

Aus der Medizinischen Klinik II
(Hämatologie und Onkologie)
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. D. K. Hossfeld

**Der Einfluss verschiedener Faktoren unter
Berücksichtigung der Ausprägung des MDR1-Phänotypes
bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von

Daniel Schröpfer

aus Berlin

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27. April 2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Hegewisch-Becker

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. D. K. Hossfeld

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. B. Fehse

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungen</u>	5
1. <u>Einleitung</u>	
1.1. Allgemeines	6
1.2. Labor	7
1.3. Klassifikation	7
1.4. AML – akute myeloische Leukämie	8
1.5. ALL – akute lymphatische Leukämie	9
1.6. chronische Leukämien	10
1.7. Chemotherapeutika	11
1.7.1. Anthrazykline	11
1.7.2. Alkaloide	13
1.8. Therapien	14
1.9. MDR – Multidrug-Resistenz	14
2. <u>Material und Methoden</u>	
2.1. Material	19
2.2. Methoden	19
2.2.1. Durchflusszytometrischer Nachweis des P-Glykoproteins	10
2.2.2. Daunorubicin-Aufnahme-Assay (funktioneller Assay)	20
2.2.3. Rhodamin 123-Ausfluss-Assay (funktioneller Assay)	21
2.3. Statistik	22
3. <u>Resultate</u>	
3.1. Häufigkeiten	23
3.1.1. Verteilung der Leukämietypen	23
3.1.2. geschlechtsspezifische Verteilung der Leukämiesubtypen	25

3.1.3.	Betrachtungen zur Altersstruktur	26
3.1.4.	Häufigkeitsverteilung bei AML und MDS	27
3.2.	Durchflusszytometrische Betrachtungen	30
3.3.	Betrachtungen zum MDR	31
3.4.	Zytogenetik	35
3.5.	Einfluss des MDR-Phänotypes auf die Therapie und den Verlauf	39
3.5.1.	Betrachtungen zum MDR-Phänotyp und der Therapie	39
3.5.2.	Betrachtungen zum MDR-Phänotyp und dem Verlauf	41
3.6.	Zytogenetik und Alterstruktur	44
3.7.	Auswertung der 10 höchsten D-Werte	47
4.	<u>Diskussion</u>	
4.1.	Ziel der Arbeit	49
4.2.	Kritik	49
4.3.	Ergebnisdiskussion unter Würdigung bisher veröffentlichter Daten	50
4.3.1.	Methodik	50
4.3.2.	Höchste MDR-Phänotypausprägung	52
4.3.3.	Zytogenetik	52
4.3.4.	Variablen	53
4.3.5.	MDR-Phänotypausprägung bei ALL	54
5.	<u>Zusammenfassung</u>	55
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	57
7.	<u>Danksagung</u>	62
8.	<u>Lebenslauf</u>	63
9.	<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	64

Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AraC	Cytarabin
CML	chronische myeloische Leukämie
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CR	komplette Remission
CsA	Cyclosporin A
DNR	Daunorubicin
DXR	Doxorubicin
EPI	Epirubicin
IDA	Idarubicin
MDR1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MDS	myelodysplastisches Syndrom
P-Gp	P-Glykoprotein
PR	partielle Remission
RNA	Ribonukleinsäure
VBL	Vinblastin
VDS	Vindesin
VER	Verapamil
VM-26	Tenoposid
VRLB	Vinorelbin

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Eine akute Leukämie ist definiert als eine Proliferation und Anhäufung maligne entarteter, unreifer hämatopoetischer Zellen im Knochenmark und Blut. Virchow prägte diesen Begriff bereits im 19. Jahrhundert; ihm fiel die „Weissblütigkeit“ – helle Farbe des Blutes – seiner Patienten auf. Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts konnte man die akute myeloische Leukämie (AML) von der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) durch standardisierte Färbeverfahren differenzieren. In den 1960-iger Jahren war die Prognose dieser Erkrankungen oft noch weitgehend infaust – wenige Patienten überlebten länger als einige Monate; in den letzten 20 Jahren stieg die Remissionsrate – abhängig vom Leukämietyp und Art der Therapie – auf 20-60% an[2].

Leukämien bilden eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, stellen aber zahlenmäßig bezogen auf die Gesamtmorbidität nur einen geringen Anteil (2-4/100000/Jahr) dar. Mit zunehmendem Lebensalter steigt das relative Erkrankungsrisiko deutlich an.

Man unterscheidet verschiedene Formen der Leukämie. Abhängig vom klinischen Erscheinungsbild definiert man akute und chronische Verlaufsformen. Die akuten Leukämien werden nach ihrer Herkunft in die akuten myeloischen Leukämien (AML) oder akuten lymphatischen Leukämien (ALL) differenziert. Unter den chronischen Leukämien werden die chronische myeloische Leukämie (CML), die chronische myeloisch-monozytäre Leukämie (CMML) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL) subsummiert.

Prädisponierende Faktoren können unter anderem chemische Substanzen (Benzol, Zytostatika), ionisierende Strahlung, genetische und endemische Faktoren (zum Beispiel Down-Syndrom, Fanconie-Anämie, T-Zell-Leukämie durch HTLV-1-Viren in Japan, Afrika, Karibik) sein. Sekundäre Leukämien gibt es unter anderem auf dem Boden des myelodysplastischen Syndroms (MDS) oder myeloproliferativer Erkrankungen (MPS).

1.2.Labor

Das Blut- und Differentialblutbild, insbesondere der Blutausstrich mit mikroskopischer Differenzierung der Einzellzellen, sind elementare diagnostische Parameter zur Diagnosesicherung einer Leukämie. Oft findet man eine normo- bis makrozytäre Anämie, häufig auch eine Thrombozytopenie. Die Leukozytenkonzentration ist variabel und hängt vom Ausschwemmungsgrad unreifer Blasten aus dem Knochenmark in das periphere Blut ab. Anhand des Blastenanteils kann man aleukämische, subleukämische und leukämische Formen einer akuten Leukämie unterscheiden.

Eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, bedingt durch Anämie und Dysproteinämie (Vermehrung der Alpha₂- und Gammaglobulinfraktion), stellt ein häufiges Laborphänomen dar.

Der „Hiatus leucaemicus“ ist ein charakteristisches Merkmal akuter Leukämien. Hier findet sich ein Nebeneinander von unreifen Blasten und einer segmentkernigen Granulozytenvermehrung im Blutausstrich ohne Linksverschiebung. Eine zum Teil deutlich gesteigerte LDH-Aktivität gilt als prognostisch ungünstiger Faktor der Gesamtrisikoausschätzung.

Erhöhte Harnsäureserumwerte finden sich bei einem verstärkten Leukozytenumsatz und können klinisch als Gichtanfälle oder Nephropathien imponieren.

1.3.Klassifikation

Zur Diagnosestellung einer akuten Leukämie ist in der Regel eine Knochenmarkgewinnung erforderlich. Hiermit gelingt die Differenzierung zu anderen hämatopoetischen Erkrankungen (zum Beispiel dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder malignen Lymphomen), deren Therapie von denen der akuten Leukämie sehr unterschiedlich ist.

Die Diagnose akute Leukämie verlangt ein Blastenanteil von mindestens 30% medullär, nach der WHO-Klassifikation von 1999 reichen bereits 20% aus. Die Differenzierung zwischen akuter myeloischer und akuter lymphatischer Leukämie geschieht konventionell über die zytologische Pappenheim-Färbung. Sogenannte „Auer-Stäbchen“ sind charakteristisch für Blasten der myeloischen Reihe und können, je nach Leukämiesubtyp, bei bis zu 50% der Patienten diagnostiziert werden.

Für die Differenzierung der akuten myeloischen Leukämie stehen verschiedene zytochemische Verfahren zur Verfügung, zum Beispiel die Anfärbung mit Sudanschwarz-B-Reaktion (SSB), Myeloperoxidase (POX) und weitere. Die monozytären akuten Leukämien zeichnen sich durch eine Positivität für unspezifische Esterasen (Alpha-Naphtylacetatesterase=ANE) aus[1].

Akute Leukämien werden neben den beschriebenen morphologischen und zytochemischen auch durch immunologische Merkmale charakterisiert[2]. Hierzu verwendet man monoklonale Antikörper, die sich gegen membranständige oder intrazytoplasmatische Strukturen richten.

Steigende Bedeutung findet die zytogenetische Analyse bei der akuten myeloischen Leukämie. Ein Karyotyp mit Verlust des Chromosomen 5 (-5) bzw. seines kurzen Endes (5q-) ist ein prognostisch ungünstiger Faktor. Gleiches gilt für Veränderungen des Chromosom 7 (-7/7q-), die Aberration 11q23- und komplexe, mehr als 3 Aberrationen umfassende Karyotypen.

Es gibt jedoch auch prognostisch günstige Faktoren, zu denen unter anderem die Translokation t(8;21) bzw. die Translokation t(15;17) oder eine Inversion am Chromosom 16 (inv(16)) zählen. Weiter finden sich typische Aberrationen, die bestimmten Leukämiesubtypen zugeordnet werden können, beispielsweise die Translokation t(9;11) oder Deletion des Chromosomen 11 (del(11)) bei der AML-M5. Typische zytogenetische Aberrationen sind bei der folgenden Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie genannt und jeder Leukämieform zugeordnet.

1.4.AML – akute myeloische Leukämie

Die akuten myeloischen Leukämien werden nach der Klassifikation von Bennett et al und der French-American-British Group (FAB)– seit 1985- international übereinstimmend eingeteilt. Die Diagnostik erfolgt durch eine zytologische Beurteilung der panoptischen Färbung, Standardzytochemie und Beurteilung des Differenzierungsgrades der Blasten im Knochenmark- bzw. Blutaustrich. Eine zytogenetische Untersuchung sowie immunzytochemische Verfahren sind häufig obligat.

Eine Zusammenfassung und Übersicht der FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien findet sich in Tabelle 1 [3].

Tabelle1, nach Bennett et al, 1985, Klassifikation der AML 1 (erweitert, geändert)

FAB-Subtyp	zytologische Klassifikation	Häufigkeit	Morphologie	Zytogenetik
M0	myeloblastär mit minimaler Differenzierung	ca. 2-3%	undifferenzierte Blasten vereinzelt azurophile Granula	keine typische
M1	myeloblastär ohne morphologische Ausreifung	ca. 20%	> 90% undifferenzierte Blasten > 3% Blasten mit azurophilen Granula	t(9;22), 9q-, inv (3)
M2	myeloblastär mit morphologischer Ausreifung	ca. 30%	< 90% undifferenzierte Blasten > 10% Blasten mit azurophilen Granula Auerstäbchen, Nukleolen im Zellkern	t(8;21) = günstig t(6;9), 12p-
M3	akute Promyelozyten-Leukämie	ca. 10%	atypische Promyelozyten mit Auer-Stäbchen	t(15;17), t(11;17), t(17;17)
M4	akute myelomonozytäre Leukämie	ca. 20%	> 30% Blasten, davon <80% Monoblasten	keine typische
M4Eo	M4-eosinophile Variante	ca. 2-3%	siehe M4, atypischer Eosinophilie mit basophilen Granula	inv(16), del(16)
M5a	akute Monoblasten-Leukämie	ca. 3-5%	> 30% Blasten, davon >80% Monoblasten	del(11), t(9;11)
M5b	akute Monoblasten-Leukämie mit monozytärer Differenzierung	ca. 7-10%	> 30% Blasten, ferner Monoblasten, Promonozyten und Monozyten	del(11), t(9;11),
M6	akute Erythroblasten-Leukämie	ca. 3-4%	> 20% Myeloblasten, > 50% atypische Erythrozyten-Progenitorzellen	keine typische
M7	akute Megakaryoblasten-Leukämie	ca. 2-4%	undifferenzierte Blasten, häufig mit "blebs"	keine typische

1.5.ALL – akute lymphatische Leukämie

Die akuten lymphatischen Leukämien (ALL) werden hier nur kurz erwähnt, da in dieser Studie nur wenige Patienten mit dieser Erkrankung eingeschlossen wurden.

Zytomorphologisch ist die ALL eine Ausschlussdiagnose – Granula fehlen in 99% der Fälle. Der Nachweis nur eines Auer-Stäbchens schließt bereits eine ALL aus. Die zytochemische Untersuchung auf POX ist negativ. Man unterteilt die ALL gemäß der immunologischen Oberflächeneigenschaft in eine ALL der B-Zellreihe und der T-Zellreihe.

Bei der B-Zellreihe gibt es verschiedene Untergruppen: Pro-B-(ohne spezifische B-Zellreihen-Marker), Common-(CD10+), Prä-B-(zytoplasmatisches IgM+), und B-ALL(Kappa oder Lambdaleichtkettenexpression im Zytoplasma oder membranständig). Allgemeine Marker der B-Zellreihe sind CD19, CD79a und CD22. Die T-Zellreihe besitzt allgemein eine membran- oder zytoplasmatische Expression von CD3 und wird in die Subgruppen Pro-T-(CD7+), Prä-T-(CD2+ und/oder CD5+ bzw. CD8+), Kortikale-T-(CD1a+) und reife T-ALL (membranständig CD3+, CD1a-) unterteilt.

1.6.Chronische Leukämien

Zu den chronischen Leukämien gehören, auch unter Beachtung der historischen Einteilung, die chronische myeloische Leukämie (CML), die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) sowie die chronische lymphatische Leukämie (CLL). Die chronische myeloische Leukämie (CML) gehört in den Formenkreis der Myeloproliferativen Syndrome (MPS). Zu ihnen zählt neben ihr die Essentielle Thrombozythämie (ET), die Polycythaemia Vera (PV) und die Osteomyelofibrose (OMF). Einen erheblichen Anteil mit 20-30% aller Erwachsenenleukämien bildet die chronische myeloische Leukämie. Ihre häufigste Manifestation liegt zwischen der 4. und 6. Lebensdekade. Der natürliche Verlauf besteht aus einer chronisch-stabilen Phase (Dauer ca. 60 Monate), die über ein unscharf definiertes Zwischenstadium (Akzelerationsphase) in einen terminalen Blastenschub übergeht. Dieser kann myeloisch, lymphozytär oder gemischtzellig sein.

Dem Philadelphia-Chromosom t(9;22) liegt ein Deletion des Chromosom 22 zugrunde. Damit einher geht eine reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 9 und somit die Fusion der Gene bcr und abl. Das Produkt des Fusionsgenes ist eine p210-Tyrosinkinase. Der zytogenetische Nachweis ist beweisend für eine chronische myeloische Leukämie und wird in 95 % der Fälle gefunden.

Typische klinische Befunde sind eine Splenomegalie und Hepatomegalie, bedingt durch extramedulläre Blutbildung. Es finden auch hier die klinischen B-Symptome Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß. Die Diagnose geschieht meist in der chronischen Phase der Erkrankung. Im peripheren Blutbild findet sich eine pathologische Linksverschiebung bis zu den Myeloblasten und eine durch Neutrophile hervorgerufene Leukozytose, Vermehrung der Basophilen und Eosinophilen, ein Anteil von bis zu 15% immaturer granulöser Zellen und eine Verminderung des ALP-Indexes (Alkalische Leukozytenphosphatase).

Historisch gesehen gehört in die Reihe der Leukämien auch die chronische lymphatische Leukämie (CLL). Heute gehört sie zu den Non-Hodgkin-Lymphomen, nach der Kiel-Klassifikation von 1992 zur Untergruppe der niedrigmalignen, lymphozytischen B-Zell-Lymphome. Die CLL ist eine neoplastische Proliferation von kleinen Lymphozyten des höheren Lebensalters. Im Blutaussstrich findet man bis zu 99% Lymphozyten, das Knochenmark ist bei Diagnosestellung häufig bereits diffus infiltriert. Immunphänotypisch sind die Lymphomzellen positiv für die Marker CD5, CD23 und negativ für CD10. Zytogenetische Untersuchungen zeigen gelegentlich eine Trisomie 12 (+12) oder Veränderungen am Chromosom 13 (13q). Klinisch sind persistierende Lymphknotenschwellungen, Anämie und Thrombozytämie auffallend.

1.7. Chemotherapeutika

In der Therapie der akuten Leukämien werden verschiedenen Substanzen in unterschiedlichen Therapieschemata verwendet[3]. Im Folgenden werden die verschiedenen Chemotherapeutika kurz erläutert.

1.7.1. Anthrazykline

Zur Gruppe der Antibiotika werden die Anthrazykline gerechnet, deren Vertreter unter anderem das Daunorubicin (DNR), Doxorubicin (DXR), Epirubicin (EPI) und das Idarubicin (IDA) sind. Ein Beispiel für ein Anthracendion ist Mitoxantron. Weitere Antibiotika mit chemotherapeutischer Potenz sind Aktinomycin-D (auch Daktinomycin genannt), Bleomycin und Mitomycin-C.

