

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Medizinische Klinik III
(Direktor: Prof. Dr. D. Hoelzer)

**Untersuchungen zu Veränderungen des Zytostatika-
Resistenz Phänotyps
bei Philadelphia Chromosom positiven Leukämien unter
Imatinib Therapie**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von Matthias Hansen
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2003

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Medizinische Klinik III
(Direktor: Prof. Dr. D. Hoelzer)

**Untersuchungen zu Veränderungen des Zytostatika-
Resistenz Phänotyps
bei Philadelphia Chromosom positiven Leukämien unter
Imatinib Therapie**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von Matthias Hansen
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2003

Dekan:

Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent:

Prof. Dr. D. Hoelzer

Koreferent:

Prof. Dr. Dr. G. Geislinger

Tag der mündlichen Prüfung

26.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung der Arbeit.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Leukämien.....	2
2.2	Die akute lymphatische Leukämie (ALL)	2
2.2.1	Epidemiologie der ALL	3
2.2.2	Zytogenetik der ALL	3
2.2.3	Klinik der ALL	3
2.2.4	Therapie der ALL.....	4
2.3	Die chronisch myeloischen Leukämie (CML).....	4
2.3.1	Epidemiologie der CML	5
2.3.2	Klinik und Verlauf der CML.....	5
2.3.3	Bisherige Therapie der CML.....	5
2.4	Die BCR-ABL Translokation	6
2.4.1	Struktur und Funktion von ABL.....	7
2.4.2	Struktur und Funktion von BCR.....	8
2.4.3	Besonderheiten von BCR-ABL und seine Signalpfade.....	8
2.5	Imatinib (Glivec TM), ein spezifischer Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase.....	11
2.5.1	Imatinib (Glivec TM) in der klinischen Anwendung.....	12
2.5.2	Imatinib Resistenz	13
2.6	Pleiotrope Zytostatika Resistenz (<i>multidrug resistance</i>) durch P-gp und MRP1 14	
2.6.1	Das MDR-1 Gen codierte P-Glycoprotein (P-gp).....	15
2.6.2	Das <i>Multidrug resistance associated</i> Protein, MRP1.....	17
2.6.3	MRP2 oder cMOAT	20
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Primäre Patientenzellen und Zelllinien	21
3.1.1	Primäre Patienten Zellen	21
3.1.2	Eigenschaften und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien	21
3.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot.....	23
3.2.1	Zellyse	23
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektrophotometers .	23
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.2.4	„Western Blotting“, Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran	25
3.2.5	Immundetektion von Proteinen.....	26
3.3	RNA Isolierung und Quantifizierung für die RT-PCR von MRP1 und MDR1 ..	27
3.3.1	RNA-Isolation	27
3.3.2	Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Kontrolle der RNA Qualität in einem Agarosegel	27
3.3.3	RT-PCR zur Detektion von MRP1 bzw. MDR1mRNA	28
3.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Lokalisierung von MRP-1	28
3.5	Durchflußzytometrie	30
3.5.1	Durchflußzytometrie zur Untersuchung der cKIT Expression in Zelllinien	30
3.5.2	Durchflußzytometrie zur Untersuchung der MRP1 Proteinexpression	31
3.5.3	Calcein-Assay zur Beurteilung der funktionellen Aktivität von MRP1 und P- gp	32
3.6	Transwell-Assays für Substrattransport-Experimente.....	35
3.6.1	Transwell-Assay zum Nachweis einer Imatinib bedingten Inhibition des [³ H]-Vinblastin Transports	37
3.6.2	Imatinib-Transport im Transwell-Assay	39

4	Ergebnisse.....	40
4.1	Einfluß der BCR-AbL Tyrosinkinase-Aktivität auf P-gp und MRP1 Expression und Funktion	40
4.1.1	Veränderungen der MRP-1 Proteinexpression bei in Imatinib kultivierten Philadelphiachromosom positiven Zelllinien	40
4.1.2	Einfluß von Imatinib auf die c-myc Expression und die MAPK-Aktivität ..	46
4.1.3	MRP1-mRNA Expression in BCR-ABL positiven Zelllinien nach Kultivierung in Imatinib.....	49
4.1.4	Die Durchflußcytometrische Betrachtung der MRP-1 Proteinexpression nach Imatinib Behandlung	51
4.1.5	Calcein-Assay von Imatinib behandelten Ph ⁺ -Zelllinien zur Bestimmung der <i>multidrug resistance activity</i>	53
4.1.6	Immunfluoreszenz Mikroskopie von Imatinib behandelten Ph ⁺ Zelllinien zum Nachweis von Veränderung der MRP1 Lokalisation	54
4.1.7	FACS Analyse zum Ausschluß einer c-Kit (CD117) Expression in den verwendeten BCR-ABL positiven Zelllinien	55
4.2	Rolle der ABC-Transporter P-gp und MRP1 bei der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib bei Patienten mit Ph ⁺ ALL.....	56
4.2.1	Etablierung eines modifizierten Calcein-Assays unter Verwendung der 2008 Zelllinie und ihrer MRP1 und MDR1 Transfektanten.....	57
4.2.2	Imatinib als Inhibitor des Calceintransport durch P-gp	65
4.2.3	Imatinib als Inhibitor des Vinblastin Transport durch P-gp.....	67
4.2.4	Imatinib Transport durch P-gp im Transwell	70
4.2.5	Vergleich der <i>multidrug resistance</i> Aktivität vor und nach Entwicklung einer Imatinibresistenz bei Patienten mit Ph ⁺ ALL	72
5	Diskussion	76
5.1	Stellenwert von P-gp und MRP1 bei der Resistenz Entwicklung von Patienten mit Philadelphia positiver Leukämie gegenüber Imatinib.....	76
5.1.1	Imatinib als Substrat und Inhibitor des P-gp-Transports.....	76
5.1.2	P-gp-Funktion bei Patienten mit Ph ⁺ ALL nach sekundärer Resistenzentwicklung	79
5.2	Bedeutung von MRP1 und P-gp für die Resistenz von BCR-ABL positiven Zelllinien gegenüber Zytostatika.....	84
6	Zusammenfassung	90
7	Conclusion	92
8	Literaturverzeichnis.....	94
9	Danksagung	108
10	Lebenslauf.....	109
11	Schriftliche Erklärung	110

1 Zielsetzung der Arbeit

Die BCR-ABL positiven Leukämien weisen eine hohe Resistenz gegen konventionelle Hochdosischemotherapie auf, und daraus resultierend ein schlechtes Ansprechen auf konventionelle Therapieschemata. Ein neues Behandlungsprinzip, der Eingriff in die Signaltransduktion, ist mit dem BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib möglich. Dieser hemmt die durch die reziproke Translokation entstandene deregulierte und exzessiv aktive Tyrosinkinase des chimären Translokationsprodukts BCR-ABL. In der klinischen Anwendung tritt bei vielen Patienten, z.T. nach Anfangs gutem Ansprechen, eine Resistenz gegen dieses neue Medikament auf, deren Ursache ungeklärt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob der BCR-ABL Signaltransduktionsweg bzw. die Hemmung der BCR-ABL Tyrosinkinase einen Einfluß auf die Expression der pleiotrope Zytostatikaresistenz vermittelnden ABC-Transporter P-gp und MRP1 hat. Würde etwa aktiviertes BCR-ABL zu einer Hochregulation von MRP1 oder P-gp führen, könnte dies als Erklärung für das schlechte Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie dienen. Reguliert BCR-ABL umgekehrt durch seine Tyrosinkinase-Aktivität die beiden Transport Proteine direkt herunter, würde eine Inhibition der Kinase Aktivität mit Imatinib, eine vermehrte Produktion dieser Proteine nach sich ziehen, was als mögliche Erklärung für die Imatinib Resistenz dienen könnte. Außerdem sollte die Arbeit eine Antwort auf die Frage finden, ob Imatinib von MRP1/P-gp transportiert wird, was Voraussetzung für eine durch Transportproteine ausgelöste Resistenz ist, und ob es bei den Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden, zu einem Anstieg der Aktivität dieser Transport Proteine kommt

2 Einleitung

2.1 Leukämien

Unter dem von R. Virchow geprägten Begriff Leukämie versteht man eine systematische diffuse autonome Proliferation eines abnormen Zellstammes der leukozytenbildenden Systeme, welche mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Zellausschwemmung ins periphere Blut einhergeht. Leukämien sind definitionsgemäß monoklonal, d.h. das Leukämie induzierende Ereignis lässt sich auf die maligne Transformation einer Zelle zurückführen. Sie sind eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen der hämatopoetischen Zellen. Nach dem Zelltyp der malignen Zellen unterscheidet man zwischen myeloischen und lymphatischen, nach ihrer Entstehungsweise und Verlaufsform zwischen akuten und chronischen Leukämien. Die Behandlung von Leukämien erfolgt meist mit polychemotherapeutischen Regimes, die vor allem die stark proliferierenden leukämischen Zellen treffen. Da auch andere stark proliferierende Gewebe getroffen werden, kommt es zu schweren z.T. tödlichen Nebenwirkungen. Ein Eingriff in die tumorspezifische Signaltransduktionskaskade, wie er mit dem BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib möglich ist, ist im Vergleich zur herkömmlichen Polychemotherapie ein neuer Ansatz, der verträglicher ist, wenn die Wirkung nur den transformierten Zellklon trifft.

2.2 Die akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL hat ihren Ursprung in der malignen Transformation unreifer lymphatischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, dem Thymus, oder den anderen lymphatischen Gewebe. Bei der akuten lymphatischen Leukämie kommt es zu einer extremen klonalen Proliferation und Akkumulation von lymphatischen Blasten. Charakteristischerweise kommt es zur Ausschwemmung der pathologischen Lymphoblasten ins Blut, und zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Es liegt ein Differenzierungsblock vor [1]. Die malignen Blasten können Lymphknoten, Leber, Milz, Meningen und andere Körperorgane infiltrieren.

2.2.1 Epidemiologie der ALL

Die ALL tritt häufiger im Kindesalter auf als bei Erwachsenen, mit Häufigkeitsgipfeln im 3. Lebensjahr und im 7. Lebensjahrzehnt. Die Inzidenz liegt bei 1 Erkrankung / 100.000 Einwohner > 15 Jahre pro Jahr [2] .

2.2.2 Zytogenetik der ALL

In 60 bis 85 % der ALL-Patienten können numerische oder strukturelle Chromosomen-Aberrationen, wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen, nachgewiesen werden, denen eine ursächliche Bedeutung in der Leukämogenese zugeschrieben wird [2]. Dass zytogenetische Abnormitäten die klinische Prognose beeinflussen, wurde erstmals 1978 von Secker-Walker et al. berichtet [3], die zeigen konnten, dass ein hyperdiploider gegenüber einem hypodiploiden Karyotyp eine bessere Prognose hat. Chromosomen-Aberrationen führen entweder zur Aktivierung von Genen, die normalerweise während der Hämatopoese nicht, oder weniger exprimiert sind, oder zur Bildung von chimären Genen, die den hämatopoetischen Vorläuferzellen Funktionen vermittelt, welche sie normalerweise nicht inne haben. Chromosomenbruchstellen, die in internen Intronen oder Exonen der beteiligten Gene liegen, führen zur Bildung von chimären Genen, deren Produkte entweder anders reguliert werden als die jeweiligen Wildtyp-Genprodukte oder die Funktion der beteiligten Genprodukte modifizieren. Die häufigste Translokation bei Erwachsenen ALL-Patienten ist die reziproke Translokation von Chromosom 9 und Chromosom 22, aus der das sogenannte Philadelphia-Chromosom hervorgeht, die in 15-30 % der Fälle vorliegt [4, 5]. Sie ist mit höherem Alter, stärkerer Leukozytose, L2 Morphologie und einer schlechten Prognose von weniger als 10 % Langzeitüberleben assoziiert [4-6]. Etwa die Hälfte dieser Patienten haben zusätzliche chromosomale Anomalien, z.B. eine Monosomie 9.

2.2.3 Klinik der ALL

Der Beginn ist meist plötzlich mit Fieber, Abgeschlagenheit und Nachtschweiß. Infolge der Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt es zu Granulozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie, was mit einer vermehrten Anfälligkeit für Infekte durch Bakterien und Pilze, Anämie bedingter Blässe, Müdigkeit und Dyspnoe und einer vermehrten Blutungsbereitschaft mit Blutungen aus Nase, Magendarm Kanal und Urogenitaltrakt einhergeht. Durch Organinfiltration kommt es in einem Teil der Fälle zu Splenomegalie, Hepatomegalie und Lymphadenopathie und ZNS Symptomatik [5].

2.2.4 Therapie der ALL

Behandlungsprinzip der ALL bei Erwachsenen ist die aggressive Kombinationschemotherapie nach dem GMALL Studienprotokoll [7]. In die Therapieplanung gehen die verschiedenen Risikofaktoren ein. Die Behandlung gliedert sich in mehrere Phasen, die Induktionstherapie der eine Vorphase vorausgehen kann, und die Postinduktions- oder Konsolidierungsbehandlung. Im Anschluß erfolgt für 1 1/2 Jahre eine Erhaltungstherapie. Während der Behandlungszeit wird eine ZNS-Prophylaxe mit Schädelbestrahlung und intrathekaler Chemotherapie durchgeführt.

Durch diese Maßnahmen läßt sich bei etwa 80% der Patienten eine Vollremission erzielen, in 40 % der Patienten erreicht man eine Langzeitremission. Patienten mit schlechten prognostischen Faktoren, etwa 60% der Erwachsenen ALL-Patienten, haben nur eine Heilungsrate von 20 % während Patienten ohne diese Faktoren Heilungsraten von 60 % haben. Schlechte prognostische Faktoren sind hohes Alter, hohe Leukozytenzahlen und das Philadelphia-Chromosom [8]. Bei Hochrisiko-Patienten ist in der ersten kompletten Remission eine Knochenmarktransplantation zu erwägen. Die Philadelphia Chromosom positive ALL ist charakterisiert durch einen aggressiven Verlauf und ein Langzeitüberleben von weniger als 10% mit üblichen chemotherapeutischen Regimes [6]. Und obwohl die allogene Stammzelltransplantation potentiell kurativ ist, sind Rückfälle trotz myeloablativer Konditionierung häufig. Resistenz gegen eine Reihe von Zytostatika ist eines der Charakteristika der Ph⁺ALL. Die Ursache dieser Zytostatika Resistenz ist noch nicht ausreichend geklärt.

2.3 Die chronisch myeloischen Leukämie (CML)

Eine weitere Erkrankung, bei der das Philadelphia Chromosom eine herausragende pathogenetische Bedeutung hat, ist die CML.

Die CML hat ihren Ursprung in der malignen Entartung einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks. Sie gehört zu den chronisch myeloproliferativen Erkrankungen und ist dadurch gekennzeichnet, dass das periphere Blut massiv mit Zellen der ganzen Myelopoese, aller Reifungsstufen, oft mit hohem Basophilenanteil überschwemmt wird. Sie war die erste Leukämie bei der eine Assoziation mit einer chromosomalen Abnormität nachgewiesen werden konnte [9]. Bei mehr als 90% der CML Patienten findet sich das aus der reziproken Translokation t(9;22) hervorgehende Philadelphia Chromosom. Etwa 5-10% weisen keine Philadelphia Translokation auf, wobei sich bei etwa der Hälfte molekulargenetisch eine BCR-ABL Rekombination findet. Die übrigen

Fälle repräsentieren verschiedene Formen myeloproliferativer Erkrankungen mit insgesamt schlechter Prognose. Der genetische Defekt führt zu einer so weitgehenden Expansion des betroffenen Zellklons, dass sich in der Regel schon bei der Diagnosestellung in allen teilungsfähigen Knochenmarkszellen das Philadelphia Chromosom nachweisen lässt.

2.3.1 Epidemiologie der CML

Die CML tritt bevorzugt im mittleren und höheren Lebensalter auf, und besitzt eine Inzidenz von 1-1,5 Erkrankung pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Das mediane Alter bei Diagnose liegt bei 60 Jahren [10].

2.3.2 Klinik und Verlauf der CML

Die CML verläuft phasisch. Die chronische Phase, bei der es noch zur Ausreifung der myeloischen Zellen kommt, ist im Durchschnitt 4-5 Jahre stabil. Sie geht mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Nachtschweiß und Oberbauchbeschwerden einher. Letztere rühren von der durch extrameduläre Blutbildung verursachten Splenomegalie. Im Verlauf der Erkrankung entstehen durch genetische Instabilität zusätzliche Chromosomenveränderung (Ph-Duplikation, Isochromosom 17, Trisomie 8, Trisomie 19), was zum Übergang in die akzelerierte Phase mit zunehmender Leukozytose, Anämie, Thrombozytopenie führt. Nach einer Dauer von durchschnittlich 6-18 Monaten kommt es durch erneute Mutationen (p53/mdm-2, Rb-1, Ras) zur Blastenkrise mit heftigen therapierefraktären Allgemeinsymptomen und der Zunahme unreifer Zellen im Blutbild, wie es für akute Leukämien typisch ist. In 2/3 der Fälle ist der Blastenphänotyp myeloisch, bei den übrigen lymphatisch [10].

2.3.3 Bisherige Therapie der CML

Eine Behandlungsindikation besteht bei ausgeprägter Leukozytose, Thrombozytose, Anämie, symptomatischer Splenomegalie oder schweren Allgemeinsymptomen. Interferon α wird bevorzugt eingesetzt und führt bei mehr als 50 % der Patienten zu hämatopoetischen Remissionen, in 10 % der Fälle gar zu einer kompletten zytogenetischen Remission mit absinken des Philadelphia-Chromosom positiven Zellklons unterhalb die Nachweisgrenze [11]. Mittels PCR bleibt das BCR-ABL-Gen aber weiter nachweisbar, so dass es auch hier nach Absetzen der Therapie zum

Rezidiv kommt. Hydroxyharnstoff ist ebenso wirksam führt aber ebensowenig zu einer Eradikation des malignen Zellklons, sondern lediglich zur Reduktion der leukämischen Zellmasse. Einzig kurativer Ansatz ist derzeit die allogene Knochenmarkstransplantation. Die Blastenkrise wird je nach Zelltyp nach den gleichen Therapieschemata behandelt wie die akute myeloische bzw. die akute lymphatische Leukämie [12].

2.4 Die BCR-ABL Translokation

Das Philadelphia Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22 welches aus der reziproken Translokation, $t(9;22)-(q34;q11)$, zwischen den langen Armen von Chromosom 9 und 22 zustande kommt [9, 13]. Es findet sich bei mehr als 90% der CML Patienten und bei 15-30% der erwachsenen ALL-Patienten. Die Philadelphia Translokation fügt ein 3´Segment des ABL-Gens von Chromosom 9q34 an das 5´Segment des BCR-Gens auf Chromosom 22q11, wodurch das BCR-ABL-Hybridgen entsteht (siehe Abb.1). Das ABL –Gen codiert für eine non-Rezeptor Tyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von 145 kD. Die exakte Lage der Bruchpunkte variiert von Patient zu Patient. Im ABL-Gen streuen die Brüche über eine große Distanz von 200 kb im ersten Intron. Dagegen konzentrieren sich die Bruchereignisse im BCR-Gen in 2 Regionen, die als M-bcr (major-breakpoint cluster region) und m-bcr (minor-bcr) bezeichnet werden. Bei nahezu allen CML Patienten liegen die Brüche in der 5,8 kb großen, die Exons 12 bis 16 (historisch als b1 bis b5 bezeichnet) umfassenden M-bcr, was zu einem b2a2 bzw. einem b3a2 Fusionstranskript führt (siehe Abb.1). Es codiert für ein 210 kDa Fusionsprotein [14]. Bei etwa 50 % der Philadelphia Chromosom positiven erwachsenen ALL-Patienten liegen die Brüche im 3´-Bereich des ersten BCR-Introns, der m-bcr, was nach splicen der Exone e1´ und e 2´ zu einer e1a2 BCR-ABL m-RNA führt, und damit zu einem 190 kDa BCR-ABL Fusionsprotein (siehe Abb. 1) [15].

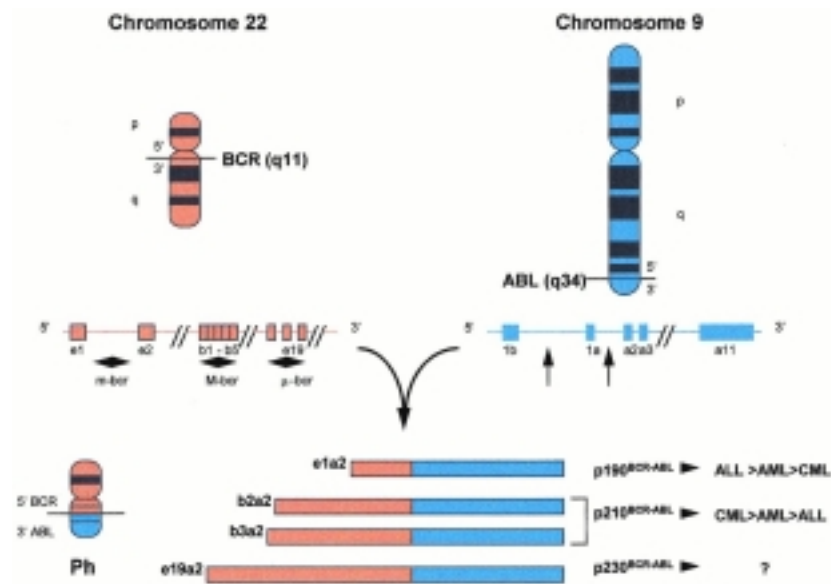


Abb. 1: Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ und ihr Fusionsprodukt (Abb. aus [2])

Das Philadelphia Chromosom kommt durch die reziproke chromosomale Translokation eines 3'abl Segments von Chromosom 9 an ein 5'-bcr Segment auf Chromosom 22 zustande. Während die Bruchpunkte im ABL-Gen 5' von Exon a2 auftreten, gibt es unterschiedliche Bruchpunkt Regionen im BCR-Gen auf Chromosom 22. Abhängig von der Bruchpunktlokalisierung in Chromosom 22, werden unterschiedlich große Segmente des BCR-Gens an das ABL-Gen Segment fusioniert. Es resultieren unterschiedliche BCR-ABL Protein Produkte (p190, p210, p230).

2.4.1 Struktur und Funktion von ABL

Das ABL-Gen codiert für eine ubiquitär expremierte non-Rezeptor Tyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von 145 kDa, welche sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert ist [16]. Im Bereich seiner N-terminalen Region besitzt ABL 3 SRC-homologe Domänen (SH1-3), wobei die SH1 Domäne die Tyrosinkinase-Aktivität besitzt, die durch die SH2 Domäne positiv und durch die SH3-Domäne negativ reguliert wird [17]. Im Zentrum des Proteins liegen Prolin reiche Regionen die mit SH3 Domänen andere Proteine wie CRK interagieren können [18]. Im Bereich des C-Terminalen Endes findet sich ein nukleäres Lokalisierungssignal [19], ein DNA-Bindungsmotiv und eine F-Aktin Bindungsdomäne [20]. Dem ABL-Protein werden eine Reihe unterschiedlicher Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus und der Auslösung des programmierten Zelltodes zugeschrieben. Beispielsweise soll nukleäres ABL durch Stress aktiviert werden und p73 induzieren, ein proapoptotisches p53-Homolog [21].

2.4.2 Struktur und Funktion von BCR

Die physiologische Funktion des ubiquitär exprimierten 160-kDa Proteins BCR ist unklar. Das erste N-terminale Exon codiert für eine Serin-Threonin Kinase. Es folgt ein *coiled-coil* Motiv, welches es BCR erlaubt zu dimerisieren [22]. Im Zentrum des Moleküls finden sich dbl ähnliche und Pleckstrin homologe Domänen, welche einen Austausch von GDP durch GTP in Rho-*guanidine exchange*- Faktoren ermöglicht. Der C-Terminus besitzt GTPase Aktivität für Rac, einem Mitglied der RAS Superfamilie, welche beispielsweise die Actinpolymerisierung und die NADPH-Aktivität in Phagozyten reguliert [23]. Zudem kann BCR an Tyrosine 177 phosphoryliert werden, welches dann Grb-2, ein Adaptermolekül des Ras- Signalpfades, binden kann [24].

2.4.3 Besonderheiten von BCR-ABL und seine Signalpfade

Die onkogenen Varianten von ABL, also p210 BCR-ABL und p190 BCR-ABL aber auch v-ABL, sind chimäre Fusionsproteine. Die reziproke chromosomale Translokation von Chromosom 9 und 22 führt zu einer deregulierten Tyrosinkinase-Aktivität und zur exzessiven Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Proteine, einschließlich BCR-ABL selbst, und dadurch zur Stimulation multipler Signaltransduktionswege. Dies führt zu Veränderungen der Proliferation, der Differenzierung und des Adhäsionsverhalten der Zellen. Zudem wirkt BCR-ABL antiapoptisch.

Tyrosin-spezifische Proteinkinasen sind weitverbreitete Werkzeuge der Signalleitung. Sie sind beispielsweise in die Aktivierung der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren, eingeschaltet. Der PDGF-Rezeptor und der SCF-Rezeptor sind klassische Rezeptortyrosinkinasen, deren katalytisches Zentrum durch Bindung eines extrazellulären Wachstumsfaktors aktiviert wird. Typischerweise kommt es neben der Phosphorylierung von Substratproteinen auch zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinase-Domäne, hierdurch zur weiteren Aktivierung der Tyrosinkinase durch Aufhebung der Autoinhibition und zur Schaffung von Bindungsstellen für zugeordnete Signalmoleküle. Im Gegensatz zu den Rezeptortyrosinkinasen gehört, BCR-ABL wie ABL zur Gruppe der Nicht-Rezeptortyrosinkinasen. Die Fusion mit dem bcr-Gen führt zur einer zytoplasmatischen Lokalisation und zu einer gesteigerten Aktivität der ABL-Tyrosinkinase, dadurch zur konstitutiven Aktivierung potentiell transformierender Signalpfade.

Die Aktivierung einer C-terminalen ABL-Domäne, die für die Kopplung mit F-Actin sorgt, durch das N-Terminale *coiled-coil* Motiv von BCR führt zur Kopplung von BCR-ABL an

das Zytoskelett, und verhindert den Übertritt in den Zellkern, wo ABL in nicht transformierten Zellen eine antiproliferative Rolle spielt [22]. Die zytoplasmatische Lokalisation ist essentiell für das Onkogen BCR-ABL. Wird BCR-ABL mit Hilfe von Leptomycin B in den Zellkern eingeschlossen, so wirkt es wie ABL proapoptotisch [25]. BCR interferiert mit der Kinase inhibitorischen ABL Domäne SH3, was zur konstitutiven Aktivierung der BCR-ABL Tyrosinkinase führt. Eine große Zahl von Substraten kann durch BCR-ABL an Tyrosinresten phosphoryliert werden. Bedeutsam ist vor allem die Autophosphorylierung von BCR-ABL, weil sie die Bindung von SH2 Domänen anderer Proteine ermöglicht [26]. Die Autophosphorylierung von Tyrosine 177 ermöglicht die Bindung von Grb 2 [27] über die Bindung von SOS kommt es dann zur Aktivierung der kleinen GTPase RAS.

Der RAS-Signaltransduktionsweg ist ein Pfad der durch Wachstumsfaktoren und Tyrosinkinasen aktiviert wird. Vermittelt durch RAF und die Serin-Threonin-Kinasen MEK1 und MEK2 wird die p44/42 MAP-Kinase (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Erk1/2 aktiviert, welche sodann in den Nukleus transloziert wird, wo sie Transkriptionsfaktoren aktiviert. Ein konstitutiv aktiviertes RAS führt zur Transformation von Zellen und spielt auch in der Pathogenese von BCR-ABL eine wichtige Rolle [28, 29].

Wie bei vielen anderen Tumoren ist auch bei der BCR-ABL positiven Leukämie der Transkriptionsfaktor c-Myc überexprimiert, was für die Transformation essentiell ist [30, 31]. C-myc ist ein Mitglied der myc-Genfamilie, die aus 7 engverwandten Genen besteht, und spielt eine Rolle bei der Proliferation, Transformation und Differenzierung von Geweben [32]. Die c-Myc Expression wird durch Bindung von E2F1 an den c-myc-Promotor erhöht. E2F1 wiederum wird durch STAT5 und RAS aktiviert [33, 34].

BCR-ABL aktiviert durch direkte Phosphorylierung den Transkriptionsfaktors STAT 5 [35]. Die STAT Transkriptionsfaktoren sind in der Signaltransduktion vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren involviert und regulieren Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen [36]. STAT5, beispielsweise wird physiologisch durch IL3 aktiviert [37]. Die Aktivierung von STAT5 durch BCR-ABL führt zur vermehrten Expression von BCL-X_L und wirkt dadurch antiapoptotisch [34, 38-40]. Auch der PI3-Kinaseweg ist in den antiapoptotischen Effekt von BCR-ABL involviert [41]. Die aktivierte PI3 Kinase aktiviert AKT [42]. Diese Proteinkinase, die auch durch IL3 aktiviert werden kann, wirkt antiapoptotisch durch Phosphorylierung des proapoptotischen BAD. Phosphoryliertes BAD ist nicht mehr in der Lage antiapoptotische Proteine, wie BCL-X_L zu binden, und dadurch Apoptose auszulösen [43]. AKT kann ausserdem eine Hochregulation von c-

Myc und BCL-2 (einem weiteren antiapoptotischen Transkriptionsfaktor) bewirken [42]. Eine Reihe weiterer Substrate ist in der transformierenden Wirkung von BCR-ABL involviert [26, 44-47].

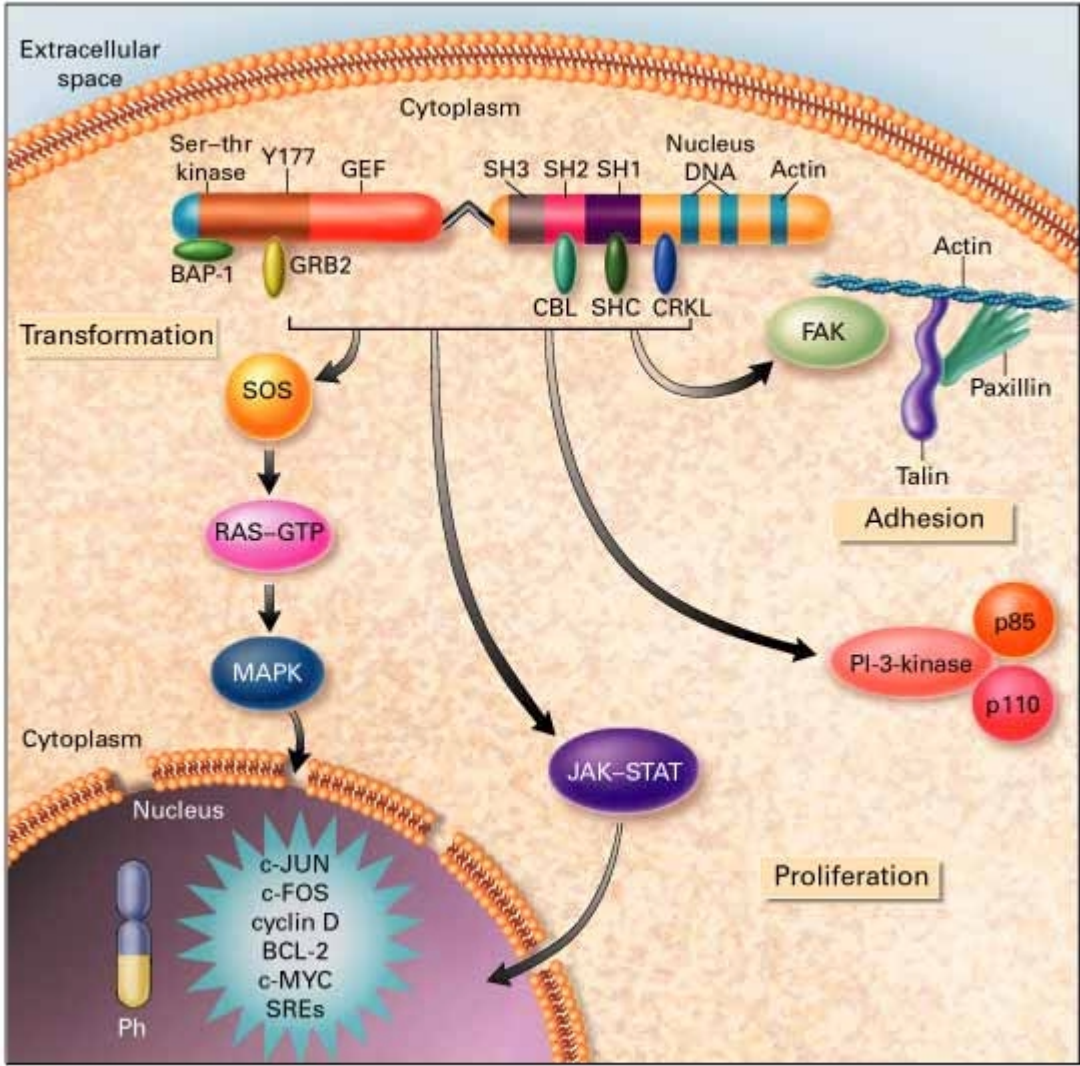


Abb.2 stellt schematisiert einige Eigenschaften bzw. Signaltransduktionswege von BCR-ABL dar (Abb. nach [44]).

2.5 Imatinib (Glivec™), ein spezifischer Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase.

Die exzessive Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL ist der Ausgangspunkt der transformierenden Eigenschaften des Philadelphia Chromosoms [48]. Der Einsatz von Tyrosinkinase Inhibitoren soll BCR-ABL, die Fähigkeit transformierend auf Zellen einzuwirken, nehmen. Durch Hemmung der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase-Aktivität soll die Signaltransduktionskaskade an ihrem Ursprung durchbrochen werden. Eine Reihe von Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. das Antibiotikum Herbimycin A sind in der Lage, das Wachstum BCR-ABL positiver Zellen zu hemmen [49], und Differenzierung zu induzieren [50]. Die natürlich vorkommenden Tyrosinkinasen haben jedoch den Nachteil das sie auch andere Tyrosinkinasen unspezifisch inhibieren. Hierdurch ist ein klinischer Einsatz nicht möglich.

In der Mitte der neunziger Jahre wurde Imatinib in einem Kinaseinhibitor Programm der Firma Ciba Geigy (jetzt Novartis) bei der Suche nach Inhibitoren der PDGF-Rezeptortyrosinkinase synthetisiert, und als ein potenter und selektiver Inhibitor der BCR-ABL Tyrosinkinase identifiziert [51]. Imatinib Mesylat, Handelsname Glivec™(Novartis), wurde früher als STI 571, und davor als CGP57148b bezeichnet. Es ist ein 2-Phenylaminopyrimidin (siehe Abb. 3b), das im hochkonservierten Nukleotidbindungsbereich der katalytischen Domäne der ABL-Tyrosinkinase bindet, was kompetitiv die Bindung von ATP verhindert. Hierdurch verhindert Imatinib Mesylat Substratphosphorylierung und Autophosphorylierung von BCR-ABL [52] (siehe Abb.3a).

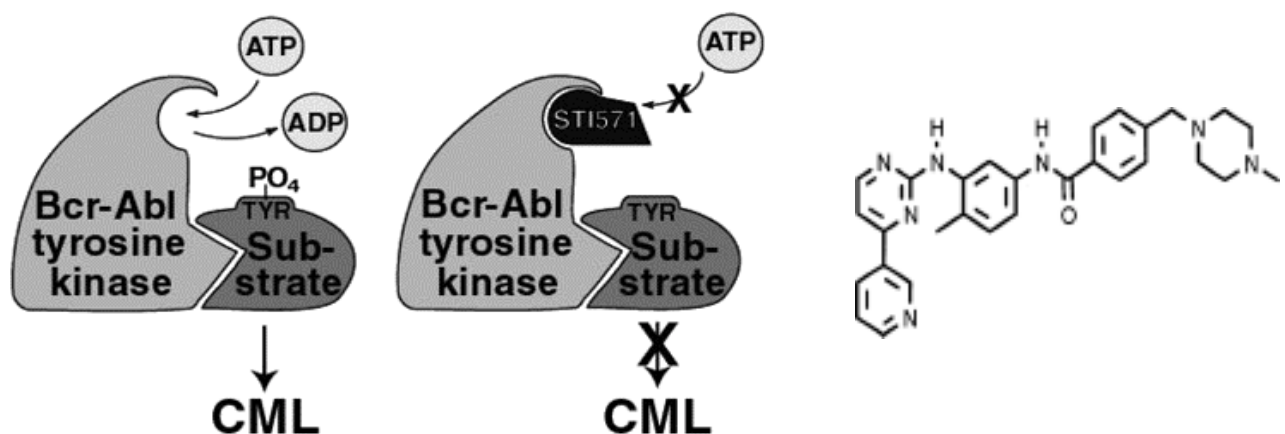


Abb. 3a (links) veranschaulicht die Wirkungsweise von Imatinib (Abb. nach [10]). Durch kompetitive Bindung im Bereich des katalytischen Zentrums der Tyrosinkinase verhindert das 2-Phenylaminopyrimidin Imatinib die Bindung von ATP, und damit die Phosphorylierung von Tyrosinresten der Substratproteine. Abb.3b (rechts) stellt die Molekülstruktur von Imatinib dar.

Neben BCR-ABL werden durch Imatinib auch die Tyrosinkinase von ABL, v-ABL, ARG, die des PDGF-Rezeptors und die des C-Kit Rezeptors (CD 117) in submikromolaren Konzentrationen kompetitiv inhibiert [53, 54]. Imatinib zeigte *in vitro* und im Mausmodell eine Hemmung des Wachstums BCR-ABL positiver Zelllinien und primärer CML-Zellen, während BCR-ABL negative Zelllinien nicht beeinflusst wurden [55-58].

2.5.1 Imatinib (Glivec™) in der klinischen Anwendung

Zur Dosisfindung begann 1998 eine Phase I Studie, die Interferon α refraktäre CML Patienten einschloss [59]. Es wurden orale Dosen zwischen 25 und 1000 mg täglich oral gegeben. Obwohl sowohl abl, c-kit als auch pdgf-rezeptor-gen negative Tiere z.T. letale Missbildungen entwickeln [60], waren die unerwünschten Nebenwirkungen trotz suffizienter Hemmung auch dieser Kinasen überraschend gering. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Übelkeit, Myalgie, Ödeme und Diarrhoe. Die bei einigen der Patienten observierte Myelosuppression erklärt sich durch die dominante Rolle, die der BCR-ABL positive Zellklon in der Hämatopoese dieser Patienten ausmacht. Sie war bei Patienten mit GIST-Sarkomen („*gastrointestinal stromal tumor*“), bei denen eine konstitutiv aktive C-Kit Mutation vorliegt, nicht beobachtet worden [61]. Bei Dosen über 300 mg sprach ein grosser Teil der CML Patienten in der chronischen Phase, aber auch der CML Patienten mit myeloischer Blastenkrise an.

Phase II Studien folgten und zeigten für CML-Patienten in der chronischen Phase eine Ansprechrate von 95 %, bei 41 % mit kompletter zytogenetischer Remission. Nur 9 % hatten nach 18 Monaten Therapie einen Rückfall [62]. Patienten mit Philadelphia-positiver CML in der akzelerierten Phase zeigten Ansprechraten bis 82 %, davon 17 % mit kompletten zytogenetischen Ansprechen. 59% dieser Patienten waren 12 Monate lang progressionsfrei. Eine Dosis von 600 mg zeigte mehr Effektivität als kleinere Dosen [63]. Bei Patienten mit CML in myeloider Blastenkrise lag die Ansprechrate bei 52 %, davon zeigten 8 % der Patienten ein komplettes hämatologisches Ansprechen. Bei 22 % der Patienten war die Ansprechdauer länger als einem Jahr [64]. Die Ansprechraten bei Patienten mit lymphoider Blastenkrise und Ph⁺ALL lagen bei 29 % für komplettes Ansprechen (CHR 19 %, CMR 10 %). Weitere 31 % zeigten ein partielles Ansprechen. Jedoch hatten die Patienten, die Ansprechen, nach durchschnittlich 2,2 Monaten einen Rückfall [65]. Da Imatinib nicht nur die Tyrosinkinasen von BCR-ABL, sondern auch die des PDGF-Rezeptors, des SCF-Rezeptors C-Kit und von ARG inhibiert, sind auch Anwendungen möglich bei denen diese Tyrosinkinasen in die

Pathogenese involviert sind. Für GIST-Sarkome, bei denen aktivierte c-KIT Mutationen eine pathogenetische Ursache sind, haben bereits klinische Studien, eine Wirksamkeit von Imatinib nachweisen können, mit Remissionsraten um 60 % [61]. C-Kit spielt aber auch bei einigen Formen von akuten myeloischen Leukämien, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Keimzelltumoren, Myelomen und Neuroblastomen eine Rolle, so dass es sich auch bei diesen Tumoren lohnen könnte, eine Anwendung von Imatinib zu untersuchen [66, 67]. Bei Patienten mit chronisch myelomonocytärer Leukämie liegt ein chimärer konstitutiv aktiver Tel-PDGF-Rezeptor als Resultat einer Translokation von Chromosom 5 und 12 vor. Auch hier war Imatinib wirksam [68]. In Glioblastomen besteht eine autokrine Aktivierung des PDGF-Rezeptors, die durch Imatinib inhibiert wird [69].

