

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig - Maximilians – Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Kollaterale Chemosensitivität / - resistenz bei
akuten myeloischen Leukämien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von
Inka Zimmermann
aus Saarbrücken

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Nerl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: P.D. Dr. med. Jan Braess

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

ABKÜRZUNGEN

ABC	- ABC Transporterproteine (Proteinfamilie)
AML	- akute myeloische Leukämie
AML-CG	- AML Cooperative Group – deutsche Studiengruppe zur Therapie der AML
AML/ETO	- Fusionstranskript
AML M0	- Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung
AML M1	- Myeloblastenleukämie mit geringer Ausreifung
AML M2	- Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
AML M3	- Promyelozytenleukämie
AML M3v	- hypogranuläre Variante der AML M3
AML M4	- Myelomonozytäre Leukämie
AML M4eo	- eosinophile Variante der AML M4
AML M5	- Monozytenleukämie
AML M5a	- Monoblastenleukämie
AML M5b	- ausreifende Monozytenleukämie
AML M6	- Erythroleukämie
AML M7	- Megakaryoblastenleukämie
AraC	- Cytosin Arabinosid
AraCDP	- AraC Diphosphat
AraCMP	- AraC Monophosphat
AraCTP	- AraC Triphosphat
AraU	- Uracil Arabinosid
AraUMP	- AraU Monophosphat
ARC	- Cytosin Arabinosid
ATP	- Adenosintriphosphat
ATRA	- All-Trans-Retinolsäure
BCRP	- breast cancer related protein
CBF β /MYH11	- Fusionsgen
CD	- cluster designation (Oberflächenprotein)
CO ₂	- Kohlendioxid
CR	- komplette Remission
dCK	- Desoxycytidinkinase
DNA	- desoxyribonucleotide acid
DNR	- Daunorubicin

FAB	- French-American-British Klassifikation der AML auf morphologischer Basis
FCS	- fetal calf serum
FICOLL	- Name einer Zellisierungslösung
FISH	- Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
GAG	- giemsa bands by acetic bands
G-CSF	- Granulozyten colony-stimulating-factor
GM-CSF	- Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating-factor
IDA	- Idarubicin
IMDM	- Iscove's modified Dulbecco Medium
Inv(x)	- Inversion (Zytogenetik)
ISCN	- International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KMT	- Knochenmarkstransplantation
LC-50%	- letale Konzentration 50%
log	- Logarithmus zur Basis 10
MDR 1	- multiple drug resistance gene 1
mg	- Milligramm
MIT	- Mitoxantron
ml	- Milliliter
mM	- Millimolar
MRD	- minimal residual disease
MRP	- multiple drug resistance related protein
MW	- Mittelwert
MXR	- Protein aus der Familie der ABC Transporter
µg	- Mikrogramm
µl	- Mikroliter
n	- Fallzahl
nm	- Nanometer
p450 3A4	- hepatisches Cytochrom
PBS	- phosphate buffered saline
PCR	- polymerase chain reaction
PML/RAR	- Fusionstranskript
RS	- Reduktase System
TOP	- Topotecan
t (x;y)	- Translokation (Zytogenetik)
VC	- Variationskoeffizient
VP16	- Etoposid

- WST-1 - Name eines Formazan Reagenzes
- WHO - world health organization
- Z_B - (Zeit-) bedingter Faktor für die B-Steilheit bei einer Expositionszeitänderung
- Z_{LC} - (Zeit-) bedingter Faktor für die LC-50% bei einer Expositionszeitänderung

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie, Klassifikation, Diagnose und klinisches Erscheinungsbild der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)	1
1.2. Therapie und Prognosefaktoren der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)	3
1.3. Therapieresistenz – allgemeine Überlegungen	7
1.3.1. Therapieresistenz – substanzspezifische Mechanismen	9
1.3.1.1. Cytosin Arabinosid (AraC)	9
1.3.1.2. Daunorubicin	10
1.3.1.3. Idarubicin	11
1.3.1.4. Mitoxantron	12
1.3.1.5. Etoposid	12
1.3.1.6. Topotecan	13
1.3.2. Therapieresistenz – zelluläre „Drug-Response“	14
2. FRAGESTELLUNG	17
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. Probengewinnung und Aufarbeitung	19
3.1.1. Zellisolierung	19
3.2. Zytogenetische Analyse	20
3.3. Zytotoxizitätsanalysen mittels WST – 1 Assay	20
3.4. Auswertung	21
4. PATIENTEN	25
5. ERGEBNISSE	26
5.1. Biometrische Daten der Patientengruppe	26
5.2. Zytogenetische Befunde	26
5.3. Chemosensitivität – LC-50% Bestimmungen	27
5.3.1. Chemosensitivität – Zeitabhängigkeit der LC-50%	29
5.3.2. Korrelation der LC-50% Werte	30
5.4. Chemosensitivität – Responsehomogenität / B-Slopes- Bestimmungen	31

5.4.1. Chemosensitivität - Zeitabhängigkeit der B-Steilheit (Responsehomogenität)	34
5.4.2. Korrelation der B-Werte	35
5.5. Korrelation von LC-50% und B-Werte bei einzelnen Substanzen	37
5.6. Relevanz der Zytogenetik für die LC-50%	38
6. DISKUSSION	39
7. ZUSAMMENFASSUNG	48
8. ANHANG - ROHDATEN	49
9. LITERATURVERZEICHNIS	56
10. CURRICULUM VITAE	66
DANKSAGUNG	67

1. EINLEITUNG

1.1. Epidemiologie, Klassifikation, Diagnose und klinisches Erscheinungsbild der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)

Die myeloischen Leukämien sind eine heterogene Gruppe an Erkrankungen, die charakterisiert sind durch die Infiltration des peripheren Blutes, des Knochenmarkes und anderer Gewebe durch neoplastische Zellen des hämatopoetischen Systems. Diese neoplastischen Zellen sind myeloide Vorläuferzellen, die in ihrer Ausreifung blockiert sind. Die gesunde Hämatopoese kann nicht mehr suffizient erfolgen, und die Folgen sind Thrombozytopenie, Granulozytopenie und / oder Anämie, mitbedingt durch die Infiltration des Knochenmarkes.

Die Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie beträgt etwa 2,4 - 4 Erkrankte auf 100.000 Einwohner (Bishop, 1997, Löwenberg *et al.*, 1999). In den letzten zwanzig Jahren änderte sich die Inzidenz der AML nicht signifikant. Die Inzidenz der AML steigt mit dem Alter. Unter 65 Jahren beträgt sie 1,3 auf 100.000 Einwohner, und über 65 Jahren beträgt sie 12,6 auf 100.000 Einwohner (Löwenberg *et al.*, 1999). Zwischen 65 und 70 Jahren liegt auch das mediane Erkrankungsalter der Patienten (Hiddemann *et al.*, 1999).

Die Klassifikation der AML basiert auf der Morphologie, auf zytochemischen Befunden, der Immunphänotypisierung, sowie auf zytogenetischen und molekularbiologischen Faktoren.

Die Diagnose einer AML wird zytomorphologisch durch eine Knochenmarksaspiration, vorzugsweise aus dem Beckenkamm, gestellt. Um die Diagnose der AML zu stellen, müssen nach der sogenannten French-American-British-Klassifikation mehr als 30% blastärer Zellen im Knochenmark vorhanden sein (Löwenberg *et al.*, 1999); nach der aktuellen Definition der WHO müssen mehr als 20% Blasten vorhanden sein.

Mittels der Morphologie und der histochemischen Befunde (Peroxidase- und Esterase-Reaktionen) erfolgt die Einteilung in die French-American-British-Klassifikation (FAB) der AML. Diese unterscheidet 8 Haupttypen, M0 bis M7. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um folgende Subtypen: AML M0 (Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung), AML M1 (Myeloblastenleukämie mit geringer Ausreifung), AML M2 (Myeloblastenleukämie mit Ausreifung), AML M3 (Promyelozytenleukämie), AML M4 (Myelomonozytäre Leukämie), AML M5 (Monozytenleukämie), AML M6 (Erythroleukämie) sowie die AML M7 (Megakaryoblastenleukämie). Einzelne Subtypen werden in weitere Untergruppen unterteilt. Von der AML M3 existiert eine hypogranuläre Variante, M3v. Von der AML M4 existiert eine Variante, die durch das Vorliegen von mehr als 3% abnormen Eosinophilen gekennzeichnet ist, M4eo. AML M5 lässt sich in zwei weitere Typen einteilen, die AML M5a (Monoblastenleukämie) und die AML M5b (ausreifende Monozytenleukämie).

Die Immunphänotypisierung als ein weiteres wichtiges diagnostisches Mittel ermöglicht anhand der Expression von Oberflächenmarkern die Zuordnung der Blasten zur myeloischen

oder lymphatischen Zellreihe. Die Ergebnisse sind sowohl für die Diagnostik als auch für die Prognose von Bedeutung. Die AML M0 kann zum Beispiel durch das Auftreten der Oberflächenantigene CD13 oder CD33 diagnostiziert werden, die AML M7 kann durch die Anwesenheit von CD41 abgegrenzt werden.

Ein weiteres diagnostisches Mittel, welches derzeit auch als der wichtigste Prognoseparameter in der AML gilt, ist die Karyotypisierung der AML-Blasten. Chromosomale Veränderungen in den malignen Blasten lassen sich bei circa 60% aller AML-Fälle nachweisen (Keating *et al.*, 1988, Mrozek *et al.*, 1997, Bloomfield *et al.*, 1998). Lediglich zwei chromosomale Aberrationen sind eindeutig mit einer spezifischen FAB-Gruppe assoziiert: Die Translokation t(15;17)(q22;q11-12) ist mit der AML M3 (Lo Coco *et al.*, 1998) und die Inversion inv(16)(p13q22) ist mit der AML M4eo assoziiert. Einige chromosomale Aberrationen sind lediglich hauptsächlich mit einer FAB-Gruppe assoziiert, die Translokation t(8;21)(q22;q22) mit der AML M2 und die Translokation t(9;11)(p22;q23) mit der AML M5.

Die zytogenetischen Abnormalitäten waren Ausgangspunkt für weiterführende molekularbiologischen Studien, bei denen im Bereich der Bruchpunkte Transfusionsgene entdeckt wurden, die für die Leukämiegenese eine zentrale Rolle spielen. Das PML/RAR α Fusionstranskript der Translokation t(15;17), welche sich bei dem FAB Subtyp M3, der Promyelozytenleukämie findet, verhindert die Ausdifferenzierung der Blasten zu Granulozyten. Die Folge ist, dass die natürliche Entwicklung zum Granulozyten, die letztlich in der Apoptose enden sollte, durch einen dominant negativen Effekt auf das *wildtype* RAR α Protein verhindert wird. Es kommt zur Akkumulation nicht vollständig ausgereifter promyelozytärer Vorläuferzellen. Das Therapeutikum All-Trans-Retinolsäure interagiert mit diesem Transfusionsprotein und ermöglicht somit wieder die natürliche Ausreifung der Granulozyten (Warrell *et al.*, 1993). ATRA ist zentral in der Therapie der AML M3 (Kern *et al.*, 2000).

Ein weiteres Beispiel ist das CBF β /MYH11 Fusionsprotein, das sich bei der Inversion inv(16) findet. CBF β /MYH 11 findet man bei der AML M4eo (Löwenberg *et al.*, 1999). Ähnlich verhält es sich mit dem AML/ETO Fusionstranskript. Es findet sich bei der Translokation t(8;21), und bei circa 40% aller AML M2 Fälle (Löwenberg *et al.*, 1999). Weitere solche Fusionstranskripte sind derzeit noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Unklar ist noch, inwiefern diese Fusionsproteine für einen Ausreifungsblock verantwortlich sind. Ebenso unklar ist ihre Funktion bei der Ausreifung zu einem bestimmten Phänotyp.

Das klinische Erscheinungsbild und die Symptome der AML sind häufig unspezifisch, beginnen abrupt oder zeigen manchmal einen langsameren protrahierten Verlauf. Sie sind Folge der Anämie, Leukozytose, Leukopenie, der leukozytären Dysfunktion und/oder der

Thrombozytopenie. Typischerweise klagen die Patienten über Müdigkeit, Leistungsschwäche und Gewichtsverlust. Weitere Symptome sind Fieber, Infektionen, abnorme Blutungsneigung, Blässe und Dyspnoe. Der körperliche Untersuchungsbefund ist häufig unspezifisch, er ergibt mitunter eine Splenomegalie, Hepatomegalie und Lymphadenopathie, bedingt durch die leukämische Infiltration bestimmter Organe. Charakteristisch für die Subtypen M4 und M5 ist eine leukämische Infiltration der Gingiva, der Haut (Leukämia cutis), des Bindegewebes oder der Meningen.

Die Laborbefunde ergeben häufig eine normozytäre, normochrome Anämie. Die verminderte Erythropoese ist Folge der Infiltration des Knochenmarks mit leukämischen Blasten. Gleichzeitig wird die Anämie durch die häufig erhöhte Blutungsneigung unterhalten.

Eine Leukozytose von circa 15.000 Leukozyten/ μ l wird bei ungefähr 40% der Patienten gefunden, ebenso viele Patienten zeigen Leukozytenzahlen von weniger als 5000/ μ l, und ungefähr 20% haben mehr als 100.000 Leukozyten/ μ l im peripheren Blut. Diese Hyperleukozytose kann zur Leukostase mit zerebro-vaskulärer und okulärer Symptomatik führen.

Thrombozytenzahlen unter 100.000/ μ l werden bei Diagnosestellung bei circa 75% der Patienten gefunden, 25% der Patienten weisen Thrombozytenzahlen unter 25.000/ μ l auf. Es werden sowohl morphologische als auch funktionelle Abnormalitäten werden gefunden.

1.2. Therapie und Prognosefaktoren der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)

Die Therapie der akuten myeloischen Leukämie hat in den letzten zwei Jahrzehnten aufgrund besserer supportiver Maßnahmen und der Therapieintensivierung inklusive der allogenen Knochenmarkstransplantation große Fortschritte erzielt. Durch die Standardinduktionstherapie erreichen 52-72% der Patienten eine komplette Remission, wie in großen randomisierten multizentrischen Studien gezeigt wurde (Bishop *et al.*, 1997, Preisler *et al.*, 1987). Der Standardinduktionstherapie folgt immer eine Postremissionstherapie zur Rezidivverhinderung. Dennoch entwickelt ein erheblicher Anteil der Patienten ein Rezidiv und die Dauer der kompletten Remission liegt im Mittel nur bei 12 Monaten (Bishop *et al.*, 1996). Bei der primär refraktären AML ist die Situation noch ungünstiger, da die Blasten sich hier schon a priori als resistent gegenüber der Induktionstherapie erweisen und häufig auch dann noch therapierefraktär bleiben, wenn zu anderen Therapieregimen mit anderen Substanzen gewechselt wird. Deshalb bleiben die Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzklassen und innerhalb der verschiedenen Substanzklassen ein Hauptproblem bei der Behandlung der AML.

Die Behandlung der AML erfolgt in der Regel ohne Verzug, da die Prognose ohne Therapie infaust ist. Sie sollte nach Möglichkeit in hämatologischen Zentren und im Rahmen von Studien erfolgen.

Die Ziele, die von allen Therapieregimen verfolgt werden, sind einerseits das Erreichen einer kompletten Remission, zytomorphologisch definiert als < 5% Blasten im Knochenmark und die Erholung des peripheren Blutbilds mindestens vier Wochen lang, mit mehr als 100.000 Thrombozyten/ μ l und mehr als 1500 Granulozyten/ μ l. Ein weiteres wichtiges Therapieziel ist das Verhindern eines Rezidivs durch die Postinduktionstherapie.

Induktionstherapie: Das bekannteste und am häufigsten benutzte Behandlungsprotokoll für Patienten mit AML (eine Ausnahme bildet der FAB-Subtyp M3) besteht aus einer Kombination von Cytosin Arabinosid (AraC) und einem Anthrazyklin. AraC wird in der Regel als Dauerinfusion in einer täglichen Dosis von 100-200 mg/m² Körperoberfläche sieben Tage lang verabreicht. Die Anthrazyklintherapie besteht in der Regel aus Daunorubicin, intravenös verabreicht in einer täglichen Dosis von 45 mg/m² Körperoberfläche am Tag 1, 2 und 3 (7+3 Protokoll). Idarubicin, ein relativ neues Anthrazyklin, in einer täglichen Dosis von 12 oder 13 mg/m² Körperoberfläche über 3 Tage in Verbindung mit einer 7 tägigen AraC Infusion gegeben, soll im Vergleich zu Daunorubicin die komplette Remissionsrate, sowie das Überleben zumindest bei jüngeren Patienten mit de novo AML verbessern (Wheatley *et al.*, 1995).

In der Behandlung der rezidierten oder refraktären AML hat sich die sogenannte Hochdosis AraC Therapie etabliert. Hier wird AraC in Dosen von 1-3 g/m² alle zwölf Stunden über 3 Tage in Kombination mit Amsacrin, Mitoxantron, Idarubicin oder Etoposid gegeben (Champlin *et al.*, 1987, Hiddemann *et al.*, 1990, Bishop *et al.*, 1997).

Postinduktionstherapie: Die Postremissionstherapie wurde mit dem Ziel, alle nach der Induktionstherapie verbliebenen leukämischen Zellen zu eliminieren, eingeführt. Sie soll Rezidive verhindern und das Überleben verlängern. Es gibt vier Konsolidierungsverfahren: die intensivierte Chemotherapie im konventionellen Sinne, die Hochdosistherapie mit autologer Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation und die allogene Knochenmarkstransplantation von einem HLA-passendem verwandten oder unverwandten Spender.

Am häufigsten wird nach wie vor die Chemotherapie durchgeführt. Etabliert hat sich die Integration von Hochdosis AraC Regimen, da sie in der Postremissionstherapie und in der Therapie der rezidivierenden und refraktären AML der Standardtherapie signifikant überlegen sind (Herzig *et al.*, 1983, Peters *et al.*, 1988, Hiddemann, 1991, Fopp *et al.*, 1997). Bei der autologen Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation erhalten die Patienten eigene hämatopoetische Stammzellen, die während der Remission entnommen und gelagert wurden. Die autologe Transplantation nach intensiver myeloablativer Radiochemotherapie bietet sich an, wenn kein geeigneter Spender zur Verfügung steht. In Studien konnte gezeigt werden, dass in dieser Weise behandelte Patienten ein reduziertes Rezidivrisiko besaßen,

die Überlebensrate im Vergleich zur Chemotherapie aber nicht erhöht war, mitbedingt durch eine höhere Mortalität (Burnett *et al.*, 1998, Harousseau *et al.*, 1997, Zittoun *et al.*, 1995).

Die allogene Knochenmarkstransplantation hat seit ihrer Einführung vor 25 Jahren eine Heilungsrate von 50-60% erreicht (Thomas *et al.*, 1979, Appelbaum *et al.*, 1984, Cassilet *et al.*, 1998). Sie zeigt damit unter den Konsolidierungstherapien die stärkste antileukämische Potenz. Allerdings beträgt die Altersobergrenze der Patienten für eine allogene Transplantation von einem verwandten Spender 65 Jahre, von einem unverwandten Spender 55 Jahre. Dennoch, die Toxizität der myeloablativen Radiochemotherapie ist erheblich, die Nebenwirkungen und Komplikationen dieser Therapiemodalität, wie beispielsweise die venöse Okklusionskrankheit, die graft-versus-host-Erkrankung und Infektionen, bedingt durch die Immunsuppression, relativieren durch eine hohe therapiebedingte Mortalität den hohen antileukämischen Effekt.

Supportive Maßnahmen: Zu den supportiven Maßnahmen zählen im Wesentlichen die antiinfektiöse Prophylaxe, die frühzeitige antibiotische Therapie von Infektionen sowie die Therapie von Thrombozytopenien und Anämien mittels Transfusionen von Blut oder Blutkomponenten. Ferner kann der Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie der Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor GM-CSF hinzugerechnet werden.

Ein wichtiger prognostischer Faktor in Bezug auf ein verlängertes Überleben stellt das Erreichen und die Dauer der kompletten Remission dar. Diese wiederum hängt von mehreren Faktoren ab. Das biologische Alter bei Erstdiagnose ist einer der wesentlichen Faktoren. Junge Patienten, definiert als jünger als 60 Jahre, sprechen zu 75% auf eine Induktionstherapie an, die 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 35-50% (Wiernik *et al.*, 1992, Cassileth *et al.*, 1998). Ältere Patienten über 60 Jahre sprechen nur noch zu 45-55% auf eine Induktionstherapie an, und ihre 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 10% (Löwenberg *et al.*, 1998, Hiddemann *et al.*, 1999). Das liegt am reduzierten Allgemeinzustand der Patienten, sowie am vermehrten Auftreten ungünstiger Karyotypen und sekundärer Leukämien, beispielsweise nach vorangegangenem Myelodysplastischen Syndrom.

Neben dem Alter des Patienten hat sich der Karyotyp des malignen Klons als entscheidender prognostischer Faktor erwiesen. Circa 60% aller AML Patienten weisen chromosomale Veränderungen in den leukämischen Blasten auf, entweder numerischer und/oder struktureller Natur (Keating *et al.*, 1988, Mrozek *et al.*, 1997, Bloomfeld *et al.*, 1998). Abbildung 1. zeigt das Gesamtüberleben einer großen Gruppe einheitlich im Rahmen der Therapiestudien der AML-CG behandelten Patienten aufgeteilt nach zytogenetisch definierten prognostischen Subgruppen.