Anthrazykline sind Glykosid-Antibiotika, die folgenden Wirkmechanismus aufweisen DNA-Interkalation, Induktion von DNA-Strangbrüchen, Bildung freier Sauerstoffradikale, Hemmung der Topoisomerase II. Sie wirken auf die S-/G2-Zellzyklusphase und werden in der Leber zu 90 % über Aldolasereduktion bzw. Aglykonbildung abgebaut und zu 10% renal eliminiert. Kontraindikationen für den Einsatz von Anthrazyklinen sind kardiale Erkrankungen (Herzinsuffizienz, KHK, Arrhythmien, Herzinfarkt), schwere Leberfunktionsstörungen und akute Infektionen. Dosislimitierend ist vor allem die Myelosuppression des Knochenmarkes (Leuko- und Thrombozytopenie). Paravasate führen zu lokaler Toxizität, da diese Glykopeptid-Antibiotika eine stark nekrotisierende Wirkung besitzen. Häufige Nebenwirkungen sind Nausea, Vomitus, Mukositis, Stomatitis, Infertilität. An der Haut können Exantheme, Urtikaria sowie eine totale Alopezie beobachtet werden. Seltene Nebenwirkungen sind Tubulusschädigungen (renal), Hyperpigmentierungen und Diarrhoen.

Doxorubicin (DXR) ist das hydrierte Daunorubicin (DNR) mit einer terminalen Halbwertszeit von ca. 21-90 Stunden. Im Gegensatz zum DNR verfügt es über eine ca. 70% Plasmaproteinbindung sowie eine hohe Gewebsbindung mit intranukleärer Retention. Doxorubicin (DXR) besitzt neben der Zulassung für die Therapie der AML und ALL auch noch eine für solide Tumoren (zum Beispiel Bronchial-, Mamma-, Ovarial-, Prostata-Karzinome).

Idarubicin ((IDA), 4-Demethoxydaunorubicin), dessen orale Verfügbarkeit liegt im Mittel bei 30% und die terminale Halbwertszeit (triphasisch) beträgt ca. 6-25 Stunden. Idarubicinol, der Metabolit des Idarubicin, hat eine terminale Halbwertszeit von bis zu 60 Stunden, bedingt durch intranukleäre und intrazelluläre Retention bei erhöhter Lipophilität und DNA-Bindung. IDA besitzt neben einer AML/ALL-Therapiezulassung auch eine für die Therapie des Mammakarzinoms und einiger Lymphomentitäten. Sein Nebenwirkungsspektrum ist etwas verschieden zu den anderen Anthrazyklinen. Kardiotoxizität und Alopezie sind geringgradiger ausgeprägt.

Epirubicin (EPI) besitzt eine terminale Halbwertszeit von 15-48 Stunden, wird jedoch in der Therapie der AML nicht eingesetzt.

1.7.2. Alkaloide

Zu der Gruppe der Alkaloide gehören folgende übergeordnete Stoffklassen Podophyllotoxinderivate, Vincaalkaloide, Taxane und Camptothecinderivate. Letztere finden bei der Betrachtung im Zusammenhang mit der Multi-Drug-Resistenz keine Beachtung und werden daher auch nicht näher erläutert.

Etoposid (VP-16) ist der wohl bekannteste Vertreter der Podophyllotoxinderivate. Es ist ein 4'-Desmethylepipodophyllotoxinethylidenglucosid, ein pflanzliches Alkaloid. Ein weiterer Vertreter ist das Teniposid (VM-26). Beide hemmen die Topoisomerase II. Die Folge ist ein Mitosearrest mit konsekutiven DNA-Strangabbrüchen.

Zellzykluspezifität besteht für die Phasen G2 und S. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 50% für VP16, die terminale Halbwertszeit beider Substanzen beträgt ca. 4-15 Stunden. Die Eliminierung des Etoposid findet überwiegend renal statt, während das Teniposid vorwiegend bilären Metabolismen unterliegt. Auch hier ist dosislimitierend die Myelosuppression, die überwiegend als Neutropenie imponiert, sowie schwere Leber- und Nierenschädigungen. Die Nebenwirkungen des Etoposid bestehen unter anderem aus transienten Transaminasenerhöhungen, mäßiggradiger Alopezie, Hypotonie bei intravenöser Applikation, Nausea und Emesis bei oraler Gabe, seltener Neuropathien und ZNS-Störungen.

Teniposid kann gelegentlich ein Lebervenenverschlussyndrom (VOD = "veno-occlusive disease"), Störungen des Nervensystems (periphere Parästhesien) und Hyperpigmentierung hervorrufen.

In die Gruppe der Vincaalkaloide gehören folgende Substanzen: Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vindesin (VDS) und Vinorelbin (VRLB). Diese Substanzen gehören zu den Mitosehemmern. Sie binden sich an das Protein Tubulin und hemmen die Ausbildung einer Mitosespindel in den Zellzyklusphasen G2 bzw. M. Hieraus ergibt sich, wie bei den Podophyllotoxinderivaten, ein Mitosearrest mit konsekutiven DNA-Strangabbrüchen. Weiterhin führen sie über eine Hemmung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen zu einer Absenkung der RNA-Syntheserate. Die initiale Halbwertszeit aller Vincaalkaloide ist kleiner als 5 Minuten, die terminale schwankt je nach Substanz zwischen 20-85 Stunden. Die Metabolisierung findet hepatisch über das Cytochrom-P450 statt. Ein geringer Anteil (10-30%) wird renal eliminiert. Das

Nebenwirkungsspektrum aller Vinkaalkaloide ist entsprechend ihrer gemeinsamen Gruppenzugehörigkeit ähnlich. Alle führen zu einer Myelosuppression, kardiovaskulären Störungen, Nausea, Vomitus, Obstipation, Diarrhoe, Erythemen, Exanthenen, lokaler Toxizität in Form von Nekrosen bei paravasaler Injektion, Neurotoxizität unterschiedlicher Ausprägung, Pulmotoxizität mit akut intestitieller Pneumonitis, Bronchospasmus bei gleichzeitiger Verabreichung von Mitomycin C, außer Vinorelbin, und Muskelkrämpfen bzw. Muskelschmerzen im Bereich des Unterkiefers, Hals, Rücken und der Extremitäten. Typische Nebenwirkungen des Vinblastins (VBL) sind die dosislimitierende Myelosuppression (Neutropenie), Fotosensibilität und eine mäßiggradige Neurotoxizität. Vincristin (VCR) ist weniger myelotoxisch, kann aber zu einer Polyurie durch verminderte ADH-Sekretion führen. Es ist dosislimitierend neurotoxisch, wie auch Vindesin (aber nicht in dem Umfang), und kann zu peripheren Neuropathien, autonomer Neurotoxizität mit Hirnnervenausfällen und ZNS-Störungen, zum Beispiel Hypästhesien mit teilweiser Areflexie führen. Es besteht eine gesteigerte Ileusgefahr bei der gleichzeitigen Gabe von Opiaten. Vinorelbin (VRLB) führt seltener zur peripher-neurologischen Veränderungen und ist ebenfalls dosislimitierend myelosuppressiv (Neutropenie).

1.8. Therapien

Die Patienten erhielten am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Medizinischen Klinik II, Hämatologie – Onkologie, folgende Therapien: IVA (Cytarabin, Idarubicin, Etoposid), FLAG-IDA (Fludarabin, Idarubicin, Cytarabin) und DAV (Daunorubicin, VP 16, Cytarabin). Diese enthalten Chemotherapeutika, die zuvor genannt wurden und für die Betrachtung der Multidrug-Resistenz von Bedeutung waren.

Auf eine ausführliche Beschreibung dieser und weiterer optionaler Therapieschemata wurde verzichtet, da keine Untersuchung bezüglich der applizierten Menge eines Chemotherapeutikums Bestandteil der Arbeit waren.

1.9. Multidrug-Resistenz (MDR)

Es gibt verschiedene Resistenzmöglichkeiten. Auf zellulärer Ebene betrifft dies: (1) die transportvermittelte Resistenz, (2) die metabolische Resistenz, (3) die Target-

Resistenz , (4) Veränderungen des DNA-Reparaturmechanismus und (5) Störungen der Apoptose[4].

Daneben gibt es weitere Resistenzmechanismen, so z.B. Alterationen von Target-, Entgiftungs- und Reparaturenzymen. Für Methotrexat konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Dihydrofolat-Reduktase-Spiegel (Targetenzym) einer Resistenzentwicklung Vorschub leisten kann. Die Aldehyd-Dehydrogenase ist für eine Resistenzvermittlung gegenüber Cyclophosphamid verantwortlich. Ein anderer, weiterer Mechanismus findet sich auf der pharmakologischen Seite durch veränderte Substanzdosen und ihre Metabolisierung.

In dieser Arbeit geht es speziell um Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber antineoplastisch wirkenden Substanzen (Chemotherapeutika) bei der akuten myeloischen Leukämien (AML).

Das Multidrug-Resistenz-Phänomen bezeichnet eine Resistenz gegenüber mehreren, chemisch nicht identischen Substanzklassen. Hierzu zählen klassischer Weise die zuvor bereits ausführlich erläuterten Chemotherapeutika: Anthrazykline, Epipodophyllotoxine, Taxane und Vinkaalkaloide sowie die weiteren Substanzen Amsacrin, Aktinomycin-D und Colchicin. Es findet sich eine Kreuzresistenz, deren einziges gemeinsames Merkmal die Lipophilität ist.

Bereits 1968 wurden wesentliche Merkmale der MDR von Kessel et. al. beschrieben[5].

Das Multidrug-Resistenz-1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 7 zu finden[6,7]. Die Beteiligung des c-Ha-ras-1-Onkogen und des p53 – Tumorsuppressorgens als Transkriptionsfaktoren der Gruppe der C/EBP für die Regulation und Expression des MDR-Genproduktes scheint gesichert[8,9]. Das P-Gp (P-Glykoprotein) stellt das Produkt des MDR1-Genes dar und ist ein 170 kD großes, membranständiges Transportprotein, das der ATP-Binding-Cassette-(ABC-) Superfamilie zugeordnet wird[10]. Daneben gibt es weitere Charakterisierungsmöglichkeiten. Hierzu gehört die Gruppeneinteilung anhand des vorhandenen Pumpmechanismus. Neben der oben erwähnten Gruppe der (1) ATP-binding-Cassette-(ABC-)Superfamilie gibt es noch die (2) Major Facilitator (MF)-Superfamilie, der (3) Small Multidrug Resistance (SMR)-Familie und (4) die Familie der Resistance/Nodulation/Cell Division (RND)[11]. Lediglich die ABC-

Superfamilie arbeitet mit einem ATP getriebenen Pumpmechanismus, via Adenosintriphosphat-Hydrolyse, während sonst ein Protonen-Drive genutzt wird. Die SMR- und RND-Familien finden sich nur in Prokaryonten, während die ABC- und MF-Superfamilien sowohl in Eukaryonten als auch Prokaryonten vorkommen. Das P-Gp besteht aus 1280 Aminosäuren, die sich in fast 2 identische Hälften aufteilen. Insgesamt finden sich in jeder Hälfte sechs hydrophobe, die Membran überspannende Domänen und eine hydrophile, ATP-bindende Region, die zytoplasmatisch gelegen ist. Die Pumpfunktion wird durch die Regulation einer eigenständigen ATP-Hydrolyse gewährleistet.

Ein Modell des P-Gp (P-Glykoproteins) findet sich in der Abbildung 1.

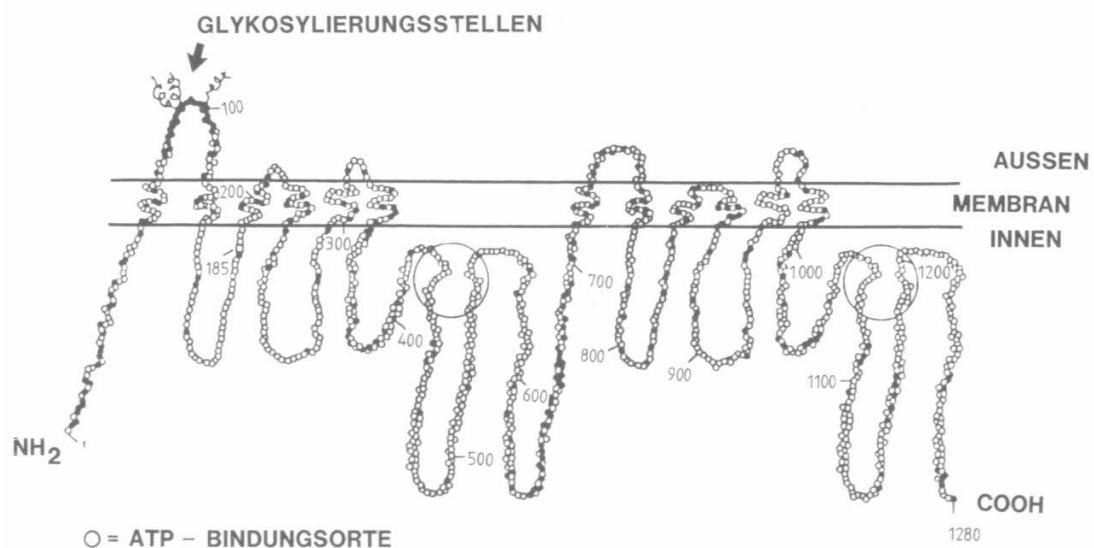


Abbildung 1: P-Gp Modell

Der Mensch besitzt nur zwei MDR-Gene, das MDR1-Gen und das MDR2-3-Gen, während bei Mäusen, Hamstern und anderen Spezies die Genfamilie 3 Gene umfasst. Das MDR2-3, von einigen Autoren auch als MDR2-Gen bezeichnet, dessen Amplifikation vom MDR1 abhängig scheint[12], besitzt jedoch untergeordnete Bedeutung.

Transportproteine spielen in der Vermittlung der Multidrug-Resistenz eine wesentliche Rolle. Hierzu gehören unter anderem das Breast-Cancer-Resistance-Protein (BRCP)[13,14,15], das Lung-Resistance-Protein (LRP)[16,17,18], das

humane zystische Fibrose-Gen (CFTR) und das Multidrug-Resistance-associated Protein (MRP)[17,19]. Durch die Entschlüsselung dieser verschiedenen und weiteren Transportproteine wird die Multi-Drug-Resistenz heute als multifaktorielles Geschehen betrachtet und nicht mehr alleine der Überexpression des MDR1-Genproduktes, dem Permeabilitäts-Glykoprotein (P-Gp), zugeschrieben. Eine hohe Expression von MDR1-Gen findet sich beispielsweise in der Nebennierenrinde, der Leber (Gallengänge), den Endothelzellen des Gehirns und Hodens, auf Makrophagen, im Kolon und anderen Geweben. Eine mittlere Expressionsrate konnte unter anderem im Nebennierenmark, in der Trachea, Prostata, den CD34+ Progenitorzellen sowie Lymphozyten (CD4+, CD8+, CD56+) festgestellt werden. In Haut, Skelettmuskulatur, Herz und Ovarien findet sich eine niedrige bis keine Expression des MDR1-Gens[20].

Die Hochregulierung des MDR1-Genes führt zu einer verminderten intrazellulären Akkumulation der bereits genannten Chemotherapeutika. Eine Ausnahme bilden die Vinkaalkaloide. Somit finden sich bei der klassischen Multidrug-Resistenz von Beginn an geringere Wirkspiegel intrazellulär. Andere Resistenzmechanismen basieren meist auf einer Alteration der Metabolisierung spezifischer Substanzen in der Zelle.

Die physiologischen Substrate des P-Gp sind unter anderem Xenobiotika, Bilirubin, Peptide und Steroidhormone. Eine erhöhte Expression wurde auch nach Vergiftungen mit Arsen oder Tetrakohlenstoff gefunden.

Das gesteigerte Interesse für den MDR-Phänotyp erklärt sich in der Möglichkeit der kompetitiven Hemmbarkeit des P-Gp durch nichtzytotoxische Substanzen, zu denen unter anderem Kalziumkanalblocker, Steroide, Immunsuppressiva und andere gehören.

