exprimierenden und MDR1-sensitiven Zellversuchen können zum Verständnis dieser Wechselwirkungen beitragen.

Die Bestimmung der maximal tolerierbaren Dosis, die klinisch erreichbare Plasmakonzentration und der therapeutische Index des BIBW22BS in klinischen Phase I-Studien sind zur weiteren Beurteilung obligatorisch.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die Kombination aus Idarubicin und eines potenten Resistenzmodifiziers die Serumkonzentration des Idarubicinols erhöhen kann und somit die Multidrugresistenz umzukehren ist.

Unter Berücksichtigung der atypischen MDR sollten weitere Studien unternommen werden, um das Resistenzverhalten der Blastenpopulationen bei der AML und die Resistenzmodulation genauer zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die Resistenz von Blasten der akuten myeloischen Leukämie kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen, zu denen die Expression von P-Glykoprotein (Pgp) gehört, einem Membranprotein, das Anthrazykline, Vinkaalkaloide, Taxane und andere Xenobiotika energieabhängig aus der Zelle transportiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Phenylpteridinderivat BIBW22BS als potentieller Inhibitor der Pgp-vermittelten Multidrugresistenz (MDR) bei Blasten, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit erstdiagnostizierter und rezidivierender/refraktärer akuter myeloischer Leukämie gewonnen wurden, ex vivo untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von BIBW22BS auf die Zytotoxizität von Cytosinarabinosid (Ara-C) in einer sensiblen und einer resistenten Zelllinie in vitro untersucht.

Dabei ergaben sich folgende Befunde:

1. BIBW22BS führte bei den peripheren Blasten ex vivo zu einer signifikanten Hemmung des Efflux von Rhodamin 123 und dem Anthrazyklin Daunorubicin.
2. Der Ex vivo-Efflux des Anthrazyklins Idarubicin aus den peripheren Blasten wurde im Gegensatz dazu nicht von BIBW22BS beeinflusst.
3. Die Inkubation der sensiblen Pgp-negativen Zellen mit Ara-C in vitro ergab eine dosis- und inkubationszeitabhängige Zytotoxizität.
4. Die Zytotoxizität von Ara-C in den sensiblen Pgp-negativen Zellen konnte in vitro durch Koinkubation mit BIBW22BS zu 80 bis 100% aufgehoben werden.
5. BIBW22BS hatte bei den resistenten Pgp-positiven Zellen in vitro keinen Einfluß auf die insgesamt geringere Zytotoxizität von Ara-C.

Insgesamt erwies sich damit BIBW22BS als Inhibitor des Pgp-vermittelten Efflux von Anthrazyklinen. Gleichzeitig wurde aber die Zytotoxizität von Ara-C durch BIBW22BS in den Pgp-positiven Zelllinien gehemmt, was möglicherweise über eine Wechselwirkung mit dem Nukleosidtransporter zu erklären ist.

Damit wird der positive Effekt von BIBW22BS auf die MDR möglicherweise durch die Hemmung der Zytotoxizität von Ara-C bei der Behandlung der AML aufgehoben, so daß der klinische Einsatz von BIBW22BS zur Verbesserung der Therapie und Überwindung der MDR kritisch beurteilt werden muß.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham J., Edgerly M., Wilson R., Wilson R., Chen C., Medina W., Hermonstine L., Rutt A., Bakke S., Robey R., Dwyer A., Goldspiel B., Steiner J., Norris D., Grem J., Guemei A., Bates S., Fojo T. (2001):
A phase I study of the novel P-glycoprotein antagonist, XR9576 in combination with vinorelbine. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20, 73a
2. Adachi M., Suematsu S., Kondo T., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., Nagata S. (1995):
Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 11, 294-300
3. Akiyama S., Cornwell M.M., Kuwano M., Pastan I., Gottesman M.M. (1988):
Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog. *Molec Pharmac* 33, 144-147
4. Allen J.D., Brinkhuis R.F., van Deemter L., Wijnholds J., Schinkel A.H. (2000):
Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res* 60, 5761-5766
5. Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano-Spica V., Dean M. (1998):
A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58, 5337-5339
6. Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. (1999):
Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 361-398
7. Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. (1986):
Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67, 842-845
8. Asoh K., Saburi Y., Sato S., Nogae I., Kohno K., Kuwano M. (1989):
Potentiation of some anticancer agents by dipyridamole against drug-sensitive and drug-resistant cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 80, 475-481
9. Avendaño C., Menéndez J.C. (2002):
Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR). *Curr Med Chem* 9, 159-193
10. Baer M.R., George S.L., Dodge R.K., O'Loughlin K.L., Minderman H., Caligiuri M.A., Anastasi J., Powell B.L., Kolitz J.E., Schiffer C.A., Bloomfield C.D., Larson R.A. (2002):
Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 100, 1224-1232

11. Bardelmeijer H.A., Beijnen J.H., Brouwer K.R., Rosing H., Nooijen W.J., Schellens J.H., van Tellingen O. (2000):
Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 6, 4416-4421
12. Bates S.F., Chen C., Robey R., Kang M., Figg W.D., Fojo T. (2002):
Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Found Symp* 243, 83-96
13. Beck W.T., Grogan T.M., Willman C.L., Cordon-Cardo C., Parham D.M., Kuttesch J.F., Andreeff M., Bates S.E., Berard C.W., Boyett J.M., Brophy N.A., Broxterman H.J., Chan H.S., Dalton W.S., Dietel M., Fojo A.T., Gascoyne R.D., Head D., Houghton P.J., Srivastava D.K., Lehnert M., Leith C.P., Paietta E., Pavelic Z.P., Weinstein R. (1996):
Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 56, 3010-3020
14. Beck W.T., Mueller T.J., Tanzer L.R. (1979):
Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res* 39, 2070-2076
15. Berman E., Heller G., Santorsa J., McKenzie S., Gee T., Kempin S., Gulati S., Andreeff M., Kolitz J., Gabrilove J., Reich L., Mayer K., Keefe D., Trainor K., Schluger A., Penenberg D., Raymond V., O'Reilly R., Jhanwar S., Young C., Clarkson B. (1991):
Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 77, 1666-1674
16. Berman E., McBride M. (1992):
Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug-resistant leukemia cells. *Blood* 79, 3267-3273
17. Bezombes C., Maestre N., Laurent G., Levade T., Bettaieb A., Jaffrezou J.P. (1998):
Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833. *FASEB J* 12, 101-109
18. Biedler J.L., 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
19. Bishop J.F., Matthews J.P., Young G.A., Szer J., Gillett A., Joshua D., Bradstock K., Enno A., Wolf M.M., Fox R., Cobcroft R., Herrmann R. (1996):
A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 87, 1710-1717
20. Bogush T., Robert J. (1996):
Comparative evaluation of the intracellular accumulation and DNA binding of idarubicin and daunorubicin in sensitive and multidrug-resistant human leukaemia K562 cells. *Anticancer Res* 16, 365-368

21. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996):
Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815
22. Boldin M.P., Mett I.L., Varfolomeev E.E., Chumakov I., Shemer-Avni Y., Camonis J.H., Wallach D. (1995):
Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270, 387-391
23. Borg A.G., Burgess R., Green L.M., Scheper R.J., Liu Yin J.A. (1998):
Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol* 103, 1083-1091
24. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (1999):
The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461, 347-357
25. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000):
A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92, 1295-1302
26. Boven E., Jansen W.J., Hulscher T.M., Beijnen J.H., van Tellingen O. (1999):
The influence of P170-glycoprotein modulators on the efficacy and the distribution of vincristine as well as on MDR1 expression in BRO/mdr1.1 human melanoma xenografts. *Eur J Cancer* 35, 840-849
27. Bradley G., Jurunka P.F., Ling V. (1988):
Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* 948, 87-128
28. Broxterman H.J., Sonneveld P., van Putten W.J., Lankelma J., Eekman C.A., Ossenkoppele G.J., Pinedo H.M., Lowenberg B., Schuurhuis G.J. (2000):
P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy. *Leukemia* 14, 1018-1024
29. Burnett A.K. (1998):
Transplantation in first remission of acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 339, 1698-1700
30. Callies S., de Alwis D.P., Mehta A., Burgess M., Aarons L. (2004):
Population pharmacokinetic model for daunorubicin and daunorubicinol coadministered with zosuquidar.3HCl (LY335979). *Cancer Chemother Pharmacol* 54, 39-48
31. Campos L., Guyotat D., Archimbaud E., Calmard-Oriol P., Tsuruo T., Troncy J., Treille D., Fiere D. (1992):
Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79, 473-476
32. Carella A.M., Berman E., Maraone M.P., Ganzina F. (1990):
Idarubicin in the treatment of acute leukemias. An overview of preclinical and clinical studies. *Haematologica* 75, 159-169

33. Cassileth P.A., Lynch E., Hines J.D., Oken M.M., Mazza J.J., Bennett J.M., McGlave P.B., Edelstein M., Harrington D.P., O'Connell M.J. (1992): Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 79, 1924-1930
34. Chen C., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. (1987): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389
35. Chen H.X., Bamberger U., Heckel A., Guo X., Cheng Y.C. (1993): BIBW 22, a dipyridamole analogue, acts as a bifunctional modulator on tumor cells by influencing both P-glycoprotein and nucleoside transport. *Cancer Res* 53, 1974-1977
36. Chen Z.S., Lee K., Kruh G.D. (2001): Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276, 33747-33754
37. Cheson B.D., Cassileth P.A., Head D.R., Schiffer C.A., Bennett J.M., Bloomfield C.D., Brunning R., Gale R.P., Grever M.R., Keating M.J., Sawitsky A., Stass S., Weinstein H., Woods W.G. (1990): Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 8, 813-819
38. Chiodini B., Bassan R., Barbui T. (1999a): Cellular uptake and antiproliferative effects of therapeutic concentrations of idarubicin or daunorubicin and their alcohol metabolites, with or without cyclosporin A, in MDR1+ human leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 33, 485-497
39. Chiodini B., Bassan R., Barbui T. (1999b): Apoptosis by anthracyclines at therapeutic concentrations in MDR1+ human leukemic cells. *Adv Exp Med Biol* 457, 313-324
40. Choi K., Chen C.J., Krieglner M., Roninson I.B. (1988): An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529
41. Cleveland J.L., Ihle J.N. (1995): Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* 81, 479-482
42. Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M., Deeley R.G. (1992): Overexpression of a transporter gene in a human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654
43. Cole S.P., Deeley R.G. (1998): Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein, MRP. *BioEssays* 20, 931-940

44. Cole S.P., Sparks K.E., Fraser K., Loe D.W. (1994):
Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54, 5902-5910
45. Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R. (1990):
Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1277-1287
46. Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D. (1989):
Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 816, 695-698
47. Cornwell M.M., Safa A.R., Felsted R.L., Gottesman M.M., Pastan I. (1986):
Membrane vesicles from multidrug-resistant cancer cells contain a specific 150- to 170-kDa protein detected by photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 3847-3850
48. Cory S., Vaux D.L., Strasser A., Harris A.W., Adams J.M. (1999):
Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 59 (Supp 7), 1685s-1692s
49. Cui Y., Konig J., Buchholz J.K., Spring H., Leier I., Keppler D. (1999):
Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55, 929-937
50. de Bruin M., Miyake K., Litman T., Robey R., Bates S.E. (1999):
Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* 146, 117-126
51. Del Poeta G., Stasi R., Aronica G., Venditti A., Cox M.C., Bruno A., Buccisano F., Masi M., Tribalto M., Amadori S., Papa G. (1996):
Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 87, 1997-2004
52. Del Poeta G., Venditti A., Stasi R., Aronica G., Cox M.C., Buccisano F., Tamburini A., Bruno A., Maurillo L., Battaglia A., Suppo G., Epiceno A.M., Del Moro B., Masi M., Amadori S., Papa G. (1999):
P-glycoprotein and terminal transferase expression identify prognostic subsets within cytogenetic risk classes in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 23, 451-465
53. Dodion P., Sanders C., Rombaut W., Mattelaer M.A., Rozenzweig M., Stryckmans P., Kenis Y. (1987):
Effect of daunorubicin, carminomycin, idarubicin and 4-demethoxydaunorubicinol against human normal myeloid stem cells and human malignant cells in vitro. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23, 1909-1914
54. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. (1998):
A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15665-15670

55. Duan H., Chinnaiyan A.M., Hudson P.L., Wing J.P., He W.W., Dixit V.M. (1996):
ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 1621-1625
56. Evers R., Kool M., van Deemter L., Janssen H., Calafat J., Oomen L.C., Paulusma C.C., Oude Elferink R.P., Baas F., Schinkel A.H., Borst P. (1998):
Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 101, 1310-1319
57. Facchetti I., Grandi M., Cucchi P., Geroni C., Penco S., Vigevani A. (1991):
Influence of lipophilicity on cytotoxicity of anthracyclines in LoVo and LoVo/Dx human cell lines. *Anticancer Drug Des* 6, 385-397
58. Ferry D., Price L., Atsmon J., Inbar M., Ofer M., van Tellingen O., Steiner J., Mellows G., Norris D.B., Waterfall J. (2001):
A phase IIa pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the P-glycoprotein inhibitor, XR9576 in patients treated with doxorubicin chemotherapy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 42, 950
59. Filipits M., Pohl G., Stranzl T., Suchomel R.W., Scheper R.J., Jager U., Geissler K., Lechner K., Pirker R. (1998):
Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 91, 1508-1513
60. Filipits M., Suchomel R.W., Zochbauer S., Brunner R., Lechner K., Pirker R. (1997):
Multidrug resistance-associated protein in acute myeloid leukemia: No impact on treatment outcome. *Clin Cancer Res* 3, 1419-1425
61. Fisher G.A., Lum B.L., Hausdorff J., Sikic B.I. (1996):
Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32A, 1082-1088
62. Fitzgerald G.A. (1987):
Dipyridamole. *N Engl J Med* 316, 1247-1257
63. Flasshove M., Meusers P., Schütte J., Noppeney R., Beelen D.W., Sohrab S., Roggenbuck U., Kemmeries G., Brittinger G., Seeber S., Scheulen M.E. (2000):
Long-term survival after induction therapy with idarubicin and cytosine-arabinoside for acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 79, 533-542
64. Foley G.E., Lazarus H., Farber S., Uzman B.G., Boone B.A., McCarthy R.E. (1965):
Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18, 522-529
65. Ford J.M., Hait W.N. (1990):
Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 42, 155-199