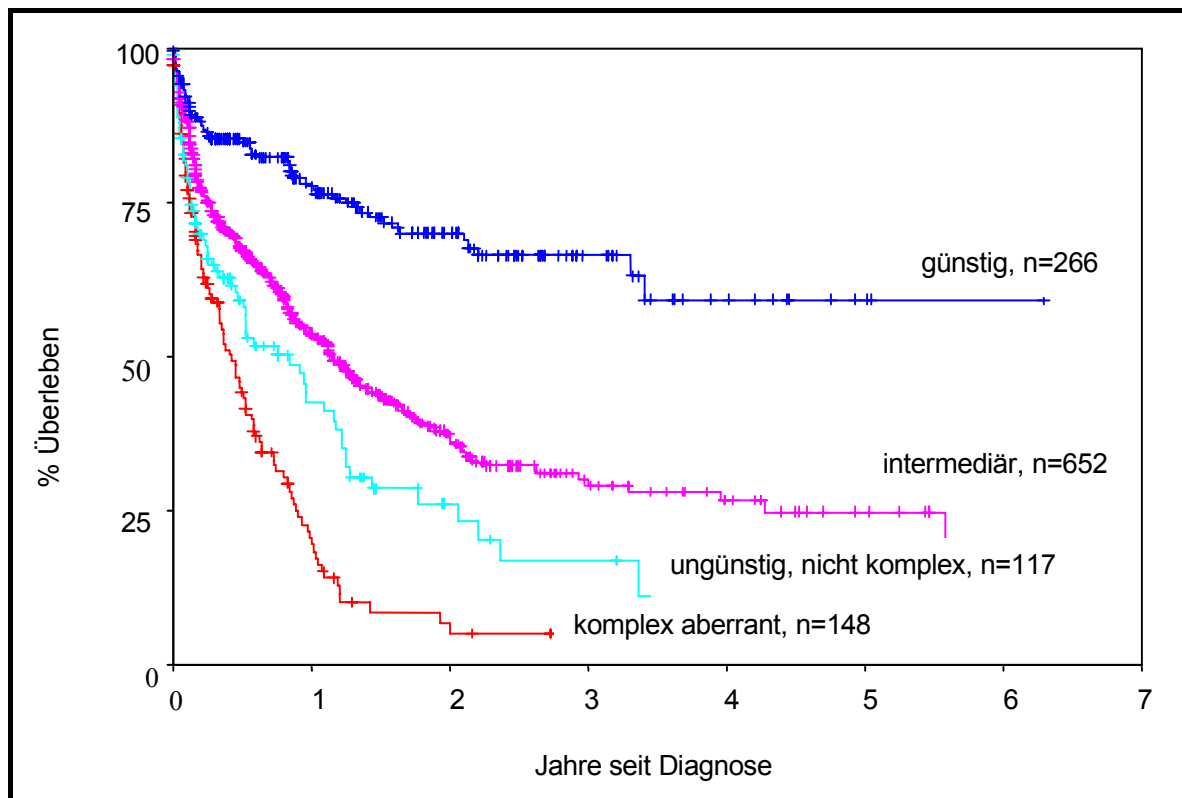


Abbildung 1. Kaplan Meier Kurve des Gesamtüberlebens der in der Therapiestudie der AML CG behandelten Patienten, aufgeteilt in prognostische Subgruppen anhand ihres Karyotypen (günstige, intermediäre und ungünstige prognostische Subgruppe). Die Darstellung zeigt die hochsignifikant unterschiedlichen klinischen Verläufe dieser biologisch definierten Subgruppen unter einer identischen Therapie ($p < 0,01$). Die Gruppe der ungünstigen prognostischen Subgruppe wurde unterteilt in den komplex aberranten Karyotypen und in den nicht komplex aberranten Karyotypen, um den außerordentlich schlechten klinischen Verlauf der ersteren Gruppe zu zeigen (persönliche Mitteilung, Frau Dr.med. C. Schoch, Labor für Leukämiediagnostik, Klinikum Großhadern, München).

Die AML Subgruppe mit der günstigsten Prognose ist gekennzeichnet durch den Karyotypen mit der Translokation t(8;21) oder der Inversion inv(16) und den entsprechenden Fusionstranskripten. Ebenfalls zu dieser Subgruppe zählt die Translokation t(15;17) und sein Fusionstranskript. Die AML Subgruppe mit der ungünstigsten Prognose stellen Karyotypen dar mit Veränderungen der Chromosomen 5 oder 7 (d.h. Monosomien oder der Verlust des langen Armes: 5q-, 7q-), eine Inversion inv(3), eine Beteiligung der Bande q23 auf Chromosom 11 (11q23 Aberrationen) oder ein komplex aberranter Karyotyp (3 oder mehr numerische oder strukturelle Aberrationen, ohne die Veränderungen, die zur prognostisch günstigen Gruppe zählen). Patienten, die einen komplex aberranten Karyotypen aufweisen, erreichen mit intensiver Therapie nur CR Raten von ca. 30-40% mit einem Langzeitüberleben von 0% (Schoch *et al.*, 2001). Die AML Subgruppe mit einer intermediären Prognose stellen normale Karyotypen dar und Karyotypen mit anderen hier

nicht aufgeführten Aberrationen, letztere werden häufig auch als „zytogenetische Aberrationen unbekannter Signifikanz“ bezeichnet.

Eine weitere große Gruppe mit einer schlechten Prognose stellen die sekundären Leukämien und die Rezidive dar (Löwenberg *et al.*, 1999). Eine sekundäre Leukämie ist definiert als die Entwicklung einer AML aus einem myelodysplastischen Syndrom, einer Polyzythämia Vera oder seltener aus einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie. Ferner rechnet man zu den sekundären Leukämien die Entwicklung einer AML nach früherer Exposition mit mutagenen Substanzen oder nach Bestrahlung, beispielsweise zur Therapie eines Malignoms. Ein Rezidiv ist definiert als das Wiederauftreten leukämischer Blasten (mehr als 5% Blasten im Knochenmark) nach primär erreichter kompletter Remission (CR). Davon abzugrenzen sind die therapierefraktären Leukämien, bei diesen wird eine CR vor einem erneuten Blastenanstieg nicht erreicht. Auch in solchen Fällen verschlechtert sich die Prognose deutlich (Estey, 2000).

1.3. Therapieresistenz – allgemeine Überlegungen

Mit den neuesten Therapieverfahren erreichen ca. 70 - 80% der Patienten eine CR, was eine Mindestvoraussetzung für ein längeres krankheitsfreies Intervall darstellt (Mayer *et al.*, 1994, Appelbaum *et al.*, 1997, Burnett *et al.*, 1998, Buchner *et al.*, 1999). Ein Problem stellt die kurze Remissionsdauer, sowie das Rezidiv dar. Ungefähr die Hälfte der Patienten, die nach der Induktionstherapie eine CR erreichen konnten, wird ein Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden. Patienten mit einem Rezidiv haben eine sehr schlechte Prognose und können nur in einem geringen Prozentsatz mit einem längerfristigen Überleben rechnen. Die Prognose der Patienten mit einer therapierefraktären AML, die per definitionem keine CR nach Induktionstherapie erreicht, ist extrem schlecht und geht de facto gegen 0% hinsichtlich des Langzeitüberlebens von 5 Jahren. Patienten mit einer therapierefraktären AML scheinen solche therapieresistenten Zellen von Anfang an zu besitzen.

In der Regel liegen im Patienten bei der Diagnosestellung der de novo AML ungefähr 10^{12} Blasten vor. Nach einer erfolgreichen Induktionstherapie, welche zur kompletten Remission führt, liegen in der Regel 10^{10} Blasten vor, also lediglich eine Reduktion um 2-3 Log-Stufen. Diese Reduktion der Tumormasse wird derzeit noch zytomorphologisch festgestellt. Durch sensitivere Methoden, wie die durchflußzytometrische Detektion von Blasten anhand ihres Immunphänotyps oder die PCR, kann eine Reduktion der Tumorzellmasse um 3, maximal 4 Log-Stufen beschrieben werden. (Marcucci *et al.*, 1998, Mitterbauer *et al.*, 1999). Man kann davon ausgehen, dass nach Induktionstherapie noch eine sogenannte minimale Resterkrankung (MRD – minimal residual disease) mit ungefähr 10^9 AML Blasten vorhanden ist.

Kommt es nach einer solchen erfolgreichen Induktionstherapie zu keinen weiteren konsolidierenden Therapiemaßnahmen, so ist die Proliferation der noch vorhandenen

leukämischen Blasten, und damit das Wiederauftreten der AML nur eine Frage der Zeit. Bei diesem wiederauftretendem Zellklon kann es sich phänotypisch um denselben Klon handeln, der bei der Erstmanifestation der AML vorhanden war. In einigen Arbeiten wird beschrieben, dass der sogenannte Rezidivklon sich hinsichtlich des Proliferationsverhaltens und des Resistenzprofils gegen die identische Therapie nicht notwendigerweise von der Zellpopulation unterschied, welche für die Erstmanifestation verantwortlich war (Skipper *et al.*, 1964). Dies würde die These stützen, dass durch die Therapie die maligne Zellpopulation lediglich um 3 bis 4 Log-Stufen reduziert wird. Die restlichen Zellen wären nicht notwendigerweise therapieresistent gewesen, sondern ihr Überleben wäre vielmehr Ausdruck einer nicht auf Null reduzierten Zytoreduktion mit konsekutivem Wachstum einer in ihrer Heterogenität / Homogenität unter Umständen wenig veränderten Zellpopulation.

Dennoch gibt es auch Beschreibungen einer Induktionstherapie mit einem Wiederauftreten einer phänotypisch veränderten Zellpopulation. Die wiederaufgetretene Population zeigt meistens eine deutlich geminderte Chemosensitivität (Estey, 2000).

Zwei Möglichkeiten sind denkbar, wie der Rezidivklon zu seinem veränderten Phänotyp gekommen ist:

Bei der ersten Möglichkeit geht man davon aus, dass es unter den verwendeten zytostatischen Konzentrationen zu einer vermehrten Expression derjenigen Gene kommt, die für die Resistenz verantwortlich sind. Einige Studien beschreiben einen solchen Mechanismus in Form einer Genamplifikation, die auch das Auftreten resistenter Nachkommen erklärt (O'Neill *et al.*, 1998, Morganti *et al.*, 2000). Die Therapieresistenz entwickelt sich demnach unter der Therapie.

Bei der zweiten Möglichkeit geht man davon aus, dass bei der de novo AML eine heterogene Population der leukämischen Zellen vorliegt, und damit auch einzelne therapieresistentere Zellen. Durch die Induktionstherapie wird ein Selektionsdruck auf die sensitiven Zellen ausgeübt, wobei die resistenten Zellen überleben und sich weiter vermehren, was sich klinisch letztendlich in einem Rezidiv äußert.

Neben der absoluten Zellzahl der leukämischen Blasten ist also auch die Heterogenität der Zellpopulation bei der Erstmanifestation der AML ein entscheidendes Kriterium für die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit resistenter Zellen.

Ein weiteres nicht zu vernachlässigendes Kriterium ist die Zeit. Man geht davon aus, dass sich im Laufe der Zeit während der Therapie spontane Mutationen entwickeln. D.h. aus einer nicht resistenten oder wenig resistenten Zellpopulation können sich im Laufe der Zeit durch Mutationen resistente Zellen entwickeln und damit Ursache für ein Rezidiv sein (Goldie *et al.*, 1984). Als Mutagen kann unter anderem die zytotoxische Chemotherapie selbst wirken.

1.3.1. Therapieresistenz – substanzspezifische Mechanismen

In den folgenden Kapiteln werden die 6 zytotoxischen Substanzen beschrieben, die in der Induktions- und Konsolidierungstherapie der akuten myeloischen Leukämie am häufigsten verwendet werden.

1.3.1.1. Cytosin Arabinosid (AraC)

Cytosin Arabinosid (1-β-D-Arabinofuranosylcytosin, AraC, Cytarabin) ist ein Antimetabolit, und das am häufigsten in der Therapie der AML verwendete Agens. Es bildet die Grundlage fast aller derzeit verwendeten Kombinationstherapien. Zunächst wird AraC ATP-abhängig durch einen Nucleosidcarrier in die Zelle transportiert, bei sehr hohen Konzentrationen gelangt AraC auch mittels passiver Diffusion in die Zelle. Intrazellulär wird AraC von dem Enzym Desoxycytidinkinase (dCK) über das Mono- und Di- hin zum Triphosphat (AraCMP, AraCDP, AraCTP) phosphoryliert. Parallel dazu erfolgt eine Deaminierung von AraC, bzw. AraCMP zum nicht zytotoxischen AraU, bzw. AraUMP. Schlüsselenzym hier ist die Cytidineaminase. Die eigentliche zytotoxische Wirkung besitzt der aktive Metabolit AraCTP. AraCTP wird als sogenanntes falsches Substrat in die DNA eingebaut und führt dort zu Strangbrüchen. Zusätzlich hemmt es die DNA Polymerasen α, β und δ und damit die DNA-Replikation und die DNA-Reparatur. Die Wirkung von AraC hängt sehr stark vom Zellzyklusstatus ab.

Damit spielt für die Sensitivität, bzw. Resistenz der Zelle auf AraC ihr jeweiliger Zellzyklusstatus eine entscheidende Rolle. Wenig proliferierende Zellpopulationen sind demnach relativ resistent gegenüber einer Exposition von AraC. Zellen, die sich jedoch in der S-Phase des Zellzyklus, der Replikationsphase befinden, sind demnach relativ sensitiv gegenüber einer AraC Exposition (Braess *et al.*, 2000, Kamikubo *et al.*, 2000). Da AraC einer ausgeprägten Metabolisierung von Seiten der Zelle unterworfen ist, gibt es auch einige pharmakokinetische Ursachen für eine Therapieresistenz. Zunächst kann eine verkürzte Expositionsdauer mit AraC ein entscheidendes Kriterium sein, da die Wahrscheinlichkeit, Zellen in ihrer sensiblen replikativen Phase zu treffen durch eine verkürzte Expositionsdauer verringert wird. Ein erhöhter Abbau des AraC durch die Cytidineaminase zum nicht zytotoxischen AraU stellt auch eine Ursache für eine Therapieresistenz dar. Bei niedrigen Plasmaspiegeln kann die Kapazität des ATP-abhängigen Nucleosidcarrier limitierender Faktor sein, und damit zu niedrigeren intrazellulären AraC Konzentrationen führen. Dass die intrazelluläre AraC-Konzentration die eigentliche zytotoxische Wirkung besitzt, wird durch folgende Beobachtung gestützt: Die intrazellulären AraCTP-Spiegel korrelieren mit klinischen Parametern wie dem Erreichen und der Dauer einer kompletten Remission bei der Behandlung der AML und nicht die AraC-Konzentrationen im Plasma (Preisler *et al.*, 1985). Bei hohen Plasmaspiegeln spielt der Resistenzmechanismus, ausgelöst durch die limitierende Kapazität des Nucleosidcarriers aufgrund der passiven Diffusion von AraC nach

intrazellulär keine Rolle mehr. Ein weiterer wichtiger Faktor der Therapieresistenz stellt das Schlüsselenzym Deoxycytidinkinase dar, welches das AraC zum aktiven Metaboliten Ara-CTP umwandelt. Erniedrigte Mengen des Enzyms dCK führen zu einer geringeren Bildung des aktiven Metaboliten und somit zu geringerer Wirkung (Kakihara *et al.*, 1998, van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2001). Die Aktivität der dCK kann durch Mutationen verändert sein, denkbar ist auch eine negative Rückkopplung durch das CTP oder eine kompetitive Hemmung durch Cytidin. Zusätzlich kann, selbst wenn AraCTP in ausreichenden Mengen und in adäquater Aktivität vorhanden ist, dessen Abbau durch unspezifische Phosphatasen beschleunigt sein. Damit ist eine weitere Ursache einer Therapieresistenz denkbar. Welcher dieser Faktoren oder welche Kombination dieser Faktoren letztendlich für die klinische Resistenz der entscheidende ist, bleibt ungeklärt.

1.3.1.2. Daunorubicin

Daunorubicin gehört zu der Substanzklasse der Anthracycline und ist das zweite wesentliche Medikament in der Primärtherapie der AML. Es hat sich als effektiver Kombinationspartner von AraC etabliert und wird in der Induktions-, häufig aber auch in der Konsolidierungstherapie eingesetzt. Daunorubicin wird zu Daunorubicinol metabolisiert. Daunorubicinol ist jedoch wegen der geringen Lipophilie kaum zellgängig und damit de facto nicht zytotoxisch. Über die zytotoxische Wirkungsweise des Daunorubicins sind drei Mechanismen denkbar. 1) Die Interkalation von Daunorubicin zwischen die Basenpaare der DNA. Dieser Mechanismus scheint jedoch nicht ausschlaggebend für die Zytotoxizität zu sein, denn andere Substanzen, die ähnlich ausgeprägte interkalierende Wirkung haben, zeigen keinerlei zytostatische Wirkung. 2) Die Bildung von Sauerstoffradikalen. Auch dieser Mechanismus scheint für die Pharmakodynamik eine untergeordnete Rolle zu spielen. 3) Die Inhibition der Topoisomerase II. Dieser Mechanismus scheint primär für die Zytotoxizität des Daunorubicins verantwortlich zu sein. Die Topoisomerase II ist das Enzym, welches gemeinsam mit der Topoisomerase I die Tertiärstruktur der DNA bestimmt, indem es in einem dreistufigen Prozess die Veränderung der DNA-Verwindungszahl katalysiert. Zunächst bewirkt es ATP-abhängig eine Spaltung beider DNA-Stränge, danach bewirkt das Enzym das Durchtreten eines DNA-Abschnitts durch den entstandenen Strangbruch und als letzten Schritt katalysiert es die Wiederverknüpfung der DNA-Bruchstelle. Der zytotoxische Effekt des Daunorubicin liegt vor allem darin, dass es den Zustand dieser gespaltenen DNA stabilisiert und die Wiederverknüpfung der DNA-Bruchstelle verhindert.

Entscheidend für die Sensitivität, bzw. Resistenz einer Zelle hinsichtlich einer Exposition mit Daunorubicin scheint die Aktivität der Topoisomerase II zu sein (Matsumoto *et al.*, 2001). Zudem sind einige Mutationen des Enzyms beschrieben, welche durch Daunorubicin nicht adäquat gehemmt werden können und damit ebenso zur Resistenzentwicklung seitens der

Zelle beitragen (Beck *et al.*, 1999). Der Zellzyklusstatus scheint für die Aktivität des Enzyms ebenso eine gewisse Rolle zu spielen. Auf pharmakokinetischer Ebene ist eine Therapieresistenz bei ausreichender Dosierung am ehesten durch einen gesteigerten hepatischen Abbau von Daunorubicin erklärbar. Weiterhin kann die Pumpaktivität des p-Glykoproteins, welches aktiv verschiedene lipophile Substanzen, wie beispielsweise Anthracycline, aus der Zelle herauspumpt und damit ihre intrazelluläre Wirkung aufhebt, ein entscheidender Mechanismus für eine Therapieresistenz sein (Litman *et al.*, 2001, van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2001). Welcher dieser mannigfaltigen Mechanismen, oder welche Kombination dieser Mechanismen letztendlich für eine klinische Therapieresistenz quantitativ der entscheidende ist, ist bisher noch ungeklärt.

1.3.1.3. Idarubicin

Idarubicin gehört ebenfalls zu der Substanzklasse der Anthracycline und wird in manchen Studien als Anthracyclinpartner von Cytarabin eingesetzt. Als Besonderheit ist Idarubicin das einzige Anthracyclin, welches aufgrund relativ hoher Bioverfügbarkeit oral verabreicht werden kann. Eine weitere Besonderheit stellt sein Hauptmetabolit, das Idarubicinol dar. Aufgrund der relativ hohen Lipophilie der Substanz ist Idarubicinol membrangängig und erreicht somit den Intrazellulärraum in zytotoxisch höheren Konzentrationen. Außerdem übertrifft Idarubicinol die systemische Exposition von Idarubicin um ein Mehrfaches. Dennoch ist seine Toxizität der Toxizität der Muttersubstanz gleichwertig. Aus den genannten Gründen leistet Idarubicinol einen wesentlichen Beitrag zur eigentlichen zytotoxischen Wirkung. Ansonsten entsprechen die Wirkprinzipien des Idarubicins dem der anderen Anthracycline. Genauso wie für Daunorubicin spielt für die Sensitivität, bzw. Resistenz einer Zelle auf eine Exposition mit Idarubicin das Ausmaß der Aktivität der Topoisomerase II eine große Rolle (Matsumoto *et al.*, 2001). Es sind Mutationen des Enzyms beschrieben, welche zur Folge haben, dass die Affinität für Anthracycline verringert ist (Beck *et al.*, 1999). Ebenso ist eine gewisse Zellzyklusabhängigkeit für die Aktivität der Topoisomerase II von Bedeutung. Als ein weiterer Resistenzmechanismus ist eine selektionsbedingte Reduzierung der Topoisomerase II Expression denkbar. Ob Idarubicin, ähnlich dem Daunorubicin einem Pumpmechanismus nach extrazellulär durch beispielsweise das p-Glykoprotein unterliegt, ist momentan noch unklar. Ebenso unklar ist derzeit noch, welcher dieser Faktoren, oder welche Kombination dieser verschiedenen Faktoren für eine klinisch manifeste Resistenz verantwortlich ist.

1.3.1.4. Mitoxantron

Mitoxantron gehört zu der Substanzklasse der Anthracendione und wird mittlerweile in vielen Studien in der Primärtherapie der AML, im Rahmen von Induktions-, sowie Konsolidierungstherapien und in der Therapie refraktärer und rezidivierter AML eingesetzt. Die Substanzklasse der Anthracendione besitzt im Wesentlichen dieselben pharmakokinetischen Eigenschaften wie die Anthracycline, hat aber weniger kardiotoxische Nebenwirkungen als die klassischen Anthracycline.

Entscheidend für die Sensitivität bzw. Resistenz einer Zelle hinsichtlich einer Exposition mit Mitoxantron ist genauso wie bei den klassischen Topoisomerase II – Inhibitoren die Aktivität dieses Enzyms. Beschrieben ist eine selektionsbedingte Minderung der Topoisomerase II Expression, sowie die zellzyklusbedingte Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms. Ebenso existieren Mutationen des Enzyms mit folglich geringerer Affinität für die zytostatische Substanz (Beck *et al.*, 1999). Auf pharmakokinetischer Ebene ist eine Therapieresistenz bei ausreichender systemischer Exposition am ehesten durch einen gesteigerten hepatischen Abbau (Clearance) des Mitoxantrons erklärbar. Bei gleicher Dosierung (bezogen auf die Körperoberfläche) erreichen die Patienten individuell sehr unterschiedliche systemische Konzentrationen, was darauf hindeutet, dass metabolische und pharmakokinetische Ursachen eine entscheidende Rolle spielen. Auch eine zu geringe intrazelluläre Konzentration an Mitoxantron kann trotz adäquater systemischer Exposition ursächlich für eine verminderte Zytotoxizität des Substrats sein. Weiterhin ist auch Mitoxantron ein Substrat der Transporterproteine, welche aktiv lipophile Substanzen aus der Zelle herauspumpen und damit die intrazelluläre Wirkung vermindern, bzw. aufheben. Damit könnte auch eine hohe Aktivität dieser Transporterproteine für eine Therapieresistenz verantwortlich sein. Ungeklärt bleibt, welcher dieser Faktoren, oder welche Kombination dieser verschiedenen Faktoren für eine klinisch manifeste Resistenz quantitativ entscheidend ist.

1.3.1.5. Etoposid

Etoposid ist ein semisynthetisches Derivat des Podophylotoxins, eines Mitosegiftes, welchem 1942 eine therapeutische Wirkung bei *Condylomata accuminata* nachgewiesen wurde. Später wurde das antineoplastisch wirkende, hydrophile Etoposid, auch VP16 genannt als Zytostatikum in der Therapie der AML verwendet.

Ähnlich wie bei den Anthracyclinen spielt auch für die Wirkung von Etoposid die Topoisomerase II eine entscheidende Rolle (Fry *et al.*, 1991). Allerdings weist Etoposid keine interkalierende Wirkung auf, sondern es stabilisiert den DNA / Topoisomerase II - Komplex, den sogenannten cleavable complex. Dieser entsteht, nachdem die Topoisomerase II an den DNA-Strang bindet und in Einzelstränge schneidet. Durch die Stabilisierung wird das Wiederverknüpfen der Bruchstelle verhindert. Solange eine ausreichende Konzentration an

Etoposid gewährleistet ist, ist eine Religierung der Strangbrüche unmöglich. Genau darin besteht der zytotoxische Effekt von Etoposid.