Es folgt ein Überblick über mögliche Resistenzmodulatoren (gekürzt[4]):

Resistenzmodulatoren :

<u>Substanzklasse</u>	<u>Beispiel</u>
Kalziumkanalblocker	Verapamil Diltiazem Nifedepin
Steroide	Progesteron
Antiöstrogene	Tamoxifen

Substanzklasse

Beispiel

Antibiotika

Erythromycin

Immunsuppressiva

Cyclosporin A

FK 506

Calmodulin-Inhibitoren

Fluphenazin

Verschiedene Substanzklassen

Chinin

Amiodaron

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die Arbeit konnte auf 151 Proben des peripheren Blutes und des Knochenmarks von insgesamt 134 Patienten, die während der routinemäßigen Diagnostik allfällig waren, zurückgreifen. Für diese Studie sind keine Extra-Proben (Knochenmarkspunktion, Blutentnahme) gewonnen worden. Der Entnahmezeitraum erstreckte sich über 6,25 Jahre (03.11.1993 bis 03.02.2000); das Ende der Einschlusszeit war der 30.04.2002.

2.2. Methoden

Es wurde eine retrospektive Analyse durchgeführt. Die Fragestellung einer möglichen Korrelation zwischen dem Nachweis des MDR1-Phänotypes und dem Ansprechen auf bestimmte Chemotherapien sollte geklärt werden.

Für die Auswertung wurde die Durchflusszytometrie als Methode der Wahl zum Nachweis des P-Gp gewählt. Sie wurde von medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten im Pavillon 29 des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Die Daten lagen zur Auswertung vor.

2.2.1. Durchflusszytometrischer Nachweis des P-Glykoproteins

Die Zellen wurden zunächst für 30 Minuten bei 4 °C mit dem primären Antikörper UIC2 und in der Konzentration von 1,6 und 39 Mikrogramm pro 1×10^6 Zellen inkubiert, dann zweimal in PBS gewaschen und anschliessend für erneute 30 Minuten mit dem sekundären, FITC-markierten Antikörper erneut inkubiert, der zuvor 1:40 in PBS verdünnt wurde. Die Zellen wurden abermals zweimal gewaschen und anschliessend durchflusszytometrisch gemessen.

Dieses Assay wurde an einer Kontrollprobe in gleichen Schritten wiederholt, wobei der primäre Antikörper durch einen unspezifischen, dem Immunglobulinisotyp entsprechenden Kontrollantikörper, ersetzt wurde.

2.2.2. Daunorubicin-Aufnahme-Assay (Funktioneller Assay)

Daunorubicin ist eine rot fluoreszierende Substanz, deren intrazelluläre Akkumulation durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann, ein direktes Substrat der P-Gp-Pumpe darstellt und somit für einen funktionellen Test herangezogen werden kann. Von Vorteil ist bei dieser Nachweismethode die quantitative Bestimmungsmöglichkeit der Resistenz der Anthrazykline im Gegensatz zur Immunzytochemie. Der Nachteil der durchflusszytometrischen Bestimmung besteht darin, dass ein Nachweis der alleinigen Aktivität des P-Gp nicht möglich ist, da möglicherweise weitere bzw. andere Transportproteine, zum Beispiel das MRP (MDR-associated Protein) erfasst werden können. Es empfiehlt sich daher noch die Bestimmung mittels einer zweiten Methode zum Nachweis der MDR1-Genexpression.

Daunorubicin und Doxorubicin sind geeignete Nachweissubstanzen für die Aktivität des P-Gp-Proteins, da diese nicht nur fluoreszierend, sondern auch in der Leukämiebehandlung bekannt sind und eingesetzt werden. Damit erhofft man sich direkte Aussagen über die Zytotoxizität.

Als Maß der Aktivität der Pumpe wird die Zunahme der mittleren Fluoreszenz in Prozent in Gegenwart des Modulators im Vergleich zur mittleren Fluoreszenz in der Probe ohne Zugabe des Modulators herangezogen. Die prozentuelle Zugabe der Daunorubicin-Akkumulation in Gegenwart des Resistenzmodulators wurde ermittelt durch den Vergleich zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität des intrazellulär akkumulierten Daunorubicins in Gegenwart oder Abwesenheit des Modulators nach folgender Formel:

$$\frac{100 \times (\text{MFI DNR-Akk}(+\text{Mod})) - (\text{MFI DNR-Akk}(-\text{Mod}))}{(\text{MFI DNR} - \text{Akk}(-\text{Mod}))}$$

MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

Mod = Modulator

DNR-Akk = intrazelluläre DNR-Akkumulation

Die Wahl der prozentuellen Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität in Gegenwart des Modulators als Messparameter zur Beurteilung des Vorliegens des

MDR-Phänotypes anstelle des Absolutwertes der mittleren Fluoreszenz nach Inkubation mit Daunorubicin erklärt sich aus der Herkunft der zu untersuchenden Proben. Da alle Proben aus leukämischen Zellen bestanden, die erwartungsgemäss je nach Art der Leukämieblasten unterschiedliche Größe aufweisen, wäre ein Vergleich des Absolutwertes nicht möglich gewesen, ohne gleichzeitig eine Abgleichung für die Blastengröße vorzunehmen.

2.2.3. Rhodamin 123-Ausfluß-Assay (Funktioneller Assay)

Rhodamin 123 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der sich hervorragend zur Darstellung von Mitochondrien in lebenden Zellen eignet. Es konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass Rhodamin 123 eine ausgeprägte Färbung von Mitochondrien in sensitiven Zellen bewirkt, jedoch resistente Zellen nicht anfärbt. Dies wird durch eine stark reduzierte Akkumulation des Farbstoffes im Zytoplasma der resistenten Zellen verursacht. Durch den Einsatz von typischen Resistenzmodulatoren konnte eine den sensitiven Zellen vergleichbare Anfärbung wieder hergestellt werden. Die Aktivität des Resistenzmodulators bewies, dass die mangelnde Einfärbung resistenter Zellen nicht auf eine verminderte intrazelluläre Akkumulation, sondern auf einen erhöhten Ausfluss aus der Zelle zurückzuführen ist. Der Vorteil von Rhodamin 123 im Vergleich zu Daunorubicin liegt unter anderem darin begründet:

1. Der Farbstoff wird deutlich schneller aus der Zelle gepumpt, da er im Gegensatz zu Daunorubicin nicht nukleär oder in intrazellulären Vesikeln gebunden wird. Daraus folgt, dass auch im niedrigen Resistenzbereich Unterschiede zuverlässig nachweisbar sind.
2. Bei Doppelmarkierungsstudien grenzt sich das grün fluoreszierende Rhodamin 123 sehr gut von dem mit roter Fluoreszenz des Antikörpers ab, während es beim Daunorubicin zu erheblichen Überschneidungen kommt.

Durchführung:

Nach erfolgter Zellseparation über Ficoll-Gradienten erfolgte die Resuspension der Zellen in PBS oder in RPMI-1640 + 10% FCS (1×10^5 bis 1×10^6 /ml Zellen) unter Zugabe von 60 bis 100 ng/ml Rhodamin 123. Die Aufnahme des Rhodamin 123 wurde über 20 Minuten bei 38°C durchgeführt, und anschliessend

wurden die Zellen zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, in frischem RPMI-1640-Medium + 10% FCS resuspendiert und für 3 Stunden bei 37°C in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil (10 µM) inkubiert, um den Farbstoffausfluss zu ermöglichen. Die Aktivität der P-Gp-Pumpe wurde durch Überführung der Proben auf Eis gestoppt. Danach wurde sofort der verbliebene intrazelluläre Rhodamin-123-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt oder es erfolgte eine zusätzliche Markierung mit Oberflächenmarkern, um in diversen Zellpopulationen die Aktivität der Pumpe zu bestimmen.

Vergleichende Untersuchungen in unserem Labor von Zelllinien und Patientenproben zeigten, dass die Rhodamin 123-Aufnahme bei 4°C oder Raumtemperatur erfolgen kann, wenn es sich um hochresistente Zelllinien handelt. Hier kann auch der Rhodamin 123-Ausfluss in PBS durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind jedoch wesentlich zuverlässiger, wenn Rhodamin 123-Aufnahme und -Extrusion bei 37°C durchgeführt und als Kulturmedium RPMI 1640 + 10% FCS verwendet wird [39].

2.3. Statistik

Für die Probenanalyse wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen, ein statistisches Programm, welches eine Beurteilung der geringen Antigenität eines Antikörpers und den daraus resultierenden schwach positiven Signalen erlaubt. Es ist automatisch in der FAC-Scan-Software integriert und quantifiziert kleine Differenzen zwischen 2 Histogrammen über den D-Wert (Degree of Difference), d.h. es erfasst nicht nur die Positivität, die über die höchste Positivität der Kontrolle herausgeht, sondern die Fluoreszenzzunahme jeder einzelnen Zelle.

Die weitere statistische Auswertung der bereits vorliegenden Proben erfolgte mittels des Statistikprogrammes „spss“. Es wurden verschiedene Analysen durchgeführt, unter anderem Vierfeldertafel, Chi-Quadrat-Test, lineare Korrelationskoeffizient (r^2) und Fisher`s Exact-Test.

3. Resultate

In die Auswertung wurden 120 von insgesamt 153 Proben eingeschlossen.

33 Fälle waren nicht vollständig reproduzierbar bzw. liessen sich im Verlauf nicht darstellen. Die “drop out rate” betrug somit 21,5%.

Schwierigkeiten bei der Datenerhebung ergaben sich aus der Schließung einiger Arztpraxen oder die nachbehandelnden Ärzte waren umgezogen bzw. Nachfolger führten die Praxis weiter, denen keine Unterlagen früherer Patienten vorlagen. Leider waren auch die Antworten auf die versendeten Fragebögen zum Patientenverlauf teilweise unvollständig, so dass weitere Fälle ausgeschlossen werden mussten.

Die überwiegende Anzahl der Fälle ließ sich in den verschiedenen Archiven des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf recherchieren. Auch hier mussten einige Fälle ausgeschlossen werden, da durch diverse Archivumzüge und verschiedene Standorte ein Teil der Akten nicht mehr auffindbar war.

Nicht unerheblich für die schwierige Auswertung war auch die bewusst sehr lang gewählte Einschlusszeit.

3.1. Häufigkeiten

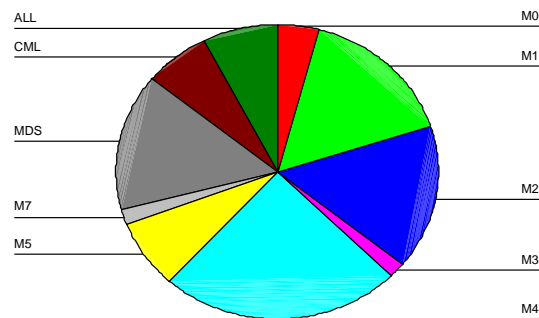
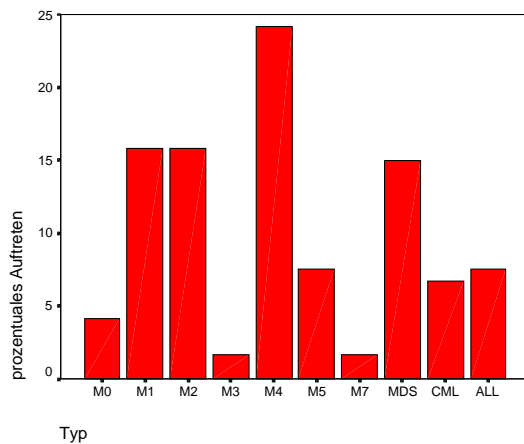
3.1.1. Verteilung der Leukämiesubtypen

Von den 120 Fällen (100%) konnten 103 der Gruppe der akuten myeloischen Leukämien (AML, 70,8%) und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS, 15%), 9 der Gruppe der akuten lymphatischen Leukämien (ALL, 7,5%) und 8 der chronischen myeloischen Leukämie (CML, 6,7%) zugeordnet werden. Dies geschah aufgrund morphologischer Begutachtung des Differentialblutbildes bzw. des durch Knochenmarkaspiration gewonnenen Materials. Die häufigste Leukämieform stellte die AML-M4 mit 24,2% (29 Patienten) dar. Mit je 19 Patienten (15,8%) waren die Subgruppen AML-M1 und AML-M2, mit je 18 Patienten (15,0%) die Gruppe des myelodysplastischen Syndroms vertreten. Alle weiteren Werte können der folgenden Tabelle 2 und ihre Verteilung den beiden Grafiken (Abbildungen 3 und 4) entnommen werden.

Tabelle 2: Subtypenverteilung der Leukämien

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	M0	5	4,2	4,2	4,2
	M1	19	15,8	15,8	20,0
	M2	19	15,8	15,8	35,8
	M3	2	1,7	1,7	37,5
	M4	29	24,2	24,2	61,7
	M5	9	7,5	7,5	69,2
	M7	2	1,7	1,7	70,8
	MDS	18	15,0	15,0	85,8
	CML	8	6,7	6,7	92,5
	ALL	9	7,5	7,5	100,0
	Gesamt	120	100,0	100,0	

Abbildungen 3 und 4: Subtypendarstellung der Leukämien



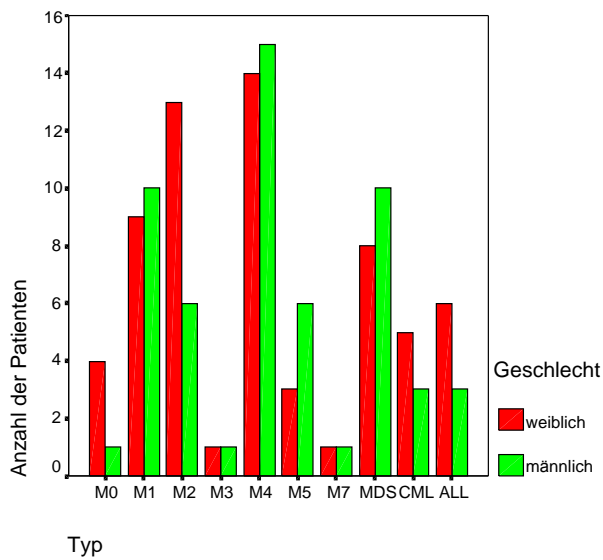
3.1.2. Geschlechtsspezifische Verteilung der Leukämiesubtypen

Von 120 Patienten waren 64 Frauen (53,3%) und 56 Männer (46,7%); es lag somit fast Gleichverteilung vor. Interessant war, dass Frauen überdurchschnittlich häufiger in der Gruppe der akuten myeloischen Leukämie, Subtyp M2 (13 Fälle), Männer eher im Subtyp M1 (10 Fälle) vertreten waren. In der Literatur gibt es bisher keine Daten, die eine geschlechtsspezifische Verteilung bei Leukämiesubtypen erkennen lässt. Die genaue Aufstellung ist in der folgenden Tabelle 3 und Grafik (Abbildung 5) dargestellt.

Tabelle 3: geschlechtsspezifische Verteilung der Leukämiesubtypen

			Geschlecht		Gesamt
			w	m	
Typ	M0	Anzahl	4	1	5
		% von Typ	80,0%	20,0%	100,0%
	M1	Anzahl	9	10	19
		% von Typ	47,4%	52,6%	100,0%
	M2	Anzahl	13	6	19
		% von Typ	68,4%	31,6%	100,0%
	M3	Anzahl	1	1	2
		% von Typ	50,0%	50,0%	100,0%
	M4	Anzahl	14	15	29
		% von Typ	48,3%	51,7%	100,0%
	M5	Anzahl	3	6	9
		% von Typ	33,3%	66,7%	100,0%
	M7	Anzahl	1	1	2
		% von Typ	50,0%	50,0%	100,0%
	MDS	Anzahl	8	10	18
		% von Typ	44,4%	55,6%	100,0%
	CML	Anzahl	5	3	8
		% von Typ	62,5%	37,5%	100,0%
	ALL	Anzahl	6	3	9
		% von Typ	66,7%	33,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	64	56	120
		% von Typ	53,3%	46,7%	100,0%

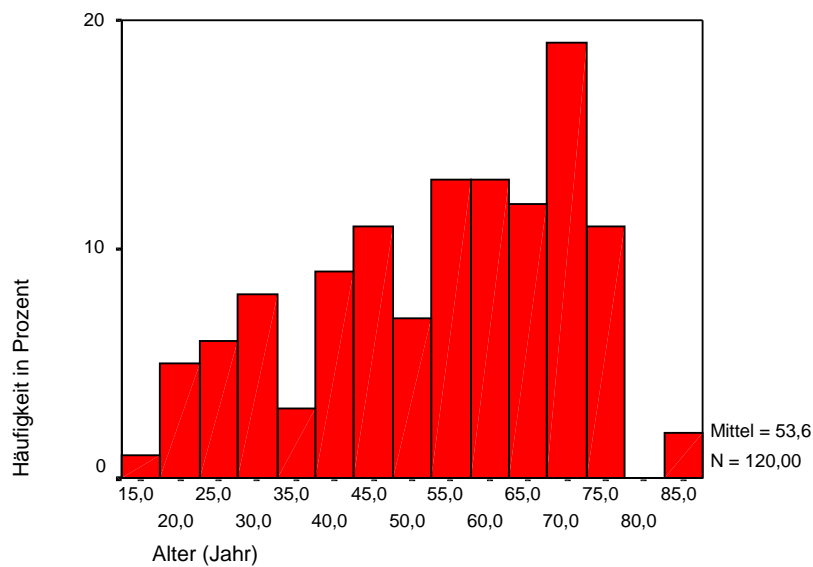
Abbildung 5: geschlechtsspezifische Darstellung der Leukämiesubtypen



3.1.3. Betrachtungen zur Altersstruktur

Die Betrachtung des Alters ergab eine Altersspanne vom 17. bis 87. Lebensjahr, der Median lag bei 56, der Mittelwert bei 54 Jahren (Abbildung 6).