66. Gaj C.L., Anyanwutaku I., Chang Y.H., Cheng Y.C. (1998):
Decreased drug accumulation without increased drug efflux in a novel MRP-overexpressing multidrug-resistant cell line. *Biochem Pharmacol* 55, 1199-1211
67. Geller R.B., Zahurak M., Hurwitz C.A., Burke P.J., Karp J.E., Piantadosi S., Civin C.I. (1990):
Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My10). *Br J Haematol* 76, 340-347
68. Gerrard G., Payne E., Baker R.J., Jones D.T., Potter M., Prentice H.G., Ethell M., McCullough H., Burgess M., Mehta A.B., Ganeshaguru K. (2004):
Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* 89, 782-790
69. Gervasoni J.E. Jr., Taub R.N., Rosado M., Krishna S., Stewart V.J., Knowles D.M., Bhalla K., Ross D.D., Baker M.A., Lutzky J. (1991):
Membrane glycoprotein changes associated with anthracycline resistance in HL-60 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 28, 93-101
70. Gieseler F., Biersack H., Brieden T., Manderscheid J., Nussler V. (1994):
Cytotoxicity of anthracyclines: correlation with cellular uptake, intracellular distribution and DNA binding. *Ann Hematol* 69 (Supp 1), S13-17
71. Gottesman M.M. (2002):
Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53, 615-627
72. Gottesman M.M., Pastan I. (1988):
The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 263, 12163-12166
73. Gottesman M.M., Pastan I. (1993):
Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427
74. Gottlieb R.A., Nordberg J., Skowronski E., Babior B.M. (1996):
Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 654-658
75. Greenberg P., Advani R., Tallman M., Letendr L., Saba H., Dugan K., Lee S.J., Lum B., Sikic B.I., Paietta E., Bennett J., Rowe J.M. (1999):
Treatment of refractory/relapsed AML with PSC833 plus mitoxantrone, etoposide, cytarabine (PSC-MEC) vs MEC: randomized Phase III trial (E2995). *Blood* 94, 383a
76. Gros P., Raymond M., Housman D. (1988):
Cloning and characterization of mouse *mdr* genes. *Mol Cell Biol* 8, 2770-2778
77. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999)
BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911
78. Guerci A., Merlin J.L., Missoum N., Feldmann L., Marchal S., Witz F., Rose C., Guerci O. (1995):

- Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. *Blood* 85, 2147-2153
79. Hann I.M., Stevens R.F., Goldstone A.H., Rees J.K., Wheatley K., Gray R.G., Burnett A.K. (1997):
Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council. *Blood* 89, 2311-2318
80. Hargrave R.M., Davey M.W., Davey R.A., Kidman A.D. (1995):
Development of drug resistance is reduced with idarubicin relative to other anthracyclines. *Anticancer Drugs* 6, 432-427
81. Hart S.M., Ganeshaguru K., Hoffbrand A.V., Prentice H.G., Mehta A.B. (1994):
Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute leukaemia. *Leukemia* 8, 2163-2168
82. Hart S.M., Ganeshaguru K., Scheper R.J., Prentice H.G., Hoffbrand A.V., Mehta A.B. (1997):
Expression of the human major vault protein LRP in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 25, 1227-1232
83. Hegewisch-Becker S., Hossfeld D.K. (1996):
The MDR phenotype in hematologic malignancies: prognostic relevance and future perspectives. *Ann Hematol* 72, 105-117
84. Hendricks C.B., Rowinsky E.K., Grochow L.B., Donehower R.C., Kaufmann S.H. (1992):
Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* 52, 2268-2278
85. Higgins C.F. (1992):
ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann Rev Cell Biol* 8, 67-113
86. Hipfner D.R., Deeley R.G., Cole S.P. (1999):
Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1461, 276-359
87. Hoffman M.M., Roepe P.D. (1997):
Analysis of ion transport perturbations caused by hu MDR 1 protein overexpression. *Biochemistry* 36, 11153-11168
88. Hooijberg J.H., Broxterman H.J., Kool M., Assaraf Y.G., Peters G.J., Scheper R.J., Borst P., Pinedo H.M., Jansen G. (1999):
Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59, 2532-2535
89. Hopper E., Belinsky M.G., Zeng H., Tosolini A., Testa J.R., Kruh G.D. (2001) :
Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 162, 181-191

90. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995):
The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504
91. Hyafil F., Vergely C., du Vignaud P., Grand-Perret T. (1993):
In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* 53, 4595-4602
92. Ino T., Miyazaki H., Isogai M., Nomura T., Tsuzuki M., Tsuruo T., Ezaki K., Hirano M. (1994):
Expression of P-glycoprotein in de novo acute myelogenous leukemia at initial diagnosis: results of molecular and functional assays, and correlation with treatment outcome. *Leukemia* 8, 1492-1497
93. Ito Y., Tanimoto M., Kumazawa T., Okumura M., Morishima Y., Ohno R., Saito H. (1989):
Increased P-glycoprotein expression and multidrug-resistant gene (mdr1) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells. Sequential analysis of 15 cases at initial presentation and relapsed stage. *Cancer* 63, 1534-1538
94. Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Schroeijers A.B., van der Valk P., Scheper R.J. (1996):
Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32A, 979-984
95. Jansen W.J., Hulscher T.M., van Ark-Otte J., Giaccone G., Pinedo H.M., Boven E. (1998):
CPT-11 sensitivity in relation to the expression of P170-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 77, 359-365
96. Jansen W.J., Pinedo H.M., Kuiper C.M., Lincke C., Bamberger U., Heckel A., Boven E. (1994):
Biochemical modulation of 'classical' multidrug resistance by BIBW22BS, a potent derivative of dipyridamole. *Ann Oncol* 5, 733-739
97. Jansen W.J.M., Pinedo H.M., van der Wilt C.L., Feller N., Bamberger U, Boven E. (1995):
The influence of BIBW22BS, a dipyridamole derivative, on the antiproliferative effects of 5-fluorouracil, methotrexate and gemcitabine in vitro and in human tumour xenografts. *Eur J Oncol* 31A, 2313-2319
98. Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Barnouin K., Kurz G., Keppler D. (1996):
Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56, 988-994
99. Jiang E.Z., Chang Y.J., Lee J.W., Lee W.K., Kim J.S., Sohn S.K., Lee K.B., Suh J.S. (1998):
Multi-drug resistance (MDR1) gene expression in de novo acute leukemia cells: correlations with CD surface markers and treatment outcome. *J Korean Med Sci* 13, 617-622

100. Johnstone R.W., Cretney E., Smyth M.J. (1999):
P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 93, 1075-1085
101. Juranka P.F., Zastawny R.L., Ling V. (1989):
P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 3, 2583-2592
102. Kasimir-Bauer S., Beelen D., Flasshove M., Noppeney R., Seeber S., Scheulen M. E. (2002):
Impact of the expression of P-glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53 and heat-shock protein 27 on response to induction therapy and long term survival in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Exper Hematol* 30, 1302-1308.
103. Kemper E.M., Verheij M., Boogerd W., Beijnen J.H., van Tellingen O. (2004):
Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur J Cancer* 40, 1269-1274
104. Kim M.Y., Linardic C., Obeid L., Hannun Y. (1991):
Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 266, 484-489
105. Kitazono M., Sumizawa T., Takebayashi Y., Chen Z.S., Furukawa T., Nagayama S., Tani A., Takao S., Aikou T., 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
106. Klein I., Sarkadi B., Varadi A. (1999):
An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461, 237-262
107. Kohno K., Sato S., Takano H., Matsuo K., Kuwano M. (1989):
The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 1415-1421
108. Konopleva M., Zhao S., Hu W., Jiang S., Snell V., Weidner D., Jackson C.E., Zhang X., Champlin R., Estey E., Reed J.C., Andreeff M. (2002):
The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol* 118, 521-534
109. Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P. (1997):
Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57, 3537-3547
110. Kool M., van der Linden M., de Haas M., Baas F., Borst P. (1999a):
Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 59, 175-182