Wie bei den Anthracyclinen ist auch hier hinsichtlich der Exposition mit Etoposid das Ausmaß der Aktivität der Topoisomerase II von entscheidender Bedeutung (Fry *et al.*, 1991). Es wird davon ausgegangen, dass sich eine verlängerte Etoposidexposition mit Plasmaspiegeln $> 1\mu\text{g/ml}$ günstig auf die zytotoxische Potenz auswirkt. Auf pharmakokinetischer Ebene ist eine Therapieresistenz bei adäquater Dosierung am ehesten durch die Induktion des hepatischen Cytochroms p 450 3A4 beispielsweise durch Antikonvulsiva erklärbar. Allerdings muss auch eine ausreichende intrazelluläre Menge an aktivem Substrat vorhanden sein, um eine zytotoxische Wirkung zu gewährleisten. Auch bei ausreichender systemischer Etoposidkonzentration kann intrazellulär zu wenig an aktiver Substanz vorhanden sein. Ursächlich scheint die Pumpaktivität verschiedener ABC Transporterproteine zu sein, insbesondere das MDR 1, sowie das MRP. Auch hier gilt, es ist bislang nicht geklärt, welcher dieser multiplen Resistenzmechanismen, ob isoliert oder in Kombination mit den anderen, für eine klinisch manifeste Resistenz der quantitativ entscheidende ist.

1.3.1.6. Topotecan

Topotecan zählt zu den Topoisomerase I – Inhibitoren und wird aus Extrakten von *Camptotheca acuminata* Decne gewonnen. Topotecan wird bei refraktärer und rezidivierter AML eingesetzt, sowohl isoliert als auch in Kombination mit anderen Zytostatika. Die Inhibition der Topoisomerase I ist primär für die Zytotoxizität von Topotecan verantwortlich. Sowohl die Topoisomerase I als auch II bestimmen die Tertiärstruktur der DNA, indem sie in einem dreistufigen Prozess die Veränderung der DNA-Verwindungszahl katalysieren. Im Gegensatz zur Topoisomerase II spaltet die Topoisomerase I ATP-unabhängig nur einen DNA-Strang. Das Enzym bewirkt im zweiten Schritt das Durchtreten eines DNA-Abschnitts durch den entstandenen Strangbruch und im dritten und letzten Schritt die Wiederverknüpfung der DNA-Bruchstelle. Diesem letzten Schritt wirkt Topotecan entgegen durch die Bindung von Topotecan an die Topoisomerase I sowie an den DNA-Strang. Folglich kommt es zu einer Anhäufung von Einzelstrangbrüchen. Sekundär scheint es auch zu Doppelstrangbrüchen zu kommen, wenn dieser Komplex Topotecan/Topoisomerase I/DNA-Strang auf Replikationsgabeln trifft.

Das entscheidende Kriterium für die Sensitivität oder Refraktärität von Zellen auf eine Topotecantherapie ist die Proliferationsaktivität der behandelten Zellen. Wesentlich ist hier die Anzahl der Zellen, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Sie bestimmt letztendlich die Zytotoxizität des Topotecan. Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Exposition nicht in der S-Phase befinden, könnten einen solchen Angriff unbeschadet überstehen. Um dem vorzubeugen, wird im klinischen Alltag Topotecan als Dauerinfusion verabreicht. Durch

die kontinuierliche Exposition mit Topotecan sollen möglichst viele Zellen in die S-Phase gelangen und so vom Topotecan erreicht werden. Das Ausmaß der Aktivität und die Konzentration von Topoisomerase I scheinen auch zellzyklusabhängig zu sein. Trotz adäquater systemischer Konzentration von Topotecan, kann die intrazelluläre Menge an Substanz nicht gewährleistet sein. Verantwortlich hierfür können die verschiedenen ABC Transporterproteine sein, im Fall von Topotecan hauptsächlich das BCRP, weniger das MDR1 (Litman *et al.*, 2001). Bislang ist noch nicht geklärt, welcher dieser Mechanismen oder welche Kombination dieser verschiedenen Faktoren letztendlich für eine klinische Resistenz der entscheidende ist.

1.3.2. Therapieresistenz – zelluläre „Drug - Response“

Der Prozess der Induktion von Zytotoxizität lässt sich in zwei wesentliche Phasen einteilen.

Die erste Phase im Prozess der Induktion ist substanzspezifisch, das heißt, sie beschreibt die Prozesse, die die applizierte Substanz durchlaufen muss, um an der Zielzelle zu wirken. Diese erste Phase beinhaltet fünf wesentliche Schritte. 1.) Zunächst müssen pharmakokinetische Prozesse vermieden werden, wie beispielsweise eine erhöhte Clearance, durch die es zu einer Wirkungsabschwächung kommen kann. 2.) Im nächsten Schritt muss eine ausreichende intrazelluläre Konzentration an Substrat gewährleistet sein. 3.) Muss die applizierte Substanz zunächst in einen aktiven Metaboliten umgewandelt werden, wie beispielsweise AraC, so muss die Metabolisierung zum aktiven Metaboliten stattfinden. 4.) Wird dieser aktive Metabolit durch Prozesse zum inaktiven Metaboliten metabolisiert, muss diese Verstoffwechslung vermieden werden. 5.) Zuletzt muss die Zielstruktur der Substanz angetroffen werden, sei es nun die sich replizierende DNA, wie im Fall von AraC oder die verschiedenen Topoisomerasen, wie im Fall der Anthracycline.

Diese in der ersten Phase aufgeführten Prozesse sind noch sehr substanzspezifisch. Beispiel hierfür ist die Interkalation der DNA mit Inhibition der Topoisomerase II und gleichzeitiger Präferenz für eine bestimmte DNA-Sequenz durch Idarubicin. VP16 dagegen inhibiert die Topoisomerase II ohne DNA Interkalation mit gleichzeitiger Präferenz für eine andere DNA-Sequenz (Capranico, 1998). Auch die Inkorporation von AraC-Triphosphat in die Nukleotidsequenz unterscheidet sich klar von der Inkorporation von Fludarabintriphosphat in die DNA (Gandhi, 2002).

Die zweite Phase im Prozess der Induktion der Zytotoxizität ist sehr viel weniger substanzspezifisch, vielmehr beinhaltet diese Phase das aktive Reagieren der Zelle auf die induzierten Schäden. Diese zweite Phase ist gekennzeichnet durch drei wesentliche Prozesse: 1.) Auf die in der ersten Phase beschriebenen Prozesse erfolgen von Seiten der Zelle in der Regel verschiedene Reparaturmechanismen wie beispielsweise die Reparatur der Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche der DNA etc. Um die Wirkung der Substanz zu

gewährleisten, müssen solche zellulären Reparaturmechanismen vermieden werden oder zumindest reduziert werden. 2.) Kam es nun nicht oder nur in geringem Maße zur Aktivierung von solchen Reparaturmechanismen, müssen die durch die applizierte Substanz entstandenen DNA-Schäden so hoch sein, dass sie von bestimmten zellulären Sensoren erkannt werden. Nur wenn das gewährleistet ist und die Zelle die entstandenen Schäden quantitativ und qualitativ als „wichtig genug bewertet“, gelangt sie in den Prozess der Apoptose. Nicht alle DNA-Schäden, die Ergebnis einer zytotoxischen Therapie sind, sind von so großem Ausmaß, dass die betroffene Zelle sich nicht weiter teilen könnte und damit nicht mehr überlebensfähig wäre. 3.) Nachdem der Schaden als wesentlich genug erkannt wurde, muss die Zelle einen aktiven und energieaufwendigen Prozess zum Zelltod aktivieren. Diese Selbsttötung geschieht im Rahmen des programmierten Zelltodes, der quantitative entscheidende Teil ist hier die Apoptose.

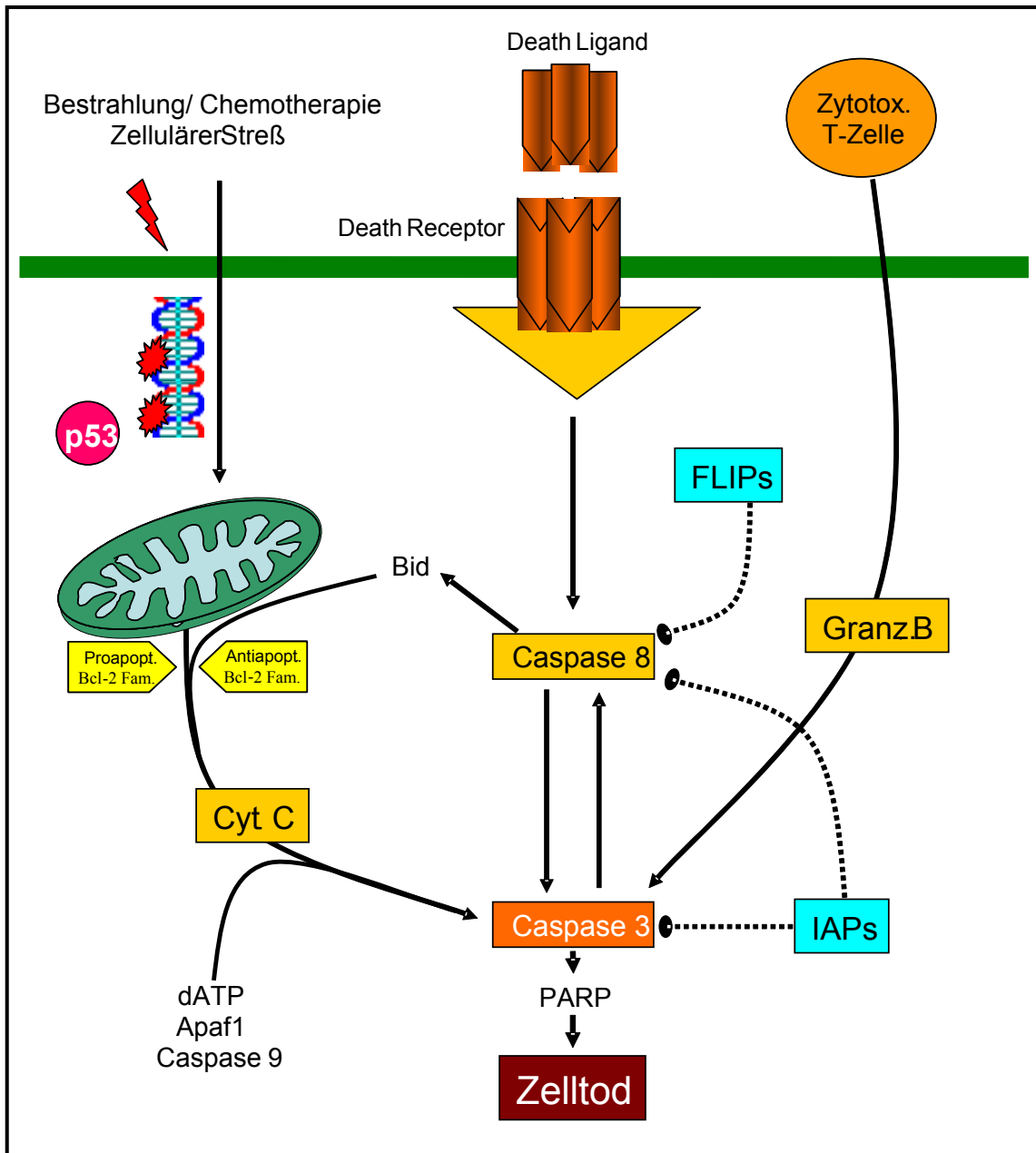


Abbildung 1.2.7. Schematische Darstellung der Apoptose. Es sind nur die wesentlichen Pfade dargestellt. „Extrinsic Pathway“: Ein Death Receptor wird durch den entsprechenden Liganden aktiviert und führt zur Rekrutierung des jeweiligen Adapter Proteins (z.B. FADD) und der Pro-Caspase 8 – diese wird durch Spaltung aktiviert und initialisiert die Caspase Effektorkaskade. „Intrinsic Pathway“: Der sogenannte mitochondriale/ Apoptosom Pfad wird durch mehrere Signale aktiviert (z.B. Radiatio, zytotoxische Substanzen). Es kommt zur Freisetzung von Apoptose-induzierenden Substanzen wie Cytochrom C oder AIF (apoptosis inducing factor) aus den Mitochondrien. Pro- und antiapoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie haben hierbei eine regulierende Wirkung. Cyt. C vereinigt sich mit dATP und Apaf1 und aktiviert die Pro-Caspase 9. Dies bewirkt die Initialisierung der Caspase Effektorkaskade. Für beide Pfade bestehen positive Feedback Schleifen, so z.B. für den Extrinsic Pathway über Bid. Ein dritter Aktivierungspfad (relev. für zytotox. T-Zellen), der offensichtlich die initialen regulatorischen Anteile der Kaskade überspringen kann, ist die direkte proteolytische Aktivierung der Caspase 3 durch Granzyme B, welches Perforin-vermittelt intrazellulär freigesetzt wird.

2. FRAGESTELLUNG

1.) Nachdem nun die verschiedenen Resistenzmechanismen einer Zelle beschrieben wurden, war es unter anderem Ziel dieser Arbeit diese mannigfaltigen Resistenzmechanismen einzugrenzen.

Beim ersten Ziel ging es um die Beantwortung der Frage, ob nun substanzspezifische oder substanzübergreifende Resistenzmechanismen quantitativ limitierend sind.

Abbildung 2.1. zeigt diese beiden Möglichkeiten und verdeutlicht damit die Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde lag. Die linke Grafik in der Darstellung stellt folgenden Zusammenhang dar: Für die Substanz A ist ein Resistenzmechanismus spezifisch, und dieser Resistenzmechanismus ist hauptsächlich für das Absterben, bzw. für das Überleben der Zellen verantwortlich. Nun bedeutet das aber nicht zwingend, dass eine hohe Resistenz der Zellen gegen die Substanz A assoziiert ist mit einer hohen Resistenz gegen die übrigen Substanzen B-F. Das bedeutet, dass man bei den letztgenannten Substanzen durchaus eine hohe Chemosensitivität finden könnte. Unter der Voraussetzung, dass der Resistenzmechanismus spezifisch und limitierend ist, sollten in diesem Fall die LC-50% Werte -als eine Größe zur Quantifizierung der in-vitro Chemosensitivität- der einzelnen Substanzen für sich stehen und nicht miteinander korrelieren.

Die rechte Darstellung in der Abbildung stellt den umgekehrten Fall dar: Für die Substanz A ist ein Resistenzmechanismus unspezifisch, dennoch ist dieser Resistenzmechanismus hauptsächlich für das Absterben, bzw. das Überleben der Zellen verantwortlich. Eine hohe Resistenz der Zellen gegen diese Substanz A, lässt annehmen, dass nun auch eine hohe Resistenz gegen die anderen Substanzen B-F vorliegt. Unter der Voraussetzung, dass der Resistenzmechanismus unspezifisch und limitierend ist, sollten in diesem Fall die LC-50% Werte der einzelnen Substanzen hochrangig miteinander korrelieren. Dies spräche dann für eine kollaterale Chemosensitivität, bzw. -refraktärität.

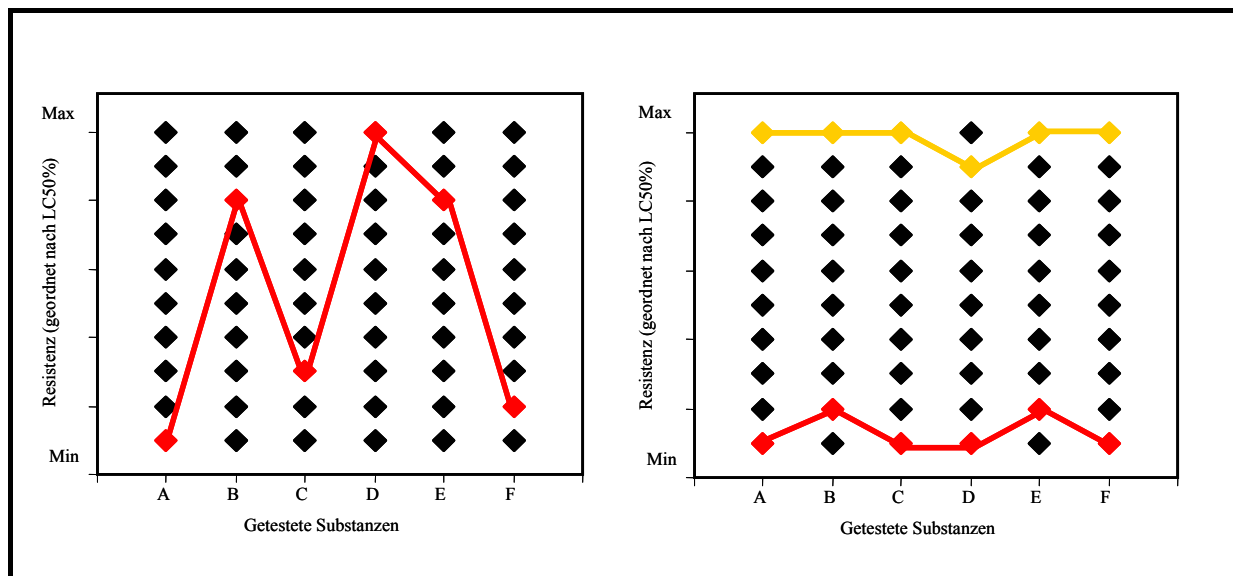


Abbildung 2.1. Darstellung des Prinzips. Hier ist beispielhaft eine Testung von insgesamt 6 Substanzen (A – F) an 10 Patienten aufgeführt. Für jeden Patienten wird für jede Substanz der LC-50% Wert (Letale Konzentration 50% - als Kenngröße für die Chemoresistenz) ermittelt. Sind Resistenzen gegen eine Substanz für diese spezifisch, so sollte die daraus resultierende hohe LC-50% unabhängig von den LC-50% Werten der anderen Substanzen sein. Die linke Graphik zeigt einen solchen Fall. Sollten Resistenzen jedoch übergreifend auf die anderen Substanzen sein, so fände man die LC-50% Werte aller (oder einiger durch ein bestimmtes Resistenzprinzip betroffenen) Substanzen auf einem ähnlichen Niveau. Die rechte Graphik demonstriert einen solchen Fall einer hochgradig korrelierten oder kollateralen Sensitivität/ Refraktärität.

2.) Das zweite wesentliche Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der Heterogenität von leukämischen Zellpopulationen hinsichtlich ihres therapeutischen Ansprechens. Bisher gibt es kaum quantitative Daten, welche die Heterogenität einer Zellpopulation hinsichtlich des Ansprechens der AML auf die applizierte Therapie näher charakterisiert hätten. In dieser Arbeit wurde eine große Gruppe an AML und damit eine große Bandbreite an Resistenzprofilen untersucht. Der Zusammenhang zwischen der Heterogenität einer Zellpopulation und ihres Reagieren auf die applizierte Substanz wird hinsichtlich der wichtigsten in der AML Therapie verwendeten Substanzen charakterisiert. Als beschreibender Parameter wurde hier der B-Wert eingeführt. Dieser beschreibt die Steilheit in einer Dosis-Wirkung-Kurve und wird als Maß für die Heterogenität einer Zellpopulation verwendet (Levasseur *et al.*, 1998).

3.) In der Klinik wird die zytotoxische Wirkung der Substanzen im Wesentlichen von zwei Parametern bestimmt, zum einen von der applizierten Dosis und damit der Konzentration an Zytostatikum und zum anderen von der Expositionsdauer. Das dritte Ziel der Arbeit war, quantitative Daten zur Expositionsdauerabhängigkeit der einzelnen Substanzen zu erheben. Da die Größe der interessierenden Gruppe zu klein war, werden dort keine statistischen Aussagen gemacht. Aussagen bezüglich dieser Abhängigkeit sind daher lediglich zur Orientierung gedacht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Probengewinnung und Aufarbeitung

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen wurde den Patienten entweder peripheres Blut mittels Venenpunktion oder Knochenmarksblut mittels Punktion aus dem Beckenkamm im Rahmen routinemäßiger hämatookologischer Untersuchungen entnommen. Die Proben wurden zur morphologischen Analyse dem Labor für Leukämiediagnostik (Prof. Dr. med. Dr. phil. T. Haferlach), Medizinische Klinik III, Großhadern, München übersandt. Überschüssiges Material wurde nach Isolierung der mononukleären Zellen mittels FICOLL (siehe unter 3.1.1) zur experimentellen Forschung weiterverarbeitet.

3.1.1. Zellisolierung

Peripheres Blut oder Knochenmarksaspirat mit einem Blastenanteil von über 70% wurde mit IMDM Medium (Iscoves's Modified Dulbecco Medium, 10% FCS, 20mM HEPES, 100µg/ml Streptomycin, 10mM L-Glutamin) in einem Falcon Röhrchen auf 20ml aufgefüllt. Zur Trennung der mononukleären Zellen von anderen Blutbestandteilen wurde die Blut-Mediumsuspension vorsichtig mit 10ml Ficoll Reagenz (Separation Solution, Isotonic Solution; Seromed) unterschichtet, um Verwirbelungen zu vermeiden. Anschließend wurde bei 1500 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Zur Zentrifugation standen das Modell Biofuge 15 der Firma Hereaus und ein Modell der Firma Jouan GmbH (Unterhaching, Deutschland) zur Verfügung. Die mononukleären Zellen zeichneten sich nun als Bande ab, der sogenannte buffy-coat, der herauspipettiert wurde und sofort mit 40ml Medium verdünnt wurde, um den zytotoxischen Effekt des Ficoll Reagenz möglichst gering zu halten. Dieser buffy-coat entsprach dem in dieser Probe enthaltenem Anteil an mononukleären Zellen. Zuletzt erfolgten zwei Waschschrte in PBS (Phosphate-buffered Saline; 8,1g NaCl, 0,22g KCl, 1,14g Na₂HPO₄, 0,27g KH₂PO₄ in einem Liter Wasser, pH 7,4) mit nachfolgender Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro Minute über 10 Minuten. Nun stand der buffy-coat für weitere Analysen zur Verfügung.

Im Anschluss wurde die Viabilität der Zellen getestet. Dazu wurden sie mit Trypanblau (Sigma, Saint Louis, USA) im Verhältnis 1:1 gefärbt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht oder nur bedingt auf, tote Zellen hingegen färben sich intensiv blau. Anschließend wurden sie im Mikroskop der Firma ZEISS, Deutschland betrachtet und in einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) gezählt. Es wurden nur Proben verwendet, deren Viabilität über 95% lag. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass unter den oben genannten Bedingungen der Anteil der leukämischen Blasten in der Suspension bei durchschnittlich 90% lag.

3.2. Zytogenetische Analyse

Chromosomenanalysen wurden durchgeführt an Zellen aus Kurzzeitkulturen (24h, 48h), die sich in der Metaphase befanden. Dazu wurden das periphere Blut und/oder das Knochenmark kultiviert, die Chromosomen präpariert und gefärbt. Eine modifizierte Technik (GAG= Giemsa bands by acetic bands) wurde angewandt, um die Banden darzustellen. Die Chromosomen wurden gemäss des ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) klassifiziert. Bei Notwendigkeit wurden diese Analysen ergänzt durch zusätzliche FISH-Analysen (Floureszenz in-situ Hybridisierung). Die zytogenetische Analyse wurde im Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Grosshadern, München durch die Arbeitsgruppe Dr. med C. Schoch im Rahmen der initialen oder Rezidivdiagnostik durchgeführt.