2.5.2 Imatinib Resistenz

Resistenzen gegenüber Imatinib bei Patienten mit Ph⁺ALL und bei Patienten mit CML stellen das Hauptproblem in der Therapie mit diesem neuen Wirkstoff dar. Resistenz gegen Imatinib schließt das primäre Nichtansprechen, und den Rückfall nach initialem hämatologischem Ansprechen ein (bei der Ph⁺ALL sprachen 40 % der untersuchten Patienten weder komplett noch partiell an; alle Patienten die Ansprechen hatten einen Rückfall). Analysiert man die möglichen Ursachen, die zu einer Resistenz führen können, so ist zum einen an zusätzliche Mutationen zu denken, welche trotz vollständiger Inhibition der BCR-ABL Tyrosinkinase das Wachstum und Überleben des malignen Zellklons sichern. Diese Ursache ist also BCR-ABL unabhängig. Zusätzliche Mutationen sind nicht nur in der akzelerierten Phase der CML und in der Blastenkrise der CML häufig, sondern auch bei der Ph⁺ALL [70]. Eine weitere Ursache für eine Resistenzentwicklung ist die Reaktivierung der BCR-ABL Kinase.

Der am weitesten verbreitete Resistenzmechanismus, der bei *in vitro* Experimenten auftrat, war eine bcr-abl-Gen Amplifikation [71]. In den Imatinib resistenten LAMA84R und in den mit bcr-abl p210 transfizierten BA/F3 Zellen liess sich nach Imatinib Langzeitexposition eine bcr-abl-Gen Amplifikation nachweisen, während bei K562r lediglich die BCR-ABL Proteinexpression gesteigert war [72, 73]. Ausserdem war bei Überexpression von BCR-ABL in 32D Zellen Imatinib vermindert wirksam [74]. Bei CML-Patienten die nach initialem Ansprechen einen Rückfall erlitten, zeigte sich, dass die Tyrosinkinaseaktivität zum Zeitpunkt des Ansprechens durch Imatinib inhibiert wird, während sie nach dem Rückfall trotz Imatinib reaktiviert ist. Als Ursache liessen sich bei

etwa der Hälfte der Untersuchten Patienten Punktmutationen in der ABL-Kinase nachweisen, die zu einem Verlusts der Sensitivität der Tyrosinkinase gegenüber Imatinib führen [75-78]. In einem Drittel der Fälle liessen sich bei den Patienten BCR-ABL Amplifikationen nachweisen [75, 76]. Auch bei 67 % der untersuchten Patienten mit Philadelphia positiver akuter lymphatischer Leukämie liess sich eine Punktmutation in der ABL-Kinase nachweisen, die nach dem Rückfall auftrat [79]. Ein anderer Mechanismus wurde mittels eines Nacktmaus-Xenograft-Modells identifiziert. Dazu wurden Nacktmäusen BCR-ABL positive KU812 Zellen gespritzt, und dann eine Therapie mit Imatinib durchgeführt. Die Nacktmäuse entwickelten eine Resistenz die nur *in vivo* bestand, die resistenten Zellen blieben *in vitro* sensibel. Als Ursache liess sich die verminderte freie Serum Imatinib Konzentration nachweisen, die durch ein akut Phase Protein, das α_1 -Glykoprotein, das Imatinib bindet, verursacht wird [80]. Andere Untersuchungen konnten allerdings keinen Einfluss des humanen α_1 Glykoproteins bei der Imatinib Resistenz bei CML Patienten ausmachen [81], so dass die Relevanz dieser Daten noch umstritten ist.

Der meist untersuchte Mechanismus, der zu Resistenzen bei Chemotherapien führt, ist der Auswärtstransport der Zytostatika durch zellmembranständige Proteine aus der Gruppe der ABC-Transporter, insbesondere durch P-gp und MRP1. Ein aktiver Auswärtstransport von Imatinib durch diese Proteine, und eine hieraus resultierende Reduktion der intrazellulären Imatinib-Konzentration, könnte auch die Ursache der Resistenz der BCR-ABL positiven Zellen gegenüber Imatinib sein.

In einer der resistenten LAMA84R Zelllinie liess sich eine erhöhte Expression des MDR-1 Gen codierten P-gp nachweisen. [82]. Verapamil, ein kompetetiver Inhibitor des P-gp medierten Drugeffluxes, steigerte die Imatinib-Sensibilität der Zelllinie.

Die hier vorliegende Arbeit sollte klären ob Proteine der ABC-Familie, insbesondere MRP1 und P-gp für die Imatinibresistenz verantwortlich sind. Beide Transmembranproteine werden im folgenden beschrieben.

2.6 Pleiotrope Zytostatika Resistenz (*multidrug resistance*) durch P-gp und MRP1

Die simultane Resistenz von Tumorzellen gegenüber mehreren nicht verwandten zytotoxischen Substanzen wird als *multidrug resistance* bezeichnet. Eine Form von *multidrug resistance* ist durch Mitglieder der *ATP-Binding-Cassette* (ABC)-Transporter

Familie bedingt. Dabei werden Zytostatika durch Membranproteine unter ATP-Verbrauch aktiv aus der Zelle befördert.

2.6.1 Das MDR-1 Gen codierte P-Glycoprotein (P-gp)

Der am längsten bekannte Chemotherapeutika-Resistenzmechanismus ist durch die Überexpression von P-Glykoprotein (P-gp) bedingt.

Das durch das MDR 1-Gen (*Multidrug-resistance-Gen 1*) codierte P-Glycoprotein ist ein glykosyliertes membranassoziertes Phosphoglycoprotein (p170 kDa), das erstmals 1976 von Juliano und Ling bei einer mit Kolchicin selektierten Zelllinie beschrieben wurde [83]. Es pumpt eine Reihe chemisch nichtverwandter Zytostatika und viele andere Substrate aus dem Intra- in den Extrazellulärraum [84, 85].

P-Glycoprotein transportiert lipophile ungeladene oder leicht positiv geladene, nicht konjugierte Substrate, etwa Zytostatika wie Vincaalkaloide, Anthracycline, Epipodophylotoxine, Kolchizin, Taxane, Topotecan, Actinomycin [85]. P-gp gehört zur ATP-Binding-Casette (ABC)-Transporter Familie (ABCB1). Der Transport Prozeß verläuft energieabhängig unter Hydrolyse von ATP oder GTP [86]. Der Transport kann durch Inhibitoren gehemmt werden. Viele dieser Inhibitoren sind Substrate des Transports, wie etwa Verapamil, Cyclosporin oder SDZ PSC 833 (ein nicht immunsuppressives Cyclosporinanalogen), und wirken als kompetitive Transportinhibitoren. Eine Reihe von Inhibitoren wie z.B. Vanadiumsäuresalze wirken durch Hemmung der ATPase dem Transport entgegen [87], wiederum andere Inhibitoren verändern die Zellmembraneigenschaften (z.B. Detergentien) [88]. Die Chemosensibilisierung mit P-Glycoprotein Inhibitoren ist in verschiedenen Studien bereits erprobt worden [89, 90]. P-gp besteht aus zwei homologen Hälften, die jeweils aus einer Transmembrandomäne (bestehend aus 6 hydrophoben Helices), einer ATP-Bindungsstelle und Substrat-Bindungsstellen bestehen [91, 92]. Eine Linker-Region verbindet die zwei homologen Hälften des Moleküls (siehe Abb. 4). Die Linker-Region enthält Serine, die durch die Phosphokinase C phosphoryliert werden können. Erste Ergebnisse, die zeigten, dass der Phosphorylierungsstatus die Pumpaktivität und damit den Zytostatikaresistenztyp beeinflussen, [93, 94] ließen sich nicht bestätigen [95]. Ob die Phosphorylierung Funktion und Stabilität von P-gp beeinflusst ist jedoch weiterhin nicht abschließend beantwortet [96]. Physiologisch wird P-gp in der Mukosa von Jejunum, Ileum und Kolon exprimiert, vermutlich um die Aufnahme von lipophilen Toxinen zu verhindern. In der Leber findet es sich auf der biliären Seite, in der Niere auf

der apikalen Membran des proximalen Tubulus und dient dort wahrscheinlich zur Exkretion in Urin und Galle [97] (siehe Abb.4).

Auch ohne vorherige Chemotherapie ist in Karzinomen dieser Gewebe P-gp häufig überexprimiert, was das geringe Ansprechen dieser Tumore auf Hochdosischemotherapie erklärt [96, 98].

P-gp wird in der Plazenta exprimiert [99], wahrscheinlich um den Fetus zu schützen. In der Nebenniere und anderen Steroidhormondrüsen ist P-gp möglicherweise an der Steroidsekretion beteiligt [100]. In den Kapilarendothelien von Gehirn und Testis ist P-gp an der Formierung der Bluthirn- bzw. der Bluttesteschranke beteiligt [101, 102]. Bei *mdr1a* Gen *Knockout*mäusen war die zentralnervöse Toxizität bisher harmloser lipophiler Substanzen die Ursache für eine im Vergleich zur Normalpopulation hohe Letalität [103].

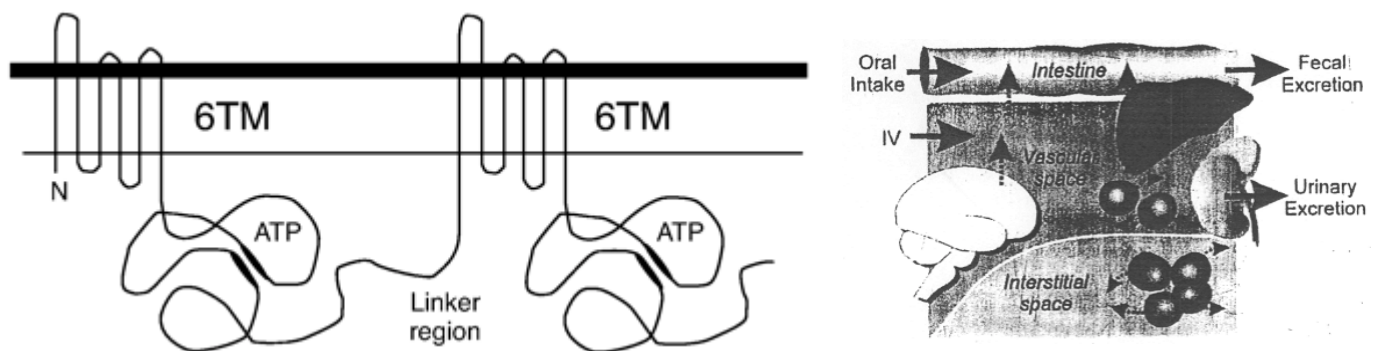


Abb.4: Die linke Abb.(nach [104]) veranschaulicht die Proteinstruktur von P-gp, das aus zwei strukturell homologen Hälften mit jeweils einer aus 6 Helices geformten Transmembranregion und jeweils einer ATP-Bindungsregion besteht. Die sogenannte Linker Region verbindet die beiden Molekülhälften. Die rechte Abb.(nach [105])veranschaulicht die Schutzfunktion von P-gp gegenüber Toxinen.

Schon seit längerem ist bekannt das die pluripotente hämatopoetische Stammzelle Rhodamin-123, ein P-gp Substrat, nicht akkumuliert. Ursache ist die hohe physiologische Expression in diesen Zellen [106]. Mit einem anderen Fluoreszenz Marker (Hoechst 33342) ließ sich eine $CD34^-CD38^-$ Zellpopulation isolieren, die erst in Kultur beginnt $CD34^+$ zu exprimieren, und die aufgrund ihrer P-gp Expression, einen großen Teil des Fluoreszenzfarbstoffs exportiert. Es wird vermutet, dass P-gp für diese primitiven Stammzelle neben der protektiven Wirkung gegenüber Xenotoxinen noch weitere Funktionen erfüllt, beispielsweise eine antiapoptotische Wirkung durch Eliminierung zelleigener proapoptotischer Phosphatidylserine, Ceramide und von Caspase 3 und 8, oder Differenzierung verhindert indem es Retinoide eliminiert [104]. Auch in der malignen Hämatopoese ist die P-gp Expression mit Unreife bzw. der Expression von CD34 (ein Oberflächenmarker der charakteristisch für hämatopoetische

Stamm und Vorläuferzellen ist), assoziiert [107, 108]. Im Gegensatz dazu tragen reife Granulozyten und Monozyten kein P-gp [109]. Bei etwa 40-50 % der AML-Patienten ist P-gp zu Beginn der Erkrankung auf den myeloischen Blasten nachweisbar [110], und ist ein prognostischer Faktor für das Ansprechen auf Chemotherapie und das Überleben [111-113]. Nach vorangegangener Chemotherapie liess sich ein Anstieg des MDR-1 Gens in AML Blasten nachweisen [114]. Bei CML Patienten mit Blastenkrise ist P-gp überexprimiert, und auch im Vergleich zu Patienten in der chronischen Phase erhöht [115-117]. Bei CML-Patienten in der chronischen Phase ist allerdings die MDR1 mRNA Transkription nicht höher als bei Normalpersonen [118]. Bei Patienten mit ALL ist die Rolle von P-gp weniger klar. Aber in neueren Studien liess sich auch bei der ALL zeigen, dass P-gp mit einem schlechteren Therapieergebnis und mit häufigeren Rückfällen assoziiert ist [119, 120]. Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms bei der ALL zeigt dabei keinen Einfluss auf die Häufigkeit der P-gp Expression [119, 121]. Die Regulation von P-gp ist bisher nur unzureichend beleuchtet. Das MDR-1 Gen kann durch RAS-Überexpression, Mutationen des p53 Gens, durch JNK und unspezifischen Stress wie Hitzeschock induziert werden. IL 6, IFN Gamma und TNF α führen zu einer Verminderung der MDR1 mRNA Expression in unterschiedlichen Zellsystemen [122].

2.6.2 Das *Multidrug resistance associated* Protein, MRP1

Das *Multidrug resistance associated* Protein, MRP 1, wurde 1992 erstmals von Cole an einer durch Doxorubicin-Langzeitexposition selektierten, gegenüber multiplen Zytostatika resistenten Bronchialkarzinomzelllinie beschrieben [123]. Auch MRP1 ist wie das MDR1 codierte P-gp ein Mitglied der ABC-Transportprotein Superfamilie (ABCC1). Es ist ein mit P-gp nur zu etwa 15% identisches glykosiliertes 190 kDa Membranprotein [124], das neben der membranösen Lokalisation auch in intrazellulären Vesikeln gefunden werden kann [125-127]. Mit der Zeit sind weitere MRP's beschrieben worden, so dass dieser Zweig der ABC-Transporter-Familie momentan 7 Mitglieder zählt [128]. Sie unterscheiden sich zum einen in ihrer Aminosäuresequenz von den anderen ABC-Transportern, durch eine Deletion von 13 Aminosäuren in der ansonsten hochkonservierten ATP-Bindungsregion 1. Zum anderen besitzen die MRP's, bis auf MRP 4 und 5, im Vergleich zu den meisten anderen ABC-Transportern eine zusätzliche Transmembranregion im Bereich des aminoterminalen Endes und eine daran anschließende zusätzliche Linkerregion [129]. MRP1 besteht also aus drei Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsregionen (siehe Abb.5). MRP1

transportiert vor allem organische Anionen [130, 131], z.B. Methotrexat [132], aber auch neutrale Substrate, wenn diese mit Gluthation, Glucuronat oder Sulfat konjugiert sind, wie Aflatoxin b1-Gluthadion oder Billirubin Glucuronid [133, 134]. So transportiert MRP1 Konjugate von Melphalan-Gluthadion, Etoposid-Glucuronid und Doxorubicin-Gluthation, und verhindert das diese hydrophilen Verbindungen in der Zelle akkumulieren [133, 135]. Viele Zellen besitzen allerdings nicht die für die Phase II der Giftstoffelimination notwendigen Enzyme, die primär in der Leber vorhanden sind. Für diese Zellen spielt ein Cotransport bei dem einige unmodifizierte Substanzen, wie Vinca Alkaloide, Etoposid und Anthracycline, mit Gluthation in unkonjugierter Form aus der Zelle befördert werden, eine entscheidende Rolle [136, 137] (siehe Abb.5 rechts). Arsenit kann nach Bildung eines Komplexes mit Gluthation aus der Zelle entfernt werden [138]. Die Tatsache das MRP1 ein Gluthation Co-Transporter ist, erklärt, dass bei gleichzeitiger Überexpression von MRP1 und Gluthation-S-Transferase beide Proteine synergistisch wirken [139]. MRP1 kann auch Gluthationdisulfit transportieren und spielt so eine Rolle in der Antwort der Zelle auf oxidativen Streß [131]. MRP 1 vermittelt Resistenzen gegen Vinca Alkaloide [140] Anthracycline, Etoposid [141] und Arsenit [128]. MRP 1 transportiert mit hoher Affinität Leukotriene C4 [142], einen Entzündungsmediator der Einfluß auf die Gefäßpermeabilität und die Kontraktion glatter Muskulatur hat.

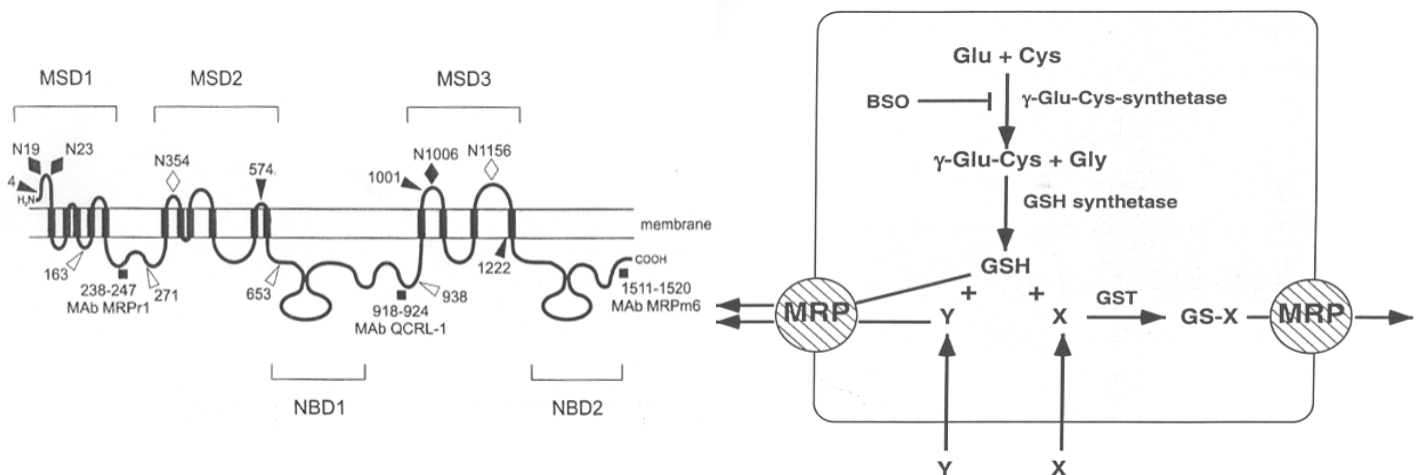


Abb.5: die Abbildung links veranschaulicht die Proteinstruktur von MRP1, links erkennt man die zusätzliche Transmembran Domäne hier MSD1 genannt, und die zugehörige Linkerregion(TMD_{0L0}). Außerdem erkennt man auf der Abb. Bindungsstellen unterschiedlicher Antikörper. Die rechte Abb. veranschaulicht die unterschiedlichen Transportmechanismen von MRP. Einige Substanzen (X), werden als Konjugate transportiert, andere (Y) in einem Gluthation Co-Transport. Beide Wege bedürfen der Gluthation Synthese aus Glu und Cys. Lediglich organische Anionen, Glucuronide und Sulfat-Konjugate sind Gluthadion unabhängige Substrate.

Der Transport von MRP1 kann mit diversen Substanzen, wie MK571 (einem Leukotrien C4 Antagonisten), Probenecid, Sulfynpyrazon und Benzbromaron inhibiert werden [143]. Die physiologische Funktion von MRP1 liegt vermutlich im Schutz vor Xenotoxinen. MRP 1 ist im Gegensatz zu MDR1 oder MRP 2 nicht apikal, sondern basolateral gelegen, fungiert also nicht im Sinne einer Exkretion, sondern dient dem Schutz der lumenwärts gelegenen Zellen [128].

Ob MRP 1 nicht nur in Zelllinien Resistenz vermittelt, sondern auch für klinische *multidrug resistance* relevant ist wie P-gp, scheint weniger evident.

MRP1 ist in fast allen Geweben ubiquitär vorhanden. Eine Überexpression wurde vor allem in kleinzelligen Bronchialkarzinomen gefunden. Aber auch in grosszelligen Bronchialkarzinomen, Karzinomen von Kolon, Brust, Blase, Prostata, Schilddrüse und Zervix, Gliomen, Neuroblastomen Fibrosarkomen wurde eine Überexpression nachgewiesen [144-146]. Bei Neuroblastomen mit schlechten Ansprechen auf Chemotherapie besteht eine Erhöhung des MRP mRNA Levels, die mit einer Amplifikation von n-myc einhergeht [147]. Bei der AML M4E0, bei der es zur Inversion von Chromosom 16 kommt, wird das MRP1 Gen entzweit, was zu einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie führt [148]. Bei CML-Patienten in der chronischen Phase ist die MRP1 und MRP2 mRNA Transkription im Vergleich zu Normalpersonen nicht erhöht. Im Gegensatz dazu wird MRP3, MRP4 und MRP 5 mRNA und höherem Maß transkribiert als bei Normalpersonen [118]. Bei ALL-Patienten ließ sich bei nur etwa 17 % (bzw. 30%) eine erhöhte MRP1 Expression nachweisen. Ein Einfluß auf das klinische Ansprechen konnte nicht gezeigt werden [119, 120]. Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms bei der ALL hat keinen Einfluss auf die MRP1 Expression [119, 121]. Eine Studie zeigte das MRP1mRNA Expression bei T-Zell-ALL ein prognostischer Faktor ist [149], und auch für AML Patienten konnte eine Untersuchung zeigen, dass eine hohe MRP1-Aktivität mit einer schlechten Prognose korreliert [150]. Dagegen zeigen andere Untersuchungen, dass MRP1 keinen Einfluss auf die Prognose bei akuter myeloischer Leukämie hat [151, 152].

Über die Regulation von MRP-1 ist wenig bekannt. Wildtyp p53 scheint die MRP1 Expression zu hemmen, dagegen wird ein Anstieg bei p53 Mutanten gefunden [153, 154]. In einer kolorektalen Tumorzelllinie konnte MRP1 durch Interleukin 1 β und NO induziert werden [155]. In einigen Zelllinien führt oxidativer Stress zu einem Anstieg des MRP1 Protein-Levels [156].

2.6.3 MRP2 oder cMOAT

MRP2 ist identisch mit dem schon länger bekanntem kanalikulären multispezifischen organischen Aniontransporter MOAT [157]. MOAT, oder auch MRP2, ist ein ATP-abhängiges Transportprotein, das in der Elimination von konjugierten organischen Anionen involviert ist, welche durch Phase I und II Reaktionen aus endogenen und exogenen Substraten hervorgegangen sind [158]. Bei Defekt dieses Transportproteins, wie er beim autosomal rezessiv erblichen Dubin-Johnson Syndrom besteht [159], kommt es zu einer milden direkten Hyperbilirubinämie, aufgrund der mangelnden Ausscheidung von Bilirubin-Konjugaten. MRP2 findet sich hauptsächlich in der Leber und Niere [160]. In Nierenzellen wird MRP2 in der apikalen Membran gefunden, was seine exkretorische Funktion veranschaulicht [161]. MRP 2 kann zu Resistenzen gegen Methotrexat, Cisplatin, Anthracycline, Etoposide und Vincaalkaloide führen [162]

3 Materialien und Methoden

3.1 Primäre Patientenzellen und Zelllinien

3.1.1 Primäre Patienten Zellen

Patienten mit Ph⁺ALL, die an der „Phase II Studie zur Untersuchung von Sicherheit und antileukämischer Wirkung von STI571 bei Patienten mit Ph⁺ALL“ [65] teilnahmen, wurde vor der Therapie und nach Entwicklung einer Imatinib-Resistenz peripheres Blut entnommen. Nach dem Studienprotokoll hatten diese Patienten vor Therapiebeginn entweder einen Rückfall nach vorhergehender Remission nach einer Polychemotherapie, oder sie hatten trotz zweier Zyklen einer Standardchemotherapie keine Remission erreicht.

Die mononukleären Patientenzellen werden mittels Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation durch Zentrifugation über 20 Minuten bei 1650 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) von den anderen Zellen isoliert. Die gewonnenen Interphasezellen werden in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Paisley, UK), das 10 % fetales Kälberserum (Hyclone®) enthält, gewaschen. Die Proben enthalten mindestens 70 % Blasten, bevor die mononukleären Zellen isoliert wurden. Die Zellen werden dann mit 10% DMSO (*Fluka*) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Eigenschaften und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

3.1.2.1 MDR-1 und MRP1 transfizierte Zelllinien

Dr. Raymond Evers (damals Georg Speyer Haus) stellte freundlicherweise zwei MRP1 und MDR1 cDNA transfizierte Zelllinien (MDCKII und 2008)[163] zur Verfügung. Die MDR1 bzw. MRP1 überexprimierenden 2008 Zelllinien sind durch Transfektion mit einem retroviralen Vektor, pCMV-neo, der MDR1 bzw. MRP1 cDNA enthält, hergestellt. Der Vektor wurde mit der Retrovirus Verpackungszelllinie Phoenix gewonnen. Einzelklone wurden isoliert und analysiert. Sie zeigten eine stabile P-gp bzw. MRP1 Expression, und eine vorwiegend membranöse Lokalisation der Transportproteine [132, 163]. Gleiches gilt für die mit MDR1, MRP2 bzw. MRP1 cDNA transfizierten Hunde-Nierenkarzinomzelllinien MDCKII. Mit diesen Zellen ist es möglich Methoden zur Bestimmung des *multidrug resistance* Phänotyps zu testen.

Die 2008 Zelllinie ist eine humane, adhärent wachsende Ovarialkarzinom Zelllinie. 2008/MRP1 und 2008/MDR1 und die Ausgangszelllinie 2008 werden in RPMI 1640

(Gibco BRL, Paisley, UK) kultiviert, dem 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Serva®), 2 mmol/l Glutamin (Gibco BRL, Paisley, UK) und die beiden Antibiotika Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50µg/ml) (beide Gibco BRL, Paisley, UK) zugesetzt sind. Auch die MDCKII Zellen wachsen adhärent. Sie werden in DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) kultiviert, dem 10 % fetales Kälberserum (Serva®), Glutamin (2 mmol/l), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 ng/l) zugesetzt ist. Im Gegensatz zu den 2008 Zellen bilden MDCKII Zellen ein polarisiertes, einschichtiges Epithel, bei dem sich P-gp und MRP2 in der apikalen und MRP1 in der basalen Membran befinden. Dadurch ist es möglich Substrat Transportexperimente mit diesen Zelllinien durchzuführen [163].

Zum Splitten werden die adhärenen Zellen alle 3 Tage nach Absaugen des alten Mediums, und spülen mit PBS (Dublecos®) mit Trypsin (Gibco BRL, Paisley, UK) überschichtet. Nach 5 min werden die Zellen mit serumhaltigem Medium abgespült. Ein Fünftel der abgelösten Zellen wird dann in eine neue Kulturflasche gegeben, und neues Medium zugefügt.

3.1.2.2 BCR-ABL positive Zelllinien und andere Suspensionszelllinien

Die beiden BCR-ABL p190 positiven Zelllinien Tom1 [164] und SUP B15 [165] entstammen von Patienten mit Ph⁺ALL, und haben einen Prä-B-Immunphänotyp. Sie werden in RPMI 1640 dem 15% fetales Kälberserum (Serva®), Glutamin (2mmol/l), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 ng/ml) zugesetzt ist bei 37 ° C in einer 5 % CO₂ enthaltenden feuchten Umgebung kultiviert. Etwa alle 48-72 h wird die Hälfte der Suspension verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Regelmäßig wird Viabilität und Zellzahl mittels Trypanblau Färbung (*Trypan Blue Stain 0,4%, GIBCO™*) kontrolliert. Für Experimente werden die Zellen in einer Dichte von 0,7 x 10⁶ Zellen pro ml ausgesät.

Die BCR-ABL p 210 positive humane B-Vorläufer Zelllinie BV 173 [166] entstammt von einem CML-Patienten mit lymphatischer Blastenkrise. Sie besitzt kein Wildtyp ABL. Sie wird in RPMI 1640 mit 10 % FCS (Serva®) und den weiteren Supplementen kultiviert. Für Experimente werden die Zellen in einer Dichte von 0,5 x 10⁶ Zellen pro ml ausgesät. Die Zellen werden etwa alle 24-48 h 1/1 gesplittet.

Die humane Megakaryoblasten Leukämiezelllinie (AML M7) MO7e, ist eine faktorabhängige, CD117 positive Zelllinie, die lediglich als Positivkontrolle verwendet wird.

Die von einem Patienten mit histiozytärem Lymphom stammende Zelllinie U-937 und zwei mit BCR-ABL p190 transfizierte Klone wurden freundlicherweise durch Fr. Dr. E. Pucetti zur Verfügung gestellt. Sie werden alle 24-48 h 1/1 gesplittet. Sie werden in RPMI 1640 mit 10 % FCS (*Serva*®) und den weiteren Supplementen kultiviert.

Ba/F3 ist eine faktorabhängige murine pro-B-Zelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 mit 10% FCS (*Serva*®) kultiviert, dem 10 ng/ml IL-3 zugegeben wird. Die von Tim Beissert freundlicherweise zur Verfügung gestellten p185 und p210 BCR-ABL Transfektantenbulks werden ohne IL3 kultiviert.

Bei Inkubation der BCR-ABL positiven Zelllinien mit Imatinib werden in der Regel Konzentrationen von 1-10 µM Imatinib (*Novartis*) zugesetzt, und 24, 48 und 72 h in serumhaltigem Medium kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 (*NEB #9900*) erfolgt unter serumfreien Bedingungen mit einer Konzentration von 50 µM für 24 h.

3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

3.2.1 Zelllyse

Zur Proteingewinnung ist es notwendig die Zellen zu lysieren. Dazu werden jeweils 5 Millionen Zellen nach zweimaligem Waschen in kaltem PBS unter Vortexen auf Eis mit 250 µl Lyse Puffer überschichtet. Der Lysepuffer enthält zur Auflösung der Zellen das Detergenz SDS. Um die durch die freiwerdende DNA zunehmende Viskosität zu verringern, werden 0,5 µl Benzonase (*Sigma-Aldrich*) zugegeben. Zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine wird Dithiothreitol (*Sigma*) in 1mM Endkonzentration zugegeben.

Lyse Puffer: 1,5 ml Tris (USB)-HCL 1M pH 6,8 ; 3 ml SDS (USB) 20 %; 3 ml Glycerol (ICN Biomedicals); 19,5 ml H₂O

(für die MAPK-Blots wurde dem Lyse Puffer zusätzlich NaF in 10 mM, und Na₃VO₄ (Sigma) in 20 mM Endkonzentration zugesetzt)

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektrophotometers

Die Proteinkonzentration, der gewonnenen Zelllysate, werden nach der von Manchester *et al.* (1996) beschriebenen Methode bestimmt. Hierbei macht man sich die starke Absorption der aromatischen Aminosäurereste Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm zunutze. Die Lysate werden in einem Verhältnis von 1:100 bzw. 1:50 in Wasser verdünnt, und die Absorptionen bei 280 nm an einem Spektrophotometer (*Ultrospec III*,

Pharmacia, FB) bestimmt. Die zu verwendende Probenmenge wird mittels folgender Formel errechnet.

Probenvolumen in µl: $V = F \times 0,6 / \text{Extinktion}_{280\text{nm}}$

F ist ein Faktor, der das Probenvolumen in eine Größenordnung von 10-25 µl bringen soll, und für den jeweiligen WB konstant.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gewonnenen Lysate werden mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Acrylamid und Bisacrylamid polymerisieren bei Zugabe von Ammoniumpersulfat zu einem Gel. Diese Reaktion wird durch Temed katalysiert. Die Porengröße ist bei hohen Acrylamidkonzentrationen geringer, eignet sich also besser zur Auftrennung kleiner Proteine. Das Sammelgel hat eine geringere Polyacrylamid Konzentration (5 %), und damit aufgrund der großen Poren keine Trennwirkung. Das Trenngel ist engporig, damit die Proteine nach Größe aufgetrennt werden. Je nach Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine werden verschiedene Acrylamidkonzentrationen im Trenngel verwendet (meist 7,5 %). Probe, Sammelgel und Trenngel enthalten Cl^- Ionen, während der Elektroden Puffer Glycin enthält. Der pH Wert des Sammelgels liegt bei 6,8, der des Trenngels bei 8,8. Legt man eine Spannung an wandern die Chloridionen mit hoher Mobilität zur Anode, während die Glycinionen die im Sammelgel langsam wandern, da sie beim pH von 6,8 als Zwitterionen vorliegen. Die Proteine laufen zwischen diesen beiden Anionen, und werden aufgrund des Spannungsgradienten zwischen Leit- und Folgeionen konzentriert. Erreicht die Ionenfront das Trenngel, dissoziieren die Glycinionen aufgrund des höheren pH-Wertes im Trenngel von 8,8, und überholen die Proteine. Die im Sammelgel fokussierte Proteinbande wird dann im Trenngel nach Größe aufgetrennt. Die SDS-PAGE erfolgt in der Anwesenheit von SDS, einem anionischen Detergenz, das die Proteine denaturiert, und ihnen eine der Proteingröße proportionale negative Ladung gibt. Außerdem enthält der Auftragspuffer Glycerol, damit die Probe eine höhere Dichte als der Elektrodenpuffer bekommt und besser aufgetragen werden kann. Die Gele werden nach den in Sambrook *et al.*, 1989 beschriebenen Protokoll gegossen. Die Elektrophorese erfolgt in Minigel-Apparaturen (*Protean II von BioRad*). Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine werden Standards bereits gefärbter Proteine (*SeeBlue™ Pre-Stained Standards, Novex* oder *BENCHMARK Prestained Protein*

Ladder) aufgetragen. Die aus der Proteinkonzentrationsbestimmung resultierende Probenmenge wird mit Lyse Puffer ergänzt, um gleiche Probenvolumina zu erreichen. Es wird 10 % (v/v) Bromphenolblau 0,1 % (*BioRad*) zugegeben. Zur Spaltung von Disulfidbrücken wird 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (*Fluka, Feinchemikalien GmbH*) hinzugefügt und für 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 110 V für 1,5 h.

Sammelgel: 2,5 ml *Rotiphorese® Gel 30* (30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid; *Carl Roth GmbH*), 3,7 ml 0,5 M Tris(*Roth*)-HCL Lösung pH 6,8, 8,5 ml H₂O, 150 µl 10% SDS-Lösung (aus SDS ultrapure, *Carl Roth GmbH*), 10 µl *Temed* (*Carl Roth GmbH*), 0,2 ml APS 10 % (als letztes zugeben).

Trenngel (7,5%): 7,5 ml *Rotiphorese® Gel 30* (30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid; *Carl Roth GmbH*), 7,5 ml 1,5 M Tris(*Roth*)-HCL Lösung pH 8,8, 14,5 ml H₂O, 300 µl 10% SDS-Lösung (aus SDS ultrapure, *Carl Roth GmbH*), 20 µl *Temed* (*Carl Roth GmbH*), 0,2 ml APS 10 % (als letztes zugegeben)

Laufpuffer: 1,5 g SDS; 6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan *Roth*; 15 g Glycin (alle 3: *Carl Roth GmbH®*); 1 l H₂O

Ammoniumpersulfat (APS) 10%: 1 g APS (*Amresco, Solon, USA*) wurden in 10 ml H₂O gelöst, und Aliquots bei -20°C gelagert.

3.2.4 „Western Blotting“, Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

Nachdem die Proteine durch die SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt sind, werden sie aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei Verwendung des Semi-Dry-Elektroblot (*BioRad*) werden auf die untere Elektrodenplatte 2 mit Blotpuffer angefeuchtete Lagen Filterpapier, die mit Blotpuffer benetzte Nitrocellulosemembran (*BioRad 2µ*), das SDS-Gel und nochmals 2 Lagen Filterpapier positioniert. Der Transfer erfolgt bei 180 mA pro Gel für 1 h.

Beim Nasstransfer wird die Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfercell (*BioRad®*) verwendet. Das SDS-Gel wird luftblasenfrei auf die benetzte Nitrozellulose-Membran (*Protran, Schleicher & Schnell GmbH*) gelegt, bevor sie zwischen je ein Filterpapier und jeweils einen in Transferpuffer getränkten Schwamm positioniert wird. Anschließend erfolgt die Überführung in die Nasszelle, in der bei 100 mA bei 4°C über Nacht transferiert wird. Die Proteine werden mit Ponceau S-Färbelösung auf der Membran sichtbar gemacht, um die Gleichmäßigkeit der Proteinverteilung nachzuweisen.

Blotpuffer: 3,02 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; 14,4 g Glycin (beide: Carl Roth GmbH®); 800 ml H₂O; 200 ml Methanol

Ponceau S-Färbelösung: 2 g Ponceau S; 30 g Trichloressigsäure; 30 g Sulfosalicylsäure (alles bezogen von Merck, Darmstadt); 1 L H₂O

3.2.5 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Transfer werden die Nitrocellulosemembranen zur Absättigung der freien Bindungsstellen mit 2 % Magermilchpulver (*Glücksklee*) in TBST (für c-ABL, c-myc), 1% Magermilchpulver + 1% BSA (*Albumin Fraktion V; from bovine Serum; Boehringer Mannheim GmbH*) in PBST (für MRP 1) oder 10 % fetalem Kälber Serum (*Serva®*) in TBST (für Phosphotyrosin) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4° C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST/PBST wird die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser ist mit einem Enzym konjugiert (Peroxidase), welches nach Zugabe der entsprechenden Reaktionspartner, Chemilumineszenz auslöst. Der Blot wird erneut 3x gewaschen und dann im Dunkeln mit den beiden im Verhältnis 1 zu 1 gemischten ECL Lösungen inkubiert. Die sichtbar werdenden Proteinbanden werden mit Autoradiographiefilmen (Hyperfilm, Amersham Life Science) detektiert. Nach der Detektion werden in manchen Fällen die Antikörper von der Nitrocellulosemembran wieder abgelöst, um durch Einsatz neuer Antikörper Informationen über andere Proteine zu erhalten. Hierzu wird die Nitrocellulose Membran 15 min in TBS-T gewaschen, und danach mit 55°C warmen *stripping*-Buffer überschichtet. Danach wird die Membran bis zur vollständigen Elimination des β -Mercaptoethanols mit TBST gewaschen und wieder geblockt.