Abbildung 6: Altersverteilung im Patientenkollektiv



Im Folgenden wurden verschiedene Altersgruppen für die genauere Betrachtung untersucht. Es erwies sich die folgende Einteilung, unter Berücksichtigung der Vergleichsmöglichkeit mit der Literatur und der steigenden Inzidenz mit höheren Lebensalter, als zweckmäßig 17.-40. Lebensjahr, 41.-60. Lebensjahr, 61.-70. Lebensjahr und ab dem 71. Lebensjahr. Die Gruppe der 41-60 Jährigen war mit über 37% aller Erkrankungen am häufigsten vertreten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Leukämiesubgruppe und Altersverteilung

			Altersgruppen (Jahre)				Gesamt
			17-40	41-60	61-70	> 71	
Typ	M0	Anzahl	1		3	1	5
		% von Altersgruppe	3,8%		12,0%	4,2%	4,2%
	M1	Anzahl		10	4	5	19
		% von Altersgruppe		22,2%	16,0%	20,8%	15,8%
	M2	Anzahl	6	7		6	19
		% von Altersgruppe	23,1%	15,6%		25,0%	15,8%
	M3	Anzahl	2				2
		% von Altersgruppe	7,7%				1,7%
	M4	Anzahl	7	11	5	6	29
		% von Altersgruppe	26,9%	24,4%	20,0%	25,0%	24,2%
	M5	Anzahl	4	3		2	9
		% von Altersgruppe	15,4%	6,7%		8,3%	7,5%
	M7	Anzahl		1		1	2
		% von Altersgruppe		2,2%		4,2%	1,7%
	MDS	Anzahl	1	8	8	1	18
		% von Altersgruppe	3,8%	17,8%	32,0%	4,2%	15,0%
	CML	Anzahl	1	4	3		8
		% von Altersgruppe	3,8%	8,9%	12,0%		6,7%
	ALL	Anzahl	4	1	2	2	9
		% von Altersgruppe	15,4%	2,2%	8,0%	8,3%	7,5%
Gesamt		Anzahl	26	45	25	24	120
		% von Altersgruppe	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

3.1.4. Häufigkeitsverteilung bei AML und MDS

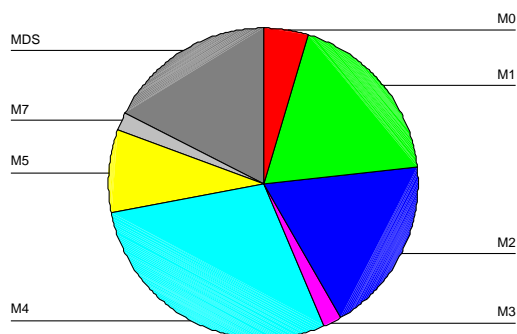
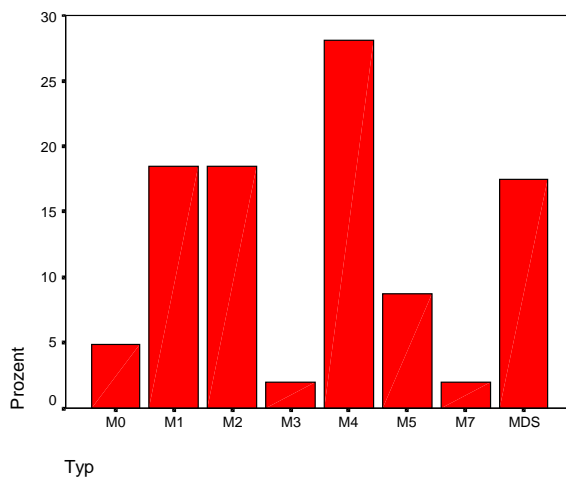
In einer nächsten Betrachtung wurden die Patienten mit CML und ALL ausgeschlossen, da bei ihnen, wie bereits aus der Literatur bekannt, der Einfluss des MDR1-Proteins auf die Erkrankungsprognose gering ist.

So wurden insgesamt 103 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) betrachtet. Die Patienten mit MDS konnten mit eingeschlossen werden, da es sich um die Subtypen RAEB und RAEB-T handelte. Am häufigsten waren die AML-M4 (29 Patienten) sowie die AML-M1 und AML-M2 (mit je 19 Patienten) vertreten. Das MDS war mit 18 Patienten ebenfalls sehr häufig (Tabelle 5, Abbildung 7 und 8).

Tabelle 5: Subgruppenverteilung bei AML und MDS

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	M0	5	4,9	4,9	4,9
	M1	19	18,4	18,4	23,3
	M2	19	18,4	18,4	41,7
	M3	2	1,9	1,9	43,7
	M4	29	28,2	28,2	71,8
	M5	9	8,7	8,7	80,6
	M7	2	1,9	1,9	82,5
	MDS	18	17,5	17,5	100,0
	Gesamt	103	100,0	100,0	

Abbildung 7 und 8: Subgruppendarstellung bei AML und MDS



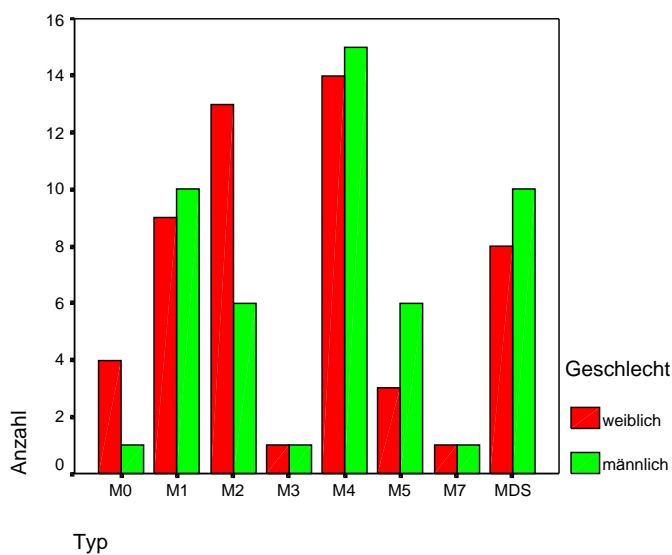
Die Verteilung nach dem Geschlecht ist im Folgenden untersucht worden. Trotz des Ausschlusses der CML- und ALL-Fälle findet sich weiterhin eine (fast) Gleichverteilung der Geschlechter (weiblich 51,5% und 48,5% männlich). Eine

überdurchschnittliche Häufung liegt im Vorkommen der AML-M4 im Vergleich zu allen anderen Subtypen, bei dem weiblichen Geschlecht findet sie sich in 26,4% und dem männlichen Geschlecht in 30% aller Fälle. Folgende Tabelle 6 und Grafik (Abbildung 9) geben genauen Aufschluss darüber.

Tabelle 6: Geschlechtsverteilung bei AML und MDS

			Geschlecht		Gesamt
			w	m	
Typ	M0	Anzahl	4	1	5
		% von Typ	80,0%	20,0%	100,0%
	M1	Anzahl	9	10	19
		% von Typ	47,4%	52,6%	100,0%
	M2	Anzahl	13	6	19
		% von Typ	68,4%	31,6%	100,0%
	M3	Anzahl	1	1	2
		% von Typ	50,0%	50,0%	100,0%
	M4	Anzahl	14	15	29
		% von Typ	48,3%	51,7%	100,0%
	M5	Anzahl	3	6	9
		% von Typ	33,3%	66,7%	100,0%
	M7	Anzahl	1	1	2
		% von Typ	50,0%	50,0%	100,0%
	MDS	Anzahl	8	10	18
		% von Typ	44,4%	55,6%	100,0%
Gesamt		Anzahl	53	50	103
		% von Typ	51,5%	48,5%	100,0%

Abbildung 9: Geschlechtsverteilung bei AML und MDS



3.2. Durchflusszytometrische Betrachtungen

Es wurden alle Proben, einschließlich CML und ALL, auf eine Aktivität des P-Glykoproteins mittels Rhodamin 123-Fluoreszenz unter Einfluss der Resistenzmodulatoren Verapamil und Cyclosporin A untersucht. Es standen 106 Proben mit CD34 positiven Blasten zur Verfügung. Des Weiteren konnte auf insgesamt 35 Proben mit sowohl CD34 als auch CD33 positiven Oberflächenmarkern, die in der myeloischen Zellreihe (unter anderem Mono-, Myeloblast, Promyelozyt bis Neutrophiler) zu finden sind, zurückgegriffen werden. Zu Kontrollzwecken diente die durchflusszytometrische Bestimmung der CD8 positiven Zellen. Eine Beeinträchtigung der Messwerte ergibt sich daraus, dass das gesamte Blut untersucht wurde, in dem sich neben Blasten auch gesunde Zellen mit den Oberflächenmarkern befanden.

Es wurde mittels statistischer Auswertung nach einer möglichen Korrelation zwischen dem Grad der Ausprägung des MDR1-Proteins (D-Wert; Aktivität des P-Gp) und den beiden unterschiedlichen Resistenzmodulatoren Verapamil und Cyclosporin A gesucht. Betrachtet man alle Proben, einschließlich ALL und CML, so scheint die Modulation der P-Gp unabhängig von einer Modulation durch Verapamil (0,397) oder Cyclosporin A (0,488) zu sein (Tabelle 7).

Bereinigt man die Daten, ohne ALL und CML, so kann gezeigt werden, dass die Verwendung des Cyclosporin A (0,612) einen geeigneteren Resistenzmodulator als Verapamil (0,365) zur Detektierung der P-Gp-Funktion darstellt (Tabelle 8). Diese Korrelationen ist signifikant (p 0,01).

Tabelle 7: Korrelation (alle Proben):

			MDR1	VER-CD 33 Durchfluß %	VER-CD 34 Durchfluß %	CSA-CD 33 Durchfluß %	CSA-CD 34 Durchfluß %
Spearman-Rho	MDR1	Korrelationskoeffizient	1,000	,312**	,397**	,335	,488**
		Sig. (2-seitig)	,	,002	,000	,082	,005
		N	103	93	100	28	32
VER-CD 33	Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,312**	1,000	,713**	,797**	,489**
		Sig. (2-seitig)	,002	,	,000	,000	,008
		N	93	108	96	35	28
VER-CD 34	Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,397**	,713**	1,000	,378*	,937**
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,	,047	,000
		N	100	96	106	28	33
CSA-CD 33	Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,335	,797**	,378*	1,000	,420*
		Sig. (2-seitig)	,082	,000	,047	,	,026
		N	28	35	28	35	28
CSA-CD 34	Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,488**	,489**	,937**	,420*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,005	,008	,000	,026	,
		N	32	28	33	28	33

** - Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

* - Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (2-seitig).

Tabelle 8: Korrelation: AML und MDS

	MDR1	VER-CD 33 Durchfluß %	VER-CD 34 Durchfluß %	CSA-CD 33 Durchfluß %	CSA-CD 34 Durchfluß %	
Spearman-Rho MDR1	Korrelationskoeffizient	1,000	,361**	,365**	,321	,612*
	Sig. (2-seitig)	,	,001	,001	,118	,001
	N	87	83	85	25	26
VER-CD 33 Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,361**	1,000	,733**	,735**	,434*
	Sig. (2-seitig)	,001	,	,000	,000	,030
	N	83	98	86	32	25
VER-CD 34 Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,365**	,733**	1,000	,297	,989**
	Sig. (2-seitig)	,001	,000	,	,150	,000
	N	85	86	90	25	27
CSA-CD 33 Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,321	,735**	,297	1,000	,342
	Sig. (2-seitig)	,118	,000	,150	,	,095
	N	25	32	25	32	25
CSA-CD 34 Durchfluß %	Korrelationskoeffizient	,612**	,434*	,989**	,342	1,000
	Sig. (2-seitig)	,001	,030	,000	,095	,
	N	26	25	27	25	27

** . Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

* . Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (2-seitig).

3.3. Betrachtungen zum MDR

In die Betrachtung wurden alle Patienten bezüglich des Grades der Expression ihres P-Gp einbezogen. 103 Proben (85%) konnten ausgewertet werden.

In der Literatur finden sich keine einheitlichen Aussagen über eine mögliche Höhe des D-Wertes (Aktivität des P-Gp), der für eine schlechtere Prognose spricht bzw. ab wann der Status „MDR1 positiv“ gerechtfertigt ist. Es wurde daher in Anlehnung an andere Studien ein D-Wert, dessen Berechnung über den Kolgomorov-Smirnov-Test durchgeführt wurde, von größer 0,15 als prognostisch ungünstig, gleichbedeutend mit MDR1 positiv, gewertet und die Unterteilung zwecks Auswertung der Daten in 2 (0,149<D-Wert>0,15) bzw. 4 Gruppen (D-Wert bis 0,04, zwischen 0,05-0,14 bzw. 0,15-0,25 und größer 0,26) gewählt.

Bei der Unterteilung in 2 Gruppen finden sich 58 Patienten (56,3%) in der Gruppe mit einem D-Wert unter 0,15 sowie 45 (43,7%) in der Gruppe mit einem D-Wert größer 0,15. Interessant ist, dass die AML-M1 mehr als ein Fünftel (22,2%) aller MDR positiven Werte ausmacht.

In der Tabelle 9 und dem folgenden Balkendiagramm (Abbildung 10) sind die Ergebnisse dargestellt. Erwartungsgemäß bestätigten sich die bereits in der Literatur postulierten Ergebnisse bezüglich des Nachweises der Expression des MDR1-Proteins bei der akuten lymphatischen Leukämie und der CML. Hier ist es regelhaft

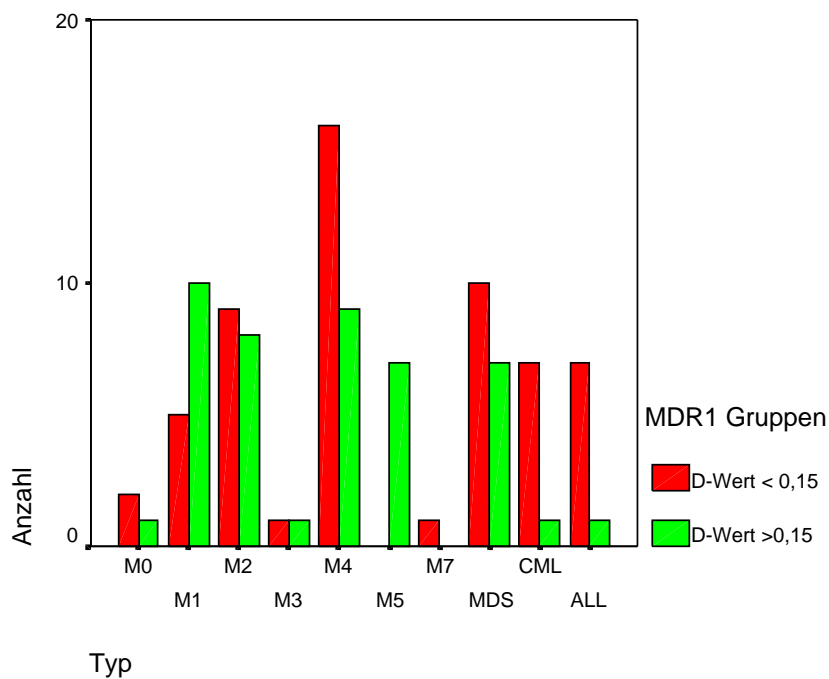
gering bis gar nicht nachweisbar. In unsere Studie fanden sich lediglich 2 Patienten (je 1 CML, 1 ALL) von insgesamt 16 mit einem erhöhten D-Wert ($D > 0,15$).