Die Aberrationen wurden gemäß ihrer prognostischen Relevanz in folgende 4 Subgruppen unterteilt: 1.) „normal“ [46,XX; 46,XY], 2.) „prognostisch günstig“ [Inversion 16, Translokation (8;21), Translokation (15;17)], 3.) „prognostisch ungünstig“ [Aberrationen an den Chromosomen 5 oder 7, Inversion 3, Aberration mit Beteiligung von 11q23, komplexe Aberrationen (definiert als 3 oder mehr numerische oder strukturelle Aberrationen - jedoch ohne Beteiligung der Inversion 16, der Translokation (8;21) oder der Translokation (15;17))], 4.) „unbekannte Signifikanz“ [alle anderen Aberrationen].

3.3. Zytotoxizitätsanalysen mittels WST-1 Assay

Um die Reduktion der Zellviabilität unter einer zytotoxischen Therapie zu messen, wurde der WST-1 Assay verwendet. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Reduktase System (RS) bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalses WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene Disulphonat) in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag wurde in einem Spektrophotometer (ELISA Reader) photometrisch gemessen und ausgewertet. Die Reduktion der Zellviabilität geht mit der Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenasen einher, die den oben genannten Farbumschlag bewirken. Die Menge des gebildeten Formazans und damit das Ausmaß der photometrisch bestimmten Extinktion (hier bei einer Wellenlänge von 450nm) ist proportional zu der Anzahl der viablen Zellen.

Zur Durchführung der Zellviabilitätsmessung wurden nach erfolgter Zellisolierung die Blasten zunächst auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt. Tabelle 3.1. zeigt schematisch die verwendeten Konzentrationen der 6 Zytostatika in $\mu\text{g/ml}$. Jeweils 100 μl der Zellsuspension, entsprechend einer Zellzahl von 10^5 wurde in jedes Well der Reihen B-H einer 96 Well Platte (Firma Nunc) hineinpipettiert. Hier wurden sie mit 6 verschiedenen Zytostatika in je 6 Konzentrationen koinkubiert. Folgende Zytostatika wurden verwendet: ARC - Cytosinarabinosid (Alexan® von Mack, Illertissen), VP16 - Etoposid (Vepesid von Bristol), DNR - Daunorubicin (Rhône-Poulenc), IDA - Idarubicin (Zavedos® von

Pharmacia&Upjohn), MIT - Mitoxantron (Lederle) und TOP - Topotecan (Hycamtin® von Smith Kline Beccham Pharma). Die Reihe B enthielt unbehandelte Zellen (Kontrolle). Die Reihe A enthielt lediglich 100µl Medium ohne Zellen. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen.

	ARC	VP16	DNR	IDA	MIT	TOP
	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	blank	blank	blank	blank	blank	blank
B	0	0	0	0	0	0
C	0,01	0,01	0,001	0,0001	0,0001	0,0001
D	0,1	0,1	0,01	0,001	0,001	0,001
E	1	1	0,1	0,01	0,01	0,01
F	5	10	1	0,1	0,1	0,1
G	10	50	10	1	1	1
H	20	100	20	10	10	10

Tabelle 3.1. Schema der verwendeten Konzentrationen der 6 Zytostatika (ARC - Cytosin Arabinosid, VP16 - Etoposid, DNR - Daunorubicin, IDA – Idarubicin, MIT - Mitoxantron, TOP - Topotecan) in µg/ml. Es erfolgten Doppelbestimmungen in benachbarten Spalten. In Reihe A befand sich nur Medium (blank). In Reihe B befanden sich unbehandelte Zellen (Kontrolle).

Die Inkubation über 96 Stunden erfolgte bei 37°C, einer CO₂ Konzentration von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Danach wurde in jedes Well 10 µl des unverdünnten WST-1-Reagenz (Boehringer Mannheim, Deutschland) pipettiert. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation über 4 Stunden. Während dieser Zeit fand die Umsetzung des schwach rot gefärbten Substrats in das dunkelrote Formazan statt. Unmittelbar nach diesen 4 Stunden erfolgte die photometrische Messung im ELISA Reader (Optimax-Reader, Fa. Molecular Devices). Das Gerät misst die Extinktion durch die Suspension in Doppelbestimmungen bei einer Wellenlänge 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

3.4. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes SoftMAXPro Version 2.4.1 (Fa. Molecular Devices). Alle gemessenen Extinktionen wurden in Relation zu den Extinktionen der unbehandelten Kontrolle gesetzt. Daraus ergaben sich 7 Werte, die in einer Konzentrations/Effekt-Kurve dargestellt werden. Es erfolgte ein Fitting einer sigmoidalen Kurve an die erhobenen Messwerte mit Hilfe eines „four parameter fits“ gemäß der Gleichung:

$$y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) + D$$

Die Abbildungen 3.1. und 3.2. stellen ein Beispiel einer solchen Kurve mit dem verwendeten „four parameter fit“ dar. Der Zytotoxizitätseffekt relativ zur unbehandelten Kontrolle wurde auf die y-Achse aufgetragen, die verwendeten Zytostatikakonzentrationen wurden auf die x-Achse aufgetragen.

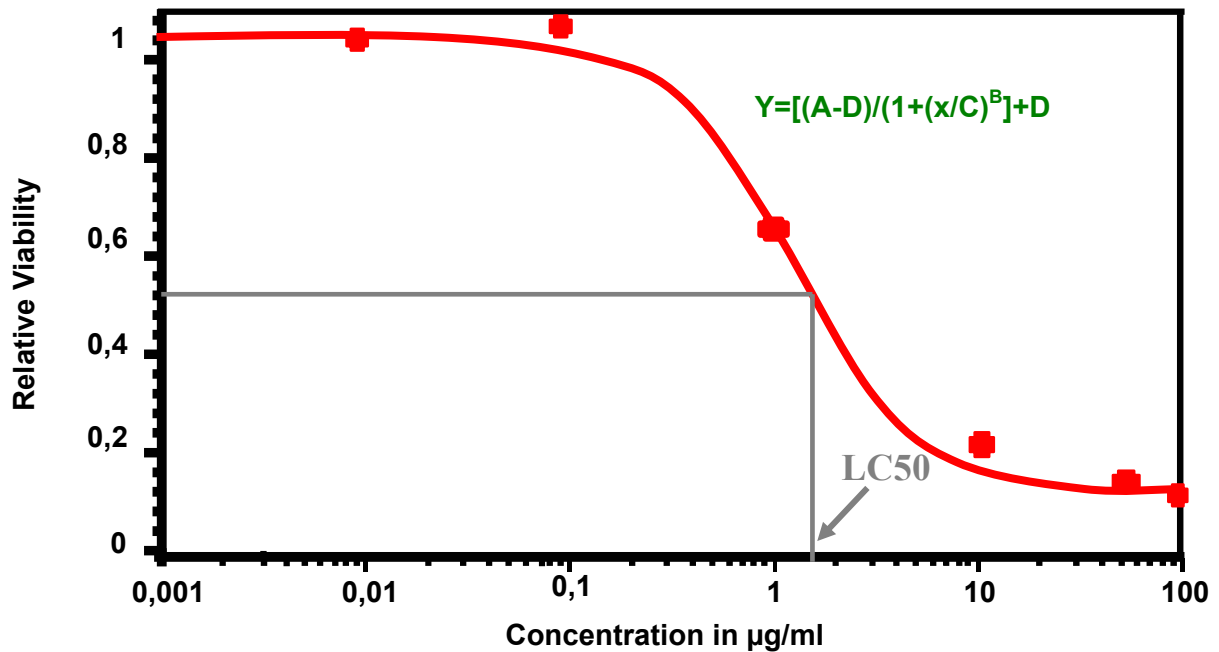


Abbildung 3.1. Beispiel einer mittels des WST-1 Assay ermittelten Dose / Response Kurve mit der verwendeten Gleichung sowie Darstellung des Parameters LC50%.

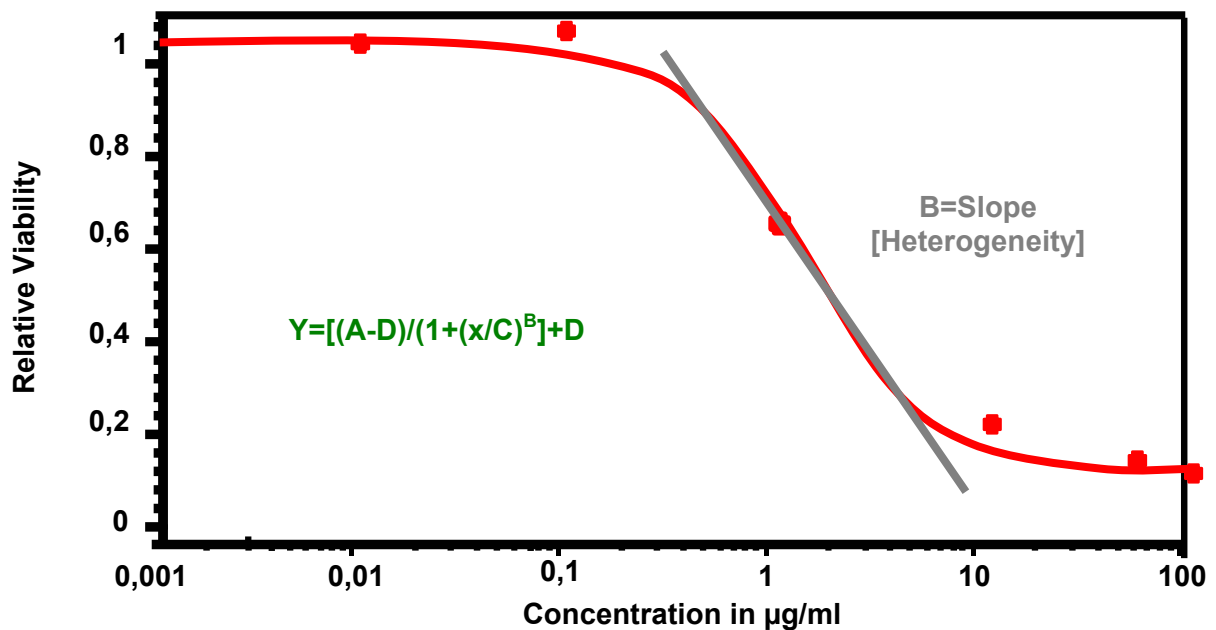


Abbildung 3.2. Beispiel einer mittels des WST-1 Assay ermittelten Dose / Response Kurve mit der verwendeten Gleichung sowie Darstellung des Parameters B-Steilheit.

In der aufgeführten Gleichung entspricht der Parameter A den y Werten bei niedrigen x Werten, der Parameter D den y Werten bei hohen x Werten, der Koeffizient C dem Mittelwert zwischen Parameter A und D. Der Exponent B ist der Parameter für einen mehr oder weniger steilen oder plötzlichen Übergang von dem einen asymptotischen Abschnitt der Kurve (bei sehr niedrigen Konzentrationen) zum anderen asymptotischen Zustand (bei sehr hohen Konzentrationen). Der B-Wert liegt meistens im Bereich von 1.

Aus der Kurve wurden als zwei wesentliche Parameter der LC-50% Wert sowie der Parameter B abgeleitet. Der Wert LC-50% (letale Konzentration 50%) beschreibt die Konzentration an zytotoxischen Agens, die benötigt wird, um die Zellzahl auf die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter einer 96 stündigen Exposition zu reduzieren. Diese Konzentration lässt sich direkt aus der Kurve ablesen. Sie ist der Schnittpunkt der Kurve mit einer Waagrechten parallel zur X-Achse bei der 50% igen Zellviabilität. Analog dazu wurden die LC-25% sowie die LC-75% Werte ermittelt, jedoch in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt und auch nicht weiter bei den Untersuchungen verwendet. Die Ermittlung der LC Werte erfolgte durch das SoftMAXPro- Computerprogramm.

Der Parameter B wurde ebenfalls direkt aus der Kurve abgeleitet. Er beschreibt die Steilheit der Kurve, also den Abschnitt der Kurve zwischen den beiden asymptotischen Teilen der Kurve. Hohe B-Werte bedeuten eine steil verlaufende Kurve und stehen damit für eine hohe Homogenität einer Zellpopulation hinsichtlich ihres Ansprechens auf ein bestimmtes Zytostatikum. Niedrige B-Werte bedeuten eine flach verlaufende Kurve und stehen damit für die Heterogenität einer Zellpopulation hinsichtlich ihres Ansprechens auf ein bestimmtes Zytostatikum (Levasseur *et al.*, 1998).

Abbildung 3.3. zeigt eine schematische Zusammenfassung der durchgeführten Arbeitsschritte.

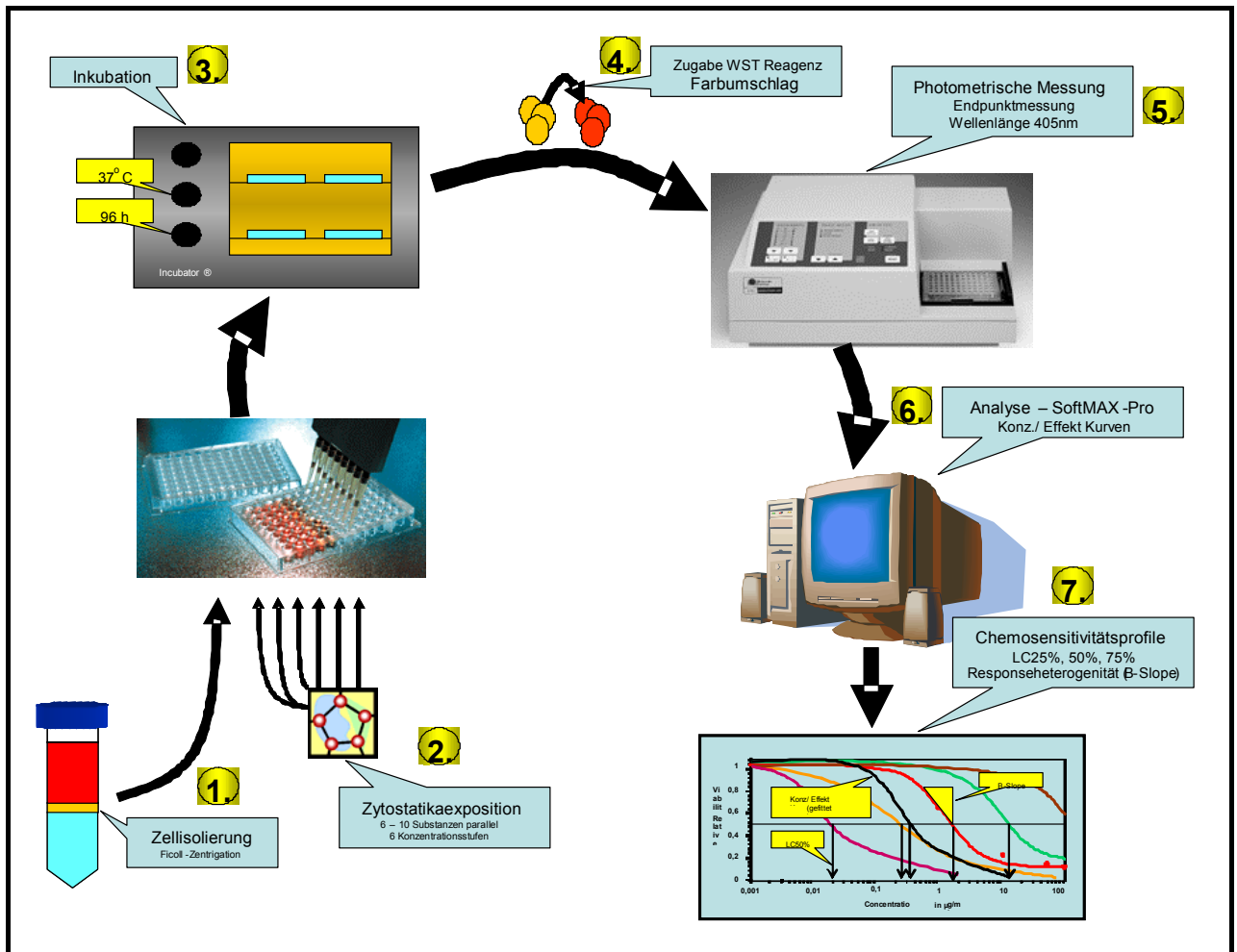


Abbildung 3.3. Schematische Darstellung des WST Assays zur Zellviabilitätstestung.

4. PATIENTEN

Patienten, bei denen die Diagnose akute myeloische Leukämie nach den Kriterien der French- American- British Klassifikation gestellt wurde, kamen für diese prospektive Studie in Frage. Die Auswahl der Patienten erfolgte konsekutiv. Zum Zeitpunkt der Experimente war lediglich das Krankheitsstadium bekannt. Der zytogenetische Befund wurde von 50 Patienten erhoben. Für den Einschluss in die Studie wurde ein Anteil von über 70% leukämischer Blasten im Knochenmark gefordert. In die Studie wurden sowohl Patienten mit der Erstdiagnose AML, als auch Patienten im Rezidiv und mit therapierefraktärer AML aufgenommen. Es wurde weiterhin keine Selektion der Patienten vorgenommen, um eine möglichst große Bandbreite an Resistenzprofilen zu sichern.

Die Vorgehensweise dieser Studie befand sich in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (Anonymous, 1997) und wurde durch das örtliche Ethik-Komitee genehmigt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Biometrische Daten der Patientengruppe

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Analysen an insgesamt 57 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.

Das mediane Alter dieser Gruppe betrug 59 Jahre, mit einem Mindestalter von 17 und einem Höchstalter von 87 Jahren. 67% der Patienten waren männlich, 33% der Patienten waren weiblich.

Die Typen nach FAB-Klassifikation verteilten sich wie folgt: Es wurden vier Patienten mit M1, neun Patienten mit M2, drei Patienten mit M3, 14 Patienten mit M4 und zwei Patienten mit M5 eingeschlossen. Bei 25 Patienten konnte der FAB-Typ nicht eindeutig festgestellt werden.

5.2. Zytogenetische Befunde

Zytogenetische Analysen wurden bei 50 Patienten durchgeführt. Von sieben Patienten konnte der Karyotyp nicht erhoben werden. Eine detaillierte Aufstellung der erhobenen Karyotypen erfolgt in Tabelle 8.1.. Die Karyotypen wurden hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung in vier Gruppen unterteilt: 1.) „normal“ [46,XX; 46,XY], 2.) „prognostisch günstig“ [inv(16); t(15;17), t(8;21)], 3.) „prognostisch ungünstig“ [-7, -5, 5q-, 7q-, inv(3), Aberrationen mit Beteiligung der Bande 11q23, komplexe Aberrationen, d.h. 3 oder mehr numerische oder strukturelle Aberrationen ohne Beteiligung der oben genannten prognostisch günstigen Aberrationen], 4.) „unbekannte Signifikanz“ [alle anderen Aberrationen]. Die Gruppierungen der Patienten sind in Tabelle 5.1. aufgeführt.

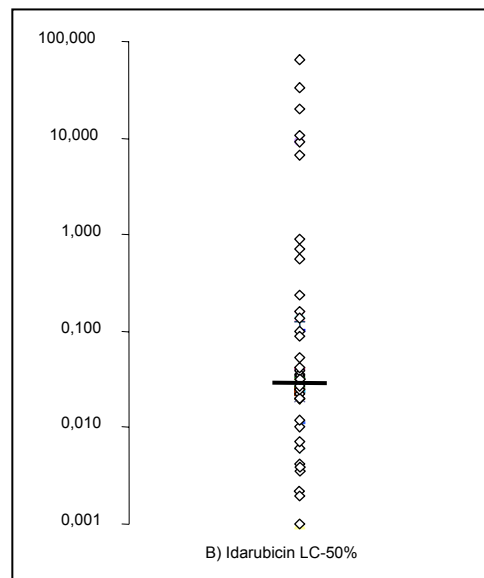
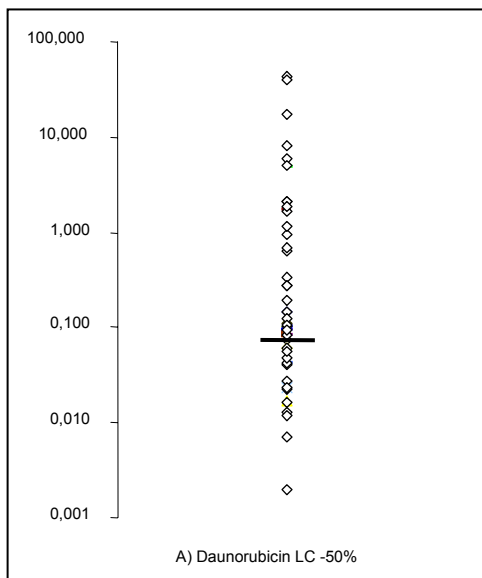
Der Anteil an Patienten mit einem normalen Karyotypen betrug 52%, der Anteil der Patienten mit einem günstigen Karyotypen betrug 14%. Der Anteil an Patienten mit einem ungünstigen Karyotypen betrug 20% und der Anteil an Patienten mit einem Karyotypen der Gruppe „unbekannte Signifikanz“ betrug 14%.

günstig	normal	ungünstig	unbek. Signifikanz
7	26	10	7

Tabelle 5.1. Verteilung der Karyotypen der untersuchten Patienten in die zytogenetisch definierten prognostischen Subgruppen der AML (zur genauen Zuordnung einzelner Karyotypen in der jeweiligen Gruppe siehe Text).

5.3. Chemosensitivität - LC 50 % Bestimmungen

Um die ex-vivo-Sensitivität/-Resistenz der Zellpopulationen zu bestimmen, wurde der WST-1 Assay verwendet. Als entscheidender Parameter wurde der LC-50% Wert erhoben. Er gibt die Konzentration eines Agens an, bei der die Viabilität der Zellpopulation unter 96 stündiger Exposition mit dem betreffenden Agens auf 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert wird. Dieser Parameter wird in den meisten Arbeitsgruppen weltweit als Kenngröße zur Bestimmung der Chemosensitivität verwendet. Der LC-50% Wert wurde für die 6 untersuchten Zytostatika aus dem Material einer Patientenprobe parallel ermittelt. Die sechs untersuchten Zytostatika sind Daunorubicin (DNR), Idarubicin (IDA), Mitoxantron (MIT), Etoposid (VP16), Topotecan (TOP), Cytarabin (ARC). Es konnten insgesamt Daten aus dem Material von 57 Patientenproben ermittelt werden. Die Rohdaten sind für die einzelnen Substanzen graphisch als Punktwolken in der Abbildung 5.1 dargestellt. Der Querbalken in den einzelnen Graphiken gibt den medianen LC-50% Wert in der getesteten Gesamtgruppe für die jeweilige Substanz an.