ECL Lösung 1: 2,5 mm Luminol, 0,44 ml p-Coumaric Säure (90mM in DMSO), 10 ml 1 M Tris HCl pH 8,5, auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

ECL Lösung 2: 64 μ l 30% H₂O₂, 10 ml 1M Tris HCl pH 8,5, auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

PBST: 8g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,2 g/l KH₂PO₄; 1 l H₂O; 500 μ l Tween®20(Roth)

TBST: 5 ml Tris HCl pH 8 2 M; 30 ml NaCl 5 M; 965 ml H₂O; 500 μ l Tween®20(Roth)

Stripping Buffer: 0,697 ml β -Mercaptoethanol 14,3 M, + 3,25 ml Tris HCL pH 6,8 (2 M), + 10 ml SDS 20 %, + 80 ml H₂O

Primärantikörper		Sekundärantikörper	
<i>Anti c-ABL :</i> 1/1000 in TBST	Santa Cruz, Biotechnology	POD-Anti-Mouse 1/3000 in TBST+0,5% Milk	POD conj.Affini Pure Goat Anti- Mouse, Dianova
<i>Anti Phosphotyrosin:</i> 1/500 in TBST	Upstate biotechnology, mouse monoclonal IgG _{2bk} 1g/l	POD-Anti Mouse 1/3000 in TBST+ 0,5% Milk	POD conj.Affini Pure Goat Anti- Mouse, Dianova
<i>Anti MRPr 1:</i> 1/500 in PBST +1%Milk+1%BSA	Durch Dr.R.Evers zur Verfügung gestellt	HRP-Goat Anti Rat IgG(H+L) 1/1000 in PBST+1%Milk +1%BSA	Zymed (San Fransisco ,USA)
<i>Anti MDR 1 C219:</i> 1/1000 in PBST +1%Milk+1%BSA	Durch Dr.R.Evers zur Verfügung gestellt	HRP-Anti mouse 1:1000 in PBST +1% Milk+1%BSA	Zymed (San Fransisco ,USA)
<i>Anti c-myc: (9E10) :sc 40</i> 1/500 in TBST	Santa Cruz Biotechnology	POD-Anti Mouse 1/3000 in TBST+ 0,5% Milk	POD conj.Affini Pure Goat Anti- Mouse, Dianova

3.3 RNA Isolierung und Quantifizierung für die RT-PCR von MRP1 und MDR1

3.3.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wird das *High Pure RNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim)* verwendet. Es werden 1×10^6 Zellen pro Zelllinie und Bedingung eingesetzt. Diese werden nach einem Waschschrift mit PBS herunter zentrifugiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellen werden dann mit einem Triton®X100 und Guanidiniumchlorid enthaltenden Lysepuffer lysiert. Das chaotrope Salz Guanidiniumchlorid führt zur spezifischen Bindung der Nukleinsäuren an eine Glasfaseroberfläche und denaturiert vorhandene RNasen. Kontaminierende DNA wird mittels DNase zerstört. Nach einigen Waschschriften zur Entfernung von Salzen und Proteinen wird die gewonnene RNA in Wasser eluiert. Für das genaue Protokoll siehe Kit-Anleitung.

3.3.2 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Kontrolle der RNA Qualität in einem Agarosegel

Die RNA-Konzentration der Proben werden spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260, 280 und 320 nm und darauffolgender Errechnung bestimmt.

$$C = OD_{260} \times f \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Um die Richtigkeit der errechneten Werte zu überprüfen, werden äquivalente RNA-Mengen in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wird die Agarose (0,7g Agarose (*Carl Roth GmbH*) + 100 ml TAE) in der Mikrowelle vorsichtig zum Kochen gebracht, nach leichtem Abkühlen 5 µl Ethidiumbromid (*Carl Roth GmbH*) zugegeben, und die Agarose dann in eine abgedichtete Kammer gegossen. Bei Darstellung sauberer Banden der ribosomalen 18S-rRNA, und der 28S-rRNA wird die RNA Qualität als gut befunden (keine Degradierung), und zudem grob abgeschätzt, ob äquivalente Mengen aufgetragen sind.

TAE-Puffer: 484 g Tris, +114 ml Essigsäure 100%, + 74,4 g Na₂EDTAx2H₂O, auf 2 l mit H₂O auffüllen.

3.3.3 RT-PCR zur Detektion von MRP1 bzw. MDR1mRNA

Die RT-PCR wurde freundlicherweise durch Frau Dr. Ulrike Stein und ihre Mitarbeiter am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin durchgeführt [167, 168].

3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Lokalisierung von MRP-1

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht es extrazelluläre und intrazelluläre Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop darzustellen. Es werden für die jeweiligen Proteine spezifische Antikörper benutzt. Der hier verwendete Antikörper MRPr1 erkennt ein intrazelluläres Epitop (siehe auch Abb.1.8.2). Daher ist eine Permeabilisierung der Zellen nötig. Die Zellen wurden auf einem Deckglas fixiert, und permeabilisiert, um die intrazellulär gelegenen Epitope mittels des für MRP 1 spezifischen Erstantikörpers MRPr1 zu markieren. Dieser wird dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff cy3 konjugierten Anti-rat Zweitantikörper (*Calbio Chem Dianova*) markiert.

3.4.1.1 Vorbereitung der Zellen

Je 5×10^6 Zellen der Zelllinien SUP B 15 und BV 173 wurden in 10 ml RPMI 1640, welchem 10% fetales Kälberserum zugesetzt war, mit oder ohne 1 µM Imatinib für 48 h kultiviert.

3.4.1.2 Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser werden mit Spülmittel gewaschen und dann nacheinander in doppeltdestilliertes Wasser, Methanol (*Carl Roth GmbH*) und Aceton (*Carl Roth GmbH*) getaucht. Nach Trocknen wird mit einem DAKO-Pen der Rand kreisförmig umrandet.

Die Deckglasfläche werden mit Poly-D-Lysine (1 mg/ml in H₂O) für 30 Minuten überschichtet, und nach Abnehmen des Restes, getrocknet.

3.4.1.3 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auf den Deckgläsern

Pro Deckglas werden 1×10^6 Zellen verwendet. Diese werden für 5 min bei 1200 rpm herunter zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Zellen erneut in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Dekantieren werden je 1 Mio. Zellen in 30 µl PBS resuspendiert, und das Deckglas gleichmäßig mit der Zellsuspension benetzt. Nachdem die Zellen bei 4°C 30 min lang auf das Deckglas sedimentieren, wird dieses mit einigen Tropfen PBS überschichtet, das gleich darauf wieder abgesaugt wird. Die Zellen werden fixiert, indem sie mit 3,7% Paraformaldehyd (*Merck, Darmstadt*) überschichtet werden, das nach 10 min wieder abgesaugt wird. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird das Deckglas zur Permeabilisierung der Zellen mit Triton X 0,1 % (*Sigma*) überschichtet und 5 min inkubiert.

3.4.1.4 Färbung der Präparate

Der 1. Antikörper, Anti-MRP1 r1, wird 1/100 in PBS/ 1% BSA (*Carl Roth GmbH*) verdünnt. Das Deckglas wird dann mit der Antikörpermischung benetzt. Nach Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wird dreimal mit PBS gewaschen. Um Effekte, die durch unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers entstehen, auszuschließen wird als Negativkontrolle zusätzlich ein Deckglas nur mit PBS/BSA inkubiert. Der 2. Antikörper, Anti-*rat* cy3, wird 1/100 in PBS/ 1% BSA verdünnt auf die Zellen gebracht, und 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit Wasser, wird das Deckglas zum Trocknen aufgestellt.

Auf einen Objektträger werden dann 12 µl Mowiol aufgetropft und das trockene Deckglas blasenfrei auf den Objektträger gelegt. Nach Aushärten des Mowiols wird schließlich das Deckglas mit Nagellack umrandet und kann bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

3.4.1.5 Auswertung

Die Präparate wurden durch Herrn Dr. Evers am konfokalen Fluoreszenzmikroskop im Max Planck Institut für Hirnforschung ausgewertet.

3.5 Durchflußzytometrie

Im Durchflußzytometer werden die zu untersuchenden Zellen einzeln in die Meßküvette gesaugt. Dort werden sie von einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Fünf unterschiedliche Detektoren dienen der Analyse des die Zelle verlassenden Lichts. Das Vorwärtsstreulicht, FSC, wird in Richtung des einfallenden Lichtstrahls gemessen, und gibt Aufschluß über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht, SSC, gemessen im 90° Winkel zum Laserstrahl, ist ein Parameter, der die Granularität und Membranfaltung widerspiegelt. Um weitere Informationen über die Zellen zu bekommen, kann man die Zellen mit Fluorochromen anfärben, die sich durch den Argonlaser zur Fluoreszenz anregen lassen. Die Emissionsspektren der jeweiligen Fluorochrome ist eng, und wird mit den drei Fluoreszenzkanälen FL-1, FL-2 und FL-3 gemessen. Die Intensität des emittierten Lichts ist der Zahl der Fluorochrom markierten Moleküle proportional. Durch die Verwendung mehrerer fluoreszierender Farbstoffe ist eine mehrfache Charakterisierung einer Zelle möglich. Die Überlappung der Emissionen unterschiedlicher Fluorochrome läßt sich durch Herausrechnen des in den anderen Fluoreszenzkanal hinüberreichenden Anteils mittels Fluoreszenzkomensation trennen. Die gewonnenen Daten werden unter Verwendung von PC-Lysis II Software (*Becton Dickinson*) ausgewertet.

3.5.1 Durchflußzytometrie zur Untersuchung der cKIT Expression in Zelllinien

Zur Messung der SCF-Rezeptor Expression in den verwendeten Zelllinien wird ein Fluorochrom markierter Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD117 verwendet, der dem SCF-Rezeptor entspricht.

Hierzu werden je Bedingung 100.000 Zellen pro FACS Röhrchen eingesetzt. Die Zellen werden bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (*Megafuge 1.0R, Heraeus*), und nach Verwerfen des Überstands in 2 ml PBS + 1 % fetales Kälber Serum (*Serva*) aufgenommen. Das FCS im Waschpuffer soll überschüssige Bindungen absättigen, die mit dem Antikörper kreuzreagieren können, und so einen unspezifischen störenden Hintergrund produzieren würden. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wird erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, und dekantiert. Zum Pellet werden dann unter Vortexen entweder 5 µl des spezifischen PE markierten CD117 Maus IgG₁-Antikörpers, oder des Kontrollantikörpers, *isomatched PE labeled mouse IgG₁*, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C, werden die Proben mit 2 ml Waschpuffer

resuspendiert, und nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren in PBS + 2 % Formaldehyd (*Carl Roth GmbH*) aufgenommen. Es werden die Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC), sowie die Fluoreszenz im FL2 Kanal detektiert. Die Daten werden anschließend und mittels PC-Lysis II Software (*Becton Dickinson*) ausgewertet.

3.5.2 Durchflußzytometrie zur Untersuchung der MRP1 Proteinexpression

Zur Messung der Proteinexpression ist neben dem Westernblot, die Durchflußzytometrie eine weitverbreitete Methode. Um die MRP1-Proteinexpression zu bestimmen kann ein Maus-Antikörper, Anti-MRPm6, verwendet werden [169].

Dieser Antikörper erkennt eine intrazelluläre Region von MRP1 im Bereich der C-terminalen ATP-Bindungsregion (Abb.5). Die intrazelluläre Lokalisation macht eine Permeabilisierung der Zellmembran notwendig. Eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen ist nach diesem Schritt nicht mehr möglich.

Pro Bedingung werden 500.000 Zellen verwendet. Die Zellen werden bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus), nach Dekantieren des Überstands in 1 ml PBS (*Dublecos*)/ 0,5 % BSA (*Roth*) aufgenommen und erneut herunter zentrifugiert.

Nach Dekantieren des Überstands wird das Zellpellet durch leichtes Klopfen resuspendiert. Die Zellsuspension wird aufgenommen und langsam unter Vortexen in 1 ml -20°C kaltes Methanol (100%, *Carl Roth GmbH*) geträufelt. Das Methanol dient dabei zur Permeabilisierung und Fixierung. Die Probe wird dann für 15 min bei -20°C gelagert, und dann bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und die Zellen in 4°C kaltes PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Das BSA dient hierbei zum Absättigen überschüssiger Bindungen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min, werden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 30 μl PBS/ 0,5 % BSA resuspendiert. Pro Probe werden dann 2 μl Anti-MRPm6 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; IgG₁) oder 2 μl BD *isotype matched* IgG1 Antikörper (*Becton Dickinson*) zugegeben und 45 min inkubiert. Der IgG1 Antikörper dient als unspezifische Kontrolle. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zu jeder Probe 2 ml PBS/ 0,5% BSA gegeben und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgt die Wiederholung des Waschschrtes. Das Pellet wird durch leichtes Klopfen resuspendiert und je 30 μl in ein FACS Röhrchen überführt. Zur Markierung des Erstantikörpers werden 2 μl des Anti-*mouse-PE-labeled*- Antikörpers zugegeben, und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nach einem Waschschrte mit PBS + 0,5 % BSA, werden die Zellen pelletiert und in PBS/ 2 % Formaldehyd aufgenommen. Die Messung erfolgte am BD FACScan,

wobei FSC, SSC und FL2 detektiert wurden. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von PC-Lysis Software.

3.5.3 Calcein-Assay zur Beurteilung der funktionellen Aktivität von MRP1 und P-gp

Neben Methoden, welche die Proteinexpression von MRP1 oder P-gp messen (Westernblot siehe 2.2 bzw. FACS mit MRPm6 siehe 2.5.2), und der Detektion des mRNA Levels (siehe 2.3), ist es auch möglich die Funktion dieser Transportproteine zu bestimmen [170]. Unter Verwendung der Durchflußzytometrie wurde hierzu Calcein-Acetoxymethyl Ester genutzt (*Calcein AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande*). Das hydrophobe Calcein AM akkumuliert aufgrund seiner Lipophilie in der zellulären Plasmamembran. Zelluläre Esterasen produzieren durch Abspaltung des Acetoxymethylrests, das fluoreszierende Calcein, das aufgrund seiner Hydrophilie in der Zelle gefangen ist (Abb.6).

Calcein wird durch eine Frequenz von 494 nm zur Fluoreszenz angeregt. Es emittiert grünes Licht mit einer Frequenz von 517 nm, meßbar im FL1 Kanal des FACScan (*Becton Dickinson*). Aktives P-Glykoprotein ist in der Lage Calcein-AM aus der Plasmamembran zu transportieren, und so den Anstieg der intrazellulären Calcein Konzentration zu verhindern [171]. Die intrazelluläre Akkumulation von Calcein, und die damit verbundene vermehrte Fluoreszenz, ist also bei P-gp überexprimierenden Zellen geringer als bei Vergleichszellen (Abb.6).

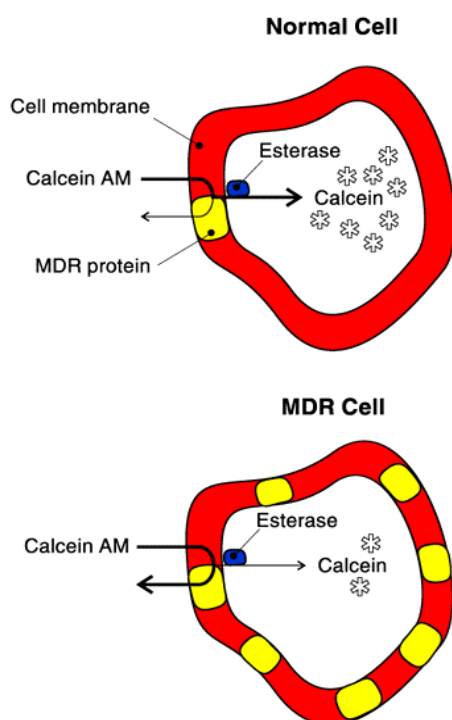


Abb. 6: die Abbildungen zeigt oben schematisiert wie das nicht fluoreszierende Calcein AM in die Zellmembran eindringt und von membranständigen Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgewandelt wird, das in der Zelle gefangen ist. Die untere Abbildung veranschaulicht wie eine P-gp (gelb) überexprimierende Zelle dies durch sofortigen Auswärtstransport von Calcein AM aus der Zellmembran verhindert.

Auch MRP1 transportiert Calcein-AM, und ist zusätzlich in der Lage das hydrophile Calcein aus der Zelle zu entfernen [143]. Calcein ist auch ein Vitalitätsmarker, da intakte Zellmembranen es nicht entweichen lassen, wenn sie keine Transportproteine besitzen. Erst wenn die Integrität der Zellmembran infolge des Zelltodes zugrunde geht, tritt Calcein nach außen. Um tote Zellen von resistenten Zellen zu unterscheiden, ist es also notwendig tote Zellen auszuschließen. Hierzu wird Propidiumiodid verwendet, das die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Es interkaliert in die DNA toter Zellen, die ihre Zellmembranintegrität eingebüßt haben. Die rote Fluoreszenz von Propidiumiodid läßt sich im FL2 Kanal des FACScan nachweisen.

Will man die Transportaktivität der Zellen quantifizieren, ist es möglich die Fluoreszenz einer mit MDR1 oder MRP1 cDNA transfizierten Zelllinie mit ihrer Ausgangszelllinie zu vergleichen. Dieses vorgehen ist allerdings nur bei Transfektanten und bei unter Langzeitexposition mit Zytostatika auf Resistenz selektionierten Zelllinien möglich, da es das Vorhandensein, einer weniger resistenten Ausgangszelllinie voraussetzt. Man kann für die transfizierten Zelllinien einen Resistenz-Aktivitäts Faktor (RAF) errechnen der die Zunahme des Calceintransports im Vergleich zur Ausgangszelllinie beschreibt (siehe 2.5.3.1). Neben der fehlenden Anwendbarkeit bei nicht transfizierten Zellen, ist ein weiterer Nachteil, das der errechnete Wert die intrinsische Aktivität dieser Proteine in der nicht transfizierten Zelllinie verschleiert.

Da eines der Ziele dieser Arbeit auch die Messung der funktionellen Aktivität von P-gp und MRP1 in mononukleären Zellen von Patienten war, wurde ein anderer Weg gegangen. Hierbei blockiert man die Transportaktivität mit Inhibitoren wie Verapamil, PSC 833, Probenecid oder Indomethacin, so dass es zum Anstieg der intrazellulären Calcein Konzentration, und damit der Fluoreszenz, kommt. Durch die Inhibition der Transportproteine und der daraus resultierenden Akkumulation des fluoreszierenden Calceins im Zytoplasma der Zellen mit inhibiertem Transport, entsteht eine verstärkte Fluoreszenz im Vergleich zu Zellen mit ungehemmten Transport. Dividiert man die Differenz der Fluoreszenz bei inhibiertem Transport und der Fluoreszenz bei ungehemmtem Transport durch die Fluoreszenz bei inhibierter Transportaktivität erhält man einen Wert, der die vorhandene Transportaktivität veranschaulicht. Dieser Quotient wird auch als *multidrug resistance activity factor* (MAF) bezeichnet [112]. Hohe Werte zeigen eine große Differenz in der Fluoreszenz zwischen den inhibierten und den nicht inhibierten Zellen, und lassen einen hohen Auswärtstransport und dementsprechend eine starke Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika annehmen. Durch

Verwendung spezifischer Inhibitoren für MRP1, bzw. P-gp kann außerdem unterschieden werden ob MRP1 oder P-gp Ursache der Zytostatikaresistenz ist [172]. Jeweils 2×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen (*Falcon Nr.2052*) werden in 450 μ l serumfreiem RPMI 1640 (*Gibco BRL, Paisley, UK*) resuspendiert. Die unterschiedlichen Inhibitoren von P-gp und MRP1 werden in den jeweiligen Konzentrationen zugegeben (siehe 2.5.3.1 und 2.5.3.2). Zusätzlich wird eine Negativkontrolle mit Wirkstoff freiem Lösungsmittel (DMSO) versetzt.

Nach einer 20 minütigen Präinkubation im Wasserbad bei 37° C, erfolgt die Zugabe von Calcein AM (0,1 μ M). Jedes FACS Röhrchen inkubiert dann exakt 15 Minuten bei 37°C. Zur Beendigung des Transports werden die Proben auf Eis gestellt und dann bei 1200 rpm für 5 min bei 0° C zentrifugiert (*Megafuge 1.0R, Heraeus*).

Nach Dekantieren des Überstands werden die Zellen in eiskaltem PBS resuspendiert, erneut pelletiert und schließlich in eine PBS/Propidiumiodid Lösung (5 μ g PI pro ml PBS) aufgenommen.

Die Messung erfolgt unter Detektion von FSC, SSC, FL1 (grüne Calcein Fluoreszenz) und FL2 (rote Propidiumiodid Fluoreszenz) Charakteristika mit einem BD FACScan. Die Kompensation wird unter Verwendung nur mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Vergleichszellen eingestellt. Schließlich erfolgt die Kalkulation unter Verwendung von PC-Lysis II Software (*Becton Dickinson*), wobei nach Setzung eines Gates um die lebenden Zellen (Propidiumiodid negativ) in einem FSC/FL2 Dotplot, die Fluoreszenz des Calcein in einem FL 1 Histogramm dargestellt wird.

Die Berechnung des **multidrugresistance activity factors** (MAF) erfolgt unter Verwendung der mittleren (mean) FL1 Werte.

$$\text{MAF} = 100 \cdot \frac{(\text{Mittelwert Inhibitor} - \text{Mittelwert DMSO Ko.})}{\text{Mittelwert Inhibitor}}$$

3.5.3.1 Austestung verschiedener P-gp Inhibitoren auf Effektivität und Spezifität im Calcein-Assays unter Verwendung mit MDR1 bzw. MRP1 cDNA transfizierten Zelllinien

Die adhären 2008 Zellen werden durch trypsinieren in Suspension gebracht. Um den Effekt unterschiedlicher Inhibitoren auf die intrazelluläre Calcein Akkumulation zu untersuchen werden die 2008 Zelllinie und ihre mit MRP1 bzw. MDR1 cDNA transfizierten Tochterzelllinien mit unterschiedlichen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen 20 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann ein Calceinassay wie oben

beschrieben durchgeführt. Zu jeder InhibitorKonzentration wird der dazugehörige MAF-Wert errechnet. Wenn möglich wird für die Inhibitoren die IC_{50} bestimmt, also die Inhibitor Konzentration, die notwendig ist um 50 % des maximalen MAF-Werts zu erreichen. Außerdem wird der RAF bestimmt, also der Wert der die Calcein-Fluoreszenz der transfizierten und der nicht transfizierten Zellen vergleicht, wenn keine Inhibitoren zugegeben sind.

$$RAF = 100 \times \frac{(\text{mittlere Fluoreszenz}_{FL1} \text{ Ausgangszelllinie} - \text{mittlere Fluoreszenz}_{FL1} \text{ Resistente Zelllinie})}{\text{mittlere Fluoreszenz}_{FL1} \text{ Ausgangszelllinie}}$$

3.5.3.2 Messung der MAF-Werte der Patienten Zellen, und der BCR-ABL positiven Zellen nach Imatinib Behandlung

Um die Funktion der Transportproteine P-gp und MRP1 in Patienten Zellen und in BCR-ABL positiven Zelllinien zu bestimmen, werden die MAF-Werte dieser Zellen mit Indomethacin, PSC833 und PAK-104P als Inhibitoren bestimmt. 8 Stunden vor jedem Versuch wird jeweils ein Paar, der kryokonservierten Patienten Zellen aufgetaut, und in IMDM Medium, dem 20 % FCS zugesetzt ist, bei 37 °C und in einer 5% CO₂ enthaltenden, feuchten Kammer präinkubiert. Die BCR-ABL positiven Zelllinien werden nach 24 h Inkubation mit und ohne Imatinib (1µM), zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

Pro Ansatz werden 2,4 Millionen Zellen benötigt, die in 5,4 ml RPMI 1640 aufgenommen und gleichmäßig auf 12 FACS-Röhrchen verteilt werden. Als Transportinhibitoren werden den Zellen PSC 833 (1 µM), Indomethacin (10 µM), PAK-104P (5 µM), oder als Kontrolle das gleiche Volumen (2,5 µl) DMSO (*Fluka*) zugegeben. Je Bedingung werden Triplikate angesetzt, und mittlere MAF-Werte für jede Bedingung errechnet.

3.6 Transwell-Assays für Substrattransport-Experimente

Wenn man MDCKII Zellen bzw. ihre MDR 1, MRP 1 und MRP 2 cDNA stabil exprimierenden Transfektanten auf Transwells aussät bilden sie einen dichten polarisierten Monolayer. P-gp und MRP 2 werden dabei an der apikalen Membran, MRP 1 an der basolateralen Membran exprimiert [163, 173]. Hieraus resultiert bei Zugabe von Substraten ein vektorieller Transport.

Wenn man Substrate entweder in das apikale oder das basale Kompartiment gibt, kommt es durch unspezifische Mechanismen wie Diffusion zum Anstieg der Konzentration im kontralateralen Kompartiment. Die Transportproteine verstärken bzw. schwächen diese Konzentrationszunahme. Da P-gp und MRP 2 aufgrund ihrer Lokalisation Substrate nach apikal transportieren kommt es durch sie zu einer verstärkten Konzentrationszunahme im apikalen Kompartiment bei Substratzugabe im basalen Kompartiment, während basal die Konzentrationszunahme bei apikaler Zugabe abgeschwächt wird [163, 173]. Dagegen transportiert MRP 1 Substrate nach basal und somit kommt es zu einer verstärkten Konzentrationszunahme im basalen Kompartiment, wenn das Substrat apikal zugegeben ist. An der Differenz der jeweiligen Konzentrationszunahmen im kontralateralen Kompartiment bei Zugabe von Substraten entweder apikal oder basal, erkennt man den gerichteten Transport. Liegt kein aktiver Transport vor, wie z.B. bei den nicht transfizierten Zellen, bzw. wenn eine Substanz zugegeben wird, die kein Substrat des jeweiligen Transportproteins ist, kommt es nicht zu Differenzen zwischen den Konzentrationszunahmen im kontralateralen Kompartiment bei apikaler bzw. basaler Substrat Zugabe.

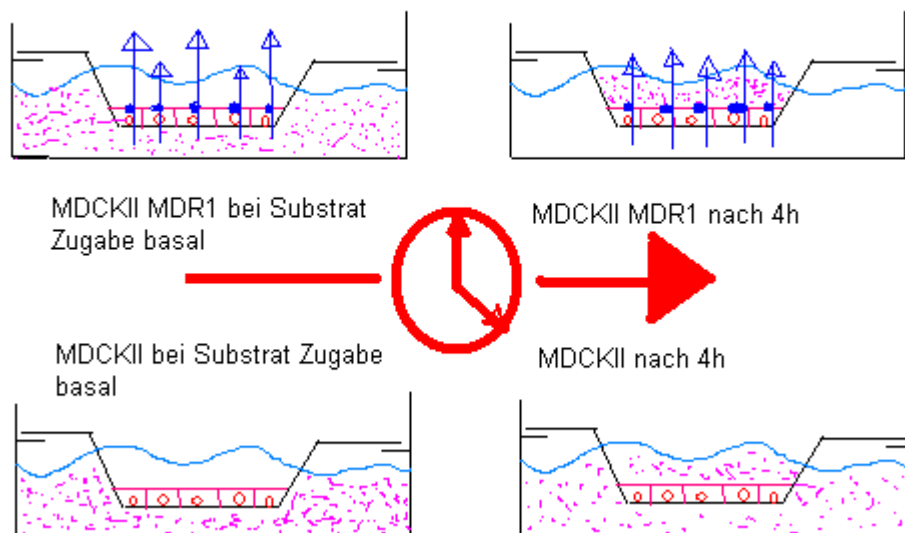


Abb. 7: Das Schema veranschaulicht den Transwellassay. Oben: die MDCKII MDR1 Zellen bilden auf dem Transwell ein einschichtiges Epithel. P-gp (blau) führt durch den vektoriellen Transport bei basaler Zugabe (links) eines Substrates (rosa) nach 4 h zu einer erhöhten Substrat Konzentration apikal (rechts). Unten: bei den nicht transfizierten Zellen kommt es nach basaler Substrat Zugabe (links) nach 4 h zu einer Angleichung der Substrat Konzentrationen apikal und basal (rechts).

Für die Transwellexperimente werden je 2×10^6 MDCKII Zellen oder ihre Transfektanten je Well des Costar TranswellTM (3 μm Poren Größe, 24,5 mm Durchmesser, No.3414; Costar Corp., Cambridge, MA, USA) ausgesät, und für drei Tage unter täglichem Mediumwechsel mit DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) + 10 % fetales Kälber Serum (Serva) + 2 mM Glutamin + 50 U/ml Penicillin + 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin kultiviert. Eine Stunde vor Beginn des Experiments wird das Medium durch 2 ml Medium pro Kompartiment ersetzt, das 0,1 μM PSC 833 enthält um das endogene P-gp der Zellen zu inhibieren. Diese geringe Konzentration reicht aus, um den intrinsischen P-gp-Transport in MDCK II, MDCK II MRP 2 und MDCKII MRP1 fast vollständig zu inhibieren, während das humane P-gp in der MDR 1 Transfektanten kaum tangiert wird. Das Experiment wird gestartet durch erneuten Austausch des Mediums durch Medium, das entweder apikal oder basal das Substrat enthält. Zusätzlich enthält das frische Medium wiederum 0,1 μM PSC 833. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten werden Proben aus dem Kompartiment entnommen, das kontralateral der Substratzugabe liegt. Die Differenz zwischen dem Transport von apikal nach basal und dem Transport von basal nach apikal illustriert den Substrattransport durch P-gp/MRP-1/2.

3.6.1 Transwell-Assay zum Nachweis einer Imatinib bedingten Inhibition des [³H]-Vinblastin Transports

Um zu untersuchen, ob Imatinib ein kompetitiver Antagonist des P-gp bzw. des MRP2 Transports ist, wird der [³H]Vinblastin Transport im Transwell-Assay in Anwesenheit und ohne Imatinib untersucht.

Unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate, wie [³H]Vinblastin, ist es möglich Konzentrationsveränderungen durch den Transport durch P-gp und MRP 2 im Szintillations Zähler zu messen. Wenn man die Zunahme der Radioaktivität im apikalen Kompartiment mißt, bei basaler Zugabe, so ist die Zunahme der gemessenen Radioaktivität stärker, als wenn das Vinblastin entgegen der Transportrichtung von P-gp und MRP-2, also apikal zugegeben wird und die Radioaktivität basal gemessen wird. Gibt man während des Experiments Substanzen hinzu die inhibitorisch auf den Transport wirken, erkennt man dies an der Abnahme der Differenz zwischen dem Transport von apikal nach basal und dem Transports von basal nach apikal, bzw. an der Angleichung der Transportcharakteristika der transfizierten und der nicht transfizierten MDCK II Zellen [163].

Für das Experiment werden MDCKII, MDCKII MDR1 und MDCKII MRP2 auf Transwells ausgesät. Eine Stunde vor Beginn des Experiments wird das Medium durch 2 ml DMEM + 10 % FCS pro Kompartiment ersetzt. Das frische Medium enthält 0,1 μ M PSC 833 um das endogene P-gp der Zellen zu inhibieren. Nach der Präinkubation wird das Medium erneut durch Medium ersetzt, welches 0,1 μ M PSC 833 enthält. Zusätzlich enthält das Medium entweder des apikalen oder des basalen Kompartiments 2 μ M [3 H]-Vinblastin (0,25 μ Ci/ml), (3 H)-Vinblastin (15 Ci /mmol), Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) und 0,025 μ Ci /ml [14 C] markiertes Inulin (Inulin- 14 C] carboxylic acid, 5,95 Ci/mol, Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK)). [14 C]Inulin ist ein großes hydrophiles Molekül, das nicht durch die Zellmembranen diffundiert. Es ermöglicht so die Unversehrtheit, des Monolayers zu überprüfen. Die Zugabe des [3 H]Vinblastin entweder in das apikale oder in das basale Kompartiment ermöglicht die Untersuchung des [3 H]-Vinblastin Flusses gegen bzw. mit der Transportrichtung des Transportproteins. Die inhibitorische Wirkung von Imatinib auf den Transport wird bei 0, 5, 25 μ M Imatinib Konzentration im Duplikat untersucht. Während des Experiments werden die Transwells bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Verlauf von 4 Stunden wird stündlich eine Probe von 50 μ l aus jedem Kompartiment gewonnen. Diese Aliquots werden dann in 4 ml Szintilationscocktail Rotiscint (Carl Roth GmbH®) aufgenommen und dann in einem Szintilationscounter gemessen. Der Transport wird als Fraktion der anfangs zugegebenen Radioaktivität kalkuliert.

3.6.2 Imatinib-Transport im Transwell-Assay

Um direkt zu untersuchen, ob Imatinib ein Substrat von P-gp, MRP1 oder MRP2 ist, wird Imatinib zu einem Transwell-Assay zugegeben und die Konzentration im kontralateralen Kompartiment mittels HPLC gemessen. Nach Präinkubation für 1 h mit Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), welche 0,1 μ M PSC833 enthält, wird das Experiment gestartet indem das Medium durch 2 ml HBSS + 0,1 μ M PSC833 ersetzt, welches entweder apikal oder basal Imatinib (5 μ M) enthält. Nach 2 und 4 h werden sowohl apikal als auch basal 500 μ l Proben gewonnen und eingefroren. Die Imatinib Konzentrationen wurden freundlicherweise mittels HPLC durch Prof. Dr. med. Carlo Gambacorti-Passerini und seine Mitarbeiter am Instituto Nazionale Tumori, Milan, gemessen. Der relative Imatinib-Transport wird kalkuliert, indem die Imatinib Konzentration im kontralateralen Kompartiment durch die Imatinib Konzentration in der Ausgangslösung dividiert wird.

HANKS balanced salt solution (HBSS): 5,4 mM KCl, 0,3 mM Na₂PO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 1,3 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,6 mM MgSO₄, 137 mM NaCl, 5,6 mM D-Glucose, 1 l H₂O, pH auf 7,4 einstellen

4 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob BCR-ABL durch die deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität zu einer Hochregulation bzw. Herunterregulation von MRP1 oder P-gp führt. Die These, die hierbei zugrunde liegt, ist das BCR-ABL durch Beeinflussung der zellulären Signaltransduktion Einfluß auf die Expression der ABC-Transporter nimmt. Imatinib könnte dann diesen Signaltransduktionsweg inhibieren, was sich in einer Veränderung des *multidrug resistance* Phänotyps niederschlagen müßte.

Der zweite Teil der Arbeit geht von einer anderen Fragestellung aus: Wenn Imatinib ein Substrat von MRP 1 oder P-gp wäre, so könnte eine gesteigerte Aktivität dieser Transport Proteine eine primäre bzw. sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib bewirken. Nach Langzeiteinnahme von Imatinib würde einem BCR-ABL positiven Zellklon mit hoher *multidrug resistance* Aktivität durch Reduktion der intrazellulären Imatinib-Konzentration und der daraus resultierenden Rekonstitution der Tyrosinkinase-Aktivität ein Wachstumvorteil entstehen. Um diese Frage näher zu beleuchten, sollte untersucht werden, ob Imatinib ein Substrat von P-gp/MRP1 oder MRP2 ist. Desweiteren wurde der *multidrug resistance* Phänotyp von Patientenzellen vor und nach Imatinib Therapie verglichen.

4.1 Einfluß der BCR-AbL Tyrosinkinase-Aktivität auf P-gp und MRP1Expression und Funktion

4.1.1 Veränderungen der MRP-1 Proteinexpression bei in Imatinib kultivierten Philadelphia-Chromosom positiven Zelllinien

Die hohe Resistenz von Ph⁺Zellen gegenüber vielen Apoptose auslösenden Zytostatika führte zu der Fragestellung, ob die deregulierte BCR-ABL- Tyrosinkinaseaktivität zu einer Hochregulation der beiden *multidrug resistance* vermittelnden Proteine MRP1 oder P-gp führt.

Um zu überprüfen, ob die Tyrosinkinaseaktivität einen Einfluß auf die MRP1 und P-gp Proteinexpression hat, wurden verschiedene BCR-ABL positive Zelllinien 24, 48 und 72 h mit oder ohne 1 µM Imatinib in serumhaltigem Medium kultiviert. Von den untersuchten lymphoblastischen Zelllinien enthalten die Zelllinien SUP B15 und TOM1

p190 BCR-ABL, während BV173 p210 BCR-ABL enthält. BV173 enthält kein Wildtyp ABL (Abb.8).

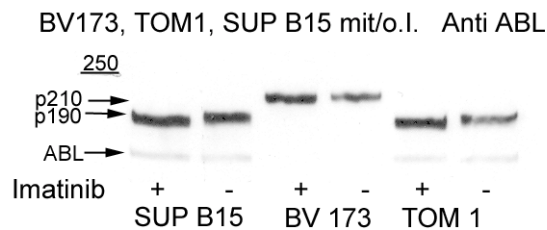


Abb. 8 zeigt einen Anti-ABL Western Blot. TOM 1 und SUP B15 enthalten neben dem Wildtyp ABL (145 kDa) auch p190 BCR-ABL (190 kDa). BV173 enthält lediglich p210 BCR-ABL (210 kDa). Durch Kultivierung mit 1µM Imatinib nimmt die BCR-ABL Proteinexpression leicht zu.

Der Westernblot, der phosphorylierten Tyrosine der entsprechenden Lysate zeigt, dass Imatinib die Tyrosinphosphorylierung bei den mit Imatinib kultivierten Zellen deutlich reduziert (Abb. 10-12).

Mittels des P-gp spezifischen Antikörpers C219 ließ sich sowohl unter Kultivierung mit Imatinib als auch ohne Zusatz des Tyrosinkinaseinhibitors bei den lymphoblastischen Zelllinien BV173, TOM1, SUP B15 kein P-gp Protein nachweisen. Lediglich bei einem Patienten lies sich eine geringe Menge P-gp nachweisen (Abb. 9, Pat. 1), die sich nicht durch Kultivierung mit Imatinib veränderte.

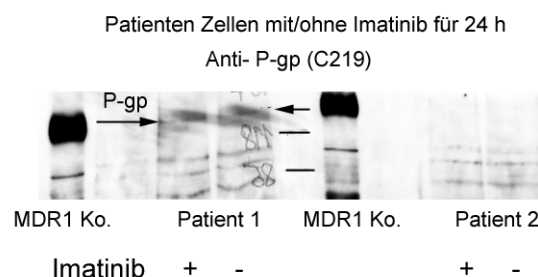


Abb. 9 zeigt mononukleäre Zellen zweier Patienten mit Ph^+ ALL, die für 24 h mit und ohne 1 µM Imatinib kultiviert wurden. Der Westernblot wurde mit dem P-gp spezifischen Antikörper C219 angefertigt. Bei Patient 1 erkennt man bei 170 kDa (Pfeil) jeweils eine schwache Bande.

Dagegen war in allen untersuchten Zelllinien und bei den mononukleären Patientenzellen im Westernblot mit dem spezifischen Antikörper MRPr1 das MRP1-Protein nachweisbar (Abb.10- 15).

Interessanterweise zeigte die BCR-ABL p210 positive Zelllinie BV 173 bei zahllosen Westernblots eine deutliche Verminderung der relativen MRP 1 Proteinexpression, wenn 1µM Imatinib dem Kulturmedium für 24, 48 und 72 h zugesetzt war (Abb.10).

Die Tyrosinphosphoylierung ist in dieser Imatinib Konzentration bei den BV173
suffizient inhibiert.