Tabelle 9: D-Wert Verteilung bei Leukämien

TYP * MDR1 Gruppen Kreuztabelle

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert kleiner 0,15	D-Wert größer 0,15	
TYP	M0	Anzahl	2	1	3
		% von TYP	66,7%	33,3%	100,0%
	M1	Anzahl	5	10	15
		% von TYP	33,3%	66,7%	100,0%
	M2	Anzahl	9	8	17
		% von TYP	52,9%	47,1%	100,0%
	M3	Anzahl	1	1	2
		% von TYP	50,0%	50,0%	100,0%
	M4	Anzahl	16	9	25
		% von TYP	64,0%	36,0%	100,0%
	M5	Anzahl	0	7	7
		% von TYP	,0%	100,0%	100,0%
	M7	Anzahl	1	0	1
		% von TYP	100,0%	,0%	100,0%
	poMDS	Anzahl	10	7	17
		% von TYP	58,8%	41,2%	100,0%
	CML	Anzahl	7	1	8
		% von TYP	87,5%	12,5%	100,0%
	ALL	Anzahl	7	1	8
		% von TYP	87,5%	12,5%	100,0%
Gesamt		Anzahl	58	45	103
		% von TYP	56,3%	43,7%	100,0%

Abbildung 10: D-Wert Verteilung bei Leukämien

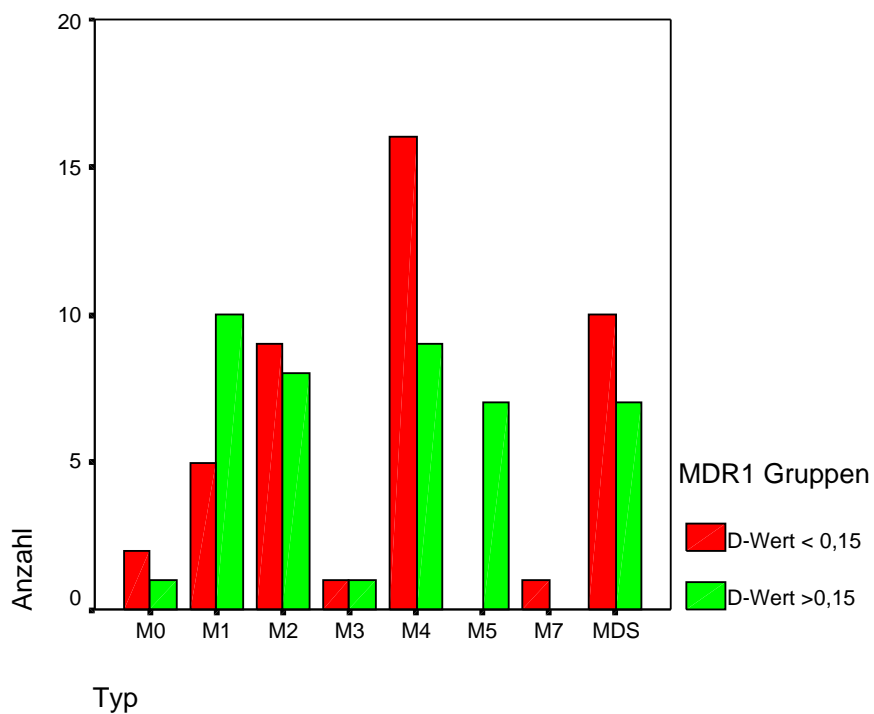


Werden wieder die Patienten der ALL und CML ausgeschlossen, kann man von einer nahezu Gleichverteilung der D-Werte sprechen. Es finden sich 44 Werte mit einem $D\text{-Wert} < 0,15$ und 43 mit einem $D\text{-Wert} > 0,15$. Überraschend war die Häufigkeit der AML-M1 mit knapp einem Viertel (23,4%) aller MDR-positiven Werte. Für die AML-M5 bzw. AML-M7 lagen nicht in jeder MDR-Gruppe Daten vor. Es konnten bei beiden jedoch auch nur sehr geringe Patientenzahlen eingeschleust werden (siehe Tabelle 10 und Abbildung 11).

Tabelle 10: D-Wert Verteilung bei AML und MDS

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert < 0,15	D-Wert >0,15	
Typ	M0	Anzahl	2	1	3
		% von Typ	66,7%	33,3%	100,0%
	M1	Anzahl	5	10	15
		% von Typ	33,3%	66,7%	100,0%
	M2	Anzahl	9	8	17
		% von Typ	52,9%	47,1%	100,0%
	M3	Anzahl	1	1	2
		% von Typ	50,0%	50,0%	100,0%
	M4	Anzahl	16	9	25
		% von Typ	64,0%	36,0%	100,0%
	M5	Anzahl		7	7
		% von Typ		100,0%	100,0%
	M7	Anzahl	1		1
		% von Typ	100,0%		100,0%
	MDS	Anzahl	10	7	17
		% von Typ	58,8%	41,2%	100,0%
Gesamt		Anzahl	44	43	87
		% von Typ	50,6%	49,4%	100,0%

Abbildung 11: D-Wert Verteilung bei AML und MDS



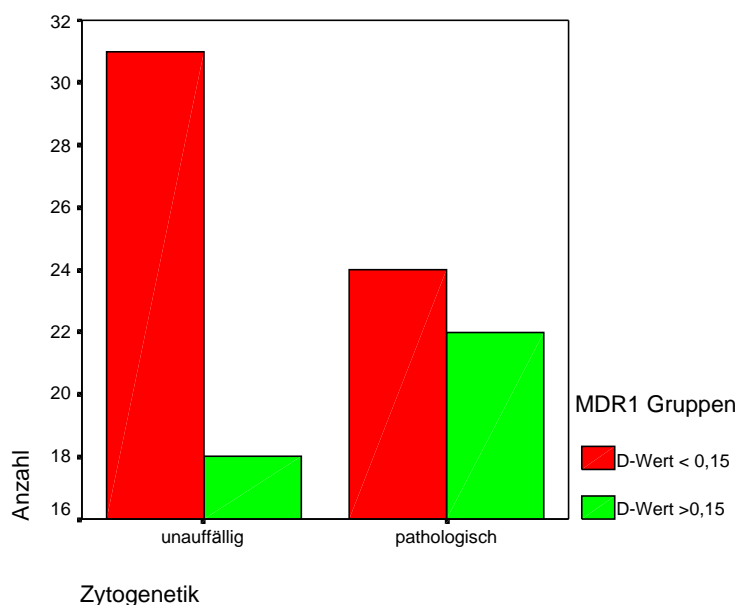
3.4.Zytogenetik

In einer weiteren Betrachtung wurden die Gruppen bezüglich ihrer Zytogenetik untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des Chromosomensatzes in knapp der Hälfte (48,4%) aller Fälle auftrat. Bei einem D-Wert < 0,15 hatten 31 Patienten einen Normalbefund bezüglich ihrer Zytogenetik, 24 einen pathologischen Befund. Waren die Patienten MDR-positiv, d.h. D-Wert > 0,15, fand sich häufiger eine Veränderung ihres Chromosomensatzes, 22 Fälle (55%) versus 18 (45%) mit normaler Zytogenetik.

Tabelle 11: Zytogenetik aller Patienten

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert < 0,15	D-Wert > 0,15	
Zytogenetik	Normalbefund	Anzahl	31	18	49
		% von MDR1 Gruppen	56,4%	45,0%	51,6%
	pathologisch	Anzahl	24	22	46
		% von MDR1 Gruppen	43,6%	55,0%	48,4%
Gesamt		Anzahl	55	40	95
		% von MDR1 Gruppen	100,0%	100,0%	100,0%

Abbildung 12: Zytogenetik aller Patienten



Die genauere Differenzierung der zytogenetischen Veränderung aller Patienten erbrachte, dass, bezogen auf Veränderungen der Chromosomen 5 und 7, von insgesamt 14 Patienten immerhin 9 (64,3%) mit einem erhöhten D-Wert und somit

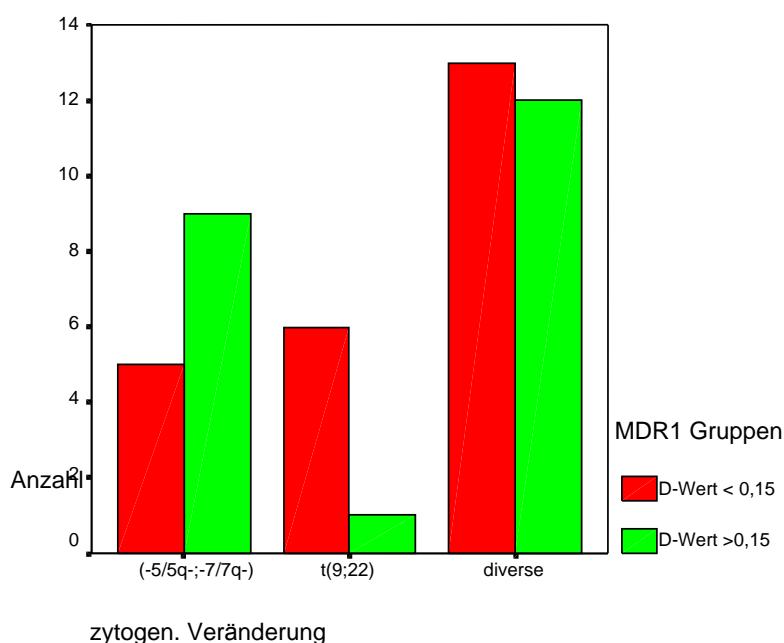
einer erhöhten Expression des P-Gp einhergehen. Dies ist umso bemerkenswerter, da die Gensequenz des MDR-Proteins auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist und bei Verlust eines Chromosomens 7 von einer verminderten Expression des P-Gp ausgegangen werden könnte. Es werden weitere Ursachen vorliegen müssen. Im Gesamtvergleich waren jedoch geringfügig mehr genetische Veränderungen in der Gruppe der MDR-negativen Patienten zu verzeichnen.

Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass ein positiver D-Wert auch gleichzeitig mit einer Strukturpathologie im Chromosomensatzes vergesellschaftet ist.

Tabelle 12: detaillierte Zytogenetik bei Patienten mit pathologischen zytogen. Veränderungen

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert < 0,15	D-Wert >0,15	
zytogen. Veränderung	(-5/5q-; -7/7q-)	Anzahl	5	9	14
		% von zytogen. Veränderung	35,7%	64,3%	100,0%
	t(9;22)	Anzahl	6	1	7
		% von zytogen. Veränderung	85,7%	14,3%	100,0%
	diverse	Anzahl	13	12	25
		% von zytogen. Veränderung	52,0%	48,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	24	22	46
		% von zytogen. Veränderung	52,2%	47,8%	100,0%

Abbildung 13: detaillierte Zytogenetik bei Patienten mit pathologischen zytogen. Veränderungen

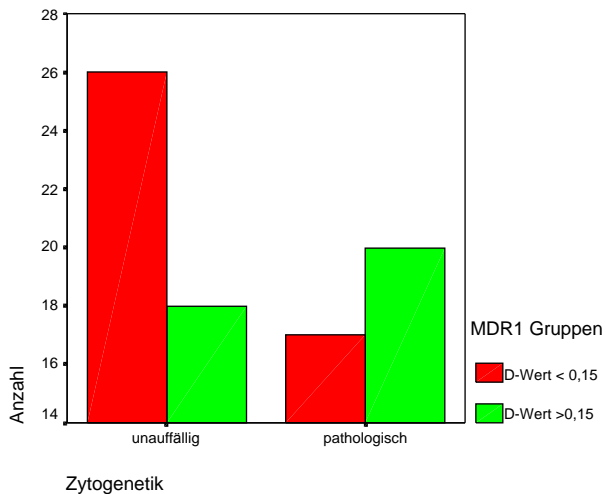


Unter Ausschluss der ALL- und CML-Patienten erfolgte erneut die Untersuchung auf einen möglichen Einfluss der Zytogenetik auf die Ausprägung des MDR-Phänotypes. Es konnte auch hier nicht eindeutig festgestellt werden, dass ein hoher D-Wert und somit eine Überexpression des P-Gp zwingend mit einer zytogenetischen Abberation einhergeht. In der Tabelle 13 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 13: Zytogenetik bei Patienten mit AML und MDS

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert < 0,15	D-Wert >0,15	
Zytogenetik	unauffällig	Anzahl	26	18	44
		% von Zytogenetik	59,1%	40,9%	100,0%
	pathologisch	Anzahl	17	20	37
		% von Zytogenetik	45,9%	54,1%	100,0%
Gesamt		Anzahl	43	38	81
		% von Zytogenetik	53,1%	46,9%	100,0%

Abbildung 14: Zytogenetik bei Patienten mit AML und MDS



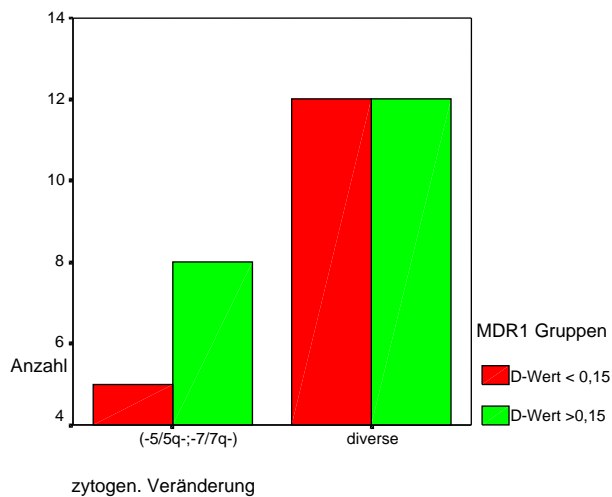
Besonderes Interesse galt den zytogenetischen Veränderungen an den Chromosomen 5 und 7. Eine Monosomie 5 (-5) geht als schlechter Prognosefaktor in die Beurteilung der Leukämie ein, ebenso ein Verlust des Chromosoms 7 (Monosomie 7, (-7)). Das MDR1-Gen ist auf dem Chromosomen 7 lokalisiert und es stellte sich die Frage, ob ein Verlust dessen die Ausprägung des D-Wertes beeinflussen könnte. Insgesamt wurden 13 Veränderungen in Form von Verlust, Zusatz oder Punktmutationen der

Chromosomen nachgewiesen. Es konnte in dieser geringen Patientenpopulation nicht nachgewiesen werden, dass ein hoher D-Wert zwingend mit einer zytogenetischen Abberation einhergeht.

Tabelle 14: detaillierte Zytogenetik bei path.-zytogen. Veränderungen bei Patienten mit AML und MDS

		MDR1 Gruppen		Gesamt
		D-Wert < 0,15	D-Wert >0,15	
zytogen. Veränderung (-5/5q; -7/7q-)	Anzahl	5	8	13
	% von zytogen. Veränderung	38,5%	61,5%	100,0%
diverse	Anzahl	12	12	24
	% von zytogen. Veränderung	50,0%	50,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	20	37
	% von zytogen. Veränderung	45,9%	54,1%	100,0%

Abbildung 15: detaillierte Zytogenetik bei path.-zytogen. Veränderungen bei Patienten mit AML und MDS



3.5. Einfluss des MDR-Phänotypes auf die Therapie und den Verlauf

3.5.1. Betrachtungen zum MDR-Phänotyp und Therapie

Ein weiterer Schwerpunkt der Studie war die Untersuchung, in wieweit das Ansprechen auf die verabreichte Chemotherapie durch eine Ausprägung des MDR1-Phänotypes beeinflusst wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die verabreichten Chemotherapien weitere Substanzen enthielten, die keine spezifischen Substrate für das P-Gp darstellen. AraC (Cytosin-Arabinosid), in den zuvor erwähnten Therapien IVA und DAV enthalten, ist beispielsweise ein Vertreter.

In diesem Schritt wurde untersucht, wie das Ansprechen der Patienten in Verbindung mit Ihrem D-Wert einzuschätzen ist. Insgesamt lagen 82 auswertbare Fälle vor, je 41 in den Untergruppen $D < 0,15$ bzw. $D > 0,15$. Es liegt somit in beiden Gruppen Gleichverteilung vor. In der Gruppe mit einem positiven D-Wert ($D > 0,15$) waren weniger komplette Remission (CR) zu verzeichnen. Die Rate der partiellen Remissionen (PR) und Persistenzen (nicht Ansprechen auf die Therapie) war entsprechend höher.