111. Kool M., van der Linden M., de Haas M., Scheffer G.L., de Vree J.M., Smith A.J., Jansen G., Peters G.J., Ponne N., Scheper R.J., Elferink R.P., Baas F., Borst P. (1999b):
MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6914-6919
112. Kuffel M.J., Reid J.M., Ames M.M. (1992):
Anthracyclines and their C-13 alcohol metabolites: growth inhibition and DNA damage following incubation with human tumor cells in culture. *Cancer Chemother Pharmacol* 30, 51-57
113. Lautier D., Canitrot Y., Deeley R.G., Cole S.P. (1996):
Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 52, 967-977
114. Lee E.J., Yang J., Leavitt R.D., Testa J.R., Civin C.I., Forrest A., Schiffer C.A. (1992):
The significance of CD34 and TdT determinations in patients with untreated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 6, 1203-1209
115. Lee K., Klein-Szanto A.J., Kruh G.D. (2000):
Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* 2000 92, 1934-1940
116. Legrand O., Simonin G., Beauchamp-Nicoud A., Zittoun R., Marie J.P. (1999):
Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 94, 1046-1056
117. Legrand O., Simonin G., Perrot J.Y., Zittoun R., Marie J.P. (1998):
Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 91, 4480-4488
118. Leith C.P., Chen I.M., Kopecky K.J., Appelbaum F.R., Head D.R., Godwin J.E., Weick J.K., Willman C.L. (1995):
Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR1+/efflux- cases. *Blood* 86, 2329-2342
119. Leith C.P., Kopecky K.J., Chen I.M., Eijdem L., Slovak M.L., McConnell T.S., Head D.R., Weick J., Grever M.R., Appelbaum F.R., Willman C.L. (1999):
Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94, 1086-1099
120. Leith C.P., Kopecky K.J., Godwin J., McConnell T., Slovak M.L., Chen I.M., Head D.R., Appelbaum F.R., Willman C.L. (1997):
Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 89, 3323-3329

121. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P. (2001):
Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167, 3-23
122. Li J., Eastman A. (1995):
Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *J Biol Chem* 270, 3203-3211
123. List A.F. (1996):
Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 937-942
124. List A.F., Kopecky K.J., Willman C.L., Head D.R., Persons D.L., Slovak M.L., Dorr R., Karanes C., Hynes H.E., Doroshow J.H., Shurafa M., Appelbaum F.R. (2001):
Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 98, 3212-3220
125. List A.F., Spier C.S., Grogan T.M., Johnson C., Roe D.J., Greer J.P., Wolff S.N., Broxterman H.J., Scheffer G.L., Scheper R.J., Dalton W.S. (1996):
Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 87, 2464-2469
126. Litman T., Brangi M., Hudson E., Fetsch P., Abati A., Ross D.D., Miyake K., Resau J.H., Bates S.E. (2000):
The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113, 2011-2021
127. Liu Yin J.A., Wheatley K., Rees J.K., Burnett A.K. (2001):
Comparison of 'sequential' versus 'standard' chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukaemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial. *Br J Haematol* 113, 713-726
128. Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.V., Karin M. (1996a):
Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576
129. Liu Z., Lheureux F., Pouliot J.F., Heckel A., Bamberger U., Georges E. (1996b):
BIBW22 BS, potent multidrug resistance-reversing agent, binds directly to P-glycoprotein and accumulates in drug-resistant cells. *Mol Pharmacol* 50, 482-492
130. Loe D.W., Deeley R.G., Cole S.P. (1996):
Biology of the Multidrug Resistance-associated Protein, MRP. *Eur J Cancer* 32A, 945-957
131. Loe D.W., Deeley R.G., Cole S.P. (1998):
Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* 58, 5130-5126

132. Lorico A., Rappa G., Flavell R.A., Sartorelli A.C. (1996):
Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res* 56, 5351-5355
133. Los M., van de Craen M., Penning L.C., Schenk H., Westendorp M., Baeuerle P.A., Droge W., Krammer P.H., Fiers W., Schulze-Osthoff K. (1995):
Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81-83
134. Lotfi K., Zackrisson A.L., Peterson C. (2002):
Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. *Cancer Lett* 178, 141-149
135. Lowenberg B., Suciú S., Archimbaud E., Haak H., Stryckmans P., de Cataldo R., Dekker A.W., Berneman Z.N., Thyss A., van der Lelie J., Sonneveld P., Visani G., Fillet G., Hayat M., Hagemeyer A., Solbu G., Zittoun R. (1998):
Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy--the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group. *J Clin Oncol* 16, 872-881
136. Lum B., Gosland M. (1995):
MDR expression in normal tissues: pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 9, 319-336
137. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. (2001):
Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61, 3458-3464
138. Mankhetkorn S., Dubru F., Hesschenbrouck J., Fiallo M., Garnier-Suillerot A. (1996):
Relation among the resistance factor, kinetics of uptake, and kinetics of the P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin, daunorubicin, 8-(S)-fluoroidarubicin, and idarubicin in multidrug-resistant K562 cells. *Mol Pharmacol* 49, 532-539
139. Manoharan A. (1998):
Acute myeloblastic leukaemia in the elderly: biology, prognostic factors and treatment. *Int J Hematol* 68, 235-243
140. Manson J.M., Guerriera F.J., Brown T., San Sebastian J. (1986):
Lack of in vivo mutagenicity and testicular toxicity of triamterene in mice. *Fundam Appl Toxicol* 7, 533-546
141. Marbeuf-Gueye C., Broxterman H.J., Dubru F., Priebe W., Garnier-Suillerot A. (1998):
Kinetics of anthracycline efflux from multidrug resistance protein-expressing cancer cells compared with P-glycoprotein-expressing cancer cells. *Mol Pharmacol* 53, 141-147

142. Marie J.P., Faussat-Suberville A.M., Zhou D., Zittoun R. (1993):
Daunorubicin uptake by leukemic cells: correlations with treatment outcome and *mdr1* expression. *Leukemia* 7, 825-831
143. Marie J.P., Zhou D.C., Gurbuxani S., Legrand O., Zittoun R. (1996):
MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. *Eur J Cancer* 32A, 1034-1038
144. Marie J.P., Zittoun R., Sikic B.I. (1991):
Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 78, 586-592
145. Marquardt D., McCrone S., Center M.S. (1990):
Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein. *Cancer Res* 50, 1426-1430
146. Maslak P., Hegewisch-Becker S., Godfrey L., Andreeff M. (1994):
Flow cytometric determination of the multidrug-resistant phenotype in acute leukemia. *Cytometry* 17, 84-93
147. Mayer R.J., Davis R.B., Schiffer C.A., Berg D.T., Powell B.L., Schulman P., Omura G.A., Moore J.O., McIntyre O.R., Frei E. 3rd (1994):
Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 331, 896-903
148. McLeod H.L. (1994):
Clinical reversal of multidrug resistance phenotype: true tumour modulation or pharmacokinetic interaction? *Eur J Cancer* 30A, 2039-2041
149. Mehta J., Powles R., Singhal S., Horton C., Hamblin M., Zomas A., Saso R., Prendiville J., Glynn P., Allford S., Mackay H., Treleaven J. (1996):
Idarubicin, high-dose cytarabine, and etoposide for induction of remission in acute leukemia. *Semin Hematol* 33 (Supp 3), 18-23
150. Meyers M.B., Rittmann-Grauer L., O'Brien J.P., Safa A.R. (1989):
Characterization of monoclonal antibodies recognizing a Mr 180,000 P-glycoprotein: differential expression of the Mr 180,000 and Mr 170,000 P-glycoproteins in multidrug-resistant human tumor cells. *Cancer Res* 49, 3209-3214
151. Michieli M., Damiani D., Ermacora A., Masolini P., Raspadori D., Visani G., Scheper R.J., Baccarani M. (1999):
P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications. *Br J Haematol* 104, 328-335
152. Michieli M., Damiani D., Michelutti A., Candoni A., Masolini P., Scaggiante B., Quadrifoglio F., Baccarani M. (1994a):
Restoring uptake and retention of daunorubicin and idarubicin in P170-related multidrug resistance cells by low concentration D-verapamil, cyclosporin-A and SDZ PSC 833. *Haematologica* 79, 500-507