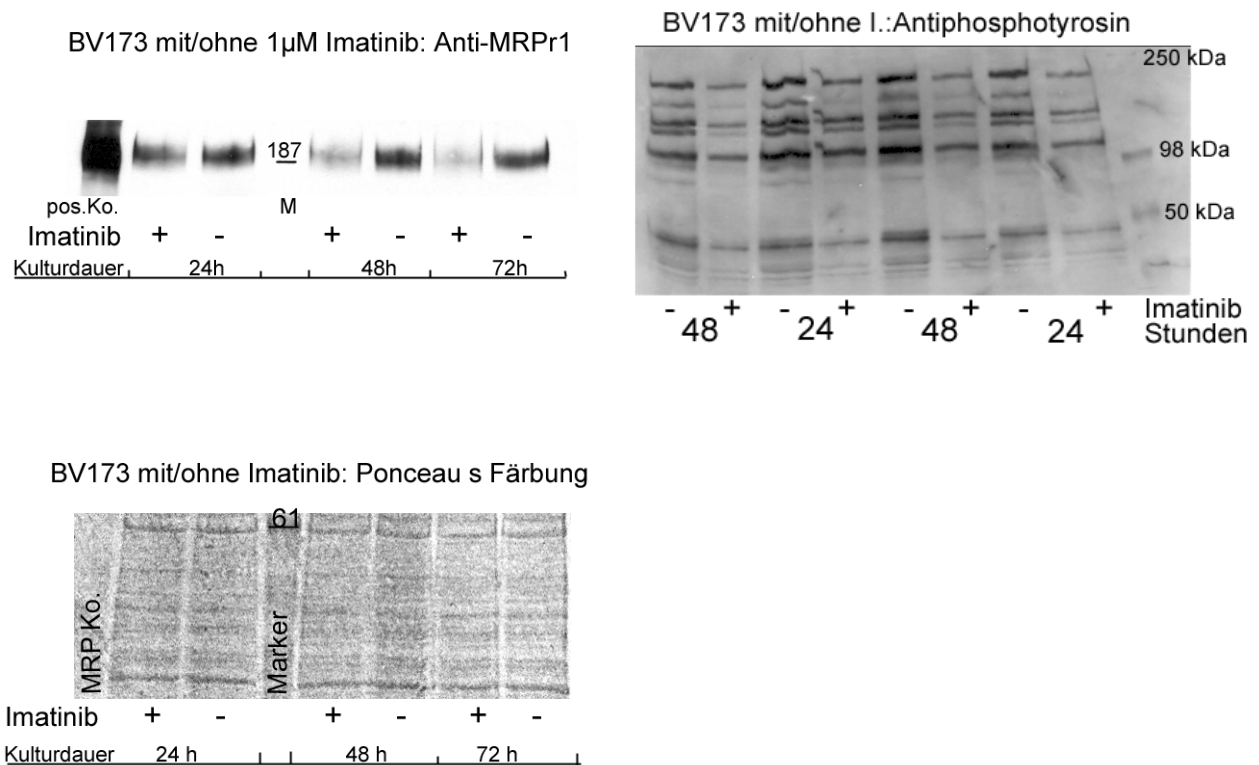


Abb. 10 : Die obere Abbildung zeigt einen Westernblot mit dem Antikörper MRPr1. BV 173 Zellen wurden mit oder ohne 1 μM Imatinib 24, 48 und 72 h kultiviert. Die untere Abbildung weist die Proteinäquivalenz des oberen Blots mittels Poinceau s Färbung nach. In der rechten Abbildung wurde der Grad der Tyrosinphosphorylierung nach Kultivierung von BV173 mit und ohne Imatinib für 24 und 48 h, mit dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper untersucht.

Für TOM1, eine lymphoblastische BCR-ABL p190 positive ALL-Zelllinie, zeigt sich meist nur eine geringfügige MRP1 Verminderung (Abb.11 links oben). Gleiches gilt für K562 (Abb.11 rechts oben), eine BCR-ABL p210 positive erythroblastische CML Zelllinie. Die BCR-ABL p190 positive ALL-Zelllinie SUP B 15 zeigt in den meisten Westernblots keine Minderung im relativen MRP1 Protein Niveau, wenn die Zellen mit Imatinib kultiviert werden (Abb.12). Dabei besteht auch bei diesen Zellen eine gute Inhibition der Tyrosinkinase-Aktivität (Abb.11 und 12). Auch bei den beiden Patienten führt eine Kultivierung mit Imatinib über 24 h zu einer Reduktion der MRP1 Niveaus (Abb.13). Als Nachweis der Proteinäquivalenz, können unspezifischen Banden im Anti-Pgp Westernblot dienen (Abb.9). Da in den Patienten Proben nach 24 h Kultivierung

einer relativ hoher Anteil toter Zellen zu finden ist, ist dieser Befund allerdings nur von eingeschränkter Aussagekraft.

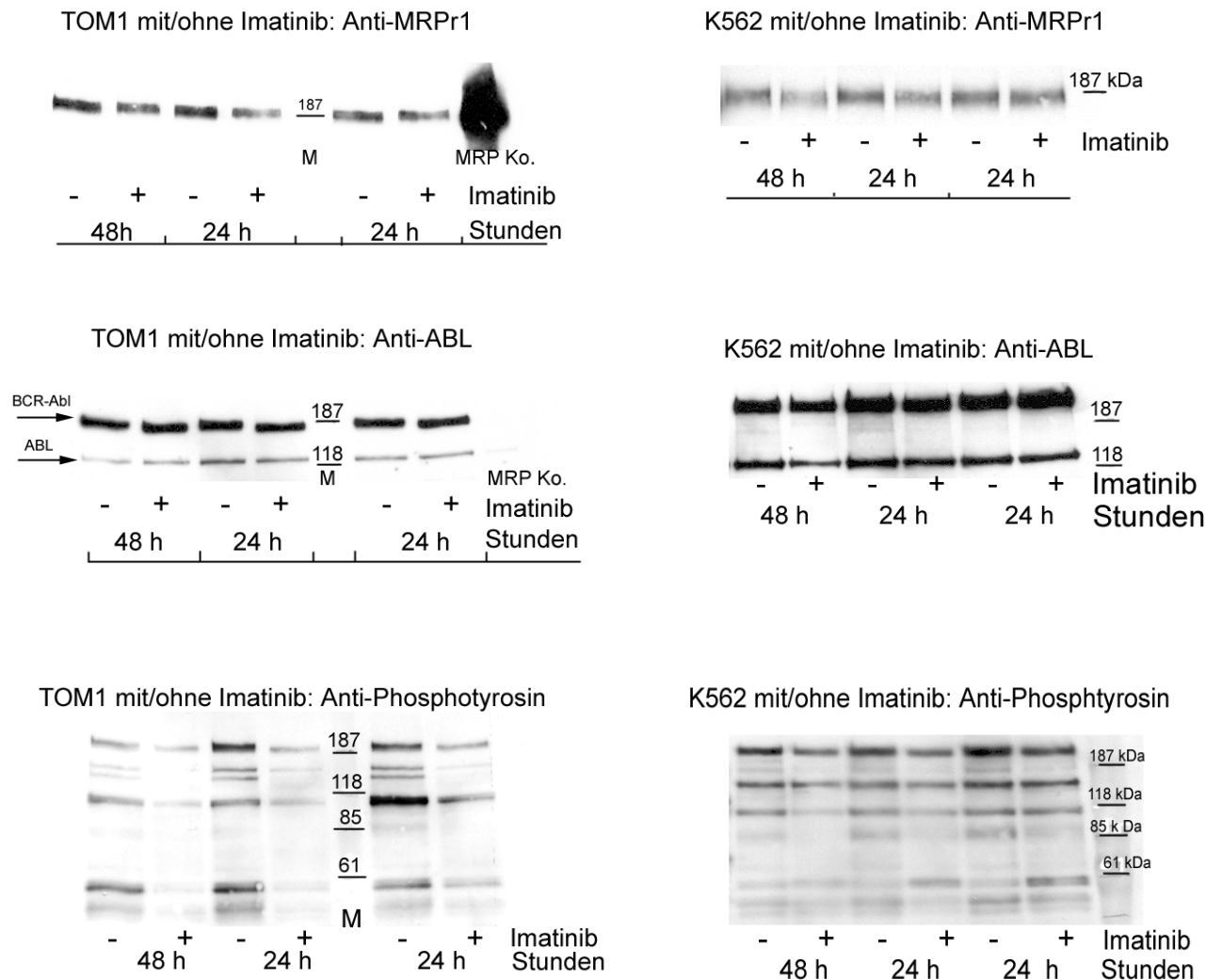


Abb.11: Die Abb. zeigt Westernblots der Zelllinie TOM 1(links), und der Zelllinie K562 (rechts), die mit und ohne 1 μ M Imatinib kultiviert wurden. Oben sind Westernblots mit dem MRP1r1 Antikörper, in der Mitte mit dem Anti-cABL Antikörper und unten mit dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper dargestellt. Der Western Blot mit dem Anti-ABL Antikörper soll die Proteinäquivalenz der aufgetragenen Proben dokumentieren. Die Inkubation mit dem Anti-ABL bzw. dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper erfolgte nach "strippen" der Nitrocellulosemembran

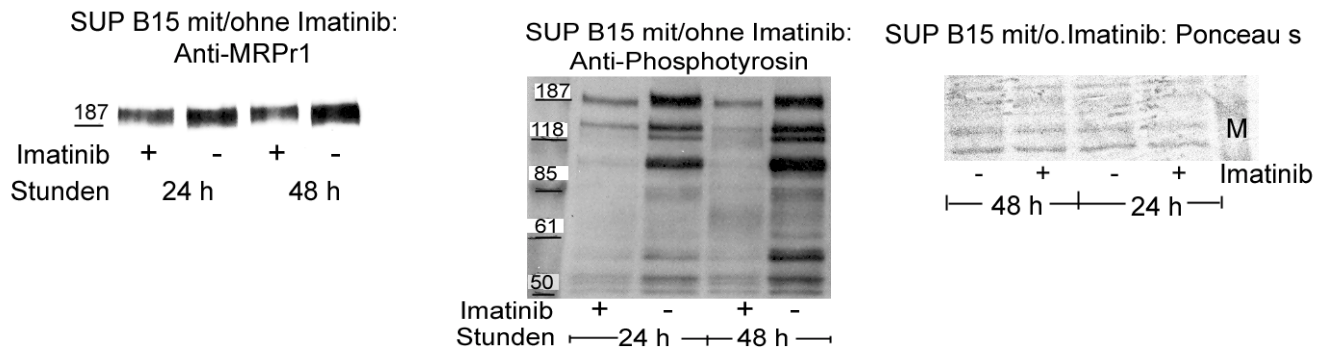


Abb. 12: Die Abb. zeigt links einen MRP1-Blot der Zelllinie SUP B15. Die Zellen wurden 24 und 48 h mit 1 μ M Imatinib kultiviert. Nach "strippen" der Nitrocellulosemembran wurde die Membran mit einem Anti-Phosphotyrosinantikörper inkubiert (Mitte). Rechts: Ponceau s Färbung des Blots.

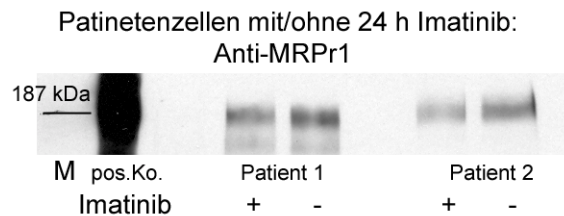


Abb. 13: Westernblot von mononukleären Zellen zweier Patienten mit Ph^+ ALL, die 24 h mit und ohne 1 μ M Imatinib kultiviert wurden. Dargestellt ist die MRP1-Expression, detektiert mit dem Anti-MRP1 Antikörper.

U 937p185 ist eine mit BCR-ABL transfizierte AML Zelllinie. Die U937 Wildtyp Zelllinie ist zytokinunabhängig. Die Tyrosinphosphorylierung nimmt durch die Transfektion mit BCR-ABL im Vergleich zu den Wildtyp Zellen deutlich zu, und lässt sich bei den transfizierten Zellen durch Imatinib hemmen (Abb. 14, oben rechts). Die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität von U937p185 führt nicht zu Apoptose oder Wachstumshemmung. Bei äquivalenter Gesamtproteinverteilung waren auch die MRP1-Proteinniveaus äquivalent.

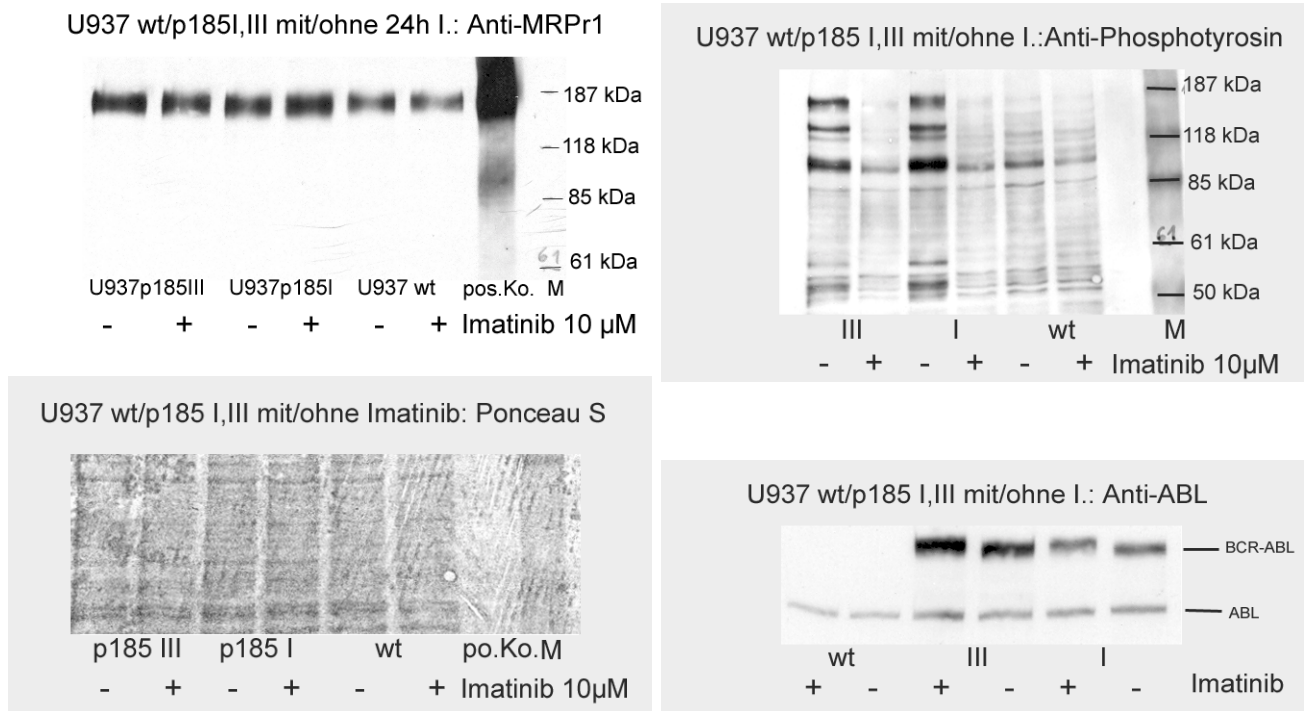


Abb. 14: Bei diesem Experiment wurden zwei Klone (I, III) mit p185 BCR-ABL transfizierte U937 Zellen mit und ohne 10 μM Imatinib kultiviert. Die Abb. oben links zeigt einen MRP1- Westernblot, die Abb. oben rechts den Anti-Phosphotyrosinblot der nach "stripfen" der Nitrozellulosemembran, und Inkubation mit einem Anti-Phosphotyrosinantikörper entstand. Die Abb. links unten zeigt die Ponceau S Färbung der Nitrocellulosemembran. Der ABL-Westernblot rechts unten dient zum Nachweis des chimären Translokationsprodukts.

Ein anderes untersuchtes Zelllinien Modell ist die mit p185 und p210 BCR-ABL transfizierte murine Ba/F3 Zelllinie. Ausgehend von der Annahme, dass die Zellen durch Inhibition der Tyrosinkinase mit Imatinib wieder faktorabhängig werden, wurden die Experimente mit und ohne IL3 durchgeführt. Sowohl bei den mit IL3-kultivierten Zellen als auch bei den ohne IL3 kultivierten Zellen führt die Inhibition der Tyrosinkinase zu einer geringfügigen Reduktion der relativen MRP1 Proteinexpression (Abb.15).

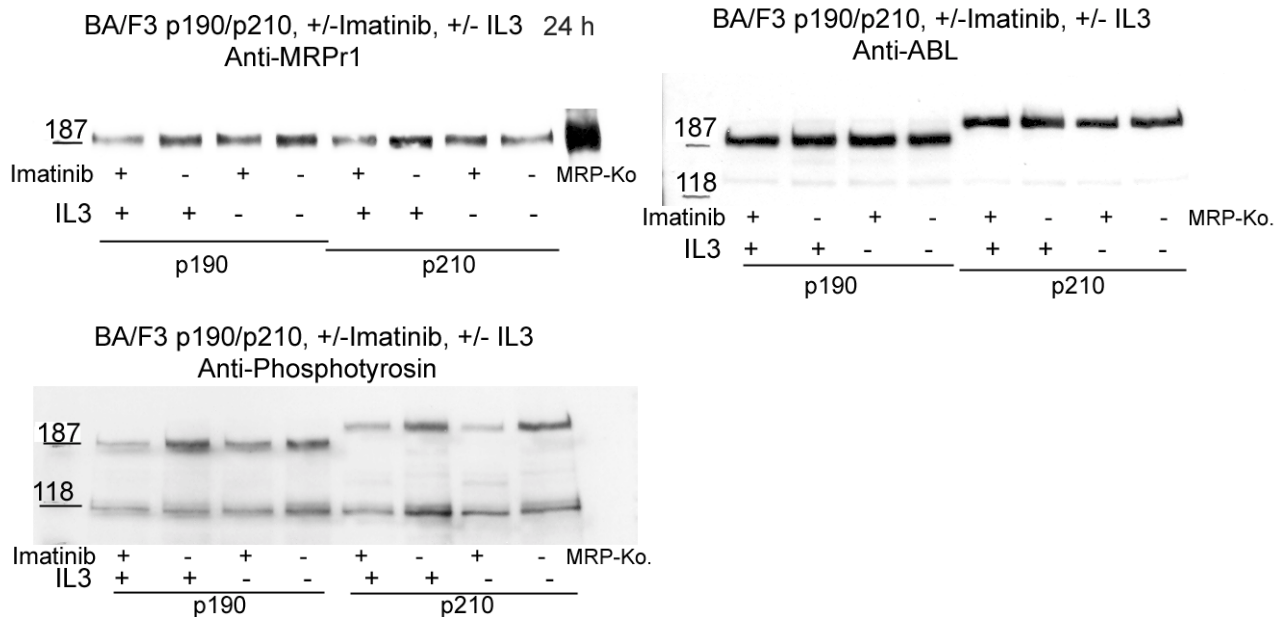


Abb. 15 zeigt oben links die MRP1 Proteinniveaus der Ba/F3 p185 und p210 Zelllinien nach 24 h Kultivierung mit oder ohne 1 μ M Imatinib, und mit oder ohne 10 ng/ml IL3. Nach stripfen und erneuter Inkubation des selben Blots mit einem Anti-ABL Antikörper entstand, der Anti-ABL-Blot, der hier sowohl als Nachweis der Proteinäquivalenz, als auch zum Nachweis von BCR-ABL p185/p210 dient (rechts). Die Abb. Unten zeigt den dazugehörigen Phosphotyrosinblot, der ebenfalls nach stripfen derselben Nitrocellulosemembran entstand.

4.1.2 Einfluß von Imatinib auf die c-myc Expression und die MAPK-Aktivität

Die deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL führt zu einer Hochregulation von c-myc, einem Transkriptionsfaktor [30, 31]. Da ein Zusammenhang zwischen erhöhten Expressionsniveaus von n-myc und MRP1 Proteinniveaus bei Neuroblastomen beschrieben wurde [147], sollte überprüft werden, ob c-myc auch bei den bisher untersuchten BCR-ABL positiven Zelllinien hochreguliert ist, ob diese Hochregulation durch Imatinib hemmbar ist, und ob dies mit der MRP 1 Expression in den behandelten Zelllinien korreliert.

Die Inkubation mit 1 μ M Imatinib bei BV173, SUPB15, U937 p185 für 24 oder 48 h führt zu einer Suppression der c-myc Expression (Abb.16). Hierbei war die c-myc Expression in der SUP B15 Zelllinie im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Zelllinien geringer. An den unspezifischen Banden in den jeweiligen Westernblots ist ablesbar

das die Proteinladung der jeweiligen Banden äquivalent sind. Da die Herunterregulation von MRP1 jedoch auf BV173 beschränkt ist, spricht dieser Befund gegen einen kausalen Zusammenhang.

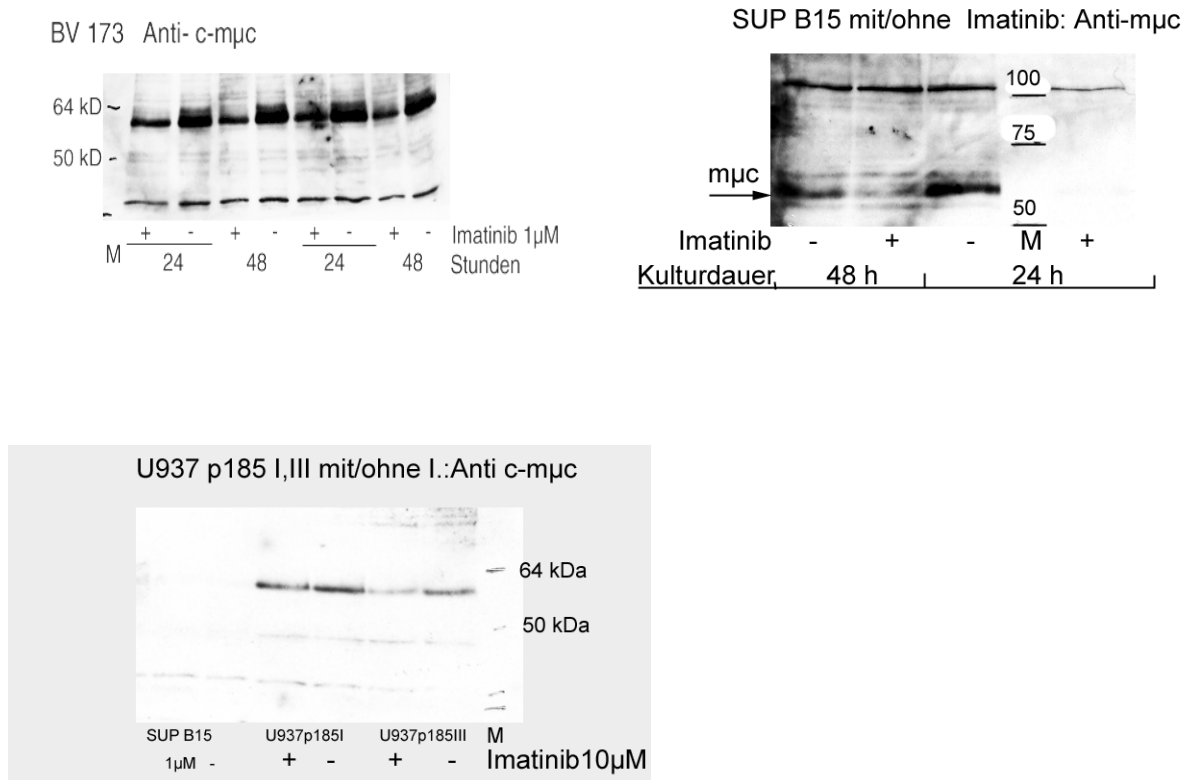


Abb. 16 zeigt Westernblots der mit und ohne Imatinib kultivierten BV173, SUPB15 und U937p185 Zelllinien mit einem c-myc (9E10) Antikörper. C-Myc ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kDa verläuft also knapp unterhalb der 64 kDa Bande (BV, U937). Für SUP B15 siehe Pfeil.

Ein weiteres wichtiges *downstream* Signal der BCR-ABL- Tyrosinkinase sind die durch RAS aktivierten MAP-Kinasen. Wären sie ursächlich an der Signaltransduktionskaskade beteiligt, die zur Suppression der MRP1 Expression unter Imatinib Therapie führt, sollte eine Inhibition dieses Signaltransduktionsweges mit dem MEK1/2-Kinase spezifischen Inhibitor PD 98059, ebenso eine Suppression von MRP1 bewirken. Die Zelllinie SUP B15 und BV173 wurde mit Imatinib, PD 98059, DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder ohne Zusätze in RPMI unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die MAPK-Gesamtproteinmenge war in allen Proben etwa gleich, und wurde weder durch Zugabe von Imatinib noch durch PD 98059 beeinflusst (Abb.17 rechts). Aktivierte MAP-Kinase

lies sich lediglich in den BV173 nachweisen. Bei Zugabe von DMSO als Lösungsmittelkontrolle kam es bei BV173 zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle verstärkten Phosphorylierung der MAPK. Nach einer Kultivierung von BV173 mit PD 98059 (50 μ M) kam es zu einer Inhibition der MAPK-Aktivierung. Im Vergleich dazu war die Inhibition durch Imatinib (1 μ M) noch deutlicher (Abb.17 links). Ein Einfluss auf die MRP1- Expression bleibt jedoch fraglich, da sich eine Reduktion der MRP1 Proteinexpression durch den MEK 1 Inhibitor nicht in allen Experimenten nachweisen liess (Abb.18: links: Imatinib und PD 98059 führen zur Inhibition von MRP1, rechts: kein Effekt der Inhibitoren).

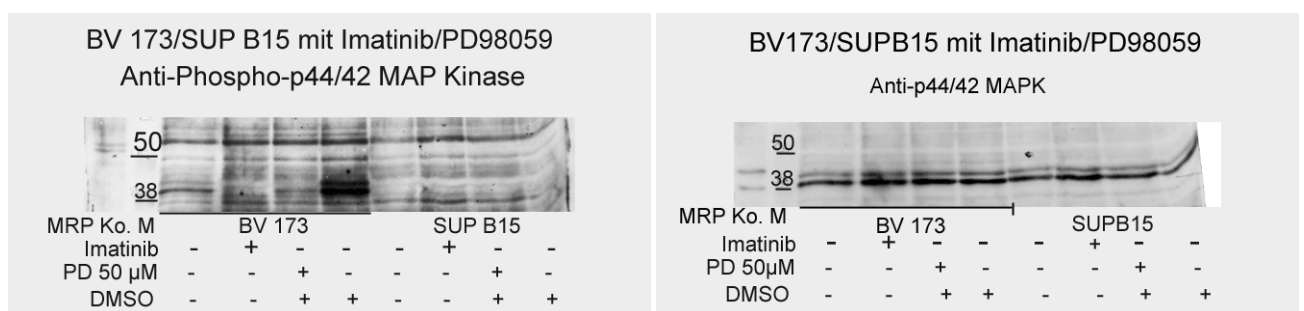


Abb. 17 zeigt Westernblots der beiden BCR-ABL positiven Zelllinien SUP B15 und BV 173 nach Kultivierung über 24 h mit 1 μ M Imatinib, 50 μ M PD98059, DMSO oder ohne Zusätze unter serumfreien Bedingungen. Dem Lysepuffer wurde für dieses Experiment 10 mM NaF und 10 mM Na₃VO₄ zugegeben. Links ist der Anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase Westernblot zum Nachweis der aktivierten Proteine, rechts der Anti-p44/42 MAPK Blot zum Nachweis des Gesamtproteins dargestellt. Die p44/42 MAPK (Molekulargewicht 42 bzw. 44 kDa) stellt sich als feine Doppelbande knapp oberhalb der 38 kDa Bande des Markers dar

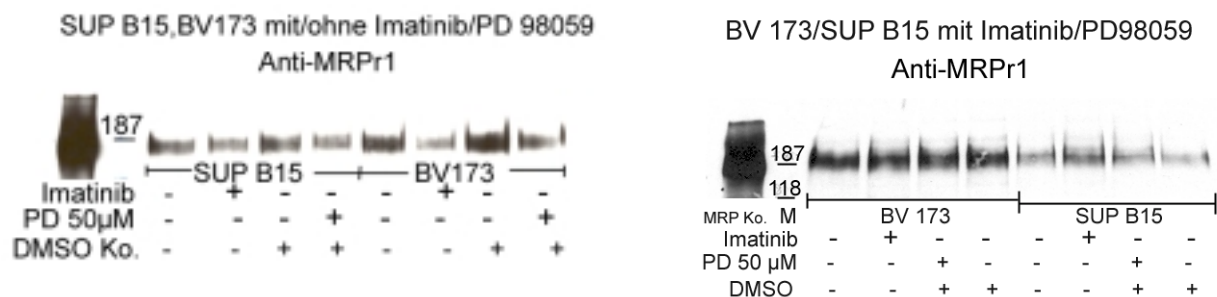


Abb. 18 zeigt zu Abb. 17 die entsprechenden Anti-MRPr1 Blots von BV173 und SUP B15.

Um Effekte auszuschliessen, die lediglich durch eine vermehrte Rate apoptotischer Zellen bedingt sind wurden die Zellen mit Daunorubicin kultiviert. Bei einer Daunorubicin- Konzentration von 20 nM kommt es zu einer Reduktion des MRP1 Proteinniveau (Abb.19). Bei dieser Konzentration liegt der Anteil toter Zellen bei 10 %, (negativ Kontrolle13%, +Imatinib 15 %). Bei dieser Daunorubicin Konzentration ist im Gegensatz zu den Imatinib behandelten Zellen auch die BCR-ABL Proteinexpression im Vergleich zur Negativkontrolle vermindert.

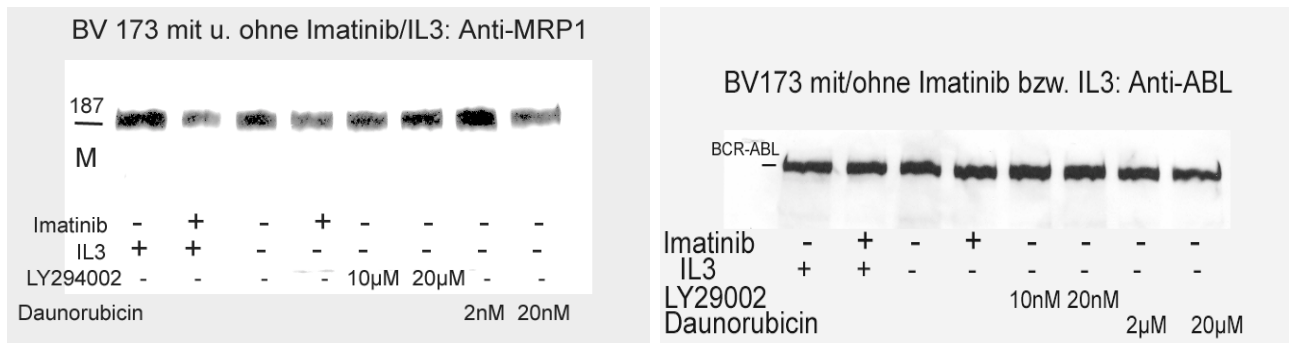


Abb. 19: Westernblots von BV173 kultiviert mit und ohne Imatinib (1 µM) und Daunorubicin (20 nM). Links: Anti-MRP1 Blot. Rechts: Anti-ABL Blot.

4.1.3 MRP1-mRNA Expression in BCR-ABL positiven Zelllinien nach Kultivierung in Imatinib

In 4.1.1 zeigte sich bei der Zelllinie BV173 konstant eine Minderung des MRP1-Proteinniveaus unter Kultivierung mit Imatinib, während andere Zelllinien geringere (TOM1) oder keine (SUP B15) Veränderungen zeigen. Gewinnt man unter denselben Bedingungen mRNA und amplifiziert diese mittels RT-PCR, so zeigt sich bei den in Imatinib kultivierten BV173 Zellen relativ zur Kontrolle eine Reduktion der MRP1 mRNA, wohingegen die GAPDH mRNA Mengen gleich bleiben. Bei den Tom 1 Zellen besteht eine geringe Reduktion der MRP1mRNA, während SUPB15 unter Imatinib Behandlung keine Minderung zeigt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, und erbrachte entsprechende Ergebnisse. Die MDR1 mRNA Expression sind bei allen drei Zelllinien sehr gering.

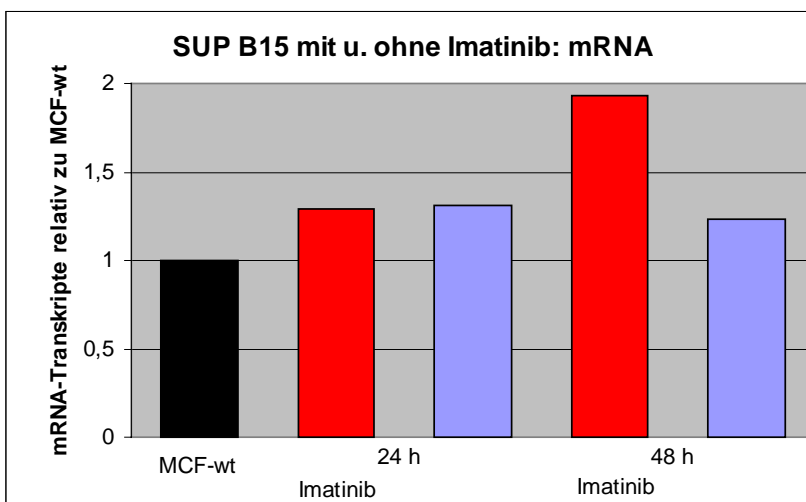
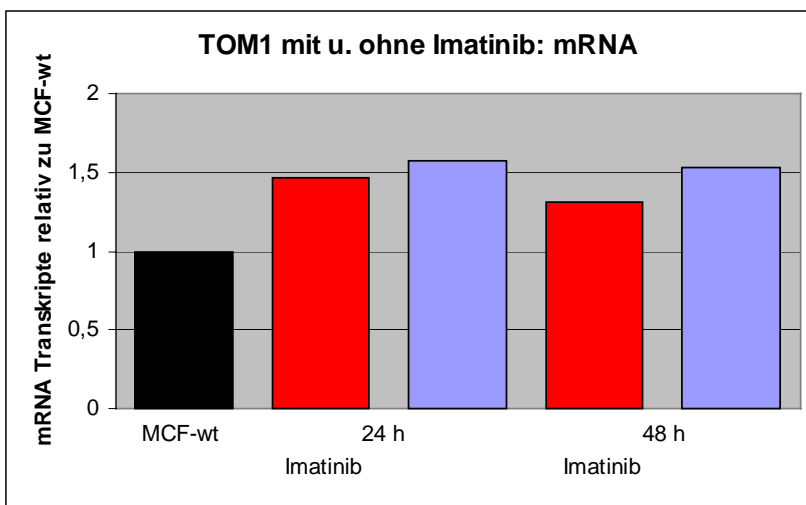
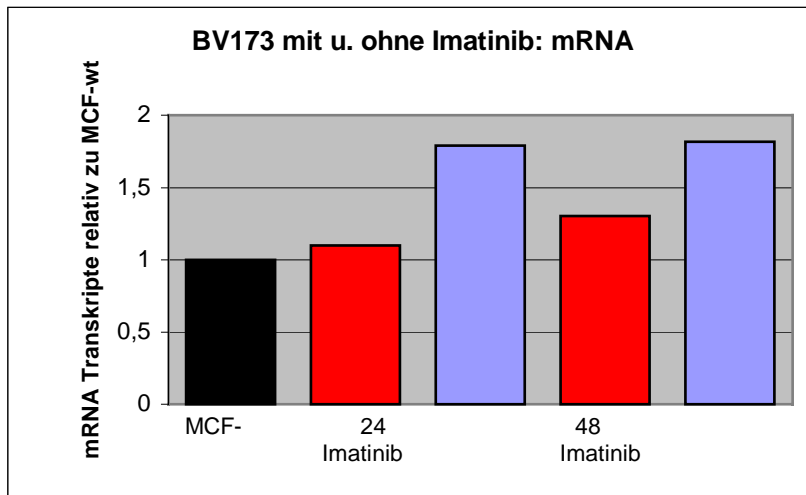


Abb. 20 zeigt Relative Anteil von MRP1-mRNA von BV173 (oben), TOM1 (Mitte) und SUP B15 (Unten) nach Kultivierung über 24/48 h mit Imatinib (1 μ M) (rot) und ohne Imatinib (blau) im Vergleich zur MCF-WT-mRNA (schwarz). Die MCF-7 Zelllinie, ist eine humane Brustkrebs Zelllinie, deren MRP1 mRNA als Referenz verwendet wurde.

4.1.4 Die Durchflußcytometrische Betrachtung der MRP-1

Proteinexpression nach Imatinib Behandlung

Neben dem Westernblot wurde auch mit durchflusszytometrischen Methoden die MRP1 Proteinexpression untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Methanol fixiert und permeabilisiert, und MRP1 mit dem MRPM6 AK als primär und nachfolgend einem Anti-*mouse* AK als sekundär Antikörper markiert. Als positiv Kontrolle für die Methode, wurden 2008 Zellen und ihre MRP1 transfizierte Tochterzelllinie verwendet. Während man zwischen der MRP1 transfizierten Zelllinie und ihrer Ausgangszelllinie 2008 einen deutlichen Unterschied der MRP1-Expression im FL2 Histogramm erkennt (Abb.21 oben), gibt es keinen Unterschied im MRP1 Niveau zwischen für 24 bzw. 48 h mit 1 μ M Imatinib inkubierten BV173 (Abb.21 unten) bzw. SUP B15 und ihren nicht behandelten Kontrollzellen.

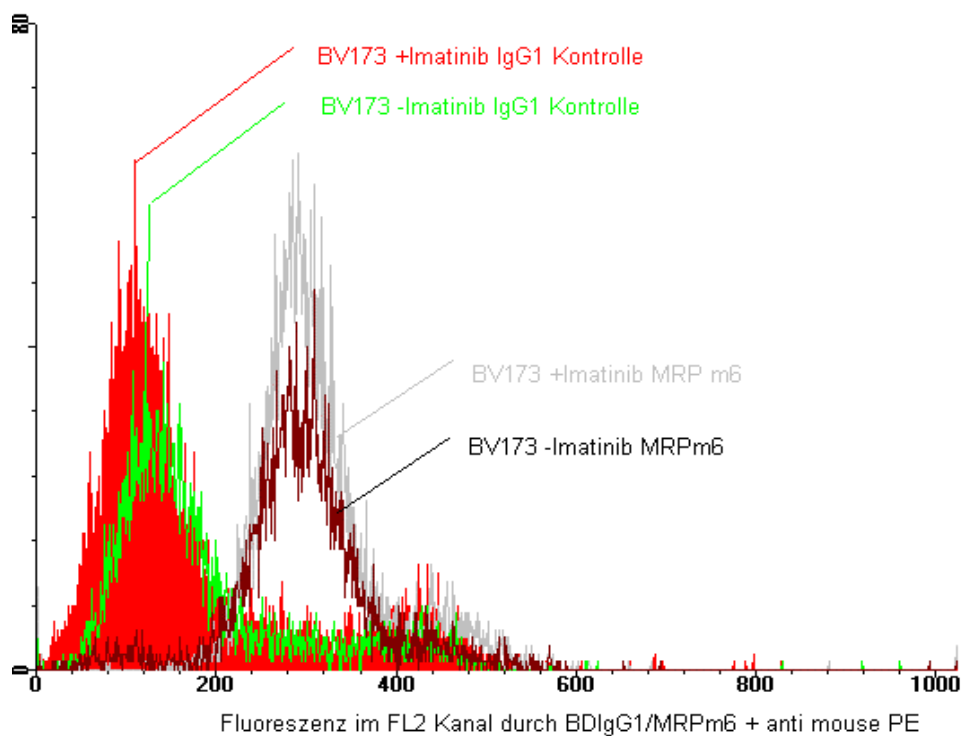
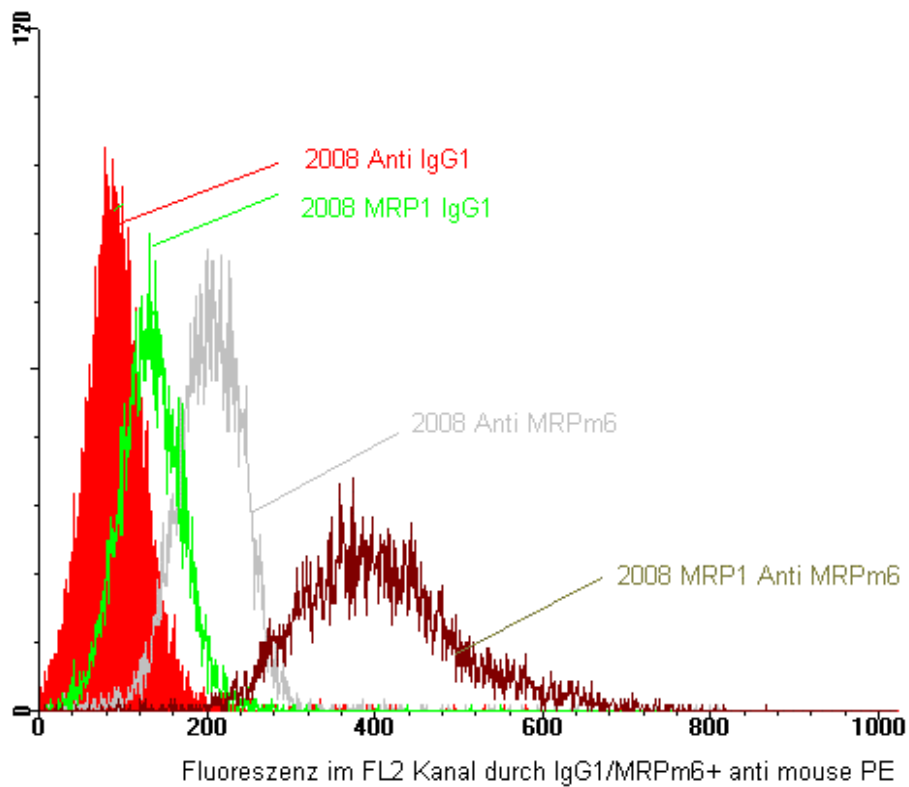


Abb. 21: Fluoreszenzmarkierung von MRP1 und Detektion im FL2 Kanal. Oben: Histogramme der MRPm6 markierten 2008 MRP1 Zellen (braun) im Vergleich zu MRPm6 markierten 2008 Zellen (grau), bzw. im Vergleich zur IgG₁-Kontrolle; Unten: Histogramme der mit MRPm6 bzw. IgG₁-markierten BV173 nach Kultivierung mit und ohne Imatinib (1 μ M) über 24 h.