Tabelle 15: D-Wert und Therapieansprechen

	Ansprechen				Gesamt
	CR	PR	Persistenz	verstorben	
MDR1 Gruppen D-Wert $< 0,15$ Anzahl	20	1	11	9	41
% von MDR1 Gruppe	48,8%	2,4%	26,8%	22,0%	100,0%
D-Wert $> 0,15$ Anzahl	15	3	15	8	41
% von MDR1 Gruppe	36,6%	7,3%	36,6%	19,5%	100,0%
Gesamt Anzahl	35	4	26	17	82
% von MDR1 Gruppe	42,7%	4,9%	31,7%	20,7%	100,0%

Die Therapieschemata IVA (Idarubicin, VP 16, AraC) und DAV (Daunorubicin, AraC, VP16) enthalten Substanzen, die durch das Multidrugresistenzprotein einem erhöhten zytoplasmatischen Efflux unterliegen können. Aus diesem Grund wurden die beiden Therapien gesondert betrachtet. In der Gruppe, die mit IVA (35 Fälle) behandelt wurde, fand sich eine CR-Rate von 57%. Bei der Therapie mit DAV (11 Fälle) erreichen lediglich 36% die CR. Die Rate der Therapieversager bzw. unter Therapie verstorbenen Patienten beträgt in der IVA-Gruppe 40%, in der DAV-Gruppe 45%. Der Tabelle 16 sind die Daten zu entnehmen.

Tabelle 16: IVA/DAV-Therapie und D-Wert

IVA / DAV				Ansprechen				Gesamt
				CR	PR	Persistenz	verstorben	
IVA	MDR1 Gruppen	D-Wert <0,15	Anzahl	14		4	2	20
			% von MDR1 Gruppe	70,0%		20,0%	10,0%	100,0%
		D-Wert >0,15	Anzahl	6	1	8		15
			% von MDR1 Gruppe	40,0%	6,7%	53,3%		100,0%
	Gesamt		Anzahl	20	1	12	2	35
			% von MDR1 Gruppe	57,1%	2,9%	34,3%	5,7%	100,0%
DAV	MDR1 Gruppen	D-Wert <0,15	Anzahl	1	1	1		3
			% von MDR1 Gruppe	33,3%	33,3%	33,3%		100,0%
		D-Wert >0,15	Anzahl	3	1	2	2	8
			% von MDR1 Gruppe	37,5%	12,5%	25,0%	25,0%	100,0%
	Gesamt		Anzahl	4	2	3	2	11
			% von MDR1 Gruppe	36,4%	18,2%	27,3%	18,2%	100,0%

Von Interesse war das Überleben unter diesen beiden Therapieregimen. Unabhängig von der Ausprägung des MDR-Phänotypes, dargestellt in Form des D-Wertes, überlebten in der mit IVA behandelten Patientengruppe 14 (von insgesamt 35) Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, in der mit DAV behandelten Patientengruppe lediglich 2 (von ursprünglich 11) Patienten. Hervorzuheben ist, dass 6 von 8 Patienten der DAV-Gruppe mit einer erhöhten Ausprägung des D-Wert >0,15 bereits in dem Beobachtungszeitraum verstorben waren, während es in der IVA-Gruppe (D-Wert >0,15) nur 7 von 15 waren. Siehe folgende Tabelle 17.

Tabelle 17: Therapieansprechen und MDR-Phänotypausprägung

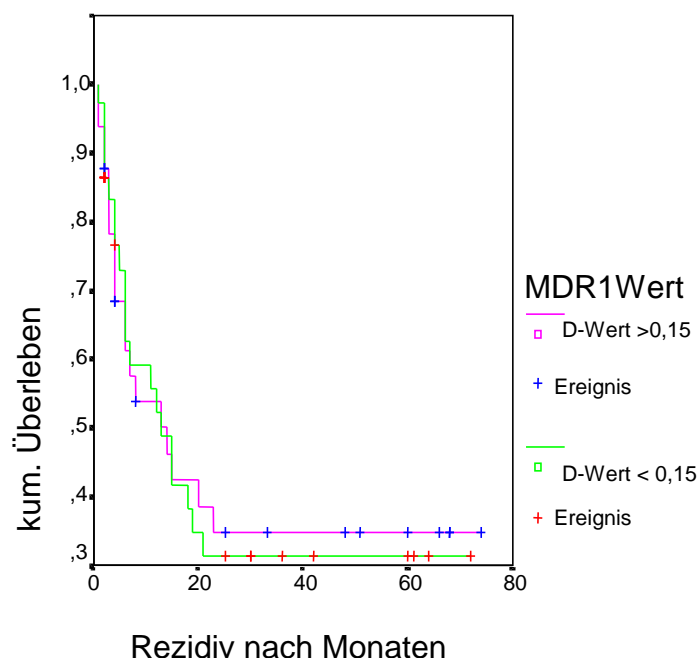
MDR1 Gruppen * Therapie-1 * Verlauf Kreuztabelle

Verlauf				Therapie-1							Gesamt	
				ATRA	IVA	DAV	FLAG-I	AraC+D	HD AraC+	sonstige		keine
lebt	MDR1	D < 0,15	Anzahl	1	8	1						10
			% von MDR1	10,0	80,0	10,0						
		D > 0,15	Anzahl		6	1				2		9
			% von MDR1		66,7	11,1				22,2		100,0
	Gesamt		Anzahl	1	14	2				2		19
			% von MDR1	5,3	73,7	10,5				10,5		100,0
verstorben	MDR1	D < 0,15	Anzahl		13	2	6	1		2	7	31
			% von MDR1		41,9	6,5	19,4	3,2		6,5	22,6	100,0
		D > 0,15	Anzahl		7	6	5	1	1	5	2	27
			% von MDR1		25,9	22,2	18,5	3,7	3,7	18,5	7,4	100,0
	Gesamt		Anzahl		20	8	11	2	1	7	9	58
			% von MDR1		34,5	13,8	19,0	3,4	1,7	12,1	15,5	100,0
kein	MDR1	D < 0,15	Anzahl		1					1		2
			% von MDR1		50,0					50,0		100,0
		D > 0,15	Anzahl		1		1					2
			% von MDR1		50,0		50,0					100,0
	Gesamt		Anzahl		2		1			1		4
			% von MDR1		50,0		25,0			25,0		100,0

3.5.2.MDR-Phänotyp und Verlauf

Es wurden die Daten der Patienten, nach ihrer MDR-Phänotypausprägung getrennt, bezüglich ihres Zeitpunktes bis Erreichen des ersten Rezidivs untersucht. Es fanden sich 37 Patienten in der Gruppe mit einem D-Wert $<0,15$ und 33 Patienten mit einem D-Wert $>0,15$. Die Gruppen sind von vergleichbarer Größe. In dieser Auswertung betrug bei den Patienten mit einem MDR-Wert $<0,15$ die mittlere Überlebenszeit bis Erreichen des 1. Rezidives 28 Monate und die mediane Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1.Rezidives 13 Monate; bei Patienten mit einem D-Wert $>0,15$ betrug die mittlere Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1.Rezidives gar 31 und die mediane Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1.Rezidives 14 Monate. Unter Berücksichtigung der geringen Gruppengrößendifferenz kann man davon ausgehen, dass es sich um nicht signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen handelt. Ein Nachweis, dass eine erhöhte Ausprägung des P-Gp auch mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist, konnte in dieser Untersuchung nicht gefunden oder bestätigt werden.

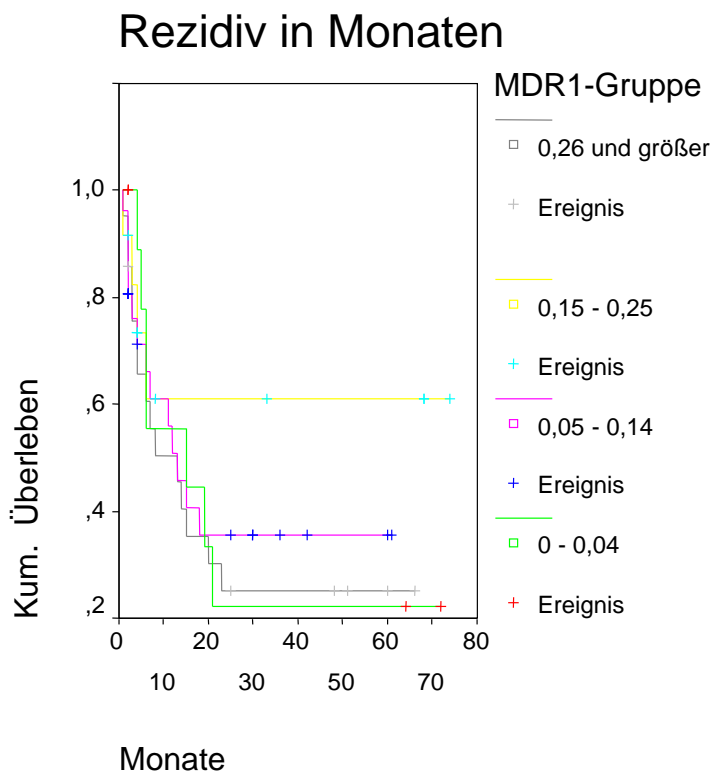
Abbildung 16: Zeit bis zum 1. Rezidiv (bezüglich der D-Wert)



Die Gruppeneinteilung wurde im Folgenden verändert, mit der Fragestellung, ob eine kleinere Untergruppenbildung bereits genaueren Aufschluss über einen möglichen negativen Einfluss eines hohen D-Wertes ($D > 0,15$) geben könnte. Dafür wurden

folgende 4 Untergruppen gebildet D-Wert 0-0,04; 0,05-0,14; 0,15-0,25 und größer 0,26. In der Gruppe 0,15-0,25 ließ sich kein Medianwert ermitteln, die anderen Untergruppen waren bezüglich des Mean (23-24) und des Median (13-15) vergleichbar. Eine unterschiedliche Prognose ließ sich daher nicht ableiten.

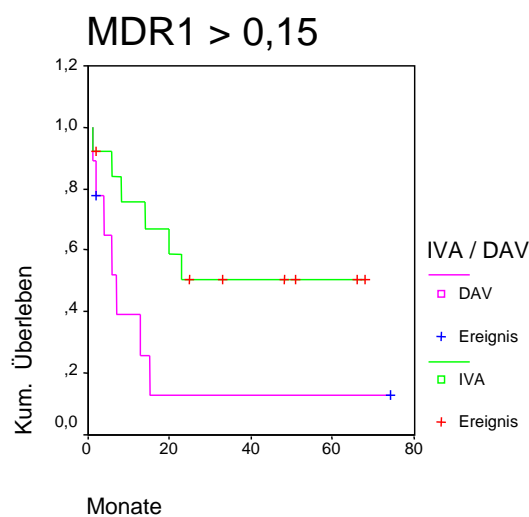
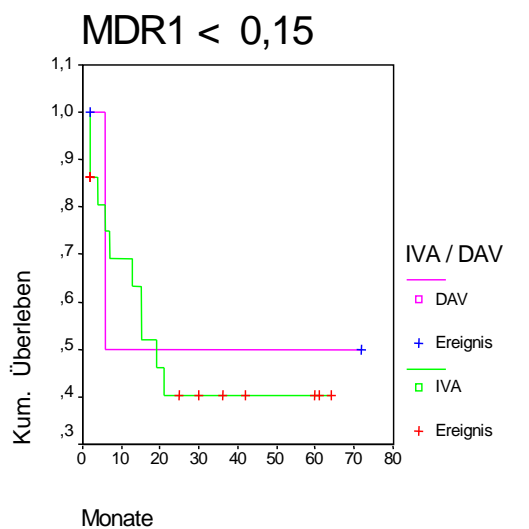
Abbildung 17: MDR-Phänotyp-Gruppen und Rezidiv



Unter Berücksichtigung der bereits erwähnten unterschiedlichen Therapieoptionen, IVA oder DAV, wurden die vorliegenden Daten erneut untersucht. In der Gruppe der mit IVA behandelten und ohne signifikante Erhöhung des D-Wertes ($D < 0,15$) waren 22 Patienten, von denen 11 eingeschlossen werden konnten. Mit gleichem D-Wert, jedoch mit dem DAV-Therapieschema behandelten Patienten konnte nur einer von drei ausgewertet werden. In der Gruppe der D-Wert($>0,15$) Patienten konnten unter IVA-Therapie 6 von 13 und bei DAV 7 von 9 ausgewertet werden. Es fanden sich signifikante Unterschiede, trotz unterschiedlicher Gruppengröße. Unter IVA-Therapie mit einem D-Wert $< 0,15$ betrug der Mean 32, die mediane Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1.Rezidives 19 Monate. War der D-Wert $> 0,15$ so betrug der Mean 40, ein Median ließ sich nicht berechnen. In der Gruppe der mit DAV behandelten

Patienten betrug der Mean bei einem D-Wert < 0,15 bereits 39 Monate, das mediane Überleben bis Erreichen des 1. Rezidives aber lediglich 6 Monate. In der Gruppe der mit DAV behandelten Patienten (D-Wert > 0,15) betrug der Mean lediglich 16 Monate, das mediane Überleben bis Erreichen des 1. Rezidives nur 7 Monate. In der folgenden Grafik sind die Ergebnisse dargestellt.

Abbildung 18 und 19: D-Wert und Therapieregime



Die Patienten in den Therapiegruppen DAV und IVA wurden weiter untersucht. Es war die Frage, ob die Genetik einen zusätzlichen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. Die Subgruppen sind weiter sehr klein, so dass allgemeingültige

Aussagen nicht getroffen werden können. Eine Berechnung des p-Wertes war daher nicht möglich.

Ein Vergleich der Daten der Gruppe D-Wert $<0,15$, Normalbefund Zytogenetik und unterschiedlicher Chemotherapie (IVA/DAV) zeigt, dass bis zum 1. Rezidiv das mediane Überleben unter DAV-Therapie 6 Monaten und mit IVA-Therapie 15 Monate beträgt.

In der Subgruppe mit den Merkmalen D-Wert $<0,15$, DAV-Therapie und pathologische Genetik fand sich nur ein Patient, der kein Rezidiv erlitt.

In einer weiteren Betrachtung wurden spezifische und unspezifische Veränderungen der Zytogenetik untersucht. Die Gruppe mit einem D-Wert $<0,15$ war, aufgrund der Ausschlüsse, so klein geworden, dass eine Betrachtung nicht sinnvoll wurde. Die Gruppe mit einem D-Wert $>0,15$ zeigte bezüglich einer unspezifischen Genveränderung einen Mean von 30 und eine mediane Überlebenszeit bis Erreichen des 1.Rezidives von 14 Monaten. In der Subgruppe mit einer spezifischen Genveränderung (-5/5q-, -7/7q-) betrug der Mean 4 und die mediane Überlebenszeit bis Erreichen des 1.Rezidives 2 Monate. Die Differenz bezüglich der medianen Überlebenszeit bis Erreichen des 1.Rezidives weist 12 Monaten auf.

Es lässt sich vermuten, dass eine spezifische Genveränderungen (-5/5q-, -7/7q-) in Zusammenhang mit einem erhöhten D-Wert (D $>0,15$) eine deutlich schlechtere Prognose für den Patienten bedeuten. Dies scheint jedoch multifaktoriell zu sein.

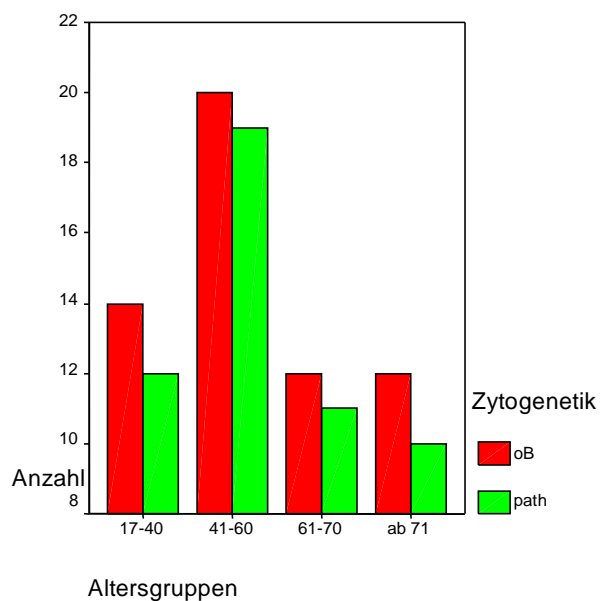
3.6.Zytogenetik und Alterstruktur

Im Bezug auf genetische Veränderungen wurden alle Patienten untersucht. Es lagen von insgesamt 110 Patienten Daten vor. Die Verteilung bezüglich der ersten Beurteilung, ob eine Veränderung der Zytogenetik vorliegt, ergab nahezu eine Gleichverteilung. 52,7% aller Patienten hatten einen normalen Befund, 47,3% eine zytogenetische Veränderung in ihrem Chromosomensatz. Die häufigsten Veränderungen wurden in der Altersgruppe der 41-60 Jährigen gefunden; es war auch die am stärksten vertretene Gruppe. Ansonsten war innerhalb der Altersgruppen fast jeder zweite von einer veränderten Zytogenetik betroffen.