153. Michieli M., Damiani D., Michelutti A., Melli C., Russo D., Fanin R., Baccarani M. (1994b):
p170-dependent multidrug resistance. Restoring full sensitivity to idarubicin with verapamil and cyclosporin A derivatives. *Haematologica* 79, 119-126
154. Michieli M., Giacca M., Fanin R., Damiani D., Geromin A., Baccarani M. (1991):
mdr-1 gene amplification in acute lymphoblastic leukaemia prior to antileukaemic treatment. *Br J Haematol* 78, 288-289
155. Mistry P., Stewart A.J., Plumb J.A., Callaghan R., Martin C., Dangerfield W., Bootle D., Liddle C., Templeton D., Charlton P. (1999):
In vitro and in vivo evaluation of XR9576, a novel potent modulator of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 40, 313
156. Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T., Bates S.E. (1999):
Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59, 8-13
157. Molgaard H.V., Spurr N.K., Greaves M.F. (1989):
The hemopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia* 3, 773-776
158. Müller M.R., Lennartz K., Nowrousian M.R., Dux R., Tsuruo T., Rajewsky M.F., Seeber S. (1994):
Improved flow-cytometric detection of low P-glycoprotein expression in leukaemic blasts by histogram subtraction analysis. *Cytometry*. 15: 64-72
159. Mulder H.S., Dekker H., Pinedo H.M., Lankelma J. (1995):
The P-glycoprotein-mediated relative decrease in cytosolic free drug concentration is similar for several anthracyclines with varying lipophilicity. *Biochem Pharmacol* 50, 967-974
160. Musto P., Cascavilla N., Di Renzo N., Ladogana S., La Sala A., Melillo L., Nobile M., Matera R., Lombardi G., Carotenuto M. (1990):
Clinical relevance of immunocytochemical detection of multidrug-resistance-associated P-glycoprotein in hematologic malignancies. *Tumori* 76, 353-359
161. Nagata S. (1997):
Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365
162. Ng W.F., Sarangi F., Zastawny R.L., Veinot-Drebot L., Ling V. (1989):
Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol* 9, 1224-1232
163. Nooter K., Herweijer H. (1991):
Multidrug resistance (mdr) genes in human cancers. *Br J Cancer* 63, 663-669
164. Nooter K., Sonneveld P. (1994):
Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies. *Leuk Res* 18, 233-243

165. Nussler V., Gieseler F., Zwierzina H., Gullis E., Pelka-Fleischer R., Diem H., Abenhardt W., Schmitt R., Langenmayer I., Wohlrab A., Kolb H.J., Wilmanns W. (1997):
Idarubicin monotherapy in multiply pretreated leukemia patients: response in relation to P-glycoprotein expression. *Ann Hematol* 74, 57-64
166. O'Brien M., Kruh G.D., Tew K.D. (2000):
The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 480-487
167. Pallis M., Russell N. (1999):
P-glycoprotein expression is associated with resistance to spontaneous in vitro apoptosis in AML. *Leukemia* 13, 1468-1469
168. Pallis M., Russell N. (2000):
P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood* 95, 2897-2904
169. Pallis M., Turzanski J., Grundy M., Seedhouse C., Russell N. (2003):
Resistance to spontaneous apoptosis in acute myeloid leukaemia blasts is associated with p-glycoprotein expression and function, but not with the presence of FLT3 internal tandem duplications. *Br J Haematol* 120, 1009-1016
170. Pallis M., Turzanski J., Higashi Y., Russell N. (2002):
P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: therapeutic implications of its association with both a multidrug-resistant and an apoptosis-resistant phenotype. *Leuk Lymphoma* 43, 1221-1228
171. Pallis M., Zhu Y.M., Russell N.H. (1997):
Bcl-x(L) is heterogeneously expressed by acute myeloblastic leukaemia cells and is associated with autonomous growth in vitro and with P-glycoprotein expression. *Leukemia* 11, 945-949
172. Pilarski L.M., Yatscoff R.W., Murphy G.F., Belch A.R. (1998):
Drug resistance in multiple myeloma: cyclosporin A analogues and their metabolites as potential chemosensitizers. *Leukemia* 12, 505-509
173. Pirker R., Wallner J., Geissler K., Linkesch W., Haas O.A., Bettelheim P., Hopfner M., Scherrer R., Valent P., Havelec L. (1991):
MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 83, 708-712
174. Planting A.S., Sonneveld P., van der Gaast A., Sparreboom A., van der Burg M.E., Luyten G.P., de Leeuw K., de Boer-Dennert M., Wissel P.S., Jewell R.C., Paul E.M., Purvis Jr. N.B., Verweij J. (2005):
A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 55, 91-99
175. Pogliani E.M., Carpenedo M., Miccolis I., Belotti D., Corneo G.M. (2001):
P-Glycoprotein expression in acute myeloid leukaemia cells at diagnosis: its

- relationship to daunorubicin or idarubicin induction therapy and survival; malignancy. *Hematol* 5, 359-367
176. Rabindran S.K., He H., Singh M., Brown E., Collins K.I., Annable T., Greenberger L.M. (1998):
Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res* 58, 5850-5858
177. Raff M. (1998):
Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119-122
178. Ramachandra M., Ambudkar S.V., Chen D., Hrycyna C.A., Dey S., Gottesman M.M., Pastan I. (1998):
Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* 37, 5010-5019
179. Ramu N., Ramu A. (1989):
Circumvention of adriamycin resistance by dipyrindamole analogues: a structure-activity relationship study. *Int J Cancer* 43, 487-491
180. Ravi R., Bedi A., Fuchs E.J., Bedi A. (1998):
CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* 58, 882-886
181. Reed J.C. (1994):
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124, 1-6
182. Renes J., de Vries E.G., Nienhuis E.F., Jansen P.L., Muller M. (1999):
ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol* 126, 681-688
183. Robinson L.J., Roberts W.K., Ling T.T., Lamming D., Sternberg S.S., Roepe P.D. (1997):
Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry* 36, 11169-11178
184. Rocchi E., Khodjakov A., Volk E.L., Yang C.H., Litman T., Bates S.E., Schneider E. (2000):
The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 42-46
185. Roninson I.B. (1992):
The role of *mdr1* (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 43, 95-102
186. Roovers D.J., van Vliet M., Bloem A.C., Lokhorst H.M. (1999):
Idarubicin overcomes P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with doxorubicin and daunorubicin in human multiple myeloma cell lines. *Leuk Res* 23, 539-548
187. Ross D.D. (1991):
Cellular and pharmacologic aspects of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 3, 21-29
188. Ross D.D. (2000):
Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 14, 467-473