4.1.5 Calcein-Assay von Imatinib behandelten Ph⁺-Zelllinien zur Bestimmung der *multidrug resistance activity*

Um die Relevanz der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zu beurteilen, wurde der funktionelle Calcein-Assay verwendet, der die Transportaktivität der Zellen messen kann. Es wurden die Ph⁺Zelllinien BV173, SUP B15 und TOM1 untersucht, nachdem sie 24/48 h mit 1 µM Imatinib kultiviert wurden. Vor dem Calcein-Assay wurden die Zellen eine gewisse Zeit (1 h – 3 h) Imatinib frei präinkubiert, um den Imatinib Einfluß auf den Transport zu vermindern. Die MAF-Werte waren bei allen drei Zelllinien niedrig. Eine Imatinib Behandlung änderte nichts an der Transportaktivität ausgedrückt durch den MAF-Wert. Der MRP 1 spezifischen Transportinhibitor Indomethacin ergab für BV173 nach Kultivierung mit Imatinib einen MAF_(Indomethacin) von 1,05 % (SD +/-1,7 %; n=8 Trippl). Ohne Imatinib lag der MAF-Wert für BV173 bei einem MAF_(Indomethacin) von 0,5 % (SD +/-1,8 %; n= 8 Trippl). Für den P-gp Inhibitor PSC 833 in 1 µM Konzentrationen ergab sich folgendes: Bei BV173 nach Kultivierung mit Imatinib lag der MAF_(PSC) bei 1,1 %(SD +/-1,2 %; n= 4 Trippl), ohne Imatinib bei MAF_(PSC) -0,4 %(SD +/- 0,6 %; n= 4 Trippl). Der globale Inhibitor PAK-104 P ergab für die Imatinib behandelten BV173 einen MAF_(PAK) von 3 % (SD +/- 1,7 %; n=4 Trippl), für die unbehandelten Zellen lag der Wert bei MAF_(PAK) 2,3 %(SD +/- 2,1 %; n=4 Trippl). Der ebenso eher unspezifische MAF_(MK571) lag bei den Imatinib behandelten Zellen bei 1,14 %(SD +/- 1,4 %, n=4 Trippl) bei den unbehandelten Zellen lag er bei 1,7 % (SD +/-1,4 %; n = 4 Trippl). Für SUP B15 (siehe Tabelle 1) und TOM1 lagen die Werte in einem ähnlichen Bereich.

Zelllinie	MAF(Indo.)	SD	n	MAF(PSC)	SD	n	MAF(PAK)	SD	n
BV173 mit Imatinib	1,05	1,7	8x3	1,1	1,2	4x3	3	1,7	4x3
BV173 ohne Imatinib	0,5	1,8	8x3	-0,4	0,6	4x3	2,3	2,1	4x3
SUP B15 mit Imatinib	1,7	1,2	3x3	0,3	1	3x3	3	2,5	
SUP B15 ohne Imatinib	1,2	1,3	3x3	0	2,7	3x3	3,6	2	

Tabelle 1 faßt die MAF-Werte [%] der mit oder ohne Imatinib (1 µM) kultivierten SUP B15 und BV173 unter Verwendung verschiedener Inhibitoren im Calceinassay zusammen.

Die niedrigen Werte sprechen gegen eine relevante Transportaktivität durch MRP1 oder P-gp in diesen lymphoblastischen Zelllinien. Imatinib führt nicht zu Verminderung der Transportaktivitäten dieser Zelllinien. Insgesamt nimmt die Transportaktivität mit Imatinib eher leicht zu.

4.1.6 Immunfluoreszenz Mikroskopie von Imatinib behandelten Ph⁺

Zelllinien zum Nachweis von Veränderung der MRP1 Lokalisation

Für Transportproteine wie MRP1 ist die Lokalisation von großer Bedeutung. Eine membranöse Lage von MRP1 würde es den Zellen ermöglichen die intrazelluläre Zytostatika-Konzentration aktiv zu vermindern, während dies bei intrazytoplasmatischer Lokalisation nicht der Fall sein muss. Bisher sind keine Daten über die Lage von MRP1 in lymphoblastischen Zellen veröffentlicht. Um die Relevanz einzuschätzen die MRP1 für die Zytostatikaresistenz in Philadelphia Chromosom positiven lymphoblastischen Zelllinien spielen kann, sind Informationen über die MRP 1 Lokalisation aufschlußreich. Desweiteren soll überprüft werden, ob die Kultivierung von BCR-ABL positiven Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zu einem veränderten *Routing* von MRP1 führt. Die lymphoblastischen Zelllinien BV173 und SUPB15 wurden 24 und 48 h mit oder ohne Imatinib kultiviert, und dann, nach Permeabilisierung, mit dem Erstantikörper MRP1, und einem mit dem Fluorochrom cy3 markierten Anti-*rat*-Zweitantikörper markiert.

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass MRP1 in diesen lymphoblastischen Zellen vor allem einen zytoplasmatischen Verteilungstyp hat. Die Imatinib Behandlung der Ph⁺Zellen führt nicht zu einer Umverteilung von MRP 1. Die Zellen unterscheiden sich einzig durch die Abnahme der Zellgröße unter Imatinib.

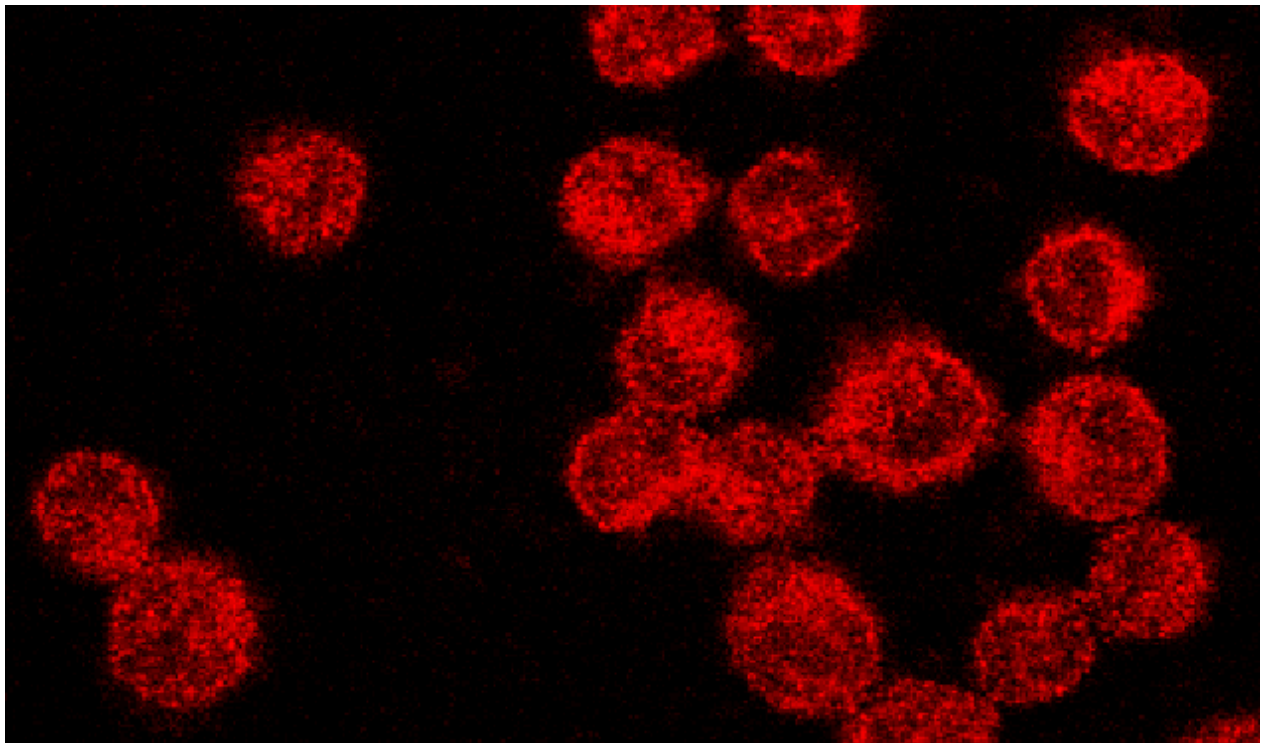


Abb. 22 zeigt die cy3 Fluoreszenz von markiertem MRP1 in SUP B15 Zellen.

4.1.7 FACS Analyse zum Ausschluß einer c-Kit (CD117) Expression in den verwendeten BCR-ABL positiven Zelllinien

Imatinib wirkt nicht nur inhibitorisch auf die Tyrosinkinase von BCR-ABL und c-ABL, sondern auch auf die Tyrosinkinase des SCF-Rezeptors c-Kit (CD117). Um auszuschließen, dass die Reduktion des MRP1-Proteinniveaus bei den BV173 durch Inhibition der Tyrosinkinase des SCF-Rezeptors ausgelöst ist, wurden die lymphoblastischen Zelllinien BV173, SUPB15 und TOM1 auf Ihre CD117-Expression mittels durchflusszytometrischer Methoden untersucht. Als Positivkontrolle diente die wachstumsfaktorenabhängige AML Zelllinie MO7e, die bekanntermaßen c-Kit positiv ist, da sie SCF-abhängig wächst. Die Markierung mit einem PE markiertem CD117 Antikörper ergab für Mo7e eine mittlere Fluoreszenz von 472. Im Vergleich dazu lagen die als Negativkontrolle dienenden mit einem PE IgG₁ Isotypen Kontrollantikörper inkubierten BV173 Zellen bei einer mittleren Fluoreszenz im FL2 Kanal von 149 (Abb. 23). Bei den drei BCR-ABL positiven Zelllinien BV173, TOM1 und SUP B15 liegt die Fluoreszenz im FL2 Kanal bei Markierung von CD117 auf dem Niveau der Negativkontrolle (für BV 140). Die gemessene Fluoreszenz ist bei BV173, SUP B15 und TOM1 somit durch unspezifische Bindungen bedingt. Eine CD117 Expression, und damit ein membranständiger SCF-Rezeptor, ist lediglich bei Mo7e nachweisbar.

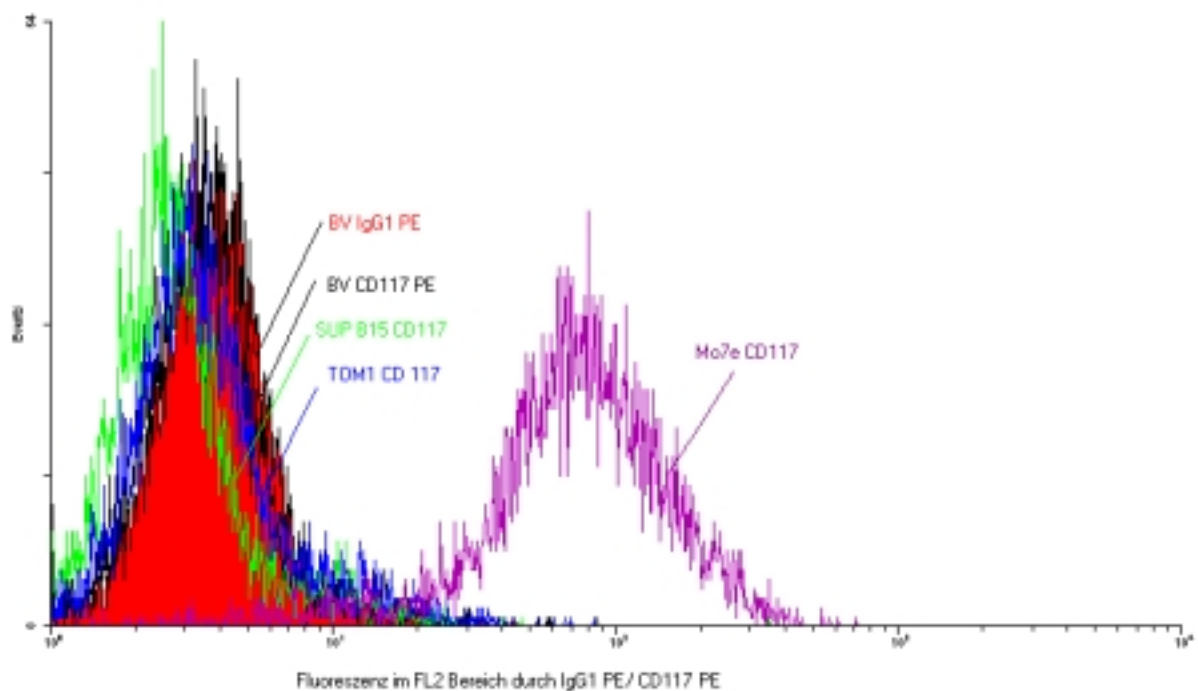


Abb. 23 zeigt Histogramme der Fluoreszenz im FL2 Bereich der mit PE-markierten Anti-CD117 inkubierten BCR-ABL positiven Zellen BV173 und SUP B15 und TOM 1, im Vergleich zur mit PE markierten IgG1 Isotypen Antikörper inkubierten BV173 (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle dient die mit Anti-CD117 inkubierten Mo7e.

4.2 Rolle der ABC-Transporter P-gp und MRP1 bei der

Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib bei Patienten mit Ph⁺ALL

Der Einsatz des BCR-ABL Tyrosinkinase Inhibitors Imatinib bei Patienten mit Ph⁺ALL führte bei einem grossen Anteil dieser Patienten zu Remissionen. Doch nach dem Verlauf von im Durchschnitt 2-3 Monaten traten bei diesen Patienten Rezidive auf. Die Ursache dieser Rückfälle bei initial gutem Ansprechen war zu Beginn dieser Arbeit vollständig unklar. Die Frage, die im folgenden beantwortet werden soll, ist ob die ABC-Transporter P-gp, MRP1 und MRP2 bei dieser Resistenzentwicklung involviert sind. Voraussetzung dafür ist das Imatinib effektiv von ihnen transportiert wird und so die intrazelluläre bzw. organische Imatinib Konzentration effektiv reduziert wird. Hierzu wurde zum einen untersucht, ob Imatinib, wie andere Substrate von P-gp/MRP1, als kompetitiver Inhibitor den Transport von bekannten Substraten, wie Calcein AM und Vinblastin inhibiert. Zum anderen wurde mittels HPLC der Imatinib Transport direkt nachgewiesen.

Desweiteren wurde untersucht, ob bei Patientenzellen, die nach einer mehrwöchigen Imatinib-Therapie eine Resistenz entwickelten, die funktionelle *in vitro* Transportaktivität, also der MAF-Wert, im Vergleich zur Ausgangsaktivität der noch sensiblen Zellen zunimmt.

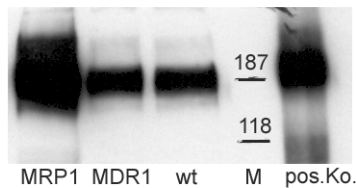
4.2.1 Etablierung eines modifizierten Calcein-Assays unter Verwendung der 2008 Zelllinie und ihrer MRP1 und MDR1 Transfektanten

Wenn man den durch P-gp oder MRP1 bedingten Transport messen will, um die Relevanz dieser Proteine für eine Resistenz zu bestimmen, kann man Calcein **A**cetoxy-**M**ethylester (Calcein AM) verwenden. Dies ist eine nicht fluoreszierende lipophile lösliche Substanz die schnell in die Plasmamembran eindringt, und dann durch endogene zelluläre Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgewandelt wird, das aufgrund seiner Hydrophilie in der Zelle gefangen ist. P-glycoprotein transportiert Calcein AM aus der Plasmamembran [174], MRP 1 kann sowohl Calcein AM als auch das intrazelluläre Calcein transportieren [175]. Beide Proteine sind damit in der Lage die durch Calcein bedingte Fluoreszenz zu vermindern. Mit Hilfe mehr oder weniger spezifischer P-gp/MRP1 Inhibitoren ist es möglich die Transportleistung der Zellen zu beurteilen.

4.2.1.1 Akkumulation des fluoreszierenden Calceins in MRP1, MRP2 und MDR1 Transfektanten im Vergleich zu ihren Ausgangszelllinien

Zur Etablierung des Assays wurde die 2008 Zelllinie und ihrer MRP1 und MDR1 überexprimierenden Transfektanten verwendet. Die Westernblots zeigen die jeweiligen Proteinexpressionen in den verwendeten Zelllinien (Abb. 24). Der MRP1-Westernblot zeigt, dass die Transfektante 2008 MRP1 das MRP1-Protein überexprimiert, dass es aber auch in geringerer Menge in den 2008 wt-Zellen und den MDR1 transfizierten Zellen vorhanden ist (Abb.24 links). Der P-gp-Westernblot veranschaulicht, dass das 170 kDa Protein P-gp nicht nur in der MDR1 transfizierten Zelllinie 2008 MDR1, sondern auch in geringerem Maß in der nicht transfizierten Zelllinie 2008 wt und der MRP1 transfizierten Zelllinie vorhanden ist.

2008 wt/MDR1/MRP1: Anti-MRPr1



2008 wt/MDR1/MRP1:Anti MDR1(C219)

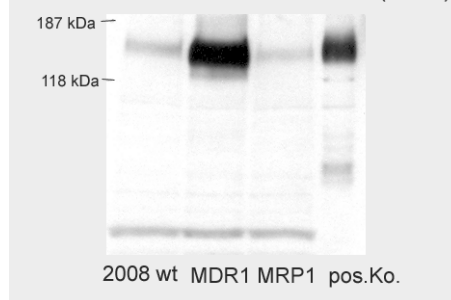


Abb. 24 : Zur Charakterisierung der 2008 Zelllinien wurden, je 5 Mill. Zellen lysiert, und Westernblots mit dem MRP1 spezifischen Antikörper Anti-MRPr1 (links), und dem P-gp spezifischen Antikörper C219 (rechts) angefertigt.

Inkubiert man die Zellen mit Calcein AM, und mißt dann die Fluoreszenz der Zellen im BD FACS, so ist sowohl die mittlere Fluoreszenz der mit MDR1 transfizierten Zellen, als auch der mit MRP1 transfizierten Zellen im Vergleich zur 2008 Zelllinie vermindert.

Ursache sind die in den beiden Zelllinien 2008 MRP1 und 2008 MDR1 überexprimierten Transportproteine, die Calcein bzw. C. AM vermehrt nach außen transportieren.

Dividiert man die Differenz der mittleren Fluoreszenz der 2008 MDR1 Zelllinie und der 2008 Zelllinie, durch die mittlere Fluoreszenz der 2008 Zellen, so erhält man RAF-Werte zwischen 40 und 25 % (je nach Zellklon und Kulturdauer). Für die 2008 MRP1 Zellen ergibt sich, bezogen auf die nicht transfizierten Zellen, eine Minderung der mittleren Fluoreszenz von 13,8 bis 7,5 %.

4.2.1.2 Verwendung von Inhibitoren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität der Transportproteine (MAF)

Beim Calcein-Assay werden Inhibitoren von P-gp bzw. MRP1 eingesetzt, um neben der durch den Transport verminderten Fluoreszenz einer möglicherweise resistenten Zelle eine Kontrolle zu besitzen, bei der es nicht zu einem Auswärtstransport von Calcein AM kommt. Die relative Differenz der Fluoreszenz bei inhibierten Transport zur Fluoreszenz bei ungehemmtem Transport, spiegelt die funktionelle Aktivität der Transportproteine. Der MAF Wert, also der *multidrug resistance activity factor* ist ein quantitativer Wert, der die funktionelle *in vitro* Transportaktivität angibt. Man errechnet ihn indem man die mittlere Fluoreszenz der Probe ohne Inhibitor, von der mittleren Fluoreszenz der Probe mit Inhibitor abzieht, und das Ergebnis durch die mittlere Fluoreszenz mit Inhibitor teilt. Normale mononukleäre Zellen haben in der Regel MAF-Werte zwischen 0 und 10 [112].

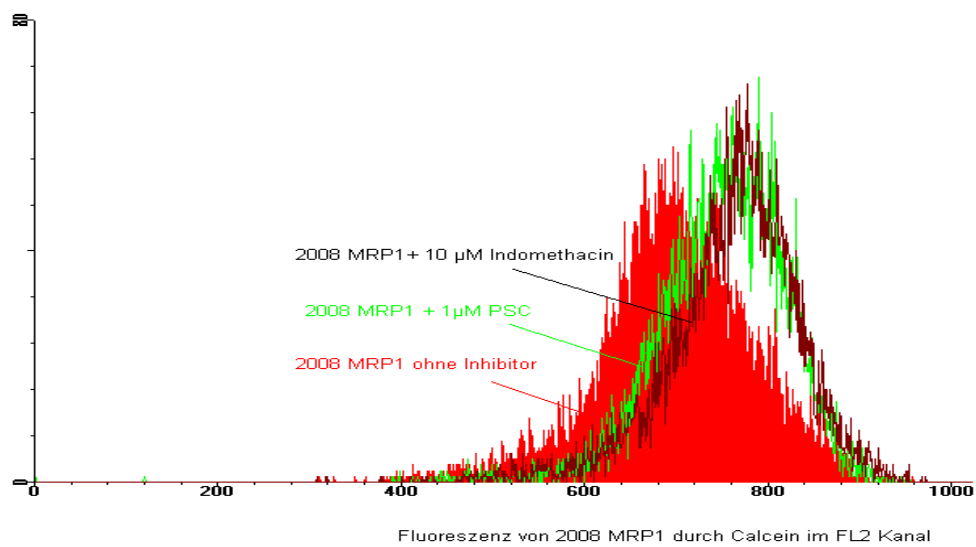
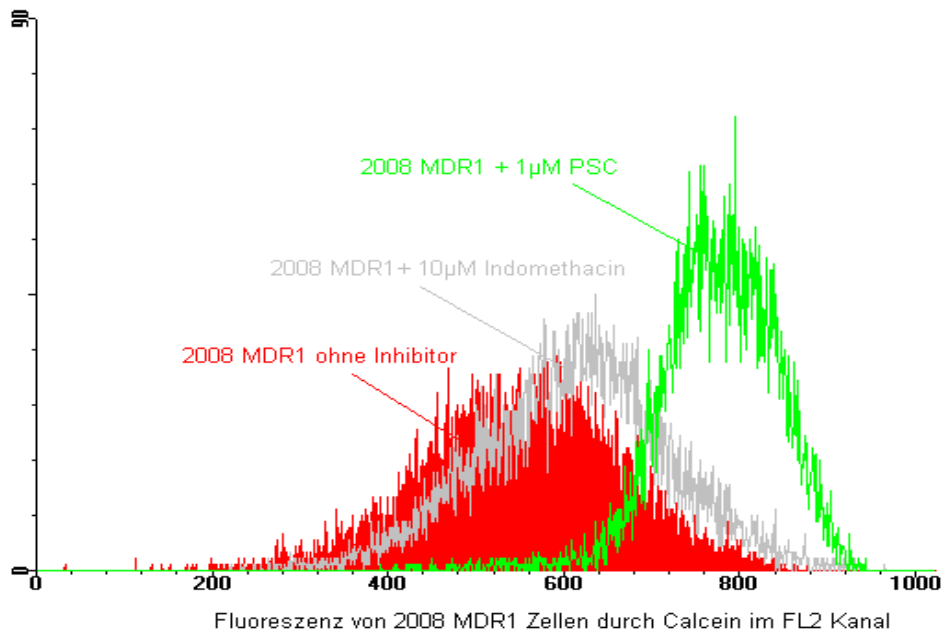


Abb.23 a,b: Die Abb.veranschaulicht den Effekt von Transportinhibitoren wie Indomethacin und PSC833 auf die Calceinfluoreszenz der 2008 MDR1 und 2008 MRP1. Die hohe P-gp Aktivität in den MDR1cDNA transfizierten 2008 Zellen (oben) führt zu einer verminderten Fluoreszenz (rot), die bei Zugabe von PSC833 (grün) einem P-gp Inhibitor deutlich zunimmt. Indomethacin (grau) hat dagegen fast keinen Effekt. Anders bei den MRP1 transfizierten Zellen (unten) bei denen sowohl Indomethacin als auch PSC833 zu einer Zunahme der Calcein bedingten Fluoreszenz führt.

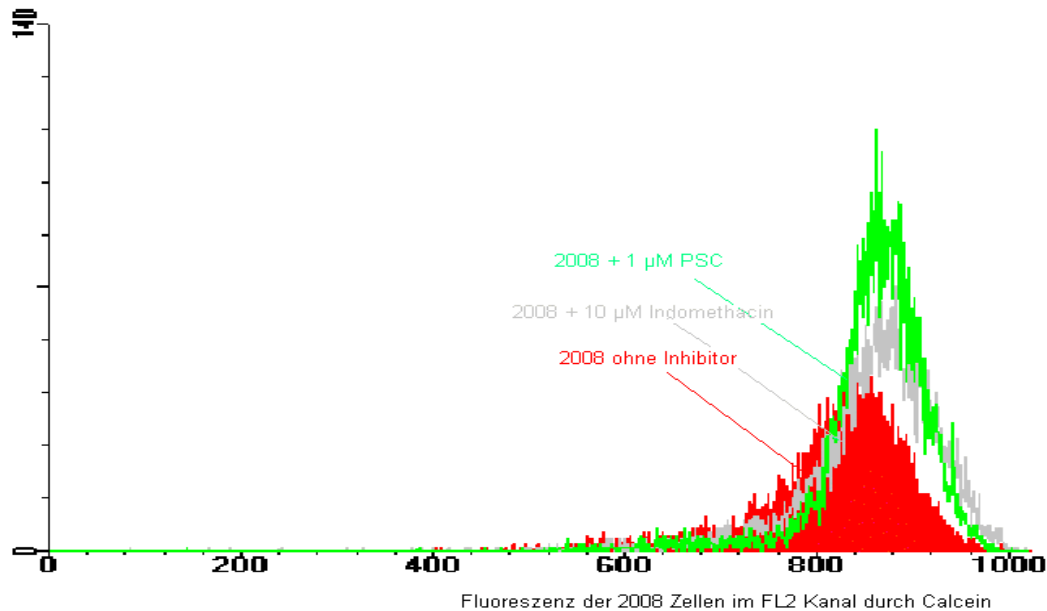


Abb.23 c veranschaulicht den Effekt von Transportinhibitoren wie Indomethacin und PSC833 auf die Calceinfluoreszenz der 2008 Wildtyp Zelllinie. Die nicht transfizierten 2008 Zellen fluoreszieren stärker als Ihre transfizierten Abkömmlinge. Die bei Zugabe von PSC833 (grün) und Indomethacin (grau) führen nur zu einer leichten Zunahme der Fluoreszenz.

Gesucht wurden Inhibitoren und deren Konzentrationen, die idealerweise selektiv entweder MRP1 oder P-gp maximal inhibieren, ohne auf andere Transportsysteme einzuwirken. Außerdem sollten die Inhibitoren bei den verwendeten Konzentrationen möglichst nicht toxisch sein, also insbesondere die Membran nicht schädigen, um eine Differenzierung lebender und toter Zellen mit Propidiumiodid zu ermöglichen. Zudem sollten sie gut in die Zellen eindringen. Es wurden unterschiedliche bekannte Substrate bzw. Inhibitoren der Transportproteine auf Effektivität, Selektivität und Toxizität getestet. Viele der untersuchten Inhibitoren erfüllten diese Kriterien nur unzureichend. Um von einer effektiven Inhibition des Transports sprechen zu können, sollten die MAF-Werte für die jeweiligen Transfektanten etwa den RAF-Werten entsprechen, die man in 4.2.1.1 erhält, wenn man die Transfektanten mit ihrer Ausgangszelllinie vergleicht.

Im folgenden sollen die Charakteristika der getesteten Inhibitoren im einzelnen beschrieben werden. Indomethacin führte bei Dosierungen bis 100 µM nicht zu einem Anstieg der Propidiumiodid positiven Fraktion. Der maximale MAF-Wert der bei den 2008 MRP1 Zellen erreicht wurde lag mit 11,7 % etwa in einem Bereich der dem RAF-Wert dieser Zellen entspricht, so dass man von einer effektiven Inhibition sprechen kann. Der maximale MAF-Wert bei den 2008 MDR1 Zellen lag bei 21,1% (bei einer Indomethacin Konzentration von 100 µM), also deutlich unter dem RAF-Wert dieser Zellen, so dass nicht von einer effektiven Inhibition von P-gp durch Indomethacin

gesprochen werden kann. Der maximale MAF-Wert der nicht transfizierten 2008 Zellen lag bei 6,2%. Die IC_{50} für Indomethacin lag bei den MRP1 transfizierten Zellen bei 0,8 μM , während sie MDR1 transfizierten Zellen über 60 μM , und bei den nicht transfizierten Zellen bei 1 μM lag. Ab einer Konzentration von 5 μM erreichten die MAF Werte der 2008 und 2008 MRP1 Zellen im Gegensatz zu den 2008 MDR1 Zellen ein Plateau. Da sich die IC_{50} -Indomethacin-Konzentrationen von P-gp und MRP 1 deutlich unterscheiden, ist es möglich Indomethacin zur Unterscheidung von MRP1 und P-gp bedingtem Transport einzusetzen. Für die Experimente mit den BCR-ABL positiven Zelllinien und den Patientenzellen wurde Indomethacin um einen differentiellen Effekt zu erhalten in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, was etwa der 12 fachen IC_{50} für die 2008 MRP1 Zellen entspricht aber weniger als einem Sechstel der IC_{50} der MDR1 transfizierten Zellen.

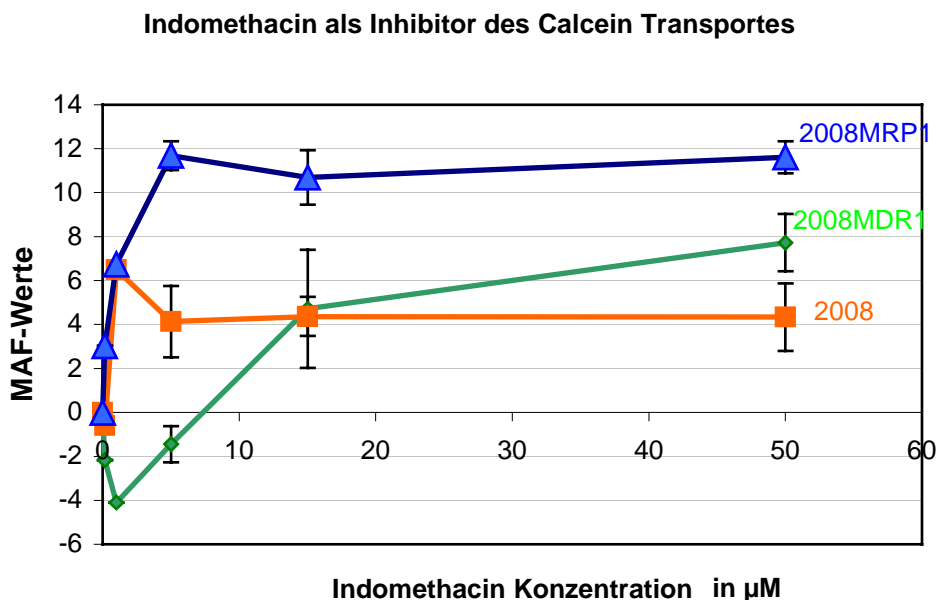


Abb.26 zeigt den Effekt verschiedener Konzentrationen von Indomethacin auf den MAF-Wert der 2008 Zellen (rot), ihrer MDR1 Transfektante (grün) und ihrer MRP1 Transfektante (blau).

PSC833, ein nicht immunsuppressives Cyclosporinanalogen [176], zeigte bereits bei Konzentrationen um 1 μM eine maximale Inhibition des P-gp bedingten Calcein Transports, hat jedoch auch auf MRP1 Einfluß. In den verwendeten Konzentration trat keine Zunahme Propidiumiodid positiven Zellfraktion durch toxische Effekte auf. Der maximale MAF Wert bei den 2008 MDR1 Zellen lag bei 41 %, also in einem dem MAF-Wert entsprechenden Bereich. Das maximale MAF der MRP1 transfizierten Zellen lag bei 12,9%. Beide Transfektanten lassen sich also mit PSC833 effektiv inhibieren. Die

2008 Zellen hatten einen max. MAF von 7,5 %. Die IC 50 für die MDR1 Transfektante lag bei 0,09 μM . Bei den 2008 MRP1 Zellen lag die IC 50 bei 0,4 μM , und die nicht transfizierten Zellen hatten eine IC 50 von 0,5 μM .

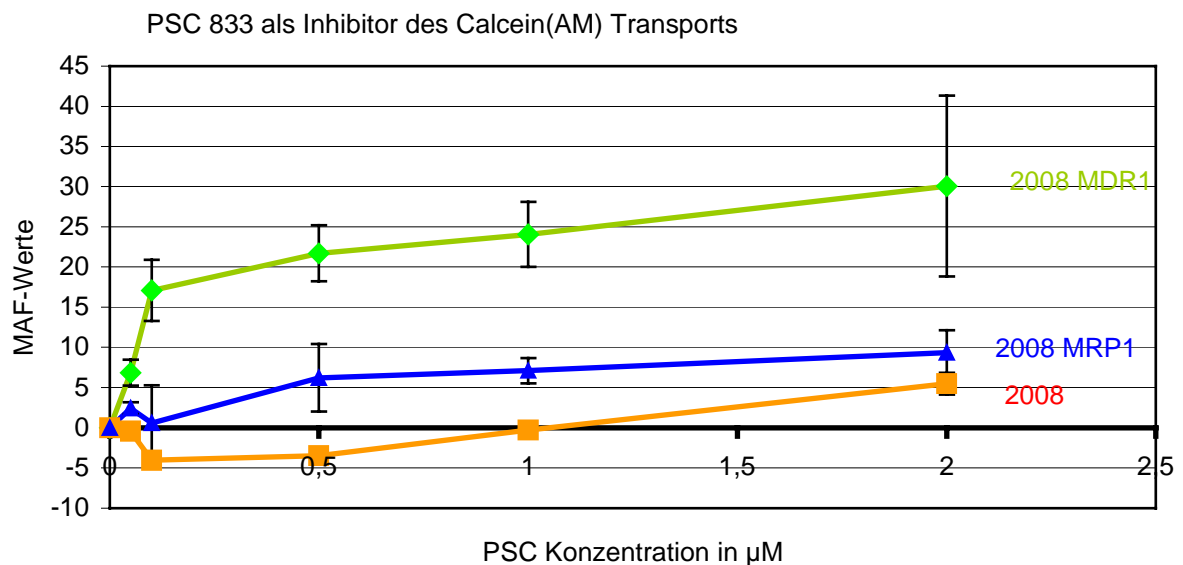


Abb.27 zeigt den Effekt verschiedener Konzentrationen von PSC 833 auf den MAF-Wert der 2008 Zellen (rot), ihrer MDR1 Transfektante (grün) und ihrer MRP1 Transfektante (blau).

PAK-104P [177] wirkt auf beide Transportsysteme sehr effektiv. Die Zahl toter Zellen nahm nicht zu. Der MAF-Wert lag bei einer PAK-104P-Konzentration von 10 μM bei 43 % bei den MDR1 transfizierten Zellen, bei 16 % bei den MRP1 transfizierten Zellen und bei 7,7 % bei den nicht transfizierten 2008 Zellen. Die IC 50 lag für 2008 MDR1 bei 0,1 μM , für 2008 MRP1 bei 0,14 μM und bei 2008 bei 0,4 μM . Da die IC 50 von MDR1/Pgp und MRP1 für PAK-104P nicht weit voneinander liegen, eine Unterscheidung der Transportproteine also kaum möglich ist, wurden für den Calcein-Assay eine Konzentration eingesetzt, die einem vielfachen der IC50 Werte entsprechen, und zwar PAK-104P in 5 μM Konzentration.

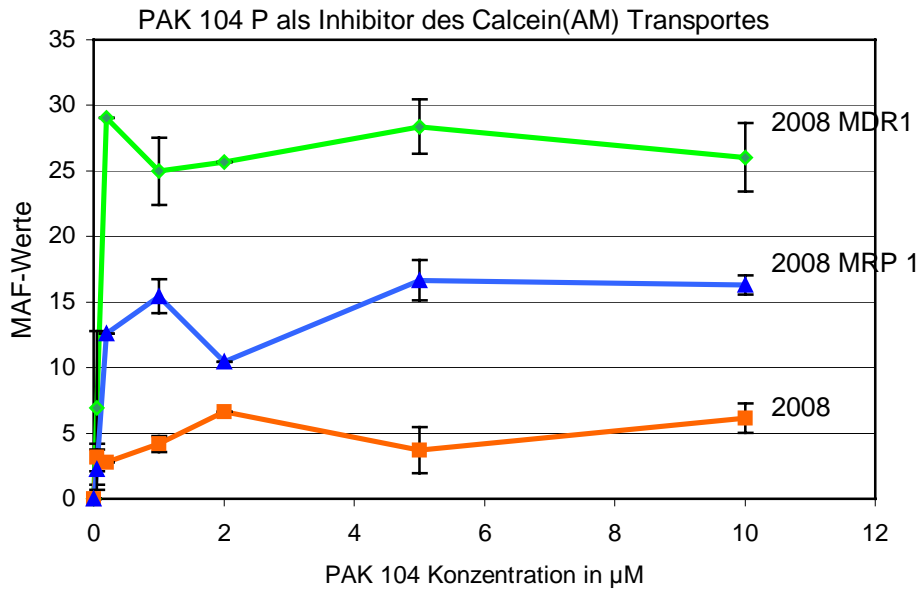


Abb.28 zeigt den Effekt verschiedener Konzentrationen von PAK- 104P auf den MAF-Wert [%] der 2008 Zellen (rot), ihrer MDR1 Transfektante (grün) und ihrer MRP1 Transfektante (blau).

MK571, ein Leukotrien C4 Analogon hatte für 2008 MRP1 einen maximalen MAF von 12,8 %, die IC 50 lag bei 5 μM . Für die 2008 MDR1 Zellen lag der MAF bei einer Konzentration von 10 μM bei 25,6%, und die IC 50 lag bei 2 μM . Der MAF der nicht transfizierten Zellen liegt bei 6,5%. Von den weiteren getesteten Inhibitoren zeigte Taxol eine toxische Wirkung, was zu einem Abfall der Fluoreszenz ab Konzentrationen von 20 μM führte, vermutlich da infolge der Membrantoxizität gefangenes Calcein aus dem Zellinneren nach Aussen gelangt. Die maximal erreichten MAF-Werte wurden bei 8 μM erreicht und lagen lediglich bei 9,5 % für MDR1, 6,5 % für MRP1 und 2,25 % für die nicht transfizierten Zellen (IC50 jeweils 2 μM). Probenezid in 2 mM Konzentration, erwies sich im 15 min Efflux des für beide transfizierte Zelllinien als eher ineffektiv ($\text{MAF}_{(\text{MDR1})}$ 4,55%, $\text{MAF}_{(\text{MRP1})}$ 2,59 %). Sulfynpyrazon hat in einer Konzentration von 2mM gute inhibitorische Effekte auf 2008 MDR (MAF 32%) und 2008 MRP (14,8%; 2008 MAF 4,5%). Benzbromaron ist in einer Konzentration von 25 μM als Inhibitor effektiv, ($\text{MAF}_{(\text{MDR})}$ 32%, $\text{MAF}_{(\text{MRP1})}$ 14,8%, $\text{MAF}_{(2008)}$ 4,48 %) zeigt jedoch eine gewisse Zunahme der Propidiumiodid positiven Fraktion.