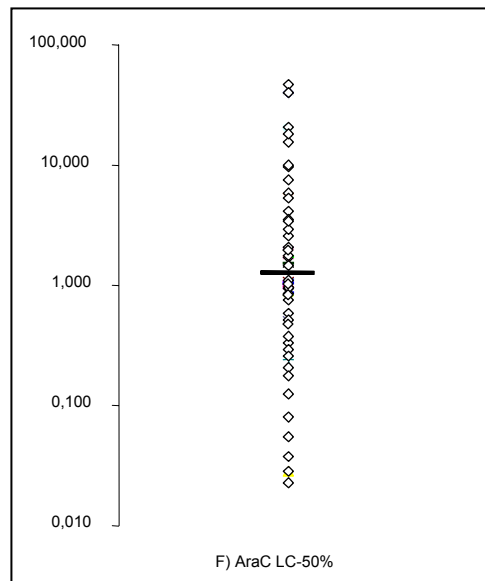
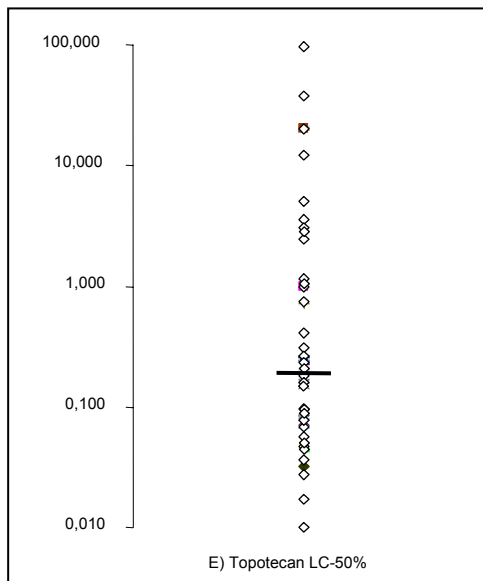
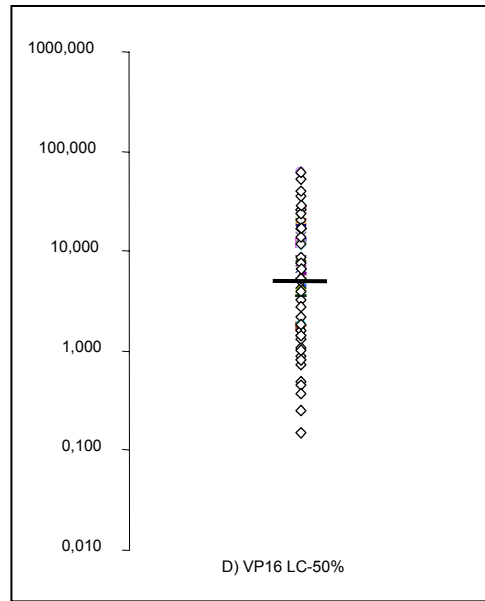
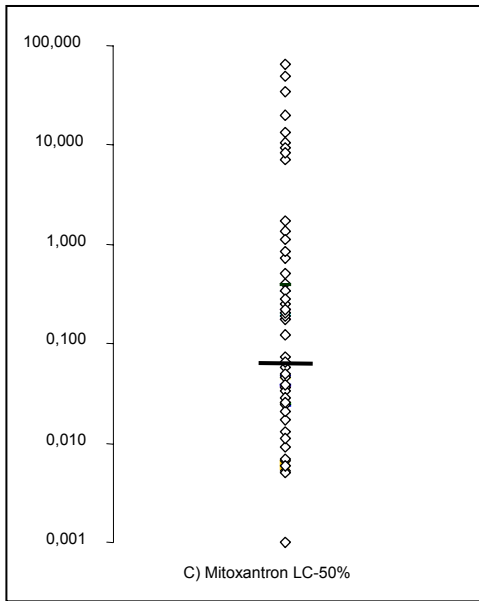


Abbildung 5.1. A)-F) Darstellung der ermittelten LC-50%-Werte bei 6 Substanzen. Der mittels des WST-1 Assays erhobene Wert gibt für die jeweilige Patientenprobe die Konzentration des entsprechenden Zytostatikums in $\mu\text{g/ml}$ an, bei der die Viabilität der AML Blastenpopulation auf 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle gefallen ist.

Setzt man nun die medianen LC-50% Werte, die in diesem in-vitro-Versuch ermittelt wurden mit den in-vivo-Daten in Beziehung, kann man feststellen, dass die mediane LC-50% Konzentration bei allen Zytostatika unter oder im Bereich der Steady State Konzentrationen lag, die bei üblicher Applikation erreicht werden. Allerdings fiel bei allen 6 getesteten Substanzen eine breite Streuung der Werte auf, was sich in den hohen Variationskoeffizienten (VC) äußert. Für die Anthracycline DNR / IDA lag der VC im Bereich von 4,5, für das Anthracendion MIT lag er bei 3,41. Der VC für den Topoisomerase I Inhibitor Topotecan und für AraC lag in einem intermediären Bereich bei ungefähr 2 - 2,5. Deutlich weniger streuten die LC-50% Werte bei VP16, hier lag der VC bei 1,16. In Tabelle 5.2. sind die wesentlichen statistischen Kenngrößen für die LC-50% Werte von allen 6 getesteten Zytostatika aufgeführt.

LC 50%	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
Median	0,09	0,03	0,06	5,26	0,13	1,07
MW	1,18	0,63	1,00	10,31	2,31	4,61
VC	4,55	4,54	3,41	1,16	2,48	2,04
n	57	57	57	57	57	57

Tabelle 5.2. Resultate der Chemosensitivitätsmessungen. Die LC-50% (letale Konzentration 50% in µg/ml) gibt die Konzentration an, bei der unter einer 96-stündigen Exposition die Viabilität der Zellsuspension auf 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle gefallen ist.

5.3.1. Chemosensitivität - Zeitabhängigkeit der LC-50%

Die Konzentration eines Agens, die benötigt wird um die Zellviabilität auf 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle zu reduzieren, nimmt mit zunehmender Expositionsdauer ab. Dies betrifft insbesondere Zellzyklus-spezifische Substanzen, da die Wahrscheinlichkeit der Zellen in die vulnerable Phase des Zellzyklus zu gelangen und währenddessen mit der Substanz zu interagieren mit zunehmender Expositionsdauer steigt. Bei den Zellzyklus-unspezifischen Substanzen wird ein deutlich geringerer Einfluss der Expositionsdauer beschrieben. Hier geht man davon aus, dass die Konzentration des Agens das Ausmaß der Zytotoxizität bestimmt.

Bei einem Teil der Patientenproben wurde neben der planmäßigen 96-stündigen Inkubation der Zellen parallel auch eine 24-stündige Inkubation durchgeführt. Es wurde der LC-50% Wert sowohl unter der 96-stündigen Inkubation ermittelt als auch unter einer 24-stündigen Inkubation. Es konnte der Zeitfaktor Z_{LC} ermittelt werden, welcher sich als Quotient aus der $LC-50\%_{24h} / LC-50\%_{96h}$ ergibt. Dieser Quotient gibt den Faktor an, um den die für eine 96-stündige Exposition ermittelte LC-50% erhöht werden muss, um auch unter einer auf 24 Stunden verkürzten Exposition die Viabilitätsreduktion um 50 % zu erreichen. Ein großer

Einfluss der Expositionsdauer auf die Zytotoxizität spiegelt sich in einem hohen Zahlenwert ($\gg 1$) wider, ein niedriger Zahlenwert (< 1) beschreibt dagegen einen geringen Einfluss. Bei einem Zahlenwert $Z_{LC}=1$ wäre die Expositionsdauer theoretisch ohne Bedeutung. Bei allen sechs Substanzen fanden sich Werte > 1 , die bei TOP mit 47,66 das Maximum und bei VP16 mit 7,66 das Minimum erreichen. In Tabelle 5.3. sind die wesentlichen statistischen Kenngrößen für den Parameter Z_{LC} aufgeführt.

Z_{LC}	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
Median	22,00	10,61	8,39	7,66	47,66	14,17
MW	34,00	20,45	20,76	14,09	114,27	87,20
VC	1,06	1,11	1,13	1,47	1,71	2,29
N	7	7	7	7	7	7

Tabelle 5.3. Relevanz der Expositionsdauer für den zytotoxischen Effekt. Der hier aufgeführte Parameter Z_{LC} stellt den (Zeitbedingten-) Faktor dar, um den die Konzentration des Zytostatikums erhöht werden muss zum Erreichen eines äquitoxischen Effektes (hier: Viabilität 50% bei einer Verkürzung der Expositionsdauer von 96 auf 24h).

5.3.2. Korrelation der LC-50% Werte

Die LC-50% Werte als Parameter für die Chemosensitivität wurden an den Blasten einer definierten Patientenprobe für 6 verschiedene in der AML Therapie verwendeten Substanzen bestimmt. Um eine mögliche Korrelation der LC-50% Werte festzustellen wurden Datensets von 57 Patienten untersucht und mittels Rangkorrelation verglichen. Ein Test mittels Kolmogorov-Smirnov-Analyse hatte keinen Hinweis auf eine Normalverteilung ergeben, so dass eine Rangkorrelation vorgenommen wurde.

In allen Konstellationen mit DNR, MIT, IDA und TOP fand sich eine hochsignifikante Korrelation der LC-50% Werte mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$. In der Konstellation VP16/ARC ließ sich keine Signifikanz erkennen. Eine qualitative Zusammenfassung zeigt Tabelle 5.4.. In der Tabelle 5.5. sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten nach Spearman angegeben, in der Tabelle 5.6. nach Kendall.

Diese Daten zeigen, dass Blastenpopulationen, die beispielsweise gegen DNR resistent sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch gegen die anderen der 6 verwendeten Substanzen resistent sind und vice versa. Umgekehrt ist es unwahrscheinlich, dass für diese Blastenpopulation eine gute Chemosensitivität gegen auch nur eine der 6 Substanzen vorliegen könnte. Lediglich für die Konstellation ARC/VP16 dürfte dies nach diesen Daten nicht zutreffen.

LC 50%	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	x	x	x	x	x
IDA	x	x	x	x	x
MIT	x	x	x	x	x
VP16	x	x	x	x	n.s.
TOP	x	x	x	x	x
ARC	x	x	x	n.s.	x

Tabelle 5.4. Korrelation der LC-50%-Werte der 6 Zytostatika. Qualitative Angabe des erreichten Signifikanzniveaus. Die Analyse erfolgte als Rangkorrelation (Spearman / Kendall; x = p < 0,01 in beiden Analysen, n.s. = not significant in beiden Analysen).

LC 50%	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	0,5478	0,5972	0,6119	0,5611	0,4492
IDA	0,5478	0,5901	0,5564	0,5018	0,3507
MIT	0,5972	0,5901	0,4704	0,5130	0,3829
VP16	0,6119	0,5564	0,4704	0,4423	0,2386
TOP	0,5611	0,5018	0,5130	0,4423	0,5118
ARC	0,4492	0,3507	0,3829	0,2386	0,5118

Tabelle 5.5. Korrelation der LC-50%-Werte der 6 Zytostatika (Spearman Rang Test).

LC 50%	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	0,4445	0,4654	0,4500	0,4023	0,2979
IDA	0,4445	0,4561	0,4071	0,3703	0,2653
MIT	0,4654	0,4561	0,3498	0,3861	0,2780
VP16	0,4500	0,4071	0,3498	0,3154	0,1663
TOP	0,4023	0,3703	0,3861	0,3154	0,3771
ARC	0,2979	0,2653	0,2780	0,1663	0,3771

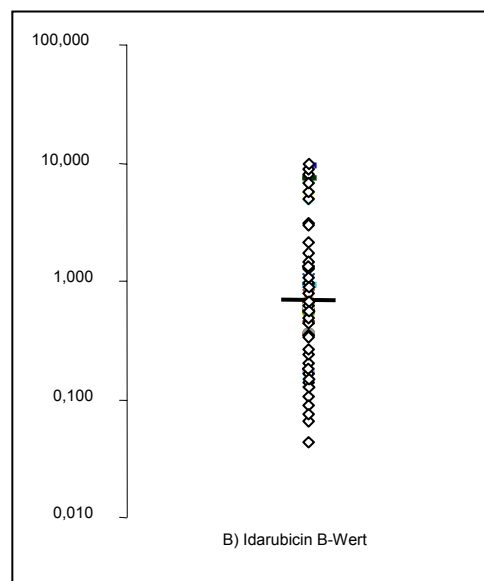
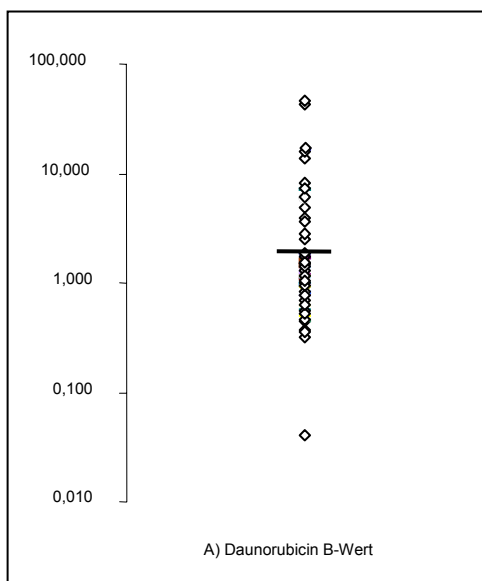
Tabelle 5.6. Korrelation der LC-50%-Werte der 6 Zytostatika (Kendall Rang Test).

5.4. Chemosensitivität - Responsehomogenität / B-Slopes - Bestimmungen

Die im Rahmen der Chemosensitivitätsmessung mittels WST-1 Assay erhobenen Werte wurden mittels eines „four parameter fits“ gemäß der Gleichung: $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$ in einer sigmoidalen Kurve dargestellt. Der Parameter B ist ein Maß für die Steilheit der Kurve, das heißt, er beschreibt den mehr oder weniger steilen Übergang der Kurve von dem

einen asymptotischen Teil der Kurve (bei sehr niedrigen Konzentrationen) zum anderen asymptotischen Teil (bei sehr hohen Konzentrationen). Die Steilheit der Kurve ist wiederum ein Maß für die Homogenität einer Zellpopulation. Im Folgenden soll dieser Sachverhalt erklärt werden: Ein hoher B-Wert steht für eine sehr steile Kurve, das bedeutet, dass die Zellpopulation bei niedrigen Konzentrationen zunächst keinen Viabilitätsverlust aufweist. Ab einer gewissen Zytostatikakonzentration kommt es jedoch zu einem Viabilitätsverlust, der gegen 0% geht. Dies macht sich in dem steilen Abfall der Kurve bemerkbar. In einem solchen Fall hätte die Zellpopulation hinsichtlich der Chemosensitivität ein homogenes Verhalten gezeigt. Umgekehrt steht ein niedriger B-Wert für eine flach verlaufende Kurve. In diesem Fall weist die Zellpopulation bei niedrigen Konzentrationen an Zytostatika einen Viabilitätsverlust in einer Subpopulation auf. Das bedeutet, dass einige Anteile der Gesamtpopulation durch eine hohe Chemosensitivität charakterisiert sind und bei niedrigen Konzentrationen schon absterben, andere Anteile jedoch bei hohen Konzentrationen nicht absterben und somit durch eine hohe Resistenz gekennzeichnet sind. Zusammenfassend stehen hohe B-Werte für eine hohe Homogenität der Zellpopulation und niedrige B-Werte für eine hohe Heterogenität der Zellpopulation hinsichtlich ihres Reagierens auf das getestete Agens.

Zur parallelen Analyse der B-Werte standen 57 Patientenproben zur Verfügung. Zur Ermittlung der B-Werte von ARC und DNR standen 56 Proben zur Verfügung. Die ermittelten Rohdaten sind in der Abbildung 5.2. dargestellt. Der Balken markiert graphisch den medianen B-Wert innerhalb der Gesamtgruppe für die jeweilige Substanz.



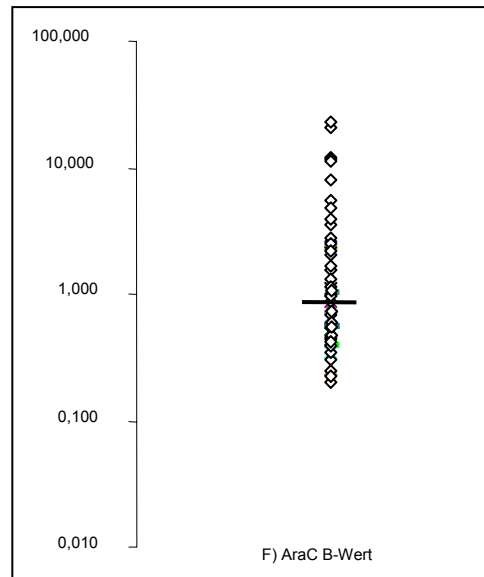
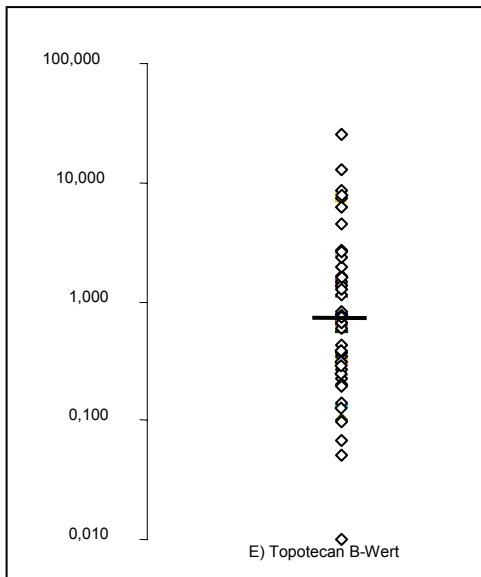
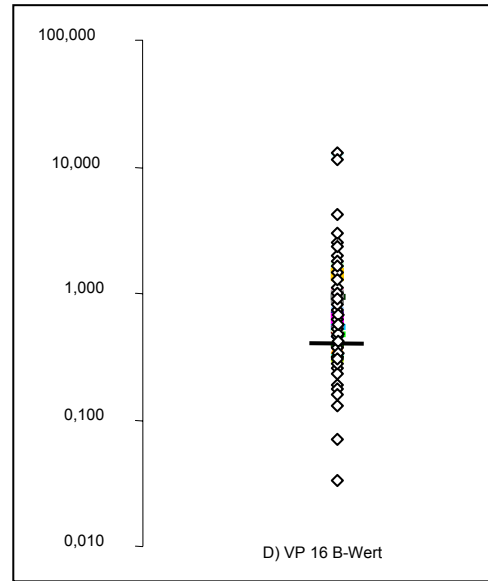
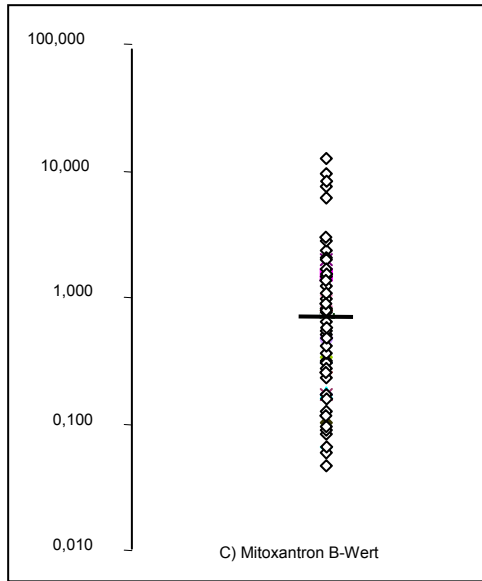


Abbildung 5.2. A)-F) Darstellung der ermittelten B-Steilheit (Responsehomogenität) Werte (dimensionslose Größe). Die Querbalken repräsentieren den jeweiligen Median der Gruppe. Der Parameter B-Steilheit ist die wesentliche Determinante für die Steilheit der abfallenden Konzentrations-Effekt Kurve. Er dient als Mass für die Homogenität einer Zellsuspension hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf das getestete Agens.

In der Tabelle 5.7. sind die wesentlichen statistischen Kenngrößen des B-Wertes aufgeführt. Für die Ermittlung des B-Wertes bei DNR und ARC standen 56 Proben zur Verfügung. Auffallend ist, dass die medianen B-Werte sich deutlich voneinander unterscheiden. Bei VP16 beispielsweise lag der Median bei 0,55, das bedeutet, dass hier die Konzentrations/Effekt-Kurve relativ flach verläuft. In diesem Fall reagiert die einzelne Zellpopulation vergleichsweise inhomogen auf das Agens. Der Median von Daunorubicin lag deutlich höher mit einem Wert von 1,48. In diesem Fall verläuft die Konzentrations/Effekt-Kurve eher steil und ist Ausdruck einer relativ homogenen Antwort der Zellen einer Zellpopulation. Die Streuung der B-Werte, die durch hohe Variationskoeffizienten beschrieben wird, ist deutlich ausgeprägt. Die Variationskoeffizienten liegen für alle 6 getesteten Substanzen zwischen 1,23 und 1,89.

B-Steilheit	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
Median	1,48	0,76	0,71	0,55	0,73	0,95
MW	4,55	2,25	1,52	1,47	1,93	2,52
VC	1,89	1,23	1,63	1,72	1,45	1,6
n	56	57	57	57	57	56

Tabelle 5.7. Resultate der Chemosensitivitätsmessungen. In dem Parameter B-Steilheit (Responsehomogenität - dimensionslose Größe) spiegelt sich die Steilheit der abfallenden Konzentrations/Effekt-Kurve. Er dient als Maß für die Homogenität einer Zellsuspension hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf das getestete Agens.

5.4.1. Chemosensitivität - Zeitabhängigkeit von B-Steilheit (Responsehomogenität)

Ein heterogenes Ansprechen einer Zellpopulation auf ein gegebenes Agens wird im Wesentlichen durch zwei Möglichkeiten bedingt. Zum einen kommen klare molekulare Resistenzmechanismen in Frage, die in einer Subpopulation der Gesamtgruppe vorhanden sind und in den restlichen Zellen fehlen. Zum anderen kann der jeweilige Zellzyklus-Status der einzelnen Blasten einer phänotypisch identischen Blastenpopulation zum Zeitpunkt der Exposition eine Rolle spielen.

Um herauszufinden, inwiefern die Expositionsdauer den Parameter B als Kenngröße für die Homogenität/Heterogenität beeinflusst, wurde der Parameter Z_B beschrieben. Hierfür stand wie in Kapitel 5.3.1. eine Subgruppe an Patientenmaterial zur Verfügung, bei der eine Bestimmung des Parameters B sowohl unter einer 96-stündigen Inkubationszeit, als auch unter einer 24-stündigen Expositionszeit möglich war. Der Parameter Z_B stellt den zeitbedingten Faktor dar, um den sich die B-Steilheit ändert bei einer Verlängerung der Expositionsdauer von 24 auf 96 Stunden. Ein hoher Wert ($Z_B > 1$) ist Ausdruck eines höheren B-Wertes unter verlängerter Expositionsdauer, das heißt es liegt eine steile Konzentrations/Effekt-Kurve vor. Ein hoher Wert zeigt damit eine größere Homogenität der

Drug Response unter diesen veränderten Bedingungen. Umgekehrt verhält es sich mit einem niedrigen Wert ($Z_B < 1$). Ein niedriger Wert ist Ausdruck einer größeren Heterogenität der Drug Response unter verlängerter Expositionsdauer. Hier liegt nun eine flache Konzentrations/Effekt-Kurve vor. Die wesentlichen statistischen Kenngrößen für den Z_B -Wert sind in der Tabelle 5.8. aufgeführt.