189. Ross D.D., Doyle L.A., Yang W., Tong Y., Cornblatt B. (1995):
Susceptibility of idarubicin, daunorubicin, and their C-13 alcohol metabolites to transport-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 50, 1673-1683
190. Ross D.D., Karp J.E., Chen T.T., Doyle L.A. (2000):
Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* 96, 365-368
191. Sachs C.W., Chambers T.C., Fine R.L. (1999):
Differential phosphorylation of sites in the linker region of P-glycoprotein by protein kinase C isozymes alpha, betaI, betaII, gamma, delta, epsilon, eta, and zeta. *Biochem Pharmacol* 58, 1587-1592
192. Safa A.R. (1988):
Photoaffinity labeling of the multidrug-resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7187-7191
193. Safa A.R., Glover C.J., Sewell J.L., Meyers M.B., Biedler J.L., Felsted R.L. (1987):
Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 262, 7884-7888
194. Saito T., Zhang Z.J., Tsuzuki H., Ohtsubo T., Yamada T., Yamamoto T., Saito H. (2001):
Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with special reference to blood-inner ear barrier. *Brain Res* 767, 388-392
195. Sandler A., Gordon M., de Alwis D.P., Pouliquen I., Green L., Marder P., Chaudhary A., Fife K., Battiatto L., Sweeney C., Jordan C., Burgess M., Slapak C.A. (2004):
A phase I trial of a potent p-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 10, 3265-3272
196. Sato H., Preisler H., Day R., Raza A., Larson R., Browman G., Goldberg J., Vogler R., Grunwald H., Gottlieb A., Bennett J., Gottesman M., Pastan I. (1990):
MDR1 transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 75, 340-345
197. Sauna Z.E., Ambudkar S.V. (2001):
Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem* 276, 11653-11661
198. Scheffer G.L., Maliepaard M., Pijnenborg A.C., van Gastelen M.A., de Jong M.C., Schroeijers A.B., van der Kolk D.M., Allen J.D., Ross D.D., van der Valk P., Dalton W.S., Schellens J.H., Scheper R.J. (2000):
Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res* 60, 2589-2593

199. Scheper R.J., Broxterman H.J., Scheffer G.L., Kaaijk P., Dalton W.S., van Heijningen T.H., van Kalken C.K., Slovak M.L., de Vries E.G., van der Valk P., Meijer C.J., Pinedo H.M. (1993):
Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 53, 1475-1479
200. Scheulen M.E., Müller M., Schröder J., Wermes R., Schütte J., Skorzec M., Käding J., Meusers P., Brittinger G., Seeber S. (1994):
Correlation of cellular pharmacokinetics of idarubicin and idarubicinol, P-glycoprotein expression and response in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Amer Ass Cancer Res* 35, 428
201. Scheulen M. E. (1998):
Clinical relevance of P-glycoprotein with respect to the application of resistance modifiers. *Int J clin Pharmacol Ther* 36, 41-45
202. Schinkel A.H., Roelofs M.E., Borst P. (1991):
Characterization of the human mdr3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res* 51, 2628-2635
203. Schneider E., Cowan K.H., Bader H., Toomey S., Schwartz G.N., Karp J.E., Burke P.J., Kaufmann S.H. (1995):
Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. *Blood* 85, 186-193
204. Schneider E., Horton J.K., Yang C.H., Nakagawa M., Cowan K.H. (1994):
Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res* 54, 152-158
205. Schott B., Robert J. (1989):
Comparative cytotoxicity, DNA synthesis inhibition and drug incorporation of eight anthracyclines in a model of doxorubicin-sensitive and -resistant rat glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 38, 167-172
206. Schröder J., Esteban M., Kasimir-Bauer S., Bamberger U., Heckel A., Scheulen M.E., Seeber S. (1996a):
In vitro modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of de novo or relapsed or persistent AML.
In: Hiddemann W., Büchner T., Wörmann B., Ritter J., Creutzig U., Plunkett W., Keating M. (Eds.): *Acute Leukemias V*; S. 118-123. Berlin, Heidelberg: Springer
207. Schröder J., Esteban M., Müller M.R., Kasimir-Bauer S., Bamberger U., Heckel A., Seeber S., Scheulen M.E. (1996b):
Modulation of multidrug resistance by BIBW22BS in blasts of de novo or relapsed or persistent acute myeloid leukemia ex vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 307-312
208. Schröder J.K., Kasimir-Bauer S., Seeber S., Scheulen M.E. (2000):
In vitro effect of multidrug resistance modifiers on idarubicinol efflux in blasts of acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 111-116

209. Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Marian B., Torok L., Kahl-Rainer P., Ellinger A. (1997):
Concepts of cell death and application to carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 25, 89-93
210. Shalinsky D.R., Andreeff M., Howell S.B. (1990):
Modulation of drug sensitivity by dipyridamole in multidrug resistant tumor cells in vitro. *Cancer Res* 50, 7537-7543
211. Sievers E.L., Smith F.O., Woods W.G., Lee J.W., Bleyer W.A., Willman C.L., Bernstein I.D. (1995):
Cell surface expression of the multidrug resistance P-glycoprotein (P-170) as detected by monoclonal antibody MRK-16 in pediatric acute myeloid leukemia fails to define a poor prognostic group: a report from the Childrens Cancer Group. *Leukemia* 9, 2042-2048
212. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990):
New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112.
213. Skladanowski A., Konopa J. (1993):
Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem Pharmacol* 46, 375-382
214. Smeets M.E., Raymakers R.A., Vierwinden G., Pennings A.H., Boezeman J., Minderman H., de Witte T.M. (1999):
Idarubicin DNA intercalation is reduced by MRP1 and not Pgp. *Leukemia* 13, 1390-1398
215. Smith B.D., Bambach B.J., Vala M.S., Barber J.P., Enger C., Brodsky R.A., Burke P.J., Gore S.D., Jones R.J. (1998):
Inhibited apoptosis and drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 102, 1042-1049
216. Smyth M.J., Krasovskis E., Sutton V.R., Johnstone R.W. (1998):
The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7024-7029
217. Solary E., Witz B., Caillot D., Moreau P., Desablens B., Cahn J.Y., Sadoun A., Pignon B., Berthou C., Maloisel F., Guyotat D., Casassus P., Ifrah N., Lamy Y., Audhuy B., Colombat P., Harousseau J.L. (1996):
Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study. *Blood* 88, 1198-1205
218. Sonneveld P. (1996):
Reversal of multidrug resistance in acute myeloid leukaemia and other haematological malignancies. *Eur J Cancer* 32A, 1062-1069
219. Steemans M., Goossens V., Van de Craen M., Van Herreweghe F., Vancompernelle K., De Vos K., Vandenabeele P., Grooten J. (1998):
A caspase-activated factor (CAF) induces mitochondrial membrane