Die Interpretation dieser Ergebnisse wird durch das Vorhandensein von P-gp und MRP1 in den nicht transfizierten Zellen und der daraus resultierenden Überlagerung erschwert. Die Tabelle 2 fasst die Ergebnisse für die später verwendeten Inhibitoren aus unabhängigen Experimenten zusammen.

	2008 MDR1		2008 MRP1		2008 parentals	
	MAF-maximal	IC-50	MAF-maximal	IC-50	MAF-maximal	IC-50
Indomethacin	21,1%	60 µM	11,7%	0,8 µM	6,2%	1 µM
PSC-833	41,0%	0,09 µM	12,9%	0,4 µM	7,5%	0,5 µM
PAK-104 P	43,0%	0,1 µM	16,0%	0,14 µM	7,7%	0,4 µM
MK-517	25,6%	2 µM	12,8%	5 µM	6,5%	

Tabelle 2: Zusammenfassung der MAF-Werte der verwendeten Inhibitoren

Neben der 2008 Zelllinie und ihren Transfektanten wurden auch die MDCK II Zelllinien untersucht. Für MDCK II MDR1 liegt die Abnahme der Fluoreszenz bezogen auf die Ausgangszelllinie MDCKII, also der RAF-Wert, zwischen 33 und 24 %, für MDCKII MRP1 bei etwa 14% und für MDCKII MRP2 liegt der RAF-Wert zwischen 27 und 20,2 %. Die Abbildung 29, 30 und 31 zeigt den Effekt der gewählten Inhibitor-Konzentrationen auf die MDCKII Zelllinien. Da die endogene P-gp Expression in dieser Hunde-Nierenkarzinom Zelllinie hoch ist, wurde versucht endogenes P-gp mit 0,1 µM PSC zu inhibieren. Indomethacin wirkt auf die MDCKII MRP1 Zellen mit hoher Effektivität, wohingegen der Transport der MDR1 und MRP2 Transfektanten kaum inhibiert werden (Abb.29).

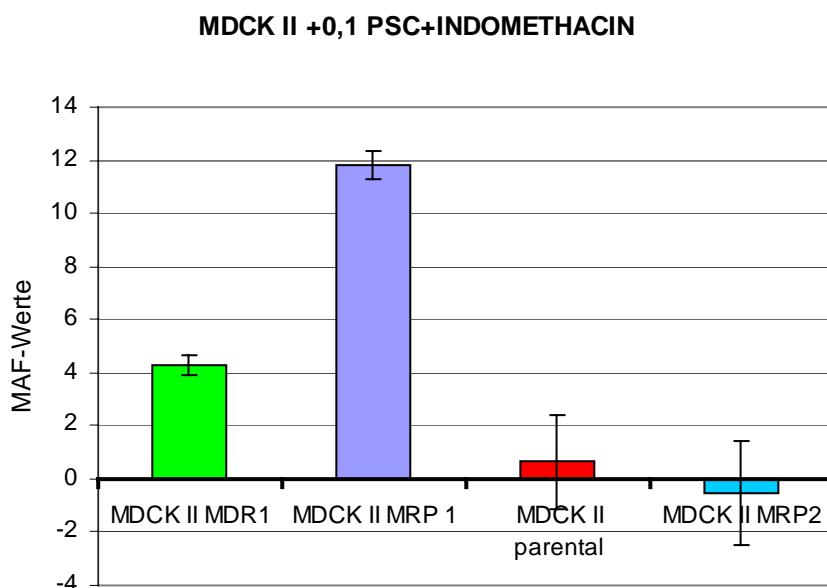


Abb.29 stellt die MAF-Werte der MDCKII Zelllinie und ihrer MDR1, MRP1 und MRP2 Transfektante unter Verwendung von 10µM Indomethacin als Transport Inhibitor dar. Um die intrinsische P-gp Aktivität zu inhibieren wurde jeweils P-gp in geringer Konzentration (0,1µM) zugegeben.

PSC 833 wirkt in 1 µM Konzentration auf alle 4 Zelllinien inhibitorisch, wobei es nur bei der MDR1 Transfektante ein im Vergleich zum RAF-Wert fast maximalen MAF-Wert

erreicht, während der Effekt auf die MRP1 und MRP2 Transfektanten nur mittelmässig ist (Abb.30).

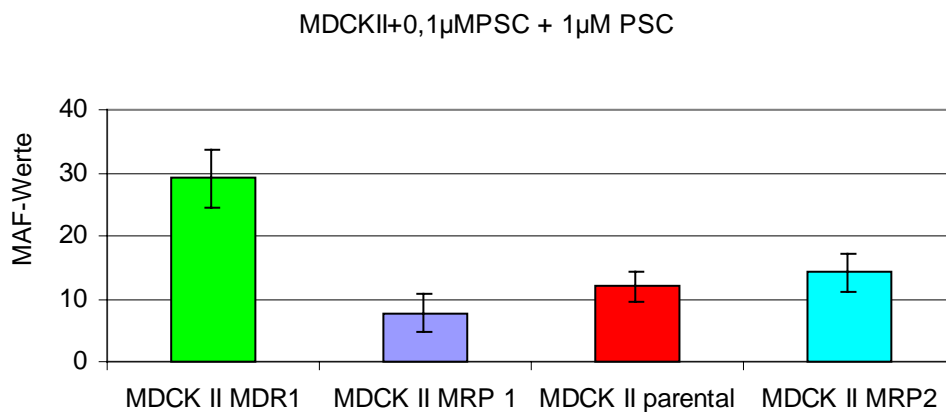


Abb.30 stellt den Effekt von 1 µM PSC 833 auf die MAF-Werte der MDCK Zellen und ihrer Transfektanten dar.

Eine Konzentration von 5 µM PAK-104P erreicht sowohl bei der MRP1 als auch bei der MDR1 Transfektante hohe Werte (Abb. 31).

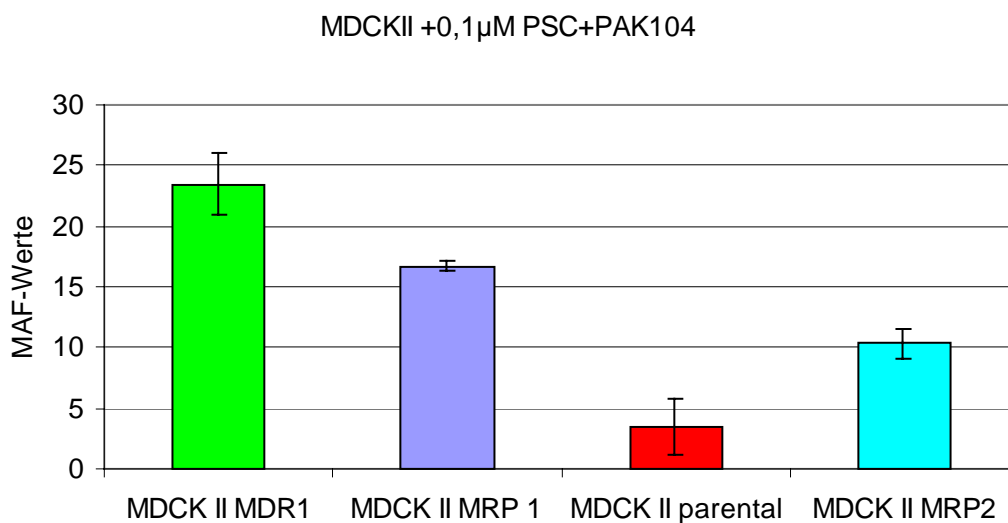


Abb. 31: Effekt von 5 µM PAK-104P auf MDCKII Zellen und ihre Transfektanten.

4.2.2 Imatinib als Inhibitor des Calceintransport durch P-gp

Substrate von MRP1 und P-glykoprotein hemmen häufig den Transport anderer Substrate durch kompetitive Inhibition. Um zu prüfen, ob Imatinib ein Substrat von MRP1 und P-gp ist, wurde untersucht, ob es auf den Calcein AM Transport inhibitorisch wirkt. Hierzu wurde Imatinib in unterschiedlichen Konzentrationen im Calcein Assay mit 2008 Zellen und ihren P-gp und MRP1 transfizierten Tochterzelllinien zugegeben (Abb.

32 links). Bei Imatinibkonzentrationen von 40 μM erreichte Imatinib bei den MDR1 transfizierten 2008 Zellen einen maximalen MAF von 28 %. Die IC 50 liegt bei den MDR1 transfizierten Zellen bei 1 μM Imatinib. Bei den MRP1 transfizierten Zellen wird der maximale MAF bei einer Imatinib Konzentration von 20 μM erreicht und liegt bei 11,7 %. Die IC50 liegt dabei zwischen 4 und 20 μM . Auch bei den nicht transfizierten Zellen wird der maximale MAF bei einer Imatinib Konzentration von 20 μM erreicht und liegt bei 8 %. Die IC50 liegt bei 4 μM . Verwendet man die MDCKII Zelllinie und ihre transfizierten Tochterzelllinien, und inhibiert man endogenes P-gp mit einer geringen Konzentration von 0,1 μM PSC833, so inhibiert Imatinib in einer Konzentration von 5 μM lediglich den P-gp bedingten Calcein AM-Transport der MDCKII MDR1 Zelllinie (Abb. 32 rechts), während der Calcein-Transport durch MRP1 und MRP2 nicht beeinflusst werden.

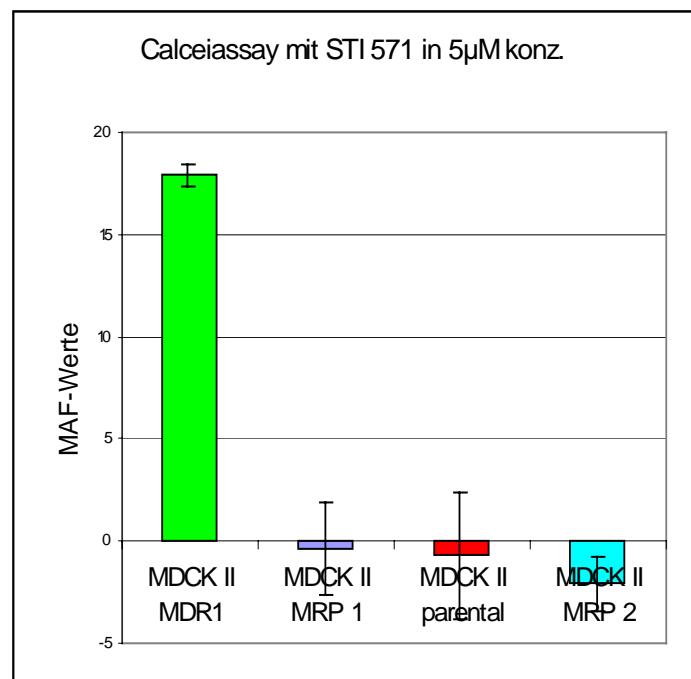
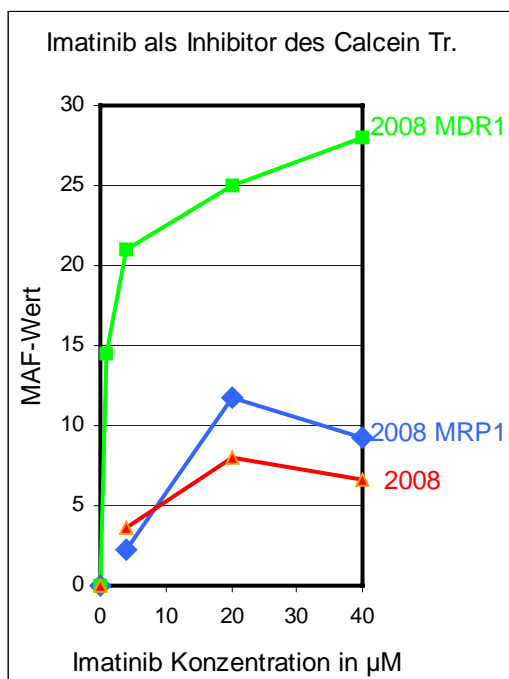


Abb.30: Das linke Diagramm zeigt die Wirkung unterschiedlicher Imatinib Konzentrationen auf den Calcein Transport der 2008 Zellen (rot), ihrer MDR1 (grün) und ihrer MRP1 (blau) Transfektante. Das rechte Diagramm zeigt einen Calcein-Assay bei dem Imatinib in 5 μM Konzentration zur MDCKII Zelllinie und ihren MDR1, MRP1 und MRP2 Transfektanten zugegeben wurde. Das Experiment wurde unter Anwesenheit einer kleinen Menge PSC (0,1 μM) durchgeführt.

4.2.3 Imatinib als Inhibitor des Vinblastin Transport durch P-gp

Ein weitere Möglichkeit die inhibitorische Wirkung von Imatinib auf die Transportfunktion von P-gp und MRP2 zu untersuchen bietet die Messung des Vinblastin-Transports von MDCKII Zellen [163]. Diese Zellen bilden auf Transwells Monolayer, in denen P-gp und MRP2 fast ausschliesslich in der apikalen Membran vorkommen. Mit radioaktivem Tritium markiertes Vinblastin wird von diesen Zellen vom Intrazellulärraum in das apikale Kompartiment transportiert. Gibt man [³H] Vinblastin ins apikale Kompartiment, so wirken P-gp und MRP2 der Konzentrationszunahme im basalen Kompartiment entgegen (Abb.33: linke obere Abb. blauer Graph). Bei Zugabe ins basale Kompartiment verstärken sie die Zunahme apikal (Abb.33: linke obere Abb. rosa Graph). Die Differenz zwischen den Aktivitäten spiegelt die Transportaktivitäten. Gibt man einen Transportinhibitor hinzu so reduziert sich diese Differenz.

Um den inhibitorischen Effekt von Imatinib auf den vektoriellen Transport von [³H] Vinblastin zu messen, wurde es in einer Konzentration von 5 bzw. 25 µM dem Medium zugegeben. Die Abbildung 33 zeigt die leichte Reduktion des Vinblastin-Transports bei den MDR1 transfizierten MDCKII Zellen. Der Vinblastin-Transport ist sowohl bei 5 µM als auch bei 25 µM Imatinib um 26 % vermindert (jeweils errechnet als Mittelwert der mittleren Aktivitäten des Transports von basal nach apikal zu den Zeitpunkten 1-4). Um unspezifische Effekte auszuschliessen wurden auch die nicht transfizierten MDCKII Zellen untersucht. Bei ihnen und auch bei den MRP2 transfizierten Zellen waren die Transportaktivitäten unverändert.

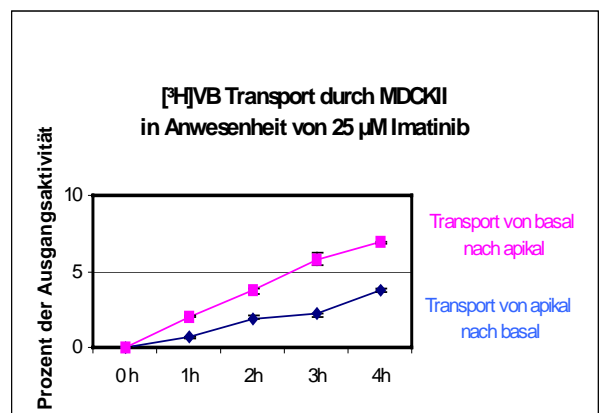
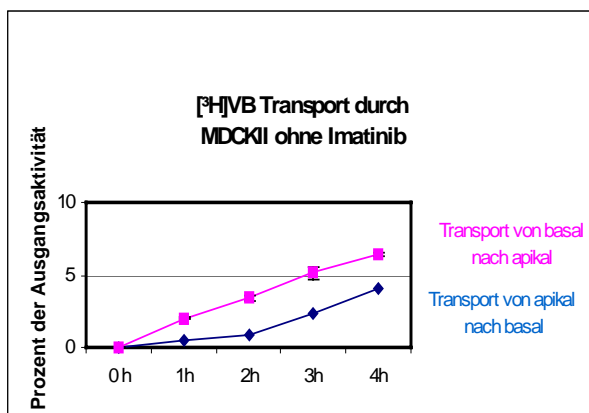
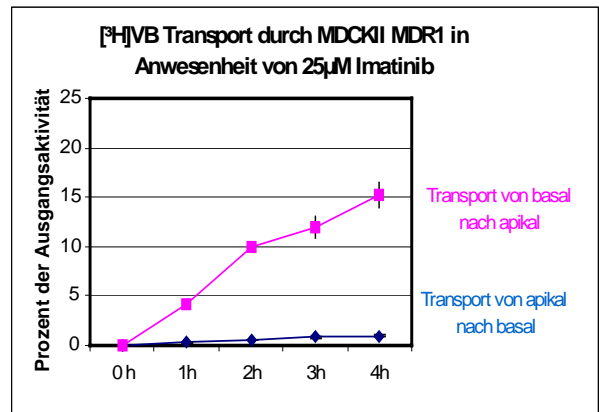
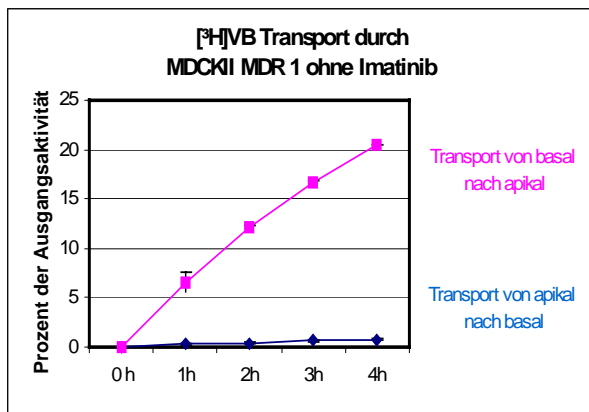
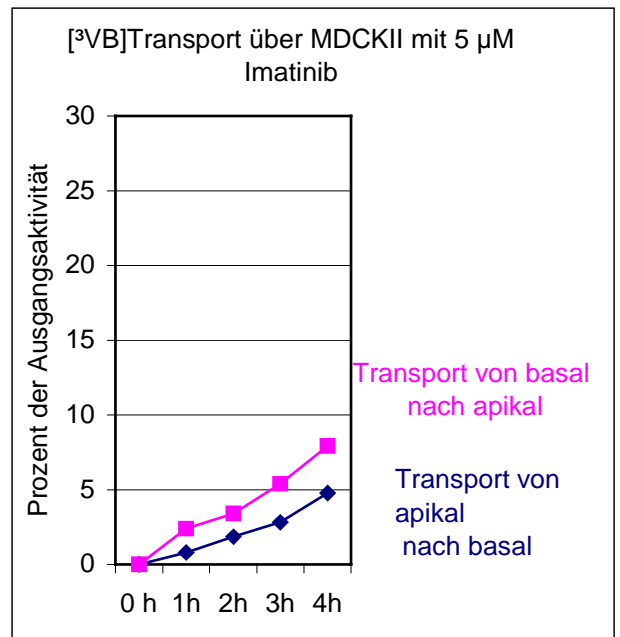
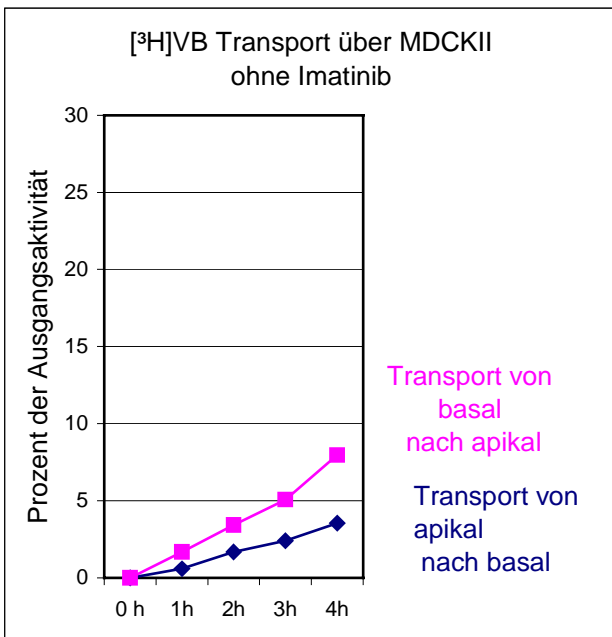
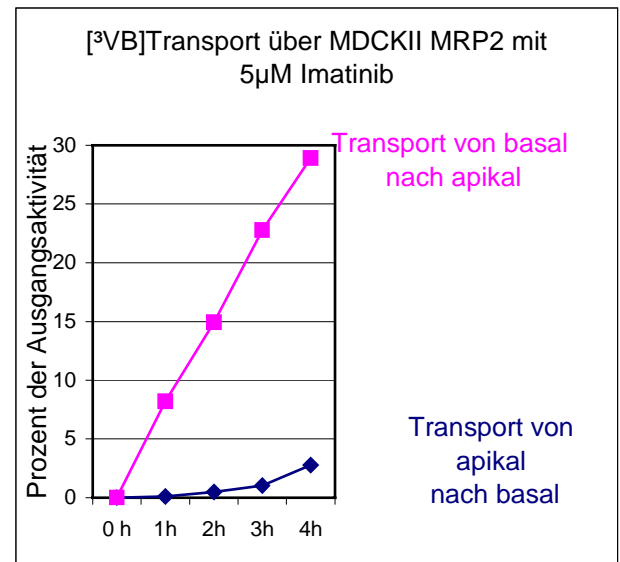
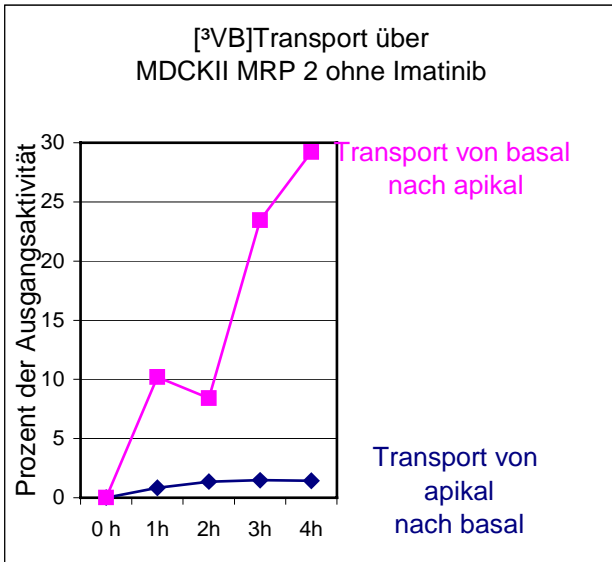
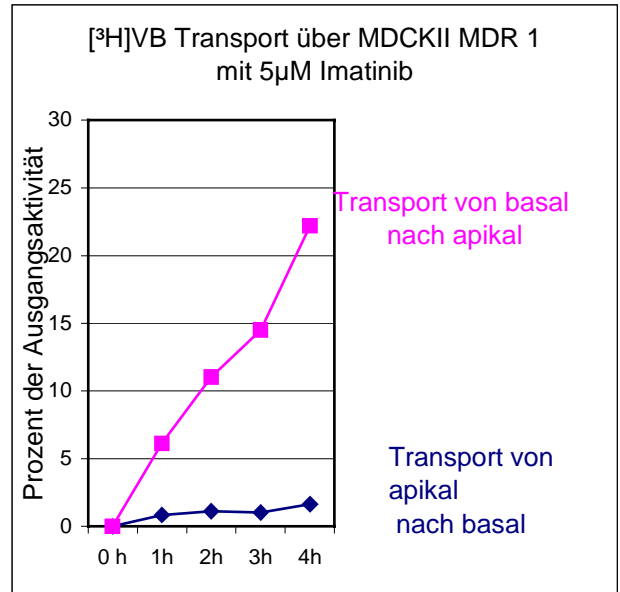
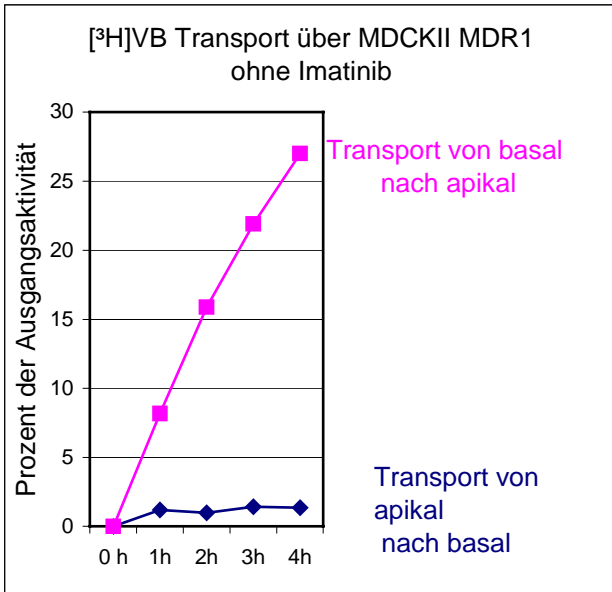


Abb. 33 veranschaulicht den Transport des mit Tritium markierten Vinblastin, dargestellt hier in Prozent der Ausgangsaktivität. Rosa Graph: Aktivitätszunahme im apikalen Kompartiment bei basaler Zugabe von Vinblastin. Blauer Graph: Aktivitätszunahme im basalen Kompartiment, wenn Vinblastin apikal zugegeben wird. Links ohne, Rechts in Anwesenheit von Imatinib. Es sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dargestellt (siehe nächste Seite). Im Experiment oben wurden 25 μM Imatinib eingesetzt und MDCKII MDR1 und MDCKII Zellen untersucht. Im unteren Experiment wurde 5 μM Imatinib eingesetzt und MDCKII MDR1, MDCKII MRP2 und MDCKII untersucht.



4.2.4 Imatinib Transport durch P-gp im Transwell

Um direkt nachzuweisen, dass Imatinib ein Substrat von P-gp oder MRP1 ist, wurde der direkte Transport der Substanz mittels HPLC untersucht.

Wiederum wurden MDR-1, MRP2 oder MRP1 cDNA exprimierende MDCK II Zelllinien auf Transwells ausgesät. Imatinib enthaltendes Medium wurde entweder apikal oder basal zugegeben. Nach 2 und 4 h wurden Proben aus dem kontralateralen Kompartiment gewonnen und die Imatinib-Konzentration mittels HPLC bestimmt. Die Zellen trennen apikales und basales Kompartiment. Durch nicht vektorielle Transportmechanismen, wie Diffusion, würde die Imatinib-Konzentration gleichermassen zunehmen unabhängig davon, ob die Substanz apikal oder basal zugegeben wurde.

Wie erwähnt ist das MDR1 Gen codierte Transport Protein P-gp in der MDR1 transfizierten Zelllinie MDCKII MDR, in der apikalen Membran lokalisiert. Aufgrund seiner Lokalisation ist der aktive Transport durch P-gp von basal nach apikal gerichtet. Wenn Imatinib basal zugegeben wird, so würde, ein aktiver Transport vorausgesetzt, die Zunahme der Imatinib Konzentration im Imatinib freien apikalen Kompartiment durch den aktiven P-gp -Transport verstärkt. Und sie würde abgeschwächt, wenn Imatinib apikal zugegeben wird.

Wenn also Imatinib aktiv transportiert würde, entstünde eine Differenz zwischen den Konzentrationen apikal und basal, die den vektoriiellen Transport widerspiegeln würde. Ist es kein Substrat, so würde sich keine Differenz ergeben. Die Ergebnisse die man erhält, wenn man Imatinib zu den MDCKII MRP2 Zellen gibt, in denen MRP2 apikal lokalisiert ist, sind genauso zu interpretieren.

In der Transfektante MDCKII MRP1 ist MRP1 basolateral lokalisiert und würde einen Imatinib Transport von apikal nach basal verursachen. Es käme also zu einer Verstärkung der Konzentrationszunahme im kontralateralen Kompartiment wenn Imatinib apikal zugegeben wird, und zu einer Abschwächung wenn es basal zugegeben wird. Um Effekte durch das endogene P-gp zu unterdrücken, wurde das Experiment in Anwesenheit einer geringen Menge PSC833 (0,1µM) durchgeführt.

Im Gegensatz zur geringen Konzentrationsdifferenz von 1,5 % bei den nicht transfizierten MDCKII Zellen, bewirkt die vermehrte P-gp-Expression bei MDCKII MDR1 einen deutlichen Konzentrationsunterschied von 35 % (Abb. 34, rechts oben). Dies beweist, dass P-gp Imatinib aktiv transportieren kann. Die MRP1 transfizierte Zelllinie MDCKII MRP1 zeigte eine geringe Differenz von -3,8 %, was gegen einen effektiven Transport durch MRP1 spricht. Die Zunahme der Differenz bei den MRP2 überexprimierenden Zellen ist nicht signifikant.

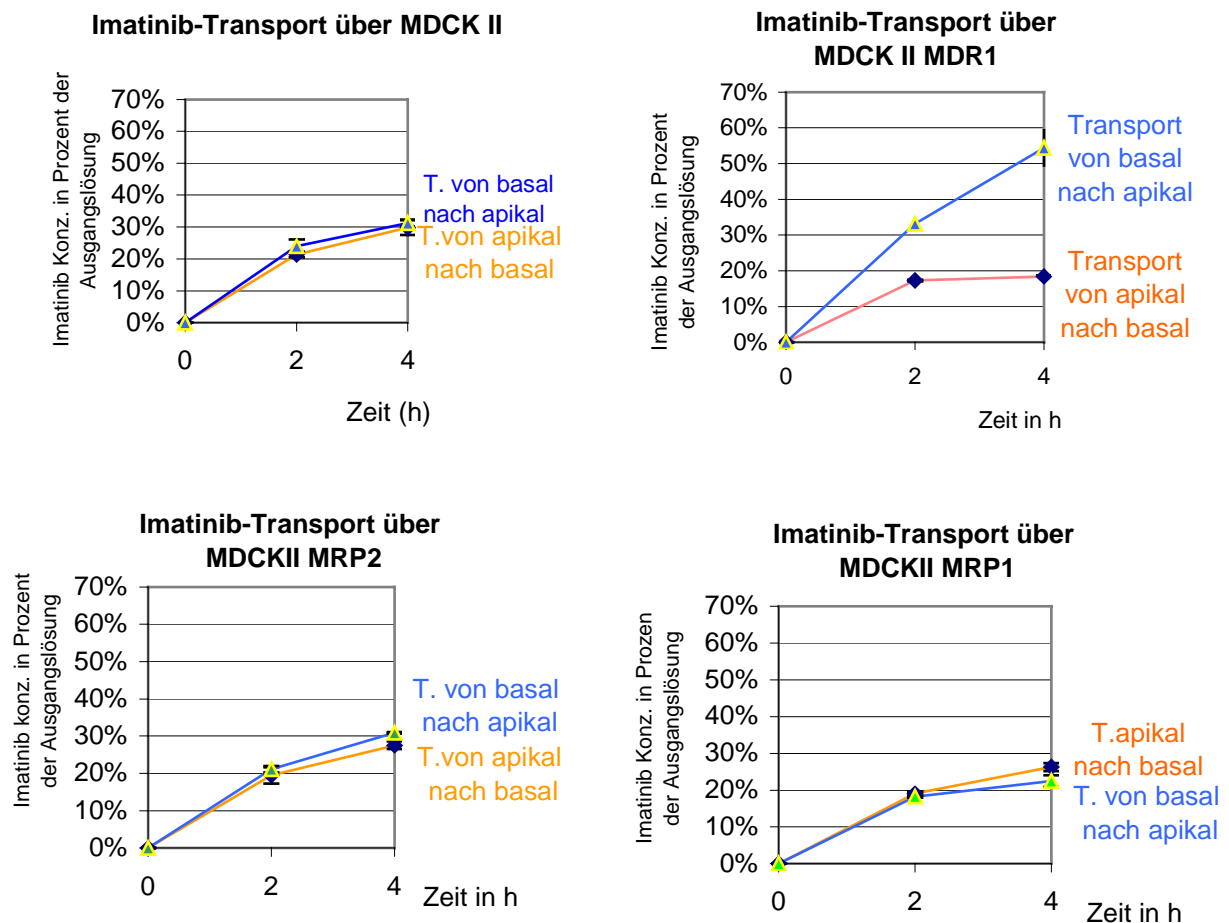


Abb. 32 stellt die Imatinib Konzentrationen im Verhältnis zur Ausgangskonzentration von $5\mu\text{M}$ dar. Bei Zugabe von Imatinib ins basale Kompartiment zum Zeitpunkt 0 wurde apikal nach 2 und 4 h eine Probe entnommen (blau). Bei Zugabe von Imatinib ins apikale Kompartiment wurde aus dem basalen Kompartiment die Probe entnommen (orange) und die Imatinib Konzentration mittels HPLC gemessen. Um endogenes P-gp zu hemmen wurden die Experimente in Anwesenheit einer kleinen Menge von $0,1\ \mu\text{M}$ PSC durchgeführt. Hier sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt. Ein Wiederholungsexperiment zeigte entsprechendes.

4.2.5 Vergleich der *multidrug resistance* Aktivität vor und nach Entwicklung einer Imatinibresistenz bei Patienten mit Ph⁺ALL

Die im Vorfeld kryokonservierten mononukleären Zellen von 10 erwachsenen Patienten mit Ph⁺ALL, die an der „Phase II Studie zur Untersuchung von Sicherheit und antileukämischer Wirkung von STI 571 bei Patienten mit Ph⁺ALL“ teilnahmen und eines ebenfalls mit Imatinib behandelten CML Patienten in lymphoider Blastenkrise wurden mit dem Calcein-Assay untersucht. Von diesen Patienten zeigten vier eine komplette hämatologische Remission, zwei eine partielle Remission und fünf waren refraktär gegenüber der Imatinib Therapie. Nach einigen Wochen entwickelten auch die Patienten die primär gut auf Imatinib ansprachen ein Rezidiv. Um einen intraindividuellen Vergleich zwischen sensiblen Blasten und resistenten Blasten zu ermöglichen, wurden von 8 Patienten jeweils prä- und posttherapeutische Proben untersucht. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die während der Therapie mit Imatinib entstehende Resistenz durch MRP1 oder P-gp bedingt ist. Zudem sollte die multidrug resistance Aktivität von Patienten die primär Imatinib sensibel waren mit solchen verglichen werden die primär refraktär waren. Tabelle 3 zeigt Charakteristika der untersuchten Patienten.

Pat. Nr.	Geschlecht/ Alter	Erkrankung	Bruchpunkt	Imatinib Therapie		Therapie- ergebnis
				Dauer (d)	bestes Ansprechen	
#1	w/35	c-ALL	b2a2	88	CR	Rezidiv /Tod
#2	w/54	c-ALL	e1a2	70	CR	Rezidiv /Tod
#3	w/33	c-ALL	e1a2	45	CR	Rezidiv /Tod
#4	w/51	CML,lyBC	unbekannt	138	CR	Rezidiv /Tod
#5	w/64	pre-B-ALL	unbekannt	54	PR	Rezidiv /Tod
#6	m/29	biphen. ALL	b3a2	44	PR	Rezidiv /Tod
#7	w/56	c-ALL	e1a2	21	Refraktär	Refraktär/Tod
#8	w/53	c-ALL	e1a2	40	Refraktär	Refraktär/Tod
#9	m/26	c-ALL	e1a2	44	Refraktär	Refraktär/Tod
#10	w/44	pre-B-ALL	e1a2	26	Refraktär	Refraktär/Tod
#11	m/57	c-ALL	e1a2	22	Refraktär	Refraktär/Tod

Tab. 3: Patientenmerkmale. CR: komplette Remission (Blastenanteil im KM < 5 %, keine Blasten peripher), PR: partielle Remission (Blastenanteil peripher und im KM < 15 %)

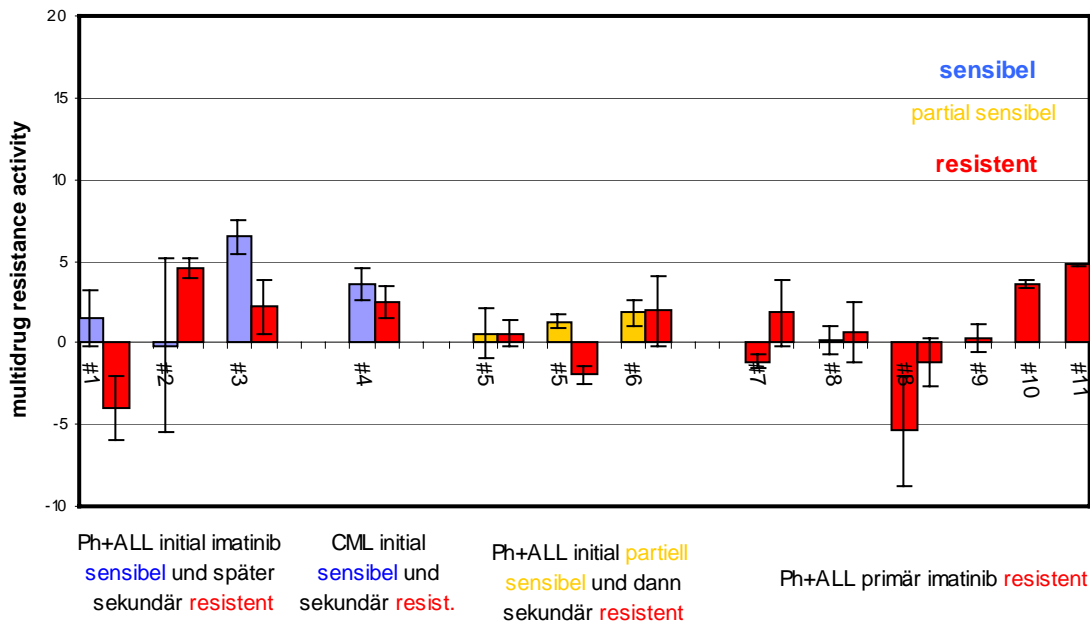
Die Verwendung mehr oder weniger spezifischer Inhibitoren für P-gp und MRP1 sollte eine Unterscheidung zwischen P-gp Transport und MRP1 -Transport möglich machen. Zur Inhibition der MRP1 Funktion wurde Indomethacin in 10 µM Konzentration verwendet. PSC 833 wurde in 1 µM Konzentration verwendet und hatte sich im Vorfeld

als ein guter Inhibitor von P-gp gezeigt, wobei es kaum spezifisch war. PAK-104P wurde zusätzlich als Inhibitor beider Transportproteine eingesetzt (4.2.1).

Insgesamt war der *multidrug resistance activity factor* niedrig, und lag im Durchschnitt bei 0,8 % für Indomethacin und bei 2,6 % für PSC für die prätherapeutischen ALL-Proben. Die Standardabweichung war hoch, so dass ein Vergleich zwischen den Proben, keine sicheren Aussagen ermöglicht. Zwei Patienten (siehe Abb. 36: Pat.: #2, #8), zeigten einen leichten Anstieg des MAF_{PSC} . Patient #2 hat einen MAF_{PSC} -Anstieg von 7,23 % (+/-1,2) auf 9,89 % (+/-2). Patient #8 hat einen Anstieg des MAF_{PSC} von 2,3 % (+/- 3,3) auf 4,35 % (+/- 0,31). Es wurde daraufhin ein weiteres Mal Proben dieses Patienten aufgetaut, bei Kontrolle ergab sich ein Anstieg von -2,11 % (+/-5,3) auf 7,76 % (+/-3,05). Allerdings zeigten die meisten Patienten keine Zunahme des MAF_{PSC} .