Z_B	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
Median	0,70	1,04	0,54	0,69	0,58	1,03
MW	2,72	3,19	0,78	1,10	4,21	1,80
VC	1,73	2,00	0,93	1,08	2,21	1,01
N	7	7	7	6	7	7

Tabelle 5.8. Relevanz der Expositionsdauer für B-Steilheit (Responsehomogenität) und damit für die Homogenität der Drug-Response der Zellpopulation. Der Parameter Z_B stellt den (Zeitbedingten-) Faktor dar, um den sich B-Steilheit ändert bei einer Verlängerung der Expositionsdauer von 24 auf 96 h.

5.4.2. Korrelation der B-Werte

Wie schon in Kapitel 5.4. erwähnt, können unterschiedliche Resistenzmechanismen für die Heterogenität der Drug Response verantwortlich sein. Es wäre denkbar, dass ein Resistenzmechanismus eine Spezifität für ein bestimmtes Agens besitzt, und bei einem anderen Agens seine Wirkung nicht entfaltet. Dies würde bedeuten, dass die für dieses Agens ermittelte Heterogenität der Drug Response nicht notwendigerweise mit der Heterogenität der Drug Response bei Exposition mit einer anderen Substanz einhergeht. Im Folgenden wird angenommen, dass Substanz-spezifische Gründe für die Drug Response den B-Wert eines Agens unabhängig von den B-Werten eines anderen Agens bestimmen. Umgekehrt bedeutet dies, dass Substanz-unspezifische Gründe, wie beispielsweise der Zellzyklus-Status den B-Wert aller Substanzen, deren Wirkung insbesondere vom Zellzyklus abhängt, ähnlich beeinflussen.

Um einen solchen Zusammenhang zu überprüfen, wurden die B-Steilheit-Werte aus den 6 Datensets von insgesamt 54 Patientenproben auf eine mögliche Korrelation untersucht. Auch hier wurde, wie bei der Überprüfung der Korrelation der LC-50% Werte, aufgrund der nicht normalverteilten Daten eine Rangkorrelation verwendet.

Die Tabelle 5.9. fasst die Untersuchungen qualitativ zusammen. In fast allen Konstellationen, nämlich in den Konstellationen DNR/IDA/MIT/VP16, fand sich eine Korrelation der B-Steilheit-Werte. Das Signifikanzniveau lag bei einem $p < 0,01$. Lediglich bei den Konstellationen TOP/MIT und TOP/VP16 und ARC/MIT lag das Signifikanzniveau bei einem $p < 0,05$. Die anderen Konstellationen mit ARC ergaben keine Signifikanz. Bei der

Konstellation IDA/TOP ließ sich nach Kendall eine Signifikanz von $p < 0,01$, nach Spearman von $p < 0,05$ nachweisen. Tabelle 5.10., bzw. Tabelle 5.11. fasst die Ergebnisse quantitativ nach Spearman, bzw. Kendall zusammen.

Diese Daten zeigen, dass unter den 4 Substanzen DNR/IDA/MIT/VP16 die Heterogenität im Drug Response hochgradig korreliert war. Die Heterogenität in der Drug Response bei ARC war jedoch völlig unabhängig von der Heterogenität der anderen Substanzen.

B-Slope	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	x	x	x	n.s.	n.s.
IDA	x	x	x	x /+	n.s.
MIT	x	x	x	+	+
VP16	x	x	x	+	n.s.
TOP	n.s.	x /+	+	+	n.s.
ARC	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.

Tabelle 5.9. Korrelation der B-Steilheit-Werte der 6 Zytostatika. Qualitative Angabe des erreichten Signifikanzniveaus. Die Analyse erfolgte als Rangkorrelation (Spearman / Kendall; x = $p < 0,01$, + = $p < 0,05$ n.s. = "nicht signifikant" in beiden Analysen, x / + = $p < 0,01$ Kendall / $p < 0,05$ Spearman).

B-Slope	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	0,3824	0,5438	0,4076	0,2394	0,1815
IDA	0,3824	0,6274	0,5150	0,3023	0,1304
MIT	0,5438	0,6274	0,6149	0,2921	0,2970
VP16	0,4076	0,5150	0,6149	0,3246	0,0358
TOP	0,2394	0,3023	0,2921	0,3246	0,1986
ARC	0,1815	0,1304	0,2970	0,0358	0,1986

Tabelle 5.10. Korrelation der B-Steilheit-Werte der 6 Zytostatik (Spearman Rang Test).

B-Slope	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
DNR	0,2768	0,3732	0,2875	0,1415	0,1287
IDA	0,2768	0,4931	0,3455	0,2398	0,0937
MIT	0,3732	0,4931	0,4298	0,2082	0,1982
VP16	0,2875	0,3455	0,4298	0,2236	0,0182
TOP	0,1415	0,2398	0,2082	0,2236	0,1429
ARC	0,1287	0,0937	0,1982	0,0182	0,1429

Tabelle 5.11. Korrelation der B-Steilheit-Werte der 6 Zytostatika (Kendall Rang Test).

5.5. Korrelation von LC-50% und B-Werten bei einzelnen Substanzen

Ziel der folgenden Untersuchung war, ob ein Zusammenhang hinsichtlich einer Korrelation zwischen den LC-50% Werten und der B-Steilheit einer bestimmten Substanz existiert. Hier sollte geklärt werden, ob eine hohe Chemoresistenz, d.h. ein hoher LC-50% Wert mit einer eher homogenen oder heterogenen Drug Response einhergeht. Dazu wurden die LC-50% Werte der 6 getesteten Substanzen mit den B-Werten auf eine mögliche Korrelation untersucht.

Tabelle 5.12. fasst die Daten für Substanzen zusammen. Für alle Zytostatika, bis auf Topotecan konnte ein hochsignifikanter ($p < 0,01$) Zusammenhang zwischen den LC-50% Werten und den B-Steilheit-Werten festgestellt werden. Bei diesen Substanzen ist also eine hohe Chemoresistenz mit einer homogenen Drug Response assoziiert. Bei Topotecan lag das Signifikanzniveau bei einem $p < 0,05$. Das kann bedeuten, dass in diesem Falle die an sich hohe Chemoresistenz gegenüber Topotecan, die sich in einem relativ hohen LC-50% Wert äussert, wahrscheinlich Ausdruck einer homogenen oder auch heterogenen Drug Response der Gesamtpopulation ist.

LC50% ~ B-Steilheit	DNR	IDA	MIT	VP16	TOP	ARC
R	0,31	0,32	0,34	0,29	0,23	0,30
$p < 0,05$	x	x	x	x	x	x
$p < 0,01$	x	x	x	x	-	x

Tabelle 5.12. Korrelation der LC-50% - und B-Steilheit Werte für die einzelnen Zytostatika (Spearman/Kendall Rang Test).

5.6. Relevanz der Zytogenetik für die LC-50% Werte

Im Folgenden wurden die LC-50% Werte bei den klar definierten zytogenetischen Subgruppen „prognostisch günstiger Karyotyp“ und „prognostisch ungünstiger Karyotyp“ bestimmt, ohne den Anspruch an eine statistische Analyse zu erheben, da die Fallzahlen der einzelnen interessierenden Gruppen zu gering waren. Die folgenden Aussagen sind also lediglich zur Orientierung gedacht.

Es wurden geringe LC-50% Werte bei prognostisch günstigen Karyotypen gefunden, im Gegensatz dazu wurden hohe LC-50% Werte bei den prognostisch ungünstigen Karyotypen gefunden. Diese Unterschiede erhielten teilweise deutliche Trends, jedoch keinerlei statistische Signifikanz im zweiseitigen Wilcoxon-Test.

6. DISKUSSION

Unbehandelt führt der Spontanverlauf der akuten myeloischen Leukämie in kurzer Zeit zum Tode. Trotz moderner Therapien konnte im Rahmen von großen randomisierten Studien bisher für die Gesamtgruppe der Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate – was in der Regel mit der Heilung der AML gleichgesetzt wird – von nur 25 - 40% erreicht werden (Buchner *et al.*, 1999, Burnett *et al.*, 1998). Tritt ein Rezidiv der AML auf, so verschlechtert sich die Prognose dieser Patienten noch deutlich (Estey, 2000). Bei Patienten mit primär therapierefraktärer Erkrankung ist die Prognose infaust und geht de facto gegen 0 hinsichtlich des Langzeitüberlebens von 5 Jahren. Für die meisten Patienten ist demnach der letale Krankheitsverlauf Ausdruck einer entweder von vorneherein bestehenden oder sich im Laufe der Zeit entwickelnden Therapieresistenz der AML. Da die systemische zytotoxische Therapie weiterhin Therapiemodalität der ersten Wahl bei der Behandlung der AML bleibt, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit in erster Linie mit dem Problem der Chemotherapieresistenz. Ein besseres Verständnis von Therapieresistenzen ist nötig, um die multiplen potentiellen Resistenzmechanismen hinsichtlich ihrer Relevanz für den klinischen Verlauf einzuschränken. Ziel dieser Arbeit war es demnach nicht, einen oder einige wenige Resistenzmechanismen genauer zu charakterisieren. Es sollte vielmehr versucht werden, das große Feld der möglichen Resistenzmechanismen sinnvoll einzuengen, um damit zukünftigen Untersuchungen eine Orientierung hinsichtlich der klinischen Relevanz zu geben.

Hierzu wurde eine große Anzahl an AML Proben bezüglich ihrer in-vitro Chemosensitivität auf insgesamt sechs Substanzen untersucht. Diese sechs Substanzen umfassen die wesentlichen Chemotherapeutika, die weltweit in der Induktions-, Konsolidierungs- und Rezidivtherapie bei der Behandlung der AML zum Einsatz kommen. Zur Charakterisierung der Chemosensitivität wurden letztlich zwei Größen verwendet.

1.) LC-50% Wert (letale Konzentration 50%): Dieser Wert beschreibt die Konzentration eines Zytostatikums, bei der die Viabilität der behandelten Zellen relativ zu unbehandelten Kontrollgruppe nur noch 50% beträgt. Dieser Wert hat mehrere Vorteile. Zunächst ist er sehr reliabel durch die Vielzahl an Messungen, die in ihn eingehen. Er wird weltweit von den meisten Arbeitsgruppen, die sich mit der in-vitro Chemosensitivität beschäftigen als Referenz verwendet. Mithilfe des LC-50% Wertes kann damit eine Vergleichbarkeit der Chemosensitivitäten sowohl zwischen den verschiedenen Substanzen als auch zwischen den verschiedenen Patientenproben ermöglicht werden. Zudem können die LC-50% Werte der Patienten für jede Substanz nach ihrem Rang (höchste Resistenz, zweithöchste etc.) geordnet und damit ein gewisses „Ranking“ erstellt werden.

2.) Parameter B (Responsehomogenität): Der Parameter B (-Steilheit) wurde aus der Gleichung $y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) + D$ ermittelt. Diese Gleichung beschreibt die jeweiligen

Konzentrations/Effekt-Kurven, und der Parameter B beschreibt die Steilheit des Übergangs von dem einen asymptotischen Teil der Kurve zum anderen asymptotischen Teil. Dieser Wert ist pragmatisch und kann prinzipiell aus allen Konzentrations/Effekt-Kurven von Zytostatika ermittelt werden (Levasseur *et al.*, 1998, Gardner 2000). Die Steilheit der Kurve ist wiederum ein wichtiges Maß für die Homogenität, bzw. Heterogenität einer Zellpopulation hinsichtlich ihres Ansprechens auf eine Substanz. Verdeutlichen lässt sich dies an zwei Extremsituationen. Das eine Extrem stellt einen B-Wert dar, der gegen unendlich geht. Hier handelt es sich um eine Stufenbildung in der Konzentrations/Effekt-Kurve: Bis zu einer gewissen kritischen Konzentration an Agens kommt es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu keinem Viabilitätsverlust, aber bei Überschreiten genau dieser kritischen Konzentration kommt es zu einem massiven Viabilitätsverlust. Hier geht die Viabilität der Zellen gewissermaßen gegen 0. In diesem Fall hätte die Zellpopulation hinsichtlich ihres Ansprechens auf ein Agens ein absolut homogenes Verhalten gezeigt. Das andere Extrem stellt ein sehr geringes Gefälle innerhalb der Kurve dar. Dies bedeutet, dass schon bei geringen Konzentrationen an Agens Anteile der Gesamtpopulation absterben, d. h. ein chemosensitives Verhalten zeigen. Andererseits sterben andere Anteile der Gesamtpopulation erst bei sehr hohen Zytostatikakonzentrationen ab, d.h. sie reagieren eher chemoresistent. In diesem Fall zeigt die getestete Zellpopulation ein heterogenes Ansprechen auf das getestete Agens. Der Parameter B ist demnach ein wichtiges Maß, um die Konzentrations/Effekt-Kurven hinsichtlich ihrer Steilheit zu charakterisieren.

Eine weitere Kenngröße für die Charakterisierung der Chemosensitivität ist der Parameter Z_{LC} (Expositionszeitabhängigkeit der LC-50%). Dieser hat vor allem aus klinisch-therapeutischer Sicht eine große Bedeutung. Wünschenswert ist die Konstellation: Verlängerung der Expositionszeit und dadurch eine deutlich homogenere Drug Response. Das wäre ein Hinweis darauf, dass insbesondere funktionelle Unterschiede – im konkreten Fall der Zellzyklusstatus zum Zeitpunkt der Exposition – für die Heterogenität der Drug Response verantwortlich sind. In der Literatur sind Fälle beschrieben, bei denen eben diese Unterschiede durch die Verlängerung der Expositionszeit relativiert werden (Ozawa *et al.*, 1989, Gardner 2000). Aus den hier erhobenen Daten konnte die oben genannte wünschenswerte Konstellation nicht erhoben werden, da die Fallzahl hier zu klein war, um eine fundierte statistische Aussage machen zu können.

Ad 1.) Die LC-50% Werte zeigten für alle getesteten Substanzen eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität. Dieser Umstand spiegelt sich in den entsprechenden Variationskoeffizienten wider. Sie bewegten sich in einem breiten Wertebereich mit einem Minimum von 1,16 für VP16 und einem Maximum von 4,55 für Daunorubicin. Die LC-50% Werte lagen jedoch in Bereichen, die nach in-vivo Applikationen der jeweiligen Substanzen erreicht oder übertroffen werden. Der wesentliche Befund war jedoch, dass trotz dieser

hohen Variabilitäten bei fast allen Substanzen eine hochsignifikante Korrelation der LC-50% Werte beobachtet werden konnte ($p < 0,01$ in fast allen Vergleichen). Lediglich in der Konstellation AraC/VP16 konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Das bedeutet, dass im Falle einer hohen Resistenz gegen beispielsweise Mitoxantron (hoher LC-50% Wert) auch mit einer ausgeprägten Resistenz gegen Topotecan oder Daunorubicin (hohe LC-50% Werte) zu rechnen ist. Hingegen wäre es sehr unwahrscheinlich, an der gleichen Patientenprobe mit einer deutlichen Resistenz gegen Mitoxantron eine ausgeprägte Sensitivität gegen Topotecan oder Daunorubicin (niedrige LC-50% Werte) zu finden. Dagegen kann nach den vorliegenden Daten im Falle einer hohen Resistenz gegen VP16 mit einer weniger hohen Resistenz, gegebenenfalls sogar mit einer gewissen Sensitivität gegenüber AraC gerechnet werden. Letztlich wurde aber mit der oben genannten Ausnahme eine ausgeprägte kollaterale Chemosensitivität/-resistenz bei dieser Gruppe von AML vorgefunden. Weiter unten ist als Abbildung 6.1. die schon im Kapitel der „Fragestellung“ abgebildete Grafik aufgeführt. Diese Grafik verdeutlicht noch einmal das Prinzip der kollateralen Chemosensitivität. Nach Analyse der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten entsprechen die Ergebnisse einer kollateralen Sensitivität/Resistenz, wie im rechten Teil der Grafik demonstriert. Ein ausgeprägtes heterogenes Resistenzmuster, wie im linken Teil der Grafik dargestellt, ist nach diesen Daten eher unwahrscheinlich.

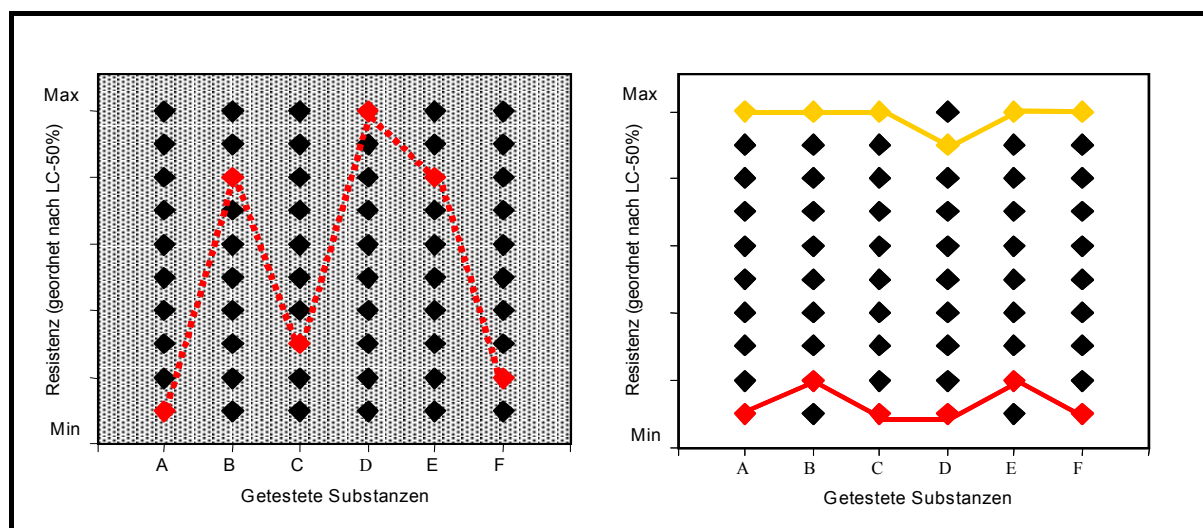


Abbildung 6.1. Darstellung des Prinzips der kollateralen Chemosensitivität. Hier ist beispielhaft eine Testung von insgesamt 6 Substanzen (A – F) an 10 Patienten aufgeführt. Für jeden Patienten wird für jede Substanz der LC-50% Wert (Letale Konzentration 50% - als Kenngröße für die Chemoresistenz) erhoben. Diese LC-50% Werte der 10 Patienten werden für jede Substanz nach ihrem Rang (höchste Resistenz, zweithöchste etc.) geordnet. Es wurde eine hochgradige Korrelation der LC-50% Werte für alle 6 getesteten Substanzen gefunden. Diese Ergebnisse entsprechen einer kollateralen Sensitivität/ Resistenz wie im rechten Teil der Graphik demonstriert. Ein heterogenes Resistenzmuster auf diese Substanzen in einer Zellpopulation wie im linken Teil dargestellt, ist nach diesen Daten eher unwahrscheinlich.

Ad 2.) Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die Responsehomogenitäten von Blastenpopulationen auf die aufgeführten Therapeutika an einer großen Anzahl an Patientenproben unter Verwendung des Parameters B ermittelt. Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Daten ergaben nach ihrer Analyse folgendes: Die Responsehomogenität innerhalb einer Blastenpopulation unterschied sich signifikant zwischen den sechs verschiedenen Substanzen. Die Drug Response war am homogensten im Fall von Daunorubicin (hoher B-Wert von 1,48). Die Drug Response war am heterogensten im Fall von VP16 (niedriger B-Wert von 0,55). Für die restlichen Substanzen Idarubicin, Mitoxantron, Topotecan und AraC bewegte sich die Drug Response in einem intermediären Bereich (B-Werte zwischen 0,71 und 0,95). Relevanter als die Unterschiede in der Responsehomogenität zwischen den einzelnen Substanzen ist die interindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Patientenproben. Diese spiegeln sich in den entsprechenden Variationskoeffizienten wider. Sie bewegten sich in einem Wertebereich mit einem Minimum von 1,23 für Idarubicin und einem Maximum von 1,89 für Daunorubicin. Ein heterogenes Ansprechen (d.h. ein niedriger B-Wert) innerhalb einer Blastenpopulation birgt das Risiko in sich, dass trotz einer hohen Chemosensitivität des Großteils der Blasten (relativ niedriger LC-50% Wert) auf eine applizierte Therapie, eine kleinere nicht ansprechende relativ chemorefraktäre Subgruppe noch vorliegen kann. Insofern hat der Parameter B eine Bedeutung in der Abschätzung des Verbleibs residueller Zellen. Denn genau diese verbleibenden Zellen könnten dann für die Entwicklung einer MRD (minimal residual disease) oder für ein Rezidiv verantwortlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals auch ein Zusammenhang zwischen der Chemosensitivität –ausgedrückt durch den LC-50% Wert– und der Responsehomogenität –ausgedrückt durch den Parameter B– ermittelt werden. Das Ergebnis aus den hier verwendeten Daten ergab folgendes Bild: Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen den LC-50% Werten und der B-Steilheit. Das bedeutet, dass im Falle einer im Durchschnitt sehr resistenten AML (hoher LC-50% Wert) ein relativ homogenes Ansprechen (hoher B-Wert) vorzufinden war. Im Falle einer im Durchschnitt relativ sensitiven AML (niedriger LC-50% Wert) war ein eher heterogenes Ansprechen (niedriger B-Wert) vorzufinden.