Tabelle 18: Verteilung der Zytogenetik bezogen auf Altersgruppen

			Zytogenetik		Gesamt
			ob	path	
Altersgruppen	17-40	Anzahl	14	12	26
		% von	53,8%	46,2%	100,0
	41-60	Anzahl	20	19	39
		% von	51,3%	48,7%	100,0
	61-70	Anzahl	12	11	23
		% von	52,2%	47,8%	100,0
	ab 71	Anzahl	12	10	22
		% von	54,5%	45,5%	100,0
Gesamt		Anzahl	58	52	110
		% von	52,7%	47,3%	100,0

Abbildung 20: Verteilung der Zytogenetik bezogen auf Altersgruppen



Im Weiteren wurden die Zytogenetik und die Ausprägung des MDR-Phänotypes miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass insgesamt knapp 58% der Patienten einen D-Wert < 0,15 hatten. In der Gruppe der Patienten mit einer pathologischen Zytogenetik fand sich eine nahezu Gleichverteilung bezüglich der MDR1-Gruppenverteilung.

Tabelle 19: Verteilung der Zytogenetik bezogen auf MDR1-Gruppen

			MDR1 Gruppen		Gesamt
			D-Wert < 0,15	D-Wert > 0,15	
Zytogenetik	Normalbefund	Anzahl	31	18	49
		% von MDR1 Gruppen	56,4%	45,0%	51,6%
	pathologisch	Anzahl	24	22	46
		% von MDR1 Gruppen	43,6%	55,0%	48,4%
Gesamt	Anzahl		55	40	95
	% von MDR1 Gruppen		100,0%	100,0%	100,0%

Eine genauere Untersuchung dieser 95 Patienten (knapp 80%), nach Altersgruppen unterteilt, zeigte, dass Veränderungen des Chromosomensatzes und ein erhöhter D-Wert überwiegend im höheren Lebensalter gefunden werden können. In der Gruppe mit einem D-Wert < 0,15 und Alter ab 71 Jahre waren 6 Patienten mit einem normalen und 3 mit verändertem Chromosomensatz zu finden. Bei Patienten mit einem D-Wert > 0,15 war das Verhältnis umgekehrt, d.h. in der Altersgruppe (ebenfalls) der über 71 Jährigen waren lediglich 3 Patienten mit einem unauffälligen zytogenetischen Befund, während hier bereits 6 eine Veränderung im Chromosomensatz aufwiesen.

Betrachtet wurde die Zytogenetik in Verbindung mit dem Alter und der MDR1-Gruppen (cut off 0,15). Es konnten 81 Fälle (= knapp 80%) ausgewertet werden. Es bestätigte sich, die bereits bei allen Patienten (inklusive ALL und CML) getroffene Aussage, dass bei einer Erhöhung des D-Wertes eine zytogenetische Aberration bei Patienten ab dem 70. Lebensjahr häufiger auftreten kann. Die Berechnung eines p-Wertes war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich. Eine Korrelation zwischen den verschiedenen Variablen konnte nicht gefunden werden.

Tabelle 20: Betrachtung zur Zytogenetik, Altersgruppen und D-Wert

Altersgruppen * Zytogenetik * MDR1 Gruppen Kreuztabelle

MDR1 Gruppen				Zytogenetik		Gesamt
				Normalbefund	pathologisch	
D-Wert < 0,15	Altersgruppen	17-40	Anzahl	3	7	10
			% von Zytogenetik	11,5%	41,2%	23,3%
		41-60	Anzahl	13	5	18
			% von Zytogenetik	50,0%	29,4%	41,9%
		61-70	Anzahl	5	3	8
			% von Zytogenetik	19,2%	17,6%	18,6%
		> 71	Anzahl	5	2	7
			% von Zytogenetik	19,2%	11,8%	16,3%
		Gesamt	Anzahl	26	17	43
			% von Zytogenetik	100,0%	100,0%	100,0%
D-Wert > 0,15	Altersgruppen	17-40	Anzahl	6	3	9
			% von Zytogenetik	33,3%	15,0%	23,7%
		41-60	Anzahl	4	7	11
			% von Zytogenetik	22,2%	35,0%	28,9%
		61-70	Anzahl	5	4	9
			% von Zytogenetik	27,8%	20,0%	23,7%
		> 71	Anzahl	3	6	9
			% von Zytogenetik	16,7%	30,0%	23,7%
		Gesamt	Anzahl	18	20	38
			% von Zytogenetik	100,0%	100,0%	100,0%

3.7. Auswertung der 10 höchsten D-Werte

Die 10 höchsten D-Werte aller Patienten der Gruppe der AML und MDS- Patienten lagen zwischen 0,40 und 0,79 (berechnet nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test).

Insgesamt erlitten 8 Patienten ein Rezidiv binnen 12 Monaten, 2 erhielten im weiteren Verlauf eine Knochenmarkstransplantation und waren bei Datenerhebung noch am Leben. Therapeutisch wurden verschiedenste Chemotherapieschemata verwendet.

Unter anderem waren es die Chemotherapien IVA (3malig), DAV (2malig), Hochdosis-AraC (3malig).

Eine überwiegend vorkommende Subgruppe der akuten myeloischen Leukämien, beispielsweise AML-M1, konnte nicht nachgewiesen werden. Es waren alle Untergruppen vertreten.

In der Untersuchung bezüglich der Zytogenetik fand sich ein ähnlich homogenes Bild. Nur 2 Patienten zeigten unspezifische genetische Veränderungen. Es konnten keine spezifischen Veränderungen auf den Chromosomen 5 oder 7 nachgewiesen werden.

Ein Verlauf konnte aufgrund fehlender Aktenlage nicht geklärt werden.

Die intensiven Betrachtungen der Bereiche Therapieschema und Zytogenetik konnten leider keine Gemeinsamkeiten, außer der hohen Ausprägung des D-Wertes, nachweisen. Möglicherweise gibt es weitere, andere Einflussfaktoren, die dieser Untersuchung entgangen sind.

4. Diskussion

4.1. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Faktoren, unter Berücksichtigung der Ausprägung des MDR1-Phänotypes, bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie untersucht werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Ausprägung des MDR1-Phänotypes mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie einhergeht.

4.2. Kritik

Für die Auswertung standen 120 Proben von Patienten zur Verfügung. Im Vergleich zu anderen Studien handelt es sich hier um eine kleine Patientengruppe, so dass sich keine allgemeingültigen Formulierungen daraus ergeben können. Die weiteren Analysen und die damit verbundene Subgruppenbildung erbrachte eine weitere, deutliche Verringerung der Patientenzahlen.

Das Patientenkollektiv ist inhomogen bezogen auf die Altersverteilung. Es finden sich überwiegend Patienten im höheren Lebensalter, die 70-75 jährigen Patienten sind mit knapp 20% aller Patienten am häufigsten vertreten, die 55-70 und 75-80jährigen Patienten erreichen insgesamt über 40%. Die Verteilung bezüglich des Geschlechts ist mit 64 weiblichen und 56 männlichen Patienten fast ausgewogen.

Ein weiterer Kritikpunkt sind die verabreichten Chemotherapieschemata. Die dort verabreichten Substanzen werden nicht alle durch den MDR1-Phänotyp erfasst. Cytosin-Arabinosid (AraC) ist eine übliche Substanz, die in den verschiedenen Chemotherapien häufig verwendet wird. Daher ist von Interferenzen und Einflüssen auszugehen, die nicht untersucht werden konnten. Die individuelle Anpassung und somit unterschiedliche Menge an verabreichten Chemotherapeutika sind ebenfalls Variablen, deren Einfluss hier unklar blieb.

Die durchflusszytometrische Bestimmung mittels Cyclosporin A und Verapamil erfasst möglicherweise nicht nur leukämische CD34+ Blasten, sondern auch normale, im Reifungsprozess befindliche CD34+ Blasten. Trotz eines entsprechenden Gating besteht auch hier eine mögliche Variable.

Ein weitere Kritikpunkt dieser Arbeit ist möglicherweise die schlechte Beurteilbarkeit der immunzytomchemischen Färbungen, die sich im Wesentlichen von der Rhodamin 123 Extrusion ableiten lassen und es deshalb nicht eindeutig bewiesen ist, dass es sich nur um die Aktivität der P-Gp-Pumpe handelt, sondern möglicherweise andere Transportsysteme miterfasst wurden. Der Rhodamin 123-Assays besitzt den Vorteil, dass er mit hoher Sensitivität bereits kleinere Änderungen der Aktivität der P-Gp-Pumpe, die zum Beispiel in Folge physiologischer Schwankungen auftreten können, nachweisen kann.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind durch die angeführten Einflüsse nicht allgemeingültig.

4.3.Ergebnisdiskussion mit der Literatur

4.3.1.Methodik

Es wurden Blut- bzw. Knochenmarksproben untersucht, speziell CD34+ Zellen zum Ausprägungsgrad des MDR1-Phänotypes, unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Testes, der in die FAC-Scan-Software integriert ist, mittels durchflusszytometrischer Bestimmung. Eine entsprechend hohe Anzahl von CD34+ Blasten im Blut von Patienten mit AML korrelierte sehr gut mit der P-Gp-Funktion (D-Wert). Es bleibt jedoch fraglich, ob nur die tatsächliche Aktivität des P-Gp bestimmt wurde, oder ob weitere, durch immunzytochemische Methoden nicht zu differenzierende Transportproteine mit nachgewiesen wurden. Der Rhodamin 123-Assay hat jedoch den Vorteil, dass er von hoher Spezifität ist und bereits kleinere Änderungen, auch im physiologischen Bereich des P-Gp nachweisen kann. In Arbeiten von Tallmann et al [21], Paietta [33] und te Boekhorst [35] wurden ähnliche Verfahren bereits erfolgreich angewandt.

Die Bestimmung des D-Wertes geschah mittels durchflusszytometrischer Bestimmung und der Resistenzmodulatoren Verapamil und CyclosporinA. In der Analyse der vorliegenden Daten konnte festgestellt werden, dass eine Substratspezifität gegeben ist. Verwendet man als Resistenzmodulator und somit „Pumpenblocker“ CyclosporinA (CsA), so ist in dieser Arbeit die Untersuchung spezifischer und quantitativ genauer als im Gegensatz zu Verapamil (Ver).

Leider gibt aber keine einheitliche Bestimmungsgrundlage bezüglich der Substratspezifität des P-Gp, so dass die Werte von Labor zu Labor stark differieren können.

Aktuell (2003) wird eine neue Methode zur Bestimmung der MDR1-Expression diskutiert. Olesen et al [27] postulieren die RQ-PCR als sensitive und quantitativ bessere Methode gegenüber der RT-PCR bzw. der Durchflusszytometrie, ebenfalls unter Verwendung von Knochenmark bzw. peripherem Blut. Die Verwendung einer Methode auf molekularer Ebene könnte sensitiver den MDR1-Status detektieren, da eventuelle Kreuzreaktionen wie bei der Immunhistochemie entfallen würden. Sie wäre als möglicher Verlaufspareter und eventuell für größere Patientengruppen geeignet. Eine Kontamination durch normale CD34+ Blasten stellt jedoch auch hier einen variablen Einfluss dar.

Vor der Festlegung des Cut Off, zur Bestimmung ab wann man von MDR1-positiven (D-Wert) bzw. MDR1-negativen Werten spricht, wurde die Literatur durchsucht. Leith et al [24] haben in ihrer 1997 publizierten Untersuchung folgende Einteilung für die Beurteilung der D-Werte getroffen: D-Wert negativ ($D < 0,10$), dim ($0,1 < D < 0,15$), moderat ($0,15 < D < 0,25$) und hoch ($D > 0,25$). In Anlehnung an diese Arbeit wurde hier als Cut Off ein D-Wert für erhöht definiert, wenn der durchflusszytometrische D-Wert größer 0,15 war. Dementsprechend wurde ein negativer D-Wert mit kleiner 0,15 gewertet. Eine internationale oder einheitliche Festlegung/Einigung liegt noch nicht vor.

Zur Betrachtung der medianen Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1. Rezidives wurden die 2 Subgruppen (MDR1-positiv versus MDR1-negativ) in kleinere Gruppen unterteilt. Es wurden folgende Gruppen: D-Wert $< 0,04$, $0,05 < D < 0,14$, $0,15 < D < 0,25$ und $D > 0,26$ gebildet. Diese genauere Unterteilung ermöglichte eine differenzierte Analyse der Daten und erbrachte eine Verringerung der medianen Überlebenszeit bis zum Auftreten des 1. Rezidives um 2 Monate (von 15 auf 13) mit steigendem D-Wert im gesamten Patientenkollektiv.

Insgesamt muss jedoch leider festgestellt werden, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer erhöhten MDR1-Ausprägung und einer schlechteren

Prognose für alle Patienten gefunden werden konnte (Einteilung in 2 Gruppen mit je D-Wert $<0,15$ bzw. $>0,15$).

Auch andere Arbeitsgruppen [21,25,36] bestätigen dieses Bild. Es ist eine Verschlechterung des Outcomes dieser Patienten zu verzeichnen, aber dieses kann wahrscheinlich nicht auf eine alleinige Erhöhung des D-Wertes, als Mass für die Ausprägung des MDR-Phänotypes, zurückzuführen sein.

4.3.2. Höchste MDR-Phänotypausprägung

Hinweise, dass eine erhöhte Ausprägung des MDR-Phänotypes im Alter häufiger ist, konnten in dieser Untersuchung bestätigt werden. So fanden sich 5 von den 10 höchsten D-Werten in der Altersgruppe ab dem 61. Lebensjahr. Ansonsten war die Gruppe sehr inhomogen. Es wurden die Therapieschemata IVA, DAV und HD-AraC sowie zweimalige Knochenmarkstransplantation durchgeführt. Lediglich 2 der 10 Patienten zeigten unspezifische Veränderungen der Zytogenetik. Der Nachweis von Veränderungen auf den Chromosomen 5 und insbesondere 7 war negativ. Ein Patientenverlauf konnte leider nicht recherchiert werden. Aufgrund der geringen Patientenzahl ist keine allgemeingültige Aussage zu treffen.

Das multifaktorielle Bild bei Patienten mit einem deutlich erhöhten D-Wert bestätigen die Aussagen der Gruppe um Baer [23], die in ihren Untersuchungen zum selben Schluss kommen.

4.3.3. Zytogenetik

Die Untersuchung des MDR1-Status unter Berücksichtigung der Genetik war ein weiterer Schwerpunkt. Die Lokalisation des MDR1-Genes auf dem langen Arm des Chromosoms 7 veranlasste zu einer Untersuchung im Hinblick auf Veränderungen dieses Chromosoms. Ebenfalls wurden Veränderungen des Chromosomen 5 untersucht. Es konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass spezifische Veränderungen der Zytogenetik (beispielsweise $-5/5q-$ und/oder $-7/7q-$) die Überlebenszeit der Patienten dramatisch verkürzte und für ein deutlich schlechteres Outcome spricht.

In dieser Auswertung betrug die mediane Überlebenszeit bis zum Erreichen des 1. Rezidives bei Patienten mit einem D-Wert $>0,15$ und typischer zytogenetischer

Veränderung (der Chromosomen 5 und 7) 2 Monate, im Vergleich dazu das mediane Überleben bis zum 1.Rezidiv bei ebenfalls erhöhtem D-Wert, jedoch unspezifischer genetischer Veränderung, 14 Monate.

Die Untersuchungen von Estey [29] stützen die hier postulierte These, da dort beobachtet wurde, dass ein schlechteres Ansprechen der Patienten auf die Chemotherapien vorliegt bei zytogenetischen Veränderungen der Chromosomen 5 und 7, obwohl von einer geringeren Expression des MDR1 Genes bei Verlust eines Chromosomen 7 ausgegangen werden könnte, da es auf dem Chromosomen 7q21.1 lokalisiert ist[37]. Leith et al [24] und Schaich et al [30] kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine schlechtere Prognose bei diesen Patienten mit entsprechenden Befunden besteht. Dies bestätigt den Verdacht auf ein multifaktorielles Geschehen.