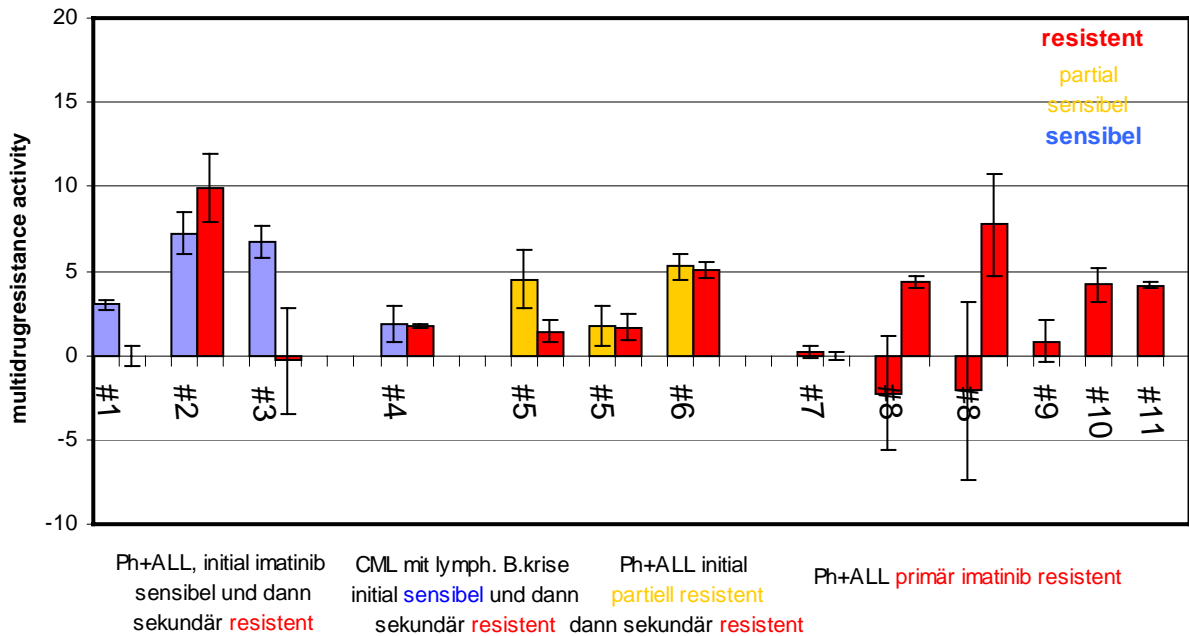
Betrachtet man den Effekt des sowohl MRP1 als auch P-gp inhibierenden Inhibitors PAK-104P so kommt es wiederum bei den Patient #2 und #8 zu einem MAF Anstieg (Abb.37). Bei Patient #2 kommt es zu einem MAF Anstieg von 3,83 % (+/-2,1) auf 7,18 % (+/- 2,38). Patient #8 zeigt im Wiederholungsexperiment einen Anstieg von 2,78 % (+/-0,48) auf 4,23 % (+/-0,41). Vergleicht man die durchschnittlichen MAF-Werte der Patienten die komplett oder partiell Ansprechen vor Therapie mit denen nach Resistenzentwicklung kommt es nicht zu einem Anstieg der MAF-Werte. Im einzelnen lagen die prätherapeutischen MAF-Werte bei 2,2 % für Indomethacin, 3,3 % für PAK-104P und bei 4,3 % für PSC833. Die posttherapeutischen MAF-Werte lagen bei 0,8 % für Indomethacin, 1,3 % für PAK-104P und bei 2,8 % für PSC833. Aufgrund des fehlenden Anstiegs in der Mehrzahl der untersuchten Patientenproben und der niedrigen Grundaktivität, scheinen die ABC-Transporter P-gp und MRP1 nicht die Hauptursache für die Rückfälle der 8 Patienten zu sein. Die 5 untersuchten Patienten mit primärer Resistenz gegen Imatinib haben durchschnittlich keine signifikant höhere Transportfunktion im Vergleich zu den nicht resistenten Patienten, so dass auch bei diesen Patienten andere Faktoren und Mechanismen als Hauptursache des Nichtansprechens postuliert werden müssen. Die durchschnittlichen MAF-Werte der primär resistenten Patienten liegen bei 2,23 % für Indomethacin, 1,56 % für PAK-104P und 3,54 % für PSC833.

Calcein(am) transport inhibiert durch Indometacin: MRP1 Aktivität



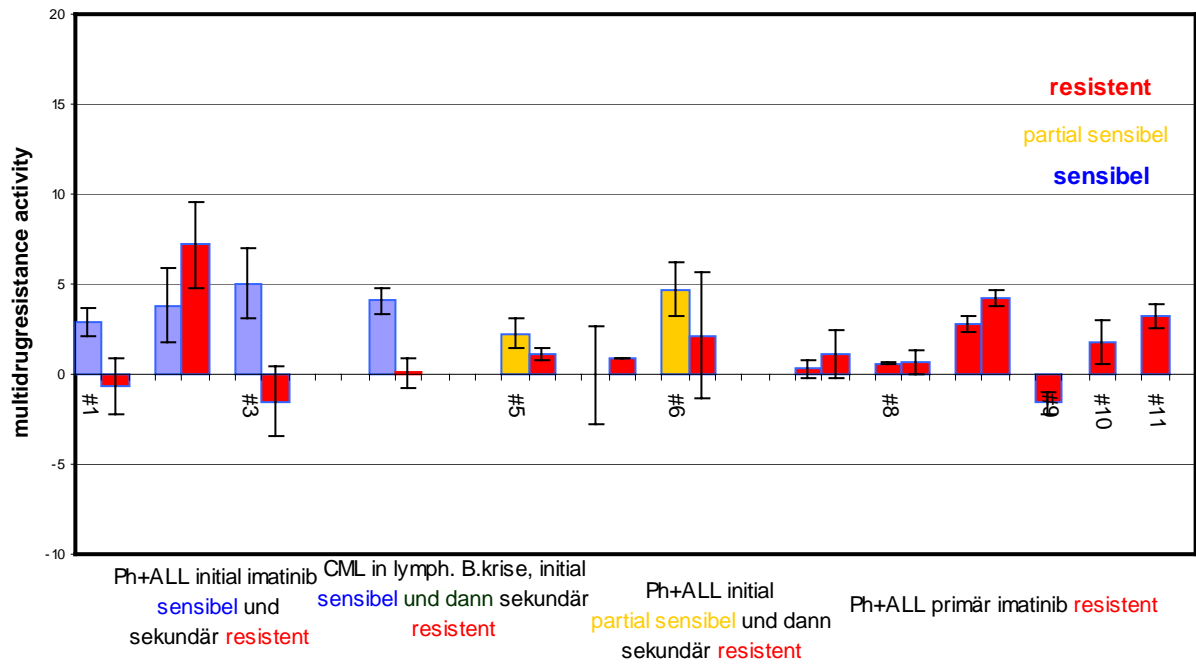
Die Abb.35 fasst die MAF-Werte [%] mit Indomethacin (10 µM) als Inhibitor von MRP1 zusammen. Links sind jeweils prä- und rechts posttherapeutische MAF-Werte der jeweiligen Patienten dargestellt. Patient #1-4 sprachen initial an, Patienten #5-6 sprachen nur partiell an und Patient #7-11 sprachen nicht auf die Imatinib Therapie an.

Calcein(am)transport inhibiert durch PSC833: P-gp Aktivität



Die Abb.36 fasst die MAF-Werte mit PSC833 (1µM) als Inhibitor zusammen. In dieser Konzentration inhibiert PSC833 P-gp sehr effektiv, aber in einem gewissen Mass auch die MRP1-Aktivität

Calcein(am)transport inhibiert durch Pak-104P: MRP1 & Pgp Aktivität



Die Abb. 37 fasst die MAF-Werte mit PAK-104P (5µM) als Inhibitor des Calcein Transports zusammen. PAK104P hemmt sowohl P-gp als auch MRP1 bedingten Transport sehr effektiv.

5 Diskussion

5.1 Stellenwert von P-gp und MRP1 bei der Resistenz Entwicklung von Patienten mit Philadelphia positiver Leukämie gegenüber Imatinib

Imatinib ist ein BCR-ABL spezifischer Tyrosinkinase Inhibitor der bei Philadelphia Chromosom positiver Leukämie durch Unterbrechung des pathogenetisch ursächlichen Signalweges wirksam ist. Bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver ALL kommt es nach durchschnittlich 2,2 Monaten Imatinib Therapie trotz initialem Ansprechen (CHR 19 %, CMR 10 %, PR 31 %) und fortgesetzter Therapie zu einem Rezidiv. Etwa 30 % der Patienten sprechen primär nicht auf Imatinib an. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die ABC-Transporter P-gp und MRP1 an der primären oder sekundären Imatinibresistenz beteiligt sind. Die zugrundeliegende Annahme für die Entwicklung einer sekundären Imatinibresistenz ist, dass die Substrat Pumpen MRP-1 und P-gp nach mehrwöchiger Imatinib Therapie überexprimiert werden, und durch aktiven Imatinib Auswärtstransport die intrazelluläre Imatinib-Konzentration so stark vermindern, dass die Tyrosinkinase reaktiviert wird. Bei den primär refraktären Patienten läge dem entsprechend bereits prätherapeutisch eine Überexpression von MRP1 oder P-gp vor.

Die Vermutung, dass P-gp bei der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib eine Rolle spielen könnte, wurde durch Beobachtungen bestärkt, die Mahon *et al.* mit der BCR-ABL positiven Zelllinie LAMA 84r machten. Diese Zelllinie zeigte nach Imatinib-Langzeitexposition eine verminderte Sensitivität gegenüber Imatinib. Mittels Durchflußzytometrie wurde eine Überexpression des MDR1-Gen codierten P-gp festgestellt. Durch Verapamil, einem unspezifischen P-gp Inhibitor, liess sich die Imatinib-Resistenz der Zelllinie zum Teil wieder aufheben [82].

5.1.1 Imatinib als Substrat und Inhibitor des P-gp-Transports

Voraussetzung für eine Beteiligung von ABC-Transportern an der Imatinibresistenz ist das Imatinib ein Substrat dieser Transport Proteine ist. Unter Verwendung der MDR1 transfizierten Zelllinien 2008 und MDCKII habe ich zeigen können, dass das P-gp Substrat Calcein AM bei Anwesenheit von Imatinib weniger effizient transportiert wird. Der P-gp Transport wird in mikromolaren Konzentrationen durch Imatinib inhibiert (IC₅₀ 1 µM). Der in den MRP1 transfizierten 2008 Zellen im Vergleich zur Ausgangszelllinie

erhöhte MAF-Wert bei hohen Imatinib Konzentrationen, spricht dafür, dass Imatinib in hohen Konzentrationen auch den MRP1 bedingten Calcein Transport hemmt. Hegedues T. *et al.* zeigten für den Calceintransport durch P-gp und MRP1 nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit entsprechendes [205]. Auch ein weiteres P-gp Substrat, das mit dem β -Strahler [^3H] markierte Vinblastin, wurde in Anwesenheit von Imatinib durch MDCKII MDR1 weniger effizient transportiert. Die nur etwa 25 % ige Reduktion des Vinblastin-Transports weist daraufhin, dass Imatinib im Vergleich zu anderen Inhibitoren nur ein mässiger Inhibitor der P-gp Funktion ist. Pluronic L61 beispielsweise erreicht im selben Transportassay eine annähernd 100 % ige Reduktion des Vinblastin Transports von P-gp [163]. Im Gegensatz zu P-gp war der MRP2 bedingte Transport von Vinblastin in Anwesenheit von Imatinib im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle nicht beeinträchtigt. Ausgehend von der Beobachtung, dass viele Substrate von P-gp und MRP1 auf den Transport anderer Substrate kompetitiv inhibitorisch wirken [176, 189], liegt die Vermutung nahe, dass Imatinib ein P-gp Substrat ist. Unter Verwendung der Nierenkarzinom Zelllinie MDCKII und ihrer MRP1, MRP2 und P-gp stabil exprimierender Transfektanten gelang es, den Imatinib Transport direkt nachzuweisen. Die MDCKII Zelllinien bilden, wenn sie auf Transwells ausgesät werden, ein einschichtiges Epithel, in dem die Transportproteine eine polare Anordnung besitzen: P-gp und MRP2 befinden sich ausschliesslich in der apikalen Membran, MRP1 in der basalen Zellmembran. Hierdurch produzieren die Zellen einen aktiven gerichteten parazellulären Transport [163]. Bei der P-gp exprimierenden MDR-1-Transfektante zeigte sich in diesem Transwellassay nach 4 h eine deutliche Imatinib Konzentrationsdifferenz, wenn man die Konzentrationen im kontralateralen Kompartiment bei Zugabe apikal bzw. basal vergleicht. Dies ist als eindeutiger Beweis für den Transport von Imatinib durch P-gp zu werten. MRP1 und MRP2 führten nicht zu einem effektiven Imatinib-Transport. Der direkte Nachweis eines durch P-gp verursachten Imatinib-Transports passt zu den Befunden die Mahon *et al.* an der Imatinib resistenten Zelllinie LAMA84r nachwiesen [82]. Folglich kommt P-gp, nicht aber MRP1 und MRP2, als Verursacher von Resistenzen gegen Imatinib bei hämatologischen und nicht hämatologischen Malignomen in Frage. Ausserdem ist ein Einfluss von P-gp auf die Aufnahme, Verteilung und Exkretion von Imatinib möglich. P-gp ist im Bereich der apikalen Membran der Enterozyten im Dün-

und Dickdarm hoch exprimiert, und ist dabei so orientiert, dass es Substrate aus dem Enterozyt zurück ins Darmlumen transportieren kann [190]. Allerdings liegt die Bioverfügbarkeit von Imatinib bei 98 % [191], im Gegensatz zu anderen P-gp Substraten, wie Cyclosporin A oder Digoxin, deren Bioverfügbarkeit durch P-gp beschränkt wird [192]. Da Imatinib die P-gp Funktion zumindest teilweise inhibieren kann ist ein Einfluss auf die Bioverfügbarkeit anderer P-gp Substrate bei gleichzeitiger oraler Gabe denkbar.

Die physiologisch hohe P-gp Konzentration im Bereich der lumenwärtigen Oberfläche der Kapillarendothelien des Gehirns blockiert den Übertritt von P-gp-Substraten über die Blut-Hirn Schranke [101, 102]. Im Ependym des Plexus choroideus sind P-gp und MRP1 an der Formierung der Blut-Liquorschranke beteiligt [85]. Dies könnte zu einer verringerten Konzentration von Imatinib im Gehirn bzw. in den Meningen führen, und somit die Effektivität von Imatinib bei Behandlung einer Ph⁺ALL mit einer Meningeosis leukemica beeinträchtigen. Interessanterweise ist die Imatinib-Liquorkonzentration im Vergleich zur Imatinib Serumkonzentration deutlich verringert [206]. Prüfwert ist daher eine Untersuchung von P-gp Inhibitoren, zur Erhöhung der ZNS-Konzentrationen von Imatinib.

Umgekehrt ist denkbar, dass Imatinib durch Inhibition von P-gp im Bereich der Bluthirnschranke, die Penetration von anderen Substraten, wie Loperamide oder Vinblastin verstärkt, was eine gesteigerte zentralnervöse Toxizität dieser Substanzen nach sich ziehen würde. Allerdings sind solche Interaktionen für andere P-gp Substrate lediglich für Loperamide und Chinin beschrieben [193], es handelt sich also um eine sehr seltene Interaktion [194].

In hämatopoetischen Zellen wird P-gp in der unreifen Stammzellpopulation physiologischerweise exprimiert, mit höchster Expression in den CD34^{low} und CD 34⁺ Stammzellen [104]. Dies führt zu einer geringeren Sensitivität hämatopoetischer Stammzellen gegenüber chemotherapeutischen Regimes im Vergleich zu differenzierteren hämatopoetischen Zellen [105, 106]. Im Gegensatz zur Ph⁺ALL ist bei der myeloproliferativen Erkrankung CML auch die Stammzellpopulation betroffen. In der Ph⁺-Stammzellfraktion könnte physiologisch vorhandenes P-gp die intrazelluläre Imatinib-Konzentration reduzieren, und so die konstitutiv aktive Tyrosinkinase reaktivieren. Die BCR-ABL positive Stammzellpopulation könnte so einen Vorteil gegenüber der BCR-ABL negativen erhalten. Die P-gp Expression in Ph⁺-Stammzellen

ist allerdings bislang nicht untersucht. Allerdings wurde bei der CML eine primitive Ph⁺ Stammzellpopulation beschrieben, die *in vitro* Imatinib resistent ist [195].

5.1.2 P-gp-Funktion bei Patienten mit Ph⁺ALL nach sekundärer Resistenzentwicklung

Um zu untersuchen, ob P-gp oder MRP1 für die Resistenzentwicklung der mit Imatinib behandelten Patienten mit Ph⁺ALL verantwortlich ist, sollte der *multidrug resistance* Phänotyp kryokonservierter mononukleärer Zellen der Patienten vor und nach Therapie bestimmt werden. Ausserdem sollten mononukleäre Zellen von primär gegenüber Imatinib refraktären Patienten untersucht werden.

In unterschiedlichen Studien wurden Methoden zur Bestimmung des *multidrug resistance* Phänotyps entwickelt, die entweder das mRNA Level, die Protein-Expression oder die Transportfunktion messen [196, 197]. Die Bestimmung von Expression und Funktion von P-gp und MRP1 ist allerdings nach wie vor kontrovers, was zu inkonsistenten Ergebnissen in verschiedenen Studien führt [198]. Da für die Funktion von ABC-Transportproteinen die Lokalisation entscheidend ist, haben Methoden die lediglich mRNA Level bzw. Proteinniveaus messen einen konzeptionellen Nachteil. In dieser Arbeit wurde daher eine Methode zur Bestimmung der Funktion der Transportproteine gewählt. Die Transportfunktion ist der klinisch interessanteste Parameter und auch eng mit dem Ansprechen korreliert [199-201]. Hierzu wurde ein modifizierter Calcein-Assay unter Verwendung von P-gp und MRP1 transfizierten Zelllinien etabliert. Calcein hat den Vorteil, dass es nicht an zelluläre Komponenten bindet, und seine Fluoreszenz vom intrazellulären pH, Ca²⁺ und Mg²⁺-Konzentration unabhängig ist [174]. Zu den aufgetauten Zellen wird nach Präinkubation mit und ohne P-gp bzw. MRP1 Inhibitoren, Calcein AM gegeben. Das lipophile Calcein AM dringt in die Zellen ein, und wird dort von Esterasen in das hydrophile und fluoreszierende Calcein umgewandelt. P-gp und MRP1 können durch aktiven Transport von Calcein AM die Akkumulation von Calcein im Zellinnern verhindern. Durch den Einsatz von Inhibitoren der Transport-Proteine erhält man durch Kalkulation der mittleren Fluoreszenzen mit und ohne Inhibitor, den *multidrug resistance* Aktivitätsfaktor (MAF-Wert), der die Transportfunktion dieser Proteine widerspiegelt. Zur Identifizierung des MRP1 vermittelten Transports wurde Indomethacin in einer 10µM Konzentration verwendet. Es hatte in dieser niedrigen Konzentration auf die mit MRP1cDNA transfizierten Zelllinien einen selektiven Effekt gezeigt. Auch Hollo *et al.* bestimmten für

Indomethacin eine grosse Differenz zwischen der IC₅₀ von MRP1 (10µM) und P-gp (>800µM) [143]. Der Inhibitor PSC833, der in 1 µM Konzentration eingesetzt wurde, zeigte hingegen, wie auch PAK-104P, keine stark differierenden IC₅₀ Werte für P-gp und MRP1, und somit nur eine geringe Spezifität.

Wie oben gezeigt ist nur P-gp nicht aber MRP1 in der Lage Imatinib zu transportieren. Daher sind vor allem MAF-Werte, die man durch Inhibition des Calceintransports mit PSC und PAK erhält, zur Beurteilung einer Mitverursachung der Imatinib Resistenz von Interesse. Da PAK und PSC auch den Calceintransport durch MRP1 hemmen, sind nur solche Transportaktivitäten sicher durch P-gp bedingt, bei denen die MRP1 Aktivität (Indomethacin als Inhibitor) gering ist.

Von den untersuchten Patienten mit Ph⁺ALL wurden mononukleäre Zellen vor Imatinib-Therapie und parallel dazu nach Resistenzentwicklung aufgetaut und untersucht. Insgesamt waren die MAF-Werte der mononukleären Patientenzellen niedrig, und lagen in einem Bereich der mit den lymphoblastischen Zelllinien vergleichbar ist. Lediglich bei zwei der untersuchten Patienten fand sich eine leichte Zunahme des PSC inhibierten Calcein AM-Transports am Ende der Imatinibtherapie, während der MAF_{PSC} bei den anderen Patienten abnahm oder gleich blieb. Aufgrund der hohen Standardabweichungen sind Vergleiche allerdings nur von eingeschränkter Aussagekraft. Neben den Patienten, die erst eine sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib entwickelten, wurden Patienten mit Ph⁺ALL untersucht, die primär nicht auf Imatinib ansprachen. Auch diese initial resistenten Patienten zeigten keine stark erhöhten MAF-Werte.

Vergleicht man die prätherapeutischen MAF-Werte, die für die untersuchte Patientenpopulation erhalten wurde (MAF-PSC = 3,12 %), mit MAF-Werten die Karaszi *et al.* bei Patienten mit ALL in Budapest gefunden haben (MAF-Verapamil = 7,8 %), so sind unsere Werte niedriger. Karaszi *et al.* zeigten auch, dass die MAF-Werte mononukleärer Zellen von Normalpersonen in einem ähnlichen Bereich liegen. Demgegenüber lag der MAF-Wert der AML-Patienten in derselben Studie mit 17,6 % deutlich höher [112]. Die Diskrepanz zwischen unseren Werten und den Werten, die Karaszi *et al.* erhielten erklärt sich möglicherweise durch geringe methodische Unterschiede. So wurde von Karaszi *et al.* Verapamil als Inhibitor beider Transportproteine verwendet. Zudem untersuchten sie frische Zellen, die nicht kryokonserviert wurden und analysierten nur eine zusätzlich eingegrenzte Subpopulation von Zellen. Ausserdem handelt es sich bei den von Karaszi *et al.*

untersuchten ALL-Patienten nicht ausschliesslich um Philadelphia positive Fälle, wie es bei den hier untersuchten Patienten der Fall ist.

Die niedrigen funktionellen Aktivitäten der mononukleären Zellen der Ph⁺ALL-Patienten und der lymphoblastischen Zelllinien im Calcein-Assay werfen die Frage auf, inwieweit P-gp überhaupt eine Relevanz bei akuten lymphatischen Leukämien besitzt. Letztlich wäre bei fehlender bzw. sehr niedriger Expression von P-gp auf Lymphoblasten, P-gp für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Imatinib bei Patienten mit ALL nicht von Bedeutung. Wie einleitend erwähnt, haben Tumore aus Geweben mit physiologischerweise hoher P-gp Expression, wie Nierenzellkarzinome, ebenfalls hohe P-gp Expressionen, was zur primären Resistenz solcher Tumore gegenüber Chemotherapie führt [98]. Demgegenüber sprechen pädiatrische ALL-Patienten sehr gut auf Chemotherapie an. Im Gegensatz zur AML, bei der eine Korrelation zwischen P-gp/MDR-1 Expression bzw. Funktion auf der einen Seite und Ansprechen auf Chemotherapie bzw. Langzeitüberleben auf der anderen Seite von unterschiedlichen Autoren gezeigt wurde [112, 172], ist die Relevanz der im Vergleich zur AML niedrigeren P-gp Expression und Aktivität bei der ALL noch kontrovers. Beispielsweise fanden den Boer *et al.* bei kindlichen akuten lymphatischen Leukämien keine Korrelation zwischen durchflusszytometrisch gemessener P-gp Expression und klinischen Parametern wie Ansprechen. Genauso wenig liess sich zur *in vitro* Resistenz gegenüber Zytostatika wie Vincristin, Etoposide und Daunorubicin eine Korrelation herstellen. Die P-gp Expression der ALL-Zellen bei Diagnose lag etwa genauso hoch, wie bei Lymphozyten von Normalpersonen [187]. Auch Wattel *et al.* konnten keine Korrelation zwischen der bei 64% der untersuchten Erwachsenen ALL-Patienten als positiv bewerteten P-gp Expression, und einem Ansprechen auf Chemotherapie bzw. dem Langzeitüberleben feststellen [202]. Im Gegensatz dazu konnten Dhooge *et al.* mittels Immunzytochemie zeigen, dass kindliche ALL-Patienten nach Rückfall mit 34 % häufiger P-gp exprimieren als Patienten vor Therapie mit 14 %. Zudem fanden sie, dass P-gp ein unabhängiger prognostischer Faktor ist [203]. Und Damiani *et al.* zeigten, dass P-gp positive erwachsene ALL-Patienten (47%) eine höhere Wahrscheinlichkeit haben Rückfälle zu bekommen [119]. Tafuri *et al.* konnten für die von ihnen untersuchten erwachsenen ALL-Patienten demonstrieren, dass die 22 % P-gp positiven Patienten mit 53 % eine schlechtere komplette Remissionsrate hatten als die P-gp negativen mit 80 % [120]. Woerden *et al.*, Tafuri *et al.* und Damiani *et al.* haben zwischen Ph⁺ALL und Ph⁻ALL keine Unterschiede in der P-gp Expression messen können [119-121]. Ein

direkter Vergleich der P-gp Funktion zwischen Ph⁺ALL und Ph⁻ALL wurde bislang noch nicht beschrieben.

Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse der verschiedenen Autoren ist wahrscheinlich neben der stark differierenden Methodik auch durch die eher schwache Expression von P-gp auf den lymphoblastischen Zellen begründet, die eine sichere Quantifizierung erschwert [198]. Dass auch niedrige P-gp Level Einfluss auf die basale Zytostatika-Resistenz besitzen, konnte im übrigen an P-gp-Knock-out Mäusen gezeigt werden [204]. Versucht man die Bedeutung von P-gp für die Lymphoblasten abschliessend zu bewerten, so sprechen derzeit die Mehrzahl der neueren Veröffentlichungen dafür, dass es zwar keine ausgeprägten Überexpressionen von P-gp bei der ALL gibt, dass aber auch geringe Differenzen in Expression und Funktion von P-gp, zu Differenzen im klinischen Ansprechen einer Chemotherapie und des Langzeitüberlebens führen. Da die MAF-Werte der von uns untersuchten Patienten durchaus differieren, mit dem höchsten MAF_(PSC) nach Therapie von 9,9 % bei Pat.Nr.2, und dem niedrigsten MAF_(PSC) nach Therapie von 0,1 bei Pat. Nr.5, wäre eine unterschiedliche Sensitivität der Zellen gegenüber Zytostatika zu erwarten.

Will man diese Ergebnisse allerdings auf die Imatinib Therapie übertragen, so ist neben dem Nachweis, dass Imatinib Substrat von P-gp ist, die Frage zu beantworten, wie effizient dieser Transport im Vergleich zu anderen Zytostatika ist. Da wir keine intrazellulären Imatinib-Konzentrationen messen konnten, ist lediglich eine Abschätzung anhand der *in vitro* Daten möglich. In den Transportexperimenten, in denen die polarisierten MDCKII Zellen verwendet wurden, ist die Konzentration im basalen Kompartiment bei apikaler Zugabe von Imatinib mit der Situation im Intrazellulärraum der Lymphoblasten vergleichbar. Bei den nicht transfizierten Zellen lag nach 4 h die Imatinibkonzentration basal bei 30% der Ausgangskonzentration, bei den mit MDR1 transfizierten lag der Wert bei 18%, und war damit etwa 40 % niedriger. Dagegen lag für Vinblastin nach 4 h die Konzentration basal bei den nicht transfizierten MDCKII Zellen bei 3,9% der Ausgangskonzentration, und bei den MDR1-transfizierten Zellen betrug sie bei 1,3% der Ausgangskonzentration, war also 70 % niedriger. Man erkennt bei diesen Werten, dass P-gp die Vinblastin-Akkumulation prozentual stärker behindert als die Akkumulation von Imatinib. Nun haben die Lymphoblasten der Patientenzellen niedrigere MAF_(PSC) Werte als die MDR1 transfizierten MDCKII Zellen. Ausgehend vom Maximalwert von 9,9 % bei Patient #2 und dem MAF_(PSC) von 30 % bei MDCK II MDR1 ist es wahrscheinlich, dass die Reduktion der Imatinib-Konzentration in den Patienten

Zellen nicht grösser ist als 10-15 %. Das durch diese nur geringe Reduktion der Imatinib-Konzentration die BCR-ABL Tyrosinkinase wieder aktiviert vorliegt, erscheint unwahrscheinlich. Da die Rückfälle der Patienten mit sekundärer Resistenz sich trotz unterschiedlicher MAF-Werte in ihren Charakteristika nicht unterschieden und regelhaft nach einer relativ kurzen Zeit von 2-3 Monaten auftraten [65], ohne dass es dabei zu einer signifikanten Steigerung der *multidrug resistance* Aktivität kam, ist das Vorhandensein anderer Resistenzmechanismen als Ursache der Imatinib-Resistenz anzunehmen. Hierbei haben unterschiedliche Autoren mit *in vitro* Modellen und mit Untersuchungen von mononukleären Zellen von Patienten verschiedene Mechanismen beschrieben.

Die *in vitro* etablierten Imatinib resistenten Zelllinien hatten meist eine BCR-ABL-Genamplifikation als Ursache der im Vergleich zu ihren Ausgangszelllinien geringeren Imatinib Sensibilität [72, 73, 82]. Allerdings liess sich auch bei megakaryozytären CML-Zelllinie LAMA84r eine Hochregulation von P-gp mittels Durchflusszytometrie nachweisen [82]. Zwei andere Zelllinien, K562r und AR230r, die wie LAMA84r eine Erhöhung IC50 für Imatinib aufwiesen, zeigten keine Veränderung der P-gp Proteinexpression. Die von le Coutre *et al.* beschriebene gegenüber Imatinib resistente Zelllinie Lama84R hatte im Vergleich zur nicht resistenten Ausgangszelllinie, keine vermehrte Expression der MDR1mRNA [73]. Beide Autoren untersuchten nicht die MRP1 Expression der Zelllinien. Weisberg *et al.* untersuchten in den Imatinib resistenten Zelllinien K562r und Ba/F3p210r mittels Durchflußzytometrie die MRP1 und P-gp Expression und fanden keine vermehrte Expression. Auch hier erklärten sich die Resistenzen durch eine erhöhte BCR-ABL Proteinexpression [72].

Auch bei den sekundären Resistenzen bei CML Patienten liessen sich Genamplifikationen nachweisen [75]. Ein weiterer Mechanismus der bei Patienten mit sekundär erworbener Imatinib Resistenz auftrat, ist durch Mutationen in der Tyrosinkinase Domäne von BCR-ABL ausgelöst, welche die kompetitive Bindung von Imatinib in der ATP-Bindungsregion beeinträchtigen [75-77, 79]. Ob bei den resistenten Patienten eine veränderte Expression/Funktion von MRP1 und P-gp vorhanden ist, wurde allerdings bisher in keiner Veröffentlichung untersucht. Interessanterweise zeigten nicht veröffentlichte Genexpressionsdaten (*Mikroarray*), die in der hämatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Frankfurt durch PD. Dr. med. Hofmann erhoben wurden, dass die MDR1-mRNA Expression bei den primär gegen Imatinib resistenten Ph⁺ Patienten höher lag, als bei den Patienten die primär

ansprechen. Zusätzlich fand sich bei zwei dieser primär resistenten Patienten ein Anstieg der MDR1-mRNA, während der Therapie, so dass in diesen Fällen die Vermutung nahe liegt, dass eine vor Imatinib Therapie erworbene MDR1 Gen-Amplifikation eine primäre Resistenz bei einem Teil der primär resistenten Patienten unterstützt. Zusätzliche, noch unbekannte Mechanismen bei der primär resistenten Patientengruppe sind wahrscheinlich, zumahl im Gegensatz zu den sekundär resistenten Patienten, keine Mutationen in der ATP-Bindungsregion gefunden wurden. Da bei der relativ niedrigen funktionellen Aktivität in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen nicht davon auszugehen ist, dass P-gp eine bedeutsame Reduktion der intrazellulären Imatinib-Konzentration bewirkt, muss geschlossen werden, dass P-gp bei den untersuchten Patienten eine sehr untergeordnete Bedeutung für die Resistenzentwicklung gespielt hat. Zusammenfassend konnte die Verursachung einer sekundären Imatinib-Resistenz alleine durch P-gp bei akuten lymphatischen Leukämien nicht nachgewiesen werden. Dass eine vermehrte P-gp Expression eine primäre Resistenzentwicklung unterstützt, ist jedoch anzunehmen. Aufgrund der größeren Bedeutung die P-gp für CML-Patienten in Blastenkrise spielt [115-117], ist die Untersuchung der P-gp Funktion auch bei Imatinib behandelten CML-Patienten sinnvoll.

5.2 Bedeutung von MRP1 und P-gp für die Resistenz von BCR-ABL positiven Zelllinien gegenüber Zytostatika

Ein Charakteristikum BCR-ABL transformierter Zellen ist deren geringe Sensitivität gegenüber Apoptose auslösenden Stimuli, wie Zytostatika [178-180]. Diese Eigenschaft wird als Erklärung für das schlechte Ansprechen der Ph⁺CML und der Ph⁺ALL auf konventionelle chemotherapeutische Regimes angeführt. Eine Reihe möglicher Ursachen, z.B. die Hochregulation antiapoptotischer Proteine (Bcl-x_L, BCL-2), wurde beschrieben [38, 178, 42]. Ob auch Mitglieder der *ATP-binding-cassette* Proteinfamilie für die geringe Sensitivität der Philadelphia positiven Leukämien gegenüber Zytostatika verantwortlich sind, ist bislang nur wenig erforscht. P-gp und MRP1 sind Membranproteine die durch aktiven Efflux die intrazellulären Konzentrationen einer großen Zahl zytotoxischer Substanzen reduzieren können. P-gp hat bei der akuten myeloischen Leukämie eine klinisch prognostische Bedeutung [110-113]. Auch für die ALL konnte in neueren Studien gezeigt werden dass P-gp-Expression mit einem schlechteren Therapieergebnis und mit häufigeren Rückfällen assoziiert ist [119, 120].

Die Inhibition der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase von BCR-ABL mit dem spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ermöglicht es, den Effekt der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase auf diese Transportproteine zu untersuchen.

In den untersuchten Ph⁺ lymphoblastischen Zelllinien ließ sich kein P-gp Protein mittels Westernblotting nach Kultivierung mit und ohne Imatinib nachweisen. In den mononukleären Zellen eines untersuchten Patienten war eine geringe Menge P-gp mittels Westernblot nachweisbar, wobei die Kultivierung in Imatinib keinen Einfluß auf die P-gp Expression hatte.

Im Gegensatz dazu ließ sich MRP1 mittels Western-Blotting in allen untersuchten Ph⁺ Zelllinien nachweisen. Aufgrund der ubiquitären Expression dieses Proteins in vielen Geweben, war dies zu erwarten [138]. Bei einem Teil der BCR-ABL positiven Zelllinien ließ sich interessanterweise eine Verminderung der MRP1 Proteinexpression nach Imatinib Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachweisen. Vor allem die p210^{BCR-ABL} positive Zelllinie BV173 zeigte unter Inhibition ihrer Tyrosinkinase-Aktivität, sowohl eine Reduktion ihrer MRP1 Proteinexpression, als auch eine Verminderung der MRP1 mRNA Expression. Auch die p190^{BCR-ABL} positive Zelllinie TOM1 zeigte in einem geringeren Maß diese Charakteristika. Dagegen war bei einer anderen p190^{BCR-ABL} positiven Zelllinie, SUP B15, weder eine Verminderung des MRP1 Proteinniveaus, noch ein Absinken der MRP1 mRNA Expression nachweisbar.

Die Reduktion der MRP1 mRNA bei BV173 und TOM1 spricht für eine verminderte Transkription des MRP1-Gens als Ursache der Verringerung des MRP1 Proteinlevels, wenn auch andere gleichzeitig bestehende Mechanismen, wie beispielsweise posttranskriptionelle Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

Imatinib wirkt nicht nur auf die Tyrosinkinase von BCR-ABL inhibitorisch, sondern auch auf die Tyrosinkinase von ABL, die Tyrosinkinase des c-KIT Rezeptors und die Tyrosinkinase des PDGF-Rezeptors. Da die Zelllinie BV173 kein Wildtyp c-ABL enthält, ist die Reduktion von MRP1 bei BV-173 sicher nicht durch Hemmung der ABL Tyrosinkinase zustande kommen. Auch Effekte durch Inhibition des PDGF-Rezeptors treten bei BV173, wie Deininger et al. zeigen konnten, nicht auf [47]. Um auszuschließen, dass eine Inhibition der c-KIT Tyrosinkinase, die Verringerung von MRP1 auslöst, wurden die untersuchten Zellen auf Ihre c-KIT Expression untersucht. C-KIT ist eine membranständige Rezeptortyrosinkinase, die durch das Zytokin Stammzellfaktor (SCF) aktiviert wird. Der Oberflächenmarker CD117 entspricht dem extrazellulären Anteil des C-KIT-Rezeptors. Durchflußzytometrisch sind die Zelllinien

BV173 und SUP B15 CD117 negativ (4.1.7). Somit ist letztlich auch die c-KIT Tyrosinkinase nicht an der Verminderung der MRP1 Proteinexpression durch Kultivierung der Zellen in Imatinib haltigem Medium beteiligt.

Die Ursache der verminderten MRP1-Transkription ist damit in der Unterbrechung der BCR-ABL-Signaltransduktion durch Imatinib zu suchen.

Essentiell für den transformierenden Effekt von BCR-ABL ist die Aktivierung des RAS-Signalpfades [28, 29]. Über die nachgeschalteten MAPK führt RAS zur Transkription von Genen. Eine Beteiligung dieses prominenten Pfades ist somit denkbar. Unter den vorhandenen Kulturbedingungen war in den BV173 Zellen der RAS- MAPK Pfad aktiv und durch Imatinib inhibierbar. Im Gegensatz dazu ließ sich eine vermehrte Aktivität dieses Signaltransduktionsweges in den SUP B15 nicht zeigen. Eine Mitbeteiligung des RAS-MAPK Pfades bei der auf BV-173 beschränkten MRP1 Reduktion ist also möglich. Allerdings ließ sich durch den MEK1 Inhibitor PD 98059, der den RAS-MAPK Pfad blockiert, keine reproduzierbare MRP1-Inhibition nachweisen. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass auch Imatinib unter den serumfreien Bedingungen, die für den Einsatz von PD 98059 notwendig sind, keine stabile MRP1-Inhibition zeigte. Um die Beteiligung von RAS weiter zu erforschen, sollten künftig andere experimentelle Methoden, wie die Verwendung dominant negativer RAS Transfektanten oder die direkte Hemmung von RAS mit RAS-antisense-Oligonukleotiden, eingesetzt werden. Myc ist ein Onkogen dessen Überexpression in vielen Malignomen nachgewiesen werden konnte. Bei Neuroblastomen korreliert die Amplifikation von n-myc interessanterweise mit der MRP1-Expression [147]. BCR-ABL führt vermittelt durch RAS zu einer Überexpression von c-myc [33]. Ob eine vermehrte Expression von c-myc zu einer erhöhten Expression von MRP1 führt, ist bislang nicht untersucht worden. In allen untersuchten Ph⁺Zelllinien führte Imatinib in mikromolaren Konzentrationen zu einer Herunterregulation des c-myc Proteinlevels. Auch die Zelllinien bei denen Imatinib nicht zu einer Verminderung des MRP1 Proteinlevels führte, also p185^{BCR-ABL} transfizierte U937 und SUP B15, zeigten eine deutliche Reduktion von c-myc bei Imatinib-Behandlung. Daher ist zu schließen das c-myc nicht bei der Verminderung der MRP1-Proteinexpression durch Imatinib involviert ist.

Ein weiterer wichtiger Signalweg der zur Transformation Ph⁺Zellen führt, ist die Aktivierung von STAT 5 durch BCR-ABL. STAT 5 ist ein Protein, das physiologischerweise durch Wachstumsfaktoren, wie IL3, aktiviert wird. BCR-ABL vermittelt wachstumsfaktorabhängigen Zelllinien durch die konstitutive Aktivierung von

STAT 5 Faktorunabhängigkeit [39, 40]. Nimmt man an, dass durch BCR-ABL aktiviertes STAT 5 zu einer vermehrten MRP1 Expression führt, so sollte auch IL3 als Aktivator von STAT 5 die MRP1 Expression steigern. In den BCR-ABL-transfizierten Ba/F3 Zellen führt IL3 jedoch nicht zu einer Hochregulation von MRP1 in den Imatinib behandelten Zellen. Eine Beteiligung von STAT 5 ist somit nicht evident.

Welcher Signalpfad von BCR-ABL die Transkription von MRP1 verstärkt, konnte somit nicht abschließend geklärt werden.

Wenn aktives BCR-ABL zu einer vermehrten Transkription des MRP1 Gens führt, und diese durch Imatinib hemmbar ist, dann muß MRP1 auch in BCR-ABL transfizierten Zellen im Vergleich zu ihren Ausgangszelllinien vermehrt sein. Dies lies sich jedoch in den BCR-ABL transfizierten U937 nicht konsistent zeigen.