Aus klinisch-therapeutischer Sicht ist zwar eine hohe Responsehomogenität wünschenswert, da man hier davon ausgehen könnte, dass die Anzahl residueller Zellen nach erfolgter Therapie als sehr gering anzusehen ist. Dagegen kann die oben genannte Konstellation „hoher LC-50% Wert in Verbindung mit einem hohen B-Wert“ nicht positiv bewertet werden. Vielmehr bedeutet dieser Zusammenhang, dass eine hohe Therapieresistenz in Verbindung mit einer hohen Homogenität Folge eines stattgehabten Selektionsprozesses sein kann. Das bedeutet, dass aus einer zunächst heterogenen Zellpopulation durch einen Selektionsprozess sensitive Subgruppen zugrunde gehen, wohingegen die resistenten

Subpopulationen persistieren. Allerdings ist ein solcher Mechanismus des Selektionsdruckes bisher noch nicht bewiesen. Bei vorbehandelten Patienten kann der Selektionsprozess durch die Chemotherapie erklärt werden. Die sensitiven Subpopulationen sterben durch die zytostatische Therapie ab, wohingegen die resistenten Subgruppen aufgrund des Selektionsvorteils überleben und für die MRD verantwortlich sein oder nach einem gewissen Zeitraum ein Rezidiv verursachen können. Die ursprüngliche Blastenpopulation hätte demnach einen Evolutionsprozess durchlaufen, bei dem es durch Selektionsdruck durch die zytostatische Therapie zu einer homogeneren therapieresistenteren Population gekommen ist. Bei nicht vorbehandelten Patienten müsste ein solcher Selektionsprozess endogen erfolgen, d.h. nicht durch äußere Einflüsse bedingt, wie beispielsweise durch Chemotherapeutika. Ein autologer antileukämischer Immuneffekt und ein zur klinischen Manifestation führender „immune escape“ sind als Selektionskriterium zwar einleuchtend, aber sie erklären eine verminderte Sensitivität des selektionierten Subklons lediglich hinsichtlich immunologischer Effektormechanismen. Eine solche Resistenz muss nicht, kann aber mit einer vermehrten Resistenz gegenüber Zytostatika zusammenhängen (Campone *et al.*, 2001).

Der Nachweis einer ausgeprägten kollateralen Chemosensitivität/-resistenz bei nicht vorbehandelten Patienten, d.h. Patienten, deren Blasten noch keinem Selektionsdruck durch eine Chemotherapie unterworfen waren, kann demnach unterschiedliche Ursachen haben. Vor der Diskussion dieser möglichen Ursachen wird der funktionelle Ablauf der Apoptose besprochen:

Die geordnete Zerstörung der zellulären Strukturen im Rahmen der Apoptose wird koordiniert (und teilweise selbst durchgeführt) durch eine Familie von Cystein Proteasen, den sogenannten Caspasen (Sadowski-Debbing *et al.*, 2002). Ein ganz wesentlicher Punkt in der typischen Apoptose ist die Aktivierung der Caspase 3 über mehrere Effektorcaspasen durch die unterschiedlichen von upstream kommenden Signale (intrinsic/extrinsic pathway). Ein Aktivierungspfad bedarf besonderer Erwähnung, da er sich auf die zellvermittelte Zytotoxizität - im Allgemeinen von zytotoxischen T-Zellen – bezieht. Dieser Aktivierungspfad kann offensichtlich die initialen regulatorischen Anteile der Kaskade überspringen und direkt die Caspase 3 proteolytisch aktivieren durch die Serinprotease Granzyme B, welches Perforin – vermittelt intrazellulär freigesetzt wird (Martin *et al.*, 1996). Die Caspase 3 stellt gewissermaßen eine zentrale Koordinationsstelle innerhalb der Caspasen dar, da sie von allen wesentlichen apoptoseinduzierenden Pfaden angesteuert wird und als Eintrittspforte in die Effektorphase der Apoptose wirkt. Letztlich kommt es dann zur Zerstörung der zellulären Strukturen und damit zum programmierten Zelltod. Ein Problem im Ablauf dieses Effektormechanismus könnte einen gravierenden Einfluss auf die Wirksamkeit aller getesteten Substanzen haben. Eine defekte Apoptose wäre demnach ein potentieller Grund für eine ausgeprägte kollaterale Chemoresistenz.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene hochgradig kollaterale Chemosensitivität/-resistenz bei klinischer AML macht substanzspezifische Faktoren für alle getesteten Substanzen als limitierende Resistenzmechanismen für das Gros der leukämischen Blasten unwahrscheinlich.

1.) Denkbar wäre beispielsweise das zufällige Auftreten verschiedener substanzspezifischer Mechanismen, die zwar untereinander in keinem engeren Zusammenhang stehen, aber in ihrer Summe das Bild einer kollateralen Chemosensitivität hervorrufen können. Eine solche Konstellation wäre möglich, erscheint aber extrem unwahrscheinlich.

Ebenso denkbar wäre das zufällige Zusammentreffen von substanzspezifischen und substanzunspezifischen Mechanismen, die in ihrem Zusammenspiel eine ähnlich ausgeprägte (=kollaterale) Chemosensitivität/-resistenz verursachen. Die xenobiotische Funktion der Transporterproteine wird beispielsweise häufig als Ursache einer substanzübergreifenden breiten Resistenz angesehen. Dass die Transporterproteine auch für antileukämisch, zytostatisch wirksame Substanzen wirksam sind, ist unbestritten. Dennoch lässt sich bei ihnen eine gewisse Substanzspezifität nachweisen. Für die AML sind hauptsächlich die Transporterproteine MDR 1, MRP 1 mit ihren Homologen MRP 2-7 und MXR, auch BCRP genannt, beschrieben. Transportiert werden bis auf das Nukleosidanalogen AraC alle fünf der hier verwendeten Zytostatika (van der Kolk *et al.*, 2002). Dass nun eine hochgradige Korrelation und damit eine kollaterale Chemosensitivität zwischen diesen fünf Substanzen besteht, wurde im Ergebnisteil Kapitel 5.3.2. dieser Arbeit beschrieben. Dennoch ist es fraglich, die ABC Transporter als substanzunabhängigen limitierenden Resistenzmechanismus zu betrachten, da die unterschiedlichen Proteine durchaus eine gewisse Substanzspezifität zeigen. MDR 1, beziehungsweise das von ihm exprimierte p-Glykoprotein transportiert bevorzugt die Anthracycline Daunorubicin und Idarubicin, sowie das Podophyllotoxinderivat VP16 nach extrazellulär. MXR transportiert hauptsächlich das Anthracendion Mitoxantron und den Topoisomerase I - Inhibitor Topotecan nach extrazellulär. MRP 2 sorgt bevorzugt für den Efflux von VP16. Abgesehen von dieser nicht eindeutigen Substratspezifität der ABC Transporterproteine unterscheiden sich die einzelnen Proteine darin, dass nicht alle Proteine in ihrer Anzahl gleichwertig auf der Zelloberfläche vertreten sind. Außerdem ist die Efflux Funktion und Effektivität der einzelnen Proteine nicht gleichwertig. Selbst innerhalb der transportierbaren Gruppe an Substraten unterscheidet sich die Spezifität und Kapazität der einzelnen Transporterproteine. Demnach bleibt es fragwürdig, die ABC Transporterfamilie als limitierenden Resistenzmechanismus zu betrachten.

2.) Eine weitere denkbare Erklärungsmöglichkeit für die kollaterale Chemosensitivität könnte in einer effektiven Reparatur der durch die Zytostatika verursachten DNA – Schäden liegen. Alle sechs Substanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, induzieren DNA – Schäden. Eine zytotoxische Wirkungsweise der Substanzen ohne DNA – Schäden ist nicht bewiesen und erscheint auch sehr unwahrscheinlich. Ein hohes Ausmaß an schneller und effektiver DNA- Reparatur führt zur Minimierung der gesetzten Läsionen und könnte damit die Wirksamkeit aller aufgeführten Substanzen verringern und so zu dem Bild der kollateralen Chemosensitivität führen (Bernstein *et al.*, 2002, Jackson, 2002). Diese DNA- Schäden stellen die sogenannten Primärläsionen (im wesentlichen sind dies DNA – Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Interstrand Crosslinks, DNA Mismatch) dar, welche von zellulären Faktoren erkannt und als wichtig genug anerkannt werden müssen, damit die Apoptose in Gang gesetzt wird. Dass die Apoptose der entscheidende Effektormechanismus im Rahmen der chemotherapieinduzierten Zytotoxizität ist, gilt als gesichert (Schimmer *et al.*, 2001). Die Art und die Schwere der Schäden variieren und hängen unter anderem mit der Art der applizierten Substanz zusammen. Aber letzten Endes führen die induzierten Schäden immer zu den (schon in geringer Menge immer tödlichen) Doppelstrangbrüchen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass mindestens sieben verschiedene Reparatursysteme, an denen eine Vielzahl an Proteinen beteiligt sind, existieren, welche teilweise überlappend, teilweise unabhängig voneinander die diversen durch Zytostatika induzierten Schäden reparieren (Skorski 2002). Eine hohe Effektivität und Kapazität in der DNA-Reparatur und die damit verbundene effektive Minimierung eines Großteils der gesetzten DNA-Schäden wäre also eine Erklärungsmöglichkeit für die kollaterale Chemosensitivität.

3.) Die durch die Substanzen verursachten DNA-Schäden müssen nun entsprechend hoch sein und von bestimmten zellulären Faktoren als wichtig genug anerkannt werden, damit die Zelle in den Prozess der Apoptose gelangt. Denn die Zelle ist durchaus in der Lage mit einem gewissen DNA-Schaden weiterzuleben und sich zu teilen, was aufgrund der akquirierten Schäden im Erbgut der Zelle von Bedeutung sein kann. An der Reparatur der DNA-Schäden sind sieben unterschiedliche, sich teils überlappende Reparaturmechanismen mit einer Vielzahl an Proteinen beteiligt, deren vorrangiges Ziel die Eliminierung der DNA-Schäden darstellt. Allerdings übernehmen diese Proteine bei Überschreiten eines gewissen Schwellenwertes an DNA – Schaden genau die gegenteilige Funktion. Sie sind nun nicht mehr an der Reparatur der DNA beteiligt, vielmehr induzieren sie in vielen Fällen die Apoptose und übernehmen eine zellzerstörerische Funktion (Bernstein *et al.*, 2002). Ab welchem Ausmass, das heißt wo genau dieser Schwellenwert liegt, ist bisher noch unklar. Ebenso ungeklärt ist derzeit der Mechanismus dieses

Funktionswandels der Proteine. Die somit proapoptotisch funktionierenden Proteine vermitteln ihre Funktion über das Tumorsuppressorgen p53. Dieser Schritt ist ein nicht kompensierbarer Knotenpunkt in der Apoptoseinduktion. Die Funktion dieses Gens ist jedoch auch von einem Schwellenwert abhängig. Bei niedrigen und reparablen Schäden an der DNA überwiegt bei p53 die zellerhaltende Funktion, in dem es die Expression von Reparaturenzymen induziert. Bei hohen irreparablen Schäden an der DNA überwiegt bei p53 die proapoptotische Funktion. P53 fungiert dann als zentraler Knotenpunkt, der die proapoptotischen Signale weiterleitet.

Die mögliche Relevanz einer mangelhaften Wahrnehmung von an sich adäquaten Primärläsionen für eine Chemotherapieresistenz lässt sich anhand einer Studie verdeutlichen. In klinischen AML Proben war bei einer geringen Expression von DNA – PK (dies ist ein solches Protein mit dualen Eigenschaften, das nach Übertreten des Schwellenwertes seine proapoptotischen Funktion übernimmt) eine deutlich erhöhte Chemoresistenz aufgetreten (Eriksson *et al.*, 2002). Das insuffiziente Sensing von an sich suffizienten DNA – Schäden wäre als substanzübergreifender Mechanismus mit limitierender Resistenz eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete ausgeprägte Chemosensitivität/-resistenz.

4.) Eine weitere Erklärung für die kollaterale Chemosensitivität/-resistenz wäre die Möglichkeit, dass eine an sich aktivierte und funktionsfähige Apoptose durch antiapoptotisches Signalling inhibiert wird. Der programmierte Zelltod wird unter anderem über proapoptotisch und antiapoptotisch wirksame Faktoren gesteuert. In der Literatur ist eine Verschiebung des bax/bcl-2 Verhältnisses zugunsten des antiapoptotisch wirksamen Proteins bcl-2 und zuungunsten des proapoptotisch wirksamen Proteins bax beschrieben (Kornblau *et al.*, 2000). Andere Studien beschäftigen sich mit Proteinen, die unter anderem die Caspase 3 inhibieren. Diese Proteine heißen IAPs, inhibitors of apoptosis. Sie wirken noch relativ spät in der Apoptosekaskade ein. Die vermehrte Expression von Survivin, einem Vertreter dieser IAPs, soll in Zusammenhang stehen mit einer erhöhten Therapieresistenz (Kornblau *et al.*, 2000).

Dennoch ist zurzeit ungeklärt, ob allein der qualitative Nachweis oder die vermehrte Expression solcher antiapoptotisch wirksamer Proteine oder die verminderte Expression proapoptotisch wirksamer Proteine ursächlich sein kann für eine kollaterale Chemosensitivität, bzw.- resistenz.

Zuletzt soll noch ein Punkt andiskutiert werden, der eventuell von klinischer Bedeutung sein könnte. Wie bereits in diesem Kapitel erwähnt, gibt es mehrere Wege, über welche die Effektorcaspasekaskade in Gang gesetzt wird. Zytotoxische T-Zellen aktivieren direkt die Caspase 3 proteolytisch durch die Serinprotease Granzyme B. Mithilfe einer positiven

Verstärkung durch die Aktivierung des mitochondrialen/ Apoptosom Pfades (Sutton *et al.*, 2003) kommt es nun zur Aktivierung der Effektorcaspasekaskade. Pro- und antiapoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie haben hierbei regulierende Wirkung. Damit könnte die T-Zell vermittelte Zytotoxizität auf ähnliche Weise unterwandert werden wie die zytotoxische Chemotherapie, nämlich beispielsweise durch eine Überexpression der antiapoptotischen Mitglieder der bcl-2 Familie.

In der Literatur sind allerdings Beispiele beschrieben, bei denen das Ansprechen auf die Chemotherapie und der weitere klinische Verlauf von Patienten mit besonders problematischer AML, das heißt AML mit einem komplex aberrantem Karyotypen sehr schlecht sind. Aber gerade diese AML scheinen auf einen immunologischen Effekt anzusprechen, das heißt auf die T-Zell vermittelte Zytotoxizität im Rahmen einer allogenen Knochenmarkstransplantation (Chalandon *et al.*, 2002, Schmid *et al.*, 2003).

Folgende Erklärung dieser klinischen Befunde ist nun denkbar. Es kommt zur Aktivierung der Apoptose über die Caspase 3 durch Granzyme B, damit wäre die T-Zell vermittelte antileukämische Wirkung bei allogenen Knochenmarkstransplantation erklärt. Gleichzeitig ist die zytotoxische Chemotherapie nicht in der Lage, die Apoptose zu induzieren, damit wäre das Nicht-Ansprechen der AML auf die Chemotherapie erklärt. Nach dieser Auslegung der Befunde wäre eine Inhibierung einer an sich funktionstüchtigen Apoptose durch antiapoptotisches Signalling als eine Erklärungsmöglichkeit für einen limitierenden Resistenzmechanismus eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend ist der Befund der kollateralen Chemosensitivität am ehesten mit dem substanzübergreifenden Mechanismus der Apoptose vereinbar. Als limitierende Resistenzmechanismen im Ablauf der Apoptose kommen sowohl die effektive Reparatur Zytostatika-induzierter DNA – Schäden als auch ein insuffizientes Sensing dieser Schäden mit konsekutivem Ausbleiben eines proapoptotischen Signals in Frage.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die wesentliche Motivation dieser Arbeit lag in der hohen Rate der entweder von vorneherein vorhandenen Resistenz bei AML Blasten mit dem klinischen Bild einer refraktären AML oder der sich entwickelnden Resistenzen mit dem klinischen Bild eines Rezidives. Nach wie vor ist die Langzeitprognose der Patienten mit AML schlecht und als Folge dieser Resistenzmechanismen zu werten.

In dieser Arbeit wurden deswegen Untersuchungen vorgenommen, die die Anzahl der potentiellen Resistenzmechanismen sinnvoll eingrenzen sollte. Dazu wurden Chemosensitivitätsprofile für die sechs weltweit am häufigsten in der Primär- und Rezidivtherapie einer AML verwendeten Zytostatika entwickelt. Dies sind Cytarabin, Daunorubicin, Idarubicin, Mitoxantron, Etoposid und Topotecan. Insgesamt wurden Blasten von 57 Patienten mit der Primärdiagnose AML verwendet. Als Parameter zur genauen Beschreibung der Chemosensitivitätsprofile wurde zum einen der LC-50% Wert evaluiert, der die Konzentration einer Substanz angibt, welche die Zellviabilität um 50% senkt, zum anderen der Parameter B-Steilheit, der als Maß für die Responsehomogenität einer exponierten Zellpopulation fungiert. Die Responsehomogenität wurde hier erstmals quantitativ an einer grossen Anzahl an Patientenproben ermittelt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war die hochgradig korrelierte und damit kollaterale Chemosensitivität, bzw. -resistenz für das Gros der getesteten Substanzen. Lediglich für die Konstellation Etoposid und Cytarabin konnte keine Korrelation ermittelt werden. Aber beispielsweise ist im Falle einer hochgradigen Resistenz gegenüber Daunorubicin ebenfalls mit einer hochgradigen Resistenz gegenüber Topotecan seitens der Zelle zu rechnen. Diese Beobachtung stützt die These, dass substanzunabhängige Mechanismen für die limitierende Resistenz verantwortlich sind. Hingegen ist es sehr unwahrscheinlich, dass substanzabhängige Mechanismen für die limitierende Resistenz ursächlich sind.

Als wesentlicher substanzübergreifender Mechanismus kommt hier die Apoptose in Frage. Sie wird als der quantitativ entscheidende Effektormechanismus im Rahmen der chemotherapieinduzierten Zytotoxizität angesehen. Unstimmigkeiten und Probleme im Ablauf dieser komplizierten Maschinerie wären demnach ein einleuchtendes Beispiel für einen substanzunabhängigen Resistenzmechanismus und damit für die kollaterale Chemosensitivität. Im Ablauf der Apoptose kämen vor allen die effektive Reparatur der chemotherapieinduzierten DNA-Schäden und ein insuffizientes Wahrnehmen dieser DNA-Schäden als Resistenzmechanismus in Frage.

Damit erfolgte die Eingrenzung potentiell möglicher Resistenzmechanismen, die nun Gegenstand weiterer Untersuchungen sein können.

8. ANHANG - ROHDATEN

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht	Prognostische Subgruppe	Chromosomale Aberration
AH	1	53	1	ungünstig	44,XY,dic(5;17)(q11;p11),der(7)t(7;15)(q11;q22),-15[8], 46,XY[3]
BM	2	38	1	normal	46, XY[26]
BL	3	62	2	normal	46,XX[25]
BA	4	17	1	ungünstig	47, XY,+13,der(16)ins(16.X)(p13,??)[6], 48, idem,+13[1],50, idem,+7,+13,+19[2];51, idem,+7,+13,+19,+mar[2],46, XY[99]
BE	5	78	2	normal	46, XX[25]
BO	6	75	1	Signifikanz?	46, XY,i(17)(q10)[13] 46,XY[6]
CS	7	45	2		
DR	8	61	1	normal	46, XY[27]
DH	9	72	1	ungünstig	49, XY,+9,+14,+21[15] 46,XY[1]
EE	10	82	1		
EW	11	66	1	normal	46, XY[25]
EG	12	78	1	günstig	47, XY,+8,t(15,17)(q22,q21)[15]
GK	13	56	1	normal	46,XY
GK	14	70	1	normal	46, XY
HJ	15	58	1		
HP	16	21	1	Signifikanz?	46,XY,t(11;19)(q13;p13)[9], 46,XY[1]
HM	17	39	2	günstig	46, XX, inv(16)(p13q22)[22]
HE	18	77	2	normal	46, XX
HH	19	70	1	normal	46,XY[25]
HH	20	50	1	normal	46,XX[25]
HJ	21	59	1	normal	46, XY
HH	22	64	1	normal	46, XY
HK	23	56	1	normal	46, XY[20]

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht	Prognostische Subgruppe	Chromosomale Aberration
HB	24	62	1	günstig	46, XY,t(15;17)(q22;q21)[5] 46,XY, dup(8)(q11q24), t(15;17)(q22;q21)[5]
JO	25	78	1	ungünstig	46, XY,inv(3)(q21q26),del(7)(q22)[26]
KA	26	45	2	Signifikanz?	46,XX[6], 46,XY[14]
KA	27	65	2	günstig	46, XX,inv(16)(p13q22)[18] 47,XX,inv(16)(p13q22),+22[2]
KH	28	76	1	normal	46,XY[25]
KS	29	32	1		
KA	30	67	2	ungünstig	45, XX,del(4)(q23),der(17)t(17;18)(p11,p11),-18[12] 46,XX[4]
LU	31	42	1		
LW	32	37	1	normal	46, XY
LK	33	29	2	normal	46, XX[16]
MD	34	56	1	normal	46, XY[25]
MB	35	53	2	günstig	46, XX,inv(16)(p13q22)[17] 46, XX[3]
MK	36	59	1	normal	46, XY
MH	37	87	1	normal	46,XY[20]
MG	38	41	2	ungünstig	48,XX,dup(1)(q11q32),+del(7)(q21),del(7)(q11),t(8,22)(q24;q11), der(11)t(8;11)(?,q23),+12,t(14;18)(q32;q21),der(17)t(7;17)(p15;p13)[12]
NF	39	69	1	Signifikanz?	46, XY,del(11)(q23q2)[14],46, XY[11]
OA	40	42	2	normal	46, XX
OB	41	44	1	Signifikanz?	46, XY,t(3;12)(q26;p13)[25]; 46, XY
OH	42	72	1		
PJ	43	65	1	normal	46, XY
PE	44	77	1	ungünstig	43, XY,del(5)(q11),-17,-18,der(19)t(1;19)(p11;q13)[16]42,idem,-7, der(10)t(7;10)(q21;p15)[4]
QH	45	43	1	normal	46, XY
RC	46	22	1	günstig	46,XX,inv(16)(p13q22)[14], 46,XX[6]
RM	47	74	2	normal	46,XX
RJ	48	77	2	normal	46,XX[25]

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht	Prognostische Subgruppe	Chromosomale Aberration
SG	49	69	1	normal	46, XY
SC	50	60	2		
SD	51	40	2	ungünstig	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[23], 46,XX[2]
ST	52	16	2	Signifikanz?	46,XX,t(6;7)(q37;q22)[16], 46,XY[6]
TH	53	43	1	günstig	45, X,-Y,t(8;21)(q22,q22)[22]
TA	54			ungünstig	46, XY,t(9;22)(q34;q11)[1];46, XY,t(9;22)(q34,q11), der(17)t(1;17)(q21;q11),der(19)t(17;19)(q11;p13,3)[14],46, XY[3]
VK	55	36	1	Signifikanz?	46, XY,t(9;22)(q34;q11)[2];46, XY,t(9;22)(q34;q11),add(19)(p13)[12], 46XY[6]
WS	56	59	2	normal	46, XX
WA	57	49	2	ungünstig	47, XX,t(11;17)(q23;q25),+20[28]; 51XX,+5+6,t(11;17)(q23;q25), +19,+20,+21[4]; 4,XX[3]

Tabelle 8.1. Patientendaten - Biometrie und Zytogenetik.