4.3.4. Variablen

Es ist festzuhalten, dass für eine schlechtere Prognose der Patienten mit AML ein multifaktorielles Geschehen zu Grunde gelegt werden muss [32,19,14,18,16,28]. Eine isolierte Erhöhung des Multidrug-Resistenz-Protein wird momentan als nicht ausreichend angesehen. Es konnten 2 Promotoren an der Startseite auf dem langen Arm des Chromosom 7 identifiziert werden, die, ähnlich wie das c-Ha-ras-1-Onkogen und das p53-Tumor-Suppressorgen, womöglich in die Expressionsregulation eingreifen[8,9]. Sie gehören alle der Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren an. Eine posttranslationale Glykolisierung des P-Gp hat keinen Einfluss auf die Ausschleusung der Substanzen, jedoch bestimmt diese die korrekte Lage im Zytoplasma. Eine posttranlacionale Phosphorilierung hingegen scheint eng mit dem Substratausfluss assoziiert zu sein [40].

In den letzten Jahren ist der Nachweis vieler assoziierter Proteine gelungen, so zum Beispiel das MRP1 (Multidrug Resistance-Associated Protein). Es ist ein 190 kDa Protein, das MDR1-Protein ist 170 kDa, gehört ebenfalls in die Gruppe der ABC-Superfamilie (ATP-Binding-Cassette) und ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 lokalisiert. Beide Proteine haben unterschiedliche Membranstrukturen und sind nur zu 15% sequenzgleich[19]. Das MRP1 ist primär ein Transporter für Gluthationkonjugate und kann durch Genestin, einen Tyrosinkinaseinhibitor, teilweise gehemmt werden. Eine gegenseitige Beeinflussung in der Expression zwischen MDR1 und MRP1 bedarf weiterer Untersuchungen.

Das MRP2 (= cMOAT=Multidrug Resistenz-Associated Protein) ist bis zu 25% identisch in der Aminosäuresequenz mit dem MDR2-Gen, das sich in Mäusen nachweisen lässt.

Vor gut 10 Jahren gelang der Nachweis eines weiteren, 110-kD großen Proteins, das an der Zellkernmembran bzw. Zellkernporen lokalisiert ist, dem Lung-Related-Protein (LRP)[41]. Es besteht aus 896 Aminosäuren, ist mit dem Multidrug-Phenotyp assoziiert und findet sich in vielen Geweben (Bronchialepithel, Keratinozyten und weiteren). Es ist ebenfalls, wie das MRP1 auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 lokalisiert und häufig überexprimiert bei Patienten mit AML und MDS.

4.3.5.MDR1-Phänotyp bei ALL

Im Gegensatz zur AML ist der Nachweis der MDR1-Proteins bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) kein Hinweis für ein schlechteres Outcome der Patienten. Eine Korrelation zwischen der CR, dem Überleben und der Expression konnten weder Tafuri et al [43] noch die Arbeitsgruppe um Damiani et al [42] nachweisen. In der vorliegenden Untersuchung fand sich bei lediglich 1 von 9 Patienten ein erhöhter D- Wert, d.h. eine gesteigerte Expression des P-Gp. Alle anderen lagen teilweise sogar noch unter einem D-Wert von 0,05 und bestätigen die Untersuchungen der oben genannten Gruppen.

Der Nachweis weitere Proteine, wie LRP (Lung Resistance Protein) und MRP1 [16] beziehungsweise verschiedener MRP-Subproteine [28] oder BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) [14], und ihr teilweise agonistisch bzw. antagonistisches Zusammenwirken bei Patienten mit AML unterstützt das Vermuten eines multifaktoriellen Geschehens.

Eine abschließende Beurteilung über den Einfluss all dieser Faktoren steht noch aus.

5. Zusammenfassung

Dieser Arbeit standen Knochenmark- bzw. Blutproben von insgesamt 153 Patienten zur Verfügung. Es mussten im Verlauf 33 Fälle (21,5%) ausgeschlossen werden, da eine Eruiierung aufgrund fehlender Dokumentation, fehlender Akten, Wegzug des Patienten/Arztes, Praxisaufgabe des nachbehandelnden Arztes und ungenügender Fragebogenrücklaufs nicht möglich war.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Einflüsse verschiedener Faktoren unter Berücksichtigung der Ausprägung des MDR1-Phänotypes bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zu untersuchen.

Die Zuordnung einer erhöhten Ausprägung des MDR1-Phänotypes zu einem bevorzugtem Typ aus dem Formenkreis der akuten myeloischen Leukämien beziehungsweise dem myelodysplastischem Syndrom konnte nicht festgestellt werden. Mögliche Gründe hierfür sind unter anderem die geringe Patientenanzahl und die Altersstruktur. Von einem repräsentativen Kollektiv kann daher nicht ausgegangen werden. Eine weitere Fehlerquelle besteht in der durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchung, in der nicht nur CD34+ Blasten, sondern auch physiologische CD34+ Zellen erfasst sein können.

Es ist häufig, dass bei einem erhöhten D-Wert und zytogenetischen Veränderungen, auch Mutationsnachweise der Chromosomen 5 und 7 gelingen. Dies ist jedoch nicht regelhaft der Fall. Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Chromosoms 7 und möglicherweise einer erhöhten MDR1-Phänotypausprägung können mit dem Ort der genetischen Kodierung des MDR1-Proteins nicht alleine assoziiert sein, der sich dort befindet. Untersuchungen, die diese Vermutung bestätigen, stehen aktuell noch aus.

Mit steigendem Lebensalter steigt die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Ausprägung des MDR1-Phänotypes. Dies scheint die Folge einer häufig beobachteten Veränderung/Degeneration des genetischen Codes durch sowohl äußere, als auch innere Faktoren zu sein.

Bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv konnte ein schlechteres Outcome von Patienten mit einem erhöhten D-Wert in dieser Studie nicht belegt werden. Die Betrachtung kleiner Untergruppen erbrachte jedoch eine gewisse Tendenz der

Outcomeverschlechterung bei erhöhtem D-Wert im Gegensatz zu Patienten, bei denen der Phänotyp nicht, oder nur gering ausgeprägt ist. Zu Berücksichtigen sind die verschiedenen Chemotherapieschemata, die sowohl Substanzen enthielten, die durch den MDR1-Phänotyp erfasst wurden, als auch jene, deren Einfluss noch unklar ist. Möglicherweise wurden andere Transportmechanismen zur Ausschleusung der Substanzen genutzt, deren Nachweis bzw. dessen Elimination nicht vollständig gelang. Es sind jedoch aufgrund der geringen Patientenzahlen und des selektierten Patientenkollektives keine allgemeingültigen Aussagen zu treffen.

Es konnte gezeigt werden, dass für den Nachweis des MDR1-Phänotypes mittels Durchflusszytometrie, unter Benützung des Kolmogorov/Smirnov-Tests zur Bestimmung des D-Wertes, unter Verwendung der Resistenzmodulatoren Verapamil und Cyclosporin A, letzterer einen sensitiveren Detektor für das P-Gp auf CD34 positiven Blasten darstellt, unter Verwendung eines Rhodamin 123-Assays. In der klinischen Studie von Liszt et al [22] konnte ein Benefit für Patienten erzielt werden, wenn Ihnen neben der gängigen Chemotherapie (Daunorubicin und Cytarabin) zusätzlich Cyclosporin A appliziert wurde. Es sank die Rate der Resistenzen signifikant um 16%. Das beste Ansprechen wurde in der Patientengruppe mit einer moderat bis erhöht Expression des P-Gp gefunden. Diese Untersuchung bestätigt hiesige durchflusszytometrischen Bestimmung, mit der Beobachtung, dass Cyclosporin A einen geeigneteren Resistenzmodulator, im Gegensatz zu Verapamil, darstellt.

Abschliessend möchte ich sagen, dass weitere Studien nötig sind, um den Einfluss des MDR1-Phänotypes im Bezug auf die Beeinflussung des Outcomes bei der akuten myeloischen Leukämie zu klären. Sehr wahrscheinlich ist, dass ein multifaktorielles Geschehen zu Grunde gelegt werden kann und differenziertere Betrachtungen dessen notwendig sind.

6. Literatur

- 1 Fuchs R und Thomalla J, Manual zum Mikrokopierkurs Hämatologie 2001, Klinik für Hämatologie/Onkologie, St. Antonius Hospital Eschweiler, 2001
- 2 Kruse R, Hämatologie für Praxis und Klinik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1995
- 3 Berger D.P., Engelardt R. Mertelsmann, Das Rote Buch (Hämatologie und Internistische Onkologie) , Ecomed Verlag, Landsberg/Lech 2002
- 4 Bradshaw D, Arcesi R : Clinical Relevance of Transmembrane Drug Efflux as a Mechanism of Multidrug Resistance. Journal Of Clinical Oncology, Vol 16, No 11, 1998:pp 3674-3690
- 5 Kessel et. al : Uptake and retention of Daunorubicin by mouse leukemic cells as factors in drug response. Cancer Res., 28, 1968, pp:938-941
- 6 Ling V : Multidrug resistance: Molecular mechanismus and clinical relevance. Cancer Chemother Pharmacol 40, 1997: pp 3-8
- 7 Gros P, Ben N, Croop P, et al: Genetics of multidrug resistance: Relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistant phenotyp. Cancer Res 47, 1987, pp:5982-5988
- 8 Chin K, Kaimitsu U, Pastan I, et al: Modulation of activity of the promotor of the human MDR1 gege by ras and p53. Science 255, 1992, pp: 459-462
- 9 Combates NJ, Rzepka RW, Chen YN, et al : NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcriton factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promotor. J Biol Chem 269, 1994, pp: 29715-29719

- 10 Roninson I : The Role of the MDR1 (P-Glycoprotein) Gene in Multidrug Resistenz in vitro and in vivo, *Biochemical Phamacology*, Vol. 43, No.1, 1992, pp 95-102
- 11 Lee L, Huang Y, Chen C: Reperessed multidrug resistance genes in *Streptomyces lividans*, *Arch Microbiol* (2003) 180, pp: 176-184
- 12 Roninson IB, Pastan I and Gottesman MM: Isolation and charakterization of human MDR (P-glycoprotein) genes. *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, Ed Roninson, Plenum Press,1991, pp: 91-106
- 13 Ross DD : Novel mechanismus of drug resistance in leukemia. *Leukemia*, 2000, Vol.14, pp: 467-473
- 14 Kolk DM van der, Vellenga E, et all : Expression and activity of breast cancer protein (BRCP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*, 2002, Vol. 99, No.10, pp: 3763-3770
- 15 Rabindran SK, Ross DD, et al : Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Research*, 2000, No 60, pp: 47-50
- 16 Leith CP, Kopecky KJ, et al : Frequency an clinical significance of the expression of the multidrug resistance protein MDR1/P-Glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia. A southwest oncology group study. *Blood*, 1999, Vol. 94, No 3, pp: 1086-1099
- 17 Kitazono M, Sumizawa T et al : Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *Jour of the National Cancer Institute*, 1999, Vol. 91, No 19, pp: 1647-1653
- 18 Sauerbrey A, Voigt A et al : Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de

- novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 2002, Vol. 43, No 4, pp:875-879
- 19 Loe DW, Deeley RG, Cole SPC : Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *European Journal of Cancer*, 1996, Vol. 32A, No.6, pp: 945-957
 - 20 Zeller, zur Hausen : *Onkologie* , 2. Erg.Lfg. 12/96
 - 21 Tallmann MS, Lee S, et al: Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine plus cyclosporine for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Cancer* 1999, Vol.85, pp: 358-67
 - 22 List AF, Kopecky KJ, et al: Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a southwest oncology group study. *Blood* 2001, Vol. 98, No. 12, pp: 3212-20
 - 23 Baer MR, George SL, et al: Phase 3 study of 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* 2000, Vol.100, No.4, pp: 1224-32
 - 24 Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, et al: Correlation of multidrug resistance (mdr1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant mdr (minus)/efflux(positive) and mdr1(positive)/efflux(minus) cases. *Blood* 1995, Vol.86, No.6, pp: 2329-42
 - 25 Solary E, Drenou B, et al: Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomised study in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Blood* 2003, Vol.102, No.4, pp: 1202-10
 - 26 Pirker R, Wallner J, Geissler et al: MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 1991, Vol.83, pp: 708-12

- 27 Olesen LH, Norgaard JM, et al: Validation and clinical implication of a quantitative real-time PCR determination of *mdr1* gene expression: comparison with semi-quantitative PCR in 101 patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2003, Vol.70, pp: 296-303
- 28 Kolk van der DM, Vries de EGE et al: Activity and expression of the multidrug resistance proteins p-glycoprotein, *mrp1*, *mrp2*, *mrp3* and *mrp5* in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001, Vol. 15, pp: 1544-53
- 29 Estay EH: Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2001, Vol.92, No.5, pp: 1059-73
- 30 Schaich M, Harbich-Brutscher E et al: Association of specific cytogenetic aberrations with *mdr1* gene expression in adult myeloid leukemia and its implication for treatment outcome. *Haematologica* 2002, Vol.85, No.5, pp: 455-64
- 31 Schaich M, Illmer T: *Mdr1* gene expression and mutations in *ras* proto-oncogenes in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2002, Vol. 43 (7), pp: 1345-54
- 32 Oselin K, Nowakowski-Gashaw I et al: Quantitative determination of *mdr1* mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphism in the *mdr1* gene. *Eur J of Clin Investigation* 2003, Vol.33, pp: 261-67
- 33 Paitta E: Classical multidrug resistance in acute leukemia. *Med Oncol* 1997, Vol. 14, pp: 53-60
- 34 Te Boekhorst PAW, de Leeuw K et al: Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1993, Vol.82, pp: 3157-62

- 35 List AF: The role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, Vol. 10, pp: 36-38
- 36 Legand O, Simonin G et al: Pgp and MRP activities using calcein-am are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998, Vol. 91, pp: 4480-88
- 37 Fojo A, Lebo R et al: Localization of multidrug resistance-associated dna sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 1986, Vol.12, pp: 415-20
- 38 Danks et al. 1985, Kartner et al. 1985
- 39 S. Hegewisch-Becker : Das Multidrug-Resistenz(MDR1)-Gen im hämatopoetischen System, *Aktuelle Onkologie* 89, 1995
- 40 Shinkel A, Kemp S, Dolle M, et al: N-glycosylation and deletion mutants of human mdr 1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993, Vol. 268, pp: 7474-81
- 41 Scheper R, Broxterman H, et al: Overexpression of a 110 kd vesicular protein in non-P-glycoprotein LRP-relates multidrug resistance. *Cancer Res* 1993, Vol.53, pp: 1475-79
- 42 Diamani D, Michelutti A, et al: P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J of Haematology*, 2002, Vol. 116, pp: 519-27
- 43 Tafuri A, Gregorj C, et al: MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002, Vol. 100(3), pp: 974-81

Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die mir diese Untersuchung möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. med. S. Hegewisch-Becker, ehemalige Assistenzprofessorin in der Medizinischen Klinik II des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Dissertationsthemas und ihre fortwährende Unterstützung und Beratung.

Herrn Prof. Dr. med. D. K. Hossfeld, Direktor der Medizinischen Klinik II (Hämatologie und Onkologie) am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, für seine wissenschaftliche Betreuung.

Allen Mitarbeitern der verschiedenen Archive des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf für Ihre Zeit und Unterstützung bei den Recherchen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pavillons 29A, Forschungspavillon der Medizinischen Klinik II des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf, für die Bereitstellung der Daten.

Insbesondere den Herren M. Supplieth und H.P. Brose des Institutes f. Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg, für Ihre Betreuung bei der statistischen Auswertung der Daten und Ihrer Geduld beim Erlernen des Statistikprogrammes.

Und nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden für die immer wiederkehrende Motivation, insbesondere meine Mutter, T. Linau, M. Crallopp und Dr. M. Brüggemann.

Name: Daniel Schröpfer

Geburtsdatum: 05. Oktober 1972

Geburtsort: Berlin

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Wohnort: Wildboden, CH-7270 Davos-Platz

Schulausbildung: 09/79 – 06/89 Oberschule in Berlin
01/90 – 06/92 Friedrich-Dessauer-Gymnasium
in Frankfurt/Main

Schulabschluß: Abitur

med. Werdegang: 10/92 Beginn des Studienganges „Humanmedizin“
an der Medizinischen Universität zu Lübeck

10/99 Ärztliche Vorprüfung

08/00 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/00 Wechsel an die Universität Hamburg/ UKE

08/01 Famulatur in Prag (Tschechische Republik)

02/02 Famulatur in New Orleans (LA, USA)

09/02 Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung
PJ in Hamburg und Zürich (Schweiz)

10/03 Dritter Abschnitt Ärztliche Prüfung

seit 01/04 Assistenzarzt in Davos-Clavadel (Schweiz)

Daniel Schröpfer

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im November 2004