- depolarization and cytochrome c release by a nonproteolytic mechanism. *J Exp Med* 188, 2193-2198
220. Stewart A., Steiner J., Mellows G., Laguda B., Norris D., Bevan P. (2000): Phase I trial of XR9576 in healthy volunteers demonstrates modulation of P-glycoprotein in CD56+ lymphocytes after oral and intravenous administration. *Clin Cancer Res* 6: 4186-4191
221. Sugawara I., Kataoka I., Morischita Y. (1988): Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK16. *Cancer Res* 48, 4611-4614
222. Sun X.M., MacFarlane M., Zhuang J., Wolf B.B., Green D.R., Cohen G.M. (1999): Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 5053-5060
223. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M., Kroemer G. (1999): Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-394
224. Taniguchi K., Wada M., Kohno K., Nakamura T., Kawabe T., Kawakami M., Kagotani K., Okumura K., Akiyama S., Kuwano M. (1996): A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 56, 4124-4129
225. Tatsuta T., Shimizu K., Nishimura T., Suzuki H. (1991): Enhancement of activities of anti-tumor drugs by dipyridamole against multidrug-resistant human hepatoma PLC/PRF/5 cells. *Anticancer Drug Des* 6, 179-188
226. te Boekhorst P.A., de Leeuw K., Schoester M., Wittebol S., Nooter K., Hagemeyer A., Lowenberg B., Sonneveld P. (1993): Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Blood* 82, 3157-3162
227. Thiebaut F., Currier S.J., Whitaker J., Haugland R.P., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. (1990): Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of a pH-sensitive dye. *J Histochem Cytochem* 38, 685-690
228. Thomas H., Coley H.M.(2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159-165
229. Thomas H., Steiner J.A., Mould G.P., Mellows G., Stewart A.J., Norris D.B., Waterfall J.F. (2001): A phase IIa pharmacokinetic study of the P-glycoprotein inhibitor, XR9576 in combination with paclitaxel in patients with ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20, 73a

230. Thornberry N.A., Lazebnik Y. (1998):
Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316
231. Tidefelt U., Prenekert M., Paul C. (1996):
Comparison of idarubicin and daunorubicin and their main metabolites regarding intracellular uptake and effect on sensitive and multidrug-resistant HL60 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 38, 476-480
232. Tolomeo M., Gancitano R.A., Musso M., Porretto F., Perricone R., Abbadessa V., Cajozzo A. (1996):
Comparative activity of idarubicin and idarubicinol in combination with cyclosporin A in multidrug-resistant leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 39, 157-161
233. Tsimberidou A.M., Paterakis G., Androutsos G., Anagnostopoulos N., Galanopoulos A., Kalmantis T., Meletis J., Rombos Y., Sagriotis A., Symeonidis A., Tiniakou M., Zoumbos N., Yataganas X. (2002):
Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 26, 143-154
234. Tura S., Morschhauser F., Zinzani P., Sloots L., Burgess M., Dumontet C. (2001):
A phase I trial of the P-glycoprotein inhibitor zosuquidar (LY335979) and CHOP chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 98, 251b
235. Ueda K., Cardarelli C., Gottesman M.M., Pastan I. (1987):
Expression of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3004-3008
236. Ushigome F., Takanaga H., Matsuo H., Yanai S., Tsukimori K., Nakano H., Uchiumi T., Nakamura T., Kuwano M., Ohtani H., Sawada Y. (2000):
Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol* 408, 1-10
237. van den Heuvel-Eibrink M.M., van der Holt B., te Boekhorst P.A., Pieters R., Schoester M., Lowenberg B., Sonneveld P. (1997):
MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 99, 76-83
238. van den Heuvel-Eibrink M.M., Wiemer E.A., de Boevere M.J., van der Holt B., Vossebeld P.J., Pieters R., Sonneveld P. (2001):
MDR1 gene-related clonal selection and P-glycoprotein function and expression in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 3605-3611
239. van den Heuvel-Eibrink M.M., Wiemer E.A., Prins A., Meijerink J.P., Vossebeld P.J., van der Holt B., Pieters R., Sonneveld P. (2002):
Increased expression of breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 16, 833-839
240. van der Blik A.M., Borst P. (1989):

- Multidrug resistance. *Adv Cancer Res* 52, 165-203
241. van der Kolk D.M., de Vries E.G., Müller M., Vellenga E. (2002):
The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 43, 685-701
242. van der Kolk D.M., de Vries E.G., Noordhoek L., van den Berg E., van der Pol M.A., Müller M., Vellenga E. (2001):
Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15, 1544-1553
243. van der Kolk D.M., de Vries E.G., van Putten W.J., Verdonck L.F., Ossenkoppele G.J., Verhoef G.E., Vellenga E. (2000):
P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 6, 3205-3214
244. Vanhoef U., Muller M.R., Hilger R.A., Lindtner B., Klaassen U., Schleucher N., Rustum Y.M., Seeber S., Harstrick A. (1999):
Reversal of MDR1-associated resistance to topotecan by PAK-200S, a new dihydropyridine analogue, in human cancer cell lines. *Br J Cancer* 81, 1304-1311
245. van Kalken C.K., van der Hoeven J.J., de Jong J., Giaccone G., Schuurhuis G.J., Maessen P.A., Blokhuis W.M., van der Vijgh W.J., Pinedo H.M. (1991):
Bepiridil in combination with anthracyclines to reverse anthracycline resistance in cancer patients. *Eur J Cancer* 27, 739-744
246. van Zuylen L., Nooter K., Sparreboom A., Verweij J. (2000a):
Development of multidrug-resistance convertors: sense or nonsense? *Invest. New Drugs* 18, 205-220
247. van Zuylen L., Sparreboom A., van der Gaast A., van der Berg M.E.L., van Beurden V., Bol C.J., Woestenborghs R., Palmer P.A., Verweij J. (2000b):
The orally administered P-glycoprotein inhibitor R101933 does not alter the pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 6, 1365-1371
248. van Zuylen L., Sparreboom A., van der Gaast A., Nooter K., Eskens F.A.L.M., Brouwer E., Bol C.J., de Vries R., Palmer P.A., Verweij J. (2002):
Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933. *Eur J Cancer* 38, 1090-1099
249. Vellenga E., van Putten W.L., Boogaerts M.A., Daenen S.M., Verhoef G.E., Hagenbeek A., Jonkhoff A.R., Huijgens P.C., Verdonck L.F., van der Lelie J., Schouten H.C., Gmur J., Wijermans P., Gratwohl A., Hess U., Fey M.F., Lowenberg B. (1999):
Peripheral blood stem cell transplantation as an alternative to autologous marrow transplantation in the treatment of acute myeloid leukemia? *Bone Marrow Transplant* 23, 1279-1282
250. Vial J.P., Belloc F., Dumain P., Besnard S., Lacombe F., Boisseau M.R., Reiffers J., Bernard P. (1997):
Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukaemic cells. *Leuk Res* 21, 163-172