Um auszuschließen, dass die Imatinib bedingte MRP1-Reduktion nur ein Epiphänomen aufgrund vermehrter Proteindegradierung ist, wurden zur Kontrolle BV173 mit Doxorubicin behandelt. Auch durch Doxorubicin kam es zu einer Reduktion des MRP1 Proteinniveaus. Allerdings war im Gegensatz zu den Imatinib behandelten Zellen auch das BCR-ABL Proteinniveau vermindert, so dass beide Phänomene nicht äquivalent sind. Auch die fehlende Verminderung von MRP1 bei Imatinib behandelten SUP B15, spricht gegen die These, dass durch vermehrte Apoptose ausgelöste Proteindegradierung zu einer Verminderung der MRP1 Niveaus bei einem Teil der Ph⁺Zellen führt.

Eine weitere mögliche Ursache für eine Verminderung des MRP1-Niveaus, die allerdings in meiner Arbeit nicht untersucht wurde, ist eine durch Kultivierung in Imatinib entstehende Verminderung des oxidativen Streß. Sattler *et al.* zeigten, dass nach Transfektion von Ba/F3 Zellen mit BCR-ABL vermehrt oxidativer Streß durch reaktive Sauerstoff Spezies auftritt, und dass umgekehrt das Auftreten von Sauerstoffradikalen durch Imatinib in BCR-ABL positiven Zelllinien verhindert wird [185, 186].

Interessanterweise ist eine physiologische Funktion die man MRP1 zuschreibt, die Normalisierung des Redoxpotentials durch Auswärtstransport von Gluthadion-disulfid [183]. Kauffmann *et al.* konnten zeigen, dass nach Inkubation von Zelllinien mit oxidierenden Substanzen MRP1 vermehrt exprimiert wird [182]. Und auch die in einer Zelllinie erhöhte MRP1-Expression wird durch Sullivan *et al.* mit der Vermehrung des oxidativen Streß erklärt [154], die durch Mutation des p53-Gens in den Tumorzellen ausgelöst wurde. Prechtl *et al.* zeigten das IL2 inkubierte Th1 Lymphozyten ein erhöhtes MRP1-Proteinniveau haben, und führen dies auf die durch vermehrte

Proliferation verstärkten Metabolismus zurück, der durch die Veränderung des Redox-Potentials, zur Hochregulation von MRP1 führt [184]. Nimmt man diese Befunde zusammen könnte die erhöhte MRP-1 Expression in Zellen mit aktivem BCR-ABL, auf einen verstärkten Metabolismus und die daraus resultierende Verschiebung des Redoxpotentials, zurückzuführen sein. Imatinib würde also lediglich durch seinen Einfluß auf Stoffwechsel und Wachstum der BCR-ABL positiven Zelllinien zu einer Reduktion der MRP1-Transkription führen. Der fehlende Effekt von Imatinib auf die MRP1-Expression der BCR-ABL transfizierten U937 p185, ließe sich dann, auf den trotz Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität fehlenden Effekt von Imatinib auf Proliferation und Metabolismus dieser Zellen zurückführen.

Hält man die These aufrecht, dass BCR-ABL über nachgeschaltete Signalwege zu einer Hochregulation von MRP1 führt, sind weitere Untersuchungen nötig, um zu prüfen, ob daraus eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erwächst. Flens *et al.* konnten zeigen, dass MRP1 in vielen Tumoren membranös lokalisiert ist, während es in normalen Geweben häufiger zytoplasmatisch lokalisiert ist [188]. Hierbei ist zu bedenken, dass MRP1 Zytostatika nur effizient aus der Zelle transportiert, wenn es membranös lokalisiert ist. Sowohl der Westernblot als auch die Bestimmung der m-RNA mittels RT-PCR sind daher vergleichende quantitative Methoden, die keinen sicheren Aufschluß über die MRP1 Funktion geben.

Versucht man die verminderten MRP1-Proteinniveaus durchflusszytometrisch unter Verwendung von MRP1 spezifischen Antikörpern zu untersuchen, so führt die Tatsache das derzeit keine monoklonalen spezifischen Antikörper gegen extrazelluläre Epitope von MRP1 zur Verfügung stehen, zur Notwendigkeit die Zellen zu permeabilisieren. Danach ist jedoch, wie beim Westernblot, keine Unterscheidung zwischen membranösem und zytoplasmatischem MRP1 möglich. Da der verwendete MRPM6 Antikörper (siehe Abb. 5) die zu anderen ABC-Transportern am stärksten homologe Region von MRP1 erkennt, und der beim Westernblot verwendete MRPr1 Antikörper gegen eine MRP1 spezifische Region gerichtet ist [187], bietet die verwendete durchflusszytometrische Methode gegenüber dem Western Blot keine Vorteile. Der bei Verwendung des MRPM6- Antikörpers fehlende Unterschied in der MRP1 Proteinexpression Imatinib behandelter und unbehandelter Zellen ist also von geringerer Relevanz als die Ergebnisse der Westernblots.

Bisher liegen keine Daten über die MRP1 Lokalisation in Lymphoblasten vor. Lediglich für murine T-Lymphozyten ist die MRP1 Lokalisation (membranös) bekannt [184]. Um

die Relevanz der bisherigen Daten zu überprüfen sollte die Lokalisation von MRP1 bestimmt werden. Mittels konfokaler Lasermikroskopie habe ich überprüft, ob MRP1 in den von uns untersuchten lymphoblastischen Zelllinien als Membranprotein vorliegt. Es zeigte sich eine zytoplasmatische Verteilung von MRP1. Eine Kultivierung mit Imatinib beeinflusste die Lokalisation von MRP1 nicht. Damit war die funktionelle Relevanz des nach Kultivierung in Imatinib verminderten MRP1-Proteingehalts der Lymphoblasten zweifelhaft. Um die Bedeutung der mit dem Westernblot erhobenen Daten abschließend zu bewerten wurde die MRP1 Funktion der BCR-ABL positiven Zelllinien mit dem Calcein-Assay untersucht. Durch Verwendung des MRP1 spezifischen Transportinhibitors Indomethacin war es uns möglich zwischen MRP1 und P-gp vermitteltem Calceintransport zu unterscheiden. Die gemessenen MAF-Werte der lymphoblastischen Zellen sind sehr niedrig mit Werten kleiner als 3 %. Eine Abnahme der MRP1-Transportaktivität, also des MAF-Indomethacin, durch Kultivierung in Imatinib, läßt sich nicht nachweisen.

Aufgrund der geringen Transportaktivität ist eine Rolle von MRP1 für die bei BCR-ABL positiven Zellen verminderten Sensitivität gegenüber Zytostatika nicht anzunehmen. Der mittels Westernblotting erhobene Befund einer Reduktion von MRP1 unter Inhibition der BCR-ABL Tyrosinkinase, hat keine klinische Relevanz.

Passend konnten Damiani *et al.* und Woerden *et al.* keine vermehrte der MRP1 Expression bei Patienten mit Ph⁺ALL im Vergleich zur Ph⁻ALL finden [119, 121].

Damiani *et al.* konnten außerdem für MRP1 keine prognostische Relevanz für die akute lymphatische Leukämie ausmachen [119].

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, dass MRP1 und P-gp nicht durch eine BCR-ABL vermittelte Hochregulation zu einer verminderten Empfindlichkeit Ph-positiver Leukämien gegenüber Zytostatika führen. Die Tatsache das die MRP1 Transkription durch Kultivierung mit Imatinib vermindert ist, erfordert weitere Untersuchung, um Informationen über die weitgehend ungeklärte Regulation des MRP1 Gens zu erhalten.

6 Zusammenfassung

Bei vielen malignen Erkrankungen sind deregulierte Signalübertragungswege bedeutsam für die Pathogenese. Modellcharakter hierfür haben die Philadelphia (Ph) Chromosom positiven Leukämien, zu denen 90 % der chronisch myeloischen Leukämien und etwa 15 – 30 % akuten lymphatischen Leukämien des Erwachsenen gehören. Das Philadelphia Chromosom, das durch die reziproke Translokation von Chromosom 9 und 22 entsteht, codiert für ein tumorspezifisches Fusionsprotein, die BCR-ABL Tyrosinkinase. Diese ist konstitutiv überaktiviert und führt zu autonomem Wachstum und maligner Entartung der Philadelphia positiven Zellen. Ein neuer therapeutischer Ansatz, die Hemmung des pathogenetisch bedeutsamen Signalweges, ist mit dem BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib möglich. Der starke antileukämische Effekt von Imatinib gegenüber BCR-ABL positiven Leukämien konnte in klinischen Studien mit Ansprechraten von etwa 60 % bei der Ph⁺ALL gezeigt werden. Dieser Erfolg wird jedoch von der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib getrübt. So entwickelt die Mehrzahl der Patienten mit Ph⁺ALL nach einer medianen Behandlungszeit von 2 Monaten ein Rezidiv.

Ein häufiger Resistenzmechanismus bei Polychemotherapien ist die erhöhte Expression der pleiotrope Zytostatikaresistenz vermittelnden Proteine P-gp und MRP-1. Diese Arbeit sollte untersuchen, ob die ABC-Transportproteine P-gp und MRP-1 bei der Imatinibresistenz beteiligt sind. MRP-1 und das durch das MDR-1 Gen codierte P-gp sind membranständige Transportproteine, die Tumorzellen durch Auswärtstransport von vielen unterschiedlichen, chemisch nicht verwandten Zytostatika, Resistenzen gegenüber diesen Substanzen verleihen. Um die Rolle von P-gp und MRP-1 bei der Entwicklung der Imatinibresistenz zu bestimmen, wurde untersucht, ob Imatinib ein Substrat von P-gp oder MRP-1 ist, und ob es während der Behandlung mit Imatinib zu einem Anstieg der funktionellen Aktivität dieser Proteine kommt. Mittels transfizierter Zelllinien ließ sich zeigen, dass die P-gp Substrate Calcein AM und Tritium-markiertes Vinblastin in Anwesenheit von Imatinib schlechter transportiert werden. Bei Annahme eines kompetitiven Mechanismus lag die Vermutung nahe, dass Imatinib nicht nur ein Inhibitor des P-gp bedingten Transports von Calcein AM und Vinblastin ist, sondern selbst ein Substrat. Durch Verwendung einer P-gp transfizierten Zelllinie in einem Transwellassay, in dem diese einen vektorialen Substrattransport bewirkt, konnte direkt gezeigt werden, dass Imatinib durch P-gp nicht aber durch MRP-1 und MRP-2

transportiert wird. Somit ist P-gp potentiell in der Lage, Resistenzen gegen Imatinib auszulösen. Um die funktionelle Aktivität von P-gp in den mononukleären Zellen der mit Imatinib behandelten Patienten bestimmen zu können, wurde eine durchflusszytometrische Methode unter Verwendung von Calcein AM etabliert. Die untersuchten Patientenzellen zeigten jedoch bei niedrigem Ausgangsniveau keinen Anstieg der funktionellen P-gp Aktivität nach Resistenzentwicklung, so dass weder MRP1 noch P-gp Anteil an der Resistenzentwicklung bei Ph⁺ALL gegenüber Imatinib zu haben scheinen.

Die Möglichkeit, die konstitutiv aktive Tyrosinkinase von BCR-ABL mit Imatinib zu inhibieren, ermöglicht es, pathogenetische Charakteristika der BCR-ABL positiven Leukämien zu untersuchen. Die Ph⁺ALL ist charakterisiert durch ihre schlechte Prognose mit einem Langzeitüberleben von weniger als 10 % bei konventionellen chemotherapeutischen Regimes. Ob die Zytostatikaresistenz vermittelnden Proteine P-gp und MRP-1 hierfür ursächlich sind, sollte in einem weiteren Teil der Arbeit untersucht werden. Durch Hemmung der BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase von Philadelphia Chromosom positiven Zelllinien mit Imatinib kam es bei einem Teil dieser Zelllinien zur Abnahme des MRP-1 Proteinniveaus und der MRP-1 mRNA Expression. Dies begründete die Hypothese, dass die aktivierte BCR-ABL Tyrosinkinase zu einer Hochregulation der MRP-1 Transkription führt, und damit für die schlechte Prognose ursächlich ist, lag nahe. Weder c-kit noch die BCR-ABL nachgeschalteten Signalproteine RAS-MAP-Kinase, c-MYC und STAT 5 waren bei der Herunterregulation von MRP-1 unter Imatinib beteiligt. Durch den Nachweis der vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation von MRP-1 in den untersuchten Lymphoblasten mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie und durch den Nachweis einer sehr niedrigen funktionellen Aktivität von MRP-1 in diesen Zellen mittels Durchflusszytometrie eine Bedeutung von MRP-1 für die schlechte Prognose nicht anzunehmen.

7 Conclusion

Deregulation and activation of molecular pathways is crucially involved in the pathogenesis of malignant disease. In 90 % of CML and 15 % - 30 % of ALL the Philadelphia (Ph) chromosome is found and essential for initiating and maintaining the transformed phenotype. The Ph chromosome is characterized at the molecular level by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, that leads to formation of a BCR-ABL fusion protein with enhanced and deregulated kinase activity. Recently, imatinib a competitive selective inhibitor of the abl tyrosine kinase has been shown in clinical trials to have pronounced anti-leukemic activity against BCR-ABL expressing leukemia's. In patients with relapsed or chemotherapy-refractory Ph⁺ALL hematologic response rates of 60-70% have been reported. These responses are generally brief, however, with resistance developing after a median of 2 months. The present study assessed if the ABC-transport proteins P-gp or MRP-1 are involved in imatinib-resistance. MRP-1 and P-gp, which is encoded by the *mdr-1* gene, are the most common reason for acquisition of resistance to a broad spectrum of anticancer drugs. The over expression of these membrane proteins is considered to result in multidrug resistance by energy-dependent efflux of many anticancer drugs from cell. Therefore it was the aim of the study to assess whether imatinib is a substrate of P-gp and/or MRP-1/2, and whether clinical resistance to imatinib is associated with high-level activity of these transporters in Ph⁺ALL. Most substrates of P-gp or MRP-1 are competitive inhibitors of other substrates of these ABC-transporters. Using MDR-1 transfected cell lines over expressing P-gp, imatinib showed an inhibitory effect on Calcein AM and vinblastine transport mediated by P-gp.

Direct evidence that imatinib is a substrate of P-gp was obtained with a transwell assay in which MDR-1 and MRP-1 transfected cell lines cause a vectorial drug transport. In this assay P-gp but not MRP-1/2 is able to transport imatinib. Thus P-gp could potentially be involved in imatinib-resistance. To measure functional activity of P-gp and MRP-1 in ALL blasts a flow cytometric method using calcein AM was established. The functional multidrug resistance was low in mononuclear cells of Ph⁺ALL patients. Most patients did not show an increase of activity after relapse. Therefore these data do not support the thesis of a prominent role of P-gp in imatinib resistance of patients with Ph⁺ALL.

Inhibiting the constitutive active BCR-ABL kinase with imatinib make it possible to uncover characteristics of Ph⁺ cell lines. Ph⁺ALL is characterized by an aggressive clinical course with long-term survival of only 0 – 10 % with current chemotherapy regimes. Whether ABC-transporter like P-gp or MRP-1 are involved is only poorly understood. Interestingly, cultivating Ph⁺ cell lines with imatinib containing media leads to decreased MRP-1 protein and MRP-1 mRNA level in some cell lines. This suggests that a constitutive active BCR-ABL leads to up regulation of MRP-1 and thereby to the poor prognosis. C-kit and signaling pathways downstream BCR-ABL like RAS-MAPK, c-MYC and STAT 5 were not involved in the imatinib induced downregulation of MRP-1. But the low functional activity of MRP-1 shown by flow cytometry and the cytoplasmatic localization of MRP-1 demonstrated by confocal immunofluorescence microscopy in the assessed cell lines enfeeble the thesis of an involvement of MRP-1 in resistance of Ph⁺ALL to chemotherapy.

8 Literaturverzeichnis

1. Sawyers, C.L., C.T. Denny, and O.N. Witte, *Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis*. Cell, 1991. **64**(2): p. 337-50.
2. Faderl, S., et al., *Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1998. **91**(11): p. 3995-4019.
3. Secker-Walker, L.M., S.D. Lawler, and R.M. Hardisty, *Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis*. Br Med J, 1978. **2**(6151): p. 1529-30.
4. Secker-Walker, L.M., et al., *Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA*. MRC Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol, 1997. **96**(3): p. 601-10.
5. Cortes, J.E. and H.M. Kantarjian, *Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy*. Cancer, 1995. **76**(12): p. 2393-417.
6. Faderl, S., et al., *Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2000. **36**(3-4): p. 263-73.
7. Hoelzer, D., Gökbuget N., Arnold R. et al.: *Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen*. Internist, 1996. **37**: p. 994-1007.
8. Gleissner, B., et al., *Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1536-43.
9. Nowell, P., *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, 1960.
10. O'Dwyer, M.E., M.J. Mauro, and B.J. Druker, *Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 369-81.
11. Faderl, S., H.M. Kantarjian, and M. Talpaz, *Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment*. Oncology (Huntingt), 1999. **13**(2): p. 169-80; discussion 181, 184.
12. Silver, R.T., et al., *An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1517-36.
13. Rowley, J., *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining*. Nature, 1973.
14. De Klein, A., et al., *bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1986. **68**(6): p. 1369-75.

15. Kurzrock, R., et al., *A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 1987. **325**(6105): p. 631-5.
16. Laneuville, P., *Abl tyrosine protein kinase*. Semin Immunol, 1995. **7**(4): p. 255-66.
17. Wang, J.Y., *Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 35-43.
18. Feller, S.M., B. Knudsen, and H. Hanafusa, *c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk*. Embo J, 1994. **13**(10): p. 2341-51.
19. Van Etten, R.A., P. Jackson, and D. Baltimore, *The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization*. Cell, 1989. **58**(4): p. 669-78.
20. McWhirter, J.R. and J.Y. Wang, *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias*. Embo J, 1993. **12**(4): p. 1533-46.
21. Gong, J.G., et al., *The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 806-9.
22. McWhirter, J.R., D.L. Galasso, and J.Y. Wang, *A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7587-95.
23. Diekmann, D., et al., *Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 400-2.
24. Ma, G., et al., *Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2*. Oncogene, 1997. **14**(19): p. 2367-72.
25. Vigneri, P. and J.Y. Wang, *Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 228-34.
26. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
27. Pendergast, A.M., et al., *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein*. Cell, 1993. **75**(1): p. 175-85.
28. Sawyers, C.L., J. McLaughlin, and O.N. Witte, *Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 307-13.
29. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. Cell, 1995. **80**(2): p. 179-85.
30. Sawyers, C.L., *The role of myc in transformation by BCR-ABL*. Leuk Lymphoma, 1993. **11**(Suppl 1): p. 45-6.

31. Nieborowska-Skorska, M., et al., *The role of c-Myc protooncogene in chronic myelogenous leukemia*. *Folia Histochem Cytobiol*, 1994. **32**(4): p. 231-4.
32. Sawyers, C.L., W. Callahan, and O.N. Witte, *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes*. *Cell*, 1992. **70**(6): p. 901-10.
33. Stewart, M.J., et al., *Role for E2F1 in p210 BCR-ABL downstream regulation of c-myc transcription initiation. Studies in murine myeloid cells*. *Leukemia*, 1995. **9**(9): p. 1499-507.
34. de Groot, R.P., et al., *STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000. **3**(5): p. 299-305.
35. Nosaka, T., et al., *STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells*. *Embo J*, 1999. **18**(17): p. 4754-65.
36. Horvath, C.M., *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(10): p. 496-502.
37. Mui, A.L., et al., *Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation*. *Embo J*, 1996. **15**(10): p. 2425-33.
38. Horita, M., et al., *Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL*. *J Exp Med*, 2000. **191**(6): p. 977-84.
39. Sillaber, C., et al., *STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 2118-25.
40. Gesbert, F. and J.D. Griffin, *Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5*. *Blood*, 2000. **96**(6): p. 2269-76.
41. Skorski, T., et al., *Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells*. *Blood*, 1995. **86**(2): p. 726-36.
42. Skorski, T., et al., *Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway*. *Embo J*, 1997. **16**(20): p. 6151-61.
43. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
44. Faderl, S., et al., *The biology of chronic myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(3): p. 164-72.
45. Gotoh, A. and H.E. Broxmeyer, *The function of BCR/ABL and related proto-oncogenes*. *Curr Opin Hematol*, 1997. **4**(1): p. 3-11.
46. Salgia, R., et al., *BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(1): p. 46-57.

47. Deininger, M.W., et al., *BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 2049-55.
48. Lugo, T.G., et al., *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products*. *Science*, 1990. **247**(4946): p. 1079-82.
49. Okabe, M., et al., *Effect of herbimycin A, an antagonist of tyrosine kinase, on bcr/abl oncoprotein-associated cell proliferations: abrogative effect on the transformation of murine hematopoietic cells by transfection of a retroviral vector expressing oncoprotein P210bcr/abl and preferential inhibition on Ph1-positive leukemia cell growth*. *Blood*, 1992. **80**(5): p. 1330-8.
50. Honma, Y., et al., *Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity*. *Cancer Res*, 1989. **49**(2): p. 331-4.
51. Buchdunger, E., et al., *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative*. *Cancer Res*, 1996. **56**(1): p. 100-4.
52. Schindler, T., et al., *Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase*. *Science*, 2000. **289**(5486): p. 1938-42.
53. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **295**(1): p. 139-45.
54. Okuda, K., et al., *ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2440-8.
55. Deininger, M.W., et al., *The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells*. *Blood*, 1997. **90**(9): p. 3691-8.
56. le Coutre, P., et al., *In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(2): p. 163-8.
57. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(5): p. 561-6.
58. Gambacorti-Passerini, C., et al., *Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis*. *Blood Cells Mol Dis*, 1997. **23**(3): p. 380-94.
59. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
60. Soriano, P., *The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites*. *Development*, 1997. **124**(14): p. 2691-700.
61. Blanke, C.D., B.L. Eisenberg, and M.C. Heinrich, *Gastrointestinal stromal tumors*. *Curr Treat Options Oncol*, 2001. **2**(6): p. 485-91.

62. Kantarjian, H.M., et al., *Imatinib Mesylate for Philadelphia Chromosome-positive, Chronic-Phase Myeloid Leukemia after Failure of Interferon-alpha: Follow-Up Results*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2177-2187.
63. Talpaz, M., et al., *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study*. Blood, 2002. **99**(6): p. 1928-37.
64. Sawyers, C.L., et al., *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3530-9.
65. Ottmann, O.G., et al., *A phase II study of Imatinib Mesylate (Glivec TM) in Patients with Relapsed or Refractory Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoid Leukemias*. Blood, 2002: p. 2001-12-0181.
66. Krystal, G.W., et al., *The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3319-26.
67. Scappini, B., et al., *Effects of signal transduction inhibitor 571 in acute myelogenous leukemia cells*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 3884-93.
68. Magnusson, M.K., et al., *Activity of STI571 in chronic myelomonocytic leukemia with a platelet-derived growth factor beta receptor fusion oncogene*. Blood, 2002. **100**(3): p. 1088-1091.
69. Kilic, T., et al., *Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5143-50.
70. Brazier, R.M., et al., *Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate-treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience*. Blood, 2002. **100**(2): p. 435-41.
71. Krystal, G.W., *Mechanisms of resistance to imatinib (STI571) and prospects for combination with conventional chemotherapeutic agents*. Drug Resist Updat, 2001. **4**(1): p. 16-21.
72. Weisberg, E. and J.D. Griffin, *Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3498-505.
73. le Coutre, P., et al., *Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1758-66.
74. Keeshan, K., et al., *Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype*. Leukemia, 2001. **15**(12): p. 1823-33.

75. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
76. Hochhaus, A., et al., *Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2163.
77. Branford, S., et al., *High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3472-5.
78. Barthe, C., et al., *Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2163.
79. Hofmann, W.K., et al., *Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1860-2.
80. Gambacorti-Passerini, C., et al., *Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(20): p. 1641-50.
81. Jorgensen, H.G., et al., *alpha(1)-Acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571*. Blood, 2002. **99**(2): p. 713-5.
82. Mahon, F.X., et al., *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
83. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
84. Endicott, J.A. and V. Ling, *The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 137-71.
85. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 385-427.
86. Ambudkar, S.V., et al., *Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8472-6.
87. Ambudkar, S.V., *Purification and reconstitution of functional human P-glycoprotein*. J Bioenerg Biomembr, 1995. **27**(1): p. 23-9.
88. Horio, M., et al., *Agents which reverse multidrug-resistance are inhibitors of [3H]vinblastine transport by isolated vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1061**(1): p. 106-10.

89. Ford, J.M. and W.N. Hait, *Pharmacologic circumvention of multidrug resistance*. Cytotechnology, 1993. **12**(1-3): p. 171-212.
90. Sonneveld, P., et al., *Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin*. *The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON*. Lancet, 1992. **340**(8814): p. 255-9.
91. Bruggemann, E.P., et al., *Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 21020-6.
92. Martin, C., et al., *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(3): p. 624-32.
93. Aftab, D.T., J.M. Yang, and W.N. Hait, *Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells*. Oncol Res, 1994. **6**(2): p. 59-70.
94. Chambers, T.C., et al., *Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7679-86.
95. Germann, U.A., et al., *Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(3): p. 1708-16.
96. Gottesman, M.M., et al., *Genetic analysis of the multidrug transporter*. Annu Rev Genet, 1995. **29**: p. 607-49.
97. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
98. Goldstein, L.J., et al., *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(2): p. 116-24.
99. Sugawara, I., et al., *Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16*. Cancer Res, 1988. **48**(7): p. 1926-9.
100. Altuvia, S., et al., *Targeted disruption of the mouse mdr1b gene reveals that steroid hormones enhance mdr gene expression*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27127-32.
101. Cordon-Cardo, C., et al., *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 695-8.
102. Thiebaut, F., et al., *Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(2): p. 159-64.

103. Schinkel, A.H., et al., *Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs*. Cell, 1994. **77**(4): p. 491-502.
104. Bunting, K.D., *ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells*. Stem Cells, 2002. **20**(1): p. 11-20.
105. Ambudkar, S.V., et al., *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 361-98.
106. Chaudhary, P.M. and I.B. Roninson, *Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells*. Cell, 1991. **66**(1): p. 85-94.
107. Sonneveld, P., et al., *High expression of the multidrug resistance P-glycoprotein in high-risk myelodysplasia is associated with immature phenotype*. Leukemia, 1993. **7**(7): p. 963-9.
108. List, A.F., et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in myelodysplasia is associated with a stem cell phenotype*. Br J Haematol, 1991. **78**(1): p. 28-34.
109. Klimecki, W.T., et al., *P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2451-8.
110. Marie, J.P. and O. Legrand, *MDR1/P-GP expression as a prognostic factor in acute leukemias*. Adv Exp Med Biol, 1999. **457**: p. 1-9.
111. Legrand, O., et al., *Both P-gp and MRP contribute to drug resistance in AML*. Leukemia, 1998. **12**(8): p. 1327-8.
112. Karaszi, E., et al., *Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **112**(2): p. 308-14.
113. Lamy, T., et al., *P-glycoprotein (P-170) and CD34 expression in adult acute myeloid leukemia (AML)*. Leukemia, 1994. **8**(11): p. 1879-83.
114. Michieli, M., et al., *Overexpression of multidrug resistance-associated p170-glycoprotein in acute non-lymphocytic leukemia*. Eur J Haematol, 1992. **48**(2): p. 87-92.
115. Michelutti, A., et al., *Overexpression of MDR-related p170 glycoprotein in chronic myeloid leukemia*. Haematologica, 1994. **79**(3): p. 200-4.
116. Pirker, R., et al., *Expression of a multidrug resistance gene in blast crisis of chronic myelogenous leukemia*. Cancer Commun, 1989. **1**(2): p. 141-4.
117. Stromskaia, T.P., et al., *[Functional activity and expression of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia]*. Ter Arkh, 2001. **73**(7): p. 20-5.
118. Carter, A., et al., *Cells from chronic myelogenous leukaemia patients at presentation exhibit multidrug resistance not mediated by either MDR1 or MRP1*. Br J Haematol, 2001. **114**(3): p. 581-90.

119. Damiani, D., et al., *P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2002. **116**(3): p. 519-27.
120. Tafuri, A., et al., *MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. **100**(3): p. 974-981.
121. Woerden, N.L., et al., *In vitro drug resistance profile of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia is heterogeneous and related to age: A report of the Dutch and German Leukemia Study Groups*. Med Pediatr Oncol, 2002. **38**(6): p. 379-386.
122. Sukhai, M. and M. Piquette-Miller, *Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals*. J Pharm Pharm Sci, 2000. **3**(2): p. 268-80.
123. Cole, S.P., et al., *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. Science, 1992. **258**(5088): p. 1650-4.
124. Cole, S.P. and R.G. Deeley, *Multidrug resistance-associated protein: sequence correction*. Science, 1993. **260**(5110): p. 879.
125. Hipfner, D.R., et al., *Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies*. Cancer Res, 1994. **54**(22): p. 5788-92.
126. Barrand, M.A., et al., *Localisation of the multidrug resistance-associated protein, MRP, in resistant large-cell lung tumour cells*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(10): p. 1725-9.
127. Van Luyn, M.J., et al., *Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1*. Int J Cancer, 1998. **76**(1): p. 55-62.
128. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(16): p. 1295-302.
129. Bakos, E., et al., *Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12322-6.
130. Jedlitschky, G., et al., *ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4833-6.
131. Muller, M., et al., *Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 13033-7.
132. Hooijberg, J.H., et al., *Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2*. Cancer Res, 1999. **59**(11): p. 2532-5.
133. Jedlitschky, G., et al., *Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. Cancer Res, 1996. **56**(5): p. 988-94.
134. Hipfner, D.R., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 359-76.

135. Barnouin, K., et al., *Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione*. Br J Cancer, 1998. **77**(2): p. 201-9.
136. Loe, D.W., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5130-6.
137. Taguchi, Y., et al., *Anti-cancer drugs and glutathione stimulate vanadate-induced trapping of nucleotide in multidrug resistance-associated protein (MRP)*. FEBS Lett, 1997. **401**(1): p. 11-4.
138. Borst, P., et al., *The multidrug resistance protein family*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 347-57.
139. Morrow, C.S., et al., *Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline 1-oxide toxicity*. Carcinogenesis, 1998. **19**(1): p. 109-15.
140. Slapak, C.A., et al., *Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in vincristine but not doxorubicin-selected multidrug-resistant murine erythroleukemia cells*. Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5607-13.
141. Brock, I., et al., *Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and mdr1 and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 1995. **55**(3): p. 459-62.
142. Loe, D.W., et al., *Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9675-82.
143. Hollo, Z., et al., *Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells*. FEBS Lett, 1996. **383**(1-2): p. 99-104.
144. Cole, S.P. and R.G. Deeley, *Multidrug resistance associated with overexpression of MRP*. Cancer Treat Res, 1996. **87**: p. 39-62.
145. Berger, W., et al., *Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and chemoresistance of human non-small-cell lung cancer cells*. Int J Cancer, 1997. **73**(1): p. 84-93.
146. Dolfini, E., et al., *Characterization of a clonal human colon adenocarcinoma line intrinsically resistant to doxorubicin*. Br J Cancer, 1997. **76**(1): p. 67-76.
147. Norris, M.D., et al., *Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma*. Eur J Cancer, 1997. **33**(12): p. 1911-6.
148. Kuss, B.J., et al., *Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications*. Lancet, 1994. **343**(8912): p. 1531-4.

149. Ohno, N., et al., *Prognostic significance of multidrug resistance protein in adult T-cell leukemia*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3120-6.
150. Legrand, O., et al., *Both Pgp and MRP1 activities using calcein-AM contribute to drug resistance in AML*. Adv Exp Med Biol, 1999. **457**: p. 161-75.
151. Leith, C.P., et al., *Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study*. Blood, 1999. **94**(3): p. 1086-99.
152. Filipits, M., et al., *Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis*. Leukemia, 2000. **14**(1): p. 68-76.
153. Wang, Q. and W.T. Beck, *Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53*. Cancer Res, 1998. **58**(24): p. 5762-9.
154. Sullivan, G.F., et al., *Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1261-7.
155. Ikegami, Y., et al., *Induction of MRP1 and gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression by interleukin 1beta is mediated by nitric oxide-related signalings in human colorectal cancer cells*. J Cell Physiol, 2000. **185**(2): p. 293-301.
156. Gomi, A., et al., *Transient induction of the MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea in human glioma cells*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5292-9.
157. Oude Elferink, R.P., et al., *Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 215-68.
158. Ishikawa, T., et al., *ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 19279-86.
159. Paulusma, C.C., et al., *A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 1997. **25**(6): p. 1539-42.
160. Kool, M., et al., *Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3537-47.
161. Schaub, T.P., et al., *Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1159-69.
162. Cui, Y., et al., *Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(5): p. 929-37.

163. Evers, R., et al., *Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport.* Br J Cancer, 2000. **83**(3): p. 366-74.
164. Okabe, M., et al., *Establishment and characterization of a cell line, TOM-1, derived from a patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia.* Blood, 1987. **69**(4): p. 990-8.
165. Clark, S.S., et al., *Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL).* Science, 1988. **239**(4841 Pt 1): p. 775-7.
166. Pegoraro, L., et al., *Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173).* J Natl Cancer Inst, 1983. **70**(3): p. 447-53.
167. Stein, U., et al., *In situ RT-PCR using fluorescence-labeled primers.* Biotechniques, 1997. **23**(2): p. 194-5, 198.
168. Stein, U., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP.* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(11): p. 807-13.
169. Den Boer, M.L., et al., *Optimal immunocytochemical and flow cytometric detection of P-gp, MRP and LRP in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1997. **11**(7): p. 1078-85.
170. Feller, N., et al., *Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry.* Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 543-9.
171. Homolya, L., et al., *Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein.* J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21493-6.
172. Legrand, O., et al., *Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients.* Blood, 1998. **91**(12): p. 4480-8.
173. Evers, R., et al., *Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA.* J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1310-9.
174. Homolya, L., et al., *A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells.* Br J Cancer, 1996. **73**(7): p. 849-55.
175. Hollo, Z., et al., *Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1.* Anticancer Res, 1998. **18**(4C): p. 2981-7.
176. Smith, A.J., et al., *Availability of PSC833, a substrate and inhibitor of P-glycoproteins, in various concentrations of serum.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(15): p. 1161-6.
177. Sumizawa, T., et al., *Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated drug resistance by the pyridine analog PAK-104P.* Mol Pharmacol, 1997. **51**(3): p. 399-405.
178. Amarante-Mendes, G.P., et al., *Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL.* Oncogene, 1998. **16**(11): p. 1383-90.

179. Bedi, A., et al., *BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents*. Blood, 1995. **86**(3): p. 1148-58.
180. McGahon, A., et al., *BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death*. Blood, 1994. **83**(5): p. 1179-87.
181. Donato, N.J., et al., *Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+) human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2846-53.
182. Kauffmann, H.M., et al., *Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression*. Toxicology, 2002. **171**(2-3): p. 137-46.
183. Hirrlinger, J., et al., *The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress*. J Neurochem, 2001. **76**(2): p. 627-36.
184. Prechtel, S., et al., *The multidrug resistance protein 1: a functionally important activation marker for murine Th1 cells*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 754-61.
185. Wang, W.L., et al., *Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571*. Oncogene, 2000. **19**(31): p. 3521-8.
186. Sattler, M., et al., *The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24273-8.
187. den Boer, M.L., et al., *Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia*. Blood, 1998. **91**(6): p. 2092-8.
188. Flens, M.J., et al., *Tissue distribution of the multidrug resistance protein*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1237-47.
189. Wallstab, A., et al., *Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918*. Br J Cancer, 1999. **79**(7-8): p. 1053-60.
190. Watkins, P.B., *The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **27**(2-3): p. 161-170.
191. Cohen, M.H., et al., *Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 935-42.
192. Mayer, U., et al., *Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(5): p. 1038-44.
193. Sadeque, A.J., et al., *Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(3): p. 231-7.

194. Ayrton, A. and P. Morgan, *Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion*. *Xenobiotica*, 2001. **31**(8-9): p. 469-97.
195. Graham, S.M., et al., *Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 319-25.
196. Broxterman, H.J., J. Lankelma, and H.M. Pinedo, *How to probe clinical tumour samples for P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(6): p. 1024-33.
197. Beck, W.T. and T.M. Grogan, *Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins*. *Leukemia*, 1997. **11**(7): p. 1107-9.
198. Szakacs, G., et al., *Diagnostics of multidrug resistance in cancer*. *Pathol Oncol Res*, 1998. **4**(4): p. 251-7.
199. Lamy, T., et al., *Multi-drug resistance (MDR) activity in acute leukemia determined by rhodamine 123 efflux assay*. *Leukemia*, 1995. **9**(9): p. 1549-55.
200. Del Poeta, G., et al., *Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(5): p. 1997-2004.
201. Martinez, A., et al., *Functional expression of MDR-1 in acute myeloid leukemia: correlation with the clinical-biological, immunophenotypical, and prognostic disease characteristics*. *Ann Hematol*, 1997. **75**(3): p. 81-6.
202. Wattel, E., et al., *Expression of the multidrug resistance P glycoprotein in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia: absence of correlation with response to treatment*. *Leukemia*, 1995. **9**(11): p. 1870-4.
203. Dhooge, C., et al., *P-glycoprotein is an independent prognostic factor predicting relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a 6-year prospective study*. *Br J Haematol*, 1999. **105**(3): p. 676-83.
204. Allen, J.D., et al., *Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance*. *Cancer Res*, 2000. **60**(20): p. 5761-6.
205. Hegedues T., et al., *Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporters proteins, MDR1 and MRP1*. *Biochim Biophys Acta* **1587** (2002): 318-25.
206. Takayama N., et al., *Imatinib mesylate has limited activity against the central nervous system involvement of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia due to poor penetration into cerebrospinal fluid*. *Br. J. Haematol.* 2002, **119**: p106-8.

9 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. D. Hoelzer danke ich für das Interesse an der vorliegenden Arbeit und für die Möglichkeit, diese in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn PD. Dr. med. O. G. Ottmann möchte ich herzlich danken für die Anleitung und das hohe mass an Eigenständigkeit das er mir gewährt hat. Zudem möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und Vorschläge und für die Zeit und Mühe bedanken.

Bei Dr. R. Evers möchte ich mich für die vielen Ratschläge und Ideen danken und für die Möglichkeit in seinem Labor im Georg-Speyer Haus zu arbeiten. Die vielen Anregungen und seine Expertise sind mir eine sehr große Hilfe gewesen.

Für das Anlernen in den ersten Wochen möchte ich T. Wenzel danken und Herrn Dr. med. M. Ruthardt für die geduldige Diskusion methodischer Probleme.

Fr. Dr. T. Roßmanith danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für die vielen schönen Pausen, die ich mit Ihr verbringen durfte.

Ich danke den Mitarbeitern der Labore i40, i44, i45 und den Mitarbeitern von Herrn Dr. Evers für die Zusammenarbeit und für die Hilfe bei experimentellen Fragen.

Zudem danke ich meiner Schwester Katja und meinen Eltern für den Ansporn.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hansen
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 27.03.1972
Geburtsort: Frankfurt a.M.
Wohnort: Adlerflychtstr. 5, 60318 Frankfurt a.M.
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1978-1982 Waldenserschule Mörfelden-Walldorf
1982-1984 Bertha von Suttner Gesamtschule Mörfelden-Walldorf
1984-1991 Prälat Diehl Gymnasium Groß-Gerau

Studium:

10/92-9/93 Studium der Architektur, TH Darmstadt
10/93-11/99 Studium der Humanmedizin an der J.W. Goethe-Universität,
Frankfurt am Main
09/95 Ärztliche Vorprüfung
08/96 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/98 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/98-9/99 Praktisches Jahr am Uniklinikum Frankfurt, Wahlfach Pädiatrie
11/99 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02.00-02.03 Promotion

Ärztliche Weiterbildung:

03/01-09/02 Arzt im Praktikum am Clementine Kinderhospital, Frankfurt a.M.
seit 11/02 Ass.-Arzt am Clementine Kinderhospital

Frankfurt, Januar 2003

11 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen zu Veränderungen des Zytostatika-Resistenz Phänotyps bei Philadelphia Chromosom positiven Leukämien unter Imatinib Therapie“

im Zentrum der Inneren Medizin/ Medizinische Klinik III
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. D. Hoelzer und mit Unterstützung durch Herrn PD. Dr. med. O. G. Ottmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, den 05.02.03