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	LC 50% Daunorubicin	LC 50% Idarubicin	LC 50% Mitoxantron	LC 50% VP16	LC 50% Topotecan	LC 50% AraC
AH	1	0,123	0,053	0,058	14,155	20,000	40,000
BM	2	0,017	0,000	0,000	0,496	0,009	0,028
BL	3	0,075	0,036	0,200	8,072	0,076	1,875
BA	4	0,022	0,004	0,021	0,362	0,005	4,025
BE	5	0,000	0,006	0,203	0,457	0,076	0,245
BO	6	0,100	0,099	0,023	12,735	0,312	0,853
CS	7	0,193	0,023	0,057	35,416	0,056	0,580

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	LC 50% Daunorubicin	LC 50% Idarubicin	LC 50% Mitoxantron	LC 50% VP16	LC 50% Topotecan	LC 50% AraC
DR	8	0,342	0,140	0,717	11,276	1,139	4,139
DH	9	0,091	0,028	0,174	20,636	0,068	0,028
EE	10	0,975	0,188	0,674	8,035	0,022	1,184
EW	11	0,007	0,001	0,049	13,853	0,049	0,079
EG	12	0,023	0,004	0,009	1,436	0,222	0,334
GK	13	0,225	0,194	0,223	16,868	1,068	0,815
GK	14	0,020	0,033	0,597	1,215	1,423	6,942
HJ	15	0,042	0,005	0,081	16,116	0,041	0,300
HP	16	0,006	0,008	0,003	0,350	0,003	0,074
HM	17	0,042	0,011	0,013	4,440	0,010	1,111
HE	18	5,907	6,138	9,511	11,853	20,000	0,123
HH	19	0,039	0,006	0,011	4,030	0,032	0,831
HH	20	0,027	0,025	0,006	0,372	0,181	7,417
HJ	21	0,002	0,004	0,005	0,001	0,003	0,293
HH	22	0,933	0,704	0,848	21,276	0,737	5,259
HK	23	0,043	0,021	0,045	13,821	0,156	0,494
HB	24	0,016	0,010	0,406	0,870	0,082	2,087
JO	25	0,276	0,125	0,348	25,624	0,158	0,511
KA	26	0,102	0,099	0,097	20,147	0,130	0,151
KA	27	1,637	0,012	0,382	3,512	0,256	1,530
KH	28	0,108	0,004	0,025	7,976	0,032	5,868
KS	29	0,086	0,023	0,342	1,696	20,000	5,271
KA	30	0,280	0,100	0,073	5,484	0,027	10,061
LU	31	0,001	0,001	0,001	0,012	0,003	0,055
LW	32	0,025	0,074	0,020	11,196	0,757	0,811
LK	33	0,144	0,034	0,006	4,757	0,267	1,560
MD	34	0,101	0,161	0,065	40,300	0,078	15,323
MB	35	0,099	0,042	0,037	21,318	0,095	1,783
MK	36	4,865	0,000	0,024	5,264	0,043	1,688
MH	37	0,094	0,022	0,037	4,920	0,047	1,044

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	LC 50% Daunorubicin	LC 50% Idarubicin	LC 50% Mitoxantron	LC 50% VP16	LC 50% Topotecan	LC 50% AraC
MG	38	0,061	0,039	0,036	3,270	0,005	0,204
NF	39	1,848	0,002	0,007	1,310	3,547	3,547
OA	40	0,060	0,001	0,214	1,982	0,000	0,257
OB	41	0,125	0,028	0,246	1,586	2,949	1,079
OH	42	0,013	0,029	0,034	3,869	0,005	0,758
PJ	43	40,000	0,000	20,000	61,993	3,084	40,000
PE	44	0,638	0,087	0,286	16,977	0,235	0,374
QH	45	0,022	0,000	0,000	1,606	0,157	0,055
RC	46	5,113	6,743	13,633	8,511	12,234	2,904
RM	47	0,001	0,001	0,003	0,066	0,016	0,068
RJ	48	0,012	0,000	0,000	0,247	0,000	0,023
SG	49	0,100	0,081	5,310	0,136	0,136	40,000
SC	50	0,023	0,007	0,021	0,713	0,017	1,083
SD	51	0,082	0,052	0,050	2,163	0,036	0,177
ST	52	0,115	0,058	0,048	21,906	0,317	2,823
TH	53	0,106	0,029	0,123	3,971	0,741	1,741
TA	54	0,697	20,000	0,507	27,037	19,212	20,602
VK	55	0,055	0,036	0,028	13,749	20,000	18,450
WS	56	1,138	0,232	1,106	26,287	0,407	0,852
WA	57	0,092	0,135	0,193	20,122	0,974	3,463

Tabelle 8.2. Rohdaten der LC 50%-Messungen.

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	B-Daunorubicin	B-Idarubicin	B-Mitoxantron	B-VP16	B-Topotecan	B-AraC
AH	1	5,114	0,257	0,229	0,329	7,419	24,447
BM	2	0,563	0,106	0,084	0,129	0,201	0,204
BL	3	1,326	1,334	2,001	1,991	1,199	0,864
BA	4	1,489	0,365	0,704	0,312	2,455	8,138
BE	5	0,586	0,131	0,822	0,5	4,463	1,571
BO	6	16,354	9,498	1,239	2,525	1,97	5,391
CS	7	0,972	0,137	0,121	0,546	0,131	2,775
DR	8	43,249	4,812	9,406	12,669	0,819	1,682
DH	9	8,079	1,715	7,409	1,549	0,686	1,13
EE	10	8,42	0,667	0,664	0,489	0,295	6,904
EW	11	0,696	5,834	0,888	0,313	0,334	0,512
EG	12	1,259	1,019	0,764	0,843	1,635	0,664
GK	13	2,168	2,755	1,223	2,25	6,188	1,117
GK	14	0,072	0,086	0,264	0,111	0,091	2,352
HJ	15	0,793	0,282	0,867	2,612	0,27	1,109
HP	16	1,184	7,272	2,278	0,634	0,78	1,145
HM	17	0,794	0,746	0,545	0,359	0,806	0,555
HE	18	0,324	0,935	0,56	1,309	0,427	5,49
HH	19	1,141	0,532	0,336	0,296	0,371	0,98
HH	20	3,841	3,08	6,137	1,394	7,401	3,514
HJ	21	0,448	0,75	0,314	0,372	0,376	0,257
HH	22	45,496	8,428	12,508	4,134	0,269	0,299
HK	23	1,618	2,099	0,959	1,768	1,98	0,66
HB	24	5,82	0,359	1,069	0,493	0,359	2,253
JO	25	0,375	0,684	0,299	0,711	0,642	0,454
KA	26	4,791	6,132	5,876	2,898	8,708	0,442
KA	27	4,798	7,421	0,711	0,933	0,559	2,334
KH	28	1,475	0,088	0,101	0,315	0,1	0,4
KS	29	1,51	0,601	0,298	0,185	0,689	11,937

Patienten - Initialen	Patienten Nr.	B-Daunorubicin	B-Idarubicin	B-Mitoxantron	B-VP16	B-Topotecan	B-AraC
KA	30	2,479	7,903	0,816	0,602	0,73	0,79
LU	31	0,387	6,315	0,547	8,488	0,509	0,628
LW	32	0,129	0,109	0,093	2,278	5,275	0,136
LK	33	0,468	0,353	0,088	0,255	0,265	1,124
MD	34	5,857	0,981	0,737	12,855	7,301	0,86
MB	35	13,73	1,376	0,793	2,95	8,616	1,312
MK	36	2,776	0,166	0,123	0,468	0,6	0,4
MH	37	1,881	0,554	0,362	0,0334	0,758	0,957
MG	38	0,936	0,832	0,409	0,309	0,138	0,35
NF	39	0,09	0,065	0,058	0,173	1,42	0,247
OA	40	0,999	3,003	0,177	0,553	0,05	0,957
OB	41	5,999	0,512	0,234	0,439	0,35	0,52
OH	42	0,55	0,496	0,227	0,345	0,099	0,519
PJ	43	1,293	0,044	7,544	0,624	0,068	8,111
PE	44	6,976	4,912	2,851	2,307	2,301	0,553
QH	45	0,779	0,076	0,047	0,376	6,14	0,702
RC	46	15,938	5,651	1,955	0,931	1,348	1,687
RM	47		2,659	1,694	0,742	0,592	0,845
RJ	48	1,739	0,34	0,094	0,985	0,341	0,427
SG	49	5,488	4,485	1,418	1,144	1,11	
SC	50	1,167	0,758	0,17	0,158	0,762	0,434
SD	51	1,487	0,784	0,749	0,452	0,376	0,68
ST	52	8,07	0,515	0,723	0,36	0,706	0,935
TH	53	0,771	0,493	0,17	0,231	1,138	1,157
TA	54	0,773	8,917	0,646	0,461	2,622	11,651
VK	55	0,353	1,079	0,794	0,812	1,273	11,174
WS	56	7,244	0,621	1,665	1,452	0,727	0,541
WA	57	1,898	6,69	2,771	0,523	12,87	3,938

Tabelle 8.3. Rohdaten der B-Steilheit-Messungen.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Anonymous. (1997):

World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects.

Cardiovasc Res, 35(1): 2-3.

Appelbaum FR, Dahlberg S, Thomas ED, Buckner CD, Cheever MA, Clift R A, Crowley J, Deeg HJ, Fefer A, Greenberg PD et al. (1984):

Bone marrow transplantation or chemotherapy after remission induction for adults with acute nonlymphoblastic leukemia. A prospective comparison.

Ann Intern Med, 101(5): 581-8.

Appelbaum FR, Kopecky KJ. (1997):

Long- term survival after chemotherapy for acute myeloid leukemia: the experience of the Southwest Oncology Group.

Cancer, 80 (11 Suppl): 2199-204.

Beck WT, Morgan SE, MO YY, Bhat UG. (1999):

Tumor cell resistance to DNA topoisomerase II inhibitors: new developments.

Drug Resist Updat, 2 (6): 382-389.

Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. (2002):

DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis.

Mutat Res, 511(2): 145-78.

Bishop JF. (1997):

The treatment of adult acute myeloid leukemia.

Semin Oncol, 24(1): 57-69.

Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D, Bradstock K, Enno A, Wolf MM, Fox R, Cobcroft R, Herrmann R, van der Weyden M, Lowenthal RM, Page F, Garson OM, Juneja S. (1996):

A randomized study of high-dose cytarabine in Induction in acute myeloid leukemia.

Blood, 87(5): 1710-7.

Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ. (1998):

Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype.

Cancer Res, 58(18): 4173-9.

Braess J, Voss S, Jahns-Streubel G, Schoch C, Haferlach T, Kern W, Keye S, Schleyer E, Hiddemann W. (2000):

The pharmacodynamic basis for the increased antileukemic efficacy of cytosine arabinoside-based treatment regimens in acute myeloid leukaemia with a high proliferative activity.

Br J Haematol, 110(1): 170-9.

Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, Loffler H, Gassmann W, Haferlach T, Fonatsch C, Haase D, Schoch C, Hossfeld D, Lengfelder E, Aul C, Heyll A, Maschmeyer G, Ludwig WD, Sauerland MC, Heinecke A. (1999):

Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high- dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard- dose cytarabine with daunorubicin and 6- thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group.

Blood, 93 (12): 4116-24.

Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, Wheatley K. (1998):

Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.

Lancet, 351(9104): 700-8.

Campone M, Vavasseur F, Le Cabellec MT, Meflah K, Vallette FM, Oliver L. (2001):

Induction of chemoresistance in HL-60 cells concomitantly causes a resistance to apoptosis and the synthesis of P-glykoprotein.

Leukemia, 15 (9): 1377-87.

Capranico G, Binaschi M. (1998):

DNA sequence selective topoisomerases and topoisomerases poisons.

Biochim Biophys Acta, 1400 (1-3): 185-94.

Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, Willman C, Hurd DD, Bennett JM, Blume KG, Head DR, Wiernik PH. (1998):

Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission.

N Engl J Med, 339(23): 1649-56.

Chalandon Y, Barnett MJ, Horsman DE, Conneally EA, Nantel SH, Nevill TJ, Nitta J, Shepherd JD, Sutherland HJ, Toze CL und Hogge DE. (2002):

Influence of cytogenetic abnormalities on outcome after allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission.

Biol Blood Marrow Transplant, 8(8): 435-43.

Champlin R, Gale RP. (1987):

Acute myelogenous leukemia: Recent advances in therapy.

Blood, 69(6): 1551-62.

Eriksson A, Lewensoh R, Larsson R, Nilsson A. (2002):

DNA –dependent protein kinase in leukemia cells and correlation with drug sensitivity.

Anticancer Res, 22(3): 1787-93.

Estey EH. (2000):

Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukaemia.

Leukemia, 14 (3): 476-9.

Fopp M, Fey MF, Bacchi M, Cavalli F, Gmuer J, Jacky E, Schmid L, Tichelli A, Tobler A, Tschopp L und von Fliedner V, Gratwohl A for the leukemia project group of the swiss group for clinical cancer research (SAKK). (1997):

Post-remission therapy of adulte acute myeloid leukemia: One cycle of high-dose versus standard-dose cytarabine.

Ann Oncol, 8(3): 251-7.

Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JR, Hickson ID. (1991):

Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines.

Cancer Res, 51 (24): 6592-5.

Gandhi V, Plunkett W. (2002):

Cellular and clinical pharmacology of fludarabin.

Clin Pharmacokinet, 41 (2): 93-103.

Gardner SN. (2000):

A mechanistic, predictive model of dose-response curves for cell cycle phase-specific and – nonspecific drugs.

Cancer Res, 60 (5): 1417-25.

Goldie JH, Coldman AJ. (1984):

The genetic origin of drug resistance in neoplasms: implications for systemic therapy.

Cancer Res 44 (9): 3643-53.

Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, Witz F, Milpied N, Delain M, Lioure B, Lamy T, Desablens B, Guilhot F, Caillot D, Abgrall JF, Francois S, Briere J, Guyotat D, Casassus P, Audhuy B, Tellier Z, Hurteloup P, Herve P. (1997):

Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM).

Blood, 90(8): 2978-86.

Herzig RH, Wolff SN, Lazarus HM, Phillips GL, Karanes C, Herzig GP (1983):

High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukemia.

Blood, 62(2): 361-9.

Hiddemann W. (1991):

Cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: The role and place of high-dose regimens.

Ann Hematol, 62(4): 119-28.

Hiddemann W, Buchner T. (1990):

Treatment strategies in acute myeloid leukemia (AML). Second line treatment.

Blut, 60(3): 163-71.

Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wormann B, Buchner T. (1999):

Management of acute myeloid leukemia in elderly patients.

J Clin Oncol, 17(11): 3569-76.

Jackson SP. (2002):

Sensing and repairing DNA double-strand breaks.

Carcinogenesis, 23(5): 687-96.

Kakihara T, Fukuda T, Tanaka A, Emura I, Kishi K, Asami K, Uchiyama M. (1998):

Expression of deoxycytidine kinase (dCK) gene in leukemic cells in childhood: decreased expression of dCK gene in relapsed leukemia.

Leuk Lymphoma, 31(3-4): 405-9.

Kamikubo KH, Ogata K, An E, Dan K. (2000):

Low proportion of G0-phase cells during induction chemotherapy correlates with subsequent remission in acute myeloid leukemia.

Hematol, 71 (3): 249-55.

Keating MJ, Smith TL, Kantarjian H, Cork A, Walters R, Trujillo JM, McCredie KB, Gehan EA, Freireich EJ. (1988):

Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome.

Leukemia, 2(7): 403-12.

Kern W, Schoch C, Haferlach T, Braess J, Unterhalt M, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W. (2000):

Multivariate analysis of prognostic factors in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia undergoing sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy: relevance of cytogenetic abnormalities.

Leukemia, 14(2): 226-31.

Kornblau SM, Vu HT, Ruvolo P, Estrov Z, O'Brien S, Cortes J, Kantarjian H, Andreeff M, May WS. (2000):

BAX and PKC alpha modulate the prognostic impact of BCL 2 expression in acute myelogenous leukemia.

Clin Cancer Res, 6(4): 1401-9.

Levasseur LM, Slocum HK, Rustum YM, Greco WR. (1998):

Modeling of the time-dependency of in-vitro drug cytotoxicity and resistance.

Cancer Res, 58(24): 5749-61.

Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. (2001):

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.

Cell Mol Life Sci, 58(7): 931-59.

Lo Coco F, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. (1998):

Acute promyelocytic leukaemia: a curable disease.

Leukemia, 12(12): 1866-80.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. (1999):

Acute myeloid leukemia.

N Engl J Med, 341(14): 1051-62.

Löwenberg B, Suciú S, Archimbaud E, Haak H, Stryckmans P, de Cataldo R, Dekker AW, Berneman ZN, Thyss A, van der Lelie J, Sonneveld P, Visani G, Fillet G, Hayat M, Hagemeyer A, Solbu G, Zittoun R. (1998):

Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy - the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group.

J Clin Oncol, 16(3): 872-81.

Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. (1998):

Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO- associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay.

Leukemia, 12(9): 1482-9.

Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, Fitzgerald P, Tan EM, Bokoch GM, Greenberg AH, Green DR. (1996):

The cytotoxic cell protease granzyme B initiated apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism.

Leukemia, 12(9): 1482-9.

Matsumoto Y, Takano H, Nagao S, Fojo T. (2001):

Altered topoisomerase II alpha and multidrug resistance-associated protein levels during drug selection: adaptations to increasing drug pressure.

Jpn J Cancer Res, 92(9): 968-74.

Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E 3rd. (1994):

Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B.

N Engl J Med, 331(14): 896-903.

Mitterbauer G, Nehmet P, Wacha S, Cross NC, Schwarzinger I, Jaeger U, Geissler K, Greinix HAT, Kahls P, Lechner K, Mannhalter C. (1999):

Quantification of minimal residual disease in patients with BCR- ABL- positive acute lymphoblastic leukemia using quantitative competitive polymerase chain reaction.

Br J Haematol, 106(3): 634-43.

Morganti M, Coronello M, Caciagli B, Biondi C, Quattrone A, capaccioli S, Mazzei T, Mini E. (2000):

Modulation of dihydrofolate reductase gene expression in methotrexate- resistant human leukemia CCRF-CEM/E cells by antisense oligonucleotides.

Anticancer Drugs, 11(4): 285-94.

Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. (1997):

Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia.

Semin Oncol, 24(1): 17-31.

O'Neill GM, Peters GB, Harvie RM, Mac Kenzie HB, Hennes S, Davey RA. (1998):

Amplification and expression of the ABC transporters ARA and MRP in a series of multidrug-resistant leukemia cell sublines.

Br J Cancer, 77(12): 2076-80.

Ozawa S, Sugiyama Y, Mitsunashi J, Inaba M. (1989):

Kinetic analysis of cell killing effect induced by cytosine arabinoside and cisplatin in relation to cell cycle phase specificity in human colon cancer and Chinese hamster cells.

Cancer Res, 49(14): 3823-8.

Peters WG, Colly LP, Willemze R. (1988):

High-dose cytosine arabinoside: Pharmacological and clinical aspects.

Blut, 56(1): 1-11.

Preisler HD, Rustum Y, Priore RL. (1985):

Relationship between leukemic cell retention of cytosine arabinoside triphosphate and the duration of remission in patients with acute non-lymphocytic leukemia.

Eur J Cancer Clin Oncol, 21(1): 23-30.

Preisler HD, Davis RB, Kirshner J, Dupre E, Richards F 3rd, Hoagland HC, Kopel S, Levy RN, Carey R, Schulman P et al. (1987):

Comparison of 3 remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute non-lymphocytic leukemia: a cancer and leukaemia group B study.

Blood, 69(5): 1441-8.

Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M. (2002):

Caspases - their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies.

Arch Immunol Ther Exp, 50(1): 19-34.

Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. (2001):

Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view.

Blood, 98(13): 13541-53.

Schmid C, Schleuning M et al. (2003):

Allogeneic stem cell transplantation after chemotherapy and dose reduced conditioning for high risk AML and MDS.

Bone Marrow Transplant suppl.: 572.

Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Loffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W: German AML Cooperative Study Group. (2001):

Patients with de novo acute myeloid leukemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients.

Br J Haematol, 112(1): 118-26.

Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS. (1964):

Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia.

Cancer Chemotherapy Rept, 35, 3-111.

Skorski T. (2002):

BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability.

Oncogene, 21(56): 8591-601.

Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA. (2003) :

Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors.

Immunity, 18(3): 319-29.

Thomas ED, Sanders JE, Flournoy N, Johnson FL, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Goodell BW, Storb R und Weiden PL. (1979):

Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia in remission.

Blood, 54(2): 468-76.

van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, de Boevere MJ, van der Holt B, Vossebeld PJ, Pieters R, Sonneveld P. (2001):

MDR1 gene-related clonal selection and P-glykoprotein function and expression in relapsed or refractory acute myeloid leukemia.

Blood, 97(11): 3605-11.

van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, Kuijpers M, Pieters R und Sonneveld P. (2001):

Absence of mutations in the deoxycytidine kinase (dCK) gene in patients with relapsed and/or refractory acute myeloid leukemia (AML).

Leukemia, 15(5): 855-6.

van der Kolk DM, de Vries EG, Muller M, Velenga E. (2002):

The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia.

Leuk Lymphoma, 43(4), 685-701.

Warrell RP, Jr, de The H, Wang ZY und Degos L. (1993):

Acute promyelocytic leukemia.

N Engl J Med, 329(3): 177-89.

Wheatley K. (1995):

Meta-analysis of randomized trials of idarubicin (IDAR) or mitoxantrone (MITO) vs daunorubicine as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML).

Blood, 86, 434a

Wiernik PH, Banks PL, Case DC Jr., Arlin ZA, Periman, PO, Todd MB, Ritch PS, Enck RE und Weitberg AB. (1992):

Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia.

Blood, 79(2): 313-9.

Zittoun RA, Mandelli F, Willenze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, Leonie F, Damasio E, Visani G, Papa G et al. (1995):

Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA). Leukemia Cooperative Groups.

N Engl J Med, 332(4): 217-23.

10. CURRICULUM VITAE

Name: Inka Zimmermann

Geburtstag: 30. April 1976

Geburtsort: Saarbrücken

Schulzeit: Grundschule in Weinstadt 1982 - 1985
Remstal - Gymnasium in Weinstadt 1986 -1995
Abitur - Juni 1995

Studium: Studium der Humanmedizin:
Ruprecht - Karls - Universität, Heidelberg – Vorklinik 1996 - 98
Physikum: März 1998
Ludwig - Maximilians - Universität, München – 1998 - 2003
I. Staatsexamen: März 2000
II. Staatsexamen: September 2002
III. Staatsexamen: Dezember 2003

Klinische Ausbildung: Ärztin im Praktikum seit Juni 2003, seit Oktober 2004
Assistenzärztin in der Abteilung Frauenheilkunde und
Geburtshilfe im Josefinum, Augsburg.

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. W. Hiddemann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Jan Braess. Ohne seine Kompetenz, Geduld und wohlwollende Unterstützung wäre es nie zu dieser Arbeit gekommen. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenso war Frau Heil als medizinisch technische Assistentin stets an meiner Seite und hat mich in allen praktischen Angelegenheiten unterstützt. Ihr danke ich für diese stete Hilfe bei allen technischen Fragen.

Wichtig für mich während der ganzen Zeit waren die Gespräche mit meinem Mitdoktoranden Dr. med. Michael Fiegl und Peter Schneiderat. Ihnen verdanke ich eine interessante Zeit im Labor.