251. Vogler W.R., Velez-Garcia E., Weiner R.S., Flaum M.A., Bartolucci A.A., Omura G.A., Gerber M.C., Banks P.L. (1992):
A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol* 10, 1103-1111
252. Walker J., Martin C., Callaghan R. (2004):
Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *Eur J Cancer* 40, 594-605
253. Wang C.Y., Mayo M.W., Baldwin A.S. Jr (1996):
TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787
254. Weick J.K., Kopecky K.J., Appelbaum F.R., Head D.R., Kingsbury L.L., Balcerzak S.P., Bickers J.N., Hynes H.E., Welborn J.L., Simon S.R., Grever M. (1996):
A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 88, 2841-2851
255. Wiernik P.H., Banks P.L., Case D.C. Jr, Arlin Z.A., Periman P.O., Todd M.B., Ritch P.S., Enck R.E., Weitberg A.B. (1992):
Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 79, 313-319
256. Wijnholds J., Mol C.A., van Deemter L., de Haas M., Scheffer G.L., Baas F., Beijnen J.H., Scheper R.J., Hatse S., De Clercq E., Balzarini J., Borst P. (2000):
Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7476-7481
257. Wood P., Burgess R., MacGregor A., Yin J.A. (1994):
P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol* 87, 509-514
258. Wuchter C., Karawajew L., Ruppert V., Buchner T., Schoch C., Haferlach T., Ratei R., Dorken B., Ludwig W.D. (1999):
Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. *Leukemia* 13, 1943-1953
259. Xu D., Areström I., Virtala R., Pisa P., Peterson C., Gruber A. (1999):
High levels of lung resistance related protein mRNA in leukaemic cells from patients with acute myelogenous leukaemia are associated with inferior response to chemotherapy and prior treatment with mitoxantrone. *Br J Haematol* 106, 627-633
260. Yin X.M. (2000):
Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med* 78, 203-211
261. Young L.C., Campling B.G., Cole S.P., Deeley R.G., Gerlach J.H. (2001):
Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer:

- correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 7, 1798-17804
262. Zaman G.J., Flens M.J., van Leusden M.R., de Haas M., Mulder H.S., Lankelma J., Pinedo H.M., Scheper R.J., Baas F., Broxterman H.J., Borst P. (1994):
The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci* 91, 8822-8826
263. Zeng H., Bain L.J., Belinsky M.G., Kruh G.D. (1999):
Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 5964-5967
264. Zhou D.C., Simonin G., Faussat A.M., Zittoun R., Marie J.P. (1997):
Effect of the multidrug inhibitor GG918 on drug sensitivity of human leukemic cells. *Leukemia* 11, 1516-1522
265. Zhou D.C., Zittoun R., Marie J.P. (1995):
Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 9, 1661-1666
266. Zochbauer S., Gsur A., Brunner R., Kyrle P.A., Lechner K., Pirker R. (1994):
P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 8, 974-977

7. Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	Superfamilie der ATP-binding cassette Transporter
ABCP	placental ABC transporter
ADP	Adenosindiphosphat
AIDA	Cytosinarabinosid + Idarubicin
AML	akute myeloische Leukämie
Ara-C	Cytosinarabinosid
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
BIBW22BS	4-[N-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-ethanolamino]-2,7-bis(cis-2,6-dimethyl-morpholino)-6-phenylpteridin
BP	Blastenpersistenz
BSA	bovines Serumalbumin
CEM-CCRF	humane T-Zell lymphoblastische Zelllinie
CEM-VBL	vinblastinresistente Zelllinie von CEM-CCRF
CHOP	Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison
CR	klinische Vollremission
CsA	Cyclosporin A
DD	death domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNIG	Dexniguldipin
DNR	Daunorubicin
DPM	Dipyridamol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fas associated protein with death domain
FCS	fetales Kälberserum
hd	hochdosiert
HYB-241	monoklonaler Antikörper gegen P-Glykoprotein
IDA	Idarubicin
IDA-ol	Idarubicinol

IgG _{2Ak}	Mausmyelomprotein
LRP	lung resistance protein
MDR	Multidrugresistenz
MK-571	Inhibitor von MRP1
MRP1	Multidrugresistenz assoziiertes Protein 1
MVP	major vault protein
MXR	mitoxantrone resistance protein
n.b.	nicht bestimmt
NBD	Nukleotidbindungsstelle
NF-κB	nuclear factor-κB
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pgp	P-Glykoprotein
PR	partielle Remission
PSC833	Cyclosporin-Derivat Valspodar
R123	Rhodamin 123
RMA	resistance modifying agent
SRB	Sulphorhodamin
TMD	transmembranäre Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
VER	Verapamil
VP-16	Etoposid
ZNS	Zentralnervensystem

8. D a n k s a g u n g

Für die Überlassung des Themas und die Anregungen bei der Erstellung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. M. E. Scheulen herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Schröder, der nicht nur in vielen Diskussionen mein Gesprächspartner war, sondern auch die Anfertigung der Arbeit geduldig und umsichtig betreut hat und mich jederzeit bei der Auswertung der Ergebnisse und der Abfassung der Dissertationsschrift unterstützt hat.

Allen Mitarbeitern der Laboratorien der Inneren Klinik und Poliklinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen, insbesondere Frau Dr. S. Kasimir-Bauer, Herrn W. Stellberg, Herrn M. Skorzek und Herrn J. Käding, danke ich für den aufmunternden Beistand und die wertvollen Ratschläge, die sie mir während der praktischen Tätigkeit im Labor gewährt und gegeben haben.

Für die stete Hilfsbereitschaft bei der Beschaffung der Literatur gilt Frau Ch. Wartchow ein herzliches Dankeschön.

Besonders möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in den letzten Jahren in allen Belangen voll unterstützten.

9. Lebenslauf

Name: Mauricio ESTEBAN GARCIA, wohnhaft in Herzberg
Geburtsdatum/-ort: 6. Juni 1968 in Segovia (Spanien)
Staatsangehörigkeit: spanisch

Schulbildung:

09/1974 - 07/1978 Grundschule Schwarze Heide in Oberhausen
 09/1978 - 06/1984 Friedrich-Ebert-Realschule in Oberhausen
 01/1985 Spanische Fachhochschulreife
 09/1987 - 06/1990 Abendgymnasium der Stadt Duisburg
 1. Juni 1990 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsbildung und Berufstätigkeit:

09/1984 - 07/1987 Ausbildung zum Verwaltungsfachangestellten bei der Stadtverwaltung Oberhausen
 07/1987 - 09/1990 Verwaltungsfachangestellter bei der Stadtverwaltung Oberhausen

Hochschulausbildung:

10/1990 - 07.11.1996 Studium der Humanmedizin an der Universität-GH Essen
 09/1992 Ärztliche Vorprüfung, Physikum
 08/1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, I. Staatsexamen
 09/1995 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, II. Staatsexamen
 07.11.1996 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, III. Staatsexamen
 18.11.1996 vorübergehende Berufserlaubnis zum AiP
 01.07.1998 Approbation als Arzt

Berufstätigkeit:

01/1997 - 06/1998 AiP in der Klinik für Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Direktor: Prof. Dr. med. K. M. Stürmer, Georg-August-Universität Göttingen
 07/1998 - 06/2004 Assistenz- bzw. Facharzt im Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin, Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Kettler, Georg-August-Universität Göttingen
 21.11.2002 Zusatzbezeichnung Rettungsmedizin, Ärztekammer Niedersachsen
 03.03.2004 Weiterbildungsermächtigung Rettungsmedizin, Ärztekammer Niedersachsen
 11.03.2004 Facharzt für Anästhesiologie, Ärztekammer Niedersachsen

07/2004 – 09/2004 ambulante Anästhesien in der Operationsambulanz an der Sophienklinik, Gemeinschaftspraxis für Anästhesiologie, Marienstr. 57, 30171 Hannover

seit 01.10.2004 Oberarzt in der Zentralen Anästhesie-Abteilung, Kliniken Herzberg und Osterode GmbH, 37412 Herzberg, Chefarzt: Dr. med. J. Passian

Herzberg im Januar 2005